

## 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: 16/03/2022 | Revisado: 25/03/2022 | Aceito: 02/04/2022 | Publicado: 09/04/2022

**Roberta Jenniffer Maciel Teixeira**

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

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

E-mail: robertamaciel1502@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@univap.br

### 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-chave:** Membrana amniótica; Medicina regenerativa; Periodontite; Ratos; Ligadura.

### Abstract

Periodontal disease is a multifactorial chronic inflammatory process that leads to the destruction of periodontium structures and later tooth loss, impairing oral and general health. Amniotic membrane (AM) attracts attention as a biomaterial for regenerative medicine; its unique architecture ensures excellent biological and mechanical properties. The objective is to analyze the potential of AM in the regeneration of periodontal tissues in induced periodontitis in rats. The sample involved 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 submitted to any procedure, following the normal course of the experiment; Ligation group (n=10): the animals were submitted to ligation for induction of periodontitis, and after 2 weeks it was removed and continued without treatment; Ligation + AM group (n=10): the animals were submitted to ligation to induce periodontitis, after 2 weeks the ligature was removed and the AM placed around the bone defect. After 4 weeks of AM action, the animals were euthanized and macroscopic, morphometric, histological, histomorphometric and statistical analyzes were performed to evaluate periodontal repair. There was a significant installation of periodontal disease, and after the placement of AM, there was a decrease in alveolar bone loss and probing depth, gain in the level of conjunctival attachment, and periodontal tissues with an aspect of normality. It is concluded that AM stimulates periodontal repair after removing the etiologic agent that was causing periodontitis.

**Keywords:** Amniotic membrane; Regenerative medicine; Periodontitis; Rats; Ligation.

## Resumen

La enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio crónico multifactorial que conduce a la destrucción de las estructuras del periodonto y posterior pérdida dentaria, perjudicando la salud bucal y general. La membrana amniótica (AM) atrae la atención como biomaterial para la medicina regenerativa, su arquitectura única asegura excelentes propiedades biológicas y mecánicas. El objetivo es analizar el potencial de la MA en la regeneración de tejidos periodontales en periodontitis inducida en ratas. La muestra involucró a 26 ratas macho *Rattus norvegicus*, Albinos, Wistar, con un peso aproximado de 200 a 250 g, que después del período de aclimatación se dividieron aleatoriamente en grupos: Grupo normal (n=6): los animales no fueron sometidos a ningún procedimiento, siguiendo el curso del experimento; Grupo ligadura (n=10): los animales fueron sometidos a ligadura para inducción de periodontitis, ya las 2 semanas se retiró y se continuó sin tratamiento; Grupo Ligadura + MA (n=10): los animales fueron sometidos a ligadura para inducir la periodontitis, después de 2 semanas se retiró la ligadura y se colocó la MA alrededor del defecto óseo. Después de 4 semanas de acción AM, los animales fueron sacrificados y se realizaron análisis macroscópicos, morfométricos, histológicos, histomorfométricos y estadísticos para evaluar la reparación periodontal. Hubo una instalación importante de enfermedad periodontal, y después de la colocación de AM, hubo una disminución en la pérdida de hueso alveolar y profundidad de sondaje, ganancia en el nivel de inserción conjuntival y tejidos periodontales con un aspecto de normalidad. Se concluye que la AM estimula la reparación periodontal luego de eliminar el agente etiológico que estaba causando la periodontitis.

**Palabras clave:** Membrana amniótica; Medicina regenerativa; Periodontitis; Ratas; Ligadura.

## 1. Introdução

A doença periodontal é um processo inflamatório crônico que afeta o periodonto, acarretada por uma infecção bacteriana associada ao biofilme pré-instalado na superfície dentária (Elahi, 2021). Engloba a inflamação gengival, a degeneração do ligamento periodontal e cemento, e a perda do osso alveolar, sendo que o comprometimento destas estruturas de suporte eventualmente leva à perda do dente (Kinane et al., 2017). Uma pesquisa epidemiológica sugeriu que mais de 50% de todos os adultos no mundo são afetados por doenças periodontais (Carasol, 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, 2019).

O tratamento periodontal convencional e inicial é a profilaxia, a qual é realizada 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 a realização do retalho mucoperiosteal para a raspagem subgengival (Elahi, 2021). O organismo por si só, quando se encontra livre do agente etiológico possui a capacidade de reparar as estruturas perdidas, porém hoje em dia é almejada a regeneração das mesmas. Nesse contexto, destaca-se a regeneração tecidual guiada (RTG), que tem como objetivo guiar as células com capacidade regenerativa para repovoar a lesão e promover novo cemento, ligamento periodontal e osso (Nuñez, 2019). Estudos sugerem que materiais biológicos, incluindo membranas de colágeno e a membrana amniótica humana, têm potencial suficiente para serem usados na regeneração óssea guiada (Shetty et al., 2014; Fénelon, 2018).

Atualmente, 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 tem apresentado 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 et al., 2020). Para a regeneração dos tecidos periodontais, CTMs de vários tecidos tem sido investigadas, incluindo as do ligamento periodontal (Iwata, 2009; Park et al., 2011), tecido adiposo (Wu et al., 2016), perióstio (Jiang, 2010) e da membrana amniótica (Agarwal, 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 uma membrana translúcida e avascular com espessura entre 0,02 mm a 0,5 mm, composta por colágeno dos tipos I, III, IV, V e VI, proteoglicanos, laminina, fibronectina e células tronco epiteliais e mesenquimais. Graças a esta constituição é uma estrutura forte e elástica que facilita a manipulação durante a prática cirúrgica. (Gupta et al., 2015). Tem sido usada clinicamente sobre queimaduras e úlceras dérmicas (Reilly, 2017; Dehghani, 2017), na oftalmologia para tratamento de necrose e inflamação grave dos olhos (Caporossi, 2019), e na odontologia, onde seu uso está expandindo-se rapidamente com aplicações em caso de defeitos na mucosa oral (KAR et al., 2014), defeitos intraósseos (Tsuno, 2014) e recessões gengivais (Shetty et al., 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; Mamed & 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-angiogênica, 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 (Iwasaki et al., 2019; 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, 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. Diante disso, o objetivo deste estudo foi analisar o potencial da MA na regeneração dos tecidos periodontais na periodontite induzida em ratos.

