

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Programa de Pós-Graduação Em Engenharia Biomédica

Roberta Jenniffer Maciel Teixeira

**POTENCIAL REGENERATIVO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NA DOENÇA  
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E  
MORFOMÉTRICO**

São José dos Campos, SP  
2022

Roberta Jenniffer Maciel Teixeira

**POTENCIAL REGENERATIVO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NA DOENÇA  
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E  
MORFOMÉTRICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Barros Sant'Anna

São José dos Campos, SP

2022

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Teixeira, Roberta Jenniffer Maciel  
Potencial regenerativo da membrana anniótica na doença periodontal induzida em ratos : estudo histológico e morfométrico / Roberta Jenniffer Maciel Teixeira; orientadora, Luciana Barros Sant'Anna. - São José dos Campos, SP, 2022.  
1 CD-ROM, 102 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. membrana anniótica. 3. medicina regenerativa. 4. periodontite. 5. ligadura. I. Sant'Anna, Luciana Barros, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Roberta Jenniffer Maciel Teixeira, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 3 de Junho de 2022.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 05 / 04 / 2022

**ROBERTA JENNIFFER MACIEL TEIXEIRA**

**"POTENCIAL REGENERATIVO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NA DOENÇA  
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E  
MORFOMÉTRICO".**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF. DR. LUIS EDUARDO SILVA SOARES

*Luis Eduardo Silva Soares*

PROF.ª DR.ª LUCIANA BARROS SANT'ANNA

*Luciana Barros Sant'Anna*

PROF.ª DR.ª MARIA APARECIDA NEVES JARDINI – UNESP

*Maria Aparecida Neves Jardim*

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 05 de abril 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus por ter me concedido força e sabedoria para chegar até aqui.

A minha orientadora querida Profa. Dra. Luciana Barros Sant'Anna por todos ensinamentos, ajuda, paciência e cuidado, sendo fundamental para o sucesso da nossa pesquisa e para meu crescimento profissional e pessoal, que honra estar no seu grupo de pesquisa desde a iniciação científica.

Aos meus pais Mônica Silva Maciel Teixeira e José Roberto Teixeira por me incentivarem desde de pequena aos estudos e me oferecerem todo apoio e suporte.

Aos meus tios Sônia Santos e Altair Santos que me acolheram durante 6 anos em sua casa.

A Thamires de Azevedo Malaquias, aluna de iniciação científica do nosso grupo de pesquisa, que me ajudou demais na parte experimental com os animais, sempre muito prestativa.

A Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardini que prontamente se disponibilizou a me ajudar com o modelo experimental de periodontite, foi extremamente atenciosa e gentil.

Aos professores Emília Angela Lo Schiavo Arisawa e Raduan Hage que se empenharam com meu estudo dispostos a auxiliarem.

Aos membros da banca examinadora professores Luis Eduardo Silva Soares, Maria Aparecida Neves Jardini, Emília Angela Lo Schiavo Arisawa e Luciane Dias de Oliveira por terem aceitado o meu convite.

Ao meu namorado Lucas da Silva Vieira, minha avó Benedita da Costa Silva, meu irmão Robert José Maciel Teixeira e toda minha família que sempre me encorajaram a seguir em frente mesmo diante das dificuldades e saudade de estar longe deles.

A Dra Elaine Andrade que me acolheu em sua clínica Life Odonto e em sua vida, me ofereceu flexibilidade nos meus horários de atendimentos e sempre me incentivou com os estudos.

A Universidade do Vale do Paraíba pela bolsa institucional integral que me foi oferecida para realizar o Mestrado em Engenharia Biomédica, local que tenho muito orgulho, aonde também cursei a graduação em Odontologia com bolsa integral por meio do Prouni.

Ao IP&D, colegas da minha turma de Mestrado e todos os professores da graduação e pós graduação pelo suporte e ensinamentos.

“Por maior que seja, não há obstáculo que não possa ser superado! Acredite em você, nos seus sonhos e nos seus objetivos”.

## RESUMO

A doença periodontal é caracterizada como um processo inflamatório crônico que potencialmente leva à destruição óssea alveolar e posteriormente a perda dentária, sendo a doença óssea mais comum nos humanos. Esse caráter inflamatório da doença é devido a intensa infecção bacteriana, associada ao biofilme pré-instalado na superfície dentária. A membrana amniótica (MA) tem atraído atenção como biomaterial para a medicina regenerativa, devido a presença de células tronco que conferem propriedades de biocompatibilidade, antibacteriana, antiinflamatória, imunomodulatória e pró-angiogênica. Sua arquitetura única lhe torna um biomaterial promissor para regeneração tecidual, conferindo excelentes propriedades biológicas e mecânicas. O objetivo deste estudo é analisar o potencial da MA na regeneração dos tecidos periodontais na periodontite induzida em ratos. A casuística é composta por 26 ratos machos *Rattus norvegicus*, Albinos, Wistar, com peso aproximado de 200 a 250g, os quais após o período de aclimatização foram divididos aleatoriamente nos grupos: Grupo Normal (n=6): os animais não foram submetidos a nenhum procedimento, seguindo o percurso normal do experimento; Grupo Ligadura (n=10): os animais foram submetidos à ligadura para indução da periodontite e após 2 semanas esta foi removida; Grupo Ligadura + MA (n=10): os animais foram submetidos a ligadura para indução de periodontite, após 2 semanas a ligadura foi removida e a MA colocada ao redor do defeito ósseo. Após 4 semanas de atuação da MA os animais foram eutanasiados e as análises macroscópica, morfométrica, histológica e histomorfométrica foram realizadas para avaliar o reparo periodontal. Observou-se significativa instalação da doença periodontal, e após a colocação da MA, verificou-se a diminuição da perda óssea alveolar, diminuição da profundidade de sondagem, ganho no nível de inserção conjuntiva, e tecidos periodontais com aspecto de normalidade, particularmente o ligamento periodontal com os feixes de fibras colágenas bastante definidos e organizados. Conclui-se que a MA pode estimular o reparo periodontal após ter removido o agente etiológico que estava provocando a periodontite.

**Palavras-chave:** membrana amniótica; medicina regenerativa; periodontite; ratos; ligadura.

## **Regenerative potential of the amniotic membrane in disease periodontal induced in rats: histological and morphometric**

### **ABSTRACT**

Periodontal disease is characterized as a chronic inflammatory process that potentially leads to alveolar bone destruction and later tooth loss, being the most common bone disease in humans. This inflammatory character of the disease is due to the intense bacterial infection, associated with the biofilm pre-installed on the tooth surface. The amniotic membrane (AM) has attracted attention as a biomaterial for regenerative medicine due to the presence of stem cells that confer biocompatibility, antibacterial, anti-inflammatory, immunomodulatory and pro-angiogenic properties. Its unique architecture makes it a promising biomaterial for tissue regeneration, providing excellent biological and mechanical properties. The objective of this study is to analyze the potential of AM in the regeneration of periodontal tissues in induced periodontitis in rats. The sample consisted of 26 male *Rattus norvegicus*, Albinos, Wistar rats, weighing approximately 200 to 250g, which after the acclimatization period were randomly divided into groups: Normal Group (n=6): the animals were not subjected to any procedure, following the normal course of the experiment; Ligature Group (n=10): the animals were submitted to ligation to induce periodontitis and after 2 weeks it was removed; Ligature + MA group (n=10): the animals were submitted to ligation for induction of periodontitis, after 2 weeks the ligature was removed and the MA placed around the bone defect. After 4 weeks of AM action, the animals were euthanized and macroscopic, morphometric, histological and histomorphometric analyzes were performed to evaluate periodontal repair. A significant installation of periodontal disease was observed, and after AM placement, there was a decrease in alveolar bone loss, a decrease in probing depth, a gain in the level of conjunctival attachment, and periodontal tissues with an aspect of normality, particularly the ligament. periodontal tissue with well-defined and organized collagen fiber bundles. It is concluded that AM can stimulate periodontal repair after removing the etiologic agent that was causing periodontitis.

**Keywords:** amniotic membrane; regenerative medicine; periodontitis; rats; ligature.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação do periodonto. ....	22
<b>Figura 2:</b> Distâncias biológicas em um periodonto. ....	24
<b>Figura 3:</b> Diferença entre o Periodonto Sadio e Doente. ....	26
<b>Figura 4:</b> Diagrama de associação de espécies na placa subgengival. ....	29
<b>Figura 5:</b> Modelo experimental de indução da periodontite. ....	30
<b>Figura 6:</b> Representação das áreas anatômicas da MA.....	32
<b>Figura 7:</b> Camadas Estruturais da Membrana Amniótica. ....	33

## LISTA DE FOTOGRAFIAS

- Fotografia 1:** Placa de referência do local aonde os animais foram retirados (A); Transporte dos animais de São Paulo para São José dos Campos (B). .....41
- Fotografia 2:** Estrutura do Biotério de Passagem do IPD/Univap: *Racks* ventiladas. ....42
- Fotografia 3:** Momento da conferência de consumo, reposição de ração e água, e troca de maravalha (A e B). ....43
- Fotografia 4:** Processamento da membrana amniótica - Separação manual da MA(\*\*) do córion (A); Aspecto da MA quase transparente após a lavagem com a solução de soro fisiológico, penicilina, estreptomicina e anfotericina. (B). ....47
- Fotografia 5:** Periodontite experimental induzida por ligadura. Medicamentos utilizados durante a cirurgia (A); Mesa operatória (B); Posicionamento do animal na mesa operatória (C); Afastamento da mucosa jugal e da língua (D); Sondagem Periodontal inicial (E); Luxação na região interproximal (F); Colocação da ligadura (G, H, I); Animais no colchão térmico (J). .....49
- Fotografia 6:** Procedimentos para a aplicação da MA. Fragmentos de MA criopreservada sendo descongelados(A), e cortados na dimensão aproximada de 1,5 x 3mm (B); Retalho mucoperiosteal (C);Aplicação da MA (D); Retalho reposicionado sobre a MA (E). .....51
- Fotografia 7:** Mandíbula de ratos eutanasiados após 6 semanas da ligadura. Mandíbula inteira após remoção da cavidade oral (A); Hemimandíbulas direita e esquerda após secção da mandíbula (B). .....52
- Fotografia 8:** Procedimentos para a análise morfométrica da perda óssea alveolar. Estereoscópio com a hemimandíbula fixada no silicone (A); Estereoscópio N1-1151 (B); Delimitação da junção cimento esmalte em preto e da crista óssea alveolar em vermelho. A região entre as duas linhas é a região da perda óssea alveolar. As setas indicam as regiões do 1º molar, da direita para a esquerda: mesial, mesio central, central, disto central e distal (C). .....53
- Fotografia 9:** Amostras no EDTA para a descalcificação (A); Seta: Bloco histológico do micrótomo semi-automático. Leica RM2245. ....54
- Fotografia 10:** Representações das regiões do primeiro molar inferior usadas para a análise descritiva histológica: Mesial, Furca e Distal. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 5x. ....55
- Fotografia 11:** Representações do primeiro molar inferior com a coloração tricrômico de Masson. Aumento original: 5x. ....55
- Fotografia 12:** Processo de calibração. A calibração da medida foi realizada utilizando a caixa "Set Scale". Para isto, foi inserida nesta caixa a quantidade de pixels presente em 1 µm. ....57
- Fotografia 13:** Análise histomorfométrica do nível de inserção conjuntiva (NIC) (µm). Imagem ilustrativa dos tecidos periodontais da região interproximal entre o 1º e o 2º molar inferior. A linha preta representa a medida linear do nível de inserção conjuntiva (NIC). Já a região com um círculo vermelho representa o valor de interesse mesurado em uma imagem .....58
- Fotografia 14:** Análise histomorfométrica da perda óssea (µm<sup>2</sup>). Imagem ilustrativa do 1º molar inferior na região de furca, ou seja, na região entre o teto

da furca e crista óssea interradicular. A região avaliada esta demarcada com linha poligonal em amarelo. A região com um círculo vermelho representa o valor de interesse mesurado em quatro imagens diferentes. ....59

- Fotografia 15:** - Análise histomorfométrica da densidade óssea (%). Imagens ilustrativas do 1º molar inferior na região de furca: A) “Grid”, em preto, colocado sobre a imagem; B) Delimitação da região analisada e marcação dos pontos na intersecção das linhas do “Grid”, em amarelo. ....60
- Fotografia 16:** Imagens representativas da análise macroscópica de perda óssea em ratos com periodontite induzida por ligadura do primeiro molar mandibular, nos 3 grupos experimentais. A) Grupo normal; B) Grupo Ligadura; C) Grupo ligadura +MA .....64
- Fotografia 17:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 10x. TF: Teto da bifurcação, D: Dentina, OA: Osso Alveolar, \*: Vasos congestionados, Seta preta: fibras colágenas organizadas, Seta branca: fibras colágenas desorganizadas.....67
- Fotografia 18:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região mesial do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 10x. D: Dentina, OA: Osso Alveolar, Seta Preta: Papila Gengival Mesial, Seta curta: Periosteó..68
- Fotografia 19:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região interproximal entre 1º e 2º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 10x. PMI: Primeiro Molar Inferior, SMI: Segundo Molar Inferior, D: Dentina, OA: Osso Alveolar, Círculo: infiltrado inflamatório, Seta Preta: Junção Cimento-Esmalte, Seta branca: Inserção Conjuntiva.....69
- Fotografia 20:** Fotomicrografias da região de bifurcação, próximo à raiz distal do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Notam-se as fibras de Sharpey inseridas no osso alveolar e no cimento. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 40x. D: Dentina, CE: Cimento, OA: Osso Alveolar, Seta Preta: fibras colágenas organizadas (Fibras de Sharpey), Seta Branca: Fibras colágenas desorganizadas.....70
- Fotografia 21:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região mesial do 1º Molar do grupo Ligadura + MA, onde se observa um pequeno fragmento de membrana se integrando ao tecido conjuntivo gengival. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 10x. MA e Seta Preta: Membrana Amniótica, OA: Osso Alveolar, Seta Branca: MA integrada ao tecido. ....71
- Fotografia 22:** Fotomicrografias da região de bifurcação, próximo à raiz mesial do 1º Molar do grupo normal. Seta preta: osteoclastos multinucleados presentes nas depressões da matriz óssea conhecidas como lacunas de Howship. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 40x. ....71
- Fotografia 23:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original: 10x. TF:Teto da

bifurcação, D: Dentina, OA: Osso Alveolar, \* : Vasos congestos, Seta preta: fibras colágenas organizadas, Seta branca: fibras colágenas desorganizadas.....74

**Fotografia 24:** Fotomicrografia da região de bifurcação, próximo à raiz distal do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Fibras de Sharpey inseridas no osso alveolar e no cimento. Grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + Membrana (C). Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original: 40x. D: Dentina, CE: Cimento, OA: Osso Alveolar, Seta Preta: fibras colágenas organizadas, Seta Branca: Fibras colágenas desorganizadas, Seta vermelha: fibras de Sharpey, .....75

**Fotografia 25:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região mesial do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original: 10x. D: Dentina, OA: Osso Alveolar, Seta Preta: Papila Gengival Mesial, Seta curta: Perióstio..76

**Fotografia 26:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região interproximal entre 1º e 2º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original: 10x. PMI: Primeiro Molar Inferior, SMI: Segundo Molar Inferior, OA: Osso Alveolar, \*Fibras transeptais do ligamento periodontal Seta Preta: Junção Cimento-Esmalte, Seta branca: Inserção Conjuntiva. ....77

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Síntese das Condições e Doenças Periodontais e Peri-Implantares de acordo com classificação de 2018. ....	27
--	----

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1:</b> Fluxograma do delineamento experimental .....	45
--	----

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Média e desvio padrão da profundidade de sondagem no grupo ligadura (A) e ligadura + MA (B) nos três períodos (na ligadura, após 14 dias e na eutanásia). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn.....62
- Gráfico 2:** Média e erro padrão da perda óssea alveolar nos três grupos experimentais. \*\* $p < 0,01$ . ANOVA e teste Tukey. ....63
- Gráfico 3:** Média e desvio padrão da perda óssea alveolar nas faces lingual e vestibular do 1º MI, nos três grupos experimentais. \* $p > 0,05$ ; \*\* $p > 0,01$ ; \*\*\* $p > 0,001$ . ANOVA e teste Tukey. ....64
- Gráfico 4:** Média e desvio padrão do nível de inserção conjuntiva nos três grupos experimentais. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ . ANOVA e teste Tukey. ....78
- Gráfico 5:** Média e desvio-padrão da perda óssea região de furca nos três grupos experimentais.  $p > 0,05$ . ANOVA e teste Tukey. ....79
- Gráfico 6:** Média e desvio padrão da densidade óssea na região de furca nos três grupos experimentais.  $p > 0,05$ . ANOVA e teste Tukey. ....80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D	Dentina
DP	Doença Periodontal
CE	Cemento
CTMs	Células Troncos Mesenquimais
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento
ePTFE	Politetrafluoretileno expandido
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
IC	Inserção Conjuntiva
JCE	Junção cimento esmalte
MA	Membrana Amniótica
mm	Milímetros
NIC	Nível de inserção conjuntiva
OA	Osso Alveolar
PDGF	Derivado de plaquetas fator de crescimento
PMI	Primeiro Molar Inferior
PMN	Polimorfonucleares
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
SMI	Segundo Molar Inferior
TF	Teto da Bifurcação
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
µm	Micrômetros

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
3.1 Periodonto .....	22
3.2 Espaço biológico.....	23
3.3 Doença periodontal.....	24
3.4 Classificação das doenças periodontais 2018 .....	26
3.5 Micro- organismos das doenças periodontais .....	27
3.6 Modelo de periodontite experimental.....	29
3.7 Prevenção e tratamento doença periodontal.....	30
3.8 Membrana amniótica.....	31
3.8.1 Regiões anatômicas da membrana amniótica.....	32
3.8.2 Aplicações terapêuticas e propriedades da membrana amniótica .....	33
3.8.3 Membrana amniótica e terapia periodontal regenerativa .....	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 Animais e grupos experimentais .....	40
4.2 Colheita da placenta e processamento da membrana amniótica .....	46
4.3 Modelo experimental de indução da periodontite .....	47
4.4 Remoção da ligadura e colocação da membrana amniótica.....	50
4.5 Eutanásia e coleta das amostras. ....	51
4.6 Análise macroscópica.....	52
4.7 Análise morfométrica.....	52
4.8 Processamento histológico e análise histológica.....	53
4.9 Análise histomorfométrica .....	56
4.9.1 Nível de inserção conjuntiva (NIC) .....	56
4.9.2 Perda óssea na região de furca .....	58
4.9.3 Densidade óssea na região de furca.....	59
4.10 Análise estatística .....	60
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
5.1 Análise macroscópica.....	62
5.2 Análise morfométrica.....	63
5.3 Análise histológica dos tecidos periodontais .....	64
5.4 Análise Histomorfométrica.....	77
5.4.1 Nível de inserção conjuntiva (NIC) .....	78

<b>5.4.2 Perda óssea na região de furca .....</b>	<b>78</b>
<b>5.4.3 Densidade óssea na região de furca .....</b>	<b>79</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO B: PARECER CEUA 06/CEUA/2020. ....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO C: ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA.....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é um processo inflamatório crônico que afeta o periodonto, causada por uma infecção bacteriana associada ao biofilme pré-instalado na superfície dentária (ELAHI *et al.*, 2021). Engloba a inflamação gengival, a degeneração do ligamento periodontal e cemento, e perda do osso alveolar, sendo que o comprometimento destas estruturas de suporte eventualmente leva à perda do dente (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Uma pesquisa epidemiológica sugeriu que mais de 50% de todos os adultos no mundo são afetados por doenças periodontais (CARASOL *et al.*, 2016). A patogênese desta doença é complexa e envolve as interações entre a resposta imune do hospedeiro e os micro-organismos presentes no biofilme abrangendo, também fatores de riscos incluindo tabagismo e genética. O grande desafio na terapia periodontal regenerativa é recuperar o periodonto perdido. Este desafio é ainda maior quando não se dá a devida atenção à remoção do biofilme e aos agravantes da doença, tornando o tratamento difícil (LIU *et al.*, 2019).

O tratamento periodontal convencional e inicial é a profilaxia por meio da raspagem e alisamento radicular visando interromper o acúmulo de bactérias e controlar a doença. Porém dependendo da gravidade da destruição periodontal apenas essa conduta não é suficiente, tornando necessário o uso de terapias mais invasivas como retalhos mucoperiosteal para a raspagem subgengival (ELAHI *et al.*, 2021). O organismo por si só, quando se encontra livre do agente etiológico tende a reparar as estruturas perdidas, porém hoje em dia é almejada a regeneração das mesmas. Dentro deste campo ganha destaque a regeneração tecidual guiada, que tem como objetivo guiar as células com capacidade regenerativa para repovoar a lesão e promover novo cemento, ligamento periodontal e osso (NUÑEZ *et al.*, 2019). Estudos sugerem que materiais biológicos, incluindo membranas de colágeno e membrana amniótica humana, têm potencial suficiente para serem usados na regeneração óssea guiada (SHETTY; CHATTERJEE; BOSE, 2014; FÉNELON *et al.*, 2018).

Na contemporaneidade cresce a utilização da engenharia de tecidos, a qual é um campo interdisciplinar focado no reparo, substituição, ou regeneração de tecidos danificados por traumas, senescência, doenças inflamatórias e degenerativas. A engenharia de tecidos apresenta constante progresso por possibilitar a regeneração

do tecido perdido usando células-tronco mesenquimais (CTMs), entre outras. O potencial das células tronco é devido às características de serem indiferenciadas, auto-renováveis por longos períodos, ao seu potencial de diferenciação em tipos celulares especializados, e mais recentemente à capacidade de imunomodulação durante a regeneração tecidual (NTEGE; SUNAMI; SHIMIZU, 2020). Para a regeneração dos tecidos periodontais CTMs de vários tecidos tem sido investigadas, incluindo as do ligamento periodontal (IWATA *et al.*, 2009; PARK; JEON; CHOUNG, 2011), tecido adiposo (WU *et al.*, 2016), periósteo (JIANG *et al.*, 2010) e da membrana amniótica (AGARWAL *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2016).

A membrana amniótica (MA) é a mais interna das membranas fetais, que juntamente com a placenta é descartada após o parto. É translúcida e avascular apresentando espessura entre 0,02 mm e 0,5 mm, sua estrutura forte e elástica facilita a manipulação durante a prática cirúrgica, e exibe uma rica herança de colágeno dos tipos I, IV, V e VI, proteoglicanos, laminina e fibronectina (GUPTA; KEDIGE; JAIN, 2015). Tem sido usada clinicamente sobre queimaduras e úlceras dérmicas (REILLY *et al.*, 2017; DEHGHANI *et al.*, 2017), na oftalmologia para tratamento de necrose e inflamação grave dos olhos (CAPOROSSO *et al.*, 2019) e seu uso em odontologia também está se expandindo rapidamente com aplicações em caso de defeitos na mucosa oral (KAR *et al.*, 2014), defeitos intraósseos (TSUNO *et al.*, 2014) e recessões gengivais (SHETTY; CHATTERJEE; BOSE, 2014). Além disso, em estudos pré-clínicos a MA demonstrou-se eficiente para tratamento de fibrose hepática, impedindo a sua progressão para a cirrose (SANT'ANNA *et al.*, 2011; 2016; 2017; MAMEDE; SANT'ANNA, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2020), reparo de tendão (NICODEMO *et al.*, 2017) e tratamento de feridas crônicas (CAMPELO *et al.*, 2018). Esse amplo campo de atuação é alcançado devido as suas propriedades: antibacteriana, anti-inflamatória, antifibrótica, pró/anti angiogênica e de estímulo à epitelização, diminuindo o tempo de cicatrização e a dor. Ademais, é um tecido biocompatível, e as propriedades mecânicas como estabilidade, flexibilidade e permeabilidade fazem dela um potencial *scaffold*, suportando a migração e adesão celular, e com isto o crescimento do tecido. Assim, é considerada um biomaterial potente para uso na engenharia de tecidos, para o reparo ou regeneração (LEAL-MARIN *et al.*, 2021).

A terapia periodontal regenerativa com o uso da membrana amniótica visa restaurar os tecidos de suporte perdidos por sequela da doença periodontal inflamatória. Desde que a regeneração destes tecidos é um processo complexo, a

terapia regenerativa com a MA tem atraído atenção devido às suas propriedades biológicas e mecânicas, que por sua vez são atribuídas aos seus componentes, incluindo fatores de crescimento, citocinas e proteínas estruturais (LAFZI *et al.*, 2007). A MA reduz a inflamação e fornece uma matriz altamente rica em proteínas facilitando a migração de células na área de defeito, ou seja, sustenta a proliferação celular e crescimento tecidual, além de servir como uma barreira protetora da ferida (WU *et al.*, 2016). Segundo Karrem (2020) a aplicação da MA pode ser útil para manter a configuração estrutural e anatômica dos tecidos periodontais. Entretanto, mais estudos são necessários para investigar completamente o potencial da MA como ferramenta na regeneração periodontal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar o potencial da MA na regeneração dos tecidos periodontais na periodontite induzida em ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar o potencial da MA sobre:

-A perda óssea por meio da análise morfométrica, das faces vestibular e lingual do rebordo alveolar, pela coloração do azul de metileno.

-As alterações morfológicas dos tecidos periodontais, por meio da análise histológica qualitativa;

-O nível de inserção conjuntiva na região interproximal entre o 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> molares inferiores por meio da análise histomorfométrica.

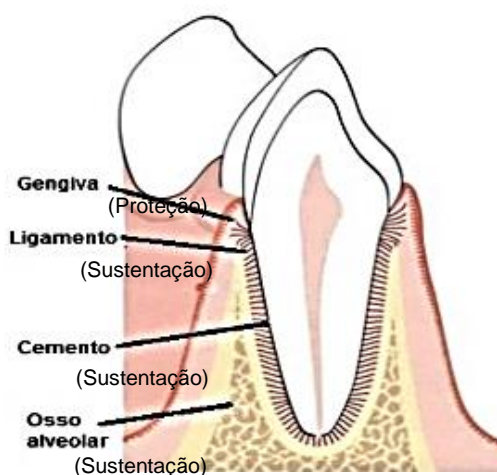
-A perda óssea e a densidade óssea, ambas na região de furca, por meio da análise histomorfométrica.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Periodonto

O dente é revestido e envolvido por um conjunto de tecidos que formam o periodonto, sendo os mesmos: gengiva, osso alveolar, ligamento periodontal e cemento, os quais são fundamentais para sua fixação e sustentação nos ossos maxilar e mandibular (FIGURA 1) (LINDHE; KARRING; ARAITJO, 2010). Cada um desses componentes do periodonto apresentam características distintas como arquitetura tecidual, composição celular, localização, porém ao desempenharem as funções de proteção e sustentação funcionam como uma unidade (SILVA, 2012).

