

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/09/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

STÉFANI CAROLINE FERRIOLLI

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOPROMOTORA DE
MEMBRANAS NACIONAIS DE PERICÁRDIO BOVINO NO
PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

**Araçatuba
2023**

STÉFANI CAROLINE FERRIOLLI

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOPROMOTORA DE
MEMBRANAS NACIONAIS DE PERICÁRDIO BOVINO NO
PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – UNESP”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração em Implantodontia.

Orientadora: Profa. Assoc. Ana Paula Farnezi Bassi

**Araçatuba
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F393c Ferriolli, Stéfani Caroline.
Comparação da atividade osteopromotora de membranas nacionais de pericárdio bovino no processo de regeneração óssea guiada / Stéfani Caroline Ferriolli. - Araçatuba, 2023
84 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Ana Paula Farnezi Bassi

1. Regeneração óssea 2. Materiais biocompatíveis
3. Osso e ossos 4. Membranas I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser fundamental em minha vida, meu guia, sempre presente na hora de angústia e alegria. Aos meus pais Simone Ferriolli e Júlio César Ferriolli, com todo amor, admiração e gratidão pelo incansável apoio ao longo de toda minha jornada e por fazerem sempre de tudo para que esse sonho fosse possível. Vocês são (e sempre serão) meus maiores e melhores exemplos. Amo muito vocês, infinitamente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, meu melhor amigo e refúgio nas horas mais difíceis. Quem sonhou comigo cada parte dessa trajetória de uma forma única, confiou em mim para trilhá-lo e me ajudou em cada momento, até mesmo quando nem eu achei que seria capaz. Eu não tenho palavras para agradecer a Sua Misericórdia e Seu Amor para comigo. Mesmo que eu não mereça, sempre está ali me amando, me guiando e me permitindo viver sua infinita misericórdia, todos os dias.

Aos meus pais, a quem dedico todo meu esforço e trajetória até aqui, meus maiores exemplos de determinação. Obrigada por todo amor, paciência, apoio e educação. Por toda a compreensão nos momentos em que estive ausente para tornar esse sonho real. Pelos ensinamentos desde o início de minha vida, construindo a pessoa que sou hoje, espero um dia retribuir tudo que me foi oferecido. Minha mãe, Simone de Paula Ferriolli, por toda insistência e cuidado comigo sempre e por ter confiado em mim. Meu Pai, Júlio César Ferriolli, por todos os conselhos, por sempre incentivar e apoiar cada decisão em minha vida e por todo apoio de vocês nessa jornada. A minha irmã e também pesquisadora Dra. Évelin Ferriolli, minha parceira de profissão, muito obrigada por todo apoio, incentivo, pelo amor a nossa família e por se fazer presente mesmo de longe.

As Minhas amigas; Mirela Caroline Silva, Ana Maira Pereira Baggio, Fernanda Camillo, Beatryce Sanchez, Ana Carolina Ribeiro, Camila Carneiro, por estarem sempre ao meu lado, em especial a Lorena Macedo e minha companheira de casa Isadora Delfraro que sempre me apoiaram e ajudaram nas horas mais difíceis. Ao meu amigo Murilo de Carvalho, por ser como um irmão, sempre disposto a ajudar e a me ouvir. Meu sincero obrigada a todos vocês, por fazerem parte de tudo isso de uma forma mais do que especial, por todo auxílio, carinho e amizade desde o primeiro até o último dia. Nunca irei me esquecer dos momentos compartilhados.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Glauco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem, pela oportunidade de ser discente de uma instituição tão reconhecida e por onde já passaram grandes nomes da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia.

Ao nosso grupo de pesquisa e todos que contribuem para que nossos projetos aconteçam, em especial ao Doutorando Vinícius Ferreira Bizelli, por todos os ensinamentos durante esses anos, desde os processos laboratoriais às cirurgias de implante, sempre com muita calma e maestria, foi uma honra enorme aprender com você. A Edith Umasi Ramos, Izabela Delamura e aos alunos de iniciação científica Bruna S da Costa e Silva, Arthur Viotto, Júlia M. B. da Silva, Natália Izumi e Natália Matos, obrigada por todo carinho e ajuda.

A minha orientadora Professora. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, por ter me acolhido em suas pesquisas e projetos de extensão, por toda atenção e paciência comigo, pelos ensinamentos e carinho durante toda minha caminhada nesta instituição, desde a época da graduação e principalmente por me ajudar a crescer pessoalmente. Com certeza encerro esse ciclo uma pessoa muito melhor graças a senhora.

A todos os professores do departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP), que contribuíram para essa formação. Em especial ao professor Dr. Leonardo Perez Faverani pelo convívio descontraído, pela amizade e por poder aprender com o senhor diariamente. A professora Dra. Daniela Ponzoni por todo conhecimento e experiências compartilhados, carinho e disposição sempre que precisei. Os senhores são exemplos de educadores.

