



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

OSWALDO DE CASTRO COSTA NETO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA E
BIOCOMPATIBILIDADE DE MEMBRANA POLIMÉRICA NANO
ESTRUTURADA À BASE DE QUITOSANA.**

Rio de Janeiro

2023

OSWALDO DE CASTRO COSTA NETO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA E
BIOCOMPATIBILIDADE DE MEMBRANA POLIMÉRICA NANO
ESTRUTURADA À BASE DE QUITOSANA.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Área de Concentração: Periodontia) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia (Área de Concentração: Periodontia).

Orientador:

Prof. Dr. Jônatas Caldeira Esteves

Coorientador:

Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon

Rio de Janeiro

Agosto de 2023

CIP - Catalogação na Publicação

d837a de Castro Costa Neto, Oswaldo
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO ÓSSEA
GUIADA E BIOCOMPATIBILIDADE DE MEMBRANA POLIMÉRICA
NANO ESTRUTURADA À BASE DE QUITOSANA. / Oswaldo de
Castro Costa Neto. -- Rio de Janeiro, 2023.
55 f.

Orientador: Jônatas Caldeira Esteves.
Coorientador: Rafael Scaff de Molon.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, 2023.

1. Regeneração óssea. 2. Membranas. 3. Colágeno.
4. Quitosana. I. Caldeira Esteves, Jônatas, orient.
II. Scaff de Molon, Rafael, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Oswaldo de Castro Costa Neto

Avaliação do potencial de regeneração óssea guiada e biocompatibilidade de membrana polimérica nano estruturada à base de quitosana.

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em _____

Presidente, Prof. Dr. Jônatas Caldeira Esteves

Profa. Dra. Andréa Fonseca Gonçalves

Profa. Dra. Carina Maciel da Silva Boghossian

Prof. Dr. Carlos Soriano de Souza

Prof. Dr. Wagner Hespanhol

*Este trabalho é dedicado à minha esposa **Cibella** e minha filha **Maria Teresa** que estiveram sempre ao meu lado me dando força, incentivo e amor; aos meus pais **Oswaldo** e **Eliane**, pela minha vida, por me proporcionarem tudo que tenho e despertarem minha vocação à docência e à minha avó **Teresinha** (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador **Prof. Dr. Jônatas Caldeira Esteves**, pela dedicação, pelas horas devotadas à elaboração do trabalho, pelo incentivo, pelos ensinamentos, pela confiança, por ser um exemplo profissional, por me ajudar a conduzir este trabalho com carinho e sabedoria. E principalmente pela sua amizade. Serei eternamente grato.

Ao **Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon**, por ter aceitado ser meu orientador e pela confiança no trabalho realizado.

Ao **Prof. Dr. Plínio Cunha Sathler** e à equipe do Laboratório de Hemostasia Experimental (LabHEX) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ, especialmente à **Priscila de Souza Furtado** por todo suporte, auxílio e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral** e à equipe do Departamento Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRJ, especialmente à **Raphael Ferreira da Silva** por todo apoio e estrutura para o desenvolvimento do trabalho.

À **Profa. Da. Maria Cynésia Medeiros de Barros, Anna Thereza, Carmelo, Eduardo, Carina, Cláudia, Nilo, Victor, Davi, Monique e Rachel** e demais professores e alunos do Departamento de Periodontia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela dedicação, por todo aprendizado e boas experiências vividas no decorrer do curso.

Ao **Prof. Gerson Hayashi, Wagner Hespanhol, Maria Aparecida Cavalcanti, Ítalo Gandelman (in memoriam), Emanuel Mendes, Caroline Águeda, Rafael Mérola, Gustavo Nardone** e demais professores da disciplina de Cirurgia Oral da UFRJ, pelo companheirismo, dedicação, por todo aprendizado e boas experiências vividas no decorrer do curso.

À **Profa Dra- Lucianne Cople Maia**, pelo incentivo, cobrança e carinho, bem como à todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Odontopediatria da UFRJ onde pude aprender muito durante toda minha formação.

À **Profa Dra-Andréa Gonçalves**, minha primeira orientadora, ajudou a florescer em mim o espírito pela docência e me estimulou, desde o mestrado a buscar continuar minha formação e fazer o Doutorado

À Direção da Faculdade de Odontologia da UFRJ, especialmente ao **Prof.-Dr. Elson Braga** por toda estrutura e apoio para o cumprimento do curso e realização do trabalho.

Ao meu aluno de iniciação científica, **Renato Rocha Filho**, meu companheiro de cirurgias e sua fundamental ajuda e dedicação ao trabalho.

A todos meus colegas de PPGO, especialmente aos mais chegados **Walder, Lélia, Natasha, Cláudia e Samy**, pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

A todos os funcionários e servidores técnico administrativos da Faculdade de Odontologia da UFRJ, em especial aos que ficaram mais próximos durante esse período como **Beto** e **Silvana**, por toda boa vontade, alegria e incentivo para que me tornasse professor.

À Unidade de Microscopia Multiusuário Padrón-Lins (Unimicro), em nome do **Prof. Jefferson Cypriano** e ao LIN (Laboratório de instrumentação Nuclear) da UFRJ, em nome da **Profa Dra- Olga Oliveira**, por disponibilizarem toda estrutura pra obtenção dos dados

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

Aos meus primos e amigos em especial **Fernado** e **Leandro**, o apoio de vocês foi fundamental.

Aos meus amigos do **Instituto Fluminense de Implantodontia** que estiveram sempre comigo me motivando e onde pude colocar em prática os ensinamentos do magistério.

Aos meus alunos e companheiros da **UFRJ, IFI, INERO, ARMONIZZARE** e todos que tiveram a paciência de me ouvir e compartilhar descobertas, vocês foram o incentivo que sempre me fez ir adiante.

Aos familiares que sempre acreditaram no meu potencial e se orgulham da minha trajetória. Em especial meu **Tio Marcelo**, que tanto incentivou que fizesse o Doutorado.

À minha querida irmã **Sophia**, cunhado **Rafael** e minha afilhada **Carolina** e sobrinho **Miguel**, obrigado pela companhia e tantos momentos felizes.

Aos meus queridos pais, **Oswaldo** e **Eliane** pelos ensinamentos, pelo direcionamento na formação do meu caráter, por serem meus exemplos para nunca desistir dos meus sonhos, por me amarem muito e por terem acompanhado sempre. Vocês sempre foram meu maior apoio durante toda a minha formação acadêmica.

E a todos os envolvidos nesta pesquisa seja direta ou indiretamente, vocês foram essenciais para o meu crescimento profissional.

Meus sinceros agradecimentos.

A **Deus, Jesus** e à **Nossa Senhora** por me dar a vida, sabedoria, calma e força sempre.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA E BIOCOMPATIBILIDADE DE MEMBRANA POLIMÉRICA NANO ESTRUTURADA À BASE DE QUITOSANA.

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Odontologia com área de concentração em Periodontia.

A regeneração óssea guiada (ROG) é uma técnica muito utilizada na odontologia para reconstrução de defeitos alveolares para posterior instalação de implantes dentários. Para que a técnica seja efetiva, uma membrana que permita o isolamento de diferentes tipos teciduais é necessária. A quitosana nanoestruturada modificada por hidróxidos duplos lamelares (HDL) é um biopolímero sintético que busca unir as características promissoras da quitosana como material bioadesivo e com propriedades antimicrobianas com a hidrocalcita buscando aprimorar suas características estruturais. O objetivo deste estudo *in vivo* foi avaliar a biocompatibilidade e o potencial de regeneração óssea guiada de uma nova membrana produzida à base de quitosana nanoestruturada modificada por HDL. Ratos Wistar machos adultos (n=64) foram divididos randomicamente em 2 grupos de acordo com o tratamento: Colágeno (COL) e Quitosana (QTS). Os animais foram submetidos à cirurgia para instalação de uma membrana no subcutâneo da região dorsal e à realização de 2 defeitos críticos na calota craniana, respeitando cada lado do animal. O defeito do lado direito foi coberto por uma das membranas testadas (COL ou QTS) enquanto o outro permanecia descoberto (Controle). Oito animais de cada grupo foram sacrificados em 4 tempos de acompanhamento: 3, 7, 14 e 30 dias. Amostras de calota e subcutâneo foram coletadas e preservadas em paraformaldeído 4%. As amostras de calota foram escaneadas em

microtomográfico para análise da quantidade de osso neoformado. Em seguida, os espécimes de calota e subcutâneo foram processados laboratorialmente para exames histológicos em parafina: para avaliação histomorfológica das características do processo cicatricial e de degradação das membranas e histomorfométrica para quantificação do processo inflamatório e do nível de reação tecidual por meio do escore global de reação tecidual (EGRT). Análises descritivas e inferenciais foram realizadas para comparação entre os grupos com nível de significância de 5%. Os resultados não demonstraram diferenças entre os grupos COL e QTS quanto à intensidade do processo inflamatório e EGRT. Já em relação aos defeitos na calota, o grupo QTS apresentou maior neoformação óssea em relação ao grupo controle aos 30 dias ($p=0,04$). Com base nos resultados conclui-se que as membranas de quitosana nano particuladas modificadas por HDL apresentaram biocompatibilidade compatível com a membrana de colágeno e efetividade para uso como barreira em ROG.

Palavras-chave: Regeneração óssea, membranas, colágeno, quitosana

ABSTRACT

EVALUATION OF GUIDED BONE REGENERATION POTENTIAL AND BIOCOMPATIBILITY OF NANO-STRUCTURED POLYMERIC MEMBRANE BASED ON CHITOSAN.

Guided bone regeneration (GBR) is a technique widely used in dentistry to reconstruct alveolar defects for subsequent installation of dental implants. For the technique to be effective, a membrane that allows the isolation of different tissue types is necessary. Nanostructured chitosan modified by lamellar double hydroxides (HDL) is a synthetic biopolymer that seeks to combine the promising characteristics of chitosan as a bioadhesive material with antimicrobial properties with hydrocalcite seeking to improve its structural characteristics. The objective of this in vivo study was to evaluate the biocompatibility and guided bone regeneration potential of a new membrane produced based on nanostructured chitosan modified by HDL. Adult male Wistar rats (n=64) were randomly divided into 2 groups according to treatment: Collagen (COL) and Chitosan (QTS). The animals underwent surgery to install a membrane in the subcutaneous tissue of the dorsal region and to perform 2 critical defects in the cranial vault, respecting each side of the animal. The defect on the right side was covered by one of the tested membranes (COL or QTS) while the other remained uncovered (Control). Eight animals from each group were sacrificed at 4 follow-up times: 3, 7, 14 and 30 days. Calvary and subcutaneous samples were collected and preserved in 4% paraformaldehyde. The cap samples were scanned in a microtomograph to analyze the amount of newly formed bone. Then, the cap and subcutaneous specimens were processed in the laboratory for histological examinations in paraffin: for histomorphological evaluation of the characteristics of the scarring process and membrane degradation and histomorphometric for quantification of the inflammatory process and the level of tissue reaction through the global score of tissue reaction (EGRT). Descriptive and inferential analyzes were performed for comparison between groups with a significance level of 5%. The results showed no differences between the COL and QTS groups regarding the intensity of the inflammatory process and EGRT. In relation to the defects in the calvaria,

the QTS group presented greater new bone formation in relation to the control group at 30 days ($p=0.04$). Based on the results, it is concluded that the nanoparticulate chitosan membranes modified by HDL showed biocompatibility compatible with the collagen membrane and effectiveness for use as a barrier in GBR.

Key words: Bone regeneration, membranes, collagen, chitosan

ABSTRACTO

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA Y BIOCOMPATIBILIDAD DE MEMBRANA POLIMÉRICA NANOESTRUCTURADA A BASE DE QUITOSANO.

La regeneración ósea guiada (ROG) es una técnica ampliamente utilizada en odontología para reconstruir defectos alveolares para la posterior instalación de implantes dentales. Para que la técnica sea efectiva es necesaria una membrana que permita el aislamiento de diferentes tipos de tejido. El quitosano nanoestructurado modificado por dobles hidróxidos laminares (HDL) es un biopolímero sintético que busca combinar las características prometedoras del quitosano como material bioadhesivo con propiedades antimicrobianas con la hidrocalcita buscando mejorar sus características estructurales. El objetivo de este estudio in vivo fue evaluar la biocompatibilidad y el potencial de regeneración ósea guiada de una nueva membrana producida a base de quitosano nanoestructurado modificado por HDL. Ratas Wistar macho adultas (n=64) se dividieron aleatoriamente en 2 grupos según el tratamiento: Colágeno (COL) y Chitosán (QTS). Los animales fueron sometidos a cirugía para instalar una membrana en el tejido subcutáneo de la región dorsal y realizar 2 defectos críticos en la bóveda craneal, respetando cada lado del animal. El defecto del lado derecho quedó cubierto por una de las membranas probadas (COL o QTS) mientras que la otra permaneció descubierta (Control). Se sacrificaron ocho animales de cada grupo en 4 tiempos de seguimiento: 3, 7, 14 y 30 días. Se recogieron muestras del calvario y subcutáneas y se conservaron en paraformaldehído al 4%. Las muestras de la tapa se escanearon en una microtomografía para analizar la cantidad de hueso recién formado. Luego, la tapa y las muestras subcutáneas fueron procesadas en el laboratorio para exámenes histológicos en parafina: para evaluación histomorfológica de las características del proceso de cicatrización y degradación de la membrana e histomorfométrico para cuantificación del proceso inflamatorio y el nivel de reacción tisular a través del puntaje global de reacción tisular (EGRT). Se realizaron análisis descriptivos e inferenciales para comparación entre grupos con un nivel de significancia del 5%. Los resultados no mostraron diferencias

entre los grupos COL y QTS en cuanto a la intensidad del proceso inflamatorio y EGRT. En relación a los defectos en la calvaria, el grupo QTS presentó mayor formación de hueso nuevo en relación al grupo control a los 30 días ($p=0,04$). Con base en los resultados, se concluye que las membranas nanoparticuladas de quitosano modificadas por HDL mostraron biocompatibilidad compatible con la membrana de colágeno y efectividad para su uso como barrera en ROG.