**Figura 1:** Representação do periodonto.



**Fonte:** Adaptado de Lindhe, Karring e Araitjo, 2010).

A gengiva representa o periodonto de proteção e é revestida por um epitélio pavimentoso estratificado. O epitélio gengival é dividido em três componentes de acordo com sua função: epitélio oral que está voltado para a cavidade oral, epitélio sulcular que está voltado para o dente, sem contato com a superfície do mesmo e epitélio juncional que permite o contato da gengiva e o dente. Também apresenta o tecido conjuntivo em compartimentos superficial e profundo. O aspecto saudável da gengiva é o de “casca de laranja”, ou seja, tem uma superfície corrugada, de coloração rosa pálida e consistência firme (STEFFENS; MARCANTONIO, 2018).

O cemento faz parte do periodonto de sustentação é caracterizado como um tecido conjuntivo mineralizado que recobre a dentina radicular, sua principal função é inserir as fibras do ligamento periodontal na raiz do dente. A composição do cemento assemelha-se ao osso, contém 50% de minerais e 50% de matriz orgânica, inclusive apresenta células muito semelhantes, mas diferente do tecido ósseo o cemento é avascular logo sua nutrição vem do ligamento periodontal (OLIVEIRA, 2016).

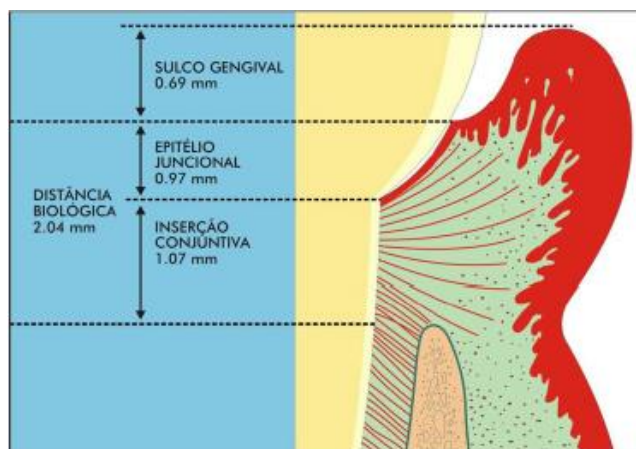
Já o ligamento periodontal é um tecido conjuntivo frouxo, vascularizado, situado entre dois componentes mineralizados o cemento e o osso alveolar, com isso exerce a articulação entre o dente e seu alvéolo. Sua estrutura permite o dente suportar as cargas de mastigatórias. É formado por diversas células sendo os fibroblastos as células mais numerosas. Já o principal constituinte da sua matriz extracelular são os feixes de fibras colágenas, os quais são nomeados de acordo com a sua orientação e região da raiz onde inserem-se (GOULARTE, 2021).

O osso alveolar é uma camada de tecido ósseo que forma a parede do alvéolo dentário. A parede alveolar ao redor de toda a raiz do dente apresenta remodelação contínua e rápida frente a mastigação funcional ou algum desafio metabólico como na movimentação ortodôntica. O osso alveolar tem aspecto fasciculado, devido a inserção dos feixes de fibras do ligamento periodontal, orientados perpendicularmente à superfície, ou seja, as fibras de Sharpey. A superfície do osso alveolar é recoberta por osteoblastos ou células de revestimento justapostas (dependendo do estado funcional destas células). Em regiões de reabsorção óssea são encontrados osteoclastos. Logo a homeostase do osso depende de um equilíbrio entre reabsorção óssea pelos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos (KATBURIAM; ARANA, 2003).

### **3.2 Espaço biológico**

O espaço biológico compreende a distância entre a base do sulco histológico e a crista óssea alveolar, apresentando uma dimensão média de 2,04 mm, que são distribuídas em 1,07mm de inserção conjuntiva e 0.97 mm de epitélio juncional (Figura 2) (GARGIULO; WENTZ0; ORBAN,1961; JANSON et al., 2002).

**Figura 2:** Distâncias biológicas em um periodonto.



**Fonte:** Janson et al., 2002.

A preservação do espaço biológico é de extrema importância pois proporciona um adequado selamento em torno do elemento dental, agindo assim como uma barreira contra a penetração de microrganismos e seus produtos para os tecidos de suporte dentário (GARGIULO; WENTZO; ORBAN, 1961). A invasão deste pode gerar uma inflamação crônica resultando na periodontite na qual se têm comprometimento do periodonto de sustentação podendo assim consequentemente evoluir para perda do elemento dental (RISSATO; TRENTIN, 2012; STEFFENS; MARCANTONIO, 2018).

### 3.3 Doença periodontal

Caracterizada como uma doença inflamatória crônica multifatorial que acomete os tecidos de proteção e de suporte dos dentes e pode levar à perda dentária, afetando grande parte da população mundial, sendo a doença óssea mais comum. Essa patologia não é considerada uma simples infecção bacteriana e sim uma doença complexa onde ocorre um desequilíbrio entre a microbiota subgengival, as repostas imunes e inflamatórias do hospedeiro e os fatores determinantes ambientais. (ARMITAGE, 1999; STEFFENS; MARCANTONIO, 2018).

A gengivite é considerada o estágio inicial e um fator de risco para periodontite, marcada por uma vermelhidão, edema e sangramento gengival à sondagem ou durante a escovação e uso do fio dental. Apresenta caráter reversível e resulta do

acúmulo do biofilme dentário, ou seja, se este for corretamente removido temos a reversão desta condição, caso contrário evoluirá para uma periodontite. Frente a isso pode se afirmar que toda periodontite foi uma gengivite anteriormente (OLIVEIRA, 2016).

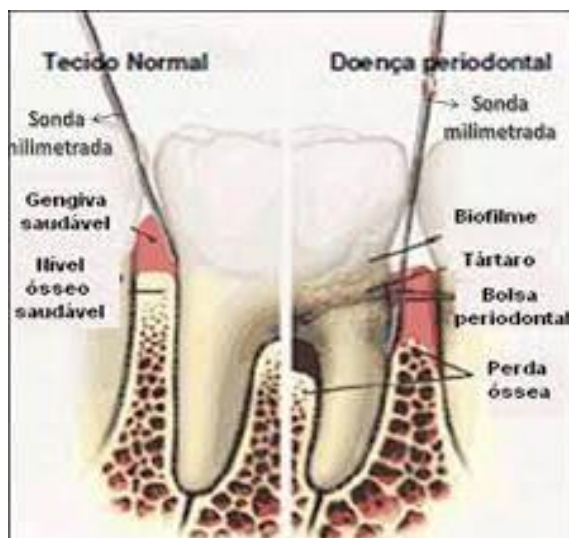
A periodontite é uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, associada com um biofilme disbiótico, composto por micro-organismos específicos ou grupos de microorganismos específicos, e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental, resultando em uma destruição progressiva do ligamento periodontal e do osso alveolar, com formação de bolsa, retração ou ambas (TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018).

O biofilme dentário é visto como o fator primário para o início do sangramento gengival e posteriormente destruição dos tecidos periodontais, porém hoje em dia é nítido que a presença isolada do biofilme corresponde a uma pequena parcela para a expressão da doença periodontal e de acordo com o novo modelo de patogênese o principal componente para esta manifestação de destruição dos tecidos moles e duros é a resposta imunoinflamatória do hospedeiro frente às agressões bacterianas (STEFFENS; MARCANTONIO, 2018).

Um periodonto saudável é caracterizado pelo sangramento à sondagem em menos de 10% dos sítios, sem perda de inserção, profundidade de sondagem de até 3 mm, sem perda óssea radiográfica e com a distância entre a junção cimento esmalte e a crista óssea variando de 1 a 3 mm (FIGURA 3) (MORELLI *et al.*, 2018).

Durante a prática clínica essa perda dos tecidos periodontais é avaliada por meio de duas medidas específicas: a profundidade de bolsa periodontal (distância entre a margem gengival até o fundo da bolsa periodontal) e o nível clínico de inserção (distância entre a junção cimento esmalte e o fundo da bolsa periodontal), realizadas com o auxílio da sonda periodontal milimetrada em diferentes sítios ao redor do dente. Outras condições que também são consideradas na avaliação clínica e durante o preenchimento do periograma são: a observação de sangramento à sondagem (índice de sangramento sulcular gengival), inspeção visual de cor, textura e edema da gengiva (índice gengival), presença de placa bacteriana na superfície dental (índice de placa), índice de mobilidade e também se faz uma complementação por meio da avaliação radiográfica de perda do osso alveolar (BUDUNELI; KINANE, 2011; OLIVEIRA, 2016).

**Figura 3:** Diferença entre o Periodonto Sadio e Doente.



. Fonte: Silva, 2012.

### 3.4 Classificação das doenças periodontais 2018

Por muito tempo a classificação aceita internacionalmente foi a de Armitage (1999) a qual subdividia a periodontite em periodontite agressiva, doenças periodontais necrosantes, periodontite crônica, abscessos periodontais e periodontite como manifestação sistêmica. Porém fosse viável e concisa algumas deficiências foram sendo levantadas como caracterização generalizada, escassez de patobiologia nítida entre as categorias definidas e imprecisão diagnóstica. Frente a isso uma nova classificação foi elaborada em 2018 substituindo a que estava vigente (CATON *et al.*, 2018; GOULARTE, 2021; MOREIRA, 2021).

Em Chicago, no Estados Unidos, em 2017, foi realizado o encontro mundial com participantes da Academia Americana de Periodontia e Federação Européia de Periodontia para elaboração da Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares que foi lançado em junho de 2018. Esse novo esquema de classificação para doenças e condições periodontais e peri-implantares visa melhorar os diagnósticos e conseqüentemente o plano de tratamento estabelecido individualmente para cada paciente, por exemplo, as periodontites são classificadas atualmente quanto seu estágio e grau o que lhe torna menos generalizada e mais precisa (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; CATON *et al.*, 2018; STEFFENS; MARCANTONIO, 2018; BARROSO *et al.*, 2021).

**Quadro 1:** Síntese das Condições e Doenças Periodontais e Peri-Implantares de acordo com classificação de 2018.

<b>1.Saúde Periodontal, Condições e Doenças Gengivais, subdividido em:</b>	<b>2.Periodontite, subdividido em:</b>	<b>3. Outras Condições que afetam o Periodonto, subdividido em:</b>	<b>Para as condições peri-implantares, estas foram divididas em:</b>
1.1 Saúde Periodontal e Saúde Gengival	2.1 Doenças Periodontais Necrosantes	3.1 Manifestações Periodontais de Doenças ou Condições Sistêmicas	1. Saúde Peri-Implantar
1.2 Gengivite Induzida pelo Biofilme	2.2 Periodontite	3.2 Abscessos Periodontais e Lesões Endoperiodontais	2. Mucosite Peri-Implanta
1.3 Doenças Gengivais Não Induzidas pelo Biofilme	2.3 Periodontite como Manifestação de Doenças Sistêmicas	3.3 Condições e Deformidades Mucogengivais	3. Peri-Implantite
		3.4 Forças Oclusais Traumáticas	4. Deficiências nos Tecidos Peri-Implantares Moles e Duros
		3.5 Fatores Relacionados ao Dente e às Próteses	

**Fonte:** Adaptado de Steffens e Marcantonio, 2018.

### 3.5 Micro- organismos das doenças periodontais

Importante lembrar que a colonização do biofilme que leva ao acúmulo de placa bacteriana ao longo da margem gengival é feita por microrganismos patogênicos Gram negativos, que estimulam a reação inflamatória. Na era de ouro da microbiologia no início do século XX, acreditava-se que certos micro-organismos (como espiroquetas, fusiformes, amebas, estreptococos) eram os possíveis agentes etiológicos da doença periodontal e responsáveis pela destruição tecidual. Contudo a cada década com mais

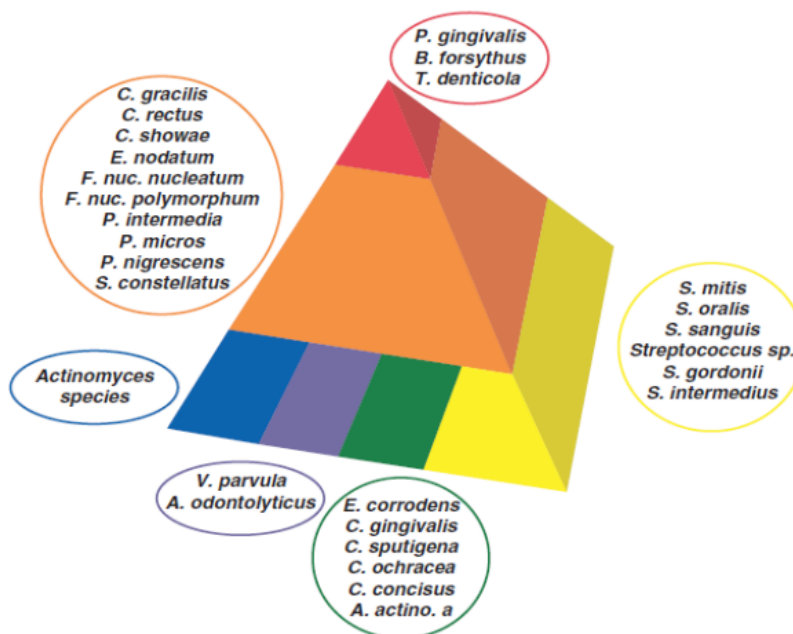
estudos acerca da relação destas bactérias com a doença foram mudando esse conceito (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1994; SILVA, 2012).

Quando os micro-organismos patogênicos colonizam a área do sulco gengival e ficam bem estabelecidos no biofilme esses patógenos apresentam alto grau de virulência, eles alteram o equilíbrio da microbiota comensal existente e iniciam o processo de mudança na composição da microbiota. Isto acarreta uma resposta imune inata do hospedeiro. Hoje em dia é notório que a destruição dos tecidos periodontais ocorre por consequência deste processo, e sua causa está muito mais relacionada a resposta imune inata desregulada do hospedeiro contra as bactérias do que as bactérias em si (PAYNE *et al.*, 2015; CAMPOS, 2018).

As alterações patológicas no periodonto estão relacionadas a um pequeno grupo de bactérias, denominado como complexo vermelho, o qual engloba e destaca *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*. Dentro deste complexo também está o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que apresenta alta virulência.

Socransky *et al.* (1998), criaram uma pirâmide para caracterizar as espécies subgengivais após analisarem as associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgengival de pacientes saudáveis e com periodontite, com isso estabeleceram padrões de colonização que foram divididos em complexos relacionados com parâmetros clínicos de doença periodontal. A base compreende os complexos que abrangem espécies colonizadoras da superfície do dente, referente aos estágios iniciais da doença periodontal. Na região intermediária da pirâmide está o complexo laranja, considerado como a transição dos colonizadores iniciais e as espécies do complexo vermelho que estão no topo da pirâmide tornam mais evidentes e dominantes nos estágios finais de desenvolvimento da placa fortemente associados à inflamação e à progressão da doença periodontal.

**Figura 4:** Diagrama de associação de espécies na placa subgengival.



Fonte: Silva, 2012.

### 3.6 Modelo de periodontite experimental

O rato é dentre os animais experimentais o mais utilizado para modelos de periodontite, por apresentar algumas vantagens: fácil manuseio e rápida destruição periodontal. Eles apresentam estruturas periodontais semelhantes ao homem (epitélio oral, epitélio sulcular, epitélio juncional, fibras colágenas periodontais, cemento e osso alveolar) (GONÇALVES, 2002).

O modelo de indução de periodontite largamente utilizado consiste na colocação de ligadura de fio de algodão (JOHNSON *et al.*, 1975; FERREIRA, 2016) ao redor dos dentes primeiros molares, ao nível do sulco gengival (Figura 5). Após 14 dias da sua colocação já tem a doença instalada e a perda óssea estabelecida (FISCHER; KLINGE, 1994; GONÇALVES, 2002; FERREIRA, 2016; OLIVEIRA, 2016).

**Figura 5:** Modelo experimental de indução da periodontite.



Fonte: Oliveira, 2016.

### 3.7 Prevenção e tratamento doença periodontal

A saúde oral exige manutenção diária, essa envolve a escovação dos dentes, uso do fio dental, visitas de rotina ao cirurgião dentista, essenciais para impedirem o acúmulo do biofilme e o início da doença, realizando a prevenção. Logo quando a mesma já está instalada requer a remoção do biofilme e cálculo dentário, para esse fim é necessário a raspagem e o alisamento radicular (RAR) supra e sub gengival, o padrão ouro de tratamento da doença periodontal, utilizando curetas manuais e/ou ultrassom. Porém existem casos mais avançados com alto comprometimento do periodonto os quais necessitam, por exemplo, de uma regeneração periodontal, visando devolver suporte e função ao elemento dental, aonde a profilaxia periodontal convencional não é suficiente e deve ser complementada por técnicas como por exemplo a regeneração tecidual guiada (CARLO *et al.*, 2006, CHRISTGAU *et al.*, 2007; CATON *et al.*, 2018, GOULARTE, 2021).

O organismo por si só após a descontaminação local e eliminação da inflamação inicia a formação de um longo epitélio juncional que recobre a raiz do dente, associado a um tecido fibroso e à gengiva. Logo esse tecido formado não desempenha as funções sensorial, nutricional e de suporte mecânico igual ao existente antes da patologia. Isto é explicado pois ocorreu uma reparação tecidual e não a regeneração que resultaria a formação de novos cemento, osso alveolar e ligamento periodontal. A regeneração tecidual guiada é a principal técnica desenvolvida para promover a regeneração tecidual, nesta uma membrana de origem natural ou sintética, é implantada entre a gengiva e a raiz dentária e osso alveolar exposto (REIS; BORGES; DEL CARLO, 2009; AGARWAL *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2016).

Atualmente barreiras físicas na forma de membrana têm sido usadas entre o retalho mucogengival e o osso. Essas barreiras devem atender aos seguintes princípios: ser biocompatível; possuir permeabilidade que permita a difusão de plasma e nutrientes, porém não a passagem de células; funcionar como suporte físico ao tecido mole circundante; criar um espaço e mantê-lo preenchido pelo coágulo no qual as células osteogênicas possam migrar; proteger a delicada rede vascular durante a organização do coágulo; excluir células não osteogênicas; e prevenir a formação de uma cicatriz residual realizando a seleção celular (CARLO *et al.*, 2006; FÉNELON *et al.*, 2018).

A técnica Regeneração Tecidual Guiada (RTG) vem sendo usada na regeneração do periodonto em casos de defeitos ósseos provocados por diversas causas como doença periodontal, traumas ou ressecções de tecidos neoplásicos e ao redor de implantes dentários. As membranas não reabsorvíveis de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) são utilizadas, porém como desvantagem necessidade de uma segunda cirurgia para serem retiradas por esse motivo, estudos recentes têm se concentrado no desenvolvimento e aplicação de materiais reabsorvíveis na RTG. Estudos sugerem que materiais biológicos (membrana amniótica, membrana de colágeno) têm potencial suficiente para serem usados na regeneração óssea guiada (SHETTY; CHATTERJEE; BOSE, 2014; FÉNELON *et al.*, 2018).

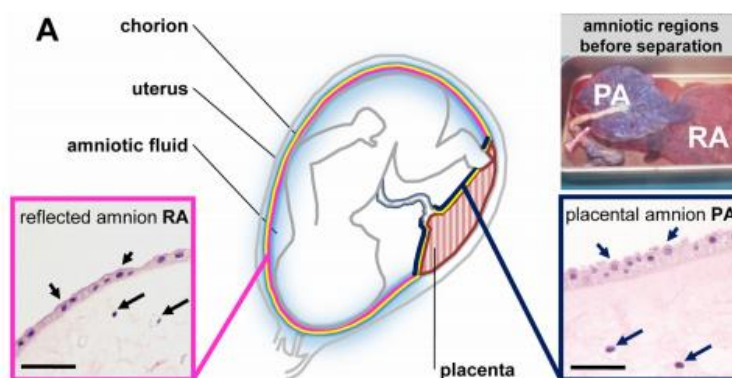
### **3.8 Membrana amniótica**

A placenta é um órgão muito importante pois promove o intercâmbio fisiológico entre o feto e sua mãe. Ela é constituída por dois componentes: um de origem fetal a placa coriônica, e outro de origem materna, representado pelas as decíduas (derivadas do endométrio). Ambas estruturas se encontram fortemente aderidas pela capa citotrofoblástica, ancorando o saco coriônico à decídua basal. A membranas amniótica e coriônica separam o feto do endométrio e fazem parte do componente fetal (BANERJEE *et al.*, 2015).

### 3.8.1 Regiões anatômicas da membrana amniótica

A membrana amniótica é a camada mais interna das membranas fetais, é descartada no momento do parto juntamente com a placenta. Sendo assim é disponível em alta quantidade e sua colheita não envolve um procedimento invasivo, também não apresenta conflitos ético ou religioso, como é o caso, por exemplo da colheita de células tronco embrionárias, ou colheita de células tronco da medula óssea. A membrana apresenta duas regiões, *Placental Amnion* (PA), onde o âmnio se encontra sobre o disco coriônico, e *Reflected Amnion* (RA), o âmnio da parte extraplacentária das membranas fetais. Estudos recentes tem demonstrado que estas regiões são distintas na morfologia, na expressão gênica, na atividade mitocondrial, na transparência, e na concentração de fatores de crescimento (DEIHIM; YAZDANPANA; NIKNEJAD, 2016)(FIGURA 6).

**Figura 6:** Representação das áreas anatômicas da MA.



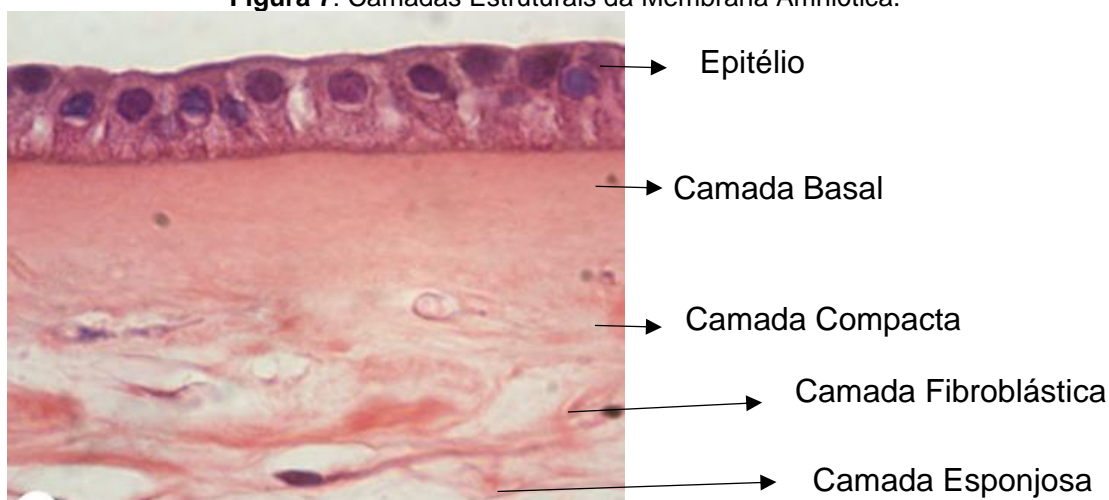
**Autor:** Banerjee, 2015.

Assim, é provável que cada região tenha potenciais diferentes na regeneração dos tecidos, sendo necessários ainda estudos nesta área para esclarecer seus possíveis efeitos na aplicação clínica.

A membrana amniótica é composta pelas camadas epitelial, membrana basal e estroma avascular (Figura 7). A mais interna é a camada epitelial sendo assim a mais próxima ao feto, estando em contato com o líquido amniótico, é formada por uma única camada de células que apresentam forma cuboide predominantemente, mas em regiões específicas se diferenciam em células colunares. São uninucleadas e se encontram aderidas a membrana basal mediante de interdigitações (NIKNEJAD *et al.*, 2008).

A membrana basal é considerada uma das mais espessas de todo tecido humano, sendo composta por fibras colágenas do tipo III, IV e V, laminina e fibronectina. Na gestação é responsável pela sustentação do feto. Já o estroma avascular subdivide-se em camada compacta, camada fibroblástica e camada esponjosa, possui predominantemente fibras colágenas do tipo III organizadas frouxamente, tem uma ligeira ligação com a membrana coriônica o que possibilita a separação manual da MA do córion (SOARES, 2013).

**Figura 7:** Camadas Estruturais da Membrana Amniótica.



**Fonte:** Modificado de Moraes et al., 2021

As células amnióticas humanas têm origem embriológica precoce, assim expressando marcadores de células tronco pluripotentes e sendo capazes de se diferenciar *in vitro* nos tecidos das três camadas germinativas (PAROLINI *et al.*, 2008). Além das células, a camada mesenquimal apresenta uma rica rede de fibras de colágeno, elastina, ácido hialurônico, lamininas e fibronectina, que proporcionam propriedades como estabilidade, flexibilidade, auto aderência, permeabilidade, permitindo que ela seja utilizada como scaffold e substrato para proliferação de células e formação de tecidos (BOURNE; BENIRSCHKE, 1960; NIKNEJAD *et al.*, 2008; MAMEDE *et al.*, 2014).

### **3.8.2 Aplicações terapêuticas e propriedades da membrana amniótica**

A MA humana foi usada pela primeira vez em 1910 para reconstrução da pele pelo cirurgião plástico Dr Davis. Em 1940, ROTT demonstrou a eficiência da MA para

o tratamento de defeitos conjuntivos e queimaduras químicas. Porém o seu uso diminuiu e quase desapareceu por cerca de 50 anos, provavelmente devido a regulamentos mais rigorosos sobre transplantes de tecidos, principalmente àqueles relacionados à forma correta de armazenamento, preservação e esterilização. O ressurgimento da MA aconteceu na década de 1990, na área da oftalmologia com Kim e Tseng (1995), e a partir disto a MA MA foi consolidada como um biomaterial de suma importância na área da oftalmologia (MAMEDE *et al.*, 2014).

Atualmente, a membrana amniótica está sendo utilizada para tratamento dos processos inflamatórios, degenerativos e fibróticos pois sua arquitetura única lhe torna um biomaterial promissor para regeneração tecidual (BANERJEE *et al.*, 2015). Clinicamente o transplante de MA intacta é usado em queimaduras (REILLY *et al.*, 2017), úlceras de pele (DEGHANI *et al.*, 2017), na ortopedia (HECKMANN; AURAN; MIRZAYAN, 2016), na vaginoplastia (VATSA *et al.*, 2017), e continua sendo usado na oftalmologia (CAPOROSI *et al.*, 2019). Na odontologia, Shetty, Chatterjee e Bose. (2014) utilizaram a MA para recessão Classe I de Miller a qual é caracterizada por não atingir a linha mucogengival e não apresentar perda na região entre os dentes, clinicamente na recessão gengival devido a migração apical da gengiva o dente apresenta exposição radicular. Tsuno *et al.* (2014) utilizaram na vestibuloplastia para o tratamento de feridas alveolares intraorais com exposição óssea. Já Kar *et al.* (2014) utilizaram a membrana amniótica humana criopreservada em defeitos na mucosa oral, neste caso servindo como material de enxerto, a qual apresentou resultados promissores neste reparo.