A professora e querida Elcia Maria Varize Silveira por aceitar compor a banca examinadora e ter disponibilizado esse tempo para se fazer presente nesse momento tão importante. A senhora é um exemplo de professora, profissional e pesquisadora.

Aos meus amigos da pós graduação, em especial ao João Matheus Fonseca e Santos, Stefany Barbosa, Paulo Matheus Honda, Izabella Sol, Harrison Lucho,

Monique Gonçalves e Natália Sanches, sempre compartilhando experiências, conhecimentos no ambulatório e no dia a dia acadêmico com certeza contribuíram para que tudo isso fosse mais alegre, compartilhando experiências, conhecimentos e dividindo

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada, agradeço pela paciência, pelos avisos e e-mails. Vocês são peças fundamentais desta engrenagem. Muito obrigado.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia Paulo, Marco e Renato, por todos ensinamentos, ajuda e conversas sobre todos os assuntos extra faculdade.

Aos animais, in memoriam, que sacrificaram suas vidas em prol da ciência.

A todos que contribuíram de alguma forma com esse título!

“O sucesso é a soma de pequenos
esforços repetidos dia após dia”

Robert Collier

FERRIOLLI, S. C. **Comparação da atividade osteopromotora de membranas nacionais de pericárdio bovino no processo de regeneração óssea guiada.** 2023. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O êxito de membranas absorvíveis já é descrito na literatura, porém, sua vulnerabilidade à degradação do colágeno e a estabilidade dimensional reduzida ainda são fatores deliberativos em pesquisas científicas [1-2] tornando pertinente a busca por materiais capazes de suprir essas limitações, bem como também cumprir as exigências para adequada reconstrução físico biológica dos defeitos ósseos. Nesse contexto, as membranas colágenas de pericárdio bovino têm como premissa retardar esse prejuízo e aumentar a resistência mecânica [3-4]. O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial osteopromotor das membranas nacionais de pericárdio bovino recentemente inseridas no mercado, em comparação com a membrana de derme suína amplamente utilizada Bio-Gide® (Geistlich Wohlen, Suíça) implantando-as em defeitos críticos criados em calvária de ratos. Foram utilizados 96 ratos Albinus Wistar divididos em 4 grupos, n=: grupo (GC-) controle negativo somente com coágulo; grupo (GT1) que recebeu a membrana de pericárdio bovino (Surgitime Collagen® - Bioinnovation); grupo (GT2): membrana de pericárdio bovino (Techgraft - Baumer®); e grupo controle positivo (GT+): membrana de derme porcina (Bio-Gide®). Cada grupo foi dividido em 04 subgrupos, de acordo com os tempos de eutanásia: 7, 15, 30 e 60 dias. Após a eutanásia, as peças foram processadas e os trâmites laboratoriais realizados para avaliação das análises histomorfométrica, perfil inflamatório e microtomográfica. Os resultados quantitativos e qualitativos obtidos demonstram que as membranas de pericárdio bovino tiveram bom comportamento biológico, promoveram neoformação óssea, e auxiliaram no processo de regeneração óssea guiada, apresentando comportamento biológico semelhante a membrana de derme suína e superior ao grupo controle negativo, fazendo das membranas nacionais Surgitime Collagen® e Techgraft uma alternativa pertinente a membrana de derme suína Bio-Gide® amplamente utilizada nos processos de regeneração óssea guiada.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Materiais biocompatíveis. Osso e ossos Membranas I. T.

FERRIOLLI, S. C. **Comparison of osteopromoting activity of bovine pericardium national membranes in the guided bone regeneration process.** 2023. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The success of absorbable membranes is already described in the literature, however, their vulnerability to collagen degradation and reduced dimensional stability are still deliberative factors in scientific research [1,2] making relevant the search for materials capable of meeting these limitations, as well as meeting the requirements for adequate biological physical reconstruction of bone defects. In this context, bovine pericardium collagen membranes have the premise of delaying this injury and increasing mechanical resistance [3,4]. The objective of this work is to evaluate the osteopromoter potential of bovine pericardium reticulated national membranes recently inserted on the market, in comparison with a widely used non-reticulated pig collagen membrane, Bio-Gide® (Geistlich Wohlhusen, Switzerland) implanting them in critical defects created in rat calvary. Ninety-six Albinus Wistar rats were divided into 4 groups, n=6: group (GC-) negative control only with clot; group (GT1) that received bovine pericardium membrane (Surgitime Collagen® - Bioinnovation); group (GT2): bovine pericardium membrane (Techgraft - Baumer®); and positive control group (GT+): porcine dermis membrane (Bio-Gide®). Each group was divided into 04 subgroups, according to euthanasia times: 7, 15, 30 and 60 days. After euthanasia, the parts were processed and laboratory procedures performed to evaluate histomorphometric, inflammatory profile and microtomographic analyses. The quantitative and qualitative results obtained demonstrate that bovine pericardium membranes had good biological behavior, promoted bone neoformation, and assisted in the guided bone regeneration process, presenting behavior similar to the swine dermis membrane and superior to the control group, making the national membranes Surgitime Collagen® and Techgraft a relevant alternative to bio-gide swine dermis membrane® widely used in guided bone regeneration processes.

