

JÁREDE CARVALHO PEREIRA

**Avaliação do processo de reparo em defeitos de
calvária de ratos com membrana de celulose
bacteriana e membrana de colágeno porcino.
Análise histológica, histométrica e
imunoistoquímica**

Araçatuba – SP

2017

JÁREDE CARVALHO PEREIRA

**Avaliação do processo de reparo em defeitos de
calvária de ratos com membrana de celulose
bacteriana e membrana de colágeno porcino.
Análise histológica, histométrica e
imunoistoquímica**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia do Campus de Araçatuba –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do
Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA
(Área de concentração em Implantodontia)

Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia-Júnior

Araçatuba – SP

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P436a Pereira, Járede Carvalho.
Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de celulose bacteriana e membrana de colágeno porcino. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica / Járede Carvalho Pereira. - Araçatuba, 2017
41 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Biomateriais 2. Xenoenxertos 3. Celulose I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dedicatória

Ao meu querido amado Deus

Deus, eu sou muito grato por este presente maravilhoso que é a vida! Agradeço também pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho. Algumas delas me inspiram, me ajudam, me desafiam e me encorajam a ser cada dia melhor e conseguir meus objetivos.

Aos meus queridos pais Agda, João e Nestor,

À minha mãe, AGDA CARVALHO SILVA, pela compreensão, incentivos e apoio em todos os momentos. Ao meu pai JOÃO EVANGELISTA PEREIRA que me dá garra para alcançar meus ideais. Ao meu segundo pai NESTOR ANGELO D` ANDREA MENDES PELO pelo amor e pela torcida na minha trajetória profissional.

A minha querida Namorada Aline Beatriz,

Quero lhe agradecer Aline Beatriz Kottwitz, por suportar meus defeitos, tolerar meus humores e, principalmente, por me entender. Amo você!

A todos meus familiares e amigos,

A minha família, pelo grande apoio e compreensão durante este período. Aos amigos da pós-graduação, pela amizade e pela troca de experiência profissional que foram muito importantes na minha formação como Doutor, pela cooperação e convívio estes anos.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior,

Por todo seu empenho em me conduzir pelos caminhos da pesquisa, tornando possível a realização deste trabalho. Te agradeço pelo dia de hoje e por mais esta chance de aprender e de ser feliz! alegria e gratidão, hoje e sempre para você. Amém!

Ao Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho,

“Tudo que sonhei um dia encontrar está resumido em uma só palavra: você!”
Participou dos dois momentos felizes em minha vida o ingresso e na conclusão do meu doutorado

Ao Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani,

Não tenho palavras para agradecer todo a atenção e valiosa contribuição que você disponibilizou para me auxiliar na conclusão desta tese.

Ao Prof. Dr. Joel Ferreira Santiago Júnior

Obrigado pela sua excelente sugestões para que esse trabalho fosse concluído com sucesso.

A Prof^a. Dra. Pamela Leticia dos Santos

Obrigado pelas sugestões, foi primordial para esse trabalho.

A Prof^a. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi

Carinho vai, carinho vem; gosto muito de você professora. Agradeço por me ensinar todos os caminhos para tornar um doutor em implantodontia.

Ao Prof. Dr. André Luís da Silva Fabris

Agradeço a toda atenção que dedicou quando cheguei em Araçatuba.

Ao Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção

Educar verdadeiramente não é ensinar fatos novos ou enumerar fórmulas prontas, mas sim preparar a mente para pensar, obrigado eternamente.

A Prof^a. Dra. María del Pilar Rodríguez Sánchez

Uma grande Mãe, hoje quero parar e agradecer, porque você fez, faz e fará sempre parte da minha história. Obrigada por passar seu conhecimento.

Ao amigo Gustavo Antonio Corrêa Momesso

Grato pela atenção essenciais nesta trajetória

Ao amigo Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira

Sinceros agradecimentos por sempre está disposto em ajudar.

Ao amigo . João Paulo Bonardi

Pela grande contribuição.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP, nas pessoas seu Direto Prof. Tit. Wilson Roberto Poi e Vice-Diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa de seu Coordenador Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso e Vice-Coordenador Prof Adj. Celso Koogi Sonoda

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Odontologia área de Concetração Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Dr. Idelmo rangel garcia junior, Dr^a. Ana paula farnezi bassi, Dr^a. Daniela ponzoni, Dr. Francisley avila souza, Dr. Leonardo perez faverani, Dr^a. Mariza akemi matsumoto, Dr. Wirley gonçaves assunção, Dr. Eduardo pizza pellizer.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia área de Concetração Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Claudio hideo matsumoto, Ana Cláudia martins grieger manzatti, Denise haruyo nakamura maeda, Luís Cláudio sedlacek, Maria Cláudia de castro benez, Ana Paula rímoli de oliveira e Luzia anderlini.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Valéria de Queiroz M. Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada pela eficiência, simpatia e paciência.

As colegas que ingressaram comigo no curso de Doutorado em Odontologia área de Concetração Implantodontia, Ana Carulina rezende de moraes e Rodrigo dos santos pereira.

A todos os colegas do curso de Mestrado e Doutorado em Odontologia área de Concetração Implantodontia e Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela convivência agradável e amizade.

A todos os demais professores, funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, não citados e que contribuíram para minha trajetória. Minha Eterna Gratidão e muito Obrigado !!

Pereira, J.C. Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de celulose Bacteriana e membrana de colágeno porcino. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica. ARAÇATUBA: UNESP – Univ. Estadual Paulista. 2017

Este estudo objetivou avaliar a eficácia da membrana de celulose bacteriana (Nanoskin[®]) no reparo ósseo de defeitos críticos de 8mm em calota de ratos machos adultos quando comparada à membrana colágena Bio-Gide[®]. Foram utilizados 72 ratos machos adultos divididos em três grupos experimentais: grupo coágulo (GC), grupo Bio-Gide[®] (BG) e grupo chá verde (CV). Os períodos de estudo foram de 7, 14 30 e 60 dias após a criação do defeito cirúrgico e aposição da membrana. Foram realizadas a análise histológica, histométrica e imunoistoquímica. Foi possível observar que aos 30 e 60 dias de reparo, o grupo BG apresentou melhor preenchimento do defeito cirúrgico, com maior quantidade de tecido ósseo. Já o grupo CV apresentou preenchimento do defeito com grande quantidade de tecido conjuntivo maduro. Os dados obtidos na análise histométrica revelam que aos 30 e 60 dias a área de osso neoformado teve grande discrepância para o grupo BG em relação ao CV e GC (Teste de Tukey - $P < 0,001$). Por outro lado, os resultados referentes à análise por imunoistoquímica evidenciam marcações moderada e intensa para as proteínas osteocalcina (OC) e osteopontina (OP) tanto para o grupo BG quanto para o CV aos 60 dias de reparo. Pode-se concluir que apesar de a membrana de chá verde apresentar aspectos promissores no reparo de

tecido mole, neste estudo não permitiu o reparo ósseo em calotas de ratos, quando comparada à Bio-Gide®.