Nas aplicações clínicas ou nos estudos experimentais a MA tem sido usada na forma fresca ou na forma preservada. Diferentes métodos foram propostos para a preservação da MA, incluindo hipototérmica (4°C), liofilização, desidratação, vitrificação e criopreservação (-80°C) (HENNERBICHLER *et al.*, 2007; RIAU *et al.*, 2010). Destas formas de preservação, a criopreservação é frequentemente empregada em vez da MA na forma fresca, pois permite o armazenamento por longos períodos antes de seu uso, possibilitando a repetição dos testes sorológicos realizados no período pré-natal, a fim de eliminar qualquer risco biológico. Ferenczy e Souza (2020) publicaram uma revisão de literatura sobre os vários métodos de preparo, no qual levantou que o mais utilizado na oftalmologia é a desepitelização, que torna a MA desnuda, com isso observa uma melhor proliferação e diferenciação celular. Já em relação ao meio de conservação destacou o glicerol pelo seu baixo

custo e facilidade de manuseio. A criopreservação em glicerol, normalmente misturado 1:1(v/v) com DMEM foi introduzido por Lee e Tseng (1997), e desde então este meio tem obtido altas taxas de sucesso para o transplante da MA, sendo assim o método mais utilizado mundialmente.

Moraes *et al.* (2021) ressalta a importância de usar um método que mantenha a integridade da MA. Seu estudo avaliou dois métodos de preservação: MA fresca e MA criopreservada. Em ambos os protocolos foi verificado uma redução da viabilidade celular, porém a morfologia das camadas epitelial e estromal foram preservadas. Ao avaliar o teor de proteínas solúveis, a MA fresca apresentou uma redução, enquanto que a MA criopreservada demonstrou uma concentração de proteínas similar ao grupo MA controle, ou sem nenhuma preservação. Logo, sobressaiu a criopreservação com DMEM/Glicerol, pois manteve a integridade estrutural e o teor de proteína solúvel, indicando maior eficiência deste método na preservação da MA para seu uso na terapia regenerativa.

Recentemente Fénelon *et al.* (2018) exploraram o uso da MA na medicina regenerativa, verificando o potencial da mesma na regeneração óssea guiada. Foi realizada uma avaliação *in vitro* da viabilidade celular da MA fresca e da MA criopreservada. Já *in vivo*, avaliou-se o impacto da MA fresca versus a criopreservada, no reparo de defeito ósseo crítico na calvária de ratos, utilizando tanto a camada epitelial quanto a mesenquimal em contato com o defeito, E por fim, a MA criopreservada associada a um substituto ósseo (neste caso a hidroxiapatita) foi comparada a uma membrana de colágeno usada atualmente para a regeneração óssea guiada. *In vitro*, foi demonstrado que não houve diferença estatística entre as condições de viabilidade celular. *In vivo*, a MA sozinha induziu maior formação óssea, quando a camada mesenquimal cobriu o defeito, em comparação ao controle onde o defeito foi deixado vazio. Quando associada a um substituto ósseo, tal resultado não foi obtido, não ficando nítido melhora. Sugerem diante deste estudo, que MA criopreservada apresenta potencial na regeneração óssea guiada.

Fénelon *et al.* (2020) compararam quatro métodos de preservação da MA a fim de verificar o mais adequado, sendo eles: fresco, criopreservado, liofilizado e descelularizado/liofilizado. Confirmaram, que a membrana amniótica manteve seus principais componentes estruturais (colágeno e glicosaminoglicanos) em todos os métodos utilizados. Ao final verificou-se, que o método que utiliza a associação entre descelularização e liofilização demonstrou os resultados mais promissores para

regeneração óssea guiada, apresentando maior resistência ao rasgamento e maior potencial de osteodiferenciação, ou seja, melhores propriedades mecânicas e osteocondutoras.

O estudo de Perepelkin *et al.* (2016) destaca a vantagem da criopreservação da MA para a possibilidade de seu armazenamento em bancos de membranas para posterior uso na prática clínica. A MA foi processada e cortada em diferentes tamanhos (3 cm x 3 cm; 5 cm x 5 cm e 10 cm x 10 cm). Foi demonstrado que em todos os fragmentos de membrana, independentemente do tamanho, a viabilidade celular, tanto das células epiteliais, quanto das estromais foi mantida, quando estes foram criopreservados. Este resultado, suporta o uso clínico da MA criopreservada, como aloenxertos sem perdas de suas propriedades e funções.

Dentro da engenharia de tecidos um componente fundamental é a matriz de suporte sobre a qual células e tecidos crescem, conhecido também como andaime. Os “scaffolds” necessitam integrar com facilidade o tecido hospedeiro e possibilitar um ambiente benéfico para a diferenciação e crescimento celular. Frente a isso o conceito de biocompatibilidade sobressai e se torna essencial, sendo a capacidade de um biomaterial desempenhar sua função sem causar resposta prejudicial local ou sistêmica no receptor do material, a MA possui uma alta biocompatibilidade e um baixo risco de imunogenicidade (FÉNELON *et al.*, 2021). Em seu estudo Kamarul *et al.* (2014) comparou a biocompatibilidade *in vivo* de um “scaffold” biológico feito de membrana amniótica e um sintético e revelou um grande infiltrado inflamatório nos ratos implantados com o sintético, mas não nos com MA. Ao avaliar diferentes métodos de preservação e osteodiferenciação a biocompatibilidade da MA se destaca novamente e se sobressai em relação à outros materiais (WILSHAW *et al.*, 2008; LAURENT *et al.*, 2017), essa é realmente um promissor biomaterial que vem sendo usada até mesmo como revestimento para melhorar a biocompatibilidade de outros materiais (TEHRANI *et al.*, 2021).

O sucesso do uso da MA nessas aplicações terapêuticas é devido às propriedades biológicas e mecânicas da membrana. E essas propriedades são atribuídas a fatores biológicos solúveis e insolúveis presentes na sua estrutura (SILINI *et al.*, 2013; KOPACZKA *et al.*, 2016). Possui propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias devido à produção de fatores anti-inflamatórios como ácido hialurônico, interleucina 10, e prostaglandina E2; propriedades antifibrótica, por atuar na redução do fator de crescimento transformante beta (TGFbeta) e assim reduz a atividade de

secreção do colágeno pelos fibroblastos.; propriedade de promoção da epitelização, devido aos seus fatores de crescimento como EGF e HGF (LEAL- MARIN *et al.*, 2021).

### **3.8.3 Membrana amniótica e terapia periodontal regenerativa**

Iwasaki *et al.* (2014) desenvolveram um novo método de transplante de células para regeneração periodontal usando células-tronco do ligamento periodontal semeadas na membrana amniótica criopreservada. Foi analisado a atuação deste novo método em defeitos periodontais criados cirurgicamente em molares superiores de ratos, esses defeitos foram criados removendo o osso alveolar, ligamento periodontal e cimento radicular usando uma broca dental. Os resultados foram positivos demonstraram características importantes como estabilidade da MA com as células aderidas nela, fácil manipulação e melhoria na regeneração do tecido periodontal, verificado tanto por micro-CT como por histologia após 4 semanas de transplantação.

Kumar *et al.* (2017) adotaram uma terapia combinada usando a MA na regeneração tecidual guiada junto com o enxerto ósseo Periobone G buscando regenerar o aparato de inserção periodontal. Seu estudo foi um relato de caso, onde o paciente apresentava um dente com prognóstico questionável com grande perda óssea e lesão periapical. Então adotou como tratamento a execução da endodontia e a terapia periodontal com amniótica e enxerto ósseo. Após 12 meses foi verificado, por meio do exame radiográfico, o preenchimento ósseo e a resolução da lesão interradicular.

Recentemente Iwasaki *et al.* (2019) avançaram ainda mais no método de “tecnologia de transferência de células”, realizando a transferência de células-tronco do ligamento periodontal humano para a membrana amniótica descelularizada, e então transplantada em defeitos periodontais realizados em ratos, com o objetivo de examinar a eficácia deste procedimento na regeneração periodontal. Diferente do seu estudo anterior desta vez utilizou um tratamento de alta pressão hidrostática para remover os componentes celulares da MA. Os resultados foram prósperos verificou-se formação de novo cimento, ligamento periodontal e osso no defeito o que demonstrou que a regeneração periodontal foi induzida pelo transplante.

Elahi *et al.* (2019) investigaram a capacidade da membrana amniótica humana atuar como scaffold para o crescimento dos fibroblastos do ligamento periodontal,

considerados as principais células na regeneração periodontal. Para isso, fibroblastos do ligamento periodontal comercialmente disponíveis foram semeados na MA, e por meio da microscopia eletrônica de varredura e análise histológica foi observada a fixação e proliferação destas células. Os resultados do estudo sugeriram que a MA pode ser usada como um promissor biomaterial para engenharia de tecidos periodontais, funcionando bem como scaffold para os fibroblastos do ligamento periodontal por 7 dias, apresentando alta biocompatibilidade com estas células, as quais se proliferam e integram a MA em um curto período de tempo.

Hamada, Yeh e Blanchard (2020) indagaram que a regeneração periodontal tem cada vez mais se sobressaído entre os tratamentos periodontais, pois almeja restaurar a morfologia e função das estruturas perdidas. Esse trabalho engloba um relato de caso que visou avaliar a eficácia da membrana de âmnio-córion, como aloenxerto, aplicada na superfície radicular para tratar defeito intraósseo periodontal. A terapia adotada foi a combinação de aplicação do aloenxerto de âmnio-córion na superfície radicular, preenchimento do defeito intraósseo com aloenxerto ósseo liofilizado cortiço-esponjoso e mais uma camada do aloenxerto de âmnio-córion por cima. Como resultados foram visíveis o ganho de inserção clínica, preenchimento ósseo radiográfico e redução da recessão gengival.

Mahajan *et al.* (2018) ressaltaram que o recobrimento radicular fundamentado na regeneração tecidual guiada apareceu como uma categoria de tratamento promissora para recessão gengival. Então, no seu estudo compararam a eficácia clínica entre a membrana de colágeno considerada “padrão ouro”, e a membrana amniótica para o tratamento de pacientes com recessão gengival. Verificou-se que as duas membranas foram igualmente eficazes no tratamento da recessão gengival possibilitando redução nos defeitos, e ganho no nível de inserção clínica. Constatou-se um aumento da espessura do tecido gengival nas recessões tratadas com membrana de colágeno, ou seja, alteração do biotipo algo não considerado interessante no campo da regeneração.

Assim, a MA é frequentemente usada para o reparo de tecido epitelial danificado, pois promove epitelização, na diminuição da inflamação, na modulação da angiogênese, e na prevenção de cicatrizes, propriedades que potencializam seu uso na periodontite. As membranas mais estudadas até o momento na odontologia para regeneração periodontal são as de colágeno (REIS; BORGES; DEL CARLO, 2011). Ambas desempenham suas finalidades de reconstrução tecidual, porém a MA é um

promissor biomaterial devido às suas propriedades biológicas e mecânicas, a sua fácil obtenção, a alta quantidade disponível, uma vez que é descartada no parto, além de ser uma alternativa mais econômica (LAFZI *et al.*, 2007, MAMEDE *et al.*, 2014).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais e grupos experimentais

Todos os procedimentos realizados nos animais foram executados de acordo com as normas éticas regidas pelo colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPD/UNIVAP, sob protocolo 06/CEUA/2020.

Foram utilizados 26 ratos machos *Rattus Norvegicus*, Albinos, Wistar, com peso aproximado de 200 a 250g, os quais foram obtidos no Biotério de Produção de Ratos Rede de Biotérios USP. O cálculo do tamanho da amostra (número de ratos) foi baseado no método da equação de recursos, onde  $E$  (tamanho da amostra) =  $N$  (número estimado de animais por tratamento x número de tratamentos) –  $T$  (números de tratamentos) (CONCEA, 2019).

$$E = N - T$$

Neste estudo,  $E = (10 \times 3) - 3$ , o que resulta em um total de 27 animais, a serem divididos por 3 grupos. Também, durante toda pesquisa, o princípio dos 3Rs (Reduzir, Reciclar, Reutilizar), estabelecido por Russell e Burch em 1959, foi respeitado. E, visando garantir o bem estar dos animais durante o transporte de São Paulo à São José dos Campos, foram mantidos quatro animais por gaiolas, abastecidos com maçãs para evitar a desidratação dos animais, e em temperatura ambiente de 22°C (Fotografia 1).

Fotografia 1: Placa de referência do local aonde os animais foram retirados (A); Transporte dos animais de São Paulo para São José dos Campos (B).



**Fonte:** o Autor.

Em São José dos Campos, os animais permaneceram no biotério de passagem do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, local com infraestrutura desenvolvida para oferecer um ambiente controlado. Os animais foram acondicionados em *racks* ventilados dentro de microisoladores, sendo mantidos de três a quatro animais dependendo do grupo, e abastecidos com água e ração, em temperatura ambiente de aproximadamente 22°C em um ciclo claro/escuro de 12h (Fotografia 2).

**Fotografia 2:** Estrutura do Biotério de Passagem do IPD/Univap: *Racks* ventiladas.



**Fonte:** o Autor.

Três vezes por semana foi realizada a limpeza dos microisoladores, com troca da maravalha, reposição de água e ração e lavagem dos equipamentos. Todas as segundas feiras foram feitas a pesagem dos ratos, acompanhando a evolução do seu peso em relação ao peso corpóreo inicial aferido no primeiro dia de sua chegada ao biotério da Universidade (Fotografia 3).

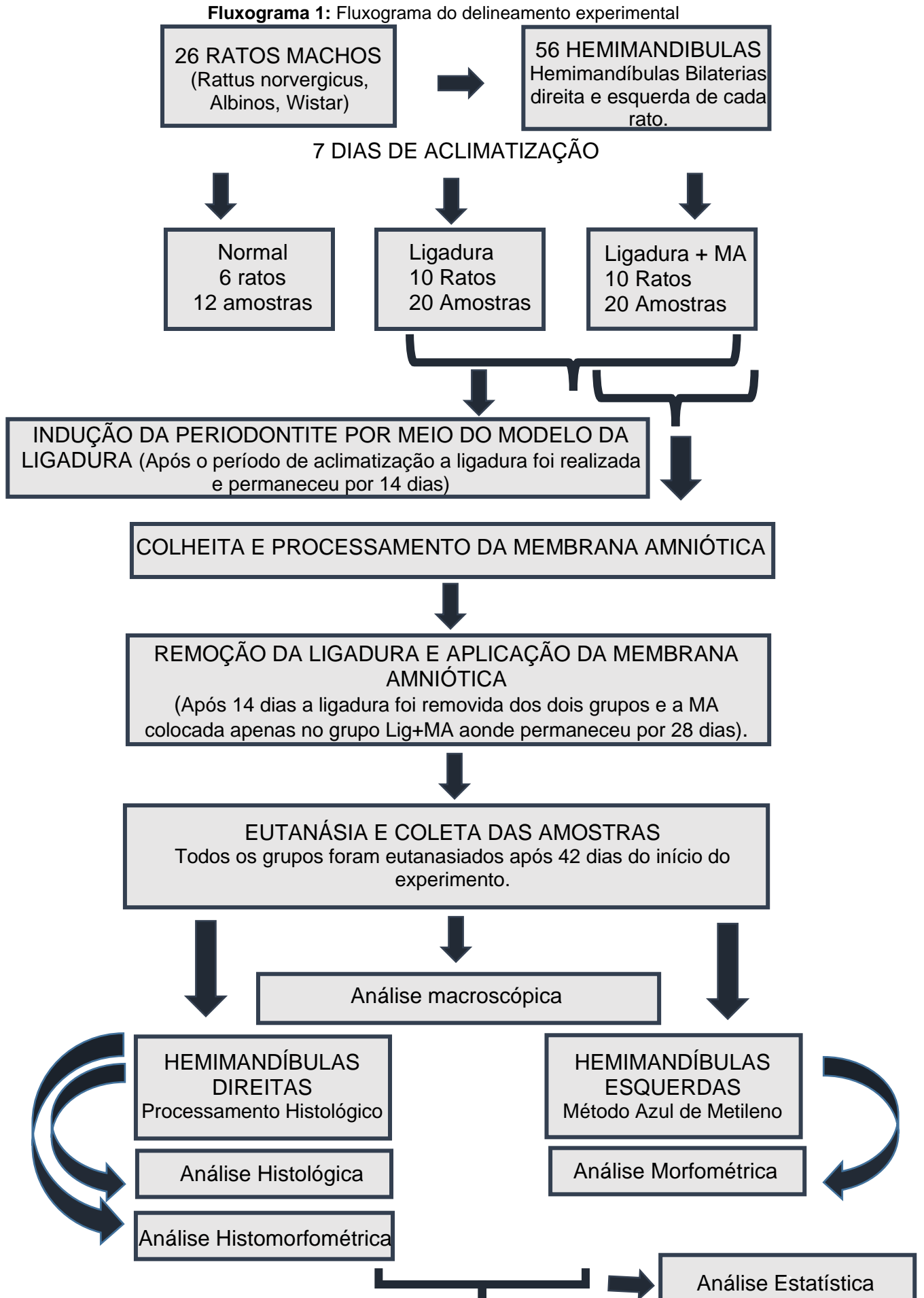
**Fotografia 3:** Momento da conferência de consumo, reposição de ração e água, e troca de maravalha (A e B).



**Fonte:** o Autor.

Durante a primeira semana os animais no biotério passaram pelo período de aclimatização antes de seu uso nos experimentos, objetivando adaptar o animal ao novo ambiente, à alimentação adotada e ao manuseio pelos pesquisadores. Após o período de aclimatização os ratos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: Grupo Normal (n=6): os animais não foram submetidos a nenhum procedimento, seguindo o percurso normal do experimento; Grupo Ligadura (n=10): os animais foram submetidos à ligadura para indução da periodontite, e após 2 semanas esta foi removida; Grupo Ligadura + MA (n=10): os animais foram submetidos a ligadura para indução da periodontite, e após 2 semanas a ligadura foi removida e a MA aplicada ao redor do defeito ósseo. Cabe ressaltar que, conforme o método da equação de recursos, o tamanho da amostra foi de 27, o que dividido por 3 resulta em 9 animais por grupo. Entretanto, um rato ainda teve que ser utilizado para um último teste relacionado ao procedimento da anestesia resultando, assim em uma amostra final de 26 ratos, os quais compuseram os grupos de tratamento, segundo descrito acima. O grupo normal foi utilizado, pois o rato possui um bruxismo constante fisiológico, logo para ser estabelecido um padrão de normalização do nível ósseo dos animais após o período de experimento este grupo é muito importante.

A partir da obtenção dos grupos experimentais, os procedimentos experimentais foram delineados em 9 etapas: 1 – Colheita e processamento da membrana amniótica; 2 – Indução da periodontite por meio do modelo da ligadura; 3 – Remoção da ligadura e aplicação da membrana amniótica; 4 – Eutanásia e coleta das amostras; 5 – Análise macroscópica; 6 – Análise morfométrica; 7 – Análise histológica; 8 – Análise histomorfométrica: da perda de inserção, da perda óssea na região de furca, da densidade óssea na região de furca; 9 – Análise estatística (Fluxograma 1).



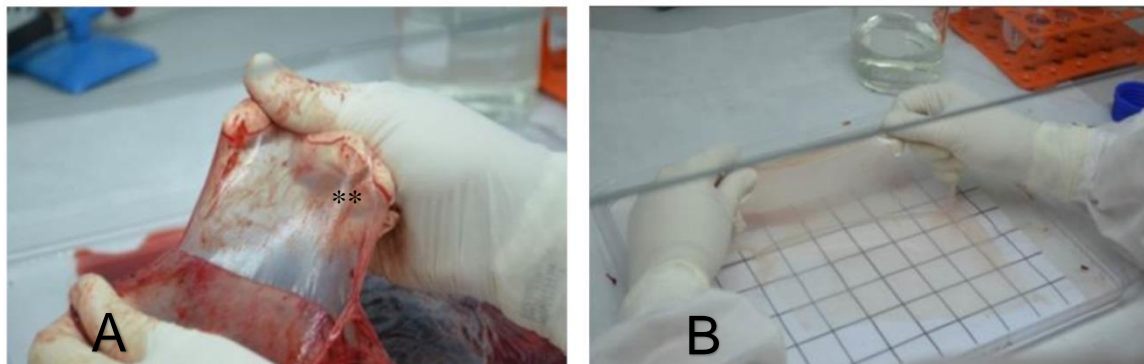
## 4.2 Colheita da placenta e processamento da membrana amniótica

O trabalho também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP/UNIVAP) protocolo nº 4.530.253. Três placentas humanas foram obtidas, por meio de cesárias eletivas de pacientes com gestação normal, do centro cirúrgico obstétrico da Santa Casa de São José dos Campos, após consentimento prévio da parturiente por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e posterior aos resultados laboratoriais negativos para hepatite B e C, sífilis e HIV. A enfermeira obstétrica responsável da maternidade, após receber treinamento, foi encarregada da colheita das placentas, sendo capaz de realizar a triagem das doadoras de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos, e sanar todas as suas possíveis dúvidas e questionamentos. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contendo todos os dados e esclarecimentos referentes à pesquisa foi realizado individualmente.

No dia do parto o médico obstetra efetuou a avaliação da placenta e a entregou para a enfermeira, que a colocou em saco plástico estéril que foi mantido sob refrigeração entre 10° a 15°C até a retirada no hospital pelo pesquisador.

As placentas foram trazidas até o laboratório de Histologia e Terapia Regenerativa - IPD/UNIVAP em caixa térmica com temperatura aproximada de 10° a 15°C, sem haver contato direto com o gelo. No laboratório, todos os procedimentos para o processamento da MA foram realizados em condições estéreis. A MA foi destacada manualmente do córion e lavada amplamente com solução fisiológica contendo 100U/ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e anfotericina B (Fotografia 4).

**Fotografia 4:** Processamento da membrana amniótica - Separação manual da MA(\*\*) do córion (A); Aspecto da MA quase transparente após a lavagem com a solução de soro fisiológico, penicilina, estreptomicina e anfotericina. (B).



**Fonte:** Sant'Anna *et al.*, (2017).

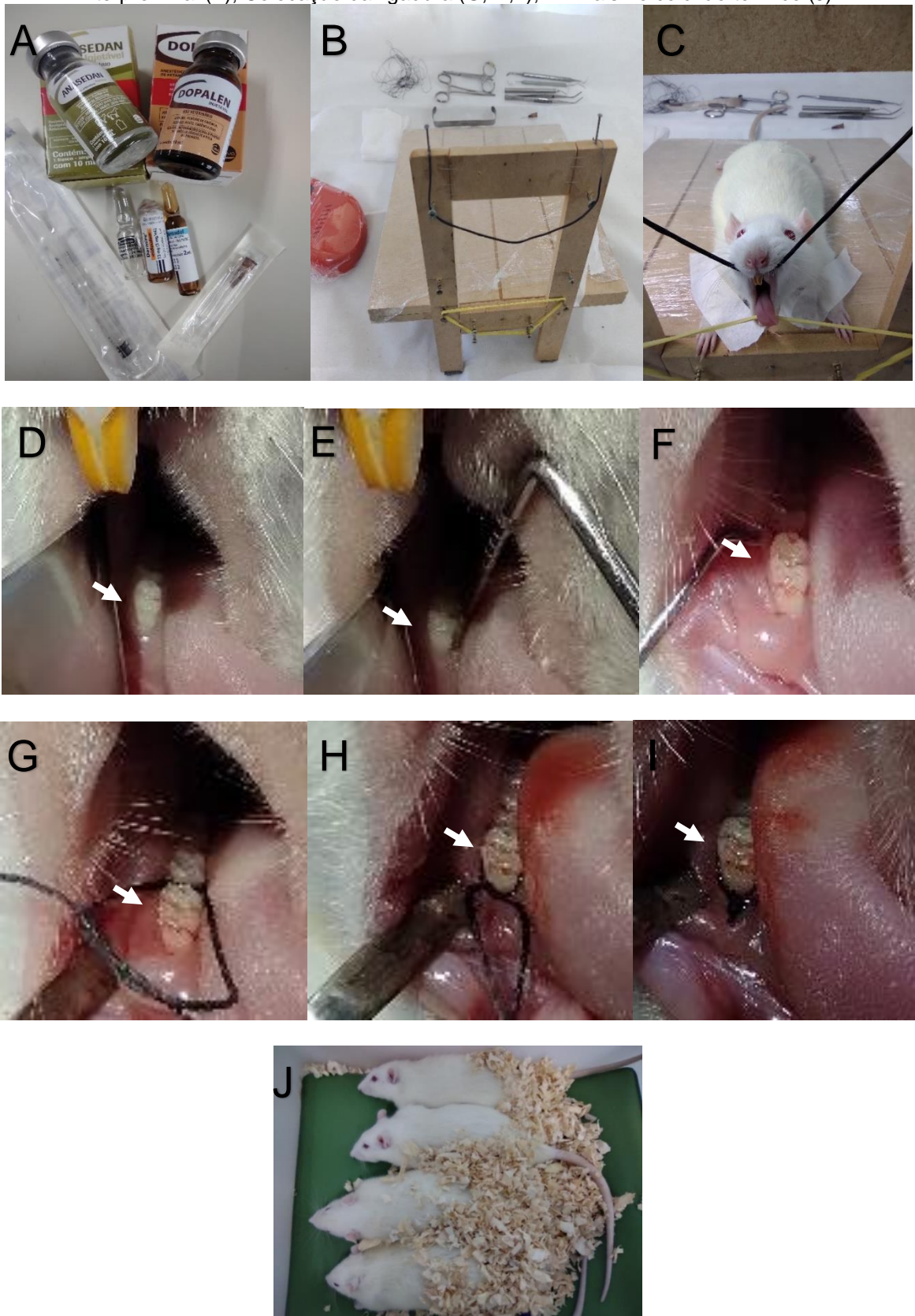
As regiões com rupturas foram descartadas, assim como a eliminação total de coágulos de sangue presentes na MA. Em seguida, fragmentos da MA (3x3cm) foram marcados de forma a possibilitar a identificação da face mesenquimal. Em seguida foram imersos e preservados em meio DMEN/glicerol 1:1 (v/v) a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias até a aplicação nos animais, em ambas hemimandíbulas, direitas e esquerdas.

### 4.3 Modelo experimental de indução da periodontite

Foi utilizado para indução da periodontite o clássico modelo experimental de ligadura, que após duas semanas já apresenta bem estabelecida a doença periodontal. Para a indução da periodontite todos os animais foram pré-anestesiados por via intramuscular com midazolam 5 mg/kg e atropina 0,044 mg/kg. Após 10 minutos foram anestesiados por via intraperitoneal com o anestésico cloridrato de quetamina 100 mg/kg, e o relaxante muscular cloridrato de xilazina 10 mg/Kg. Após 15 minutos desta aplicação os animais atingiram o estado de anestesia geral sendo então colocados em mesa operatória modificada, idealizada por Houston (1964), para a indução da periodontite, a qual se iniciou com a abertura bucal, afastamento da mucosa jugal (utilizando um afastador de Farabeuf) e afastamento da língua, para facilitar a visualização e permitir acesso aos dentes molares inferiores. Em seguida, com uma sonda milimetrada de 15 mm foi realizada a sondagem periodontal inicial das regiões mesial, mesio central, furca, disto central e distal. Com auxílio de uma sonda exploradora, entre a distal do 1º molar e mesial do 2º molar, foram realizados movimentos repetitivos ântero-posteriores, para que houvesse uma ligeira luxação no

dente com o objetivo de facilitar a colocação da ligadura. Assim, no espaço criado foi inserida uma agulha 13 x 0,45 com o objetivo de mantê-lo aberto até a colocação do fio de algodão 4.0, o qual foi inserido na região sulcular ao redor dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo de cada animal. Para isto utilizou-se um porta agulha castroviejo, uma sonda exploradora pediátrica e uma agulha fina. A ligadura foi amarrada firmemente usando um nó triplo na face mesial e mantida por 14 dias. Essa ligadura foi bilateral, ou seja, realizada nas hemimandíbulas direita e esquerda de cada rato. Como analgesia pós-operatória foi utilizado Tramadol (50 mg/Kg), por via subcutânea, de 12/12 horas por dois dias. Durante o transoperatório e até a recuperação da anestesia, os animais ficaram sobre um colchonete térmico a 37°C, por aproximadamente 30 minutos para evitar a hipotermia (FISCHER *et al.*, 1994, GONÇALVES, 2002, FERREIRA, 2016) (Fotografia 5).

