



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Câmpus de Araçatuba

**GUILHERME ANDRÉ DEL’ ARCO RAMIRES**

**Avaliação da regeneração óssea guiada em defeitos  
críticos com o uso de membranas de colágeno bovino e  
porcino. Análises histológica, histomorfométrica e  
imunoistoquímica**

**Araçatuba**

**2019**

# GUILHERME ANDRÉ DEL' ARCO RAMIRES

Avaliação da regeneração óssea guiada em defeitos críticos com o uso de membranas de colágeno bovino e porcino. Análises histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Implantodontia)

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Associada. Ana Paula Farnezi Bassi

**Araçatuba**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R173a Ramires, Guilherme André Del' Arco.  
Avaliação da regeneração óssea guiada em defeitos críticos com o uso de membranas de colágeno bovino e porcino:- análises histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica / Guilherme André Del' Arco Ramires. - Araçatuba, 2019  
52 f.: il.; tab.

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

1. Regeneração óssea 2. Membranas artificiais 3. Colágeno 4. Membranas 5. Implantes dentários I. T.

Black D7  
CDD 617.64

# **DEDICATÓRIA**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, por ser fundamental em minha vida, meu guia, sempre presente na hora de angústia e alegria.

A minha filha **Mariah Campos Ramires**, que foi meu presente de Deus, e apesar de todas as dificuldades, nela é que eu encontro forças para batalhar e se for preciso “matar um leão por dia”, para sempre presenciar um sorriso em seu rosto.

A minha esposa **Marília Campos Martins**, que sempre me apoia em todas as minhas decisões, sempre me eleva quando em momentos de turbulência, mesmo quando houveram desejos de desistência. Obrigado por ser a companheira que é, para toda hora.

A meu pai, **Marcelo André Ramires**, meu melhor amigo e primeiro orientador. Que sempre me motivou a procurar melhorar e a aprender cada vez mais, mesmo quando eu mesmo não conseguia enxergar o panorama geral. Obrigado pelo apoio, carinho, dedicação e preocupação sempre constante.

À minha mãe, **Roseane Del' Arco Ramires**, só tenho a agradecer a oportunidade que Deus me deu de ser teu filho, uma pessoa muito estudiosa e esforçada, que nunca mediu esforços para incentivar os filhos nos estudos. Muito obrigado pela proteção, carinho e cuidado. Sem seu estímulo nada disso estaria acontecendo.

À minha irmã, **Larissa**, sempre esteve presente quando necessário, ter você sempre ao meu lado tornou minha caminhada até aqui bem mais fácil.

E a todos os meus **familiares**, que não mediram esforços para que eu chegasse nessa etapa tão importante da minha vida, sempre apoiando e dando suporte quando necessário.

# **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À minha orientadora, **Profa. Ass. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi**, pelo acolhimento e orientação desde a época de graduação, todos ensinamentos tanto em pesquisa, como em clínica e também como pessoa, com você foi que despertei meu interesse pelo meio acadêmico e pesquisa. Obrigado por toda compreensão, paciência, motivação e instrução.

Ao **Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**, um amigo sempre presente e disposto. Constantemente preocupado com o ensino de qualidade, com crescimento de cada pós-graduando e com os pacientes. E pela oportunidade de poder realizar trabalhos clínicos que contribuíram muito para o meu crescimento no meio da pesquisa clínica.

À **Profa. Ass. Dra. Daniela Ponzoni**, por todo conhecimento e experiência compartilhados ao longo da trajetória da pós-graduação.

Ao **Prof. Dr Luis Eduardo Marques Padovan**, por aceitar compor a banca avaliadora de dissertação de mestrado. Muito obrigado.

À **Profa. Adj. Roberta Okamoto**, por ter participado da minha formação. Sempre disposta a ajudar e acrescentar algo novo sempre que possível.



Ao **Prof. Ass. Dr. Francisley Ávila Souza**, agradeço pelo convívio descontraído e por poder aprender com você. Toda experiência compartilhada em discussão de casos clínicos. E estando sempre com alguma piada ou alguma história antiga engraçada para alegrar nossos dias.

Ao **Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Junior**, pelo conhecimento compartilhado ao longo das disciplinas e da pós-graduação.