Keywords: Regeneração óssea. Materiais biocompatíveis. Osso e ossos Membranas I. T.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros quantitativos do tecido ósseo trabecular obtidos pelo CTAn (Bruker microCT, Kontich, Bélgica) adaptados daqueles preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR).	35
Tabela 2 – Análise por micro-CT após 60 dias.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura1 - Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representada pela linha tracejada vermelha.	26
Figura 2 - (A) Defeito crítico de 8mm tido como padrão em todos os grupos. Preenchidos com coágulo sanguíneo e recobertos com a membrana referente a cada grupo: (B) GT1: Surgitime Collagen®; (C) GT2: Techgraft®; (D) GC+: BioGide® e (E) GC-: apenas coágulo	27
Figura 3 - Software ImageJ utilizado para contagem de células e vasos sanguíneos. Grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica em um aumento da objetiva de 100x.	30
Figura 4 - Software ImageJ utilizado para calibragem da ferramenta régua na magnificação de escolha para ser realizada a histometria e a seguir a contagem da área óssea através da ferramenta polígono.	41
Figura 5 - Representação do uso do Software NRecon (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), utilizado para a reconstrução 3D das aquisições realizadas no Microtomógrafo. Na imagem as linhas vermelhas delimitam a área a ser reconstruída e a linha verde indica o centro da região de interesse.	32
Figura 6 - Ilustração do uso do software DataViewer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), para a determinação do VOI. Após delimitado em uma imagem, o VOI é reproduzido igualmente para todas as outras imagens.	33
Figura 7 - Representação do ROI utilizando o software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Após a delimitação das camadas a serem analisadas, a forma retângula do ROI é escolhida e adaptada para o tamanho da amostra.	34
Figura 8 - Representação da escala de cinza utilizada (132-45) no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para indicar a diferença entre osso cortical e trabecular.	34
Figura 9 - Conversão das camadas escolhidas para a escala de cinza no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para o cálculo dos parâmetros tridimensionais em mm.	35
Figura 10 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos GT1, GT2, GC+ e GC- em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 4x.	37

Figura 11 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A- Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) e tecido ósseo neoformado (NO) e membrana colabada (círculo azul); B e D: presença de tecido conjuntivo denso (CD) próximo às bordas do defeito ósseo; C: no centro do defeito presença da membrana (M) entremeada de tecido conjuntivo frouxo (CF) e tecido ósseo neoformado (NO).

38

Figura 12 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x Coloração HE. A - Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) e tecido ósseo neoformado (NO); B e D: presença de tecido conjuntivo denso (CD) próximo às bordas do defeito ósseo, com ilhas de neoformação óssea (INO); C: no centro do defeito presença da membrana (M), tecido conjuntivo denso, tecido conjuntivo fibroso e tecido ósseo neoformado (NO).

39

Figura 13 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. Maior aumento grupo (GT1) 15 dias (100x). A: Área de coto apresentando neoformação óssea trabecular e abaixo uma matriz óssea lamelar (seta roxa), com trabéculas (seta azul escuro) preenchidas de tecido frouxo (seta azul claro). A.1: tecido fibroso (seta azul clara); B: Centro com presença da membrana, tecido conjuntivo e abaixo, osso lamelar (seta roxa). B.1 vasos sanguíneos (seta vermelha) e infiltrado inflamatório mononuclear (seta amarela).; C: trabéculas de tecido ósseo lamelar (seta roxa), delimitando cavidades preenchidas por medula óssea (seta preta) e tecido fibroso (seta azul clara). C.1: Matriz óssea neoformada (seta azul escuro).

40

Figura 14 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo SC aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A- Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea total (NO); B e D tecido ósseo maduro (OM) às margens do defeito com presença ainda de tecido conjuntivo denso. C: ao centro defeito, uma camada de osso maduro na superfície, ao meio matriz óssea neoformada trabecular, entremeado por tecido conjuntivo denso e fragmentos da membrana (M).

41

Figura 15 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: Área de coto apresentando maturação óssea (seta roxa), cavidades preenchidas por medula óssea (seta preta); A.1: osteoblasto (seta azul claro), osteócito (seta marrom). B: Centro com presença de neoformação trabecular (seta azul escuro), B.1: vasos sanguíneos (seta vermelha); C: Maturação do tecido ósseo, C.1: mineralização dos osteóides, confinados dentro das lacunas (seta azul claro); osteoblastos (seta verde), Osteócitos (seta marrom).