**Fotografia 5:** Periodontite experimental induzida por ligadura. Medicamento utilizados durante a cirurgia (A); Mesa operatória (B); Posicionamento do animal na mesa operatória (C); Afastamento da mucosa jugal e da língua (D); Sondagem Periodontal inicial (E); Luxação na região interproximal (F); Colocação da ligadura (G, H, I); Animais no colchão térmico (J).

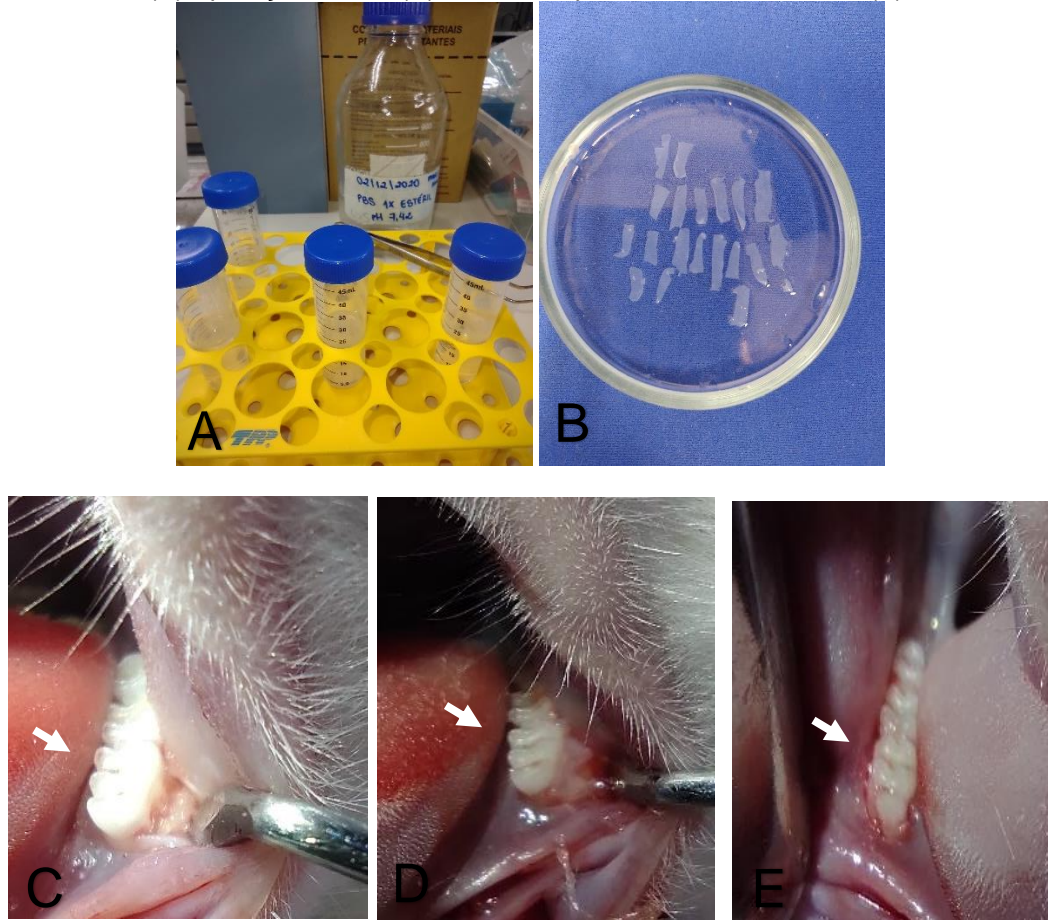


Fonte: o Autor.

#### **4.4 Remoção da ligadura e colocação da membrana amniótica**

Após 14 dias os animais foram anestesiados novamente, e uma nova sondagem foi realizada ao retirar a ligadura. No grupo Ligadura foi realizada a remoção da ligadura, e os animais seguiram sem tratamento. Já no grupo Ligadura+MA, após a remoção da ligadura, foi realizado um retalho mucoperiosteal com o auxílio de um hollemback, raspagem subgengival e em seguida aplicado a membrana, em ambas as hemimandíbulas. Antes desta aplicação, a MA criopreservada foi descongelada em banhomaria a 37°C, lavada em tampão PBS, e cortada em fragmentos de 1,5 x 3mm, os quais foram aplicados na região de perda óssea do osso alveolar, que se estabeleceu ao redor das raízes dentárias dos primeiros molares direito e esquerdo (Fotografia 6). Importante ressaltar, que não houve a necessidade de sutura da MA, devido à sua capacidade de auto aderência, principalmente da face mesenquimal da mesma. Após, o retalho foi reposicionado, e os animais permaneceram no colchonete término até a recuperação anestésica, sendo seguido pela analgesia, conforme descrito para o grupo Ligadura, protocolo este descrito no item 4.3.

**Fotografia 6:** Procedimentos para a aplicação da MA. Fragmentos de MA criopreservada sendo descongelados(A), e cortados na dimensão aproximada de 1,5 x 3mm (B); Retalho mucoperiosteal (C);Aplicação da MA (D); Retalho reposicionado sobre a MA (E).

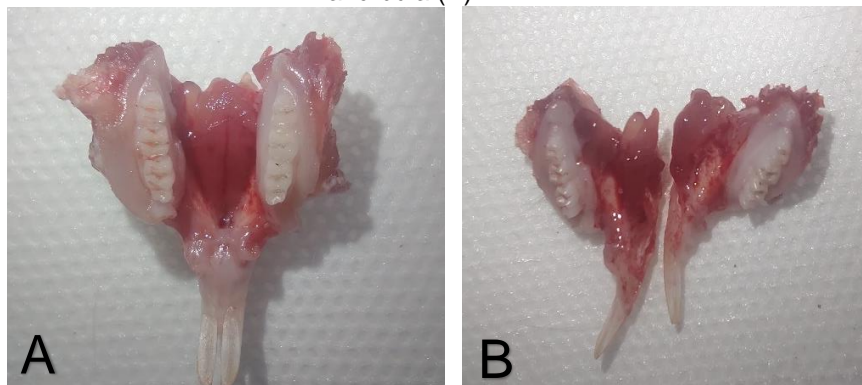


Fonte: o Autor.

#### 4.5 Eutanásia e coleta das amostras.

Após 42 dias do início do experimento, ou seja, da colocação da ligadura, os ratos foram eutanasiados com overdose dos anestésicos quetamina e xilasina. Para a remoção das mandíbulas da cavidade oral foi utilizado uma tesoura de ponta reta, para realizar 2 cortes a partir da comissura labial, incluindo o músculo masseter, até a articulação temporomandibular. Em seguida, a mandíbula foi dividida pela sínfise, e as hemimandíbulas obtidas (Fotografia 7). De cada rato, foram utilizadas as hemimandíbulas esquerdas para a análise morfométrica, e as direitas para a análise histológica.

**Fotografia 7:** Mandíbula de ratos eutanasiados após 6 semanas da ligadura. Mandíbula inteira após remoção da cavidade oral (A); Hemimandíbulas direita e esquerda após secção da mandíbula (B).



Fonte: o Autor.

#### 4.6 Análise macroscópica

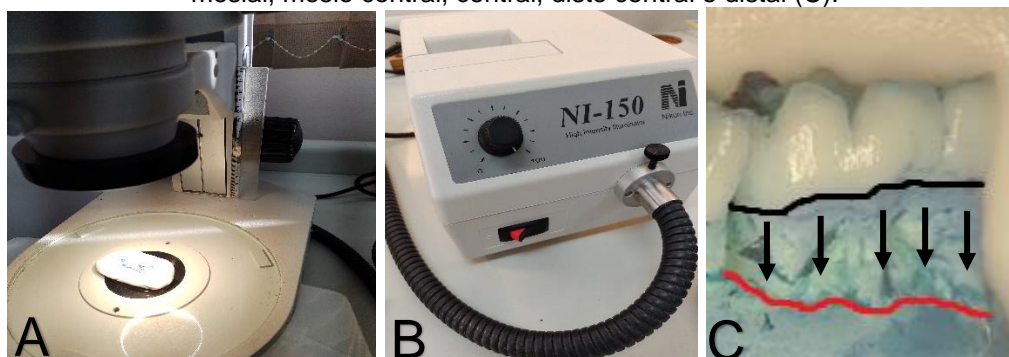
Os pesos dos animais foram verificados semanalmente, até a eutanásia. Especificamente, foram verificados alguns indicadores da periodontite, incluindo a profundidade de sondagem por meio do uso de sonda periodontal milimetrada, presença ou ausência de sangramento gengival durante a sondagem, e a mobilidade dentária.

#### 4.7 Análise morfométrica

As hemimandíbulas do lado esquerdo foram imersas em água oxigenada a 30% por 2 h. Após este tempo os tecidos moles foram removidos com auxílio de alicates, seguido pela coloração com azul de metileno a 1% por 30 minutos. Em seguida, as hemimandíbulas foram lavadas em água corrente, e o excesso de umidade removido em papel absorvente. O azul de metileno, tem por objetivo corar osso e cimento, delimitando a junção cimento-esmalte o que facilita a visualização, e mensuração das raízes expostas. As hemimandíbulas foram secas, colocadas em um suporte de silicone para a manutenção da mesma posição em todas as amostras. Em seguida, com o uso de um estereoscópio Nikon SMZ645 no aumento de 20x, as imagens de cada hemimandíbula, nas porções vestibular e lingual dos molares

inferiores foram capturadas e digitalizadas. Com o auxílio do software de processamento de imagem *Image J 1.51K*, foi analisado a perda óssea alveolar ao redor do 1º molar inferior de cada grupo experimental, por dois examinadores cegos. A perda óssea alveolar foi expressa pelo somatório em milímetros das distâncias entre a crista do osso alveolar e a junção cimento-esmalte de 5 regiões do 1º molar: mesial, mesio central, central, disto central e distal (AZAMBUJA, 2011) (Fotografia 8).

**Fotografia 8:** Procedimentos para a análise morfométrica da perda óssea alveolar. Estereoscópio com a hemimandíbula fixada no silicone (A); Estereoscópio N1-1151 (B); Delimitação da junção cimento esmalte em preto e da crista óssea alveolar em vermelho. A região entre as duas linhas é a região da perda óssea alveolar. As setas indicam as regiões do 1º molar, da direita para a esquerda: mesial, mesio central, central, disto central e distal (C).



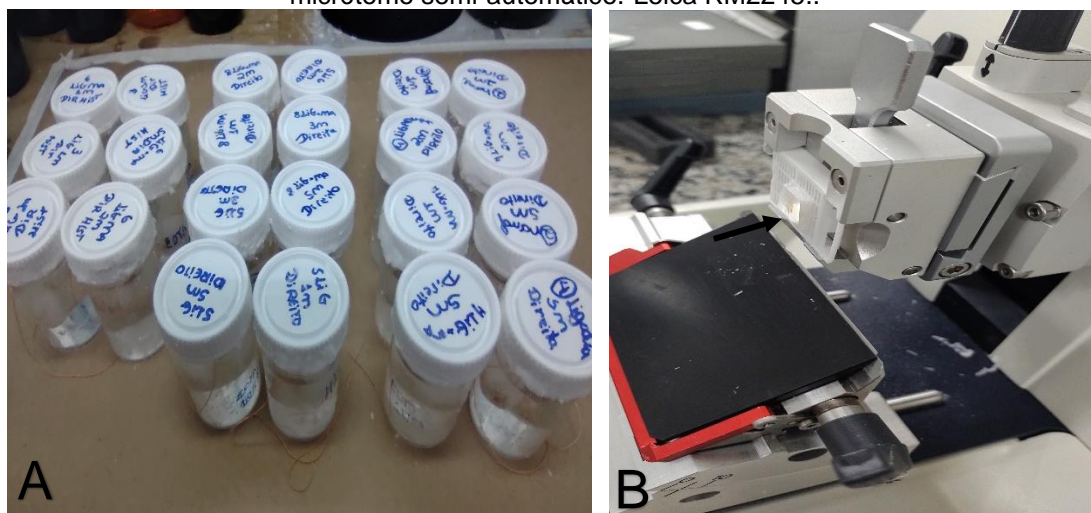
Fonte: o Autor.

#### 4.8 Processamento histológico e análise histológica

As amostras foram imersas em formalina tamponada (Synth, São Paulo, Brazil) a 10% por 24h, e em seguida foram colocadas no EDTA para se realizar o processo de descalcificação durante 2 meses. Após este período as amostras foram lavadas em água corrente por 1 hora, foram clivadas e colocadas em álcool 70% overnight. No dia seguinte iniciou-se o processamento histológico composto por 4 etapas. A primeira etapa foi a desidratação, que consiste na remoção de água da amostra por meio da imersão em álcool absoluto ou álcool 100%, sendo a solução trocada por quatro vezes. A etapa seguinte foi a clarificação ou diafanização, onde as amostras foram mergulhadas em dois banhos de xilol por 40 minutos cada, com o objetivo de remover o álcool do tecido, assim o preparando para a etapa seguinte. Então, a próxima etapa foi a infiltração, também conhecida como impregnação, na qual utiliza-se a parafina fundida em duas fases, primeiro as amostras são imersas na parafina I (Paraplast; Oxford, St.Louis, MO, USA) por 1h e 30 minutos, e em seguida na parafina

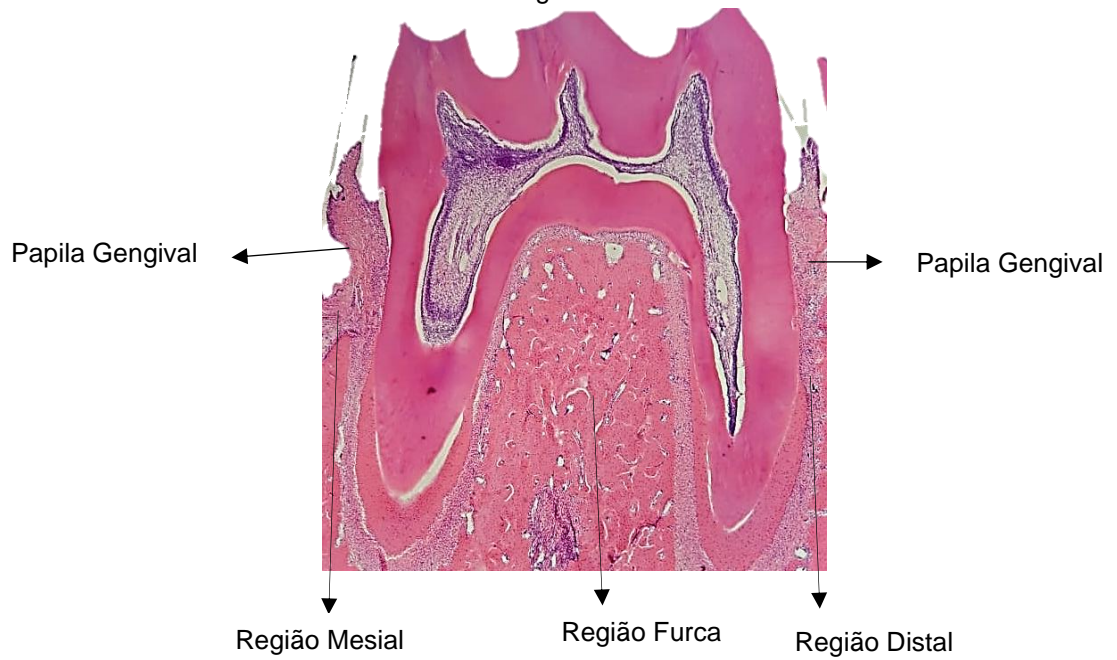
II por 2h e 30 min. E, a última etapa foi a inclusão onde as amostras de hemimandíbulas foram incluídas em parafina fundida, que após seu resfriamento se tornaram blocos de parafina nos quais foram realizados o “toilet” os tornando adequados ao seccionamento em micrótomo semi-automático (Leica RM2245) (Figura 17). Foram obtidos cortes histológicos com 6µm de espessura, na direção mesio-distal, os quais foram colocados em lâminas de vidro, e corados com a coloração de hematoxilina/eosina, e o tricrômico de Masson. Estas colorações foram utilizadas para a análise descritiva das alterações morfológicas dos tecidos periodontais, da região mesial, de furca, e distal dos primeiros molares inferiores (Fotografias 9, 10 e 11).

**Fotografia 9:** Amostras no EDTA para a descalcificação (A); Seta: Bloco histológico do micrótomo semi-automático. Leica RM2245..



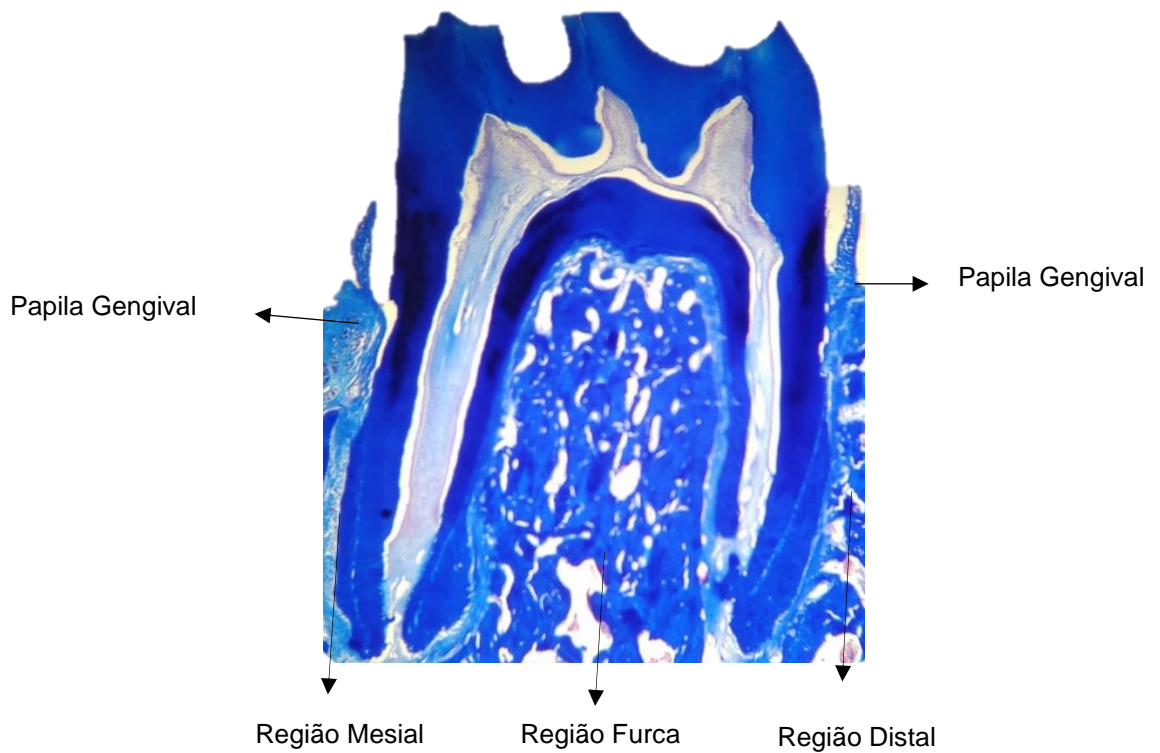
**Fonte:** o Autor.

**Fotografia 10:** Representações das regiões do primeiro molar inferior usadas para a análise descritiva histológica: Mesial, Furca e Distal. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 5x.



**Fonte:** o Autor.

**Fotografia 11:** Representações do primeiro molar inferior com a coloração tricrômico de Masson. Aumento original: 5x.



**Fonte:** o Autor.

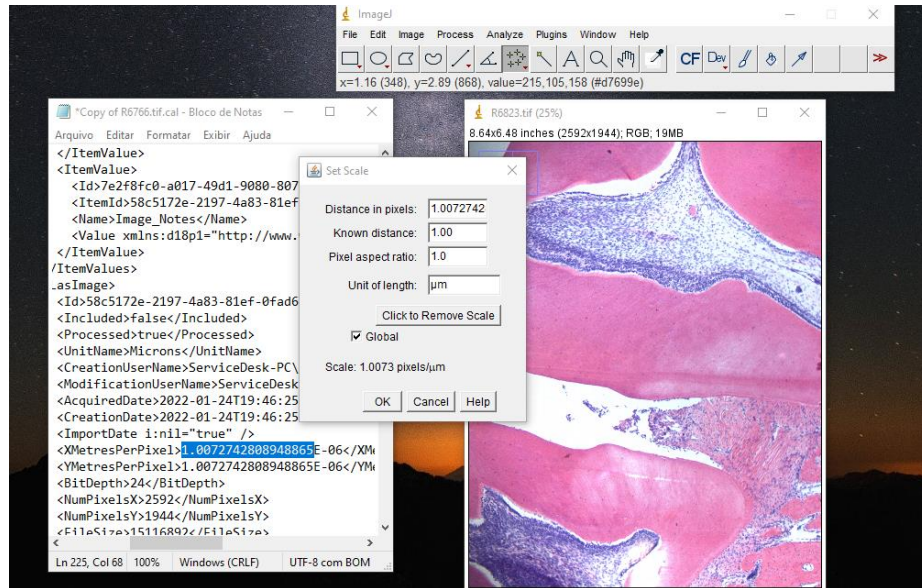
## 4.9 Análise histomorfométrica

As imagens microscópicas da coloração de hematoxilina/eosina foram visualizadas no Microscópio Trinocular Leica DM2500 (Laboratório de Terapia Fotodinâmica, IPD/UNIVAP), e digitalizadas em 1024x768 pixels, 24 bits / pixel de resolução com uma ampliação global de 50x. As imagens foram analisadas pelo programa computacional Image J 1.51v, obtido por domínio público, <http://imagej.nih.gov/ij>.

### 4.9.1 Nível de inserção conjuntiva (NIC)

Na raiz distal do 1º Molar Inferior, foram realizadas medidas lineares para avaliar o nível de inserção conjuntiva (NIC), o qual foi calculado mensurando-se em  $\mu\text{m}$  a distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a inserção conjuntiva. Foi obtida uma média dos valores dos 7 cortes analisados de cada animal. Primeiramente foi feito no Image J a calibração, por meio da relação da quantidade de pixel em 1  $\mu\text{m}$  e o valor encontrado foi utilizado para todas as medidas em todas as fotomicrografias. Esta foi a primeira etapa para todos os parâmetros avaliados neste programa (Fotografia 12).

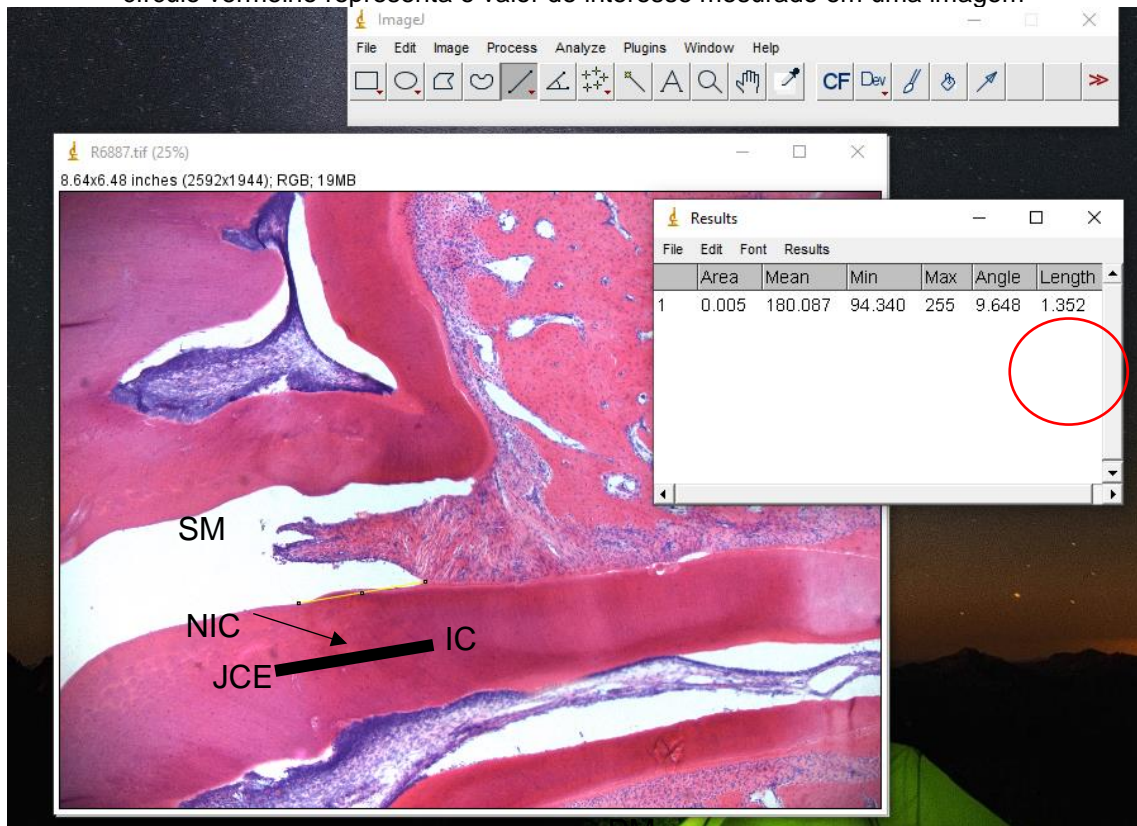
**Fotografia 12:** Processo de calibração. A calibração da medida foi realizada utilizando a caixa “Set Scale”. Para isto, foi inserida nesta caixa a quantidade de pixels presente em 1  $\mu\text{m}$ .



Fonte: o Autor.

Com a ferramenta “*Straight*” foram realizadas medidas lineares do nível de inserção conjuntiva (NIC) e mensurada em “*Analyse*” e “*Measure*”. O valor obtido em “*Length*” foi o de nosso interesse (Fotografia 13).