Palavras-chaves: Biomateriais, xenoenxertos, celulose

Pereira, J.C. Evaluation of calvaria bone healing of rats with bacterial cellulose membrane and porcine collagen membrane. Histologic, histometric and immunohistochemistry analysis. ARAÇATUBA: UNESP – Univ. Estadual Paulista. 2017

Abstract: The present study aimed to evaluate the efficiency of bacterial cellulose membrane (Nanoskin[®]) in the bone repair of 8 mm critical-size defects in male adult rat calvaria compared to collagen membrane Bio-Gide[®]. It was used 72 adult male rats divided into three experimental groups: Clot group (CG), Bio-Gide[®] group (BG) and bacterial cellulose group (BC). The study period were seven, 15, 30 and 60 days after the surgical defect and position of the membrane. It were performed the histologic, histometric and imunohistochemistry analysis and possible to observe that at 30 and 60 days, BG group showed higher filling of the surgical wound with higher amount of new formed bone. The BC group showed a mature connective tissue filling the defect. Data from histometric analysis showed that at 30 and 60 days the new bone formed area was discrepant for BG group compared with BC and CG group (Tukey test – $P < 0,001$). On the other hands, immunohistochemistry analysis showed a moderate and intense immunolabeling of osteocalcin and osteopontin at 60 days of bone repair for BG and BC group. It was possible to conclude that despite the BC membrane showing promising aspects in the soft tissue repair, did not allow bone repair in rats calvaria, compared to Bio-Gide[®]

Key words: Biomaterials, xengrafts, cellulose

Lista de Figuras

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figura 1 | (A) Membrana de celulose bacteriana. (B) Membrana de colágeno porcino. | 18 |
| Figura 2 | (A) Acesso cirúrgico a calvária. (B) Trefina de 7mm. (C) Remoção da cortical da região de calvária. | 20 |
| Figura 3 | Fotomicrografias dos cortes histológicos em menor aumento (125x) referente aos grupos experimentais (GC – Grupo Coágulo; BG – Bio-Gide®; CV – Chá verde) em todos os períodos analisados (7, 15, 30 e 60 dias), nos quais observamos a capacidade de reparação óssea de cada membrana, sendo que a Bio-Gide apresentou melhor performance aos 60 dias com o fechamento significativo do defeito ósseo. O grupo Chá-verde apresentou bom fechamento do defeito, porém com maior presença de tecido conjuntivo pouco diferenciado. | 26 |
| Figura 4 | Fotomicrografias dos cortes histológicos em menor (125x) e maior aumento (250x) de área delimitada (centro do defeito) referente aos grupos experimentais BG e CV no período mais longo de reparação (60 dias). (A) nota-se a presença de neoformação óssea a partir dos cotos ósseos e no centro do defeito. (B) nota-se que o grupo do chá verde apresenta pequenas áreas de tecido osteóide, prevalecendo o aspecto de tecido conjuntivo mais maduro, com presença de infiltrado inflamatório. | 28 |
| Figura 5 | Gráfico comparando os valores mensurados da área de neoformação óssea entre os grupos e períodos analisados. Quando comparado o tipo de membrana utilizado, observa-se que houve diferença estatística apenas no período de 30 e 60 dias entre os grupos BG x CV e BG x GC (Teste de Tukey – $P < 0,001$), sinalizados pelo asterisco (*) e cerquilha (#) acima do gráfico. Quando comparados os períodos analisados, observa-se diferença estatística apenas no grupo BG entre os períodos 30d e 60d x 15d e 30d e 60d x 7d (Teste de Tukey – $P < 0,001$). | 29 |
| Figura 6 | Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 25x em área delimitada (centro do defeito) referente aos grupos experimentais BG e CV nos períodos de 15, 30 e 60 dias de reparação. As setas vermelhas representam as áreas com maior marcação celular de diaminobenzidina, denotando maior expressão da proteína osteocalcina. | 31 |
| Figura 7 | Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 25x em área delimitada (centro do defeito) referente aos grupos experimentais BG e CV nos períodos de 15, 30 e 60 dias de reparação. As setas vermelhas representam as áreas com maior marcação celular de diaminobenzidina, denotando maior expressão da proteína osteopontina. | 32 |

Lista de tabelas

| | | |
|-----------------|--|----|
| Quadro I | Escores representativos relacionados à imunomarcção das proteínas osteocalcina (OC) e osteopontina (OP) referente aos grupos Bio-Guide (BG) e Chá Verde (CV), sendo os scores classificados como nulo (0), leve (+), moderado (++) e intenso (+++) | 31 |
|-----------------|--|----|

Lista de abreviaturas

| | |
|---------------|-----------------------------|
| GTR = | Regeneração Tecidual Guiada |
| PVPI = | Polivinil Pirrolidona Iodo |
| OC = | Osteocalcina |
| OP = | Osteopontina |
| GC = | Grupo coágulo |
| BG = | Bio-Guide |
| CV = | Chá Verde |

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------|-----------|
| INTRODUÇÃO | 14 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 16 |
| RESULTADOS | 22 |
| DISCUSSÃO | 32 |
| REFERÊNCIAS | 36 |
| ANEXOS | 40 |

Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de celulose bacteriana e membrana de colágeno porcino. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico Journal of biomedical materials research part B: Applied biomaterials*

1. Introdução

A Regeneração óssea guiada (Guided Tissue Regenerate – GTR), consiste no uso de uma membrana biocompatível fazendo o papel de barreira física para evitar que o tecido conjuntivo adjacente invada o defeito ósseo, criando assim, espaço favorável para a regeneração óssea¹. Ocorre, pois durante o reparo, o tecido epitelial migra rapidamente para a ferida, o que torna a regeneração óssea mais difícil².

As principais propriedades que essas membranas devem ter são: osteoindutividade, reabsorvíveis, biocompatibilidade, ausência de citotoxicidade e estabilidade mecânica, ou seja, capacidade de manutenção do espaço durante o processo de reparo ósseo^{3; 4; 5}.

Uma das membranas que atende grande parte desses requisitos são as membranas à base de colágeno por serem biocompatíveis, hemostáticas, além de promoverem quimiotaxia para fibroblastos e osteoblastos, e serem semi-permeáveis permitindo a transferência de nutrientes,^{6; 7; 8; 9; 10; 11} e significativa reparação de defeitos intraósseos¹², visto e associadas a vários tipos de enxertos ósseos, podem melhorar a eficácia dos mesmos, aumentando a capacidade de estimular o reparo dos tecidos periodontais.^{13; 14; 15} Dessa forma esse tipo de membrana é amplamente utilizada em cirurgia bucomaxilofacial e considerada de alto padrão no processo de cicatrização óssea. Entre as membranas de colágeno, a que se destaca no mercado é a Bio-Gide® (*Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland*)

Atualmente, buscam-se outras opções para auxiliar reparo do tecido ósseo, visto que, apesar de muito eficientes, as membranas

colágenas apresentam alto custo. Neste sentido, uma das alternativas é a exploração da celulose, que além de apresentar boas propriedades biomecânicas é um polímero natural, biodegradável e renovável. Por isso tornou-se assunto de uma série de investigações na engenharia tecidual^{16 17 18}.