42

Figura 16 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 10x, coloração HE. A: Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea total (NO); B, C e D: neoformação óssea (NO) em praticamente todo o defeito, maturação do tecido ósseo em alguns pontos (OM) e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD) em lacunas de neoformação (MON).

43

Figura 17 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo 2T1 aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: Área de coto apresentando osso maduro (seta roxa); A.1: osteócito (seta marrom), canal de Havers (seta cinza). B: Centro fechado quase completamente, com maturação do tecido conjuntivo denso. B.1: mineralização dos osteóides em osteócitos (seta azul claro), osteócito (seta marrom), canal de Havers (seta cinza); C: Tecido ósseo maduro (seta roxa) C.1: cavidades preenchidas por medula óssea (seta preta) apresentando vascularização (seta vermelha), Osteócitos (seta marrom).

44

Figura 18 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com presença de tecido conjuntivo frouxo (CF) e ausência de neoformação óssea; B e D: Cotos com início de neoformação óssea (NO) e maturação do tecido conjuntivo apresentando-se ora denso (CD) ora fibroso (CF), C: ao centro vista da membrana colabada e abaixo tecido conjuntivo frouxo.

45

Figura 19 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: estroma fibroso preenchido por tecido conjuntivo frouxo, células mononucleares (seta azul claro), lacunas preenchidas por medula (seta preta), maturação do tecido ósseo (seta azul escuro). B: tecido conjuntivo frouxo pouco organizado (seta branca). C: neoformação óssea em área de coto e maturação do tecido fibroso (seta branca).

46

Figura 20 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 10 e 40x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e membrana colabada; C e D: Margens com início de neoformação óssea e mineralização do tecido; B presença de tecido conjuntivo frouxo, iniciando o processo de formação óssea; B e D: Margens com início de neoformação óssea.

47

Figura 21 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: Neoformação óssea trabecular entremeada por tecido fibroso (seta branca), A.1 vaso sanguíneo (seta vermelha), estroma fibroso nos espaços trabecular (seta azul clara). B: membrana presente e abaixo dela a maturação do tecido conjuntivo. B.1: osteócito (seta verde), osteoclasto (seta amarela), vasos sanguíneos (seta vermelha). C: neoformação óssea em área de coto e maturação do tecido fibroso em tecido ósseo (seta roxa), osteócito (seta verde).

48

Figura 22 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 10 e 40x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e remanescente da membrana; C e D: Margens com osso maduro, ilhas de neoformação e trabéculas preenchidas por medula; B ao centro presença de tecido conjuntivo denso e fechamento do defeito.

49

Figura 23 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: grande quantidade de osso maduro, A.1 osteoblasto depositando matriz óssea (seta salmão), periósteo (seta branca). B: Tecido conjuntivo envolvendo restos da membrana, trabéculas ósseas (seta azul escuro), estroma fibroso (seta azul claro). B.1: vaso sanguíneo (seta vermelha).

50

C: trabéculas de tecido ósseo lamelar, delimitando cavidades preenchidas (seta preta), osteoclasto (seta amarela), osteócito (seta verde).

Figura 24 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo TG2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea por todo defeito (NO); B e D tecido ósseo maduro (OM) às margens do defeito apresentando ainda de tecido conjuntivo denso (CD); C: ao centro neoformação óssea entremeado por tecido conjuntivo denso, presença de perióstio (seta amarela).

51

Figura 25 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: grande quantidade de osso maduro, diminuição das trabéculas, A.1 osteoclasto (seta amarela), tecido conjuntivo fibroso (seta branca). B: Tecido conjuntivo fibroso na base do defeito, entremeado por um tecido conjuntivo fibroso bem organizado (seta branca) B.1: vaso sanguíneo (seta vermelha). C: osteoclasto (seta amarela), osteócito (seta verde).

52

Figura 26 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo (M) e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CF); B e D: início de formação óssea às margens do defeito (NO), tecido conjuntivo denso (CD); C) diferença nos tecidos abaixo da membrana (M), tecido conjuntivo frouxo e neoformação óssea (NO) entremeada por um conjuntivo denso (CD).

53

Figura 27 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: neoformação óssea nos cotos (seta roxa), maturação do tecido de granulação celularizado (seta amarela), espaços preenchidos por medula hematopoiética (seta preta) A.1 tecido celularizado (seta amarela). B: Membrana íntegra (M), tecido celularizado (seta amarela). B.1: tecido celularizado apresentando células e vasos sanguíneos. C trabéculas ósseas neoformadas (seta roxa), B.1 espaços trabeculares preenchidos de tecido conjuntivo frouxo

54

organizado (seta amarela), osteoblastos depositando matriz óssea (seta salmão) e osteócitos (seta verde).