**Fotografia 13:** Análise histomorfométrica do nível de inserção conjuntiva (NIC) ( $\mu\text{m}$ ). Imagem ilustrativa dos tecidos periodontais da região interproximal entre o 1<sup>o</sup> e o 2<sup>o</sup> molar inferior. A linha preta representa a medida linear do nível de inserção conjuntiva (NIC). Já a região com um círculo vermelho representa o valor de interesse medido em uma imagem



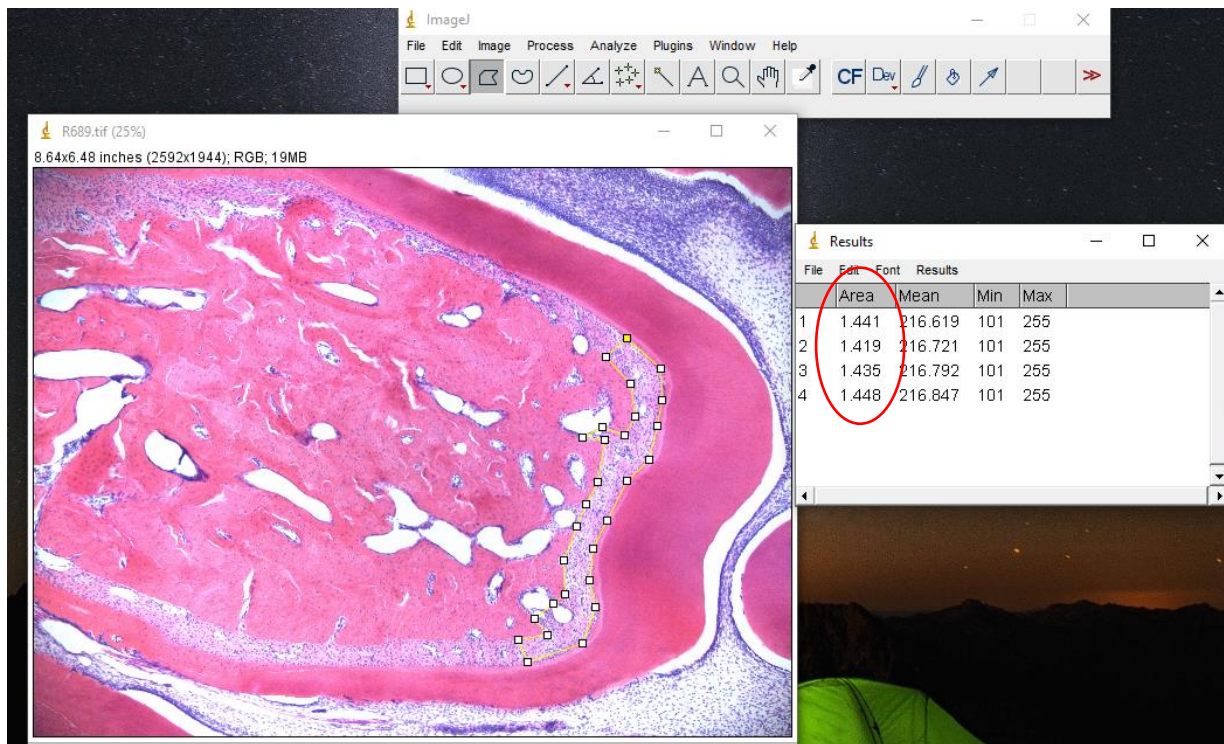
PMI

Fonte: o Autor.

#### 4.9.2 Perda óssea na região de furca

A área da perda óssea medida corresponde ao espaço ocupado pelo ligamento periodontal, e perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior. Foram medidos 7 cortes semisseriados dessa região de cada animal, e uma média desses valores foi obtida. Com a ferramenta "Polygon selections" a área de perda óssea em  $\mu\text{m}^2$  foi demarcada, e mensurada em "Analyze" e "Measure". O valor obtido em "Area" foi o de nosso interesse (Fotografia 14).

**Fotografia 14:** Análise histomorfométrica da perda óssea ( $\mu\text{m}^2$ ). Imagem ilustrativa do 1º molar inferior na região de furca, ou seja, na região entre o teto da furca e crista óssea interradicular. A região avaliada está demarcada com linha poligonal em amarelo. A região com um círculo vermelho representa o valor de interesse mesurado em quatro imagens diferentes.

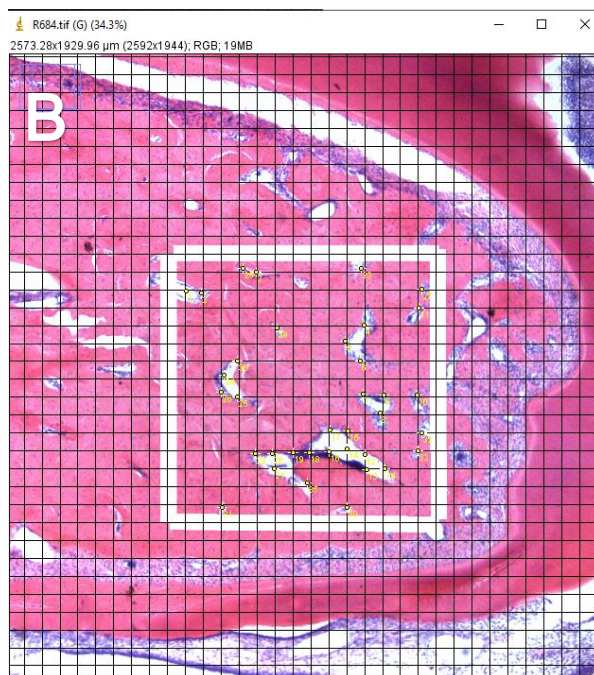
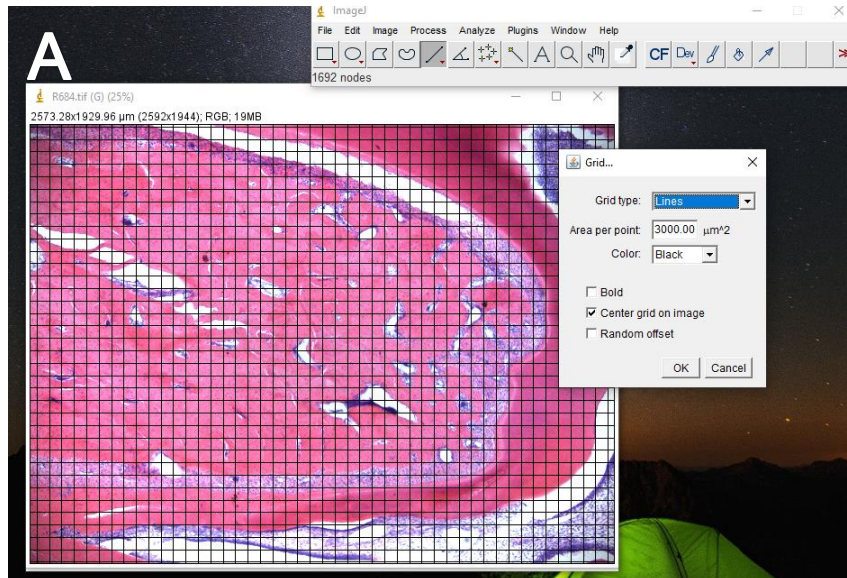


Fonte: o Autor.

#### 4.9.3 Densidade óssea na região de furca

A densidade óssea ou qualidade óssea foi avaliada em uma zona de  $3.000 \mu\text{m}$  sob a crista óssea, na área interradicular dentária. Para isto foi realizada a contagem pela marcação de pontos em 7 cortes por amostra, avaliados quanto à qualidade óssea. Foi posicionado um "Grid" (retículo quadriculado) e com a ferramenta "Straight" delimitou-se uma região quadrada dividida em  $15 \times 15$  quadrados ou 225 pontos de intersecção resultantes das intersecções entre 15 linhas verticais e 15 linhas horizontais. A contagem foi realizada na intersecção dos pontos onde não havia tecido ósseo, utilizando a ferramenta "Multi point" (Fotografia 15). Depois, utilizando o Microsoft Excel foi feita a correspondência da área ocupada por tecido ósseo neste quadrado. Os valores numéricos obtidos da densidade óssea foram transformados em porcentagem e submetidos à análise estatística.

**Fotografia 15:** - Análise histomorfométrica da densidade óssea (%). Imagens ilustrativas do 1º molar inferior na região de furca: A) “Grid”, em preto, colocado sobre a imagem; B) Delimitação da região analisada e marcação dos pontos na intersecção das linhas do “Grid”, em amarelo.



Fonte: o Autor.

#### 4.10 Análise estatística

Os dados obtidos em todas as análises foram avaliados estatisticamente no programa *GraphPad Prism versão 5.00* (GraphPad Software, CA, USA), o qual

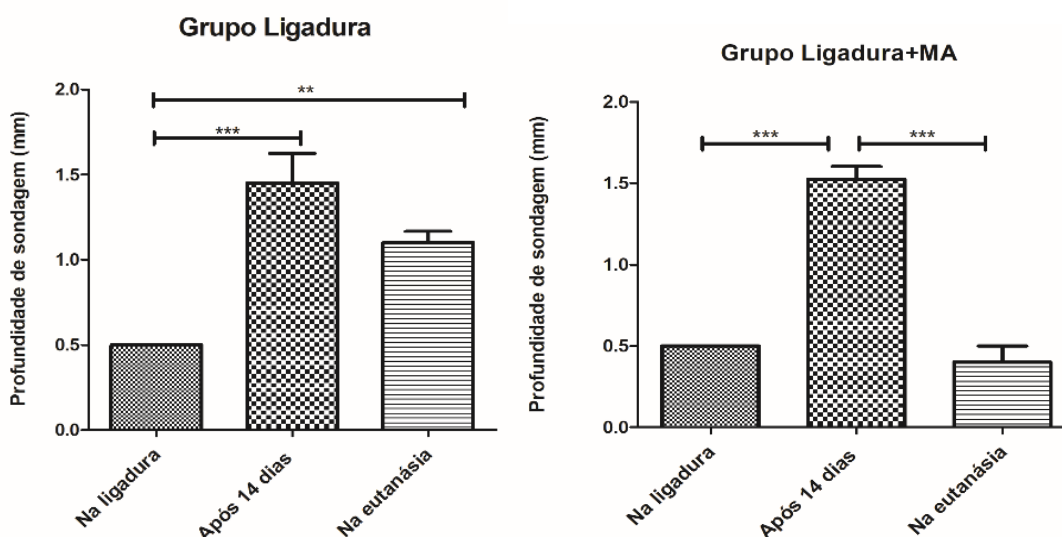
também gerou a apresentação gráfica dos resultados. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados que tiveram distribuição normal foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA para amostras independentes, seguido do teste de Tukey, e aquelas que tiveram distribuição não normal foram submetidos a análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. As diferenças entre grupos foram testadas em um nível de significância de 95% ( $p < 0.05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise macroscópica

Os animais, de todos os grupos, foram pesados semanalmente durante o período experimental e apresentaram ganho de peso dentro dos padrões de normalidade. No momento da realização da ligadura, em todos os animais, a profundidade de sondagem foi semelhante ( $0,5 \pm 0,0\text{mm}$ ). Após 14 dias da ligadura, tanto o grupo ligadura quanto o grupo ligadura+MA apresentaram aumento extremamente significativo da profundidade de sondagem, quando comparado com o momento da indução da ligadura, respectivamente ( $1,45 \pm 0,55$  vs  $0,5\text{mm}$ ;  $p < 0,001$  e  $1,53 \pm 0,25$  vs  $0,5\text{mm}$ ;  $p < 0,001$ ), mostrando que a doença foi instalada. Já, no momento da eutanásia, ou após 4 semanas da aplicação da MA, o grupo tratado com MA demonstrou redução extremamente significativa nos valores referentes ao parâmetro avaliado, quando comparado ao grupo ligadura, respectivamente ( $0,4 \pm 0,32\text{mm}$  vs  $1,11 \pm 0,22\text{mm}$ ;  $p < 0,001$ ) (Gráfico 1).

**Gráfico 1:** Média e desvio padrão da profundidade de sondagem no grupo ligadura (A) e ligadura + MA (B) nos três períodos (na ligadura, após 14 dias e na eutanásia). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn.

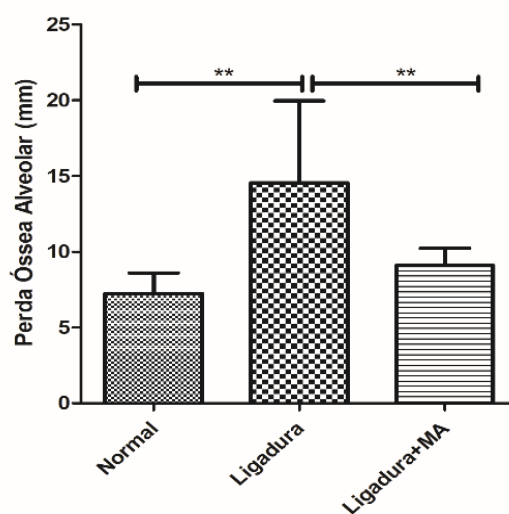


Fonte: o Autor.

## 5.2 Análise morfométrica

O gráfico 2 e a fotografia 16 demonstram os resultados da análise morfométrica da perda óssea alveolar, realizada por meio do método macroscópico. Os maiores valores de perda óssea foram encontrados no grupo ligadura ( $15,53 \pm 2,85\text{mm}$ ), quando comparado com o grupo normal ( $7,1 \pm 0,53\text{mm}$ ) e com o grupo ligadura + MA ( $8,8 \pm 0,5\text{mm}$ ), sendo estas diferenças estatisticamente muito significantes ( $p < 0,01$ ). Importante notar, que no grupo tratado com a MA a perda óssea alveolar foi muito reduzida, quando comparado ao grupo ligadura, sem tratamento ( $8,8 \pm 0,5$  vs  $15,53 \pm 2,85\text{mm}$ ;  $p < 0,01$ ), e semelhante ao grupo normal ( $8,8 \pm 0,5$  vs  $8,8 \pm 0,5\text{mm}$ ;  $p > 0,05$ ). Ademais, o gráfico 3 mostra os resultados da comparação da perda óssea alveolar, entre as faces linguais e vestibulares das hemimandíbulas, na região do 1º molar, nos 3 grupos experimentais. O grupo normal demonstra uma perda óssea fisiológica desigual entre as faces, sendo que a face lingual mostrou maior perda óssea, quando comparado à face vestibular. No grupo ligadura a perda óssea tanto na face lingual como na vestibular foi extremamente significativa com relação ao grupo normal. Nota-se que no grupo ligadura + MA não teve diferenças significativas entre as faces vestibular e lingual demonstrando que a MA agiu uniformemente na redução da perda óssea alveolar.

**Gráfico 2:** Média e erro padrão da perda óssea alveolar nos três grupos experimentais.  $**p < 0,01$ . ANOVA e teste Tukey.



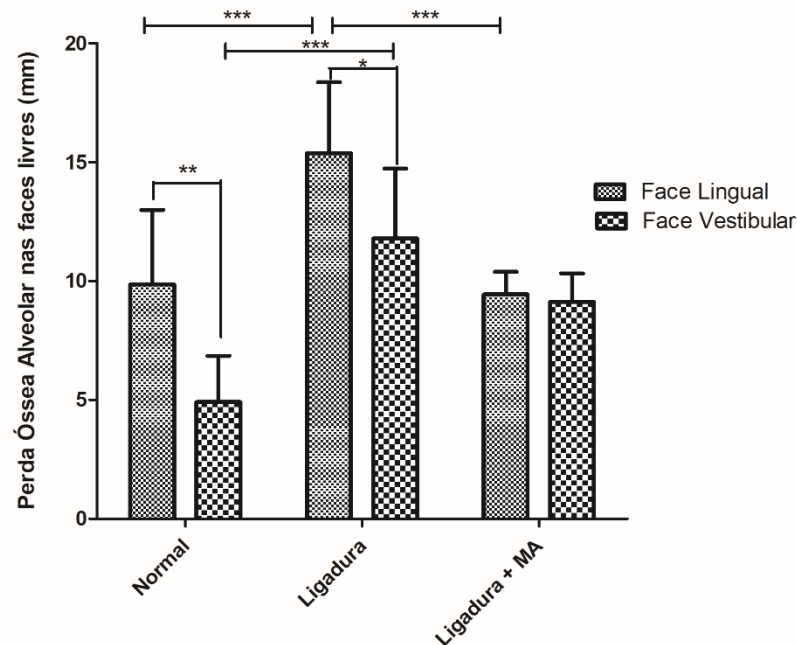
Fonte: o Autor.

**Fotografia 16:** Imagens representativas da análise macroscópica de perda óssea em ratos com periodontite induzida por ligadura do primeiro molar mandibular, nos 3 grupos experimentais. A) Grupo normal; B) Grupo Ligadura; C) Grupo ligadura +MA



Fonte: o Autor.

**Gráfico 3:** Média e desvio padrão da perda óssea alveolar nas faces lingual e vestibular do 1º MI, nos três grupos experimentais. \* $p > 0,05$ ; \*\* $p > 0,01$ ; \*\*\* $p > 0,001$ . ANOVA e teste Tukey.



Fonte: o Autor.

### 5.3 Análise histológica dos tecidos periodontais

Os resultados histológicos da coloração de hematoxilina e eosina, nos 3 grupos experimentais e em cada região do primeiro molar inferior (mesial, furca e distal) estão apresentados nas fotografias 17 a 22.

**Grupo Normal:** Na região de furca entre o teto da bifurcação e a crista alveolar a área do ligamento também apresenta tecido conjuntivo do tipo frouxo com os feixes de fibras colágenas e bastante células, incluindo fibroblastos e osteoblastos na

superfície óssea, e cementoblastos na superfície voltada para o cimento. O osso alveolar desta região apresenta cavidades medulares revestidas pelo endósteo e matriz óssea com osteócitos em suas lacunas (Fotografia 17, A). São observados alguns osteoclastos multinucleados nas depressões da matriz óssea conhecidas como lacunas de Howship (Fotografia 22). Também, podem ser observadas as Fibras de Sharpey inseridas no osso alveolar sendo mais espessas, e no cimento mais finas (Fotografia 20, A). Na região mesial a papila gengival apresenta epitélio e tecido conjuntivo dentro dos padrões de normalidades, com ausência de infiltrado inflamatório, incluindo fibras colágenas densas entremeadas por fibroblastos e alguns vasos sanguíneos. O tecido conjuntivo da gengiva papilar é composto por células e componentes da matriz extracelular, porém à semelhança do ligamento periodontal apresenta vários feixes de fibras colágenas. Este tecido conjuntivo se estende até a crista alveolar. A área do ligamento periodontal apresenta os feixes de fibras colágenas em toda sua extensão, sendo particularmente bem organizadas na região esquerda da raiz mesial, na região da crista alveolar. Processo alveolar revestido por periósteo composto de uma camada externa de fibras colágenas e uma camada interna de células achatadas (Fotografia 18, A). Por fim, na região distal a papila gengival apresenta epitélio e tecido conjuntivo dentro dos padrões de normalidades, com ausência de infiltrado inflamatório, incluindo fibras colágenas densas entremeadas por fibroblastos e alguns vasos sanguíneos. Nesta região as fibras colágenas transeptais do ligamento gengival inserem no cimento da raiz do 1º Molar e seguem direção horizontal se inserindo no cimento da raiz do 2º Molar. A inserção conjuntiva segue o padrão de normalidade, coincidente com a junção cimento esmalte (Fotografia 19, A).

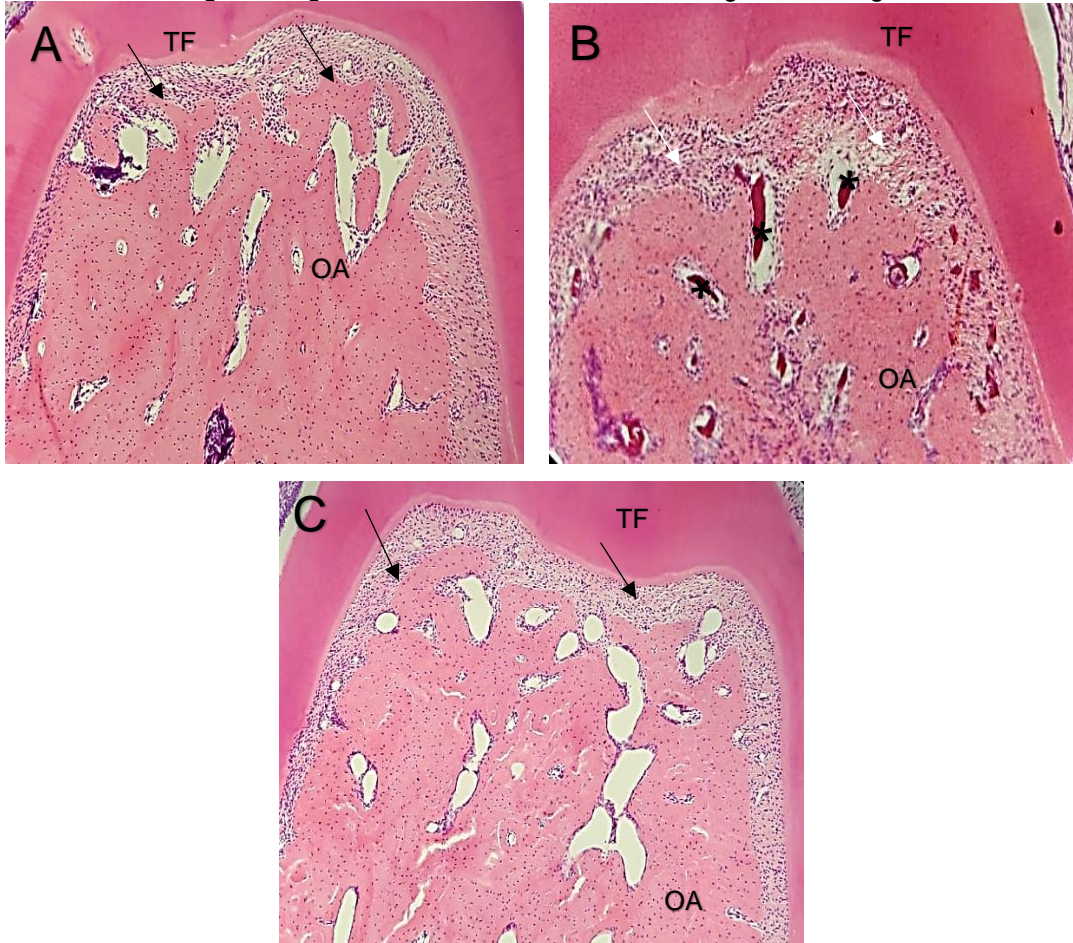
**Grupo Ligadura:** Na região de furca, entre o teto da bifurcação e a crista alveolar o tecido conjuntivo apresenta-se com fibras colágenas desorganizadas, desconexas e vasos congestos. O osso alveolar desta região apresenta cavidades medulares revestidas pelo endósteo, o qual apresenta alguns osteoclastos, e vasos congestos (Fotografia 17, B). Também, podem ser observadas as Fibras de Sharpey com padrão desorganizado, inseridas tanto no osso alveolar, quanto no cimento, sendo as do osso mais espessas, que as inseridas no cimento, respectivamente (Fotografia 20, B). Na região mesial, a papila gengival apresenta epitélio e tecido conjuntivo com ausência ou discreto infiltrado inflamatório. O tecido conjuntivo da gengiva papilar, ao contrário do grupo normal, parece apresentar-se menos denso, e

com menor extensão. A área do ligamento periodontal apresenta os feixes de fibras colágenas em toda sua extensão, porém estão menos organizadas na região esquerda da raiz mesial, próximo à crista alveolar. O processo alveolar apresenta-se revestido por um perióstio mais fino, quando comparado tanto com o grupo controle, quanto com o grupo tratado com membrana (Fotografia 18, B). Na região distal, a papila gengival apresenta epitélio e tecido conjuntivo abaixo da junção cimento esmalte demonstrando as fibras transeptais do ligamento se inserindo no cimento da região final do terço médio da raiz, com leve infiltrado inflamatório, incluindo fibras colágenas ligeiramente mais finas entremeadas por fibroblastos e alguns vasos sanguíneos. A inserção conjuntiva não coincide com a junção cimento esmalte, e há a migração apical do epitélio juncional demonstrando perda de inserção (Fotografia 19, B).

**Grupo Ligadura + MA:** Na região de furca entre o teto da bifurcação e a crista alveolar a área do ligamento apresenta tecido conjuntivo do tipo frouxo com fibras colágenas e bastante células, incluindo fibroblastos, osteoblastos na superfície óssea e cementoblastos na superfície voltada para o cimento. O osso alveolar desta região parece apresentar maior quantidade de espaços medulares revestidas pelo endóstio, e osteócitos na matriz óssea (Fotografia 17, C). Também, podem ser observadas as Fibras de Sharpey com padrão organizado, inseridas tanto no osso alveolar, quanto no cimento, sendo as do osso mais espessas, que as inseridas no cimento, respectivamente (Fotografia 20, C). Na região mesial a papila gengival apresenta epitélio e tecido conjuntivo dentro dos padrões de normalidades, com ausência de infiltrado inflamatório, incluindo fibras colágenas densas entremeadas por fibroblastos e alguns vasos sanguíneos. Este tecido conjuntivo se estende até a crista alveolar. A área do ligamento periodontal apresenta fibras colágenas principais em toda sua extensão sendo que na região da raiz mesial as fibras da crista alveolar estão bem definidas. O osso do processo alveolar está revestido por perióstio de espessura semelhante ao grupo normal. A camada mais fibrosa do perióstio parece unir-se com tecido conjuntivo da gengiva, em direção a superfície dentária (Fotografia 18, C). Em algumas amostras é possível visualizar um pequeno fragmento da Membrana Amniótica presente, e se integrando aos tecidos periodontais (Fotografia 21). Por fim, na região distal a papila gengival apresenta epitélio e tecido conjuntivo dentro dos padrões de normalidades, com ausência de infiltrado inflamatório, incluindo fibras colágenas densas entremeadas por fibroblastos e alguns vasos sanguíneos. A

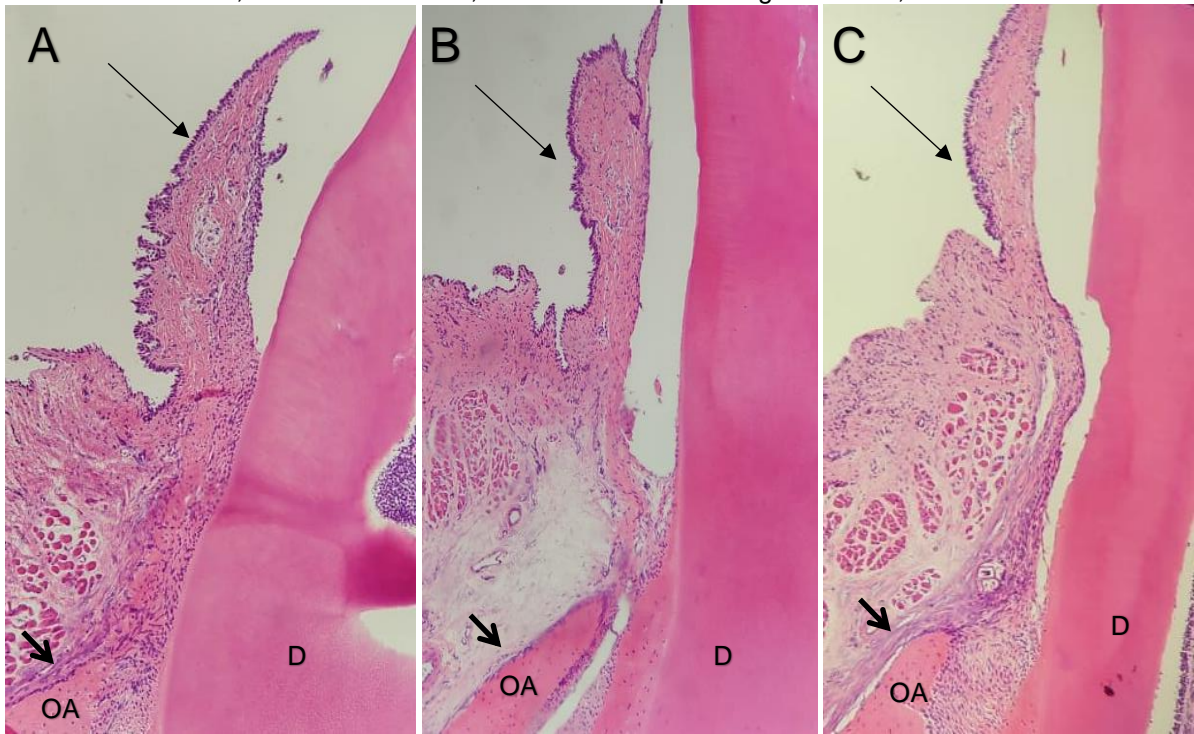
inserção conjuntiva não está coincidente com a junção cimento esmalte, porém neste grupo ocorre apenas uma leve migração do epitélio juncional demonstrando uma perda de inserção menor, quando comparado ao grupo ligadura (Fotografia 19, C).