Uma das maneiras de se obter a celulose é pela síntese bacteriana (celulose bacteriana), que resulta em uma celulose com melhores propriedades que aquela extraída diretamente da planta, mostrando alta resistência mecânica, alta capacidade de reter água,¹⁹ cristalinidade, elevado grau de biocompatibilidade e resistência à degradação, o que a torna apta para ser usada como matéria-prima na fabricação de membranas e *scaffolds* direcionados a uma variedade de tecidos, incluindo tecido ósseo.^{20; 21; 22} Ademais, esse material já tem sido aplicado como um ótimo substituto da pele no tratamento de queimaduras profundas^{23; 24; 25} e extensas perdas das camadas de derme e epiderme em feridas crônicas ou agudas, trazendo redução da dor e melhoria no processo de reparo ao acelerar o desenvolvimento do tecido de granulação e novo epitélio, além de diminuir a formação de cicatriz.^{22; 23;}
²⁴ Nesse contexto, foi recentemente desenvolvida uma membrana celulósica produzida pela ação de algumas espécies de leveduras sobre o chá verde (Nanoskin[®]); e já está sendo utilizada como auxiliar no reparo de lesões na pele, oferecendo ótimos resultados.

A membrana de celulose permanece por um longo período no organismo sem ser absorvível^{23; 24}, porém seu contato com os tecidos não gera toxicidade ou inflamação^{24; 25; 26}.

Pesquisas em engenharia tecidual apresentam biomateriais contendo celulose bacteriana eficientes também no processo de reparo ósseo, sendo explorados principalmente na forma de *scaffolds*^{23; 27; 28; 29}.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi comparar a efetividade entre a membrana de celulose bacteriana (*Nanoskin*[®] *Innovatec's, São Carlos SP, Brasil*) e a membrana colágena (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wolhusen, Switzerland*) no processo de reparação óssea em calvária de ratos machos adultos (3 a 4 meses) nos períodos de 7, 15 e 30 e 60 dias, com a hipótese nula de que a *Nanoskin*[®] pudesse promover neoformação óssea compatível com a *Bio-Gide*[®].

2. Materiais e Métodos.

2.1 Desenvolvimento da membrana de Chá Verde:

A celulose bacteriana matéria-prima (*Nanoskin*[®] *Innovatec's, São Carlos SP, Brasil*) foi fornecida a partir de *Innovatec* (São Carlos-SP, Brasil). O processo de fermentação acético foi conseguido através da utilização de glicose como uma fonte de carboidratos e chá verde como fonte de nitrogênio. As bactérias foram então inoculadas no meio de cultura e, depois de ser adicionadas, o meio foi autoclavado a 100 °C. Os resultados deste processo foram vinagre e uma biomassa de nanobiocelulose. A celulose bacteriana foi produzida por bactérias Gram-negativas, *Gluconacetobacter xylinus* e extraída a partir do meio de cultura numa estrutura 3D pura formada por uma rede ultrafina de nanofibras de celulose.³⁰

2.2 Amostras:

Este estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP com o número de protocolo: 2015-00965 (Anexo I).

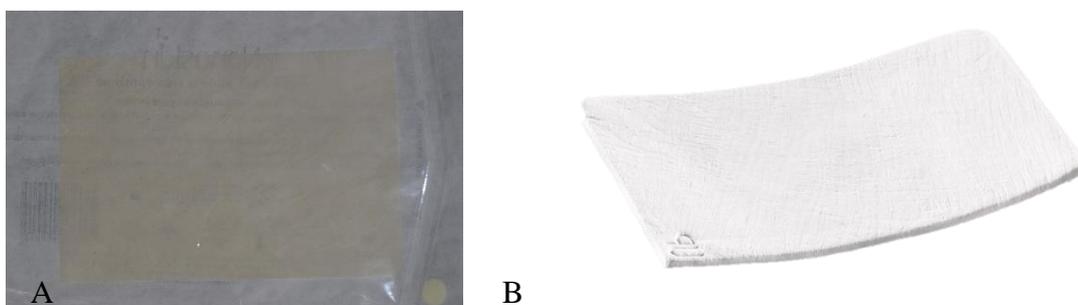
Foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os animais foram divididos em três grupos (n=24 por grupo), submetidos à eutanásia em quatro momentos do experimento, aos 7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP.

Sendo assim, em cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico na calvária (8 mm), como discriminado a seguir:

- **Grupo Coágulo (Controle Negativo)** – n= 24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo, sem colocação de membrana sendo 6 ratos submetidos a eutanásia em cada período para a análise de (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia);
- **Grupo Bio-Gide® (Controle Positivo)** – n= 24: O defeito ósseo crítico preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de Bio-Gide sendo 6 ratos submetidos a eutanásia em cada período para a análise de (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia) (Fig. 1B);
- **Grupo Chá Verde (Grupo Experimental)** – n=24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo, e sobre o defeito colocado uma **membrana de celulose bacteriana**, sendo 6 ratos submetidos à

eutanásia em cada período para a análise de (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia) (Fig.1A).

Figura 1. A. Membrana de Celulose Bacteriana. B. Membrana de colágeno porcino



2.3 Cirurgia experimental:

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de oito horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 50mg/Kg e 5mg/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Em seguida foi realizada a tricotomia na região da calvária, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI

10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Foi realizada incisão em V, no sentido occipito-frontal, sendo o ápice localizado na região frontal e base localizada na região occipital, medindo aproximadamente 2 (dois) cm, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha) (Fig. 2A). Em seguida com auxílio de broca trefina de 7mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8 mm de diâmetro (Furlaneto, 2007), na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Fig. 2B e C). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino (Grupo Bio-Gide®- Geistlich – n=24) ou com uma membrana de **celulose bacteriana** (Grupo **chá verde** – n=24) ou não foi inserido nenhuma membrana correspondendo ao Grupo Controle (n=24).

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Fig. 2. A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Trefina de 7mm. C. Remoção da cortical da região de calvária.



2.4 Análise Histológica

Após a obtenção das lâminas, avaliou-se histologicamente a neoformação óssea, ausência de infiltrado inflamatório, formação de tecido conjuntivo, absorção e/ou manutenção dos materiais estudados.