## 2. Metodologia

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 o protocolo 06/CEUA/2020, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP/UNIVAP), protocolo nº 4.530.253.

### 2.1 Animais e grupos experimentais

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 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).

$$E = N \cdot T$$

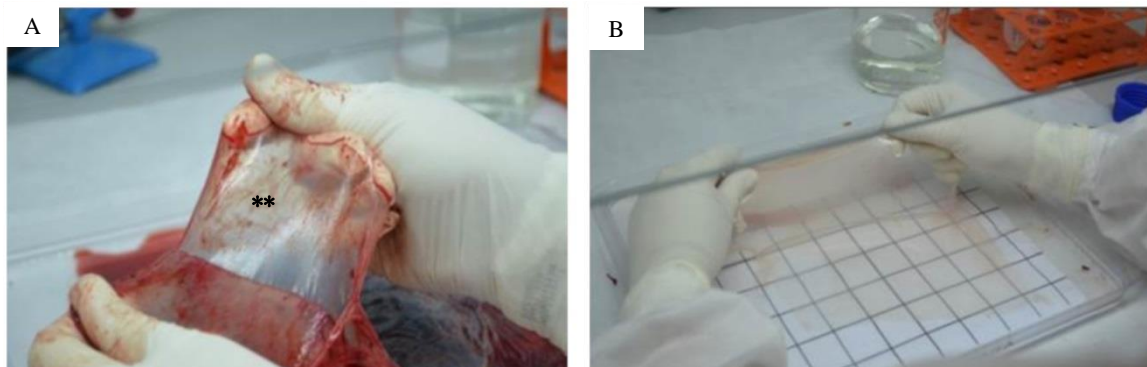
Neste estudo,  $E = (10 \times 3) - 3$ , o que resulta em um total de 27 animais, os quais foram divididos em 3 grupos. Após o período de aclimatização de 7 dias os ratos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: Grupo Normal

(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 e seguiram sem tratamento; 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 de 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.

## 2.2 Colheita da placenta e processamento da membrana amniótica

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. Após a colheita da placenta e uma vez 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. Em seguida, a MA foi cortada em fragmentos, os quais foram imersos e preservados em meio DMEN/glicerol 1:1 (v/v) a -80°C por 30 dias até o momento de aplicação nos animais (Moraes et al., 2021) (Figura 1).

**Figura 1:** 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. (B).



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

## 2.3 Modelo experimental de indução da periodontite

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) (Figura 2 A), para a indução da periodontite. Esta se iniciou com 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 (Figura 2 B). Em seguida, com uma sonda milimetrada de 15 mm foi realizada a sondagem periodontal inicial das regiões mesial, mesio central, central, 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 (Figura 2 C e D). 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; Ferreira et al., 2016).

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

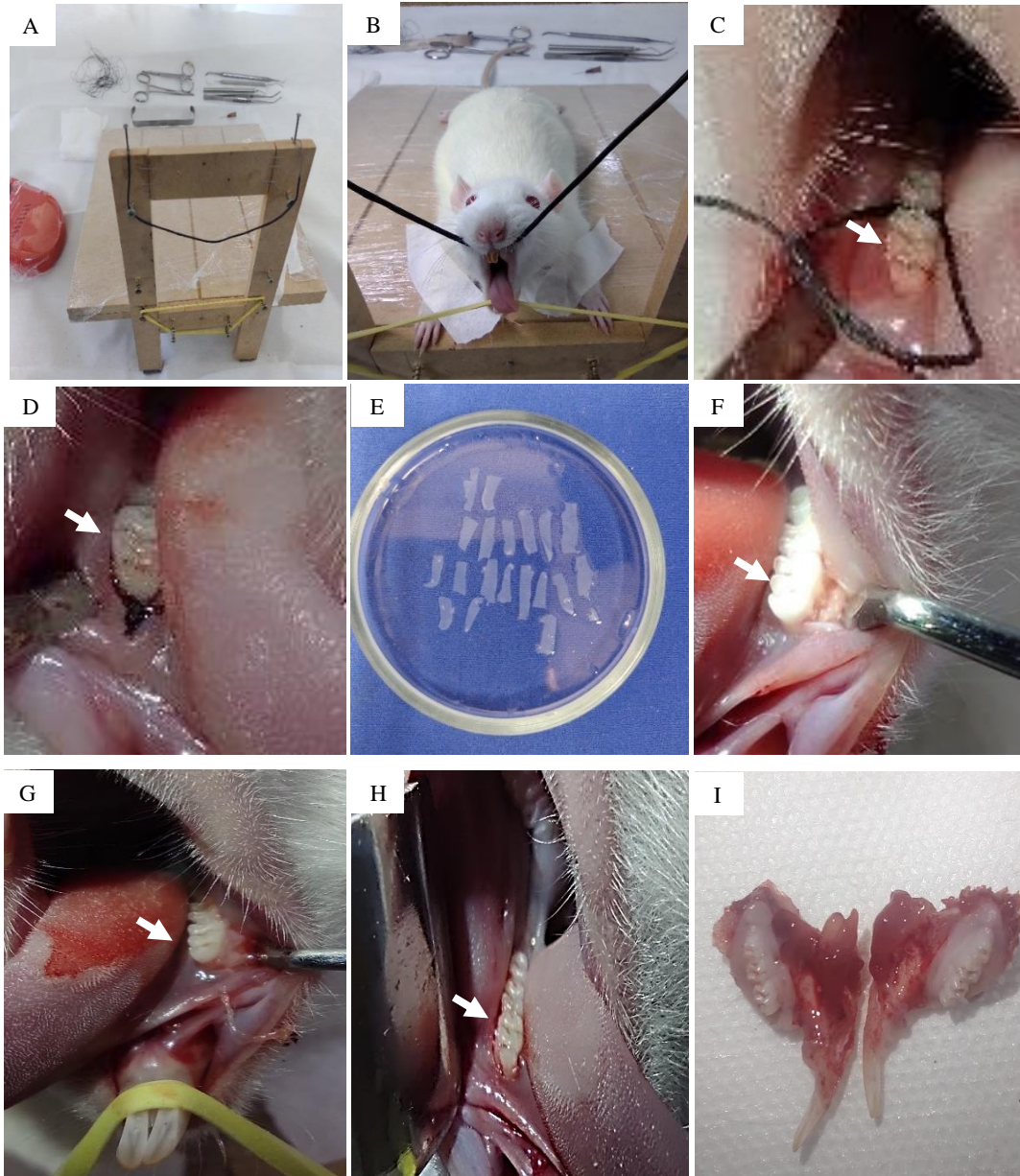
Após 14 dias os animais foram anestesiados novamente, e uma nova sondagem foi realizada ao retirar a ligadura. No grupo Ligadura foi realizada a remoção da ligadura, e os animais seguiram sem tratamento. Já no grupo ligadura+MA, após a remoção da ligadura foi realizado um retalho mucoperiosteal (Figura 2 F) com o auxílio de um holleback, e em seguida aplicado a membrana (Figura 2 G) em ambas as hemimandíbulas. Antes desta aplicação, a MA criopreservada foi descongelada em banho maria a 37°C, lavada em tampão PBS, e cortada em fragmentos de 1,5 x 3mm (Figura 2 E), 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. É 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 ao nível coronário (Figura 2 H), e os animais permaneceram no colchonete térmico até a recuperação anestésica, sendo seguido pela analgesia, conforme descrito no protocolo do item 2.3.