**Fotografia 17:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 10x. TF: Teto da bifurcação, D: Dentina, OA: Osso Alveolar, \*: Vasos congestos, Seta preta: fibras colágenas organizadas, Seta branca: fibras colágenas desorganizadas.



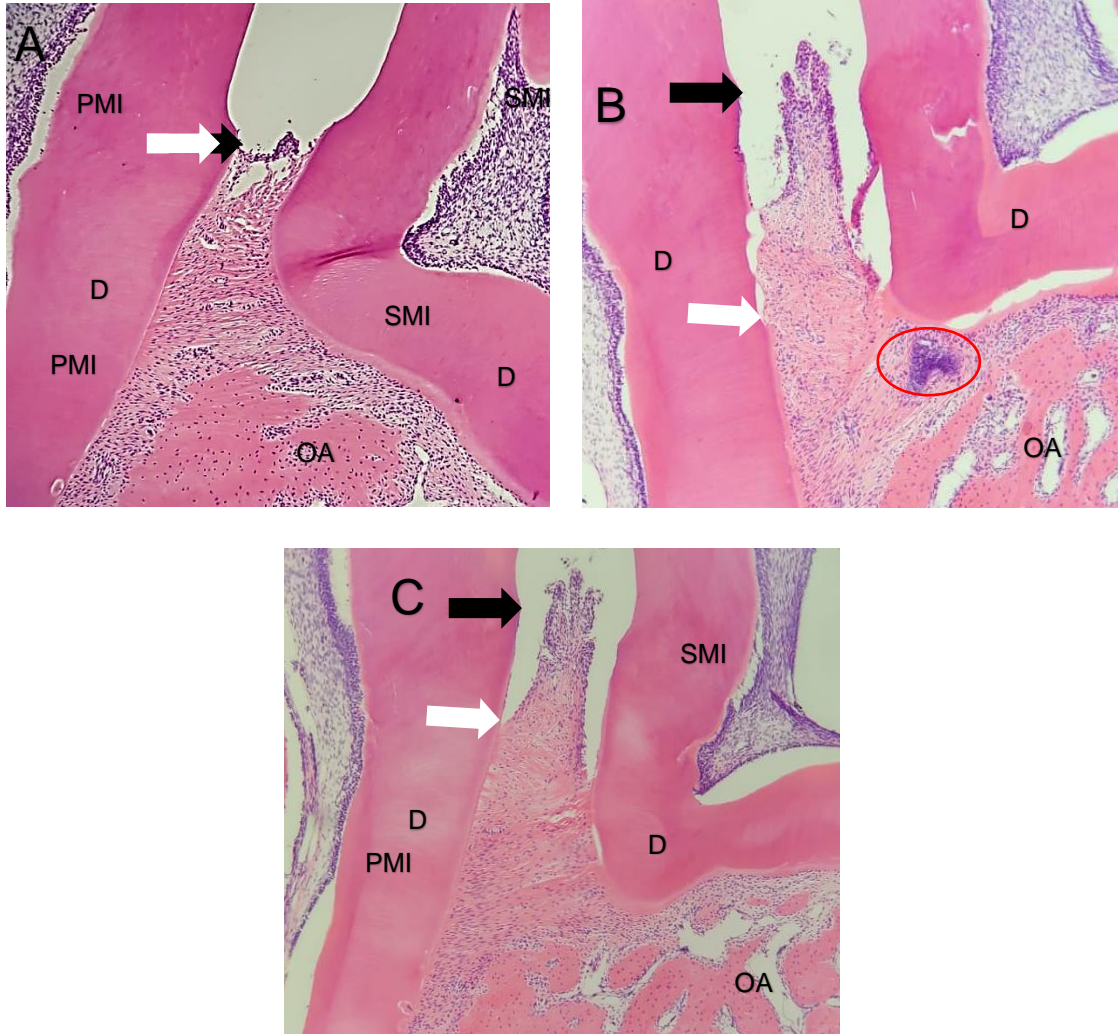
Fonte: o Autor.

**Fotografia 18:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região mesial do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 10x. D: Dentina, OA: Osso Alveolar, Seta Preta: Papila Gengival Mesial, Seta curta: Periosteio.



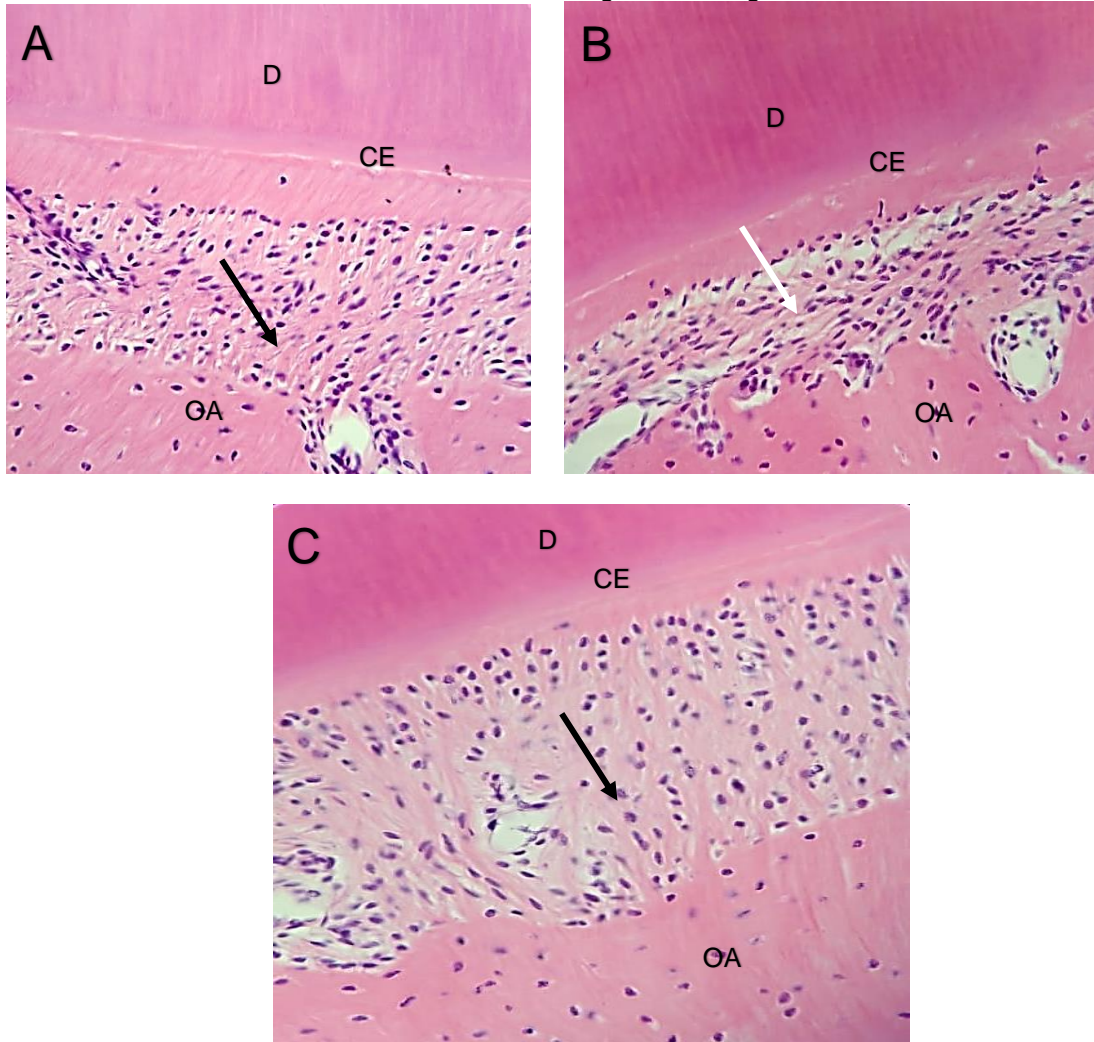
Fonte: o Autor.

**Fotografia 19:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região interproximal entre 1º e 2º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 10x. PMI: Primeiro Molar Inferior, SMI: Segundo Molar Inferior, D: Dentina, OA: Osso Alveolar, Círculo: infiltrado inflamatório, Seta Preta: Junção Cimento-Esmalte, Seta branca: Inserção Conjuntiva.



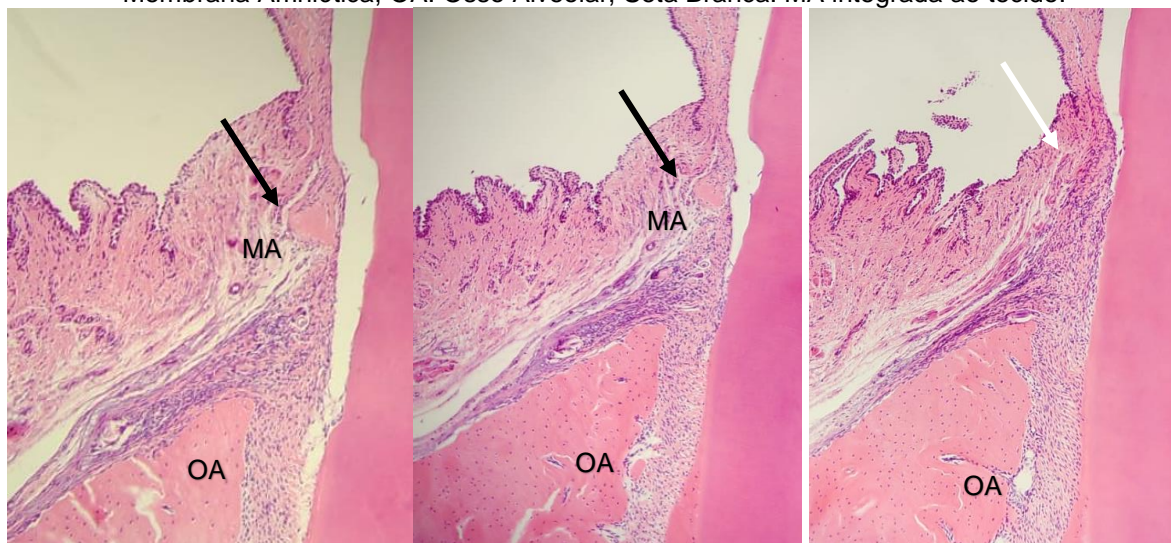
Fonte: o Autor.

**Fotografia 20:** Fotomicrografias da região de bifurcação, próximo à raiz distal do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Notam-se as fibras de Sharpey inseridas no osso alveolar e no cimento. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 40x. D: Dentina, CE: Cimento, OA: Osso Alveolar, Seta Preta: fibras colágenas organizadas (Fibras de Sharpey), Seta Branca: Fibras colágenas desorganizadas.



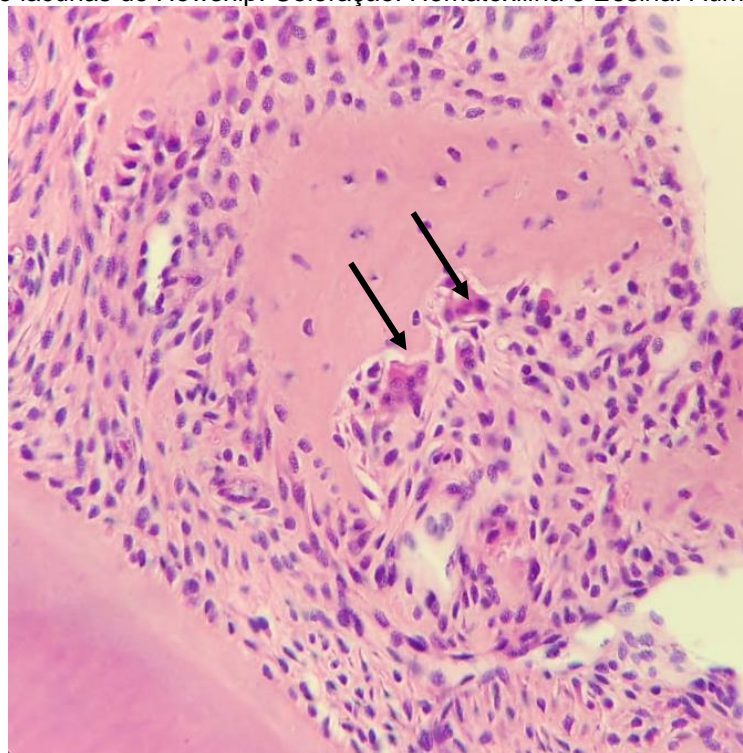
Fonte: o Autor.

**Fotografia 21:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região mesial do 1º Molar do grupo Ligadura + MA, onde se observa um pequeno fragmento de membrana se integrando ao tecido conjuntivo gengival. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 10x. MA e Seta Preta: Membrana Amniótica, OA: Osso Alveolar, Seta Branca: MA integrada ao tecido.



**Fonte:** o Autor.

**Fotografia 22:** Fotomicrografias da região de bifurcação, próximo à raiz mesial do 1º Molar do grupo normal. Seta preta: osteoclastos multinucleados presentes nas depressões da matriz óssea conhecidas como lacunas de Howship. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 40x.



**Fonte:** o Autor.

Os resultados da análise histológica, por meio da coloração tricrômico de Masson nos 3 grupos experimentais e em cada região do primeiro molar inferior (mesial, furca e distal) estão apresentados nas fotografias 23 a 26. No geral por meio desta coloração foram observadas o tecido conjuntivo (matriz extracelular,

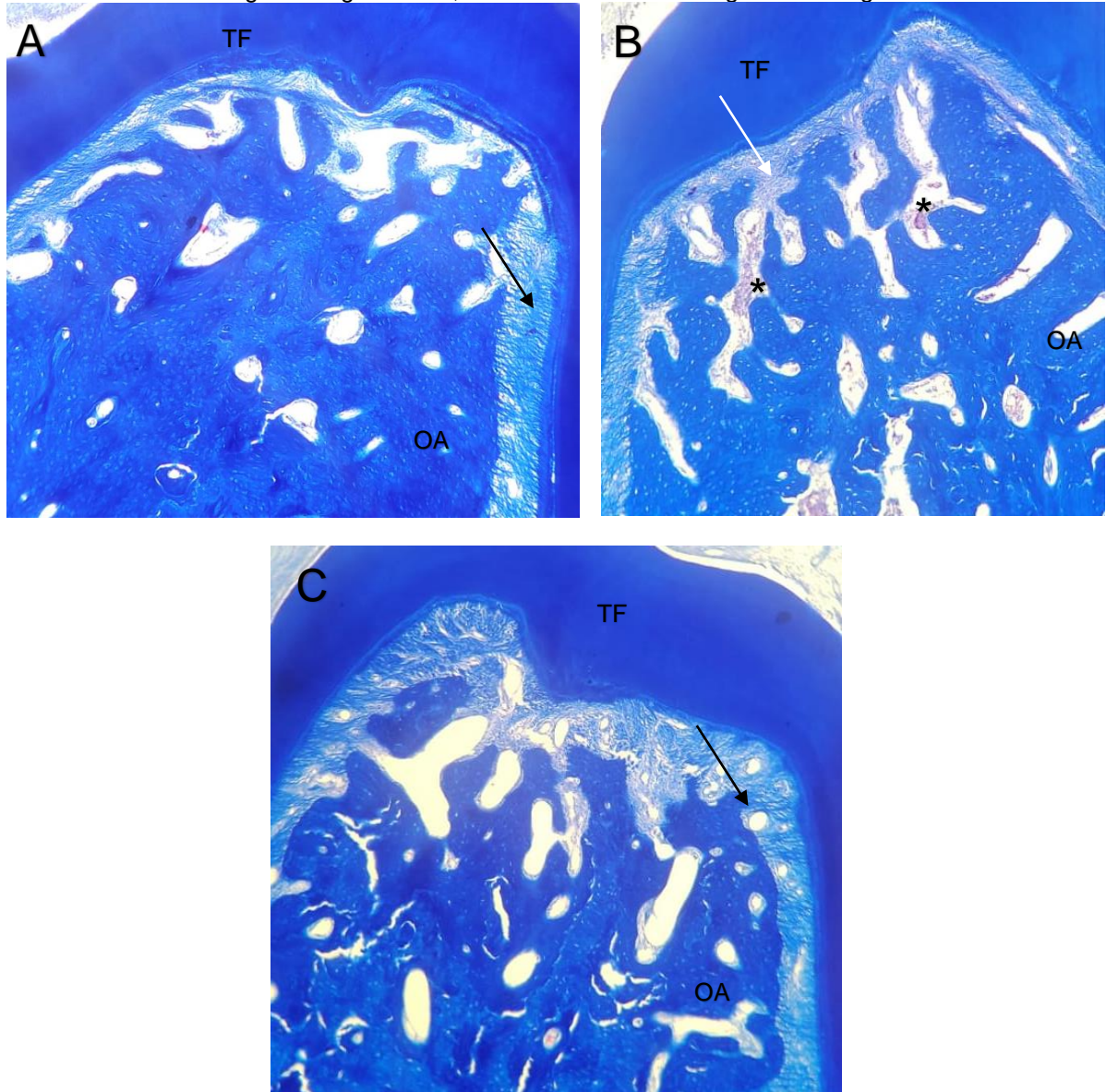
principalmente os feixes de fibras colágenas) presente nas papilas gengivais mesial e distal, assim como no espaço do ligamento periodontal ao longo das raízes e na região de furca entre o teto da bifurcação e a crista alveolar interradicular.

**Grupo normal:** Na região de furca, abaixo do teto da bifurcação, a coloração pelo tricômico de Masson mostrou um tecido conjuntivo com os grossos feixes de fibras colágenas do ligamento periodontal em toda sua extensão. Além destes feixes, a coloração Masson demonstrou outras fibras colágenas, mais finas, irregularmente dispostas na matriz extracelular (Fotografia 23, A). Na área do ligamento periodontal também é bastante definido as fibras de Sharpey, que são as porções dos feixes de fibras colágenas do ligamento inseridas na matriz do cimento e do osso alveolar, sendo as do osso alveolar mais espessas, do que as inseridas no cimento (Fotografia 24, A). Na região mesial a papila gengival apresenta tecido conjuntivo dentro dos padrões de normalidades com os feixes de fibras colágenas que compõem o ligamento gengival, abaixo do epitélio gengival (Fotografia 25, A). E, na região da papila gengival distal fica bastante evidente os feixes das fibras colágenas transeptais do ligamento gengival, os quais se inserem no cimento da raiz do 1º Molar e seguem direção horizontal se inserindo no cimento da raiz do 2º Molar (Fotografia 26, A). Nesta mesma fotografia, corada com tricômico de Masson, também verifica-se que a inserção conjuntiva é coincidente com a junção cimento esmalte, seguindo assim a normalidade.

**Grupo ligadura:** Na região de furca, entre o teto da bifurcação e a crista alveolar o tecido conjuntivo apresenta-se com fibras colágenas ligeiramente mais desorganizadas, desconexas e menos densas. A área do ligamento periodontal apresenta os feixes de fibras colágenas em toda sua extensão, porém estão menos organizadas na região esquerda da raiz mesial, próximo à crista alveolar (Fotografia 23, B). As fibras de Sharpey inseridas no osso alveolar no cimento são desorganizadas e menos definidas. (Fotografia 24 B). O tecido conjuntivo da gengiva papilar mesial, ao contrário do grupo normal, parece apresentar-se menos denso, e com menor extensão. Na região distal, a papila gengival apresenta tecido conjuntivo onde se observa principalmente as fibras transeptais do ligamento gengival, porém elas estão ligeiramente desorganizadas e finas, e principalmente estão se inserindo no terço médio da raiz. (Fotografia 26, B). E, conseqüentemente nesta mesma fotografia verifica-se que a inserção conjuntiva não é coincidente com a junção cimento esmalte demonstrando perda de inserção.

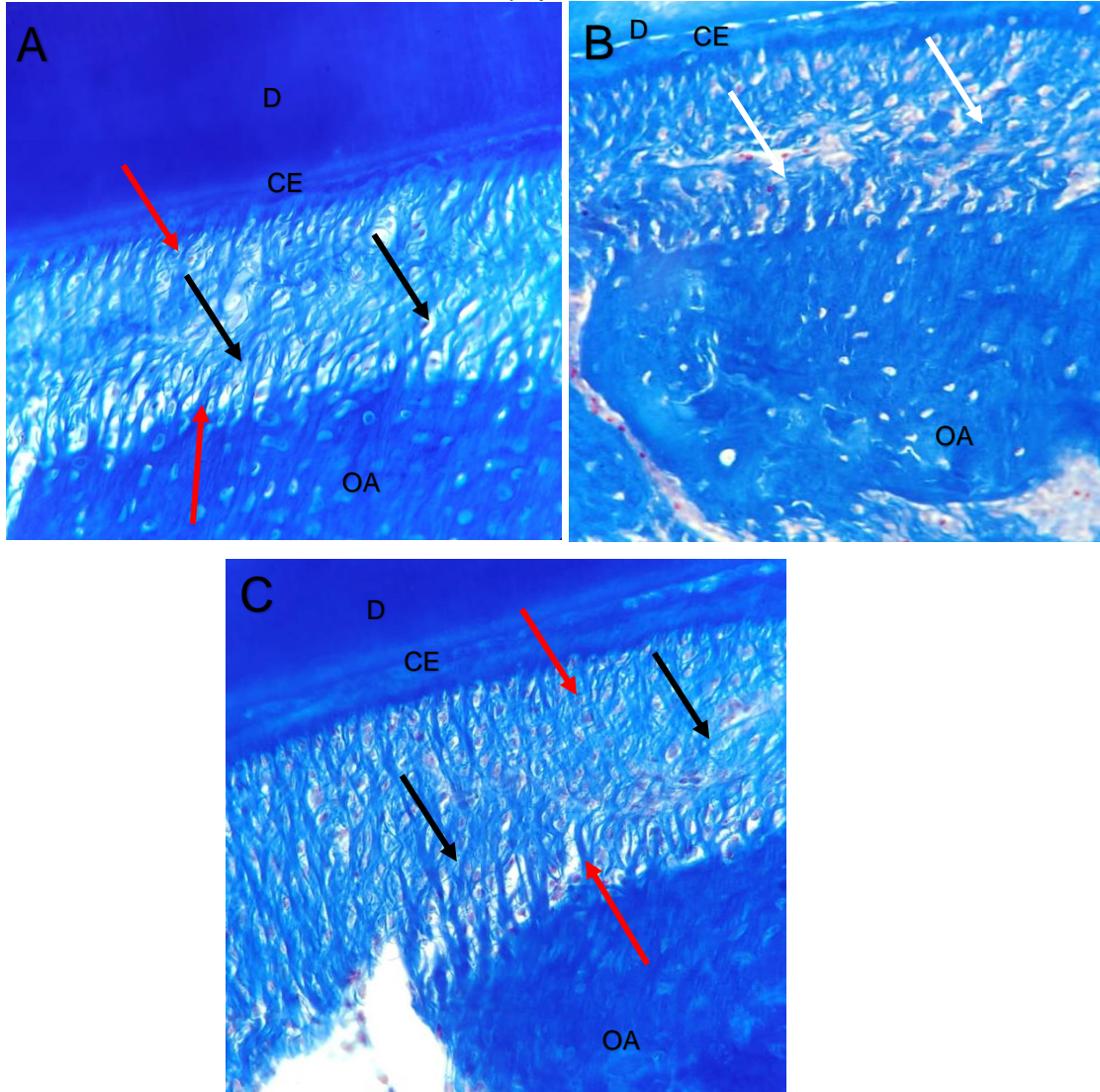
**Grupo Ligadura + MA:** Na região de furca entre o teto da bifurcação e a crista alveolar, assim como nesta região, próximo à raiz distal, a área do ligamento apresenta tecido conjuntivo com grossos feixes de fibras colágenas, assim como com outras mais finas entremeadas entre estas mais densas, com uma boa organização e definição. Também podem ser observadas as Fibras de Sharpey com padrão organizado e bem definido (Fotografia 23, C e 24, C). O tecido conjuntivo da gengiva papilar está com uma aparência próxima ao grupo normal, devido a maior densidade de feixes de fibras colágenas, que estão mais visíveis próximo à superfície radicular. E, na região distal a papila gengival apresenta as fibras transeptais densas e organizadas, sendo que neste grupo a distância entre a inserção e a junção cimento esmalte está menor, demonstrando menor perda de inserção (Fotografia 26, C).

**Fotografia 23:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região de bifurcação do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original: 10x. TF: Teto da bifurcação, D: Dentina, OA: Osso Alveolar, \* : Vasos congestos, Seta preta: fibras colágenas organizadas, Seta branca: fibras colágenas desorganizadas.