2.5 Análise Histométrica:

Posteriormente as lâminas serem coradas com corante de hematoxilina e eosina (Merck & Co., Inc.) as mensurações da área de osso neoformado foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador com um software analisador de imagens digitalizadas ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Foi avaliada a área de tecido ósseo presente na região central dos defeitos ósseos. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos, de pixels, para micrometros ao quadrado, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo. Para a comparação entre os valores médios obtidos nos diferentes grupos e períodos experimentais, foi inicialmente submetido ao teste estatístico.

2.6 Análise imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram visualizadas utilizando o método de detecção por imunoperoxidase indireta. Foi realizado o bloqueio de reações não específicas através da inativação da peroxidase endógena, usando-se peróxido de hidrogênio 3% (Merck, Sao Paulo, SP, Brazil), albumina sérica bovina 1% albumin (Sigma-Aldrich Ltda., Sao Paulo, SP, Brazil), e leite em pó sem gordura 20%. A recuperação do antígeno foi conseguida com um tampão de fosfato de citrato (PH 6,0) na presença de calor úmido. Os anticorpos primários foram utilizados contra a osteocalcina (OC) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) e osteopontina (OP) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA). Estas proteínas foram escolhidas para avaliar as repostas celulares referentes à mineralização óssea. O anticorpo secundário utilizado foi um anticorpo biotilado anti-cabra produzido em coelhos (Pierce Biotechnology, Rockford, IL EUA), com biotina e estreptavidina (Dako, Glostrup, Dinamarca) e diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Dinamarca) como o cromógeno. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris.

As reações imunoistoquímicas foram avaliadas através da atribuição de escores por análise semi quantitativa ^{31 32}. Os escores variaram de nulo (0), leve (+), moderado (++) e intenso (+++) e foram avaliados a partir das imagens capturadas do centro do defeito realizado na calvária de todos os animais que fazem parte do experimento, para os biomarcadores osteocalcina (OC) e osteopontina (OP). Para a aquisição das imagens, foi utilizado o Fotomicroscópio (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) conectado a um micro-computador. Foram avaliados apenas os períodos de 15, 30 e 60 dias, devido ao fato de que aos 7 dias não se espera que haja atividade celular referente aos biomarcadores OC e OP, que estão relacionados ao estágio final da formação óssea.

2.7 Análise Estatística:

Os dados obtidos através da análise histométrica foram, inicialmente, submetidos ao teste de homogeneidade para avaliar a distribuição dos dados na curva de normalidade (Shapiro-Wilk dois fatores). Confirmando a normalidade da distribuição, foi aplicado o teste de Tukey para comparação das medias. O nível de significância adotado foi $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Avaliação morfológica (microscópica):

Os resultados foram avaliados por meio de microscópio óptico com padronização da leitura das lâminas do grupo controle, grupo do Chá

verde e no grupo colágeno porcino (Bio-Gide[®] Geistlich Wolhusen, Switzerland).

GRUPO CONTROLE (GC) - Sem membrana

7 dias

A citoarquitetura óssea do corte histológico aos 7 dias mostrou hipervascularização na região do defeito ósseo e já com a presença de atividade fibroblástica (Fig. 3)

15 dias

Aos 15 dias, a fotomicrografia do grupo controle exhibe a borda do defeito ósseo indo em direção ao centro da ferida, notou-se neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, ricamente celularizado por osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. A neoformação óssea somente foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central. Há abundante tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblasto e pouca matriz extracelular preenchendo a região central da ferida (Fig. 3).

30 dias

No período de 30 dias o grupo coágulo apresentou área óssea neoformada mais próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes se apresenta preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado (Fig. 3).

60 dias

A fotomicrografia panorâmica do grupo coágulo denota preenchimento do defeito com tecido conjuntivo imaturo e presença de infiltrado inflamatório, sem sinais de neoformação óssea, comprovando ser um defeito crítico (Fig. 3).

GRUPO DE COLÁGENO PORCINO (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland) - (BG)

7 Dias

Nota-se a presença da membrana de colágeno porcino em todo defeito preenchido por um tecido altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório (Fig. 3).

15 Dias

Nesse tempo operatório nota-se um tecido com menor vascularização, áreas de tecido ósseo neoformado a partir do coto. Verifica-se também a presença de pontos de tecido osteóide no centro do defeito (Fig. 3).

30 Dias

No tempo operatório de 30 dias nota-se uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland*) (Fig. 3).

60 dias

Aos 60 dias de reparo, a membrana colágena Bio-Guide denota aspecto de fechamento completo do defeito sem presença de remanescente da membrana.

Na observação das lâminas em um aumento de 25X nota-se a presença de neoformação óssea a partir dos cotos ósseos e no centro do defeito, podendo ser observado células ósseas viáveis e sem a presença de remanescente da membrana. (Fig. 4A).

GRUPO DO CHÁ VERDE (Nanoskin[®] -Innovatec's, São Carlos SP, Brasil) – (CV)**7 dias**

No grupo chá verde foi possível observar aos 7 dias somente a presença de um tecido conjuntivo ricamente vascularizado e com um infiltrado inflamatório intenso (Fig. 3). Região central do defeito nota-se a presença de um intenso infiltrado inflamatório (Fig. 3).

15 dias

Foram analisados os cortes do grupo do chá verde com um aumento de 12.5X e verifica-se que ocorreu neoformação óssea próxima aos cotos e com uma pequena diminuição do infiltrado inflamatório (Fig. 3).

30 dias

Ao menor aumento (125x) é possível observar que a membrana de chá verde não foi capaz de realizar o fechamento do defeito (Fig. 3).

60 dias

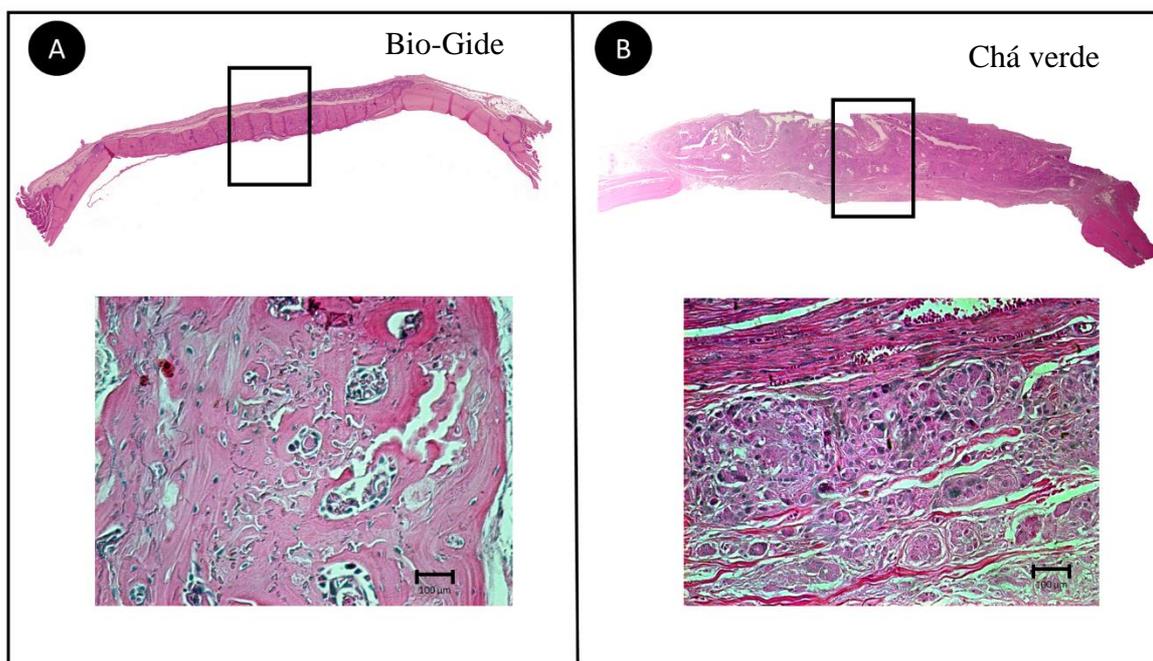
Aos 60 dias, é possível notar que ainda não há o fechamento do defeito com tecido ósseo (Fig. 3).