Ao **Prof. Adj. Osvaldo Magro Filho**, obrigado pela oportunidade de aprender um pouco mais sobre a arte da cirurgia ortognática.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Prof. Tit. Wilson Roberto Poi**, com quem tive o prazer de ter algumas aulas e conversas. Uma pessoa realmente diferenciada e que durante as suas aulas mostrou o que é ser um verdadeiro professor.

Ao **Jadison Junio Conforte**, por toda amizade desde a graduação, todo conhecimento compartilhado e casos feitos em conjunto.

Ao **Pedro Henrique da Silva Gomes Ferreira**, só tenho a agradecer pela parceria, e todo conhecimento dividido e algumas oportunidades cirúrgicas que tivemos juntos. Um amigo que a vida me deu, conte sempre comigo parceiro. Muito obrigado.

Ao **Gustavo Grossi de Oliveira**, por todo conhecimento compartilhado durante o desenvolvimento do trabalho de Preempção Analgésica.

Ao **William Phillip**, que apesar de curitibano, um amigo com o coração de ouro. Acredito que não haja pessoa mais prestativa e disposta a ajudar o próximo. Sou muito feliz por tê-lo conhecido na pós-graduação, conte comigo pra vida parceiro.

Ao **Cássio Figueiredo**, mais um amigo que tive a felicidade de encontrar na pós-graduação me apresentou, uma pessoa de humildade ímpar, muito obrigado por toda parceria.

Ao **Luan Benetti**, que é um grande amigo desde a época de graduação, entrou na pós-graduação depois e pode contribuir com a finalização desta tese.

A **Lais Sara Egas**, uma grande parceira, e muito obrigado pelos ensinamento e sabedorias.

Aos mais que amigos, **Denis Cetrangolo, Tiago Amorin, Luis Felipe Bortolan, Renan Bortolan, Leandro Bortolan, Júnio Furlaneto, Dimauro Costa, Pedro Henrique Rocha, Guilherme Gil.**

Aos amigos da pós-graduação: **Ricardo Jacob, João Paulo Bonardi, Juliana Zorzi, Leonardo Freitas, Gustavo Momesso, Tarik Polo, Valthierre Nunes, Pier Paolo, André Hergesel, Fernando Isquierdo, Júlio Cesar, Erik Neiva, Fabio**

**Batista, Rodrigo Carioca, Ana Maria Veiga Vasques** obrigado pelos conhecimentos compartilhados e pelo bom convívio.

Aos amigos que embarcaram na pós-graduação juntos comigo: **Lara Cervantes, Luara Colombo, Raquel Parra e Thiago Machado** e aos pós-graduandos de outras áreas.

A **Ana Carulina Resende de Moraes** que fazia mestrado na minha época de graduação e conseguiu uma vaga e deu incentivo para realizar as atividades de IC. As ICs que já formaram e também às atuais que ajudaram a desenvolver esta pesquisa.

Aos atuais M1s da CTBMF e Implantodontia: **Rodrigo Capalbo, Bruno Mendes, Bruna Jhunger, Edith Umasi, Ana Flávia Piqueira, Henrique Hadad e Carolina Chapernet.**

Aos **novos pós-graduandos** de 2019, sejam bem-vindos e boa sorte.

Aos funcionários e amigos do laboratório do prédio 5, os secretários **Renato de Oliveira e Fausto Canuto**, agradeço por todo apoio e ao **Marco Ianner e Paulo Gratão**, sou muito grato por vocês terem me ensinado sobre os processamentos laboratoriais.

Ao **João Correa, Camilo Venâncio e seu Arnaldo**, por cuidarem tão bem dos animais dos experimentos, ajudando durante todo o processo, desde a organização do biotério, cirurgias e eutanásia.

A todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e Brazil Imagem.

Aos **pacientes** por confiarem suas vidas aos nossos cuidados.

Agradeço à **vida dos animais** utilizados durante os experimentos, o que tornou possível a elaboração deste trabalho e permitiu o meu aprendizado.

# **AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, 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 coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**, pela forma como dirige nossa Pós Graduação em Odontologia.

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!