Palabras clave: Regeneración ósea, membranas, colágeno, quitosano.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ROG – Regeneração óssea guiada

COL – Colágeno

QTS – Quitosana

GAGS - Glicosaminoglicanos

HDL - Hidróxidos duplos lamelares

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

CCS – Centro de Ciências da Saúde

mg – Miligrama

Kg – Quilograma

μCT– Microtomografia computadorizada

LIN – Laboratório de Instrumentação Nuclear

kV – Quilovolts

μA – Miliamperes

ms – Metros por segundo

μm -Micrômetro

μm²– Micrômetro quadrado

VO – Volume ósseo

VT – Volume total

EGRT - Escore global de reação tecidual

H&E – Hematoxilina – Eosina

RTG – Regeneração tecidual guiada

PDO – Polidioxanona

PLA – Ácido polilático

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura da membrana de quitosana modificada por HDL	20
Figura 2 – Cirurgia animal.....	25
Figura 3 – Microtomógrafo.....	26
Figura 4 –. Regiões de interesse da Micro-CT.....	27
Tabela 1 – Critérios para classificação da intensidade do processo inflamatório.....	29
Tabela 2 – Sistema de avaliação histológico	30
Tabela 3 – Análises realizadas	30
Figura 5 – Imagens microtomográficas das calotas.....	33
Figura 6 – Resultados das análises de Micro-CT	34
Figura 7 - Imagens histológicas de subcutâneo 3 dias magnificação 50	35
Figura 8 – Imagens histológicas de subcutâneo 3 dias magnificação 200	35
Figura 9– Imagens histológicas de subcutâneo 3 dias magnificação 400	36
Figura 10 – Imagens histológicas de subcutâneo 7 dias magnificação100	36
Figura 11 – Imagens histológicas de subcutâneo 7 dias magnificação 400	37
Figura 12 – Imagens histológicas de subcutâneo 14 dias	38
Figura 13 – Imagens histológicas de subcutâneo 30 dias	39
Figura 14 – Imagens histológicas das calotas	41
Figura 15 - Intensidade do processo inflamatório no subcutâneo	42
Figura 16 – Escore global de reação tecidual subcutâneos	42

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Tamanho da amostra	23
3.2 Desenho do estudo.....	24
3.3 Procedimento cirúrgico.....	24
3.4 Avaliação microtomográfica da neoformação óssea.....	26
3.5 Processamento histológico	27
3.6 Avaliação histomorfológica da dinâmica cicatricial e degradação das membranas	28
3.7 Análise histométrica do processo inflamatório e reação tecidual das membranas implantadas no subcutâneo	28
3.8 Análises estatísticas	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Avaliação microtomográfica da neoformação óssea	32
4.2 Avaliação histomorfológica da dinâmica cicatricial e degradação das membranas.....	34
4.2.1 Subcutâneo	34
4.2.2 Calota	39
4.3 Avaliação histométrica do processo inflamatório e reação tecidual das membranas implantadas no subcutâneo	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO	56

1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de tecido ósseo, tanto em altura como espessura, é um requisito fundamental para reabilitação dentária implanto-suportada. Após a extração, o processo de cicatrização do alvéolo dental ocorre em diferentes estágios, desde os primeiros dias até muitos anos após o procedimento. Inicialmente, ocorre a formação de um coágulo sanguíneo seguido pela invasão de células inflamatórias e liberação de fatores de crescimento que estimulam a proliferação de células envolvidas na reparação óssea (ARAÚJO & LINDHE, 2005; LEE et al., 2018). Nos primeiros meses ocorre a formação de osso novo, em que células-tronco mesenquimais e osteoblastos presentes no coágulo sanguíneo iniciam a produção de uma matriz óssea inicial, rica em colágeno tipo I. Ao longo do tempo, os osteoblastos sintetizam e secretam mais componentes da matriz óssea, que proporciona um ambiente propício para a mineralização, com a deposição de cristais de hidroxiapatita. (PIETROKOWSKI et al., 2020).

Em até 12 meses seguidos à extração dentária, até 50% do volume da crista alveolar pode ser reabsorvida, sendo que dois terços desta perda ocorrem nos três primeiros meses (NOVAES et al., 2011). A magnitude de reabsorção varia de acordo com a região da arcada dentária e espessura da parede alveolar (JONASSON et al.; 2018). Ao longo dos vários anos seguintes, o osso alveolar passa por remodelação, com reabsorção da porção vestibular e aumento da densidade óssea na área basal (ARAÚJO & LINDHE., 2005). A atrofia do rebordo ósseo decorrente da extração dentária também pode ser observada nos tecidos moles, uma vez que a conformação da mucosa seguirá a perda volumétrica do osso subjacente (MARTINS, 2021).

O processo de reabsorção óssea seguido à extração dentária é resultado da ausência de estímulo funcional e carga mecânica no osso alveolar, que leva à diminuição do suprimento sanguíneo e da atividade remodelatória (ARAÚJO & LINDHE; PIETROKOWSKI et al., 2020). Numerosos estudos documentaram as mudanças progressivas na altura e espessura do osso alveolar após a extração dentária, destacando a necessidade de técnicas apropriadas de preservação e regeneração óssea para manter a integridade do rebordo edêntulo (LEE et al., 2018; CHIAPASCO et al., 2009; CHIAPASCO et al., 2019). Sem intervenção ou

utilização dessas técnicas, a reabsorção do rebordo pode impedir a subsequente instalação de implantes e comprometer os resultados estéticos e funcionais da reabilitação (BUSER et al., 2021; SCHWARTZ & SALAMA, 2003).

As técnicas de Regeneração Óssea Guiada (ROG), desempenham um papel crucial na promoção da preservação e na recuperação das dimensões do rebordo edêntulo para a colocação bem-sucedida do implante osseointegrável (URBAN et al., 2018; PIETROKOWSKI et al, 2020). Dentre as opções de tratamento a ROG tem se destacado como uma abordagem eficaz, produzindo aumentos ósseos verticais e horizontais de até 4,4mm em altura e 4,6mm em espessura, respectivamente, com taxas de sucesso entre 90 e 95% dos implantes instalados em rebordo ósseos reconstruídos, segundo revisões sistemáticas e meta análises recentes (HAMMERLE et al., 2019; MONJE et al. 2019.; CLEMENTINI et al, 2012).

Para que haja a ROG, a utilização de membranas constitui uma etapa fundamental durante a cirurgia, pois permite a criação de um ambiente propício para o crescimento de tecido ósseo por meio do isolamento de células de tecido epitelial e fibroso que possuem maior velocidade replicativa (SCHWARTZ; SALAMA, 2003; URBAN et al., 2017). A técnica envolve a aplicação da membrana sobre o alvéolo ou defeito ósseo, podendo estar associada ou não à utilização concomitante de enxertos ósseos, proporcionando uma barreira física que estabelece uma câmara de reparo contendo células e fatores de crescimento ósseo, isolados de tecidos de mais rápida proliferação (BUSER et al., 2021; KIM et al., 2020).

As membranas de ROG dividem-se em dois grandes grupos, as reabsorvíveis produzidas a partir de colágeno homogêneo, xenógeno ou polímeros biodegradáveis (Biogide®, Jason®, BioMend® e AlloDerm®) e as não reabsorvíveis, produzidas especialmente a partir de materiais metálicos ou poliméricos (Gore-tex®, Cytoplast®) (WANG et al., 2018). As membranas não reabsorvíveis apresentam como principal característica a estabilidade de sua integridade ao longo do período de neoformação óssea. Quando reforçadas com lâminas de titânio, propiciam conformação tridimensional, fornecendo um arcabouço firme e modelável para preenchimento com osso autógeno ou substituto ósseo particulado (HÄMMERLE et al., 2003). Por outro lado,

apresentam como desvantagens uma maior suscetibilidade à infecção, exposição prematura e principalmente a necessidade de um novo procedimento cirúrgico para sua remoção (VILLAR et al., 2010).

As membranas reabsorvíveis não apresentam a necessidade de remoção e são degradadas em períodos variáveis de acordo com a natureza do material. Uma membrana reabsorvível ideal deve apresentar boa resistência estrutural que permita minimizar as chances de colapso, tempo de degradação previsível e condizente com o período de neoformação óssea, além de não produzir metabólitos citotóxicos durante seu processo de degradação (SHEIKH et al., 2016; WANG et al., 2018). Dentre as membranas reabsorvíveis, a BioGide® (Geistlich Pharma AG, Root, Suíça) destaca-se no mercado por reunir características e propriedades importantes para o sucesso da ROG. Ela é composta por colágeno tipo I e III de origem suína, possuindo duas faces: uma rugosa, que deve estar voltada para o tecido ósseo para permitir uma adesão de células ósseas progenitoras, e uma lisa que deve estar voltada para o tecido mole, tornando-se uma base para a adesão de fibroblastos, favorecendo a cicatrização do tecido mole além de exercer uma função de barreira, isolando o defeito ósseo. (ALPAR et al., 2000; ROTHAMEL et al., 2005; SCHAWRZ et al., 2008). Além disso, ela possui alta biocompatibilidade e se degrada ao longo de 4 semanas (ROTHAMEL, et al., 2005; SCHWARZ et al., 2008; LEE et al., 2014), permitindo a regeneração do tecido ósseo (CHIAPASCO et al., 2019; URBAN et al., 2018). Estudos clínicos têm demonstrado a eficácia da Biogide® na ROG apresentando resultados positivos em termos de ganho ósseo e estabilidade dos implantes (ARAOZ et al., 2019; FELICE et al., 2018).

Ao longo dos anos, outros materiais vêm sendo desenvolvidos buscando aprimorar as qualidades das membranas reabsorvíveis de colágeno conferindo melhores características para o uso clínico como maior rigidez, elasticidade e manuseabilidade, mantendo o tempo de degradação e biocompatibilidade para o sucesso da ROG (SHEIKH et al., 2016; GIANNITELLI et al., 2015).

Nesse contexto de desenvolvimento e aprimoramento de novas membranas, a quitosana tem se destacado em pesquisas recentes que buscam materiais com características ideais (BHOWMICK et al., 2017). Trata-se de um biopolímero natural de baixo custo, derivado da quitina, uma substância encontrada nas cascas de crustáceos como camarões, caranguejos e lagostas.

A quitina é extraída a partir dessas fontes naturais e, em seguida, passa por um processo de desacetilação para a obtenção da quitosana (MUZZARELLI, 2011). Este biopolímero apresenta resistência ao calor, biocompatibilidade, bioadesividade, biodegradabilidade, não imunogenicidade, atoxicidade, capacidade de formação de estruturas flexíveis e maleáveis além de propriedades antimicrobianas (KUMAR-KRISHNAN et al., 2015; BHOWMICK et al., 2017; RAJENDRAN et al., 2020; SUN et al., 2021). Essa última propriedade é particularmente relevante em cirurgias orais, onde a microbiota residente representa um risco constante de contaminação e infecção de materiais implantados ou tecidos enxertados (CHIAPASCO; ZANIBONI, 2009). A quitosana demonstra ainda semelhança estrutural com glicosaminoglicanos (GAGS) da matriz extracelular óssea que interagem com as fibras de colágeno, disso permite-se inferir suas propriedades de adesão celular e osteocondutividade (FROHBERGH et al., 2012; PANGON et al., 2016; LOGITHKUMAR et al., 2016; SHAHRIARPANAH et al., 2016; WANG et al., 2021). Além disso, a quitosana tem sido amplamente explorada como matriz para liberação controlada de fármacos, oferecendo benefícios como aumento da biodisponibilidade e redução de efeitos colaterais dos medicamentos carregados (GADKARI et al., 2020; EL KASSAS et al., 2021).

Apesar dos recentes avanços no uso médico da quitosana, algumas características do material ainda limitam seu uso. O uso da quitosana como biomaterial substituto ósseo foi avaliado por SPIN-NETO et al (2008). Os autores testaram um gel à base de quitosana de alto e baixo peso molecular para preenchimento de defeitos ósseos em calota craniana de ratos, avaliando seu potencial osteocondutor e osteoindutor. Os resultados demonstraram que os polímeros de ambos os pesos moleculares não foram capazes de promover neoformação óssea, comprovando sua inabilidade de promover indução ou condução do processo cicatricial do osso.

Embora a possibilidade de uso da quitosana enquanto substituto ósseo tem sido refutada, a literatura apresenta estudos utilizando este polímero com modificações estruturais e em associação a outros materiais para uso em ROG. Wang et al. (2018) observaram uma significativa formação óssea em defeitos críticos tratados com membranas de quitosana com nanoestruturas alinhadas por gradiente, promovendo uma maior neoformação e densidade óssea.

Resultados semelhantes foram relatados por HU et al. (2019), que investigaram o uso de membranas de quitosana com estrutura modificada e associada ao colágeno, constatando uma notável regeneração óssea e aumento na expressão de marcadores osteogênicos. Em outro estudo conduzido por YANG et al. (2020), as membranas de quitosana foram combinadas com fatores de crescimento para regeneração óssea e demonstraram uma melhoria significativa na osteogênese e na vascularização do tecido regenerado.

Em sua estrutura original, a quitosana é mecanicamente frágil e rapidamente biodegradada, o que limitaria demasiadamente sua aplicabilidade na ROG (CHEN et al., 2016). Diante disso, novos estudos têm sido realizados buscando o aprimoramento do material (LOPES et al., 2014; SU et al., 2017; BAJPAI et al., 2017). Se quando isolada, a quitosana parece produzir membranas frágeis, quando combinada com argilas nanométricas, especialmente as de dupla camada como os hidróxidos duplos lamelares (HDL) do tipo hidrocalcita, intercaladas pelo polímero, pode resultar em melhores propriedades térmicas e mecânicas, tornando o material mais resistente, flexível e com maior tempo de degradação (Figura 1) (HUANG et al. 2017; BHOWMICK et al., 2017; De SOUZA et al., 2023).