#### **2.5 Eutanásia e coleta das amostras**

Após 42 dias do início do experimento 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 (Figura 2 I), e as hemimandíbulas obtidas. De cada rato, foram utilizadas as hemimandíbulas esquerdas para a análise morfométrica, e as direitas para a análise histológica e histomorfométrica.



**Figura 2:** Indução da periodontite, aplicação da MA e remoção das amostras: A) Mesa operatória de Houston; B) Rato posicionado na mesa operatória; C e D) Rato com a ligadura na região sulcular ao redor do 1º molar inferior; E) Fragmentação da MA em pedaços de 1,5x3mm; F) Retalho mucoperiosteal na face vestibular, com a visão do osso alveolar; G) Aplicação da MA com o auxílio de uma espátula de inserção; H) Reposicionamento do retalho ao nível coronário; I) Mandíbula dividida pela sínfise após eutanásia.



Fonte: Autores.

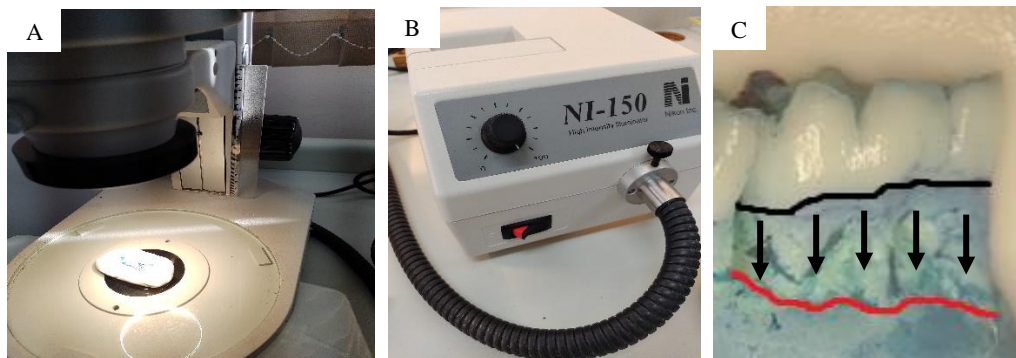
## 2.6 Análise macroscópica

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.

## 2.7 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 e 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 (Figura 3 A). 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 (Figura 3 C) (Azambuja et al., 2011).

**Figura 3:** Análises morfométrica . A) Estereoscópio com a hemimandíbula fixada no silicone; B) Estereoscópio NI-1150; C) 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.



Fonte: Autores.

## 2.8 Processamento histológico e análise histológica

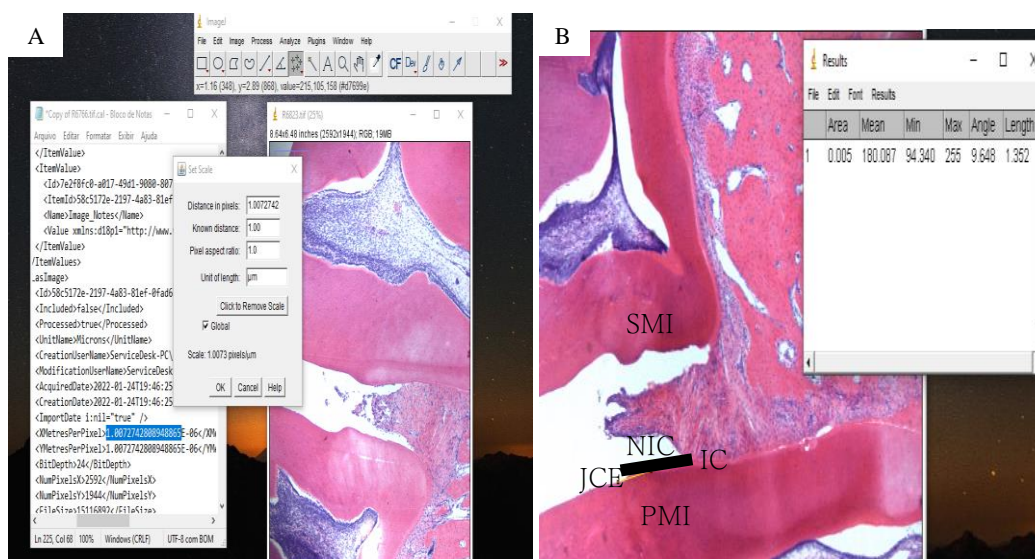
As amostras foram imersas em formalina tamponada (Synth, São Paulo, Brazil) a 10% por 24h, e em seguida foram colocadas no EDTA para serem descalcificadas durante 2 meses. Após este período as amostras foram lavadas em água corrente por 1 hora, foram clivadas e colocadas em álcool 70% overnight. No dia 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 são mergulhadas em xilol 2x 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 foi realizado o “toilet” os tornando adequados ao seccionamento em micrótomo semi-automático (Leica RM2245). 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 (H/E), e tricrômico de Masson. Estas colorações foram utilizadas para a análise descritiva das alterações morfológicas dos tecidos periodontais dos primeiros molares inferiores.