## EPÍGRAFE

*“Um navio está em segurança no porto, mas não é para isso que os navios foram feitos.”*

*(William Shedd)*

Ramires G.A.D.A. **Avaliação da regeneração óssea guiada em defeitos críticos com o uso de membranas de colágeno bovino e porcino. Análises histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica.** 2019. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2019.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da membrana colagenosa bovina e a porcina, por meio das análises histológica, histométrica e imunoistoquímica comparando-a com a eficácia da membrana colágeno porcino no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos. Para este estudo foram utilizados 72 ratos divididos em três grupos: Grupo Coágulo (GC), Grupo Colágeno Bovino (GCB), Grupo Colágeno Porcino (GCP) e foram feitas as análises nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias. Os resultados histológicos demonstraram que o GCP apresentou início de neoformação óssea a partir do 7<sup>o</sup> dia sendo que aos 30 dias de reparo houve o preenchimento do defeito cirúrgico tendo o fechamento completo em alguns animais. Para o GCB foi pouca atividade de neoformação óssea nos períodos iniciais, sendo que a partir dos 30 dias observou-se uma crescente neoformação óssea tendo um aumento importante aos 60 dias. Os dados obtidos na análise histométrica revelam que aos 30 dias a área de osso neoformado (AON) não teve grande discrepância para o GCP em relação ao GCB, mas teve de ambos em relação ao GC, já em 60 dias o GCP apresentou maior AON em relação ao GCB. Esses resultados foram corroborados pelos resultados da imunoistoquímica. Diante dos resultados obtidos conclui-se que, todas as membranas estudadas nesta pesquisa promoveram a ROG.

**Palavras-chave:** Regeneração óssea, Membranas artificiais, Membranas, Colágeno, Implantes dentários, Ratos.



Ramires G.A.D.A. **Evaluation of guided bone regeneration in critical defects with the use of bovine and porcine collagen membranes. Histological, histomorphometric and immunohistochemical analysis.** 2019. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2019.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the bovine and porcine collagenous membrane by means of histological, histometric and immunohistochemical analysis comparing it with the efficiency of the porcine collagen membrane in the process of repair of critical bone defects in calvaria of rats. For this study, 72 rats were divided into three groups: Group Clot (GC), Group Bovine Collagen (GCB), Porcine Collagen Group (GCP) and analyzes were performed at 7, 15, 30 and 60 days. The histological results demonstrated that GCP presented onset of bone neoformation from day 7 and at 30 days of repair there was filling of the surgical defect and complete closure in some animals. For GCB, there was little activity of bone neoformation in the initial periods, and from the 30 days a growing bone neoformation was observed, with a significant increase at 60 days. The data obtained in the histometric analysis revealed that at 30 days the area of newly formed bone (AON) did not have a great discrepancy for GCP in relation to GCB, but had both in relation to CG, and in 60 days GCP presented higher AON in relation to GCB. These results were corroborated by the results of immunohistochemistry. In view of the obtained results it is concluded that, all the membranes studied in this research promoted ROG

**Keywords:** Bone regeneration, Artificial membranes, Membranes, Collagen, Dental implants, Rats.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representada pela linha tracejada vermelha. Remoção da cortical da região de calvária..... 33
- Figura 2:** Defeito crítico de 8mm. A. Coágulo. B. Membrana de cortical bovina (Critéria Biomateriais Ltda, São Carlos, SP, Brasil). C. Membrana de colágeno porcino (Bio-Gide® Geistlich Wolhusen, Switzerland). ..... 33
- Figura 3:** Fotomicrografias dos cortes histológicos em menor aumento (2,5x) referente aos grupos experimentais (GC; GCB; GCP) em todos os períodos analisados (7, 15, 30 e 60 dias), nos quais observamos a capacidade de reparação óssea de cada membrana..... 41
- Figura 4:** Fotomicrografias de cortes corados com HE, 30 e 60 dias pós-operatório em maior aumento (GC, GCB, GCP). Aumento original de 12,5X..... 42
- Figura 5:** Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 40x ao centro do DOC referente aos GCB e GCP nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de reparação, denotando áreas de expressão da proteína OC. .... 46
- Figura 6:** Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 40x ao centro do DOC referente aos GCB e GCP nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de reparação, denotando áreas de expressão da proteína OP. .... 47
- Figura 7:** A. Coto direito. 30 dias. Discreta neoformação indicada pela seta. B. Centro do defeito. 30 dias. Ausência de crescimento ósseo. Formação de tecido conjuntivo fibroso (T.C). C. Coto esquerdo. 30 dias. Discreta neoformação indicado pela seta. HE, aumento original de 10X..... 64
- Figura 8:** 7 dias. A. Ilha de neoformação óssea entre perióstio e membrana, vascularização regional. B. Tecido de granulação, alta vascularização com fibras colágenas organizadas paralelamente ausência de infiltrado inflamatório. C. Vasos sanguíneos e tecido de granulação. D. Membrana com invasão de vasos sanguíneos e células sanguíneas. HE, aumento de 40x. .... 64
- Figura 9:** 15 dias. A. Fragmentos de membrana no interior do tecido ósseo neoformado (TON). B. Centro do defeito, ilhas de neoformação óssea no interior da membrana e tecido conjuntivo organizado. C. membrana parcialmente absorvida com áreas de TON, presença de vasos sanguíneos. HE, aumento original 10x..... 65
- Figura 10:** 15 dias. Centro do defeito, partículas de membrana (M), TON e vasos sanguíneos. HE, aumento original 40x ..... 65
- Figura 11:** 30 dias. A. Centro do defeito com membrana presente, tecido conjuntivo organizado, alta vascularização. B. Próximo ao coto, área de TON entremeado por tecido conjuntivo. HE, aumento original 10x ..... 66
- Figura 12:** 30 dias. A. Centro do defeito com membrana presente, tecido conjuntivo organizado, alta vascularização. B. Próximo ao coto, área de TON entremeado por tecido conjuntivo. HE, aumento original 40x ..... 66