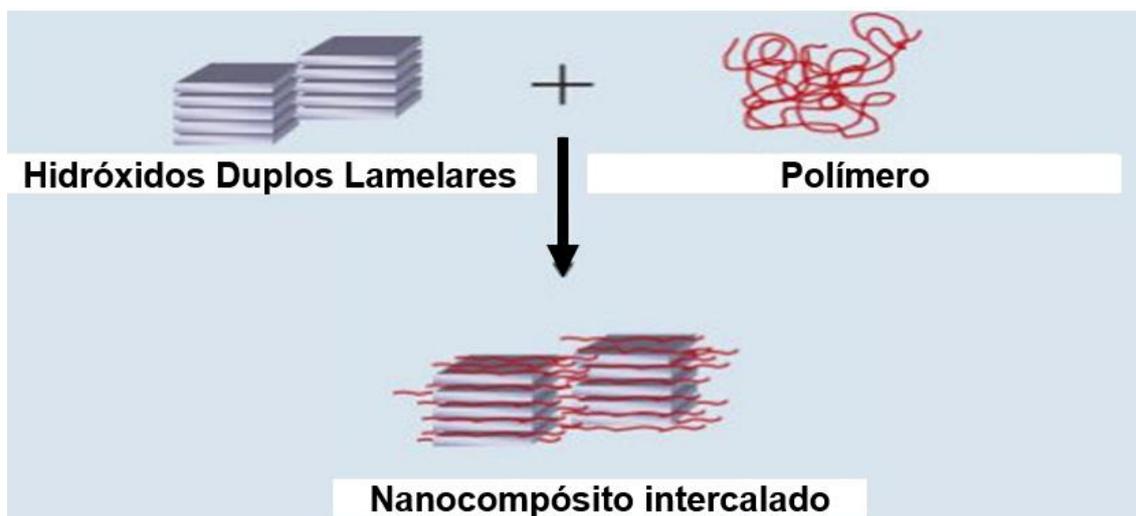


Figura 1 – Estrutura da quitosana modificada por HDL

Um estudo recente publicado por DE SOUZA et al. (2023) demonstrou que as membranas de quitosana com hidrocalcita nanoparticulada apresentaram o melhor desempenho em relação a membranas de quitosana pura em ensaios

in vitro, principalmente a membrana formada com quitosana de baixo e médio peso molecular, representando um potencial de nova terapia para ROG.

Com base nesses achados, infere-se que a investigação do potencial de regeneração óssea de uma nova membrana nanoestruturada à base de quitosana modificada por HDL deverá contribuir para o desenvolvimento de uma nova linha de membranas de baixo custo, uma vez que as membranas de colágeno possuem um custo mais elevado e são obtidas a partir de tecido xenógeno, de origem bovina, suína ou equina. Assim, mais estudos que investiguem a sua capacidade de direcionar efetivamente o crescimento do tecido ósseo são relevantes e perfeitamente justificáveis. (WANG et al., 2021).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vivo* a biocompatibilidade e desempenho na ROG de uma membrana nanoestruturada à base de quitosana, modificada por HDL, comparada à membrana de colágeno.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho das membranas de quitosana na neoformação óssea em defeitos críticos de calotas cranianas de ratos ao longo do tempo por meio dos seguintes parâmetros: volume ósseo, volume ósseo sobre volume total, número de trabéculas, espessura das trabéculas e espaço intertrabecular.
- Avaliar a reação tecidual produzida pelas membranas quando instaladas no tecido subcutâneo dos animais.
- Avaliar dinâmica cicatricial e degradação das membranas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Neste estudo experimental, em modelo animal, foram utilizados 64 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) da mesma linhagem, machos, adultos de aproximadamente 8 semanas, saudáveis e com aproximadamente 300g. Animais que não tivessem essas características não foram utilizados. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia, no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, sob o parecer A6/20-008-17 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CCS-UFRJ) (Anexo A).

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 2 grupos com 32 animais cada: Grupo COL (membrana de colágeno) e Grupo QTS (membrana de quitosana) por meio de randomização simples por lançamento de moeda. Todos os animais foram submetidos à cirurgia para implantação subcutânea das membranas e emprego delas como barreira sobre defeitos críticos produzidos em calota craniana.

3.2 – Tamanho da amostra

Baseado no estudo de SONG et al., 2014, o tamanho da amostra foi determinado considerando 8 a diferença entre as médias do volume ósseo total formado entre calotas com defeitos cobertos com membrana de colágeno e de quitosana ($2,5 \pm 1,6$). Em acréscimo, um erro de 0,05 e poder de 80% e um teste bilateral foram parâmetros considerados. Assim, 7 animais são necessários, totalizando 14 ratos. Assumindo uma perda de 10%, mais 1 animal foi adicionado por grupo de modo que 8 ratos foram necessários para compor a amostra por grupo em cada tempo de avaliação, totalizando 64 ratos.

O cálculo foi realizado no software BioEstat 5.3 (IDSM, Belém, Pará, Brasil), assumindo um nível de significância de 0.05 e o poder do teste de 0.8.

Este trabalho seguiu os parâmetros metodológicos definidos pelo guia de estudos em modelo animal ARRIVE 2.0 (PERCIE DU SERT et al., 2020).

3.3 – Procedimento cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo operador, previamente treinado, utilizando as mesmas técnicas em ambos os grupos. Cada rato foi anestesiado com uma combinação de cloridrato de xilazina (DopaserR - Bayer S. A – Saúde Animal, Brasil) na dosagem de 10mg/Kg de peso corporal, para promover o relaxamento muscular; e na sequência, cloridrato de quetamina (Quetamin® - Virbac do Brasil Ltda, Brasil) na proporção de 75mg/Kg de massa corporal para anestesia, por via intraperitoneal.

Após a anestesia, os animais foram tricotomizados na região da cabeça e do dorso, posicionados em decúbito ventral e imobilizados em placa de aquecimento. Foi realizada antissepsia com clorexidina 2%, seguida de enxágue com soro fisiológico estéril e secagem com gaze estéril. Posteriormente, foram posicionados campos cirúrgicos fenestrados para isolamento das regiões operatórias.

Para implantação subcutânea da membrana, uma incisão foi realizada na região dorsal direita de cada animal seguida por divulsão tecidual subcutânea, com tesoura de metzenbaum, criando uma loja cirúrgica onde uma membrana de 6x6mm de colágeno ou quitosana foi inserida na intimidade dos tecidos (Figuras 2a e 2b).

Para acesso à calota craniana, uma incisão cutânea sagital foi realizada até o periósteo, desde o limite correspondente ao contorno posterior da cavidade orbitária até o limite anterior das bases das orelhas, permitindo acesso cirúrgico à região dos ossos parietais, com extensão de aproximadamente 3 cm (Figura 2C). Em seguida, o retalho dermoperiosteal foi descolado para exposição de ambos os ossos parietais direito e esquerdo. Dois defeitos ósseos circulares, de 5mm de diâmetro, foram produzidos por uma broca tipo trefina de 5mm de diâmetro acoplada em contra-ângulo redutor 20:1 (WS-75 W&H, W&H Dentawerk, Burmoos, Áustria), em motor de baixa rotação (Implantmed, W&H Dentawerk, Burmoos, Áustria), a 1100RPM, com irrigação profusa de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Os fragmentos ósseos centrais produzidos pela trefina foram removidas com auxílio de um tunelizador tecidual (Quinelato

Indústria e Comércio Ltda, Rio Caro, São Paulo, Brasil). De acordo com sorteio realizado, os defeitos ósseos do lado direito foram recobertos pela membrana de 6x6mm de colágeno ou quitosana, de acordo com cada grupo. Já o defeito do lado esquerdo permaneceu sem cobertura (Grupo Controle). Periósteo e pele foram suturados, estabilizando as membranas em posição, com fio de nylon 5-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical Limited, São José dos Campos, São Paulo, Brasil). A figura 2 apresenta a sequência cirúrgica.

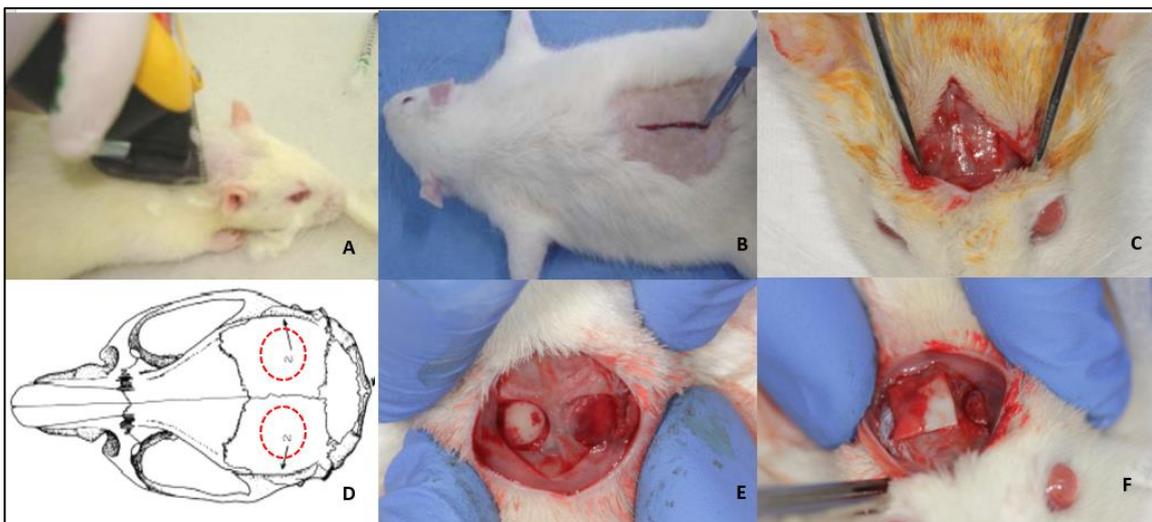


Figura 2 – Sequência cirúrgica. A- Tricotomia; B- Incisão subcutânea do dorso; C- Incisão dermoperiosteal; D- Modelo esquemático das osteotomias; E – Osteotomias realizadas na calota; F- Membrana de quitosana instalada sobre o defeito.

Após a sutura, os animais foram medicados com dipirona (0,2 mg/Kg), e pentabiótico veterinário reforçado (0,1 mg/Kg), ambos por via intramuscular, em dose única. Após o procedimento cirúrgico, cada animal permaneceu em observação em ambiente controlado, envolto em cobertor térmico e após a recuperação anestésica, receberam ração comercial padronizada e água *ad libitum*. Oito animais de cada grupo (COL e QTS) tiveram a morte induzida de acordo com os períodos de estudo: 3, 7, 14 e 30 dias por meio de sobredose de anestésico volátil isoflurano, em câmara saturada por vapor anestésico.

Para a coleta das amostras, os animais foram novamente tricotomizados na calota e no dorso. Um fragmento de pele de 10x10mm foi removido da região do dorso englobando a área de implantação da membrana. Esses fragmentos

foram colocados imediatamente em tubos falcon contendo solução de paraformaldeído a 4% tamponado em pH 7,4, durante 48 horas. As calotas foram coletadas por meio de tesoura de ponta romba, isolando a porção superior da calota em uma peça, envolvendo pele, subcutâneo, periósteo e os ossos parietais, incluindo os defeitos ósseos. Cérebro e meninges foram removidos dos espécimes. As amostras foram também fixadas em solução de paraformaldeído a 4% tamponado em pH 7,4 durante 48 horas para processamento histológico.

3.4 – Avaliação microtomográfica da neoformação óssea.

As amostras de calota foram encaminhadas para o Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) da UFRJ. Para o processo de aquisição das imagens foi utilizado o Microtomógrafo Skyscan Bruker 1273 (Bruker, Kontich, Bélgica) (Figura 3), utilizando uma energia de 40 kV, uma corrente de 200 μ A, um tempo de exposição em cada projeção de 327 ms, 5 frames e um tamanho de voxel de 12 μ m.



Figura 3 - Apresentação do Microtomógrafo Skyscan Bruker 1273.

As peças foram escaneadas em 360° e em passo angular de 0,5 grau, gerando o total de 720 projeções. A reconstrução foi feita com o software NRecon (Microphotronics Inc., Allentown, Pensilvânia, EUA) onde foram aplicadas correções de alinhamento, correção de endurecimento de feixe e um filtro de realce de borda. Para visualização das imagens reconstruídas utilizou-

se os softwares CTVox (Bruker, Kontich, Bélgica) e Avizo 2020.1 (Thermo Fisher Scientific, Berlim, Alemanha). Antes de realizar as análises, a reconstrução de cada amostra foi alinhada com o software Data Viewer (Extron, Anaheim, Califórnia, EUA), a fim de facilitar a identificação e delimitação da região de interesse a ser analisada. Utilizando o software CTanalyser (KvTester, Wuham, China), em cada calota, foi verificado o corte coronal para traçar as regiões de interesse a serem analisadas. O volume tridimensional com o destaque nas regiões pode ser visto na figura 5. As seguintes características foram analisadas: Volume ósseo (porcentagem de formação óssea em relação ao defeito original), volume ósseo sobre volume total (porcentagem), número de trabéculas por μm^2 , espessura das trabéculas e espaço intertrabecular.

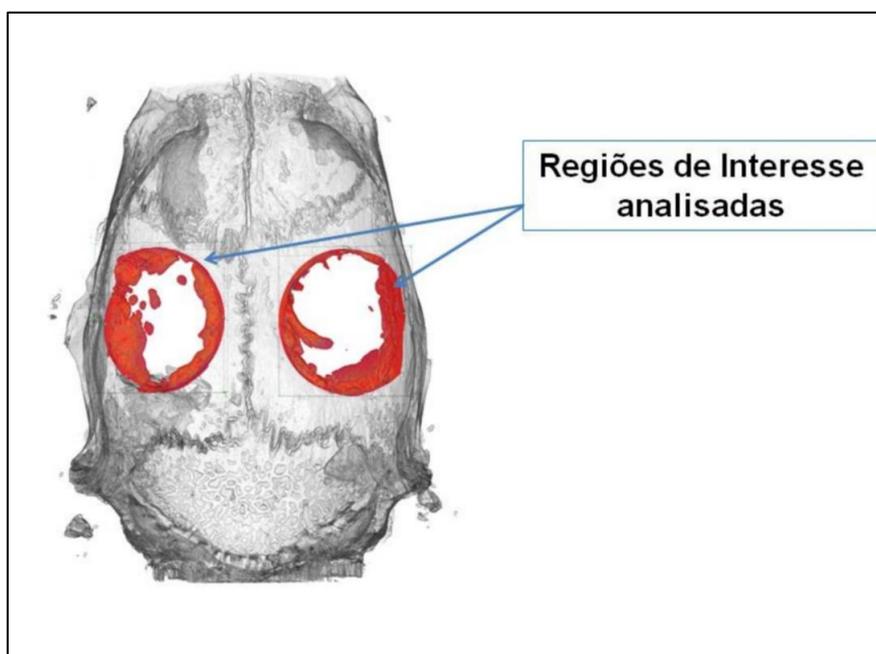


Figura 4 - Destaque das regiões de interesse analisadas em cada amostra.