Figura 28 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo (M) e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CF); B e C: Maturação do tecido ósseo as margens do defeito (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso.

55

Figura 29 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A, C: neoformação óssea nos cotos (seta roxa), maturação do tecido ósseo primário, fibras colágenas dispostas em várias direções. A.1 e B.1: células mononucleares (seta amarela) e vasos sanguíneos (seta vermelha) nas fibras colágenas. C.1 transição do osso primário em osso lamelar trabecular (seta roxa), trabéculas ósseas apresentando espaços de medula hematopoiética (seta preta).

56

Figura 30 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 40x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro e restos da membrana; B e D: Maturação do tecido ósseo às margens do defeito (MON), diminuição das trabéculas e presença ainda de tecido conjuntivo denso. C: presença de remanescentes da membrana envolta por tecido conjuntivo fibroso organizado (CF) e osso neoformado. Acima, presença de perióstio (seta amarela).

57

Figura 31 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A.1 e B1: confluência de pontes ou traves de tecido ósseo preenchidos por células mesenquimais, osteoprogenitoras e vasos sanguíneos (seta preta). B: transição do tecido primário em secundário, com as fibras colágenas mais organizadas (seta azul). C: fase de maturação do tecido primário. (seta azul) células mesenquimatosas se transformando em grupos de osteoblastos (seta marrom).

58

Figura 32 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B e D: Maturação do tecido ósseo as margens do defeito apresentado ilhas de neoformação (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso. C: defeito fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro, com restos da membrana de colágeno porcino ao centro e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CD).

59

Figura 33 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: grande quantidade de tecido ósseo lamelar nos cotos (seta roxa). A.1 e B1: confluência de pontes ou traves de tecido ósseo recém-formadas no centro da ossificação, mantendo espaços entre si preenchidos células e vasos sanguíneos (seta preta). B: centro apresentando osso maturado nas extremidades, com fechamento quase total do defeito e ao meio, a transição do tecido primário em tecido secundário. fibras colágenas organizadas (seta azul). C: fase de maturação do tecido primário. (seta azul), grupos de osteoblastos sintetizado uma matriz ainda não mineralizada (seta marrom).

60

Figura 34 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4x coloração HE. – A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). Defeito preenchido por tecido de granulação (TG). Início de neoformação óssea próximo aos cotos (NO).

61

Figura 35 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 40x coloração HE. A – visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B, D: Cotos apresentando neoformação óssea e presença de tecido conjuntivo denso; C: Defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo na superfície e denso na parte mais profunda, com início de maturação ao centro.

62

Figura 36 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 40x coloração HE. A – Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B, D: Cotos apresentando neoformação óssea com espaços preenchidos por células

63

mesenquimais, células osteoprogenitoras e vasos sanguíneos (seta preta); C: Defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo e denso.

Figura 37 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 40x coloração HE. A – Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B, D: Cotos apresentando neoformação óssea (seta azul) entremeado por tecido conjuntivo fibroso (seta amarela); C: Ausência de tecido ósseo neoformado e presença de tecido conjuntivo fibroso (seta amarela).

64

Figura 38 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter-grupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos) no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas significantes inter grupos para o período de 15 dias, o * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias.

65

Figura 39 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise da quantidade de vasos sanguíneos no período de 7 e 15 dias, sem diferença estatística significativa para nenhum dos períodos e grupos avaliados.

66

Figura 40 - Gráfico de comparativo intergrupos das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (GC+, GT2, GT1 e GC-) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. (a) minúsculo representa a diferença estatística entre os grupos (GC+) e (GT2) no período de 30 dias; (A) maiúsculo representa a diferença entre os grupos (GC+) e (GT2) no período de 60 dias e (*) representa que houve diferença estatística entre os grupos (GC+), (GT2) e (GT1) para o grupo coágulo em todos os períodos.

67

Figura 41 - Gráfico de comparativo intragrupos das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (GC+, GT2, GT1 e GC-) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. Letras minúsculas representam diferença estatística intragrupos para os períodos de 15 a 30 dias; letras maiúsculas representam diferença estatística intragrupos entre os períodos 15 a 30 e 30 a 60; (*) representa diferença estatística para os períodos 7,15 e 30 dias em relação ao período de 60 dias.

68

Figura 42 - Gráficos de análise dos parâmetros (BV), (BV/TV), (Po.tot), (Tb.th), (Tb.Sp), Tb.N) dos grupos (GC+), (GT2), (GT1) e (GC-) após microtomografia computadorizada (micro-CT) no período de 60 dias.