- Figura 13:** 60 dias. A. TON maduro entremeado por tecido conjuntivo e remanescentes de membrana. B. Centro do defeito fechado. HE, aumento original 5x..... 67
- Figura 14:** 60 dias. A. TON maduro entremeado por tecido conjuntivo e remanescentes de membrana. B. Centro do defeito fechado. HE, aumento original 40x..... 67
- Figura 15:** 30 dias. A. Observa-se o limite da osteotomia e tecido ósseo neoformado em direção ao centro do defeito ósseo. É possível notar remanescentes do colágeno da membrana no tecido ósseo neoformado. B. No centro do defeito ósseo, observa-se o seu reparo total. C. Em direção ao centro do defeito ósseo, observa-se tecido ósseo neoformado desenvolvendo-se no interior da membrana e mais ao centro, tecido ósseo mais desenvolvido (maduro) tendo ainda algumas áreas de tecido conjuntivo no seu interior D. No lado contralateral, observa-se tecido ósseo neoformado a partir do coto ósseo como também no interior da membrana. A imagem assinalada no interior do tecido ósseo neoformado sugere que houve reabsorção da membrana e remanescentes dela encontram-se incrustadas nele. HE, aumento original 40x. .... 68
- Figura 16:** 30 dias A. Observa-se remanescentes da membrana (M) entre as formações ósseas na região central do defeito ósseo (HE, aumento original 100x). B. – Remanescentes da membrana (M) observados na figura 15 (HE, aumento original 100x). .... 68
- Figura 17:** 60 dias – A: Observa-se a região onde foi realizada a osteotomia e a neoformação óssea no interior da membrana em direção ao centro do defeito além de remanescentes da membrana transpassando a margem do defeito (da osteotomia). B: Centro do defeito ósseo com reparo parcial. C: Região contralateral mostrando a região onde foi realizada a osteotomia e o tecido ósseo neoformado em direção ao centro do defeito ósseo (HE, aumento original 40x). (HE, aumento original 40x). .... 69
- Figura 18:** 60 dias. Observa-se o tecido ósseo neoformado no interior da membrana (M) (HE, aumento original 100x) ..... 69

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

<b>Tabela 1:</b> Comparação de Grupo x Tempo .....	44
<b>Tabela 2:</b> Scores representativos relacionados à imunomarcação das proteínas OC e OP referente aos GCB e GCP, sendo os scores classificados como nulo (0), leve (+), moderado (++) e intenso (+++). .....	48
<b>Gráfico 1:</b> Área de Osso neoformado para os grupos experimentais. ....	44