3.5 – Processamento histológico

Após o escaneamento microtomográfico, as amostras de calota, bem como o tecido subcutâneo, foram encaminhadas para processamento histológico para obtenção de cortes em parafina. As calotas foram descalcificadas em EDTA (0,5M pH 8.0), durante 8 semanas, com três trocas semanais, em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi neutralizado em água corrente durante 24 horas, desidratado numa sequência de álcoois em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e finalmente embebidos em

parafina. O material de cada animal foi cortado em micrótomo com cortes semiseriados de 4µm de espessura, no plano coronal. Cortes histológicos foram obtidos da porção mais central do defeito. As lâminas da calota e subcutâneo foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

3.6 – Avaliação histomorfológica da dinâmica cicatricial e degradação das membranas

Todas as análises foram realizadas na UniMicro – Unidade de Microscopia Multiusuário Pádron-Lins, CCS, UFRJ, por um único examinador sênior, com experiência nas análises propostas.

As lâminas de subcutâneo, coradas com HE, foram analisadas sob microscopia ótica no Microscópio Axio Imager D2 (Zeiss, Jena, Alemanha), equipado com a câmera AxioCam MRc 5 (Zeiss, Jena, Alemanha) com lentes objetivas de diferentes aumentos (5, 10, 20 e 40x) para avaliação histomorfológica da implantação subcutânea das membranas. Foram analisados a integridade da membrana, o padrão da reação inflamatória tecidual, características celulares do processo inflamatório e a dinâmica cicatricial ao redor das membranas ao longo dos períodos de análise. Nos espécimes de calota craniana, avaliou-se a dinâmica de cicatrização no interior dos defeitos recobertos ou não pelas membranas. Características histológicas do infiltrado inflamatório, tecido de granulação e osso neoformado foram analisados em microscopia de luz em todos os períodos de análise.

3.7 – Análise histométrica do processo inflamatório e reação tecidual das membranas implantadas no subcutâneo

A quantificação da intensidade do processo inflamatório e escore geral de reação tecidual foram conduzidas por um único examinador previamente treinado e calibrado para as análises. A calibração se deu por meio da análise

de 3 espécimes, realizadas em 2 momentos distintos, com 7 dias de intervalo (ICC = 0,95). A intensidade do processo inflamatório foi classificada em relação ao período do estudo (3, 7, 14 ou 30 dias), usando um sistema de pontuação de 4 pontos: 0 = ausente, 1 = leve ou discreto, 2 = moderado e 3 = intenso ou grave para determinar o grau de resposta celular inflamatória (Tabela 2). (Ørstavik et al., 1988; Batista et al., 2007; Bavariya et al., 2013).

Tabela 1 – Critérios para classificação da intensidade do processo inflamatório

Escore		Descrição
0	Ausente	Pequena espessura da zona de reação inflamatória, nenhuma ou poucas células inflamatórias.
1	Leve ou discreto	Aumento da zona de reação inflamatória, presença de macrófagos e/ou plasmócitos.
2	Moderado	Aumento da zona de reação inflamatória, presença de macrófagos e plasmócitos e poucos granulócitos e/ou linfócitos neutrófilos.
3	Intenso ou grave	Áreas focais de necrose; tecido densamente infiltrado por células inflamatórias.

A resposta do tecido *in vivo* às diferentes membranas foi avaliada de acordo com a norma ISO de sistema de avaliação histológica de reação Tecidual para materiais implantados - DIN EN ISO 10993-6 (LINDER et al., 2022). Em cada lâmina (referente a um único animal), três regiões de interesse foram pontuadas quanto aos diferentes tipos celulares e respostas teciduais estabelecidos nos nove parâmetros de análise e escores detalhados na tabela 2. O valor mediano das três regiões de interesse, em cada parâmetro de análise, foi usado como réplica biológica representativa cada animal. o Escore Global de Reação Tecidual (EGRT) foi calculado de acordo com a soma dos escores de cada item avaliado, estabelecido como Reação Mínima: Somatória de zero a 2,9, Reação Leve: Somatória de 3 a 8,9, Reação Moderada: Somatória de 9 a 15 e

Reação Severa: Somatória maior que 15,1. (Tabela 3) (LINDER et al., 2022). A tabela 4 apresenta o resumo das análises e períodos de análise realizados em cada espécime.

Tabela 2 – Sistema de Avaliação Histológica para Irritação/Reatividade - Tipo de Célula/Resposta

Resposta	Escore				
	0	1	2	3	4
Polimorfonucleares	0	1-5 = Raro	6-10	Moderadamente infiltrado	Muito infiltrado
Linfócitos	0	1-5 = Raro	6-10	Moderadamente infiltrado	Muito infiltrado
Plasmócitos	0	1-5 = Raro	6-10	Moderadamente infiltrado	Muito infiltrado
Macrófagos	0	1-5 = Raro	6-10	Moderadamente infiltrado	Muito infiltrado
Células gigantes	0	1-5 = Raro	6-10	Moderadamente infiltrado	Muito infiltrado
Necrose	0	Mínima	Leve	Moderada	Acentuada
Neovascularização	0	1- 3 = Mínima proliferação capilar	Grupos de 4-7 capilares	Banda de capilares com estruturas de suporte	Extensiva banda de capilares com estruturas de suporte
Fibrose	0	Fina camada	Camada moderada	Camada grossa	Camada espessa
Infiltrado gorduroso	0	Mínima quantidade de infiltrado gorduroso com fibrose	Algumas camadas de infiltrado gorduroso com fibrose	Acúmulo de infiltrado gorduroso com fibrose	Extensiva camada de infiltrado gorduroso com fibrose

Escore de reação = (Polimorfonucleares + Linfócitos + Plasmócitos + Macrófagos + Células gigantes + Necrose) X 2 + (Neovascularização + Fibrose + Infiltrado gorduroso)

Tabela 3 – Análises realizadas de acordo com o material, grupo e tempo de estudo

	µCT	Histomorfológica	Intensidade do processo inflamatório	Escore geral de reação tecidual (EGRT)
Material	Calota	Calota e Subcutâneo	Subcutâneo	Subcutâneo
Grupo	Controle; COL e QTS	Controle (Calota); COL e QTS	COL e QTS	COL e QTS
Tempo	14 e 30 dias	3, 7, 14 e 30 dias	3, 7, 14 e 30 dias	3, 7, 14 e 30 dias

3.8 – Análises Estatísticas

Os dados quantitativos obtidos nas análises microtomográficas, na mensuração da intensidade do processo inflamatório e no EGRT foram analisados por estatística descritiva e inferencial. Para avaliação da normalidade, as amostras foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre os grupos, os valores da avaliação microtomográfica e do EGRT foram comparados pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Os dados de intensidade do processo inflamatório foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Os cálculos foram realizados por meio do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

De forma geral, os animais apresentaram boa recuperação após as cirurgias. As feridas cirúrgicas cutâneas apresentaram-se cicatrizada já aos 14 dias e no momento da coleta das amostras a membrana de quitosana podia ser observada macroscopicamente em todos os espécimes, tanto no subcutâneo como na calota. Aos 14 e 30 dias, nenhum dos espécimes, tanto no Grupo COL como no QTS, apresentavam sinais macroscópicos de inflamação, infecção ou exteriorização dos tecidos. A membrana de colágeno, por sua vez, era visível nos períodos de 3, 7 e 14 dias. Aos 30 dias, ela apresentava dimensões reduzidas e completamente integrada ao tecido sobrejacente à calota, sendo distinguida como um espessamento tecidual sobre o defeito ósseo. Esse padrão macroscópico era igualmente observado nos espécimes de subcutâneo. A membrana de quitosana, apesar da completa integração tecidual, apresentava dimensões muito próximas da original e era facilmente identificável em todos os espécimes tanto de subcutâneo como de calota.

4.1 – Avaliação microtomográfica da neoformação óssea.

A análise microtomográfica aos 14 dias demonstrou uma maior tendência de neoformação óssea nos defeitos recobertos pelas membranas, embora não tenha sido detectada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Aos 30 dias o grupo QTS demonstrou maior volume de osso neoformado em comparação ao grupo controle ($p = 0,04$).

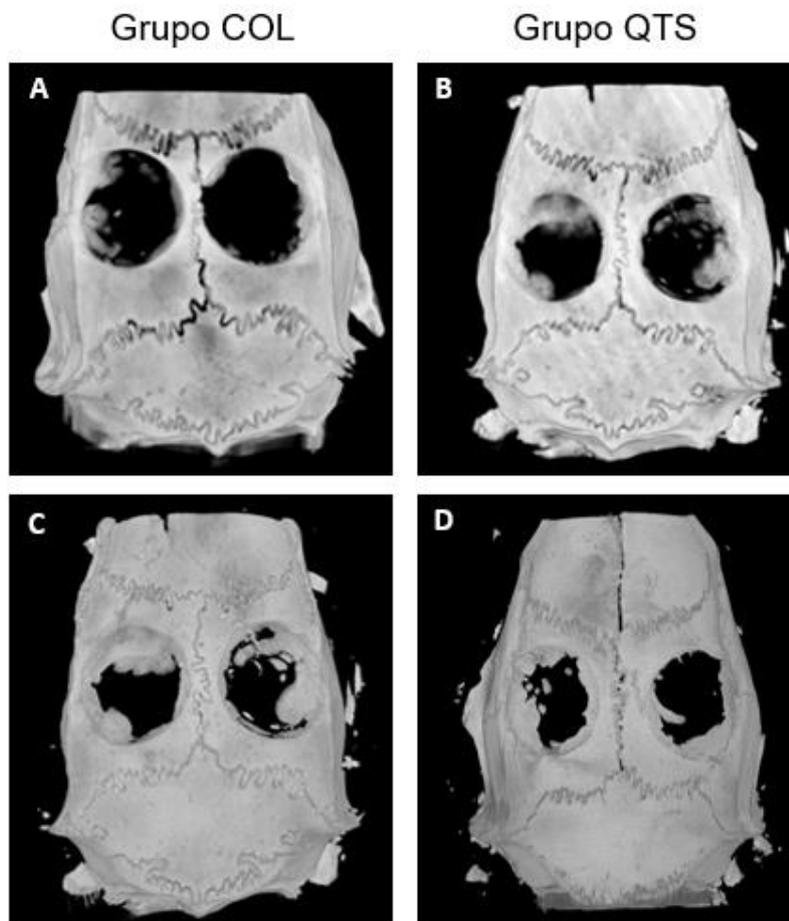


Figura 5 – Reconstituição tridimensional das calotas obtidas através da microtomografia computadorizada. A e B - Defeitos de calvária de rato de 5 mm após 14 dias. C e D – Defeitos após 30 dias da implantação da membrana. Defeitos cobertos com membranas são representados do lado direito da calota, enquanto o controle negativo (sem membrana) é mostrado do lado esquerdo da calota. A cicatrização começa a partir das bordas do defeito.

Os parâmetros referentes à espessura trabecular, espaço intertrabecular, número de trabéculas e VO/TO não demonstraram diferença estatística entre os grupos teste e controle em nenhum dos períodos de análise ($p > 0,05$). A figura 6 ilustra a representação gráfica dos valores médios obtidos na análise microtomográfica.

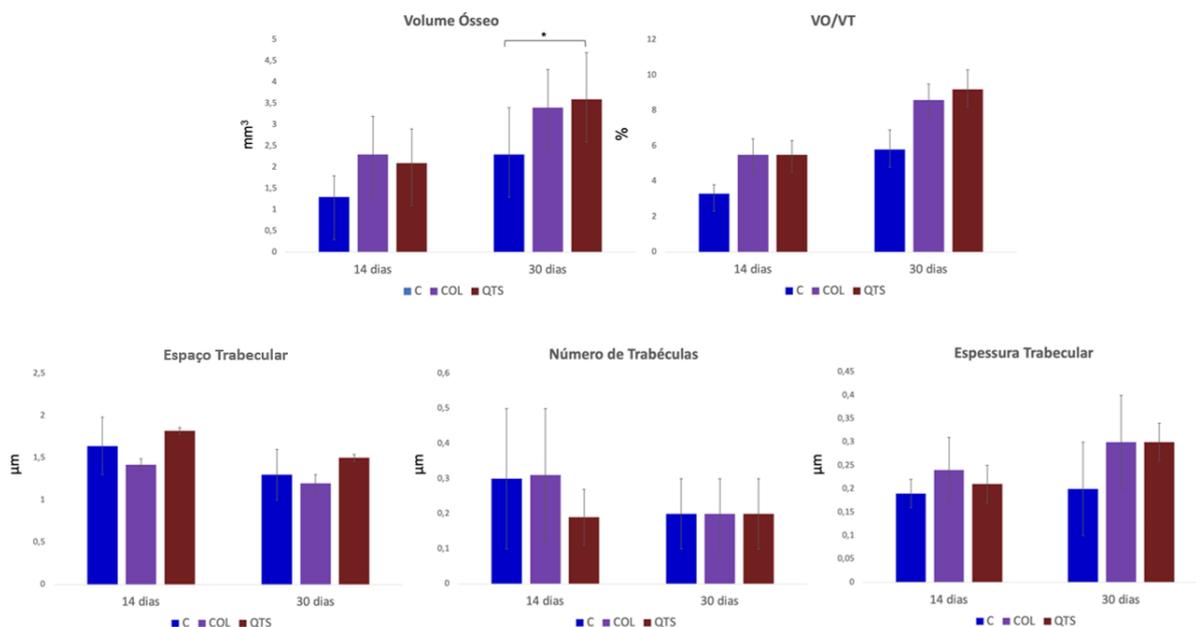


Figura 6 - Representação gráfica das médias e desvio padrão dos parâmetros de quantificação do osso neoformado pela análise microtomográfica. * diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle (C) e QTS aos 30 dias ($p=0,04$).

4.2 – Avaliação histomorfológica da dinâmica cicatricial e degradação das membranas

4.2.1 Subcutâneo

Aos 3 dias, as membranas de ambos os grupos eram claramente visíveis à microscopia de luz e delimitada dos tecidos adjacentes. As membranas do grupo COL apresentavam coloração basofílica. Seus feixes eram distinguíveis como fibras sobrepostas e intermeadas por micro espaçamentos. Já as membranas de quitosana apresentavam um aspecto mais denso, no entanto, sua integridade estrutural não era uniforme e em todos os espécimes, estrias de fragmentação eram observadas no sentido transversal da membrana (Figura 7).