Ao analisar a fotomicrografia em maior aumento (250x), nota-se que o grupo do chá verde apresenta tecido conjuntivo maduro, com presença de fibras colágenas e permanência de infiltrado inflamatório com discretas áreas de tecido osteóide (Fig. 4B).

Fig. 3 – Fotomicrografias dos cortes histológicos em menor aumento (125x) referente aos grupos experimentais (GC – Grupo Coágulo; BG – Bio-Gide[®]; CV – Chá verde) em todos os períodos analisados (7, 15, 30 e 60 dias), nos quais observamos a capacidade de reparação óssea de cada membrana, sendo que a Bio-Gide apresentou melhor performance aos 60 dias com o fechamento significativo do defeito ósseo. O grupo Chá-verde apresentou bom fechamento do defeito, porém com maior presença de tecido conjuntivo pouco diferenciado.



Fig. 4 – Fotomicrografias dos cortes histológicos em menor (125x) e maior aumento (250x) de área delimitada (centro do defeito) referente aos grupos experimentais BG e CV no período mais longo de reparação (60 dias). **(A)** nota-se a presença de neoformação óssea a partir dos cotos ósseos e no centro do defeito. **(B)** nota-se que o grupo do chá verde apresenta pequenas áreas de tecido osteóide, prevalecendo o aspecto de tecido conjuntivo mais maduro, com presença de infiltrado inflamatório.

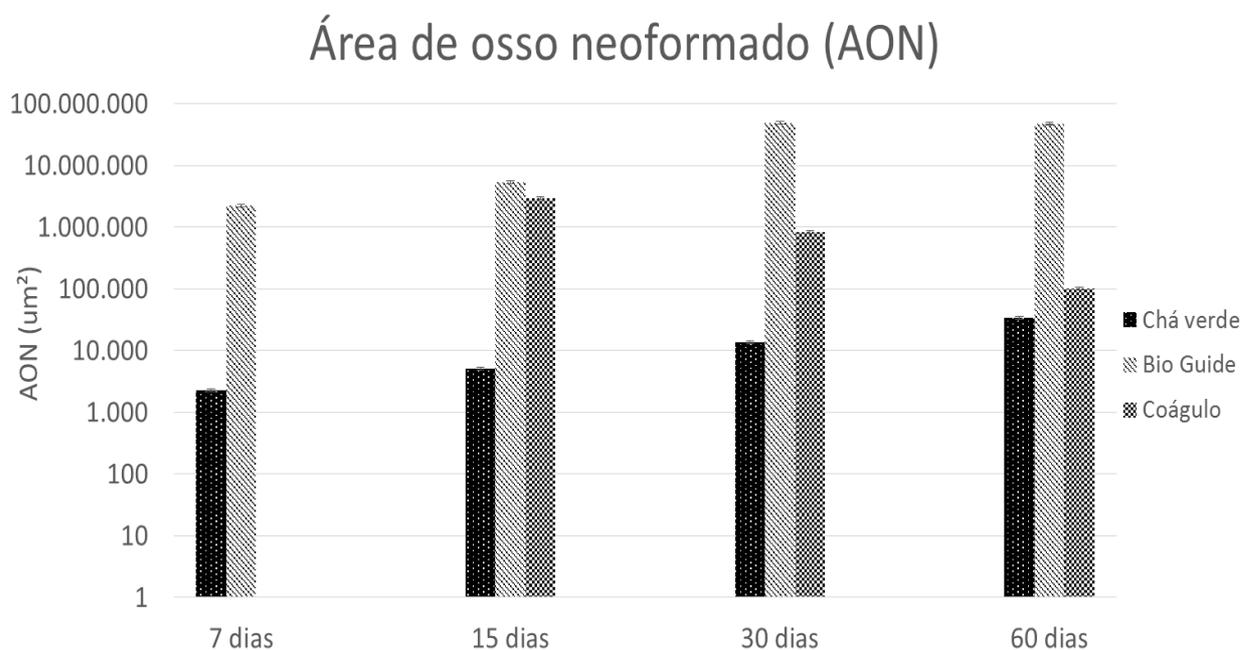


3.2. Análise histométrica:

Os resultados referentes à membrana utilizada evidenciaram que, tanto aos 7 dias quanto aos 15 dias de reparo ósseo houve similaridade nos valores da área de neoformação óssea na comparação entre os grupos (Fig. 5). Já quando analisamos os 30 dias de reparo ósseo são possíveis observar que o grupo que recebeu a membrana Bio-Gide[®] foi o que apresentou maior discrepância em relação aos outros dois grupos ($P < 0,001$). É possível observar maior área de neoformação óssea no

grupo Chá verde em relação ao grupo coágulo, no entanto sem apresentar diferença estatística ($P>0,05$) (Fig. 5). Em relação aos períodos analisados, observou-se que apenas no grupo Bio-Gide® houve melhor reparo ósseo aos 30 dias quando comparados aos demais períodos (Fig. 5).

Fig. 5 – Gráfico comparando os valores mensurados da área de neoformação óssea entre os grupos e períodos analisados. Quando comparado o tipo de membrana utilizado, observa-se que houve diferença estatística apenas no período de 30 e 60 dias entre os grupos BG x CV e BG x GC (Teste de Tukey – $P<0,001$), sinalizados pelo asterisco (*) e cerquilha (#) acima do gráfico. Quando comparados os períodos analisados, observa-se diferença estatística apenas no grupo BG entre os períodos 30d e 60d x 15d e 30d e 60d x 7d (Teste de Tukey – $P<0,001$).