LISTA DE SIGLAS

AON	Área de osso neoformado
ANOVA	Análise de variância
BV	Volume ósseo
BV-TV	Porcentagem de volume ósseo
CD	Tecido conjuntivo denso
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
GC+	Grupo coágulo positivo
GC-	Grupo coágulo negativo
GT1	Grupo teste 1
GT2	Grupo teste 2
HE	Hematoxilina e Eosina
INO	Ilhas de neoformação óssea
JPEG	Joint Photographics Experts Group (formato do arquivo)
LTDA	Sociedade de responsabilidade limitada
M	Membrana
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
MON	Matriz óssea neoformada
NO	Osso neoformado
PVPI	Iodopovidona
ROG	Regeneração óssea guiada
ROI	Região de interesse
TC	Tecido conjuntivo frouxo
TCF	Tecido conjuntivo fibroso
UNESP	Universidade estadual Paulista

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Procedimento cirúrgico	25
3.2 Eutanásia e coleta do material	28
3.3 Análise dos resultados	28
4 RESULTADOS	36
4.1 Análise Histológica	36
<i>Análise Histológica qualitativa</i>	36
4.2 Análise Histométrica	64
<i>Análise de perfil inflamatório – Células e Vasos sanguíneos</i>	64
<i>Análise da área de osso neoformado (AON)</i>	66
4.3 Análise Microtomográfica	69
<i>Microtomografia computadorizada (MicroCT)</i>	69
5 DISCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

O mecanismo biológico da regeneração óssea guiada, baseia-se no conceito da osteopromoção, isto é, o uso de meios físicos que promovem o selamento de um local anatômico, prevenindo que outros tecidos, principalmente o tecido conjuntivo invadam a região uma vez que sua formação é mais rápida que a do tecido ósseo, interferindo diretamente na osteogênese [1-4]. Com isso, há a criação e manutenção de um espaço onde células osteogênicas derivadas do osso hospedeiro possam ocupar, se proliferar e subsequentemente, melhorar a regeneração óssea, além de auxiliar no seu direcionamento [5,6].

Os meios físicos mais utilizados para promover este selamento regional são as membranas biológicas, cujo os objetivos são a criação e manutenção volumétrica desse espaço, bem como de uma geometria adequada [7-9]. A membrana deve, portanto, suportar seu peso e resistir à pressão dos tecidos adjacentes além de forças externas. Deve ter rigidez suficiente (memória), para criar e manter um espaço favorável, e adaptar-se ao contorno ósseo, permitindo que retorne à sua forma. Portanto, quanto melhor a adaptação da membrana, mais completa será a regeneração [4,10].

As membranas absorvíveis oriundas de colágeno são comumente utilizadas devido a boas propriedades e biocompatibilidades integrativas, serem semipermeáveis, o que facilita a transferência dos elementos nutritivos, tendo como principal vantagem a não necessidade de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção, além de apresentarem menos complicações na linha de incisão, em casos de deiscência de suturas [11-13].

Nesse contexto, cabe ressaltar que as membranas colágenas possuem em sua composição moléculas compostas por aminoácidos (glicinas, prolinas, hidroxiprolinas e hidroxilisinas), que definem as características de pouca extensibilidade, alta resistência, fibroorientação, controle da adição e liberação de substâncias, baixa antigenicidade e estimulação da coagulação sanguínea [14,15]. Podem ter origem bovina, suína ou equina; constituídas por colágeno tipo I, tipo III ou ambos; provenientes das regiões de pericárdio, derme, tendão, ou fáscia temporal de animais [16,17].

Estas podem ser de única ou dupla camada, compostas por ligações colágenas reticuladas (cross-linked) ou não reticuladas (não cross-linked) que necessitam de adaptação subepitelial e estabilidade [17]. Apesar de seus bons resultados no processo de ROG, ainda possuem como maior desvantagem, uma estabilidade dimensional reduzida, e como tentativa de melhorar esta propriedade, algumas empresas estão investindo em membranas com ligações cruzadas (cross-linked), como as provenientes de pericárdio bovino [18,19].

O pericárdio bovino é um material homogêneo, bioinerte e osteopromotor, que não precisa ser removido devido sua biorreabsorção, provoca reação inflamatória leve e por tempo limitado, promovendo a formação de uma fina cápsula conjuntiva e algumas áreas de calcificação. Utilizado com sucesso há cerca de três décadas em diversas áreas da medicina, principalmente na cardiologia, devido à alta resistência e fácil aquisição, com o objetivo de regeneração tecidual [20].

Baseado nas características promissoras do pericárdio bovino, novas membranas reabsorvíveis a base desse material como a Techgraft® (Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo) e a Surgitime Cocllagen® (Bioinnovation Produtos Biomédicos Ltda, Bauru, São Paulo) compostas majoritariamente de colágeno tipo I foram recentemente desenvolvidas com o intuito de promover desempenho maior ou semelhante ao de membranas pré existentes oriundas de outras fontes colagenosas como a líder de mercado Bio-Gide® (Geistlich), uma das matrizes mais utilizadas e documentadas, derivada de derme suína e não reticulada [15,21], na atividade osteopromotora da ROG.