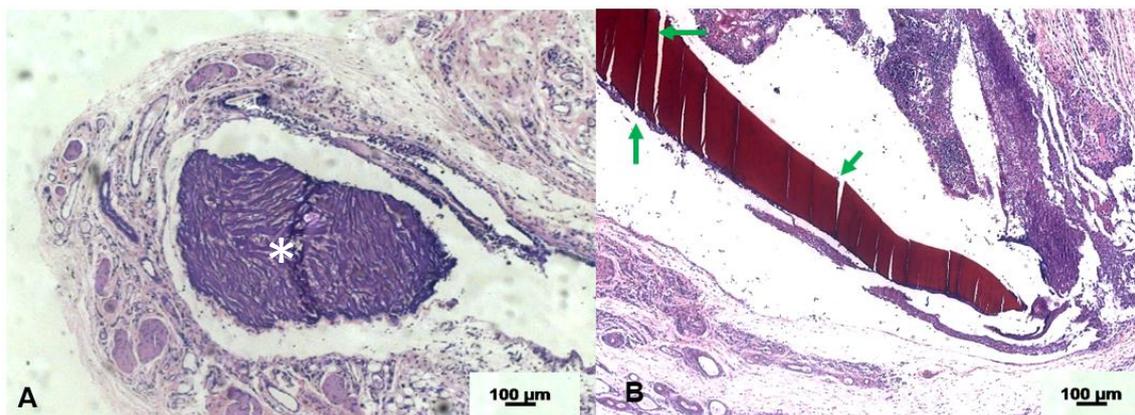


Figura 7 – Imagens de 3 dias. A) Aspecto basofílico da membrana de colágeno (*) B) Membrana de quitosana apresentando as estrias de fragmentação (setas verdes). Coloração de H&E.

Ambos os materiais determinaram um processo inflamatório moderado, composto basicamente por leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos, concentrados ao longo da interface com as membranas. No grupo COL, células inflamatórias eram observadas permeando a zona mais periférica da membrana e em alguns espécimes, uma fina camada de fibras colágenas recém-sintetizadas e depositada em contato direto com a membrana, sinalizando um incipiente processo de incorporação do material. Este mesmo padrão de deposição direta de colágeno era também observado nas membranas de quitosana, porém com uma delimitação mais clara entre os limites da membrana e do tecido cicatricial neoformado (Figura 8). Alguns Macrófagos e células gigantes multinucleadas podiam ser observados em ambos os grupos na superfície das membranas (Figura 9).

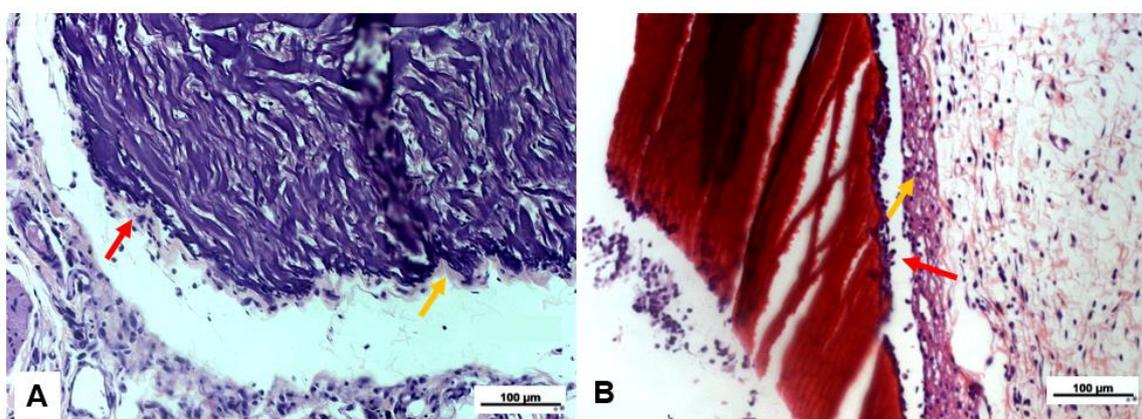


Figura 8 – Imagens de 3 dias. A e B – Ambos os materiais determinaram um processo inflamatório moderado. A) Células inflamatórias (setas vermelhas) na periferia da membrana de colágeno e fina camada de fibras colágenas (setas amarelas) em contato direto com a membrana. B) Células inflamatórias (setas vermelhas) na periferia e de fibras colágenas (setas amarelas) na periferia da membrana de quitosana. (Coloração de H&E).

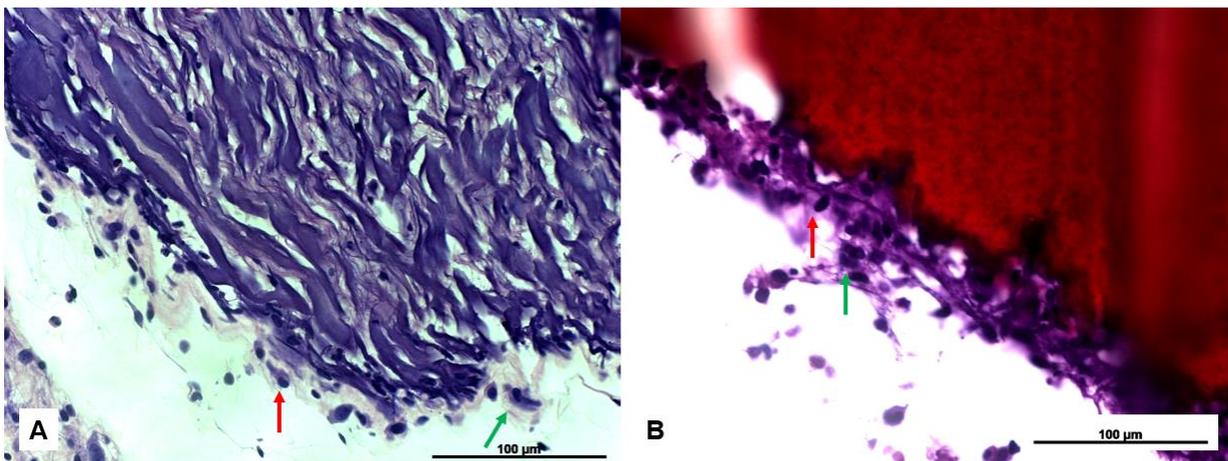


Figura 9 – Imagens de 3 dias. A e B – Macrófagos (setas vermelhas) e células gigantes multinucleadas (setas verdes) podiam ser observados em ambos os grupos na superfície das membranas. (H&E).

Aos 7 dias observou-se uma discreta diminuição na intensidade do infiltrado inflamatório. No grupo COL, um tecido de granulação ricamente celularizado e composto por capilares sanguíneos, fibras colágenas esparsas e desorganizadas era observado ao redor da membrana. Este tecido estava intimamente associado ao colágeno implantado, indicando uma completa incorporação da membrana (Figura 10).

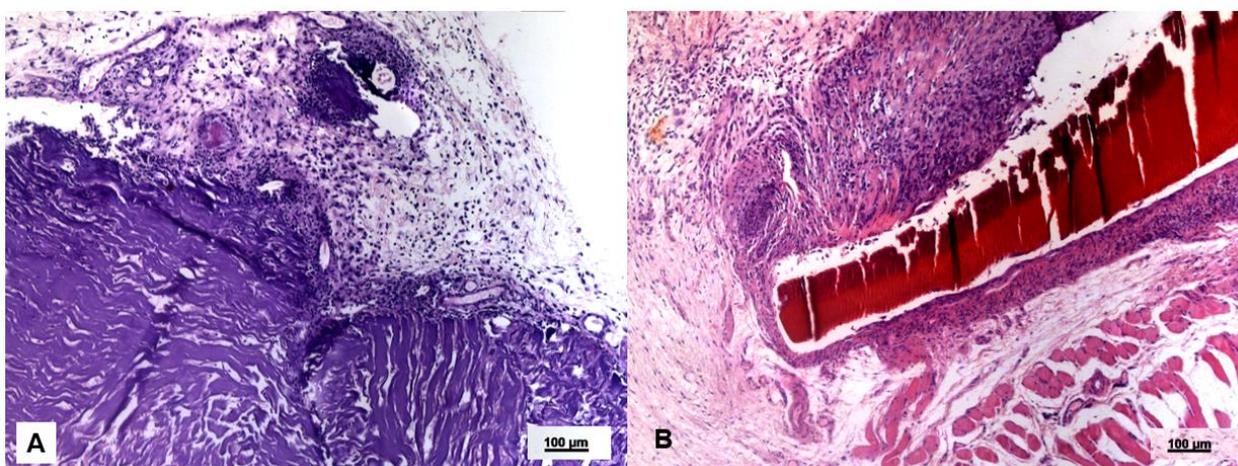


Figura 10 - Imagens de 7 dias. A) Observar tecido de granulação em íntimo contato com a membrana de colágeno. B) Tecido às margens da membrana de quitosana (H&E).

Macrófagos e células gigantes povoavam a porção periférica da membrana, seguidos por fibroblastos com características de intensa atividade secretória produzindo matriz colágena. Células inflamatórias eram observadas nos espaços reticulares das membranas de colágeno, demonstrando uma permeabilidade celular em sua porção mais periférica. A membrana de quitosana

também se apresentava circundada por um tecido de granulação com aspecto semelhante ao das membranas de colágeno. A fragmentação da membrana era mais evidente comparada aos espécimes de 3 dias, no entanto, o tecido neoformado era claramente limitado às margens do material, sem nenhuma infiltração de célula ou tecido nas estrias de fragmentação da membrana (Figura 11).

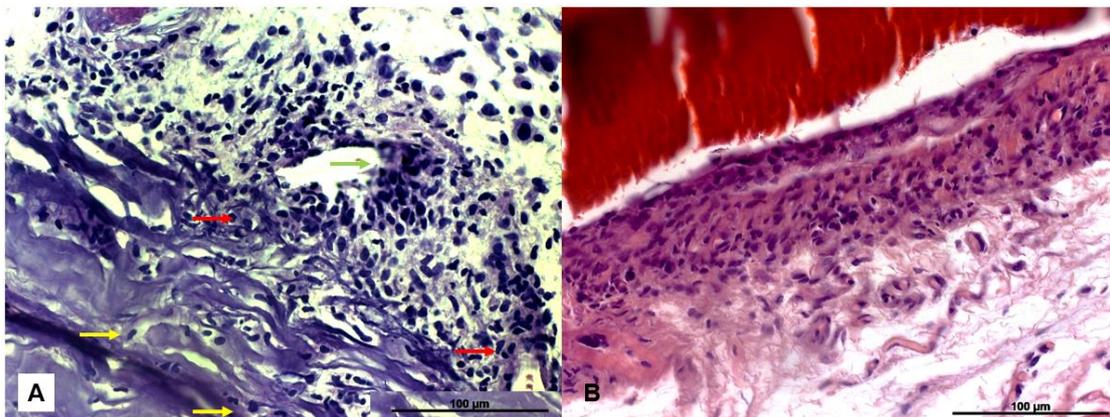


Figura 11 - Imagens de 7 dias. A) Macrófagos (setas vermelhas) e células gigantes (setas verdes) na periferia da membrana com células inflamatórias (setas amarelas) nos espaços reticulares das membranas de colágeno. B) Não se observam células entremeadas à membrana, mesmo em estrias de fragmentação. (H&E).

Aos 14 dias, ambas as membranas estavam incorporadas no tecido subcutâneo por um tecido conjuntivo frouxo, ricamente celularizado e com novos vasos sanguíneos. No grupo COL, os limites das membranas já não eram mais claramente evidentes. Macrófagos e uma grande quantidade de células gigantes multinucleadas eram vistos na porção periférica da membrana que já apresentava regiões claramente reabsorvidas. Na zona periférica de reabsorção, a membrana já era entremeadada por colágeno neoformado. No grupo QTS, as membranas apresentavam-se envoltas pelo tecido conjuntivo cicatricial. Em todos os espécimes era evidente a fragmentação da estrutura da quitosana, contudo, a infiltração tecidual era vista em poucas áreas onde a fragmentação era mais pronunciada. Macrófagos distribuíam-se abundantemente ao redor da membrana e células gigantes, em menor número comparado ao grupo colágeno, distribuíam-se no tecido de granulação (Figura 12).

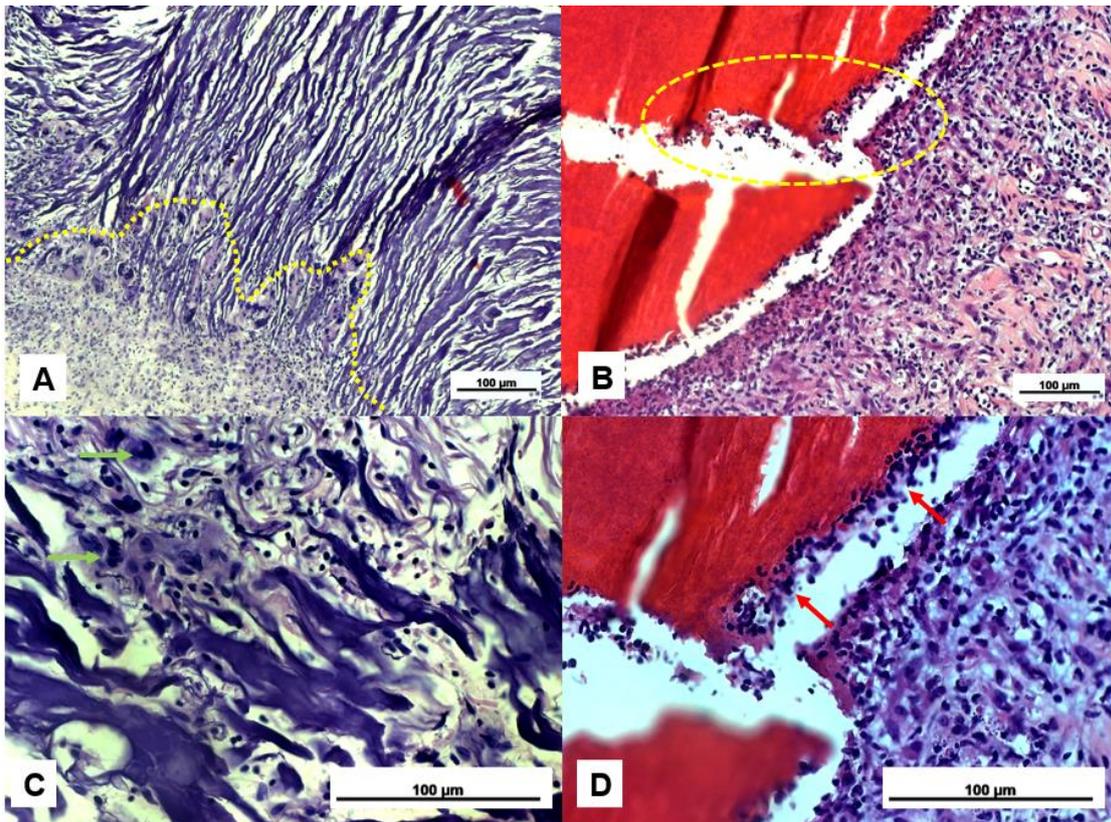


Figura 12 - - Imagens de 14 dias. A) Membrana de colágeno com mostrando área de reabsorção (linha pontilhada). C) Aumento da matriz colágena no interior da membrana de colágeno em reabsorção e presença de células gigantes multinucleadas (seta verde). B) Áreas pontuais de reabsorção na margem da membrana de quitosana (linhas pontilhadas). D) Presença de macrófagos em contato com a membrana (setas vermelhas) (H&E).