3.3. Análise imunoistoquímica

GRUPO DE COLÁGENO PORCINO (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland) - (BG)

Osteocalcina: A fotomicrografia do reparo ósseo aos 15 dias de evidencia marcação moderada (++) para a proteína osteocalcina, principalmente em região de matriz extracelular. Aos 30 e 60 dias de reparo ósseo, é possível observar marcação intensa (+++) para o biomarcador osteocalcina em região de coto ósseo e centro do defeito (Quadro I, Fig. 6).

Osteopontina: A fotomicrografias do reparo ósseo aos 15 dias denota marcação moderada (++) para a proteína osteopontina. Já aos 30 dias, observa-se marcação leve (+) para o biomarcador. Aos 60 dias, é possível observar a presença moderada (++) deste biomarcador novamente (Quadro I, Fig. 7).

GRUPO DO CHÁ VERDE (Nanoskin® -Innovatec's, São Carlos SP, Brasil) – (CV)

Osteocalcina: As fotomicrografias obtidas aos 15 e 30 dias de reparo ósseo, evidenciam marcação leve (+) para a proteína osteocalcina. No entanto, aos 60 dias de reparo, é possível notar marcação intensa (+++) para esta proteína em região de cotos ósseos (Quadro I, Fig. 6).

Osteopontina: Em relação à proteína osteopontina, observou-se imunomarcção leve (+) aos 15 dias de reparo, moderada (++) aos 30 dias e intensa (+++) aos 60 dias de reparo (Quadro I, Fig. 7).

| Groups | OC | OP |
|-------------------|-----|-----|
| BG 15 dias | ++ | ++ |
| BG 30 dias | +++ | + |
| BG 60 dias | +++ | ++ |
| CV 15 dias | + | + |
| CV 30 dias | + | ++ |
| CV 60 dias | +++ | +++ |

Quadro I: Scores representativos relacionados à imunomarcção das proteínas osteocalcina (OC) e osteopontina (OP) referente aos grupos Bio-Guide (BG) e Chá Verde (CV), sendo os scores classificados como nulo (0), leve (+), moderado (++) e intenso (+++)

Fig. 6 – Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 25x em área delimitada (centro do defeito) referente aos grupos experimentais BG e CV nos períodos de 15, 30 e 60 dias de reparação. As setas vermelhas representam as áreas com maior marcação celular de diaminobenzidina, denotando maior expressão da proteína osteocalcina.

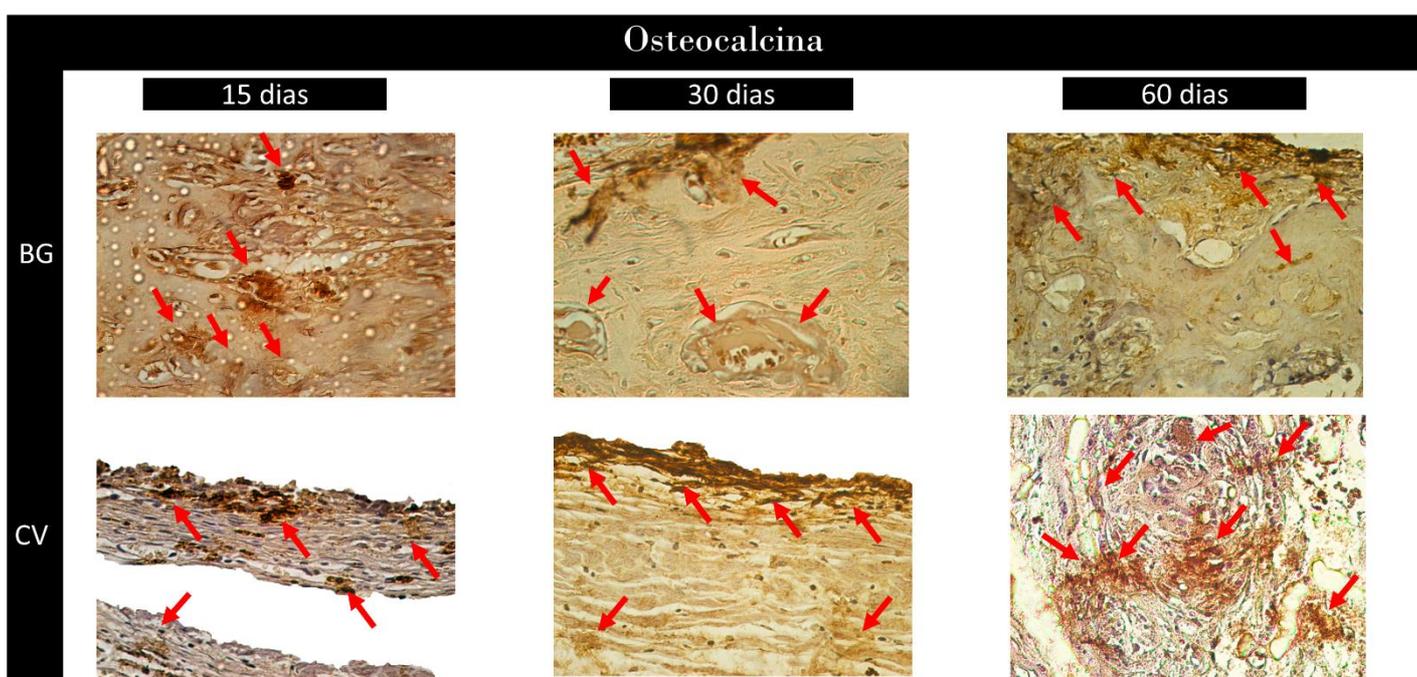
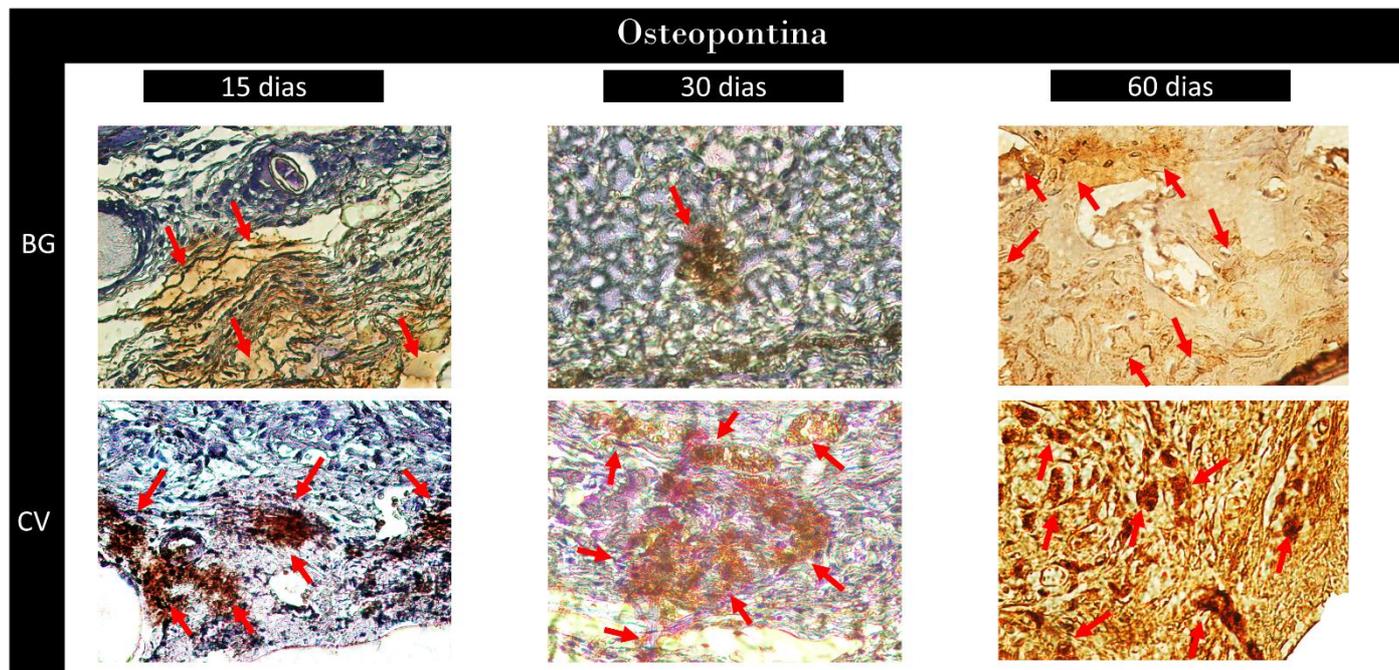