Sabendo-se que ainda há poucos trabalhos sobre esses novos materiais e entendendo a importância dos trabalhos pré-clínicos para que biomateriais possam ser validados, este projeto foi então elaborado para ser mais uma fonte de análise importante para fomentar o possível uso dessas membranas nos processos de regeneração óssea guiada.

6 CONCLUSÃO

Dentro da metodologia empregada foi possível concluir que as membranas nacionais de pericárdio bovino Surgitime Collagen® e Techgraft® estudadas nesta pesquisa promoveram desempenho semelhante a membrana de derme suína, no processo de regeneração óssea guiada em defeitos críticos de calotas de ratos podendo atuar como alternativa a membrana BioGide®.

REFERÊNCIAS

- 1 Baek YJ, Kim JH, Song JM, Yoon SY, Kim HS, Shin SH. Chitin-fibroin-hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration: micro-computed tomography evaluation in a rat model. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2016;38(1):14. doi: 10.1186/s40902-016-0060-6.
- 2 Chandra RV, Sneha K, Reddy AA. Non-cross-linked versus cross-linked collagen membrane in maxillary sinus perforation repair: a comparative histologic study in a rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020;35(1):91–9. doi: 10.11607/jomi.7600.
- 3 Ottenbacher N, Alkildani S, Korzinskas T, Pissarek J, Ulm C, Jung O, Sundag B, Bellmann O, Stojanovic S, Najman S, Zechner W, Barbeck M. Novel histomorphometrical approach to evaluate the integration pattern and functionality of barrier membranes. *Dent J*. 2021;9(11):127. doi: 10.3390/dj9110127.
- 4 Danieleto-Zanna CF, Bizelli VF, Ramires GADA, Francatti TM, Carvalho PSP, Bassi APF. Osteopromotion capacity of bovine cortical membranes in critical defects of rat calvaria: histological and immunohistochemical analysis. *Int J Biomater*. 2020;2020:6426702. doi: 10.1155/2020/6426702.
- 5 Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1988;81(5):672-6. doi: 10.1097/00006534-198805000-00004.
- 6 Hämmerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol 2000*. 2003;33:36-53. doi: 10.1046/j.0906-6713.2003.03304.x.
- 7 Ayub LG, Novaes AB Jr, Grisi MFM, Taba M Jr, Palioto DB, Souza SLS. Regeneração óssea guiada e suas aplicações terapêuticas. *Periodontia*. 2011;(21(4):24-31.
- 8 Caballé-Serrano J, Munar-Frau A, Ortiz-Puigpelat O, Soto-Penaloza D, Peñarrocha M, Hernández-Alfaro F. On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. *J Clin Exp Dent*. 2018;10(5):e477-83. doi: 10.4317/jced.54767.
- 9 Acevedo RA, Trentin MS, Shibli JA, Marcantonio E Jr. Bases clínicas e biológicas da regeneração óssea guiada (ROG) associada a barreiras ou membranas. *Rev Bras Implantodontol Prótese Implant*. 2004;11(43):251-7.

- 10 Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 1990;1(1):22-32. doi: 10.1034/j.1600-0501.1990.010104.x.
- 11 Jiménez Garcia J, Berghezan S, Caramês JMM, Dard MM, Marques DNS. Effect of cross-linked vs non-cross-linked collagen membranes on bone: a systematic review. *J Periodontal Res.* 2017;52(6):955-64. doi: 10.1111/jre.12470.
- 12 Pilger AD, Schneider LE, Silva GM, Schneider KCC, Smidt R. Membranes and barriers for guided bone regeneration. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2020;19(3):441-8.
- 13 Buser D. Implant placement with simultaneous guided bone regeneration: selection of biomaterials and surgical principles. In: Buser D, editor. 20 years of guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Books; 2009. p. 123-52.
- 14 Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994;9(1):13-29.
- 15 Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(5):315-37. doi: 10.1111/eos.12364.
- 16 Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol.* 2001;72(2):215-29. doi: 10.1902/jop.2001.72.2.215.
- 17 Wang J, Qu Y, Chen C, Sun J, Pan H, Shao C, Tang R, Gu X. Fabrication of collagen membranes with different intrafibrillar mineralization degree as a potential use for GBR. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;104:109959. doi: 10.1016/j.msec.2019.109959.
- 18 Lee CR, Grodzinsky AJ, Spector M. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials.* 2001;22(23):3145-54. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00067-9.
- 19 Bet MR, Goissis G, Lacerda CA. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. *Biomacromolecules.* 2001;2(4):1074-9. doi: 10.1021/bm0001188