## 2.9 Análise histomorfométrica do nível de inserção conjuntiva (NIC)

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 1.51k* obtido por domínio público, <http://imagej.nih.gov/ij>. 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 cemento-esmalte (JCE) e a inserção conjuntiva (IC). 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. Com a ferramenta “*Straight*” foram realizadas medidas lineares do nível de inserção conjuntiva (NIC) e mensuradas com as ferramentas “*Analyse*” e “*Measure*”. O valor obtido em “*Length*” foi o NIC de cada animal (Figura 4 A e B).

**Figura 4:** A) Processo de calibração para a análise histomorfométrica do nível de inserção conjuntiva (NIC). A calibração da medida foi realizada utilizando a caixa “*Set Scale*”. Para isto, foi inserida nesta caixa a quantidade de pixels presente em 1  $\mu\text{m}$ ; B) 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).



Fonte: Autores.

## 2.10 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 à 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% ( $p < 0.05$ ).

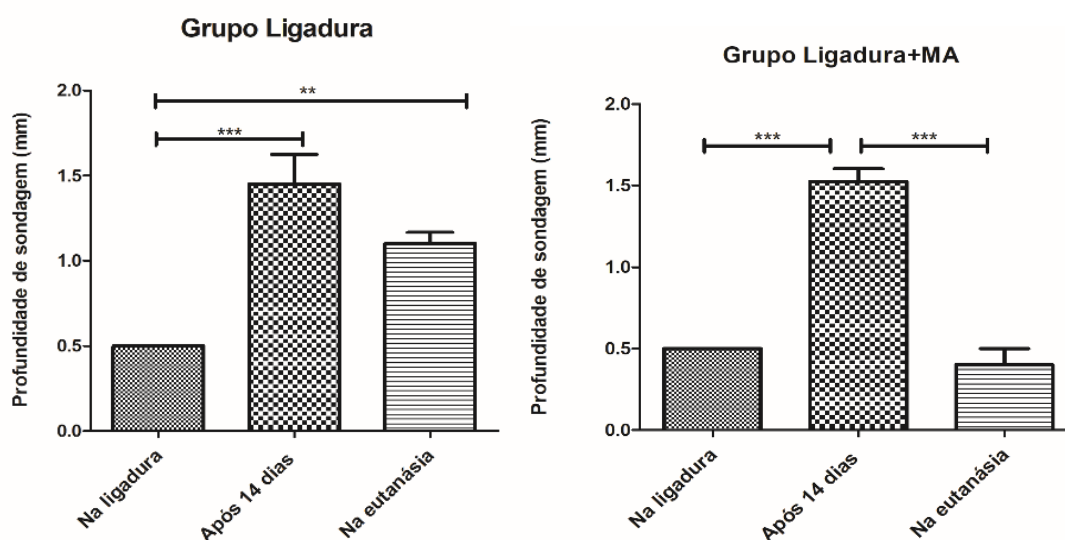


### 3. Resultados

#### 3.1 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. Em contraste, 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.



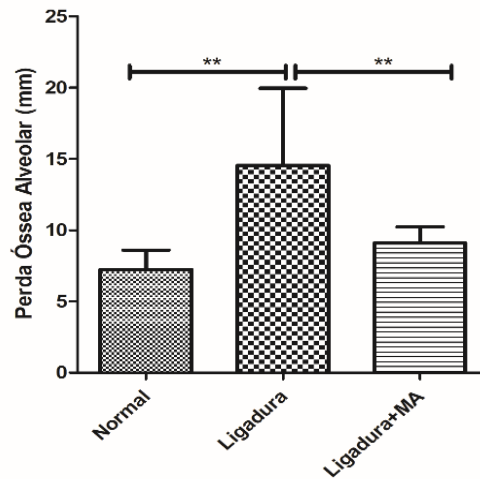
Fonte: Autores.

#### 3.2 Análise Morfométrica

O gráfico 2 e a figura 5 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 ( $p<0,01$ ). É 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 face vestibular foi extremamente significativa, quando comparado 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.



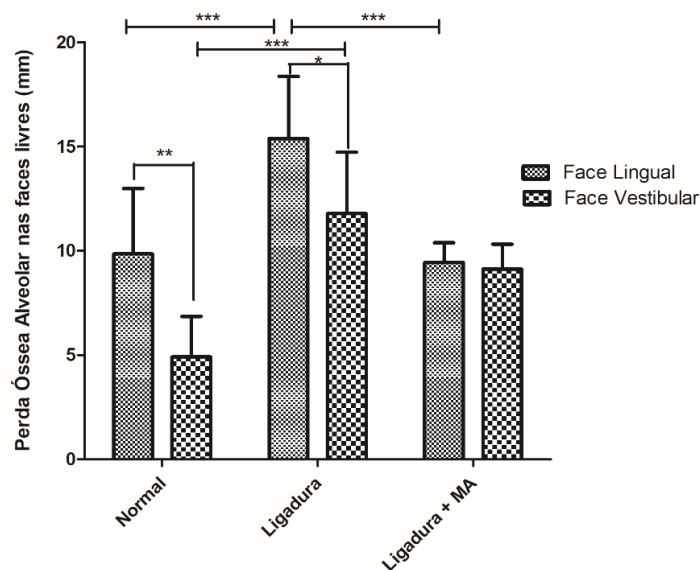
Fonte: Autores.