Fig. 7 – Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 25x em área delimitada (centro do defeito) referente aos grupos experimentais BG e CV nos períodos de 15, 30 e 60 dias de reparação. As setas vermelhas representam as áreas com maior marcação celular de diaminobenzidina, denotando maior expressão da proteína osteopontina.



4. Discussão

Este estudo teve como proposta avaliar a eficácia da membrana Nanoskin® (Innovatec's, São Carlos SP, Brasil), sintetizada através da celulose bacteriana, no reparo de defeitos ósseos de 8mm criados em calvária de ratos machos adultos. Em relação a capacidade dessa membrana na osteopromoção e permitir neoformação de tecido ósseo, ficou evidente nas fotomicrografias referentes aos maiores períodos do reparo ósseo (30 e 60 dias) que não houve preenchimento do defeito ósseo com osso neoformado. Além da ausência de tecido ósseo e fragmentos da membrana, notou-se a predominância de tecido conjuntivo

fibroso em toda a extensão do defeito ósseo, mesmo nos períodos mais tardios. Nos períodos iniciais (7 e 15 dias), as características microscópicas mostraram que especificamente no grupo chá verde, houve um infiltrado inflamatório expressivo, o que atrasou o reparo ósseo em comparação aos grupos que utilizaram a membrana de colágeno (Bio-Gide®).

A investigação da biologia do tecido ósseo em função da membrana de chá verde nesta pesquisa se fundamentou na engenharia tecidual que tem mostrado resultados promissores, principalmente no que diz respeito ao reparo de tecido mole, tais como no reparo de úlceras venosas (28), lacerações e abrasões traumáticas, estases venosas, sítio doador de enxertos de pele, lesões por queimaduras de segundo grau, além de úlceras em pés diabéticos (29). Apesar de mostrar bom comportamento no reparo de tecidos moles, pouco se sabe sobre o efeito da celulose bacteriana em tecidos duros. Sendo assim, considerou-se avaliar sua eficácia na regeneração óssea guiada, uma vez que se trata de um material totalmente natural e biocompatível (30). Alguns trabalhos (31,32) iniciaram pesquisas nesse sentido obtendo resultados promissores e que diferiu dos resultados encontrados em nossa pesquisa.

As membranas colágenas porcinas são amplamente utilizadas para este fim, sendo a Bio-Gide® a mais utilizada. Vários estudos clínicos (37,38) e experimentais (39,40) têm demonstrado a efetividade desta membrana como barreira biológica em defeitos ósseos importantes, seja associado a um biomaterial ou seu uso isolado.

Em relação ao presente estudo, os resultados referentes à análise histométrica evidenciam que a Bio-Gide® foi superior à membrana de chá verde ($P < 0,001$) aos 30 dias de reparo ósseo. Além disso, a análise histológica evidencia que, apesar de preencher o defeito ósseo criado, a membrana de chá verde não foi capaz de produzir tecido ósseo maduro, em que é possível observar apenas tecido conjuntivo, com discreta presença da membrana e tecido ósseo.

Em contrapartida, Lee e colaboradores (2015) (41) compararam o uso da membrana de chá verde com membrana colágena (GENOSS, Suwon, Korea) como barreiras biológicas em defeitos de 8mm em calvária de ratos. No entanto, além da membrana, foi utilizado enxerto ósseo xenógeno. Os autores puderam observar que a membrana de chá verde apresentou comportamento bastante similar com a membrana de colágeno, capaz de estimular boa neoformação óssea no defeito criado, podendo ser utilizada como barreira biológica.

Apesar dos autores terem demonstrado bons resultados relacionados à membrana de celulose bacteriana, é importante ressaltar que foi utilizado enxerto ósseo xenógeno associado, além de que a membrana colágena não se tratava da Bio-Gide®. No entanto, os resultados mostram a necessidade de realizar novos estudos acerca do uso da membrana de celulose bacteriana na regeneração óssea guiada (utilização de substitutos ósseos recobertos por membrana), uma vez que o material apresenta propriedades bastante interessantes, além de ser um material fitoterápico. Além disso, a atividade celular reparacional deste grupo em função da imunomarcagem para as proteínas osteopontina e

osteocalcina aos 60 dias, foi intensa, por meio da área de imunomarcção na matriz extracelular. Estas proteínas representam a maturação do tecido ósseo e desta forma, a utilização da membrana de celulose bacteriana mostrou atividade celular interessante, o que suscita avaliar o seu comportamento em associação com substitutos ósseos em estudos futuros.

A inflamatória atividade inflamatória apresentada nos resultados histológicos, que persiste em quase todos os períodos pode ser devido ao fato de que a celulose se apresenta como um corpo estranho ao ser humano, uma vez que não este não apresenta capacidade de digeri-la, o que pode ter levado a um atraso na sua reabsorção, acarretando em uma maior resposta inflamatória no tecido ósseo.

Sendo assim, dentre as limitações deste estudo animal, foi possível concluir que, apesar de o chá verde demonstrar propriedades interessantes como membrana biológica e apresentar bons resultados no reparo de grandes injúrias em tecido mole, não demonstrou bom comportamento em defeitos críticos em calvária de ratos, pelo menos quando comparada à membrana colágena (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland), que evidenciou ser significativamente superior no que diz respeito à qualidade e quantidade de osso neoformado.