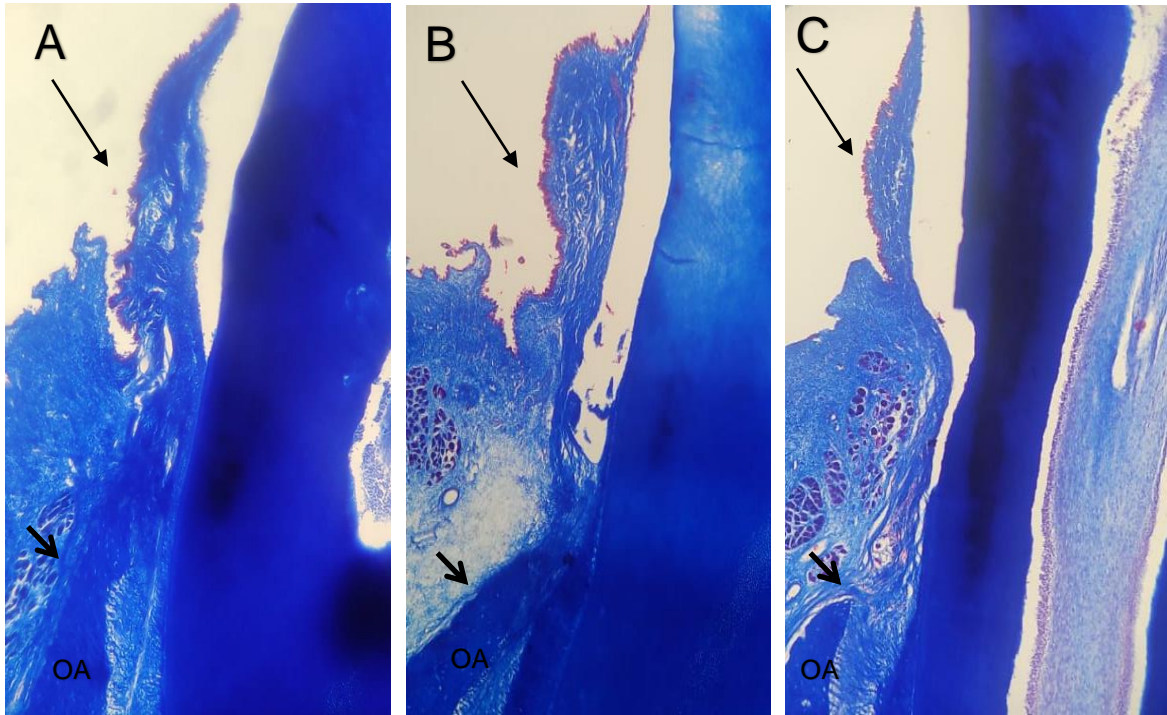
Fonte: o Autor.

**Fotografia 24:** Fotomicrografia da região de bifurcação, próximo à raiz distal do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Fibras de Sharpey inseridas no osso alveolar e no cimento. Grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + Membrana (C). Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original: 40x. D: Dentina, CE: Cimento, OA: Osso Alveolar, Seta Preta: fibras colágenas organizadas, Seta Branca: Fibras colágenas desorganizadas, Seta vermelha: fibras de Sharpey,



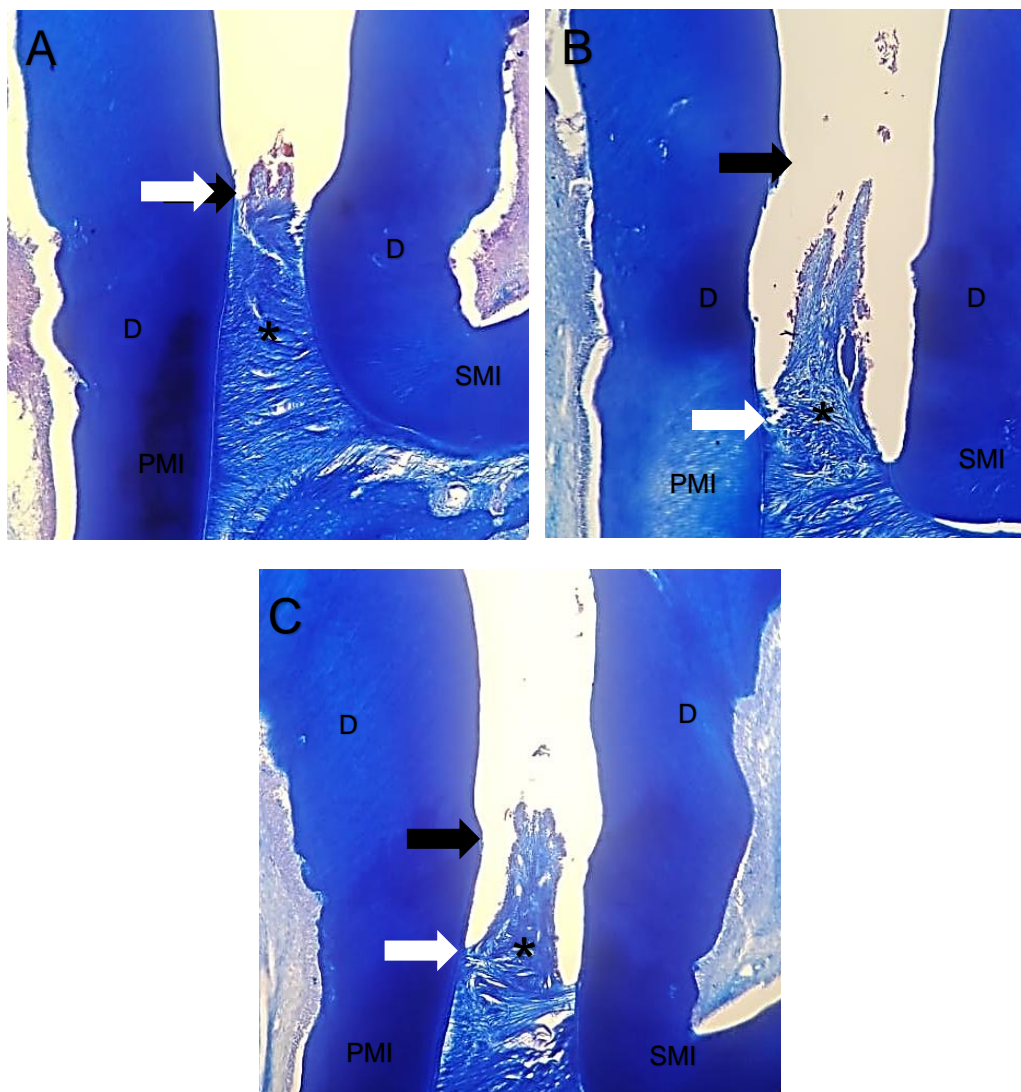
**Fonte:** o Autor.

**Fotografia 25:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região mesial do 1º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original: 10x. D: Dentina, OA: Osso Alveolar, Seta Preta: Papila Gengival Mesial, Seta curta: Periosteio.



**Fonte:** o Autor.

**Fotografia 26:** Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região interproximal entre 1º e 2º Molar dos grupos: Normal (A), Ligadura (B), Ligadura + MA (C). Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original: 10x. PMI: Primeiro Molar Inferior, SMI: Segundo Molar Inferior, OA: Osso Alveolar, \*Fibras transeptais do ligamento periodontal Seta Preta: Junção Cimento-Esmalte, Seta branca: Inserção Conjuntiva.



Fonte: o Autor.

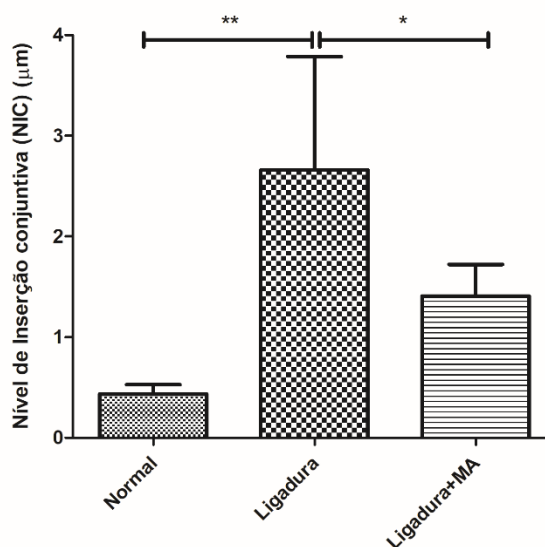
#### 5.4 Análise Histomorfométrica

Por meio desta análise foram avaliados três parâmetros: o nível de inserção conjuntiva, a perda óssea na região de furca e a densidade óssea, também na região de furca.

#### 5.4.1 Nível de inserção conjuntiva (NIC)

O Gráfico 4 demonstra os resultados do nível de inserção conjuntiva. O maior valor do NIC foi encontrado no grupo ligadura ( $1,51 \pm 4,26 \mu\text{m}$ ), sendo a diferença estatisticamente muito significativa ( $p < 0,01$ ), quando comparado com o grupo normal ( $0,33 \pm 0,52 \mu\text{m}$ ), e significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o valor médio do NIC no grupo ligadura + MA ( $0,91 \pm 1,75 \mu\text{m}$ ). O grupo tratado com a MA o NIC não apresentou diferença significativa com relação ao NIC do grupo normal ( $0,91 \pm 1,75 \mu\text{m}$  vs  $0,33 \pm 0,52 \mu\text{m}$   $p < 0,01$ ).

**Gráfico 4:** Média e desvio padrão do nível de inserção conjuntiva nos três grupos experimentais. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ . ANOVA e teste Tukey.

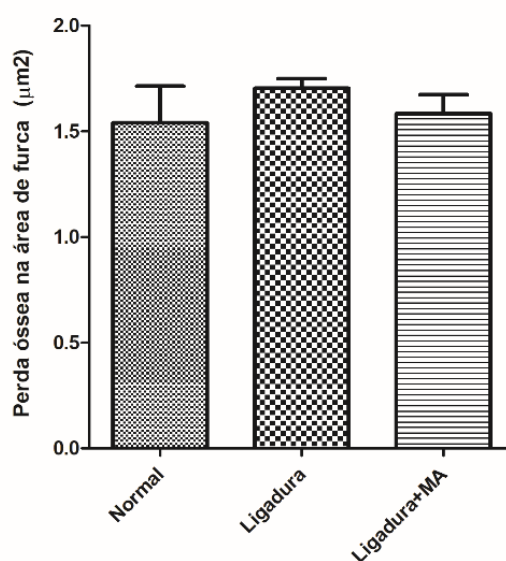


Fonte: o Autor.

#### 5.4.2 Perda óssea na região de furca

O Gráfico 5 demonstra os resultados da perda óssea na região de furca. Os maiores valores de perda de óssea na região de furca foram encontrados no grupo ligadura ( $1,55 \pm 1,85 \mu\text{m}$ ), quando comparado com o grupo normal ( $1,21 \pm 1,80 \mu\text{m}$ ) e com o grupo ligadura + MA ( $1,24 \pm 1,83 \mu\text{m}$ ), porém estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

**Gráfico 5:** Média e desvio-padrão da perda óssea na região de furca nos três grupos experimentais.  
 $p > 0.05$ . ANOVA e teste Tukey.

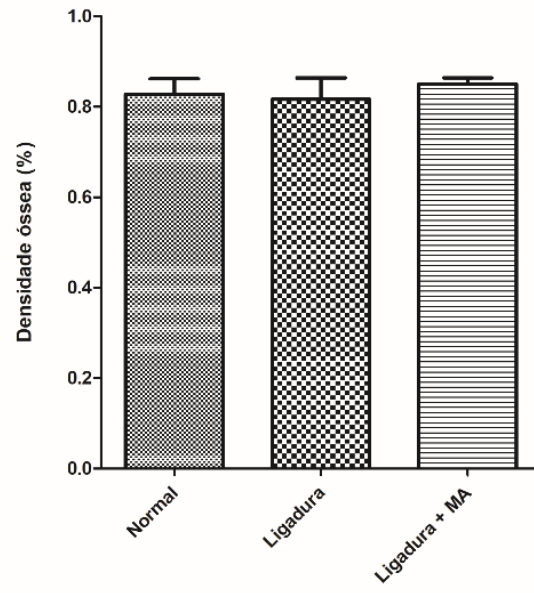


**Fonte:** o Autor.

#### **5.4.3 Densidade óssea na região de furca**

O gráfico 6 demonstra os resultados da análise histomorfométrica da densidade óssea na região de furca,.. Os maiores valores de densidade óssea na região de furca foram encontrados no grupo ligadura + MA ( $0,85 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ), quando comparado com o grupo normal ( $0,82 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ), e com o grupo ligadura ( $0,81 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ) sendo estas diferenças estatisticamente não significativas.

**Gráfico 6:** Média e desvio padrão da densidade óssea na região de furca nos três grupos experimentais.  $p>0.05$ . ANOVA e teste Tukey.



**Fonte:** o Autor.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo analisar o efeito da membrana amniótica na regeneração periodontal, em ratos, submetidos à periodontite por meio do modelo experimental da ligadura. Os principais resultados deste estudo foram que a aplicação da MA por 4 semanas reduziu a perda óssea alveolar induzida pela periodontite, e estimulou o ganho de inserção conjuntiva.

O modelo experimental da ligadura em ratos reproduz as características patológicas da periodontite causada pelo excesso de placa bacteriana, pré-instalada na superfície dentária (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). A doença periodontal leva à perda do dente, logo o método empregado com a engenharia de tecidos e terapia com células-tronco é um tratamento muito promissor para essa patologia (WU *et al.*, 2016). A membrana amniótica demonstra ter características proeminentes dentro do campo da regeneração de tecidos, devido às suas proeminentes propriedades: biocompatibilidade, imunomodulação, antibacteriana, antiinflamatória, e pró-angiogênica (IWASAKI *et al.*, 2019).

No presente estudo foi notório que a doença periodontal foi instalada com sucesso, o que está de acordo com o modelo clássico da periodontite induzida com ligadura de algodão de Johnson (1975). A indução da periodontite ocorreu por meio da colocação de ligaduras com fio de algodão ao redor dos 1º molares inferiores direito e esquerdo, ao nível do sulco gengival. Neste modelo, os patógenos apresentam um alto grau de virulência, estando bem aderidos na região dentária após 14 dias (OLIVEIRA, 2016). Esta colonização da área do sulco gengival, altera o equilíbrio e a composição da microbiota humana, acarretando na resposta imune inata do hospedeiro, que é a principal causa da destruição dos tecidos periodontais (PAYNE *et al.*, 2015; CAMPOS, 2018). A escolha referente ao modelo para indução de periodontite se embasou nestes estudos uma vez que esse padrão apresenta alto potencial de acometimento dos tecidos, acarretando uma perda óssea alveolar significativa e baixa reversibilidade espontânea.

Alguns indicadores de periodontite foram avaliados no presente estudo. Após 14 dias da colocação da ligadura o êxito da indução da periodontite foi comprovado pela presença de biofilme dental, sangramento gengival, mobilidade dental e profundidade de sondagem característica de perda de inserção periodontal. Após 4 semanas da aplicação da MA, e antes da eutanásia dos animais foi verificando neste

grupo, que os valores referentes à profundidade de sondagem estavam extremamente reduzidos quando comparado ao grupo ligadura, e também não havia mobilidade dental e sangramento gengival à sondagem, assim significando uma melhoria para as consequências clínicas da doença, uma vez que o contrário indica periodontite instalada (PEREIRA *et al.*, 2019, VENKATESAN; LAVU; BALAJI, 2021). Assim como em nosso estudo, Pereira *et al.* (2019) relata que os ratos não mostram diferença com relação ao peso corporal, ganhando peso durante o experimento.

O tratamento convencional da periodontite em humanos é a raspagem e alisamento radicular, porém nos casos severos da doença este tratamento sozinho pode não produzir os resultados clínicos desejáveis e a recorrência da doença é comum (CHRISTGAU *et al.*, 2007). Em nosso estudo, após os 14 dias da colocação da ligadura, o agente etiológico da doença (fio de algodão) foi removido no grupo ligadura, mas mesmo assim ocorreu uma perda óssea alveolar significativamente superior ao grupo ligadura + MA, o qual também teve a ligadura removida no mesmo período daquele, indicando que a doença periodontal se manteve no grupo ligadura, enquanto que no grupo tratado, a MA reduziu a perda óssea alveolar, estimulando o reparo do osso.

Atualmente, a utilização de tecidos biológicos na terapia regenerativa tem atraído atenção, especificamente a MA, devido às suas propriedades biológicas e mecânicas (AGARWAL *et al.*, 2014). A MA se destaca por apresentar potencial como *scaffold* para a engenharia tecidual periodontal, devido a sua biocompatibilidade, viscoelasticidade e adequado suporte mecânico para a adesão e proliferação celular (ELAHI *et al.*, 2021). Quanto a sua forma de apresentação os estudos vêm demonstrando que suas propriedades são mantidas tanto na fresca quanto na forma criopreservada (FÉNELON *et al.*, 2018; MORAES *et al.*, 2021). Entretanto, quando a MA é aplicada na prática clínica, a criopreservada é usada, ao invés da MA na forma fresca, pois permite o armazenamento por longos períodos antes de seu uso. Perepelkin *et al.* (2016) também relatam a importância do emprego da MA criopreservada, a qual pode ser armazenada em bancos de tecidos os quais garantem a esterilidade e a disponibilidade de um biomaterial de qualidade. Assim, por ser mais viável e pensando numa futura aplicação clínica, neste trabalho foi escolhido usar a MA na forma criopreservada.

Pela nossa experiência, o presente estudo foi pioneiro em aplicar a membrana amniótica 4 semanas após a indução da doença periodontal por meio da ligadura no

1º molar inferior de ratos. Durante a aplicação da MA, ela apresentou uma boa acomodação, se moldando ao defeito ósseo provocado pela ligadura. Segundo Agarwal *et al.* (2014), a espessura fina da membrana e a sua natureza auto aderente permite a fácil manipulação e sua adaptação suprimindo a necessidade de sutura da mesma. Por conseguinte, o procedimento cirúrgico é mais rápido, sem muitos obstáculos técnicos, sugerindo uma boa opção em áreas de mais difícil acesso da cavidade oral, como a região de molar devido à sua grande adaptabilidade a diferentes morfologias de defeitos ósseos (LEAL-MARIN *et al.*, 2021).

Kumar *et al.* (2015) também ressalta que a membrana amniótica não se desloca do defeito ósseo devido sua auto aderência, assim eliminando o uso de suturas. Assim esses atributos biológicos e físicos únicos que a MA apresenta reduzem a complexidade da técnica minimizando efetivamente as chances de complicações pós-operatórias o que verificamos no nosso estudo, tendo em vista que no período pós operatório não tivemos nenhuma complicação. Segundo Elahi *et al.* (2021) o controle da infecção pós operatória é importante para o sucesso de qualquer técnica, sendo a membrana amniótica particularmente relevante para prevenir a colonização de microorganismos, o que é explicado pela sua propriedade antimicrobiana devido a secreção e liberação dos peptídeos antimicrobianos, incluindo beta-defensinas, inibidor da proteinase secretória de leucócitos e elafina.

A dinâmica de reabsorção da MA é importante. Especificamente na engenharia dos tecidos, os *scaffolds* devem apresentar estabilidade e capacidade de biodegradação durante um período apropriado permitindo assim, a difusão de células ou fatores biológicos solúveis para a região do defeito, promovendo a total regeneração do tecido. Segundo Kumar *et al.* (2015) a literatura é escassa sobre a dinâmica da reabsorção da MA, embora é sugerido que a membrana é completamente reabsorvida na ferida em cerca de 2-4 semanas (GOMMA *et al.*, 2022). A taxa de reabsorção é relevante, porque no campo da regeneração tecidual guiada as membranas devem funcionar por um período de 4-6 semanas para alcançar a regeneração periodontal ideal (KUMAR *et al.*, 2015).

No presente estudo a MA permaneceu por quatro semanas, o que foi confirmado na análise histológica pela presença de um pequeno fragmento, totalmente integrado ao tecido conjuntivo da gengiva, próximo ao epitélio juncional do dente, indicando que a membrana se enquadrou neste período ideal considerado pela RTG. Nossos resultados são consistentes com (KHALIL; MELEK, 2018) que

constatarem a presença de remanescentes de MA, no período entre 4 e 6 semanas, no centro de defeitos ósseos criados cirurgicamente no fêmur de coelhos porém, diferente do nosso estudo, foi encontrado inflamação ao redor do fragmento de MA. Iwasaki *et al.* (2014) também observaram remanescentes de âmnio, em 4 semanas, no espaço do ligamento periodontal de ratos, submetidos à aplicação de scaffold de âmnio com células tronco do ligamento periodontal. Esta pesquisa demonstrou, que o scaffold de âmnio com células tronco do ligamento periodontal acelerou a regeneração periodontal, porém ao contrário do nosso trabalho, o fragmento de âmnio remanescente interferiu com a orientação dos feixes de fibras colágenas do ligamento periodontal. Os resultados da análise histológica do nosso trabalho, tanto pela coloração de H/E, quanto e principalmente pela coloração do tricrômico de Masson, demonstraram que a MA foi biocompatível com os tecidos periodontais. As papilas gengivais, tanto por mesial, quanto por distal apresentaram epitélio e tecido conjuntivo dentro dos padrões de normalidades, com ausência de infiltrado inflamatório. A área do ligamento periodontal apresentou os feixes de fibras colágenas principais orientados e densamente organizados em toda sua extensão do ligamento periodontal, com as fibras de Sharpey inseridas no osso alveolar e no cimento, o que é uma evidência estrutural da função de sustentação do dente no alvéolo ósseo promovida pelo ligamento periodontal.

A preservação do espaço biológico, o qual compreende a inserção epitelial e a inserção conjuntiva, é de extrema importância para a manutenção de um periodonto de inserção sadio. A invasão deste espaço por microorganismos e suas toxinas promove danos aos tecidos periodontais resultando na periodontite, a qual apresenta perda de inserção conjuntiva, presença de bolsa periodontal e perda óssea alveolar.

Neste trabalho, o nível de inserção conjuntiva (NIC) foi analisado tanto histologicamente como histomorfométricamente. Em ambas as análises, o grupo tratado com MA apresentou maior ganho de inserção conjuntiva quando comparado com o grupo ligadura, o que evidencia a atuação relevante deste biomaterial no crescimento epitelial e ganho de inserção clínica. Essa diminuição da perda de inserção epitelial e conjuntiva está de acordo com Velez *et al.* (2010) os quais relataram bons resultados da aplicação da membrana amniótica criopreservada no campo da periodontia clínica mostrando a aceleração na cicatrização dos tecidos periimplantares, incluindo o rápido crescimento do epitélio, uma boa adesão da gengiva inserida e a redução da dor no pós operatório. A MA incentiva o crescimento

do epitélio facilitando a migração celular e reforçando a adesão, pois apresenta vários fatores de promoção de epitelização, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimentos dos hepatócitos (HGF) (LEAL- MARIN *et al.*, 2021).

Rinastiti *et al.* (2006) avaliaram histologicamente o potencial do transplante de membrana amniótica humana em um defeito gengival em coelho e verificaram que a MA induziu epitelização rápida, formação de colágeno, e suprimiu a inflamação, pois impediu a migração de polimorfonucleares (PMN) até o local da ferida, sugerindo que a mesma promove a cicatrização gengival rápida. Novamente estes achados estão de acordo ao nosso resultado significativo de ganho de inserção clínica, considerando o reparo rápido do tecido gengival no grupo tratado com MA. Esta regula positivamente a expressão de receptores de fatores de crescimento, como o receptor de EGF em células epiteliais, o qual quando ligado ao EGF pode induzir rápida migração de células epiteliais gengivais e fixação na área da ferida, estimulando assim a rápida proliferação celular (LAFZI *et al.*, 2007).

Neste estudo os animais do grupo tratado com MA apresentaram menor perda óssea alveolar evidenciado pela análise morfométrica macroscópica, quando comparado ao grupo ligadura, sugerindo um efeito positivo da MA. Isso corrobora com o estudo pré-clínico de Wu *et al.* (2016) no qual aplicaram a membrana amniótica com células tronco adiposas cultivadas sobre ela no defeito ósseo produzido após a extração do 1º molar superior de ratos, verificando o aumento da regeneração óssea das paredes do alvéolo. Neste parâmetro avaliado, ainda verificamos a não ocorrência de diferença significativa entre o grupo tratado com MA e o grupo normal o qual apresentou somente uma leve perda óssea fisiológica. Este fato demonstra que a MA estimulou o reparo ósseo, sendo este próximo do nível ósseo normal, pelo menos nas faces vestibular e lingual do 1º molar.

Outro resultado interessante do presente estudo, ainda com relação análise morfométrica macroscópica, foi que o padrão desta perda óssea alveolar não foi uniforme entre as faces linguais e vestibulares nos diferentes grupos experimentais. Ao se comparar as faces lingual e vestibular, a perda óssea nos grupos normal e ligadura sempre foi maior na face lingual, seguida pela face vestibular. Estes dados podem ser corroborados por Fernandes (2014), que avaliou a perda óssea alveolar durante a progressão da periodontite em ratos, por meio da microtomografia computadorizada, e relatou que após a retirada da ligadura, a perda óssea progrediu diferentemente entre as faces vestibular e lingual, e a região de furca, sendo a perda

óssea maior na vestibular, seguida pela lingual e por último a região de furca. Já no grupo tratado com a MA o resultado foi bastante diferente, sendo que, tanto na face lingual, quanto na face vestibular a redução na perda óssea foi semelhante. Isto pode confirmar primeiro, a manutenção da membrana nestas regiões e segundo, o efeito homogêneo da MA sobre a redução na perda óssea, promovendo um reparo ósseo também homogêneo em ambas as faces do 1º molar inferior.

Venkatesan, Lavu e Balaji (2021) analisaram, em um estudo clínico, qual combinação era mais eficaz para o manejo de defeito intra-ósseo periodontal de 6mm sendo elas: membrana amniótica associada ao fosfato de cálcio bifásico e membrana de colágeno associada ao fosfato de cálcio bifásico. Como resultado verificaram uma atuação positiva e mais significativa no grupo da MA demonstrando redução da profundidade de bolsa e ganho de adesão clínica, assim estando de acordo com os resultados que encontramos no grupo tratado com MA o qual apresentou uma menor profundidade de sondagem e uma maior inserção clínica, quando comparado ao grupo ligadura. A MA contém numerosos fatores de crescimento, como fator de crescimento de fibroblastos básico, fator de crescimento epitelial, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento transformador, e fator de crescimento de hepatócitos, todos correlacionados com a regeneração periodontal por meio de efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores, antibacterianos e promoção do crescimento de progenitores endógenos (YAMADA; SHANBHAG; MUSTAFA, 2022).

Yamada, Shanbhag e Mustafa (2022) fizeram um levantamento das principais técnicas de *scaffolds* na regeneração periodontal, e relataram que o uso da MA como membrana de barreira em associação com grânulos de hidroxiapatita tem efeitos benéficos na supressão da inflamação local, resultando em maior ganho de inserção clínica, com maior formação óssea do que apenas os substitutos ósseos. Embora, a eficácia da MA sozinha para induzir a regeneração periodontal permaneça indefinida, o estudo provou ser a MA um arcabouço promissor para terapia periodontal baseada em células, onde sua atuação já é bem elucidada para o reparo e regeneração de tecidos moles. Nossos resultados estão de acordo com esses achados, sendo realmente observado um maior reparo estatisticamente significativo no tecido mole, ou seja, maior inserção clínica, no grupo tratado com MA. Também abre a possibilidade de associar em um estudo futuro a MA com outros biomateriais, a fim de analisar se terá um maior ganho ósseo.

Ainda com relação à associação da MA com outro biomaterial, Sali e Geroge (2016) avaliaram a combinação de desbridamento de retalho aberto com membrana amniótica e osso liofilizado desmineralizado para tratamento de defeito intraósseo, e verificaram que a combinação da MA, como *scaffold*, juntamente com o osso liofilizado conferiu benefícios estendidos para a MA, devido à capacidade formativa do osso liofilizado. Como resultados, observaram redução de profundidade de bolsa, ganho de nível de inserção clínica e ganho ósseo radiográfico, esses parâmetros foram avaliados e persistiram nos períodos de 3,6,9 e 12 meses após a aplicação do biomaterial. Este estudo está de acordo com os nossos resultados no que diz respeito ao ganho de inserção clínica e à profundidade de sondagem, em contrapartida desperta o interesse em um próximo estudo associar a MA com algum biomaterial osteogênico, e também aguardar um maior período de atuação a fim de verificar maior ganho ósseo.

Gomaa et al. (2022) comparou a resposta de cicatrização em caso de recessão gengival criada em cães tratados com um retalho posicionado à nível coronário com uso de membrana de aloenxerto de âmnio ou enxerto de tecido conjuntivo. Em 1 mês, o grupo tratado com MA mostrou fibras colágenas do ligamento periodontal altamente celulares e orientadas obliquamente à superfície da raiz, e inseridas em uma camada contínua de cimento recém formado, porém nenhuma nova formação óssea. Já com 3 meses, o mesmo grupo apresentou cicatrização completa com uma nova inserção de tecido conjuntivo com fibras de colágeno densas e bem organizadas que eram oblíquas à superfície do dente e inseridas no cimento recém-formado. No entanto, nenhum osso novo foi observado novamente. Os resultados do nosso trabalho são consistentes com esses, uma vez que observamos ganho de inserção, com feixes de fibras colágenas organizados e orientados entre o cimento e osso alveolar, e também não verificamos diferença entre os grupos em relação a densidade óssea na furca e a perda óssea na região de furca, estando os dados bem homogêneos em todos os grupos.

Estudos antecedentes relatam que a microtomografia computadorizada se correlaciona muito bem com a análise histológica com relação a quantificação da área de osso novo (COWAN *et al.*, 2007). Já Thomsen *et al.* (2005) elucidou que a microtomografia computadorizada pode substituir com precisão a análise histológica convencional na análise quantitativa do osso. Fernandes (2014) sugere que embora o método mais utilizado para mensurar e avaliar a perda óssea alveolar em estudos

com animais seja a análise histológica, esta apresenta limitada capacidade de distinguir os níveis ósseos associados com os tecidos saudáveis e os relacionados com a doença periodontal, e por esse motivo torna tão importante o uso da microtomografia computadorizada para este fim. O fato de não verificarmos diferença na densidade óssea e na perda óssea na região de furca entre os grupos pode estar relacionado a essa limitação, e nos estimula a planejar um estudo futuro com o uso da microtomografia computadorizada, a qual permitirá obter medidas volumétricas de todo o osso do processo alveolar.

O presente estudo demonstrou efeitos benéficos da aplicação da MA no tratamento da periodontite, incluindo um processo de cicatrização favorável, sem sinais de reação inflamatórias crônica ou de corpo estranho, pelo menos no período avaliado, confirmando assim a biocompatibilidade, capacidade regenerativa, não toxicidade e não imunogenicidade da MA na regeneração tecidual guiada para o tratamento de defeitos periodontais, sendo esse um biomaterial promissor dentro da engenharia de tecidos que merece cada vez mais estudos a fim de aprimorar ainda mais seu sucesso na aplicação clínica.

## **7 CONCLUSÃO**

Com base nos experimentos realizados, e a partir dos resultados obtidos podemos concluir, que a membrana amniótica foi eficaz na diminuição da profundidade da bolsa periodontal, na diminuição da perda óssea alveolar e, possibilitou um ganho de inserção clínica periodontal. Assim, a MA pode estimular o reparo periodontal após ter removido o agente etiológico que estava provocando a periodontite e com isto promove gradativamente a reconstrução das estruturas periodontais acometidas pela periodontite.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, Ashish *et al.* Pleiotropic properties of amniotic membrane for modulation of periodontal healing. **Journal of International Dental and Medical Research**, v. 1, p. 110-7, 2014.

ARMITAGE, Gary C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Annals of periodontology**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.

AZAMBUJA, Carolina Barrera de. **Análise comparativa da perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos Wistar nas faces livres e proximais**. 2011. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Odontologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BANERJEE, Asmita *et al.* Different metabolic activity in placental and reflected regions of the human amniotic membrane. **Placenta**, v. 36, n. 11, p. 1329-1332, 2015.

BARROSO, Alícia Rocha Siqueira *et al.* Nova Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares: importância do conhecimento para profissionais e acadêmicos de Odontologia. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 73219-73238, 2021.

BOURNE, Gordon L.; BENIRSCHKE, Kurt. Absent umbilical artery: a review of 113 cases. **Archives of disease in childhood**, v. 35, n. 184, p. 534, 1960

BUDUNELI, Nurcan; KINANE, Denis F. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 38, p. 85-105, 2011.

CAMPELO, M. B. D. *et al.* Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v. 33, n.2, p. 144-155, 2018.

CAMPOS, Renata Silva Cardoso de. **Efeitos da administração de Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos portadores de artrite reumatoide experimental**. 2018. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

CAPOROSSO, Tomaso *et al.* A human amniotic membrane plug to repair retinal detachment associated with large macular tear. **Acta Ophthalmologica**, v. 97, n. 8, p. 821-823, 2019.

CARASOL, Miguel *et al.* Periodontal conditions among employed adults in Spain. **Journal of clinical periodontology**, v. 43, n. 7, p. 548-556, 2016.

CARLO, Emily Correna *et al.* Técnica da regeneração tecidual guiada (RTG) na reparação da mandíbula de cão. **revista Ceres**, v. 53, n. 307, p. 350-356, 2006.

CATON, Jack G. *et al.* A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. **Journal of periodontology**, v. 89, p. S1-S8, 2018

CHRISTGAU, Michael *et al.* Extracellular matrix expression and periodontal wound-healing dynamics following guided tissue regeneration therapy in canine furcation defects. **Journal of clinical periodontology**, v. 34, n. 8, p. 691-708, 2007.

CONCEA. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Brasília: Ministério da Ciência, 2019.

COWAN, Catherine M. *et al.* MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. **Tissue engineering**, v. 13, n. 3, p. 501-512, 2007.

DEIHIM, Tina; YAZDANPANA, Ghasem; NIKNEJAD, Hassan. Different light transmittance of placental and reflected regions of human amniotic membrane that could be crucial for corneal tissue engineering. **Cornea**, v. 35, n. 7, p. 997-1003, 2016.

DEHGHANI, Mehdi *et al.* Grafting with cryopreserved amniotic membrane versus conservative wound care in treatment of pressure ulcers: a randomized clinical trial. **Bulletin of Emergency & Trauma**, v. 5, n. 4, p. 249, 2017.

ELAHI, Asrar *et al.* Evaluation of the Human Amniotic Membrane as a Scaffold for Periodontal Ligament Fibroblast Attachment and Proliferation. **Sains Malays**, v. 48, p. 1927-35, 2019.

ELAHI, Asrar *et al.* Amniotic Membrane as a Scaffold for Periodontal Tissue Engineering. **Journal of Health Science and Medical Research**, v. 39, n. 2, p. 169-180, 2021.

FÉNELON, Mathilde *et al.* Human amniotic membrane for guided bone regeneration of calvarial defects in mice. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 6, p. 78, 2018.

FENELON, Mathilde *et al.* Assessment of fresh and preserved amniotic membrane for guided bone regeneration in mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 108, n. 10, p. 2044-2056, 2020.

FÉNELON, Mathilde *et al.* Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. **Membranes**, v. 11, n. 6, p. 387, 2021.

FERENCZY, Peter Alexander von Harbach; SOUZA, Luciene Barbosa de. Comparison of the preparation and preservation techniques of amniotic membrane used in the treatment of ocular surface diseases. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 79, p. 71-80, 2020.

FERNANDES, P. G. **Aplicação da microtomografia computadorizada para a análise morfométrica bi e tridimensional na avaliação da perda óssea**

**experimental em ratos**, 2014. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

FERREIRA, Camila Lopes. **Efeito concomitante da doença periodontal induzida e movimentação ortodôntica em ratos submetidos à inalação da fumaça de cigarro**: estudo histomorfométrico. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2016.

FISCHER, Ricardo Guimarães; KLINGE, Björn. Clinical and histological evaluation of ligature-induced periodontal breakdown in domestic ferrets immunosuppressed by Cyclosporin-A. **Journal of clinical periodontology**, v. 21, n. 4, p. 240-249, 1994.

GARGIULO, Anthony W.; WENTZ, Frank M.; ORBAN, Balint. Dimensions and relations of the dentogingival junction in humans. **The Journal of Periodontology**, v. 32, n. 3, p. 261-267, 1961.

GOMAA, Marwa *et al.* Healing of experimental gingival recession defects treated with amnion allograft: histologic and histometric analysis in dogs. **Journal of Oral Biosciences**, v. 64, n 1, p. 93-99, 2022.

GONÇALVES, Patricia Furtado. **Influencia da ciclosporina-A e nifedipina sobre a perda ossea alveolar na periodontite induzida em ratos**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2002.

GOULARTE, Felipe Corazza. **Modelos preditivos e doenças periodontais**: uma revisão integrativa. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

GUPTA, Akanksha; KEDIGE, Suresh D.; JAIN, Kanu. Amnion and chorion membranes: potential stem cell reservoir with wide applications in periodontics. **International journal of biomaterials**, 2015.

HAMADA, Yusuke; YEH, Yu-Ting; BLANCHARD, Steven B. Amnion–Chorion Allograft Barrier Used on Root Surface for Regenerative Procedures: Case Report. **Clinical Advances in Periodontics**, v. 10, n. 4, p. 195-199, 2020.

HECKMANN, Nathanael; AURAN, Richard; MIRZAYAN, Raffy. Application of amniotic tissue in orthopedic surgery. **American journal of orthopedics (Belle Mead NJ)**, v. 45, n. 7, p. E421-E425, 2016.

HENNERBICHLER, Simone *et al.* The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. **Cell and tissue banking**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2007.

HOUSTON, William J. B. A new design of rat mouth prop. **Journal of dental research**, v. 43, n. 3, p. 458-458, 1964.

IWASAKI, Kengo *et al.* Periodontal regeneration using periodontal ligament stem cell-transferred amnion. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 3-4, p. 693-704, 2014.

IWASAKI, Kengo et al. The fate of transplanted periodontal ligament stem cells in surgically created periodontal defects in rats. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 1, p. 192, 2019.

IWATA, Takanori *et al.* Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. **Biomaterials**, v. 30, n. 14, p. 2716-2723, 2009.

JANSON, Marcos dos Reis Pereira *et al.* Tratamento interdisciplinar II-Estética e distância biológica: Alternativas ortodônticas para remodelamento vertical do periodonto. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, p. 85-105, 2002.

JIANG, Jun *et al.* Application of autologous periosteal cells for the regeneration of class III furcation defects in Beagle dogs. **Cytotechnology**, v. 62, n. 3, p. 235-243, 2010.

JOHNSON, I. H. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. **Journal of Periodontal Research**, v. 10, n. 6, p. 332-345, 1975.

KAMARUL, Tunku *et al.* Biocompatibility and toxicity of poly (vinyl alcohol)/N, O-carboxymethyl chitosan scaffold. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

KAR, I. B. *et al.* Repair of oral mucosal defects with cryopreserved human amniotic membrane grafts: prospective clinical study. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 43, n. 11, p. 1339-1344, 2014.

KAREEM, Nashra. Amniotic Membranes-A Futuristic Trend in Periodontal Regeneration. **Journal of Contemporary Issues in Business and Government**, v. 26, n. 2, p. 1910-1918, 2020.

KATCHBURIAN, Eduardo; ARANA, Victor. Histologia e embriologia oral. **Histologia e embriologia oral**, p. 381-381, 2003.

KHALIL, Nesma Mohamed; MELEK, Lydia Nabil Fouad. Histologic and histomorphometric evaluation of lyophilized amniotic membrane in bone healing: An experimental study in rabbit's femur. **Future Dental Journal**, v. 4, n. 2, p. 205-210, 2018.

KIM, Jae Chan; TSENG, S. C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v. 14, n. 5, p. 473-484, 1995.

KINANE, Denis F.; STATHOPOULOU, Panagiota G.; PAPAPANOU, Panos N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2017.

KOPACZKA, Katarzyna *et al.* The relationship between amniotic epithelial cells and their microenvironment. **Journal of applied biomedicine**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2016.

KUMAR, Aravind *et al.* Evaluation of clinical, antiinflammatory and antiinfective properties of amniotic membrane used for guided tissue regeneration: A randomized controlled trial. **Dental Research Journal**, v.12, n. 2, p. 127, 2015.

KUMAR, Kanakamedala Anil *et al.* Use of an amniotic membrane as a novel barrier in a tooth with a questionable prognosis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 21, n. 3, p. 237, 2017.

LAFZI, Ardeshir *et al.* Amniotic membrane: A potential candidate for periodontal guided tissue regeneration?. **Medical hypotheses**, v. 69, n. 2, 2007.

LAURENT, Romain *et al.* Fresh and in vitro osteodifferentiated human amniotic membrane, alone or associated with an additional scaffold, does not induce ectopic bone formation in Balb/c mice. **Cell and tissue banking**, v. 18, n. 1, p. 17-25, 2017.

LEAL-MARIN, Sara *et al.* Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 109, n. 8, p. 1198-1215, 2021.

LEE, Shwu-Huey; TSENG, Scheffer CG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. **American journal of ophthalmology**, v. 123, n. 3, p. 303-312, 1997.

LINDHE, J. A. N.; LANG, Niklaus P.; KARRING, Thorkild. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. In: **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**, p. 1304-1304, 2010.

LIU, Jin *et al.* Periodontal bone-ligament-cementum regeneration via scaffolds and stem cells. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 537, 2019.

MAHAJAN, Rupali *et al.* Comparative efficacy of placental membrane and Healiguide™ in treatment of gingival recession using guided tissue regeneration. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 22, n. 6, p. 513, 2018.

MAMEDE, Ana Catarina *et al.* Effect of amniotic membrane proteins in human cancer cell lines: an exploratory study. **The Journal of membrane biology**, v. 247, n. 4, p. 357-360, 2014.

MAMEDE, Karina M.; SANT'ANNA, Luciana B. Antifibrotic effects of total or partial application of amniotic membrane in hepatic fibrosis. In: ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 91., 2019. **Anais...**, 2019.

MORAES, Jéssica Tereza Guedes *et al.* Effects of Preservation Methods in the Composition of the Placental and Reflected Regions of the Human Amniotic Membrane. **Cells Tissues Organs**, v. 210, n. 1, p. 66-76, 2021.

MOREIRA, Thiago Crispim. **Classificação das doenças periodontais 1999 versus 2017**. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Odontologia) - Unicesumar Maringá, 2021.

MORELLI, Thiago *et al.* Periodontal profile classes predict periodontal disease progression and tooth loss. **Journal of periodontology**, v. 89, n. 2, p. 148-156, 2018.

NICODEMO, Mariana de Castro *et al.* Amniotic membrane as an option for treatment of acute Achilles tendon injury in rats<sup>1</sup>. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, p. 125-139, 2017.

NIKNEJAD, Hassan *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European cells & materials**, v. 15, p. 88-99, 2008.

NTEGE, Edward H.; SUNAMI, Hiroshi; SHIMIZU, Yusuke. Advances in regenerative therapy: a review of the literature and future directions. **Regenerative therapy**, v. 14, p. 136-153, 2020.

NUÑEZ, Javier *et al.* Cellular therapy in periodontal regeneration. **Periodontology** **2000**, v. 79, n. 1, p. 107-116, 2019.

OLIVEIRA, Luiz Fernando Ferreira de. **Administração tópica do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 reduz a destruição tecidual periodontal em ratos com periodontite experimental**: estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

PARK, Joo-Young; JEON, Soung Hoo; CHOUNG, Pill-Hoon. Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. **Cell transplantation**, v. 20, n. 2, p. 271-286, 2011.

PAROLINI, Ornella *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international **Workshop on Placenta Derived Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

PAYNE, Jeffrey B. *et al.* The link between periodontitis and rheumatoid arthritis: a periodontist's perspective. **Current oral health reports**, v. 2, n. 1, p. 20-29, 2015.

PEREIRA, Suiane *et al.* An alternative, easy and reproducible method of stabilization and ligature-induced periodontitis in mouse. **MethodsX**, v. 6, p. 2156-2165, 2019.

PERPELKIN, Natasha M. J. *et al.* Cryopreserved amniotic membrane as transplant allograft: viability and post-transplant outcome. **Cell and tissue banking**, v. 17, n. 1, p. 39-50, 2016.

REILLY, Debra Ann *et al.* Clinical experience: using dehydrated human amnion/chorion membrane allografts for acute and reconstructive burn care. **Annals of plastic surgery**, v. 78, n. 2, p. S19-S26, 2017.

REIS, Emily Correna Carlo; BORGES, Andréa Pacheco Batista; DEL CARLO, Ricardo Junqueira. Regeneração periodontal em cães. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2128-2136, 2011.

RIAU, Andri K. *et al.* Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v. 31, n. 2, p. 216-225, 2010.

RINASTITI, M. *et al.* Histological evaluation of rabbit gingival wound healing transplanted with human amniotic membrane. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 35, n. 3, p. 247-251, 2006.

RISSATO, Marcos; TRENTIN, Micheline Sandini. Aumento de coroa clínica para restabelecimento das distâncias biológicas com finalidade restauradora–revisão da literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, v. 17, n. 2, 2012.

SALI, Deepthi D.; GEORGE, Joann Pauline. Demineralized freeze dried bone allograft with amniotic membrane in the treatment of periodontal intrabony defects-12 month randomized controlled clinical trial. **Journal of periodontology**, p. 1-18, 2016.

SANT'ANNA, L. B. *et al.* Amniotic Membrane Application Reduces Liver Fibrosis in a Bile Duct Ligation Rat Model. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 3, p. 441–453, abr. 2011.

SANT'ANNA, L. B. *et al.* Antifibrotic effects of human amniotic membrane transplantation in established biliary fibrosis induced in rats. **Cell transplantation.**, v. 25, n. 12, p. 2245-2257, 2016.

SANT'ANNA, L.B. *et al.* Long-term effects of human amniotic membrane in a rat model of biliary fibrosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 50, n. 7, 2017.

SHETTY, Sonia S.; CHATTERJEE, Anirban; BOSE, Somik. Bilateral multiple recession coverage with platelet-rich fibrin in comparison with amniotic membrane. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 18, n. 1, p. 102, 2014.

SILINI, Antonietta *et al.* Soluble factors of amnion-derived cells in treatment of inflammatory and fibrotic pathologies. **Current stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 6-14, 2013.

SILVA, Natália Linhares Coutinho. **Estudo do perfil anti-inflamatório dos derivados nacilidrazônicos lassbio-930 e lassbio-651 em modelo de periodontite experimental em ratos.** 2012. Dissertação (Mestrado Ciências farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SOARES, F.A.N. **Análise Morfológica e Biomecânica do Âmnio Conservado em Glicerol Esterilizado com Diferentes Doses de Radiação Ionizante.** 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. **Compendium (Newtown, Pa.). Supplement**, n. 18, p. S684-5, 688, 1994.

SOCRANSKY, S. S. *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of clinical periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998.

STEFFENS, João Paulo; MARCANTONIO, Rosemary Adriana Chiérici. Classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares 2018: guia prático e pontos-chave. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 47, p. 189-197, 2018.

TEIXEIRA, Roberta Jenniffer Maciel *et al.* A atuação da membrana amniótica na expressão dos genes CD206 e IL-12B na fibrose hepática biliar. **Revista Univap**, v. 26, n. 50, p. 47-63, 2020.

TEHRANI, Fatemeh D. *et al.* A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1444, 2021.

THOMSEN, J. S. *et al.* Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. **Journal of microscopy**, v. 218, n. 2, p. 171-179, 2005.

TONETTI, Maurizio S.; GREENWELL, Henry; KORNMAN, Kenneth S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. **Journal of periodontology**, v. 89, p. S159-S172, 2018.

TSUNO, Hiroaki *et al.* Intraoral application of hyperdry amniotic membrane to surgically exposed bone surface. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 117, n. 2, p. e83-e87, 2014

VATSA, Richa *et al.* Evaluation of amnion in creation of neovagina in women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. **Fertility and sterility**, v. 108, n. 2, p. 341-345, 2017.

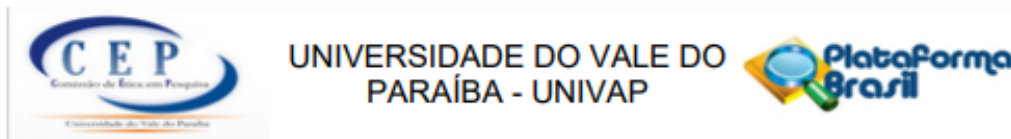
VELEZ, Ines *et al.* Cryopreserved amniotic membrane for modulation of periodontal soft tissue healing: a pilot study. **Journal of periodontology**, v. 81, n. 12, p. 1797-1804, 2010.

VENKATESAN, Nivedha; LAVU, Vamsi; BALAJI, S. K. Clinical efficacy of amniotic membrane with biphasic calcium phosphate in guided tissue regeneration of intrabony defects-a randomized controlled clinical trial. **Biomaterials Research**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2021

WILSHAW, Stacy-Paul *et al.* Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 4, p. 463-472, 2008.

WU, Pin-Hsien *et al.* Amniotic membrane and adipose-derived stem cell co-culture system enhances bone regeneration in a rat periodontal defect model. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 115, n. 3, p. 186-194, 2016.

YAMADA, Shuntaro; SHANBHAG, Siddharth; MUSTAFA, Kamal. Scaffolds in Periodontal Regenerative Treatment. **Dental Clinics**, v. 66, n. 1, p. 111-130, 2022.

**ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Potencial da membrana amniótica na regeneração periodontal.

**Pesquisador:** ROBERTA JENNIFFER MACIEL TEIXEIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 40087620.2.0000.5503

**Instituição Proponente:** FUNDACAO VALEPARAIBANA DE ENSINO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.530.253

**Apresentação do Projeto:**

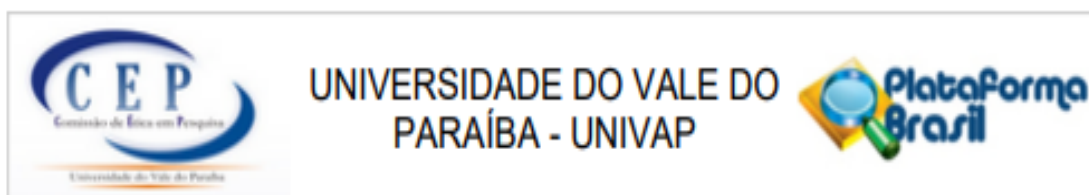
Os pesquisadores solicitam a análise do projeto por esse CEP pois necessitam de três placentas humanas, as quais serão utilizadas para obtenção da membrana amniótica humana (MA), que serão obtidas, a partir de cesáreas eletivas de pacientes com gestação normal, do centro cirúrgico obstétrico da Santa Casa de São José dos Campos, para uso em um estudo experimental com ratos sobre o potencial da membrana amniótica em promover regeneração óssea em doença periodontal induzida.

(Em: PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1657436, de 01/11/2020)

**Objetivo da Pesquisa:**

Analisar o potencial da membrana amniótica na modulação inflamatória e regeneração periodontal em ratos submetidos ao modelo de periodontite experimental.

(Em: PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1657436, de 01/11/2020)



Continuação do Parecer: 4.530.253

Outros	HOSPITAL.pdf	01/11/2020 22:09:07	ROBERTA JENNIFFER MACIEL	Aceito
Outros	CURRICULO.pdf	01/11/2020 22:07:21	ROBERTA JENNIFFER MACIEL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCEP.pdf	01/11/2020 22:01:19	ROBERTA JENNIFFER MACIEL TEIXEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	01/11/2020 21:52:11	ROBERTA JENNIFFER MACIEL TEIXEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	01/11/2020 21:44:04	ROBERTA JENNIFFER MACIEL	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 08 de Fevereiro de 2021

---

**Assinado por:**  
**Mauricio Martins Alves**  
**(Coordenador(a))**

**ANEXO B: PARECER CEUA 06/CEUA/2020.**

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA**  
**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que a proposta intitulada "**Potencial da membrana amniótica na regeneração periodontal.**", registrada com o protocolo nº CEUA06/2020, sob a responsabilidade de **Luciana Sant'Anna Barros**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa- 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), **\_11\_/\_12\_/\_2020.**

Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

Coordenadora CEUA-UNIVAP

## ANEXO C: ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA.

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, eXX, 2022  
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.XXXXX>

### **Membrana amniótica reduz a perda óssea alveolar e aumenta o ganho de inserção na doença periodontal em ratos**

Amniotic membrane reduces the alveolar bone loss and increases attachment level gain in periodontal disease in rats

Membrana amniótica reduce la pérdida de hueso alveolar y aumenta la ganancia de inserción en la enfermedad periodontal en ratas

Recebido: 00/01/2022 | Revisado: 00/01/2022 | Aceito: 00/01/2022 | Publicado: 00/01/2022

**Roberta Jennifer Maciel Teixeira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9689-2159>

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

E-mail: robertamaciel1902@gmail.com

**Thamires de Azevedo Malaquias**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4597-3511>

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

E-mail: thamimalaquias@gmail.com

**Luciana Barros Sant'Anna**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5128-7414>

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

E-mail: lucianabsa@gmail.com

#### **Resumo**

A doença periodontal é um processo inflamatório crônico multifatorial, que leva à destruição das estruturas do periodonto e posteriormente perda dentária, prejudicando a saúde bucal e geral. A membrana amniótica (MA) atrai atenção como biomaterial para a medicina regenerativa, sua arquitetura única garante excelentes propriedades biológicas e mecânicas. O objetivo é analisar o potencial da MA na regeneração dos tecidos periodontais na periodontite induzida em ratos. A casuística envolveu 26 ratos machos *Rattus norvegicus*, Albinos, Wistar, com peso aproximado de 200 a 250g, os quais após o período de aclimatização foram divididos aleatoriamente nos grupos: Grupo normal (n=6): os animais não foram submetidos a nenhum procedimento, seguindo o percurso normal do experimento; Grupo ligadura (n=10): os animais foram submetidos à ligadura para indução da periodontite, e após 2 semanas esta foi removida e seguiram sem tratamento; Grupo ligadura + MA (n=10): os animais foram submetidos a ligadura para indução de periodontite, após 2 semanas a ligadura foi removida e a MA colocada ao redor do defeito ósseo. Após 4 semanas de atuação da MA os animais foram eutanasiados e as análises macroscópica, morfométrica, histológica, histomorfométrica e estatística foram realizadas para avaliar o reparo periodontal. Observou-se significativa instalação da doença periodontal, e após a colocação da MA, verificou-se a diminuição da perda óssea alveolar e da profundidade de sondagem, ganho no nível de inserção conjuntiva, e tecidos periodontais com aspecto de normalidade. Conclui-se que a MA estimula o reparo periodontal após ter removido o agente etiológico que estava provocando a periodontite.

**Palavras-chaves:** Membrana amniótica; Medicina regenerativa; Periodontite; Ratos; Ligadura.