Aos 30 dias as membranas do grupo COL estavam completamente incorporadas ao tecido subcutâneo. As membranas já não apresentavam limites nítidos com o tecido conjuntivo neoformado e o colágeno original das membranas já era totalmente entremeado pelo colágeno do tecido cicatricial. Núcleos celulares já eram vistos no interior do remanescente da membrana, indicando a completa permeabilidade ao tecido cicatricial. O tecido era composto basicamente por fibras colágenas em abundância, com grande número de fibroblastos, vasos sanguíneos e um discreto infiltrado inflamatório. A atividade reabsortiva ainda era bastante evidente pela presença de macrófagos próximos ao remanescente da membrana. Células gigantes ainda eram observadas, mas em menor número quando comparado ao período de 14 dias. As membranas de quitosana, por outro lado, mantinha o tecido cicatricial claramente delimitado em suas margens, formando uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso com alta densidade de colágeno, grande celularidade e um infiltrado inflamatório leve. As

membranas eram facilmente visualizadas e menos reabsorvidas que no grupo COL. Áreas pontuais de reabsorção eram evidentes ao longo da superfície da membrana e uma população de macrófagos concentrava-se em contato com a membrana em toda sua superfície, em um lento processo reabsortivo. Em alguns espécimes as membranas estavam altamente fragmentadas sem, contudo, permitir o crescimento tecidual em seu interior (Figura 13).

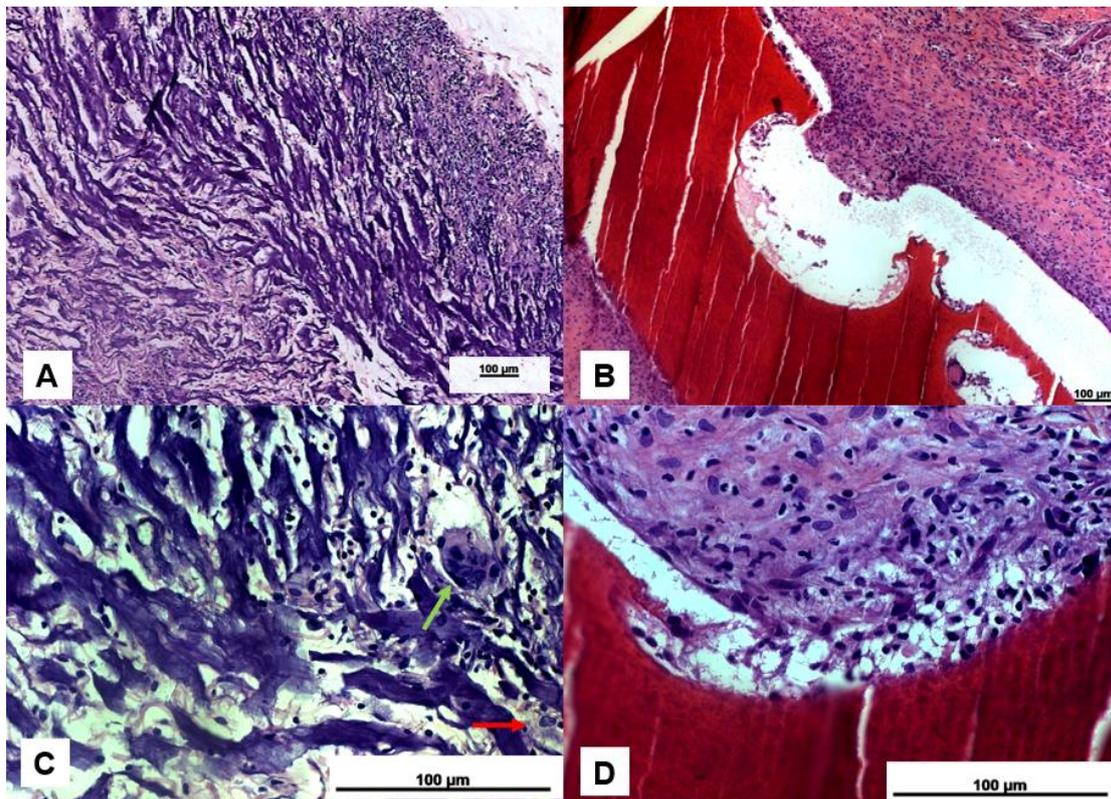


Figura 13 – Imagens de 30 dias. A) Membrana de colágeno sem limites definidos praticamente incorporada. C) Fibras colágenas em abundância, presença de macrófagos (setas vermelhas) e células gigantes (setas verdes) próximos ao remanescente da membrana de colágeno. B) Tecido cicatricial bem delimitado com áreas pontuais de reabsorção ao longo da superfície da membrana de quitosana. D) Ausência de células no interior da membrana de quitosana mesmo em áreas de reabsorção. (Coloração de H&E, magnificação de 100 (A e C) e 400 (B e D), barra de escala de 100µm).

4.2.2 - Calota

Aos 3 dias, tanto nos grupos controle, COL e QTS, remanescente do coágulo sanguíneo entremeado por um tecido de granulação ricamente celularizado foi observado em todos os espécimes. O tecido era composto por um infiltrado inflamatório moderado, rico em polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos, que se agrupavam na superfície das membranas e junto ao coágulo

sanguíneo. Fibroblastos também eram abundantes, entremeados por uma matriz conjuntiva com fibras colágenas finas e esparsas. O tecido cicatricial concentrava-se, em maior espessura, na porção periférica do defeito, juntos às margens ósseas. No centro do defeito o tecido era fino e menos celularizado que na periferia.

Aos 7 dias o tecido de granulação apresentava-se mais desenvolvido, com maior densidade de fibras colágenas e remanescentes do coágulo só eram vistos na porção mais central do defeito. Nos espécimes no grupo colágeno, a membrana encontrava-se colapsada sobre essa porção central, limitando a espessura do tecido cicatricial. Núcleos de ossificação eram vistos principalmente junto às margens do defeito, onde uma matriz osteóide recém-sintetizada destacava-se em meio ao tecido conjuntivo frouxo. O infiltrado inflamatório persistia, no entanto, uma menor quantidade de macrófagos era observada no tecido cicatricial e concentravam-se especialmente em contato com a membrana. Aos 14 dias um tecido ósseo com trabéculas finas e rudimentares ocupavam a porção mais periférica do defeito. Numerosos osteoblastos, com característica de intensa atividade sintética, eram vistos ao redor de trabéculas finas e com amplos espaços medulares contendo vasos sanguíneos e tecido conjuntivo fibroso com poucas células inflamatórias. Osteoclastos também eram vistos junto à margem óssea e ao redor das trabéculas, indicando atividade reabsortiva. Aos 30 dias, em nenhum dos grupos, o defeito apresentava-se totalmente preenchidos por osso neoformado. A neoformação concentrava-se na porção mais periférica, junto às margens ósseas e era vista especialmente nos grupos colágeno e quitosana. A porção central era composta por um tecido conjuntivo frouxo e fino. O osso neoformado era imaturo, com grande quantidade de lacunas osteocíticas sem organização definida. Grande parte dos espécimes do grupo controle tinha a neoformação óssea restrita a pequenos focos de mineralização próximo à margem óssea. A figura 15 apresenta imagens histológicas dos grupos em diferentes períodos de análise.

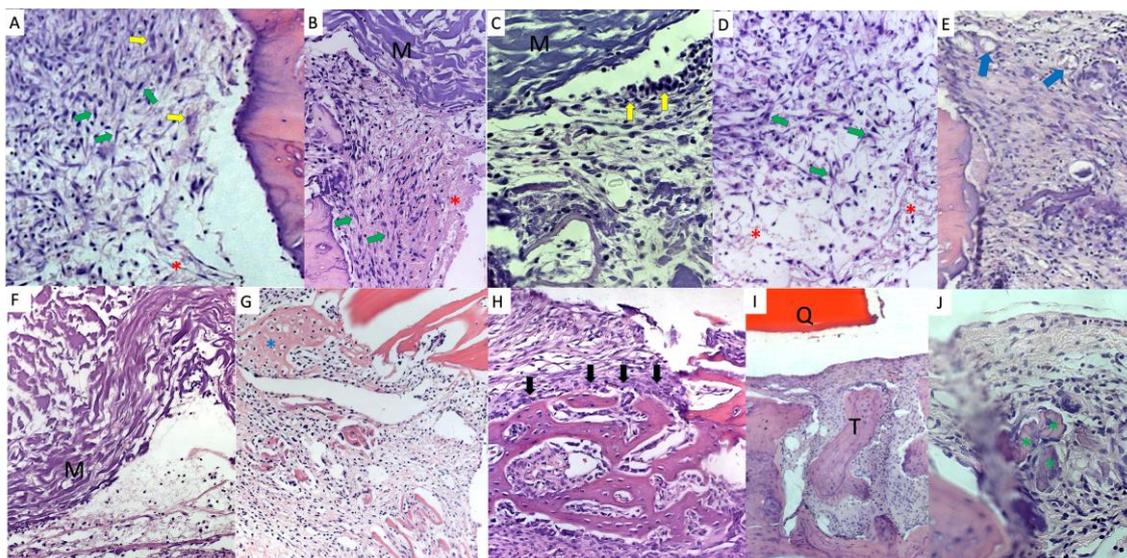


Figura 14 - Processo cicatricial dos defeitos ósseos em calota craniana. (A-D) aos 3 dias. A) Grupo Controle (200x), B: Grupo Colágeno (100x), C: Grupo Colágeno (400x), D: Grupo Quitosana (200x). Remanescentes do coágulo (asteriscos vermelhos) sanguíneo em processo de reabsorção, substituído por um tecido de granulação ricamente celularizado. Células inflamatórias em todos os grupos com presença de macrófagos (setas amarelas) distribuídos no interior do tecido, nas margens do defeito e junto às membranas (M). Numerosos Fibroblastos (setas verdes) eram vistos em meio à matriz conjuntiva incipiente. (E-G) aos 7 dias - E) Grupo Controle, F) Grupo Colágeno, G) Grupo Quitosana: Tecido conjuntivo frouxo, com fibras colágenas imaturas. No tecido cicatricial novos vasos sanguíneos (setas azuis) e pontos de secreção de matriz osteóide eram (asterisco azul). No grupo colágeno (Figura F), a membrana (M) apresentava-se colapsada na porção mais central do defeito, diminuído a espessura do tecido cicatricial. H) Grupo controle 14 dias (200x) – tecido ósseo neoformado constituído por trabéculas finas com amplos espaços intertrabeculares e margeadas por osteoblastos (setas pretas). (I-J I) Grupo Quitosana 30 dias (100x). Membrana de quitosana (Q) sobreposta ao osso neoformado junto à margem do defeito ósseo. Trabécula óssea (T) entremeada por tecido conjuntivo fibroso. J) Grupo Controle 30 dias (100x) pequenos focos de mineralização (asteriscos verdes) junto à margem do defeito, entremeados por tecido conjuntivo.

4.3 – Avaliação histométrica do processo inflamatório e reação tecidual das membranas implantadas no subcutâneo

A análise da intensidade do processo inflamatório demonstrou que ambos os grupos produziram uma reação de intensidade moderada a intensa nos períodos de 3 a 7 dias. No grupo QTS, no entanto, a maioria dos espécimes mantiveram-se na categoria moderada em ambos os períodos de análise, enquanto no grupo COL, o processo inflamatório intensificou-se do terceiro para o sétimo dia. Nos períodos de 14 e 30 dias, a inflamação foi reduzida em ambos os grupos, contudo, aos 30 dias, 2 espécimes do grupo colágeno mantiveram um infiltrado inflamatório intenso (Figura 15). A análise estatística não demonstrou diferença entre os grupos.

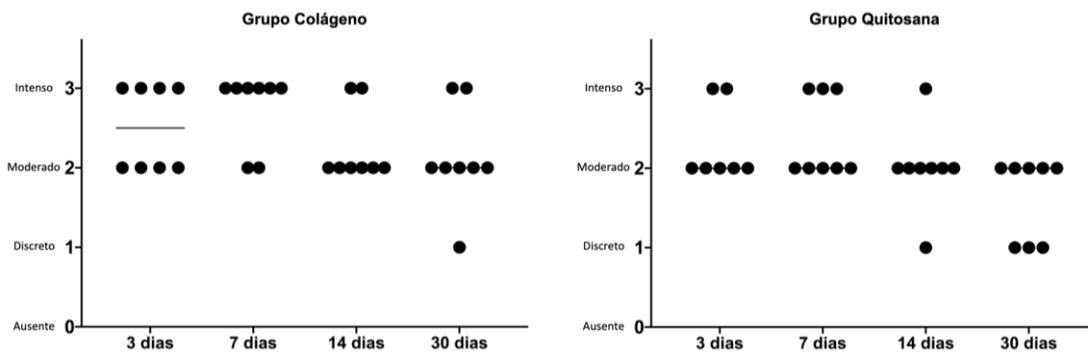


Figura 15 - Distribuição das amostras de acordo com a análise da intensidade do processo inflamatório.