**Figura 5:** 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: Autores

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



Fonte: Autores

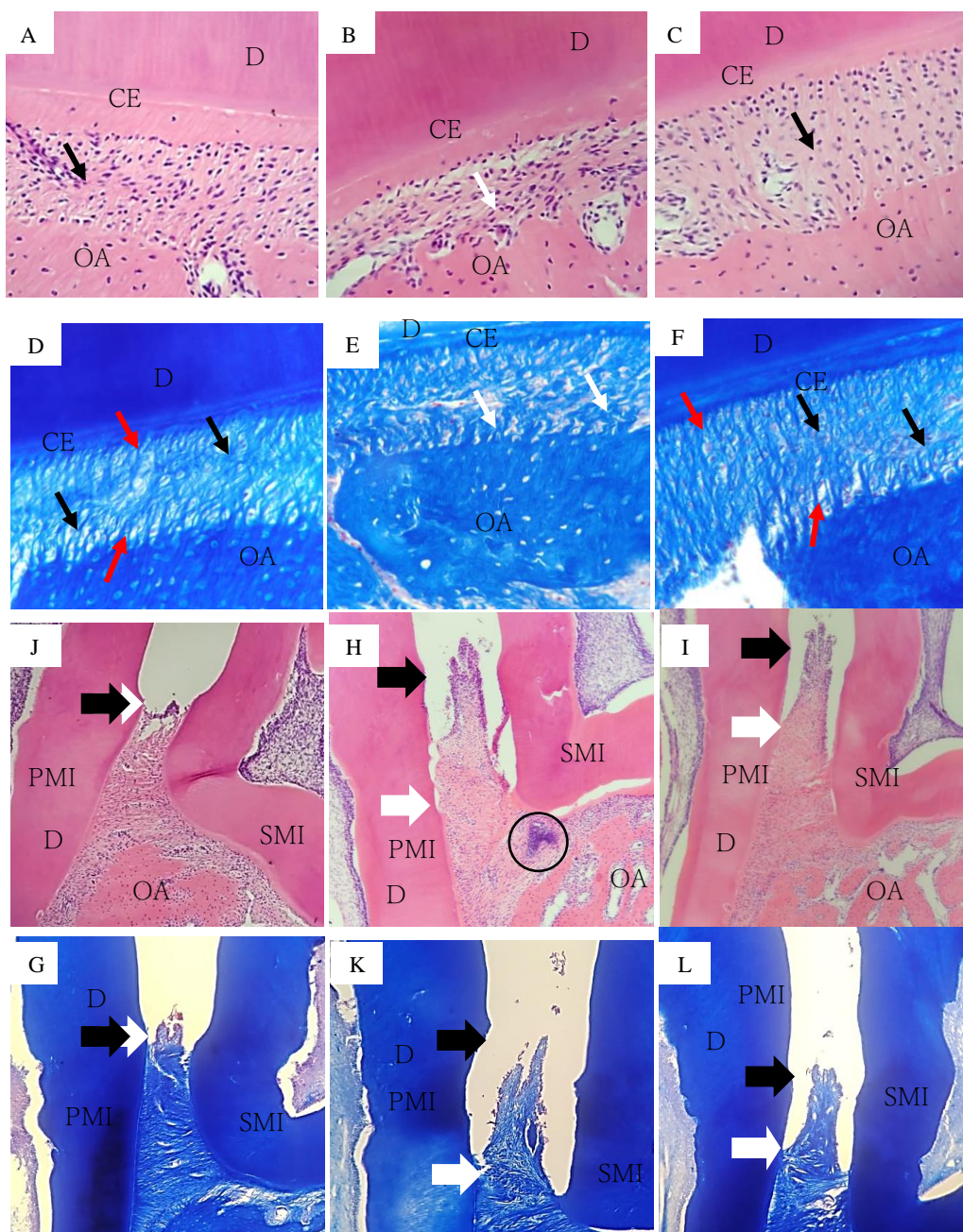
### 3.3 Análise Histológica

Os resultados da análise histológica descritiva por meio das colorações de H/E e tricômico de Masson, nos 3 grupos experimentais, estão representados na Figura 6. A coloração de H/E permitiu uma visão geral dos tecidos dentários e periodontais, enquanto que o tricômico de Masson permitiu observar, com maior precisão e detalhe, os grupos de feixes de fibras colágenas do ligamento periodontal, assim como as fibras de Sharpey inseridas tanto no osso alveolar quanto no cimento. Nos 3 grupos (figura 6 A, B e C), portanto, foi possível observar o ligamento periodontal formado por tecido conjuntivo frouxo com células e os feixes de fibras colágenas entre a superfície do cimento e do osso alveolar. Nos grupos normal (Figura 6 A) e ligadura + MA (Figura 6 C) a espessura do ligamento periodontal estava maior quando comparado ao grupo ligadura (figura 6 B), e os feixes de fibras colágenas estavam mais organizados. Na figura 6 D, E e F, verificam-se os feixes de fibras colágenas corados em azul. Nos grupos normal (figura 6 D) e ligadura + MA (Figura 6 F) foi observado que os feixes de fibras do ligamento estavam bastante orientados e definidos, assim como 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. Já no grupo ligadura (Figura 6 E) os feixes de fibras colágenas do ligamento periodontal estavam distribuídas de forma desorganizada.

A Figura 6 G, H e I demonstram os tecidos periodontais na região interproximal entre 1º e 2º molar inferior. No grupo normal a papila gengival apresentou 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 inseriam-se no cimento da raiz do 1º molar, seguindo uma direção horizontal até se inserir no cimento da raiz do 2º molar. A inserção conjuntiva seguiu o padrão de normalidade, coincidente com a junção cimento esmalte (Figura 6G e J). Contudo, no grupo ligadura (Figura 6H e K) a papila gengival apresentou um epitélio e um tecido conjuntivo com leve infiltrado inflamatório, incluindo feixes de fibras colágenas ligeiramente mais finas, sendo que as fibras transeptais não apresentavam definição. A inserção conjuntiva não coincidiu com a junção cimento-esmalte, e houve a migração apical do epitélio juncional demonstrando perda de inserção. Por fim, no grupo ligadura + MA (Figura 6I e L) a papila gengival apresentou epitélio e tecido conjuntivo dentro dos padrões de normalidades, com ausência de

infiltrado inflamatório, incluindo feixes de fibras colágenas densas e maior definição das fibras transeptais. O nível de inserção conjuntiva não estava coincidente com a junção cimento-esmalte, porém neste grupo ocorreu apenas uma leve migração do epitélio juncional demonstrando uma perda de inserção menor, quando comparado ao grupo ligadura.

**Figura 6:** Fotomicrografias da região de bifurcação, próxima à raiz distal do 1º molar dos grupos: Normal (A, D, G e J), Ligadura (B, E, H e K), Ligadura + MA (C, F, I e L). No ligamento periodontal, notam-se os feixes de fibras colágenas e as fibras de Sharpey inseridas no osso alveolar e no cimento. Aumento original: 40x. Seta Preta: feixe de fibras colágenas organizadas, Seta Branca: feixes de fibras colágenas desorganizadas, Seta vermelha: fibras de Sharpey. Fotomicrografias dos tecidos periodontais na região interproximal entre 1º e 2º molar dos grupos: Normal (G e J), Ligadura (H e K), Ligadura MA (I e L). Aumento original: 10x, Seta Preta: Junção Cimento Esmalte, Seta branca: Inserção Conjuntiva, Seta vermelha: fibras de Sharpey, Círculo: foco de células inflamatórias. Coloração: Hematoxilina e eosina (A, B, C, G, H, I); tricrômico de Masson (D, E, F, J, K e L). Abreviações: D: Dentina, CE: Cimento, OA: Osso Alveolar, PMI: Primeiro Molar Inferior, SMI: Segundo Molar Inferior.