Referências

- 1 SEEMAN, E. Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 14 Suppl 3, p. S2-8, 2003. ISSN 0937-941X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730770>>.
- 2 HILLNER, B. E. et al. American Society of Clinical Oncology 2003 update on the role of bisphosphonates and bone health issues in women with breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 21, p. 4042-57, Nov 2003. ISSN 0732-183X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963702>>.
- 3 WALLACE, S. S. et al. Sinus augmentation utilizing anorganic bovine bone (Bio-Oss) with absorbable and nonabsorbable membranes placed over the lateral window: histomorphometric and clinical analyses. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 25, n. 6, p. 551-9, Dec 2005. ISSN 0198-7569. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16353530>>.
- 4 HANSEN, P. J. et al. Incidence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) in patients taking bisphosphonates for osteoporosis treatment - a grossly underestimated risk? **Clin Oral Investig**, v. 17, n. 8, p. 1829-37, Nov 2013. ISSN 1436-3771. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114879>>.
- 5 SIMS, N. A. et al. Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 18-25, Jan 2002. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792560>>.
- 6 HIRBE, A. C. et al. The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. **Bone**, v. 44, n. 5, p. 908-16, May 2009. ISSN 1873-2763. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442620>>.
- 7 PEREZ, E. A.; WEILBAECHER, K. Aromatase inhibitors and bone loss. **Oncology (Williston Park)**, v. 20, n. 9, p. 1029-39; discussion 1039-40, 1042, 1048, Aug 2006. ISSN 0890-9091. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16986348>>.
- 8 LEFEVRE, J.; MCCLINTOCK, M. K. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. **Biol Reprod**, v. 38, n. 4, p. 780-9, May 1988. ISSN 0006-3363. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3401536>>.
- 9 BESTETTI, G. E. et al. Functional and morphological changes in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis of aged female rats. **Biol Reprod**, v. 45, n. 2, p. 221-8, Aug

1991. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1786286> >.
- 10 MATT, D. W. et al. Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in aging rats. **Biol Reprod**, v. 34, n. 3, p. 478-87, Apr 1986. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3697463> >.
- 11 FARIA, P. E. et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 4, p. 393-401, Apr 2008. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18324960> >.
- 12 ALVAREZ, O. et al. **Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous ulcers: results of a single center randomized study involvin**. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2004
- 13 _____. **Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: Results of a single center randomized study involving 24 patients**. *Wounds*. 16 2004.
- 14 KOWALSKA-LUDWICKA, K. et al. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. **Arch Med Sci**, v. 9, n. 3, p. 527-34, Jun 2013. ISSN 1734-1922. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847677> >.
- 15 HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **J Biomed Mater Res A**, v. 76, n. 2, p. 431-8, Feb 2006. ISSN 1549-3296. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16278860> >.
- 16 RODRIGUES, C. et al. New therapy of skin repair combining adipose-derived mesenchymal stem cells with sodium carboxymethylcellulose scaffold in a pre-clinical rat model. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96241, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788779> >.
- 17 SALATA, L. A. et al. In vitro and in vivo evaluation of e-PTFE and alkali-cellulose membranes for guided bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, v. 12, n. 1, p. 62-8, Feb 2001. ISSN 0905-7161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168272> >.
- 18 HUANG, Y. et al. Modification and evaluation of micro-nano structured porous bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 75, p. 1034-1041, Jun 2017. ISSN 1873-0191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28415386> >.
- 19 GRUSS, J. S.; ANTONYSHYN, O.; PHILLIPS, J. H. Early definitive bone and soft-tissue reconstruction of major gunshot wounds of the face. **Cellulose Plast Reconstr Surg**, v. 87, n. 3, p. 436-50, Mar 1991. ISSN 0032-1052. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1998014> >.

- 20 BLUMENTHAL, N. M. The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. **J Periodontol**, v. 59, n. 12, p. 830-6, Dec 1988. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3225730> >.
- 21 VON ARX, T.; BUSER, D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 4, p. 359-66, Aug 2006. ISSN 0905-7161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16907765> >.
- 22 WANG, H. L. et al. Evaluation of an absorbable collagen membrane in treating Class II furcation defects. **J Periodontol**, v. 65, n. 11, p. 1029-36, Nov 1994. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7853126> >.
- 23 RAMALHO-FERREIRA, G. et al. **Effect of anti-resorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats.** 2016
- 24 CRIGGER, M. et al. Repair following treatment of circumferential periodontal defects in dogs with collagen and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. **J Periodontol**, v. 67, n. 4, p. 403-13, Apr 1996. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8708967> >.
- 25 GRUSS, J. S.; ANTONYSHYN, O.; PHILLIPS, J. H. Early definitive bone and soft-tissue reconstruction of major gunshot wounds of the face. **Plast Reconstr Surg**, v. 87, n. 3, p. 436-50, Mar 1991. ISSN 0032-1052. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1998014> >.
- 26 YUKNA, C. N.; YUKNA, R. A. Multi-center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human Class II furcations. **J Periodontol**, v. 67, n. 7, p. 650-7, Jul 1996. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8832475> >.
- 27 DE OLYVEIRA, G. M. et al. Physically Modified Bacterial Cellulose Biocomposites for Guided Tissue Regeneration. **Science of Advanced Materials**, v. 7, n. 8, p. 1657-1664, 2015. ISSN 1947-2935.
- 28 ENEMARK, H.; SINDET-PEDERSEN, S.; BUNDGAARD, M. Long-term results after secondary bone grafting of alveolar clefts. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 45, n. 11, p. 913-9, Nov 1987. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3312537> >.
- 29 ROCHEFORT, G. Y. The osteocyte as a therapeutic target in the treatment of osteoporosis. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, v. 6, n. 3, p. 79-91, Jun 2014. ISSN 1759-720X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24891879> >.

- 30 DE OLYVEIRA, G. M. et al. Bacterial cellulose/chondroitin sulfate for dental materials scaffolds. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 4, n. 2, p. 150-154, 2014. ISSN 2157-9083.
- 31 RAMALHO-FERREIRA, G. et al. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. **Clin Oral Investig**, Jul 2016. ISSN 1436-3771. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27460567> >.
- 32 FAVERANI, L. P. et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. **Clin Oral Investig**, Mar 2017. ISSN 1436-3771. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28357643> >.

ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de chá verde e membrana de colágeno porcino. Avaliação histométrica, imunoistoquímica**", Processo FOA nº 2015-00965, sob responsabilidade de Ana Paula Farnezi Bassi apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Outubro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Novembro de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Dezembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Repair process evaluation in rats skulls defects with green tea membrane and porcine collagen membrane. Histometric evaluation, immunohistochemistry**", Protocol FOA nº 2015-00965, under the supervision of Ana Paula Farnezi Bassi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 14, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 01, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 01, 2016.

Profa. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO II

Revista pretendida: *Journal of Biomedical Materials Research Part B:*

Applied Biomaterials

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1552](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552)

[4981/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)15524981/homepage/ForAuthors.html)