A intensidade do processo inflamatório do tecido subcutâneo, tanto membranas de colágeno como quitosana, demonstrou inflamação moderada durante todo o período de análise. Os valores médios do EGRT do grupo QTS foram menores que do grupo COL em todos os períodos de análise, principalmente aos 3 e 7 dias, contudo, a comparação estatística não demonstrou diferença entre os grupos (Figura 16).

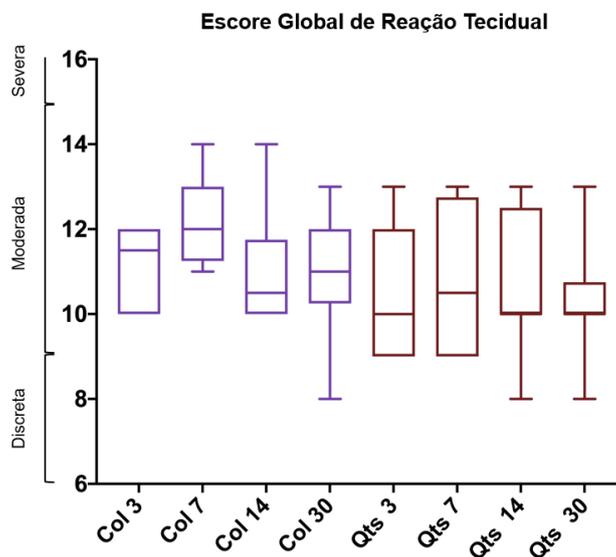


Figura 16 - Média e desvio padrão dos escores de reação tecidual de ambos os grupos ao longo dos períodos de análise.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenhado para avaliar a biocompatibilidade *in vivo* das membranas de quitosana modificadas por HDL e comparar seu comportamento histológico quando implantadas em tecido subcutâneo e na ROG de defeitos na calota craniana, com a membrana reabsorvível de colágeno disponível comercialmente mais estudada da literatura (SCHWARS et al., 2008; TAL et al., 2008).

Na análise dos resultados histomorfológicos, foi possível observar que as membranas de colágeno exibiram uma integração tecidual muito satisfatória, com deposição de tecido cicatricial intimamente relacionado com sua rede reticular, onde as fibras de colágeno neoformado entremeavam o colágeno da membrana. Estes resultados, já bem evidentes aos 14 dias, são corroborados por estudos prévios que avaliaram a capacidade de integração tecidual de membranas de colágeno xenógeno (ROTHAMEL et al., 2005; WANG et al., 2018; NETO et al., 2020). Já as membranas de quitosana apresentavam, seus limites bem definidos durante todo o período de análise, sendo claramente distinguida do tecido conjuntivo circundante com fibroblastos que foram observados em fileiras ao redor da membrana principalmente em períodos mais tardios. Esses resultados também são condizentes com estudos prévios que avaliaram o comportamento tecidual da quitosana se apresentando de forma semelhante não integrada ao tecido. (SHIN et al., 2005; BRITO et al., 2009; SIMOES et al., 2011).

Considerando a habilidade de isolamento celular, uma propriedade fundamental da membrana para que haja ROG, a membrana de colágeno, a despeito de sua inquestionável habilidade de integração tecidual, demonstrou permeabilidade celular e tecidual já nas fases precoces do processo cicatricial. Aos 3 dias, células inflamatórias já eram observadas nas porções mais periféricas da membrana, e aos 14 dias, fibras colágenas neoformadas já entremeavam os espaços reticulares da membrana. Com o passar do tempo, novas fibras colágenas foram sintetizadas até que os limites da membrana não fossem mais claramente identificáveis. Em contrapartida, os resultados

histológicos demonstram a lenta degradação da membrana de quitosana. Embora sua estrutura apresentasse fragmentação progressiva desde os três dias pós-operatórios, nem células nem tecido conjuntivo era observado no interior da membrana, o que ratifica sua habilidade em isolar os componentes teciduais. Esses achados estão de acordo com estudos prévios (SONG et al., 2014; VULCANI et al., 2015)

A dinâmica cicatricial da membrana de colágeno é resultado de seu processo de degradação por fagocitose (BEHFARNIA et al., 2012). A presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas no grupo COL dão evidência à maior velocidade de reabsorção deste material quando implantado tanto no leito subcutâneo como no leito ósseo (GIELKENS et al., 2008). BEHFARNIA et al., (2012) consideram a hipótese de a degradação acelerada do colágeno estar diretamente ligada à intensidade do processo inflamatório. Nos resultados do presente estudo, ambos os grupos apresentaram uma reação inflamatória moderada diante da implantação subcutânea da membrana, no entanto, no grupo COL observou-se uma presença marcante de macrófagos e células gigantes especialmente aos 14 dias, o que de certa forma, corrobora a tese de que o colágeno induz uma atividade macrofágica mais intensa e conseqüentemente uma reabsorção mais rápida quando comparado à quitosana. De diferente modo, a incorporação tecidual da membrana de quitosana ocorreu por meio de encapsulamento fibroso, produzindo um processo inflamatório também moderado, com limitado número de células gigantes, sugerindo que o material não produziu reação de corpo estranho.

Numerosos estudos *in vivo* (ROTHAMEL et al., 2012; MERLI et al., 2015; BORNERT et al., 2021; LINDER et al., 2022; ZHOU et al., 2023), reportam uma taxa relativamente rápida de degradação das membranas de colágeno, variando entre 2 e 6 semanas. É importante salientar que estudos de cicatrização de defeitos ósseos não críticos em ratos e descrevem que o reparo ósseo se dá em aproximadamente 4 semanas (HASSUMI et al., 2018), logo, uma membrana capaz de cumprir seu papel de barreira por um período mais prolongado pode ter implicações positivas, permitindo o isolamento do defeito da invasão de tecido mole durante toda a fase de formação óssea, aumentando o efeito da ROG (YANG et al., 2022).

À semelhança de outros biopolímeros, o mecanismo de degradação *in vivo* da quitosana ocorre por hidrólise, mediado principalmente pela lisozima, gerando resíduos acetilados (LARANJEIRA et al., 2009). Seus produtos de degradação são oligossacarídeos atóxicos que são posteriormente excretados ou incorporados por glicoproteínas (MATICA et al., 2017). Este é um processo sabidamente mais lento, semelhante ao que ocorre em outros biomateriais como a polidioxanona (PDO) e o ácido polilático (PLA) podendo sua estrutura permanecer estável por períodos mais prolongados como 6 (SHIN et al., 2005), 12 (MARTINO et al., 2005; ZHU et al., 2023) ou até 20 semanas (KIM et al., 2011; BAVARYIA et al., 2013). O grau de desacetilação da quitosana tem sido reportado como variável fundamental para seu tempo de degradação, onde a quitosana totalmente desacetilada (100%) é indegradável (FREIER et al., 2005; KIM et al., 2011) e a parcialmente desacetilada (70%) é totalmente degradável. (KIM et al., 2011; PARK et al., 2017). No presente estudo a quitosana utilizada era desacetilada (75-85%) como descrita em DE SOUZA et al., 2023, e mesmo no período mais longo de análise, ainda foi possível distinguir as membranas com pouca alteração estrutural.

Para avaliação do desempenho das membranas no processo de reparo ósseo, foi realizado um modelo de defeito crítico na calota dos ratos. Cabe ressaltar que nesse tipo de modelo é um desafio osteogênico, uma vez que a dimensão do defeito produzido não é passível de reparo espontâneo (BOSCH et al., 1998; BENVINDO et al., 2019). Os aspectos histomorfológicos demonstram que o reparo se deu a partir da periferia do defeito, uma vez que nestas margens estão presentes as fontes de estímulo osteogênico e fatores de crescimento responsáveis pelo estímulo para diferenciação das células-tronco multipotenciais em osteoblastos (SHI X et al., 2023). Considerando essa dinâmica de reparo, a presença da membrana se estabelece como a principal variável que modula positivamente a formação óssea em um ambiente de ROG (YEN et al., 2014; ZHOU et al., 2023). Histologicamente, as características do tecido cicatricial eram bastante semelhantes nos 3 grupos de análise, especialmente nos períodos mais precoces. Esse fato foi corroborado pela análise microtomográfica que demonstrou semelhança estatística das características do osso neoformado, como o número e espessura das trabéculas, nos três grupos analisados.

A neoformação óssea no grupo QTS foi maior aos 30 dias em comparação ao grupo COL e Controle, o que sinaliza um bom desempenho da quitosana nanoestruturada na manutenção do ambiente de neoformação óssea. Por outro lado, a análise microtomográfica também demonstrou que a presença das membranas foi essencial para que a neoformação óssea fosse quantitativamente maior nos grupos com membrana. Esse achado vem de acordo com uma revisão sistemática proposta por ZHOU et al. (2023), que demonstra o papel fundamental do recobrimento dos defeitos ósseos com barreiras de ROG para otimização da neoformação óssea.

Ponderadas as limitações de estudos animais e na impossibilidade de extrapolação direta de seus resultados para humanos, os resultados demonstrados no presente estudo sugerem que a quitosana nanoestruturada com adição de HDL parece ser um material biocompatível, com baixa reatividade tecidual, estruturalmente estável e de lenta degradação, com potencial para uso em ROG. Estudos futuros devem ser desenvolvidos para que se conheça o tempo exato de degradação *in vivo* das membranas de quitosana e como este material deverá interagir com o tecido ósseo e conjuntivo em fases mais tardias do processo cicatricial. Estes trabalhos deverão fundamentar a viabilidade de estudos clínicos em humanos para um eventual uso deste material na prática clínica.

6. CONCLUSÃO

Pela análise dos resultados, as membranas de quitosana nano particuladas modificadas por HDL demonstraram-se biocompatíveis, de lenta reabsorção e efetivas para uso como barreira de ROG em modelo animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ARAÚJO, M.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction: an experimental study in the dog. **Journal of Clinical Periodontology**, 32(2), 212-218, 2005.
2. LEE, J.; KIM, K.; KIM, Y. Changes in alveolar bone height after immediate implant placement in extraction sockets: a prospective clinical study with 12 months of follow-up. **Journal of Periodontal & Implant Science**, 48(1), 9-17, 2018.
3. PIETROKOWSKI, J.; GÓMEZ-DIAZ, M.; VALENZUELA, D.; MANZANARES-CÉSPÉDES. Alveolar bone regeneration after tooth extraction: a systematic review. **Clinical Oral Investigations**, 24(10), 3313-3332, 2020.
4. NOVAES JR, A.; MACEDO, G.; SAUID, F.; SILVEIRA E SOUZA, A. Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. **J Periodontol**, 82(6):872-7.23, 2011.
5. JONASSON, G.; SKOGLUND, I.; RYTHÉN, M. The rise and fall of the alveolar process: Dependence on Hemi-mandibulectomy of teeth and metabolic aspects. **Archives of oral biology**, 96, 195-200, 2018.
6. MARTINS, S.; BEZERRA, F.; SCOMBATII, S. Implante imediato pós-exodontia em região de molar utilizando um novo implante com a técnica de preparo intrarradicular e preservação alveolar. **Journal of Multidisciplinary Dentistry**, 10, 160-7, 2021.
7. CHIAPASCO, M.; ZANIBONI, M.; RIMONDINI, L. Autogenous onlay bone grafts vs. alveolar distraction osteogenesis for the correction of vertically deficient edentulous ridges: a 2-4-year prospective study on humans. **Clinical Oral Implants Research**, 20(12), 1386-1393, 2009.
8. CHIAPASCO, M.; ZANIBONI, M.; BOISCO, M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. **Clinical Oral Implants Research**, 30(Suppl. 19), 76-112, 2019.
9. BUSER, D.; CHEN, S.; WEBER, H.; BELSER, U. Early implant placement following single-tooth extraction in the esthetic zone: a cross-sectional, retrospective study on patient-centered outcome variables. **Clinical Oral Implants Research**, 32(1), 48-60, 2021.

10. SCHWATZ, Z., SALAMA, M. The science of regenerative therapy in implant dentistry. **Journal of Periodontology**, 74(8), 1189-1191, 2003.
11. URBAN, I.; MONJE, A.; WANG, H. Horizontal bone augmentation: the decision tree. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, 38(2), e30-e43, 2018.
12. HARMMERLE, C.; JUNG, R. Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontol 2000**.33:36-53. 2019.
13. MONJE, A.; CHAPPUIS, A. The Critical Peri-implant Buccal Bone Wall Thickness Revisited: An Experimental Study in the Beagle Dog. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 34, n. 6, 2019.
14. CLEMENTINI, M.; MORLUPI, A.; CANULLO, L.; BARLATTANI, A. Success rate of dental implants inserted in horizontal and vertical guided bone regenerated areas: a systematic review. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, 41(7), 847-852., 2012.
15. URBAN, I.; MONTERO, E.; MONJE, A.; SANZ-MARTIN, I. Clinical and radiographic outcomes of a regenerative approach for the treatment of peri-implantitis: a case series. **Journal of Clinical Periodontology**, 44(7), 708-716, 2017.
16. KIM, Y.; KU, J. Guided bone regeneration. **J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg**. Oct 31;46(5):361-366, 2020.
17. BUSER, D. 30 years of guided bone regeneration. **Quintessence**. 2021.
18. WANG, L.; ZHAO, Y.; MA, C. Chitosan membranes with gradient-aligned nanostructures for guided tissue regeneration. **J Biomed Mater Res**, 35(4), 415-428, 2018.
19. HARMMERLE, C.; JUNG, R. Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontol 2000**. 20, 215-245, 2003.
20. VILLAR, C.; COCHRAN, D. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. **Dent. Clin. North. Am.** 54, 73-92, 2010.
21. SHEIKH, Z.; KHAN, A.; REHMAN, I. Protein absorption capability on polyurethane and modified-poliurethane membrane for periodontal guided tissue regeneration. **Mat. Sci. Eng. C**. 68, 267-275, 2016.
22. ALPAR, B.; LEYHAUSEN, G.; GUNAY, H.; GEURTSSEN, W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures

of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. **Clinical oral investigations**, 4, 219-225, 2000.

23. ROTHAMEL, D.; SCHWARZ, F.; SAGER, M.; BECKER, J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. **Clinical oral implants research**, 16(3), 369-378, 2005.

24. SCHWARZ, F.; ROTHAMEL, D.; HERTEN, M.; BECKER, J. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. **Clinical oral implants research**, 19(4), 402-415, 2008.