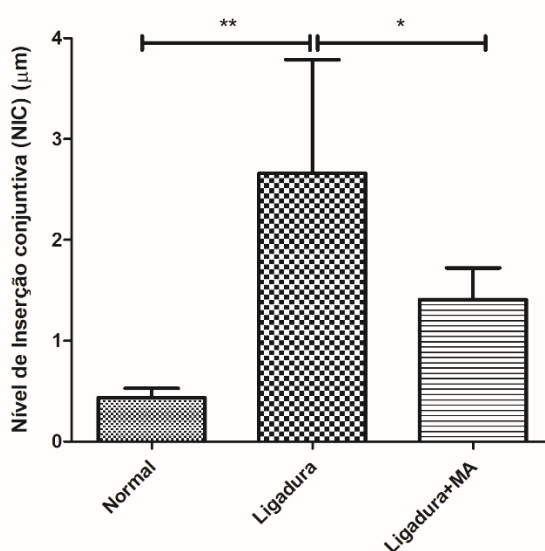
Fonte: Autores



### 3.4 Análise histomorfométrica nível de inserção conjuntiva (NIC)

O Gráfico 4 demonstra os valores médios e desvios-padrão 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 ( $0,91 \pm 1,75 \mu\text{m}$ ). No 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: Autores

## 4. 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.

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 Johnson et al. (1975). Neste modelo, os patógenos apresentam um alto grau de virulência, estando bem aderidos na região dentária após 14 dias (Oliveira et al., 2017). Esta colonização de patógenos na 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 et al., 2018). A escolha do modelo para indução de periodontite foi embasada nesses estudos, uma vez que este tipo de modelo apresenta alto potencial de acometimento dos tecidos periodontais, acarretando uma perda óssea alveolar significativa e baixa reversibilidade espontânea da doença.

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 e em progressão (Pereira et al., 2019, Venkatesan et al., 2021). Assim como este 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). No presente 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 em vez 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 no presente estudo 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 e não causou nenhuma reação adversa ao animal. 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 a sua grande adaptabilidade a diferentes morfologias cavitárias (Leal-Marín 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, logo 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 neste 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, o qual permita 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 (GOMAA 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 constataram 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 presente estudo, naquele 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 presente trabalho, o fragmento de âmnio remanescente interferiu com a orientação dos feixes de fibras colágenas do ligamento periodontal. Os resultados da análise histológica deste 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 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. No presente estudo, 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).

Rinastitl et al. (2006) avaliou histologicamente o potencial do transplante de membrana amniótica humana em um defeito gengival em coelho e verificou 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 com os resultados significativos de ganho de inserção clínica no presente estudo, considerando o reparo rápido do tecido gengival no grupo tratado com a MA. Esta regula positivamente a expressão de receptores de fatores de crescimento, como o receptor de EGF em células epiteliais da gengiva, 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, 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 a 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, lingual e 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, 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 foram encontrados no grupo tratado com a MA, o qual apresentou uma menor profundidade de sondagem e uma maior inserção clínica 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 os quais estão seguramente correlacionados com a regeneração periodontal por meio de efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores, antibacterianos e promoção do crescimento de progenitores endógenos (Yamada et al., 2022).

Yamada et al. (2022) fez um levantamento das principais técnicas de *scaffolds* na regeneração periodontal, e relatou 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 geração óssea do que apenas os substitutos ósseos. Ainda com relação à associação da MA com outro biomaterial, Sali e Pauline (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. Todos esses parâmetros foram avaliados e persistiram nos períodos de 3, 6, 9 e 12 meses após a aplicação do biomaterial. Os resultados do presente trabalho 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 e aguardar um maior período de atuação a fim de verificar maior ganho ósseo.

Diferentes estudos, assim como nosso, mostraram um processo de cicatrização favorável, sem sinais de reações inflamatórias crônicas ou de corpo estranho, ganho de inserção clínica, diminuição de profundidade de sondagem, confirmando assim a biocompatibilidade, a capacidade regenerativa, a não toxicidade e a não imunogenicidade em relação a MA na regeneração tecidual guiada para o tratamento de defeitos periodontais. Assim, a MA é um biomaterial promissor dentro da



engenharia de tecidos que merece mais estudos a fim de consagrar seu uso na aplicação clínica (Kumar et al., 2015; Leal-Marín et al., 2021; Yamada et al., 2022; Gomaa et al., 2022).

A membrana amniótica tem um impacto significativo no tratamento da doença periodontal, logo em estudos futuros será interessante adicionar um fragmento de MA de espessura ligeiramente maior e aguardar mais que 4 semanas para a eutanásia, com o objetivo de verificar se o aumento no tempo de aplicação da membrana potencializará o reparo ósseo e o ganho de inserção clínica. Assim, considerando os estudos prévios de Sant'Anna et al. (2011) e Sant'Anna et al. (2017), o período de 6 semanas de atuação da MA poderá ser aplicado, e para a eutanásia dos ratos é viável que seja realizada em mais intervalos de tempo, por exemplo, após 1, 2, 3, 4 e 6 semanas após a aplicação da MA. A escolha destes períodos é devido a importância de acompanhar histopatologicamente o processo de reparo/regeneração tecidual, o que inclui período de inflamação, proliferação de células, formação do tecido ósseo e sua remodelação, respectivamente. Ao mesmo tempo, é possível a análise da taxa de reabsorção da MA, contribuindo assim com a literatura do uso da membrana e sua reabsorção, o que ainda é limitado. Outra análise a ser realizada será a tomografia computadorizada, uma vez que ela se correlaciona muito bem com a análise histológica com relação à quantificação da área de osso novo e possibilita análises mais precisas, como a obtenção de medidas volumétricas de todo o osso do processo alveolar. Finalmente, a realização de estudos clínicos para a aplicação da MA. Neste caso, será necessário o uso da membrana criopreservada proveniente de um banco de membrana amniótica, o qual deve disponibilizar uma infraestrutura exigida pela legislação, como a presença da chamada "sala limpa", própria para o processamento dos tecidos que serão disponibilizados para a clínica, mantendo a qualidade do biomaterial. Essa aplicação clínica sem dúvida será um avanço na medicina regenerativa periodontal.

## 5. 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, possibilitando um ganho de inserção clínica periodontal, e na diminuição da perda óssea alveolar. 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.

## Referências

- Agarwal, A., Shankar, S., Singh, G., Saxena, P., & Tahseen, A. (2014). Pleiotropic properties of amniotic membrane for modulation of periodontal healing. *Int J Dent Med Res*, 1, 110-117.
- Azambuja, C. B. D. (2011). Análise comparativa da perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos Wistar nas faces livres e proximais. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Odontologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Campelo, M. B. D., Santos, J. D. A. F., Maia Filho, A. L. M., Ferreira, D. C. L., Sant'Anna, L. B., Oliveira, R. A. D., ... & Arisawa, E. Â. L. (2018). Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. *Acta cirurgica brasileira*, 33, 144-155.
- Campos, A. D. S., Diaz, B. L., Rivera, E. A. B., Granjeiro, J. M., Braga, L. M. G. D. M., Frajblat, M., & Stephano, M. A. (2016). Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: introdução geral. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.
- Campos, R. S. C. D. (2018). *Efeitos da administração de Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 na periodontite induzida por ligadura em ratos portadores de artrite reumatoide experimental* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Caporossi, T., Tartaro, R., De Angelis, L., Pacini, B., & Rizzo, S. (2019). A human amniotic membrane plug to repair retinal detachment associated with large macular tear. *Acta Ophthalmologica*, 97(8), 821-823.
- Carasol, M., Llodra, J. C., Fernández-Meseguer, A., Bravo, M., García-Margallo, M. T., Calvo-Bonacho, E., ... & Herrera, D. (2016). Periodontal conditions among employed adults in Spain. *Journal of clinical periodontology*, 43(7), 548-556.

- Christgau, M., Caffesse, R. G., Schmalz, G., & D'Souza, R. N. (2007). Extracellular matrix expression and periodontal wound-healing dynamics following guided tissue regeneration therapy in canine furcation defects. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(8), 691-708.
- Dehghani, M., Azarpira, N., Karimi, V. M., Mossayebi, H., & Esfandiari, E. (2017). Grafting with cryopreserved amniotic membrane versus conservative wound care in treatment of pressure ulcers: a randomized clinical trial. *Bulletin of Emergency & Trauma*, 5(4), 249.
- Elahi, A., Taib, H., Berahim, Z., Ahmad, A., Ab Hamid, S. S., & Mocktar, N. A. (2021). Amniotic Membrane as a Scaffold for Periodontal Tissue Engineering. *Journal of Health Science and Medical Research*, 39(2), 169-180.
- Fénelon, M., Chassande, O., Kalisky, J., Gindraux, F., Brun, S., Bareille, R., ... & Boiziau, C. (2018). Human amniotic membrane for guided bone regeneration of calvarial defects in mice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(6), 1-11.
- Fénelon, M., Catros, S., Meyer, C., Fricain, J. C., Obert, L., Auber, F., ... & Gindraux, F. (2021). Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes*, 11(6), 387.
- Fernandes, P. G. (2014). *Aplicação da microtomografia computadorizada para a análise morfológica bi e tridimensional na avaliação da perda óssea experimental em ratos* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Ferreira, C. L. (2016). Efeito concomitante da doença periodontal induzida e movimentação ortodôntica em ratos submetidos à inalação da fumaça de cigarro: estudo histomorfométrico. Dissertação Mestrado (Biopatologia Bucal) – Universidade Estadual Paulista.
- Fischer, R. G., & Klinge, B. (1994). Clinical and histological evaluation of ligature-induced periodontal breakdown in domestic ferrets immunosuppressed by Cyclosporin-A. *Journal of clinical periodontology*, 21(4), 240-249.
- Gomaa, M., El Guindy, H., Shoukheba, M., & Metwalli, A. (2022). Healing of experimental gingival recession defects treated with amnion allograft: histologic and histometric analysis in dogs. *Journal of Oral Biosciences*.
- Gupta, A., Kedige, S. D., & Jain, K. (2015). Amnion and chorion membranes: potential stem cell reservoir with wide applications in periodontics. *International journal of biomaterials*, 2015.
- Iwasaki, K., Komaki, M., Yokoyama, N., Tanaka, Y., Taki, A., Honda, I., ... & Morita, I. (2014). Periodontal regeneration using periodontal ligament stem cell-transferred amnion. *Tissue Engineering Part A*, 20(3-4), 693-704.
- Iwasaki, K., Akazawa, K., Nagata, M., Komaki, M., Honda, I., Morioka, C., ... & Morita, I. (2019). The fate of transplanted periodontal ligament stem cells in surgically created periodontal defects in rats. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 192.
- Iwata, T., Yamato, M., Tsuchioka, H., Takagi, R., Mukobata, S., Washio, K., ... & Ishikawa, I. (2009). Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials*, 30(14), 2716-2723.
- Johnson, I. H. (1975). Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research*, 10(6), 332-345.
- Jiang, J., Wu, X., Lin, M., Doan, N., Xiao, Y., & Yan, F. (2010). Application of autologous periosteal cells for the regeneration of class III furcation defects in Beagle dogs. *Cytotechnology*, 62(3), 235-243.
- Kar, I. B., Singh, A. K., Mohapatra, P. C., Mohanty, P. K., & Misra, S. (2014). Repair of oral mucosal defects with cryopreserved human amniotic membrane grafts: prospective clinical study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 43(11), 1339-1344.
- Kareem, N. (2020). Amniotic Membranes-A Futuristic Trend in Periodontal Regeneration. *Journal of Contemporary Issues in Business and Government/ Vol*, 26(2), 1911.
- Khalil, N. M., & Melek, L. N. F. (2018). Histologic and histomorphometric evaluation of lyophilized amniotic membrane in bone healing: An experimental study in rabbit's femur. *Future Dental Journal*, 4(2), 205-210.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-14.
- Kumar, A., Chandra, R. V., Reddy, A. A., Reddy, B. H., Reddy, C., & Naveen, A. (2015). Evaluation of clinical, antiinflammatory and antiinfective properties of amniotic membrane used for guided tissue regeneration: A randomized controlled trial. *Dental Research Journal*, 12(2), 127.
- Lafzi, A., Farahani, R. M. Z., Shoja, M. M., & Tubbs, R. S. (2007). Amniotic membrane: A potential candidate for periodontal guided tissue regeneration?. *Medical hypotheses*, 69(2).
- Leal-Marín, S., Kern, T., Hofmann, N., Pogozhykh, O., Framme, C., Börgel, M., ... & Gryshkov, O. (2021). Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(8), 1198-1215.

- Liu, J., Ruan, J., Weir, M. D., Ren, K., Schneider, A., Wang, P., ... & Xu, H. H. (2019). Periodontal bone-ligament-cementum regeneration via scaffolds and stem cells. *Cells*, 8(6), 537.
- Mamede, K. M., & SANT'ANNA, L. B. (2019). Antifibrotic effects of total or partial application of amniotic membrane in hepatic fibrosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.
- Moraes, J. T. G., Costa, M. M., Alves, P. C. S., & Sant'Anna, L. B. (2021). Effects of Preservation Methods in the Composition of the Placental and Reflected Regions of the Human Amniotic Membrane. *Cells Tissues Organs*, 210(1), 66-76.
- Nicodemo, M. D. C., Neves, L. R. D., Aguiar, J. C., Brito, F. D. S., Ferreira, I., Sant'Anna, L. B., ... & Arisawa, E. A. L. S. (2017). Amniotic membrane as an option for treatment of acute Achilles tendon injury in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 32, 125-139.
- Ntege, E. H., Sunami, H., & Shimizu, Y. (2020). Advances in regenerative therapy: a review of the literature and future directions. *Regenerative therapy*, 14, 136-153.
- Núñez, J., Vignoletti, F., Caffesse, R. G., & Sanz, M. (2019). Cellular therapy in periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 79(1), 107-116.
- Oliveira, L. F., Salvador, S. L., Silva, P. H., Furlaneto, F. A., Figueiredo, L., Casarin, R., ... & Messoria, M. R. (2017). Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* probiotic in experimental periodontitis. *Journal of periodontology*, 88(2), 197-208.
- Pereira, S. S., Araujo, G. F., de Queiroz, L. N., Câmara, P. R., Pascoal, V. D., Azevedo, R. S., & Robbs, B. K. (2019). An alternative, easy and reproducible method of stabilization and ligature-induced periodontitis in mouse. *MethodsX*, 6, 2156-2165.
- Perepelkin, N. M., Hayward, K., Mokoena, T., Bentley, M. J., Ross-Rodriguez, L. U., Marquez-Curtis, L., ... & Elliott, J. A. (2016). Cryopreserved amniotic membrane as transplant allograft: viability and post-transplant outcome. *Cell and tissue banking*, 17(1), 39-50.
- Park, J. Y., Jeon, S. H., & Choung, P. H. (2011). Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. *Cell transplantation*, 20(2), 271-286.
- Payne, J. B., Golub, L. M., Thiele, G. M., & Mikuls, T. R. (2015). The link between periodontitis and rheumatoid arthritis: a periodontist's perspective. *Current oral health reports*, 2(1), 20-29.
- Reilly, D. A., Hickey, S., Glat, P., Lineaweaver, W. C., & Goverman, J. (2017). Clinical experience: using dehydrated human amnion/chorion membrane allografts for acute and reconstructive burn care. *Annals of plastic surgery*, 78(2), S19-S26.
- Rinastiti, M., Santoso, A. L. S., & Sosroseno, W. (2006). Histological evaluation of rabbit gingival wound healing transplanted with human amniotic membrane. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 35(3), 247-251.
- Sali, D. D., & Pauline George, J. (2016). Demineralized freeze dried bone allograft with amniotic membrane in the treatment of periodontal intrabony defects-12 month randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontology*, (0), 1-18.
- Sant'Anna, L. B., Cargnoni, A., Ressel, L., Vanosi, G., & Parolini, O. (2011). Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. *Cell transplantation*, 20(3), 441-453.
- Sant'Anna, L. B., Hage, R., Cardoso, M. A. G., Arisawa, E. A., Cruz, M. M., Parolini, O., ... & Sant'Anna, N. (2016). Antifibrotic effects of human amniotic membrane transplantation in established biliary fibrosis induced in rats. *Cell transplantation*, 25(12), 2245-2257.
- Sant'Anna, L. B., Brito, F. S., Barja, P. R., & Nicodemo, M. C. (2017). Long-term effects of human amniotic membrane in a rat model of biliary fibrosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50.
- Shetty, S. S., Chatterjee, A., & Bose, S. (2014). Bilateral multiple recession coverage with platelet-rich fibrin in comparison with amniotic membrane. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 18(1), 102.
- Teixeira, R. J. M., da Silva Alves, A. P., da Silva, R. M., de Azevedo Carnevari, R., & Sant'Anna, L. B. (2020). A atuação da membrana amniótica na expressão dos genes *cd206* e *il-12b* na fibrose hepática biliar. *Revista Univap*, 26(50), 47-63.
- Tsuno, H., Arai, N., Sakai, C., Okabe, M., Koike, C., Yoshida, T., ... & Noguchi, M. (2014). Intraoral application of hyperdry amniotic membrane to surgically exposed bone surface. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 117(2), e83-e87.
- Velez, I., Parker, W. B., Siegel, M. A., & Hernandez, M. (2010). Cryopreserved amniotic membrane for modulation of periodontal soft tissue healing: a pilot study. *Journal of periodontology*, 81(12), 1797-1804.
- Venkatesan, N., Lavu, V., & Balaji, S. K. (2021). Clinical efficacy of amniotic membrane with biphasic calcium phosphate in guided tissue regeneration of intrabony defects-a randomized controlled clinical trial. *Biomaterials Research*, 25(1), 1-9.
- Wu, P. H., Chung, H. Y., Wang, J. H., Shih, J. C., Kuo, M. Y. P., Chang, P. C., ... & Chang, C. C. (2016). 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*, 115(3), 186-194.
- Yamada, S., Shanbhag, S., & Mustafa, K. (2022). Scaffolds in Periodontal Regenerative Treatment. *Dental Clinics*, 66(1), 111-130.