- 20 Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobbato L, Bressan E, Nastri L. Selection of collagen membranes for bone regeneration: a literature review. *Materials*. 2020;13(3):786. doi: 10.3390/ma13030786.
- 21 Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(4):443-9. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.01039.x.
- 22 Du Sert, N.P.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M.T.; Padeiro, M.; Browne, W.J.; Oliveira, A.; Cuthill, I.C.; Dirnagl, U.; Emerson, M.; et al. Relato de pesquisas com animais: Explicação e elaboração das diretrizes ARRIVE 2.0. *PLoS Biol*. 2020, 18, e3000411.
- 23 Vajgel, A.; Mardas, N.; Farias, A.C.; Petrie, A.; Cimões, R.; Dono, N. Uma revisão sistemática sobre o modelo de defeito de tamanho crítico. *Clin. Implante Oral. Res*. 2014, 25, 879–893.
- 24 Hassumi, J.S.; Mulinari-Santos, G.; Fabris, A.L.D.S.; Jacó, R.G.M.; Gonçalves, A.; Rossi, A.C.; Freire, A.R.; Faverani, L.P.; Okamoto, R. Cicatrização óssea alveolar em ratos: Micro-TC, análise imuno-histoquímica e molecular. *J. Appl. Oral Sci*. 2018, 26, e20170326.
- 25 Bassi, A.P.F.; Bizelli, V.F.; Francatti, T.M.; De Moraes-Ferrerira, A.C.R.; Pereira, J.C.; AlSharani, H.M.; Lucas, F.A.; Faverani, L.P. Bone Regeneration Assessment of Polycaprolactone Membrane on Critical-Size Defects in Rat Calvaria. *Membranes (Basel)*. Feb 2021, 11, 2, 124.
- 26 Farnezi Bassi AP, Bizelli VF, Brasil LFM, Pereira JC, Al-Sharani HM, Momesso GAC, Faverani LP, Lucas FA. Is the bacterial cellulose membrane feasible for osteopromotive property? *Membranes (Basel)*. 2020 Sep 12;10(9):230. doi: 10.3390/membranes10090230. PMID: 32932731; PMCID: PMC7558580.
- 27 de Freitas Silva, L.; de Carvalho Reis, E.N.R.; Bárbara, T.A.; Bonardi, J.P.; Garcia, I.R.; De Carvalho, P.S.P.; Ponzoni, D. Avaliação do reparo ósseo em defeito de tamanho crítico no calvário de ratos após o implante de fosfato tricálcico beta (β -TCP). *Acta Histochem*. 2017, 119, 624–631.

- 28 Messoria, M.R.; Nagata, M.J.H.; Dornelles, R.C.M.; Bomfim, S.R.M.; Fucini, S.E.; Garcia, V.G.; Bosco, A.F. Cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico tratados com plasma rico em plaquetas: Um estudo histológico e histométrico em calvária de ratos. *J. Res. Periodontal* 2008, p. 43, pp. 217–223.
- 29 Ramalho-Ferreira, G.; Faverani, L.P.; Momesso, G.A.C.; Luvizuto, E.R.; de Oliveira Puttini, I.; Okamoto, R. Efeito de drogas antirreabsortivas na cicatrização óssea alveolar. Estudo histométrico e imuno-histoquímico em ratos ovariectomizados. *Clin. Investigação Oral*. 2017, 21, 1485–1494.
- 30 Ramalho-Ferreira, G.; Faverani, L.P.; Grossi-Oliveira, G.A.; Okamoto, T.; Okamoto, R. Dinâmica óssea alveolar em ratos osteoporóticos tratados com raloxifeno ou alendronato: análise de microscopia confocal. *J. Biomed*. 2015, 20, 38003.
- 31 Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(23):2347-59. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00102-2.
- 32 Ortolani E, Quadrini F, Bellisario D, Santo L, Polimeni A, Santarsiero A. Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. *Ann Ist Super Sanita*. 2015;51(3):229-35. doi: 10.4415/ANN_15_03_11.
- 33 Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials*. 2005;26(31):6158-66. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.023.
- 34 Abou Neel EA, Bozec L, Knowles JC, Syed O, Mudera V, Day R, Hyun JK. Collagen--emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):429-56. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.010.
- 35 Cury DP, Dias FJ, Miglino MA, Watanabe IS. Structural and ultrastructural characteristics of bone-tendon junction of the calcaneal tendon of adult and elderly wistar rats. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153568. doi: 10.1371/journal.pone.0153568.
- 36 Ottenbacher N, Alkildani S, Korzinskas T, Pissarek J, Ulm C, Jung O, Sundag B, Bellmann O, Stojanovic S, Najman S, Zechner W, Barbeck M. Novel histomorphometrical approach to evaluate the integration pattern and functionality of barrier membranes. *Dent J*. 2021;9(11):127. doi: 10.3390/dj9110127.