25. LEE, S.; KIM, S. Membranes for the Guided Bone Regeneration. **Maxillofac Plast Reconstr Surg**. 36:239-246, 2014.

26. ARAOZ, D.; MANZANARES-CÉSPEDES, C.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. Short dental implants as a treatment option: results from an observational study in a single private practice. **Journal of Oral Implantology**, 45(4), 273-279, 2019.

27. FELICE, P.; BARAUSSE, C.; IPPOLITO, D.; ESPOSITO, M. Short implants versus longer implants in vertically augmented posterior mandibles: a randomised controlled trial with 5-year after-loading follow-up. **European Journal of Oral Implantology**, 11(3), 263-278, 2018.

28. GIANNITELLI, S.; MOZETIC, P.; TROMBETTA, M.; RAINER, A. Combined additive manufacturing approaches in tissue engineering. **Acta biomaterialia**, 24, 1-11, 2015.

29. BHOWMICK, A.; BENERJEE, S.; KUNDU, P. Organically modified clay supported chitosan/hydroxyapatite-zinc oxide nanocomposites with enhanced mechanical and biological properties for the application in the bone tissue engineering. **Int. J. Biol. Macromol**, 07.168, 2017.

30. MUZZARELLI, R. Chitins and Chitosans for the Repair of Wounded Skin, Nerve, Cartilage, and Bone. **Carbohydrate Polymers**, 84(2), 816-822, 2011.

31. KUMAR-KRISHNAN, S.; PROKHOROV, E.; HERNÁNDEZ-ITURRIAGA, M.; KOVALENKO, Y. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. **European Polymer Journal**, 67, 242-251, 2015.

32. RAJENDRAN, R.; MANICKAM, S.; ANAND, T.; JAYAKUMAR, R. Applications of chitosan nanoparticles in drug delivery: a comprehensive review. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, 121, 87-152, 2020.

33. SUN, Q.; CHEN, W.; ZHAO, H.; LI, Z. Chitosan-based nanomaterials for skin regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 9, 625197, 2021.
34. ZANIBONI, M.; CHIAPASCO, M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. **Clinical oral implants research**, 20, 113-123, 2009.
35. FROHBERG, M.; KATSMAN, A.; BOTTA, G.; LELKES, P. Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. **Biomaterials**. Dec;33(36):9167-78, 2012.
36. PANGON, A.; SAESSO, S.; SAENGRIT, N. RUKTANONCHAI, U.; INTASANTA, V. Hydroxyapatite-hybridized chitosan/chitin whisker bionanocomposite fibers for bone tissue engineering applications. **Carbohydr Polym**, Jun 25;144:419-27, 2016.
37. LOGITHKUMAR, R.; KESHAVNARAYAN, A.; CHAWLA, A.; SELVAMURUGAN, N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. **Carbohydrate polymers**, 151, 172-188, 2016.
38. SHARIARPANAH, S.; NOURMOHAMMADI, J.; AMOABEDINY, G. Fabrication and characterization of carboxylated starch-chitosan bioactive scaffold for bone regeneration. **International journal of biological macromolecules**, 93, 1069-1078, 2016.
39. WANG, W.; YAN, X.; GE, S.; LIU, Y. Electrospun nanofibrous membranes for guided bone regeneration: a perspective review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 9, 644932, 2021.
40. PERCIE DU SERT, N.; HURST, V.; BAKER, M.; WURBEL, H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 40(9), 1769-1777, 2020.
41. GADKARI, R.; ALI, S.; JOSHI, M.; ALAGIRUSAMY, R. Leveraging antibacterial efficacy of silver loaded chitosan nanoparticles on layer-by-layer self-assembled coated cotton fabric. **International Journal of Biological Macromolecules**, 162, 548-560, 2020.
42. EL KASSAS, H.; EL SAWY, N.; KANDEIL, M. Chitosan-based nanomaterials: promising tools in drug delivery and tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 186, 236-252, 2021.

43. SPIN-NETO, R.; COLETTI, F.; FREITAS, R.; MARCANTONIO, E. Biomateriais a base de quitosana na correção de defeitos ósseos críticos criados em calvaria de ratos: avaliação radiográfica. **Revista de Odontologia da UNESP**, 41(5), 312-317, 2008.
44. HU, L.; ZHANG, L.; CAO, L. The effect of chitosan modification and collagen loading on the osteogenic activity and immune response of chitosan films. **Carbohydr Polym**; 223:115082, 2019.
45. YANG, X.; MENG, S.; JIANG, H. Enhanced osseointegration and angiogenesis using a novel fibroblast growth factor 2-loaded calcium phosphate-chitosan scaffold. **Sci Rep**;10(1):17118, 2020.
46. CHEN, Y.; LI, J.; SHEN, Y.; CHEN, S. Enhanced water-solubility, antibacterial activity and biocompatibility upon introducing sulfobetaine and quaternary ammonium to chitosan. **Carbohydrate polymers**, 143, 246-253, 2016.
47. LOPES, M.; ABRAHIM, B.; CABRAL, L. Alginate-based micro and nanoparticles coated with chitosan. **Journal of Chitin and Chitosan Science**, v. 1, p. 173-176, 2014.
48. SU, B.; WANG, R.; SONG, X.; ZHAO, C. Mussel-inspired chitosan-polyurethane coatings for improving the antifouling and antibacterial properties of polyethersulfone membranes. **Carbohydrate polymers**, 168, 310-319, 2017.
49. BAJPAI, S.; SONG, X. Nano cellulose dispersed chitosan film with Ag NPs/Curcumin: An in vivo study on Albino Rats for wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1012-1019, 2017.
50. HUANG, B.; LIU, M.; ZHOU, C. Chitosan composite hydrogels reinforced with natural clay nanotubes. **Carbohydr Polym**, 175(8):689–98, 2017.
51. DE SOUZA, F.; SIMON, A.; D'ORNELLAS, E.; SILVA, L.; CABRAL, L. Chitosan-based hydroxylapatite nanostructured membranes containing sodium alendronate for guided bone regeneration therapy. **J Appl Pharm Sci**, 2023.
52. ALVAREZ-MARTINEZ, F.; BARRAZA-SALAS, M. CÓRDOVA, T. Innovation and research as a driving force to boost competitiveness: a bibliometric analysis of the Brazilian pharmaceutical industry. **Scientometrics**, 115(3), 1323-1346, 2018.

53. VIANNA, C.; CAETANO, A.; PELLEGRINI FILHO, A.; FIGUEIREDO, T. Innovation in the Brazilian pharmaceutical industry: a systematic review. **Research Policy**, 49(1), 103868, 2020.
54. MORAES, A.; DE CASTRO, M.; SILVA, G.; ROSA, M. Analysis of the competitiveness of the Brazilian pharmaceutical industry through the Porter Diamond model. **Brazilian Journal of Operations & Production Management**, 15(1), 24-37, 2018.
55. RODRIGUES, R.; FERREIRA, S.; SILVA, L.; VASCONCELLOS, A. Strategic innovation management in Brazilian pharmaceutical industry: an analysis of patent applications. **Innovation & Management Review**, 17(2), 214-231, 2020.
56. ØRSTAVIK, D.; MJOR, I. Histopathology and x-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. **J Endodont**;14:13–23,1988;
57. BATISTA, R.; HIDALGO, M.; HERNANDES, L.; CONSOLARO, A. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. **J Biomed Mater Res A**, 7;81:171–177, 2007.
58. BAVARIYA, A.; NOROWSKI, A.; BUMGARDNER, J. Evaluation of biocompatibility and degradation of chitosan nanofiber membrane crosslinked with genipin. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 102(5), 1084-1092, 2013.
59. DIN EN ISO 10993-6; Biological Evaluation of Medical Devices—Part 6: Tests for Local Effects after Implantation (ISO 10993- 6:2016). German Version of EN ISO 10993-6:2016; **International Organisation for Standardization**: Geneva, Switzerland, 2016.
60. LINDER, C.; ALHILDANI, S.; STOJANOVIC, S.; BARBECK, M. In vivo biocompatibility analysis of a novel barrier membrane based on bovine dermis-derived collagen for guided bone regeneration (GBR). **Membranes**, 12(4), 378, 2022.
61. URBAN, I.; MONTERO, E.; MONJE, A.; SANZ-SÁNCHEZ, I. Effectiveness of vertical ridge augmentation interventions: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, 46, 319-339, 2019.

62. APRILE, P.; LETOURNEUR, D.; SIMON-YARZA, T. Membranes for Guided Bone Regeneration: A Road from Bench to Bedside. **Adv. Healthcare Mater.** 2020.
63. HASSUMI, J.; FABRIS, A.; ROSSI, A. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. **J Appl Oral Sci** [Internet]. 2018;26:e20170326.
64. YANG, Z.; WU, C.; LUO, X.; ZHANG, D. Advances in Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration Techniques. **Front Bioeng Biotechnol**, Jun 22;10:921576, 2022.
65. SOLDATOS, N.; STYLIANOU, P.; KOIDOU, VP.; ROMANOS, G. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. **Quintessence Int.** 48(2):131-147, 2017.
66. TAL, H.; KOZLOVSKY, A.; NEMCOVSKY, C.; MOSES, O. Longterm biodegradation of cross-linked and non-cross-linked collagen barriers in human guided bone regeneration. **Clin Oral Implants Res.** 2008 Mar;19(3):295-302. 2008.
67. NETO, A.; SARTORETTO, S.; RESENDE, R.; MOURÃO, C.; CALASANS-MAIA, M. In Vivo Comparative Evaluation of Biocompatibility and Biodegradation of Bovine and Porcine Collagen Membranes. **Membranes** ,Dec 15;10(12):423, 2020.
68. BRITO, M.; SCHELLINI, S.; PADOVANI, C.; NETO, G. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. **An Bras Dermatol** [Internet]. Jan;84(1):35–40, 2009.
69. SIMÕES, M.; SHIROSAKI, Y.; MAURICIO, A. In vitro and in vivo chitosan membranes testing for peripheral nerve reconstruction. **Acta Medica Portuguesa**, 24(1), 43-52, 2011.
70. SONG, J.; SHIN, S.; KIM, H. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. **Int J Oral Sci.** Jun;6(2):87-93, 2014.

71. VULCANI, V.; FRANZO, R.; ANTONI, S. In vivo biocompatibility of nanostructured Chitosan/Peo membranes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67, n.4, p.1039-1044, 2015
72. BEHFARMIA, P; KHORASANI, M; BIRANG, R; ABBAS, F. Histological and histomorphometric analysis of animal experimental dehiscence defect treated with three bio absorbable GTR collagen membrane. **Dent Res J**, 9:574-81, 2012
73. GIELKENS, P.; JONG, J.; STEGENGA, B.; BOS, R. Vivosorb, BioGide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. **Clin Oral Implants Res. May**;19(5):516-21. 2008.
74. ROTHAMEL, D.; FERRARI, D.; ZOLLER, M. Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, 27(1), pp.146-154, 2012.
75. MERLI, M.; MOSCATELLI, M.; PAGLIARO, U.; NIERI, M. Membranes and bone substitutes in a one-stage procedure for horizontal bone augmentation: A histologic double-blind parallel randomized controlled trial. **The International journal of periodontics & restorative dentistry**, 35(4), pp.463-471, 2015.
76. BORNERT, F.; VALENTIN, H.; WITEK, L. Comparative barrier membrane degradation over time: Pericardium versus dermal membranes. **Clinical and experimental dental research**, pp.1-8, 2021
77. LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. Fávère V. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quím Nova** [Internet]. 32(3):672–8. 2009.
78. MATICA, A.; MENGHIU, G.; OSTAFE, V. Biodegradability of chitosan based products, **New Frontiers in Chemistry**, 26(1). 2017.
79. MARTINO, A.; MAKARAND, V.; RISBUD, M. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering, **Biomaterials**, Volume 26, Issue 30, Pages 5983-5990, 2005.

80. FREIER, T.; KOH, H.; KAZAZIAN, K.; SHOICHET, M. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. **Biomaterials**; 26:5872–5878, 2005.
81. PARK, S.; KIM, H. Preparation of acetylated chitosan/carbonated hydroxyapatite composite barriers for guided bone regeneration. **Macromol. Res.** **25**, 158–164, 2017.
82. BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERICIK, K. Importance of critical size bone defect in the testing of bone regeneration materials. **Journal of Craniofacial Surgery** 9(4):p 310-316, julho de 1998.
83. BENVINDO, R.; GONZAGA, K. Avaliação da reparação óssea espontânea em calvária de ratos para determinação do defeito crítico de acordo com o tamanho e a localização anatômica. 2019. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.
84. SHI, X.; LI, X.; TIAN, Y.; QU, X.; CHU, S. Physical, mechanical, and biological properties of collagen membranes for guided bone regeneration: a comparative in vitro study. **BMC Oral Health** Jul 22;23(1):510. doi: 10.1186/s12903-023-03223-4, 2023.
85. YEN, C.; CHEN, T.; LU, H. Comparison of treatment effects of guided tissue regeneration on infrabony lesions between animal and human studies: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontal Res.** 2014 Aug;49(4):415-24. 2014.
86. ZHOU, Z.; LI, J.; CHEN, Y.; NIU, G. Comparison of the efficacy of different biodegradable membranes in guided bone/tissue regeneration: a systematic review and network meta-analysis. **Biomed Mater.** 2023 Apr 19;18(3). 2023.
87. GUO, Y.; YANJUN, Y.; HAN, L.; XIA, Y.; ZHOU, Y. Biocompatibility and osteogenic activity of guided bone regeneration membrane based on chitosan-coated magnesium alloy; **Materials Science and Engineering**; 100, 226-235, 2019.

Anexos

Anexo A – Parecer da CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 25 de maio de 2020

Prezado Professor Lucio Mendes Cabral

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o **ADENDO** do projeto intitulado: “Desenvolvimento, caracterização e avaliação do potencial de regeneração óssea guiada e osteoindução de membranas poliméricas nanoestruturadas à base de quitosana.”, protocolo nº **A6/20-008-17**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 13/05/2020.

A vigência do projeto foi prorrogada: Até 30/09/2021.

Linhagens autorizadas nesse projeto – *Rattus norvegicus*/ Wistar - 250-350g / 7-9 semanas – machos e fêmeas.

Já foram utilizados 10 animais até o momento, ficando esta carta de aprovação vigente para os 80 animais restantes

A procedência dos animais continua sendo o Biotério da Faculdade de Farmácia CCS - bloco B, subsolo, sala 36 – UFRJ.

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS