

AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS DE COLÁGENO COM DIFERENTES PERÍODOS DE CROSS-LINKAGE. ESTUDO HISTOLÓGICO EM SUBCUTÂNEO DO RATO*

Daniela Cristina Joannitti CANCIAN**

Elcio MARCANTONIO JUNIOR***

Rosemary Adriana Chiérici MARCANTONIO***

Gilberto GOISSIS****

Raphael Carlos Comelli LIA*****

Wanda Maria de CARVALHO*****

- RESUMO: Foram avaliadas, histologicamente, 3 membranas de colágeno com períodos diferentes de tratamento por glutaraldeído a 0,05% (8, 22 e 28 horas). Os materiais foram implantados em tecido subcutâneo de ratos por 3, 7, 15, 30 e 60 dias. A análise histológica mostrou: padrão irritativo semelhante para os 3 grupos; os materiais sofreram reabsorção completa para o grupo I (8 h) e incompleta para os grupos II e III (22 e 28 h) após 60 dias; boa aceitação biológica; o material (colágeno) é promissor para confecção de membranas periodontais reabsorvíveis.
- UNITERMOS: Colágeno toxicidade; materiais biocompatíveis; doenças periodontais.

Introdução

A evolução das pesquisas no campo da Periodontia tem levado a novas formas de tratamento da doença periodontal (D.P.). Dentre as novas técnicas existentes, a da Regeneração Tecidual Dirigida é a que mais entusiasmo tem causado^{1, 2, 7, 13, 20, 21}.

Proposta inicialmente por Nyman et al.¹⁷, esta técnica visa ao repovoamento da superfície radicular, afetada pela doença periodontal, por células do ligamento

* Projeto financiado por: CNPq/PADCT-2, proc. nº 620228/91-1.

** Estagiária - Departamento de Diagnóstico e Cirurgia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 14800 - Araraquara - SP - Bolsista da FAPESP.

*** Departamento de Diagnóstico e Cirurgia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 14800 - Araraquara - SP.

**** Departamento de Bioquímica - Instituto de Física e Química - USP - São Carlos - 13560 - SP.

***** Departamento de Patologia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 14800 - Araraquara - SP.

***** Aluna de Pós-Graduação - Curso de Mestrado em Química Analítica - Instituto de Física e Química - USP - São Carlos - 13560 - SP.

periodontal⁹, evitando, desta forma, a formação de um epitélio juncional longo, freqüente nas intervenções cirúrgicas^{7, 19} e a reabsorção radicular que ocorreria se houvesse contato direto entre o conjuntivo gengival e a superfície radicular^{10, 16}.

O material utilizado inicialmente, nesta técnica, foi o filtro Milipore¹⁷. Estudos posteriores demonstraram que uma membrana de politetrafluoretileno (Teflon) apresenta melhores resultados²². Porém este material apresenta custo muito maior (cerca de US\$ 100,00 por dente), o que restringe sua utilização a certos grupos sociais.

Além deste fato, os dois materiais acima apresentam o inconveniente de exigirem uma nova intervenção cirúrgica para sua remoção, 42 dias após sua colocação.

Com o intuito de sanar estes problemas, alguns autores testaram membranas feitas de material reabsorvível, no qual se destaca o colágeno^{3, 18}.

Sendo assim, é nosso objetivo desenvolver uma membrana de colágeno reabsorvível, nacional, que não apresente os inconvenientes dos materiais não reabsorvíveis, seja de fácil aplicação e esterilização e que permaneça íntegra pelo período necessário a desempenhar a sua função, mas, que após cumprir sua missão, seja fagocitada pelo organismo. Como um dos fatores que influem na reabsorção é o tempo de *cross-linkage*, serão testadas membranas com diferentes períodos de *cross-linkage*, para se conhecer o seu padrão de reabsorção, de modo que no futuro se possa avaliar este material no periodonto de cães.

Material e método

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Holtzmann) machos, pesando em média 220 gramas. Os animais foram divididos em 5 grupos de 6 animais, com 4 implantes por animal. Estes foram mantidos antes e durante a pesquisa, com ração comercial semi-sólida balanceada e água à vontade.

As membranas de colágeno reconstituído foram confeccionadas no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Física e Química da USP, São Carlos, em formato de tiras. O tempo de tratamento com glutaraldeído 0,05%, com tampão fosfato 0,14 M pH 7,13, foi de 8, 22 e 28 horas, de forma a permitir uma reabsorção orgânica com períodos diferenciados. O material foi acondicionado em frascos de vidro com solução salina estéril. No momento da implantação, as membranas foram recortadas com tesoura cirúrgica no tamanho de 1 cm².

Os animais foram submetidos à anestesia geral, por inalação de éter sulfúrico, a tricotomia foi realizada na região dorsal escapular e pélvica e a anti-sepsia com solução de álcool iodado. Os animais foram posicionados em mesa cirúrgica, onde se procedeu a implantação dos corpos-de-prova.

Para isso, foram realizadas 2 incisões de aproximadamente 7 mm, uma na região dorsal escapular e outra na região dorsal pélvica, sendo o tecido subcutâneo cuidadosamente divulsionado por tesoura de ponta romba.

As membranas foram implantadas no tecido subcutâneo do rato a uma distância de 3 cm da incisão. Cada animal recebeu 4 corpos-de-prova, e a distribuição foi feita de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Divisão do número de implantes, por grupos e períodos.

| Grupo | I | II | III | Total |
|----------------|----|----|-----|-------|
| Período (dias) | | | | |
| 3 | 8 | 8 | 8 | 24 |
| 7 | 8 | 8 | 8 | 24 |
| 15 | 8 | 8 | 8 | 24 |
| 30 | 8 | 8 | 8 | 24 |
| 60 | 8 | 8 | 8 | 24 |
| Total | 40 | 40 | 40 | 120 |

GI: membrana de colágeno com *cross-linkage* de 8 horas.

GII: membrana de colágeno com *cross-linkage* de 24 horas.

GIII: membrana de colágeno com *cross-linkage* de 28 horas.

Decorridos 3, 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram novamente anestesiados, tricotomizados, e as áreas de implantes foram removidas, com margem de segurança, após o que o animal foi sacrificado. As peças cirúrgicas foram fixadas em formalina a 10% e, após receberem tratamento histológico de rotina para inclusão em parafina, os blocos foram cortados seriadamente com 6 micrômetros de espessura e o material corado pelo método de Hematoxilina-Eosina.

Resultado

Os Grupos II e III (22 e 28 horas) foram descritos conjuntamente por serem semelhantes.

3 dias

Em todos os grupos observa-se compacção de fibras, formando pseudocápsula, assim como intensa população celular e vascularização. O infiltrado inflamatório é intenso, predominando polimorfonucleares neutrófilos junto ao material e linfocitário adjacente. A atividade macrofágica é também intensa, efetuada por células mononucleadas, notando-se ainda alguns gigantócitos nos Grupos II e III (Figuras 1 e 5).

7 dias

A cápsula que envolve o material apresenta-se no geral com amplitude moderada para todos os grupos, mantendo população celular e vascularização em grau intenso, com evolução para discreta colagenização nos Grupos II e III (Figuras 6 e 10). O infiltrado inflamatório é intenso de prevalência linfocitária; todavia, justaposto ao material é neutrofílico em grau moderado, maior atividade no Grupo I (Figura 2). Há intensa atividade macrofágica exercida por mononucleados e gigantócitos em toda extensão do material implantado, notadamente nas bordas. As alterações celulares são mínimas para todos os grupos. Não há nenhuma evidência de mineralização ou de necrose por contato.

15 dias

A cápsula justaposta ao material em evolução por colagenização mostra população celular e vascularização moderadas. O infiltrado é moderado intenso com prevalência linfocitária, vendo-se alguns polimorfonucleares neutrófilos próximos ao material em grau discreto/não-significante. Permaneceu intensa atividade macrofágica, efetuada por células mononucleadas e gigantócitos, em toda extensão do material implantado. Não foram encontrados sinais de necrose por contato ou mineralização e alterações de significado (Figuras 3 e 11).

30 dias

Para este período, observamos uma tendência de diminuição da espessura da cápsula, com colagenização no Grupo I e moderada/intensa nos Grupos II e III (Figuras 7 e 12), mantendo população celular e vascularização em grau moderado. O infiltrado inflamatório de predomínio linfocitário é moderado, com algumas variações para moderado/discreto no Grupo I (Figura 4), mantendo-se ainda alguns polimorfonucleares neutrófilos. A atividade macrofágica, representada por células mononucleadas e gigantócitos, varia de intensa a moderada/intensa, sempre abrangendo a extensão do material implantado. Novamente não foram encontradas necrose ou mineralização e alterações celulares de significado.

60 dias

Aos 60 dias não foram encontrados vestígios do material do Grupo I. Para os Grupos II e III (Figuras 8 e 9), há redução acentuada do material implantado envolvido por cápsula de espessura fina apresentando moderada/intensa colagenização para discreta celularidade e moderada vascularização. O infiltrado inflamatório em grau discreto moderado é linfocitário. A atividade macrofágica, nas mesmas condições

anteriores, é moderada. Não foram encontrados sinais de mineralização ou necrose por contato e alterações celulares de significado.

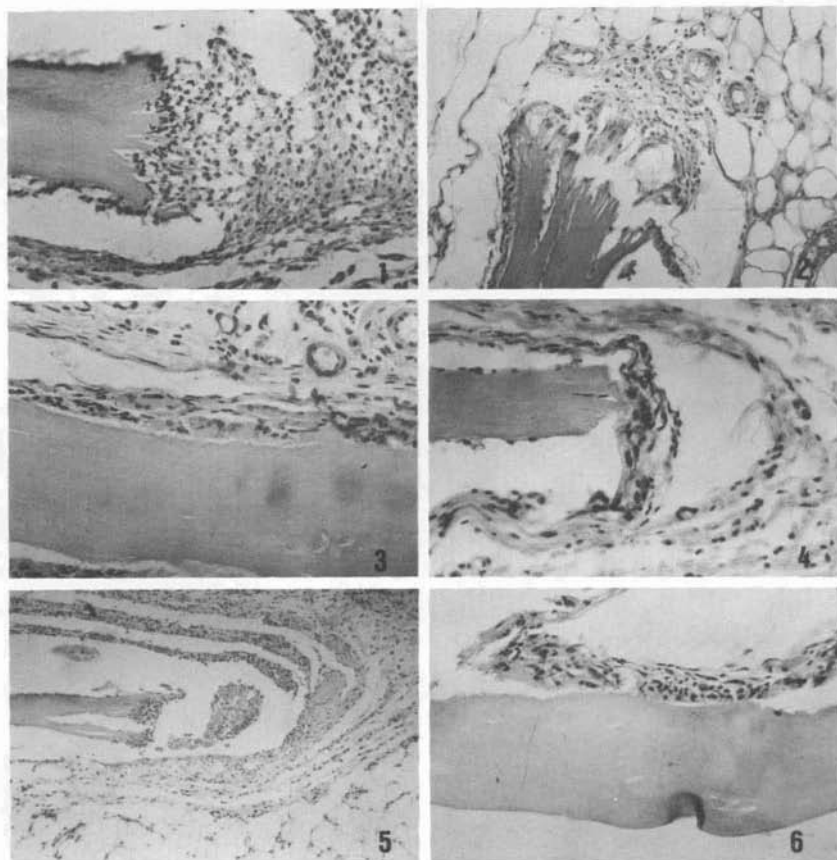


FIGURA 1 – 3 dias – Grupo I – Cápsula bem celularizada junto ao material implantado. Infiltrado inflamatório intenso. H.E. 200 X.

FIGURA 2 – 7 dias – Grupo I – Detalhe de cápsula e material. Intensa atividade macrófágica. Gigantócitos em destaque. H.E. 200 X.

FIGURA 3 – 15 dias – Grupo I – Atividade macrófágica sobre o material. Gigantócitos em destaque. H.E. 100 X.

FIGURA 4 – 30 dias – Grupo I – Atividade macrófágica sobre o material. H.E. 100 X.

FIGURA 5 – 3 dias – Grupo II – Disjunção tecidual junto ao material. Intenso infiltrado inflamatório. H.E. 40 X.

FIGURA 6 – 7 dias – Grupo II – Cápsula e material. Atividade macrófágica sobre o material. H.E. 200 X.

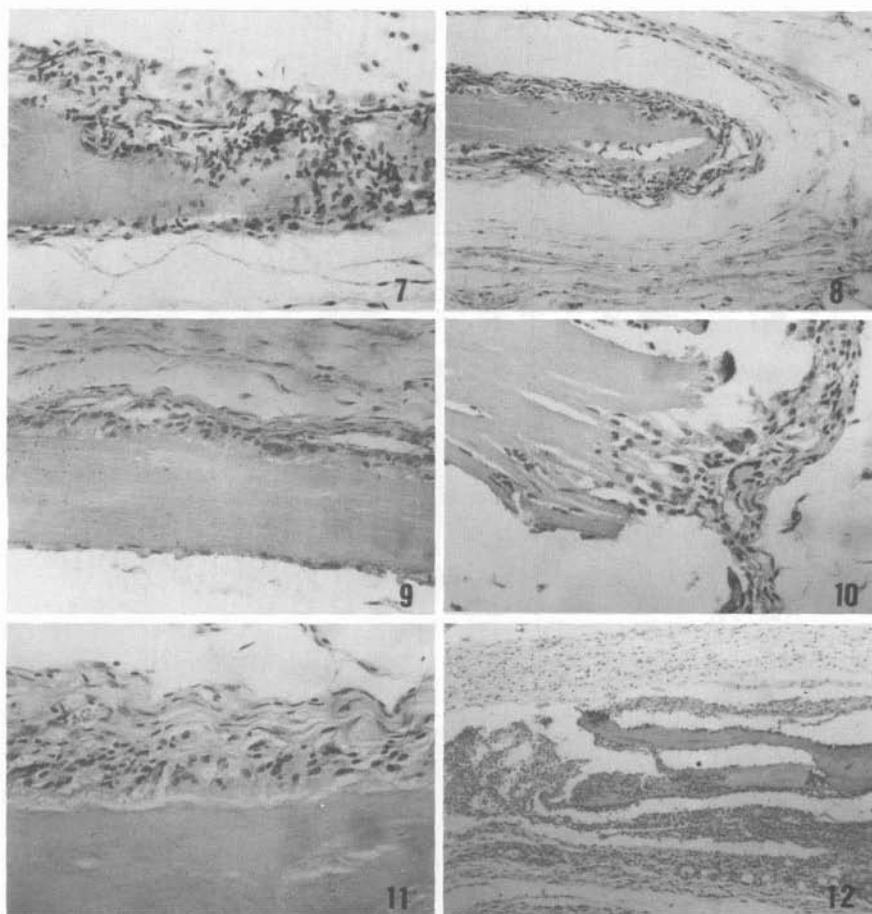


FIGURA 7 - 30 dias - Grupo II - Atividade macrofágica sobre o material. Presença de gigantócitos. H.E. 200 X.

FIGURA 8 - 60 dias - Grupo II - Aspecto panorâmico da cápsula e do material. Intensa atividade macrofágica. H.E. 100 X.

FIGURA 9 - 60 dias - Grupo II - Cápsula e material. Atividade macrofágica sobre o material. H.E. 200 X.

FIGURA 10 - 7 dias - Grupo III - Cápsula e material. Atividade macrofágica sobre o material. H.E. 200 X.

FIGURA 11 - 15 dias - Grupo III - Cápsula em colagenização. Presença de gigantócitos. H.E. 200 X.

FIGURA 12 - 30 dias - Grupo III - Aspecto panorâmico da cápsula e material. Intensa atividade macrofágica. H.E. 40 X.

Discussão

O advento da técnica de Regeneração Tecidual Dirigida (R.T.D.) trouxe um novo alento à área de periodontia, por ser uma técnica previsível de recuperação do aparato de inserção, perdido no decorrer da doença periodontal^{1,2,7,13,17,20,21,22}.

Os primeiros trabalhos utilizavam-se de um filtro biológico, o Milipore^{1,2,17,20,21} que, embora servisse ao propósito, apresentava dificuldade de manuseio, esterilização e se fragmentava, dificultando a remoção.

Numa segunda etapa desenvolveu-se uma membrana de politetrafluoretileno (Teflon), apresentando uma série de vantagens, como facilidade de manuseio, já vir esterilizada, não favorecer a colonização bacteriana, manutenção da integridade, facilitando a remoção e permitindo um crescimento celular maior em relação ao Milipore^{20,21}.

Apesar destas vantagens, ainda não é o material ideal, visto que há a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, aumentando os custos, além de ser um incômodo ao paciente.

Desta forma, tem-se procurado materiais reabsorvíveis ou solúveis para substituir a membrana de Teflon^{3,4,8,11,15}.

Dentre estes materiais, o colágeno é um dos que apresenta maior probabilidade de sucesso, pela sua utilização aprovada nos campos médico e odontológico, por ser pouco agressivo, ter baixo custo e também poder servir de veículo para outras substâncias químicas¹⁵, embora alguns autores considerem sua reabsorção excessivamente rápida para permitir o aparecimento de nova inserção^{6,12,23}.

O grau de *cross-linkage*, a espessura do material e a resposta inflamatória é que determinam o tempo de reabsorção de uma membrana de colágeno.

Os materiais por nós testados apresentaram grande semelhança de comportamento no tecido subcutâneo do rato, sendo que os dos Grupos II e III (22 e 28 horas, respectivamente) foram praticamente iguais.

A reabsorção do material já foi observada aos 3 dias, e foi se intensificando até o final dos períodos estudados, inicialmente por uma maior quantidade de células mononucleadas, com aumento de células gigantes a partir do 7º dia.

Esta grande concentração de células fagocitárias está de acordo com Carvalho et al.⁶, que testaram em subcutâneo de rato, esponjas de colágeno de origem suína. Porém este material reabsorveu-se rapidamente, de tal forma que aos 15 dias encontrou-se apenas uma pequena quantidade do material implantado. Este fato mostra que as membranas por nós testadas são mais promissoras na utilização em R.T.D., do que as esponjas de colágeno, visto serem de reabsorção bem mais lenta¹².

Em relação à resposta tecidual, os materiais implantados foram, em geral, bem tolerados, levando à formação de cápsula com proliferação fibroblástica e vascular em evolução por colagenização, demonstrando ser biocompatível. É interessante notar,

também, que não houve o aparecimento de mineralização, que poderia acarretar um efeito indesejável em se tratando de membranas que devam ser reabsorvidas.

Aos 30 dias as membranas parecem apresentar estrutura ainda compatível, como barreira mecânica, para os 3 grupos. Como aos 60 dias não encontramos mais resquícios das membranas no Grupo I (8 horas), portanto um período intermediário de 45 dias deverá ser realizado.

Como uma extrapolação do subcutâneo de rato para áreas de periodonto seja difícil, novos estudos serão necessários para conhecer melhor as propriedades deste material, que se mostra promissor, inclusive para poder propor modificações.

Conclusão

1. O padrão irritativo, para os 3 grupos, foi semelhante, determinando uma reação inflamatória decrescente no decorrer dos períodos de análise.

2. Os materiais apresentaram reabsorção, sendo que no Grupo I (8 horas) ela foi mais rápida e nos Grupos II (22 horas) e III (28 horas) esta foi mais lenta.

3. A compatibilidade biológica, em nível de subcutâneo de rato, foi satisfatória.

4. Os materiais testados mostraram-se promissores para a confecção de membranas periodontais reabsorvíveis.

Agradecimento

A Maria Estela Moralis Caramori, pela revisão bibliográfica.

CANCIAN, D. C. J. et al. Evaluation of collagen membranes with different cross-linkage periods. Subcutaneous histologic study in rat. Rev. Odontol. UNESP, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 181-190, 1992.

■ **ABSTRACT:** *The collagen membranes were implanted in subcutaneous tissue of rats after treated with 0.05% glutaraldehyde for different periods (8, 22, 28 h). The animals were sacrificed after 3, 7, 15, 30, and 60 days. Histological analysis showed: similar irritative patterns for the three groups; resorption for all materials tested, complete in group I (8 h) and incomplete for groups II and III (22 and 28 h) after 60 days; good biological acceptance. Collagen is a promising material to be used for making resorbable periodontal membranes.*

■ **KEYWORDS:** *Collagen toxicity; biocompatible materials; periodontal diseases.*

Referências bibliográficas

1. AUKHIL, I. et al. An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs. *J. Periodontol. Res.*, v. 18, p. 643-54, 1983.
2. AUKIL, I. et al. Guided tissue regeneration: an experimental procedure in beagle dogs. *J. Periodontol.*, v. 57, p. 727-34, 1986.
3. BLUMENTHAL, N. M. The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. *J. Periodontol.*, v. 59, p. 830-6, 1988.
4. CAFFESSE, R. G. et al. Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration (GTR). *J. Periodontol.*, v. 61, p. 45-50, 1990.
5. CARD, S. J. et al. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int. J. Periodontol. Rest. Dent.*, v. 9, p. 59-69, 1989.
6. CARVALHO, A. C. P. et al. Implante de poliuretano em tecido conjuntivo subcutâneo: e estudo histológico em ratos. *Rev. Fac. Odontol.*, Araçatuba, v. 5, p. 63-7, 1976.
7. CATON, J., ZANDER, H. A. Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. *J. Clin. Periodontol.*, v. 3, p. 54-8, 1976.
8. GALGUT, P. N. Oxidized cellulose mesh used as a biodegradable barrier membrane in the technique of guided tissue regeneration: a case report. *J. Periodontol.*, v. 61, p. 766-8, 1990.
9. GOTTLLOW, J. et al. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration: case report. *J. Clin. Periodontol.*, v. 13, p. 604-16, 1986.
10. KARRING, T. et al. Potentials for root resorption during periodontal wound healing. *J. Clin. Periodontol.*, v. 11, p. 41-52, 1984.
11. KON, S. et al. Regeneration of periodontal ligament using resorbable and nonresorbable membranes: clinical, histological, and histometric study in dogs. *Int. J. Periodontol. Rest. Dent.*, v. 11, p. 59-71, 1991.
12. KODAMA, T. et al. The effect of various concentrations of collagen barrier on periodontal wound healing. *J. Periodontol.*, v. 60, p. 205-10, 1989.
13. MAGNUSSON, I. et al. New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. *J. Periodontol.*, v. 59, p. 1-6, 1988.
14. MINABE, M. et al. Application of a local drug delivery system to periodontal therapy. I. Development of collagen preparations with immobilized tetracycline. *J. Periodontol.*, v. 60, p. 113-17, 1989.
15. MINABE, M. et al. Guided tissue regeneration using lactide/glycolide copolymer-atelocollagen complex membranes. *Bull. Kanagawa Dent. Col.*, v. 19, p. 3-10, 1991.
16. NYMAN, S. et al. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J. Clin. Periodontol.*, v. 7, p. 394-401, 1980.
17. NYMAN, S. et al. The regenerative potential of the periodontal ligament: an experimental study in the monkey. *J. Clin. Periodontol.*, v. 9, p. 157-65, 1982.

18. PITARU, S. et al. Partial regeneration of periodontal tissue using collagen barriers: initial observations in the canine. *J. Periodontol.*, v. 59, p. 380-6, 1988.
19. PITARU, S. et al. Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue attachment during periodontal wound healing in dogs. *J. Periodont. Res.*, v. 24, p. 247-53, 1989.
20. PONTORIERO, R. et al. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *J. Clin. Periodontol.*, v. 14, p. 618-20, 1987.
21. PONTORIERO, R. et al. Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars: clinical study. *J. Clin. Periodontol.*, v. 15, p. 247-54, 1988.
22. SALONEN, J. I., PERSSON, G. R. Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration. *J. Periodont. Res.*, v. 25, p. 215-21, 1990.
23. TANNER, M. G. et al. An evaluation of new attachment formation using a microfibrillar collagen barrier. *J. Periodontol.*, v. 59, p. 524-30, 1988.

Recebido em 6.2.1992.