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<i>ROG</i>	Regeneração Óssea Guiada
<i>CEUA</i>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<i>g</i>	Gramas
<i>DOC</i>	Defeito Ósseo Crítico
<i>mm</i>	Milímetros
<i>GC</i>	Grupo Coágulo
<i>GCB</i>	Grupo Colágeno Bovino
<i>GCP</i>	Grupo Colágeno Porcino
mg	Miligramas
Kg	Quilogramas
cm	Centímetros
nº	Número
mL	Mililitros
HE	Hematoxilina e Eosina
OC	Osteocalcina
OP	Osteopontina
AON	Área de Neoformação Óssea
TON	Tecido Ósseo Neoformado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>27</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 Membrana Colagenosa Bovina – LUMINA-COAT®</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 Amostragem</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3 Cirurgia Experimental</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4 Análise Histomorfométrica</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5 Análise Estatística</b> .....	<b>34</b>
<b>3.6 Análise Imunoistoquímica</b> .....	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 Análise Histomorfométrica</b> .....	<b>38</b>
4.1.1 GC (Figura 3) .....	38
4.1.2 GCB (Figura 3) .....	39
4.1.3 GCP (Figura 3) .....	39
<b>4.2 Análise Estatística</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3 Análise Imunoistoquímica</b> .....	<b>44</b>
4.3.1 OC – GCB (Figura 4, Tabela 2).....	45
4.3.2 OC GCP (Figura 4, Tabela 2).....	45
4.3.3 OP – GCB (Figura 5, Tabela 2).....	46
4.3.4 OP – GCP (Figura 5, Tabela 2).....	47
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>ANEXO I: COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	<b>63</b>
<b>ANEXO II: LÂMINAS HISTOLÓGICAS EM MAIOR AUMENTO</b> .....	<b>64</b>
<b>A.II.1 Grupo Coágulo (GC) (Sem Membrana)</b> .....	<b>64</b>
<b>A.II.2 Grupo Colágeno Bovino (GCB) (Lumina-Coat® - Criteria Biomateriais)</b> ...	<b>64</b>
<b>A.II.3 Grupo Colágeno Porcino (GCP) (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen)</b> .....	<b>68</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios tanto da odontologia quanto da medicina é a procura de substitutos ósseos que cumpram as exigências para reconstrução físico-biológica de defeitos ósseos causados por alterações traumáticas, fisiológicas ou razões patológicas<sup>(1, 2)</sup>.

A regeneração óssea guiada (ROG), é uma técnica empregada para facilitar a regeneração óssea, 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 óssea<sup>(3)</sup>. Isso porque, durante a cicatrização, o tecido epitelial migra rapidamente para a ferida, o que torna a regeneração óssea mais difícil<sup>(4)</sup>. Entre as principais propriedades que as membranas e/ou barreiras devem ter são: osteopromoção, biocompatibilidade, não citotoxicidade e estabilidade mecânica, ou seja, capacidade de manter espaço durante o processo de reparo ósseo<sup>(5-7)</sup>.

Um dos primeiros trabalhos a estudarem esse processo de ROG foi descrito por Dahlin et al (1990)<sup>(8)</sup> que avaliaram o potencial de regeneração óssea por meio do uso de membranas em defeitos criados e preenchidos por tecido conjuntivo fibroso. Após 12 semanas tal tecido foi removido e os defeitos foram recobertos com membranas. Após seis semanas, todos os defeitos estavam preenchidos por tecido ósseo.

Desta forma a membrana é colocada em contato direto com o defeito ósseo circundante posicionando o periósteo sobre a mesma. A literatura mostra que certos tecidos no interior do organismo possuem potencial biológico para regeneração, sempre que exista um ambiente adequado durante a cicatrização<sup>(9)</sup>. As principais



indicações do uso das membranas biológicas em processos de ROG são: correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais<sup>(10)</sup>; alvéolos após exodontias<sup>(11)</sup>; deiscência e fenestrações após colocação de implantes mediatos e imediatos<sup>(11)</sup>.

Para neoformação óssea ser completa pela ROG, devem existir as seguintes condições: fonte de células osteogênicas (osso viável adjacente ao defeito); fonte adequada de vascularização; o local da ferida deve permanecer mecanicamente estável durante a cicatrização, já que os micro movimentos poderão influenciar no tecido a ser formado, deve existir um espaço apropriado entre a membrana e a superfície óssea, impedindo o colapso da membrana neste espaço (sendo este espaço crítico) e desta forma que este seja preenchido por um coágulo sanguíneo, já que nele as células osteogênicas irão se multiplicar; as membranas devem possuir propriedades de permeabilidade que permita a difusão de plasma e nutrientes, porém não a passagem de células não osteogênicas; biocompatibilidade da membrana; proteger a delicada rede vascular durante a organização do coágulo<sup>(12)</sup>.

Segundo Andrade-Acevedo et al. (2004)<sup>(13)</sup> os problemas mais frequentemente associados à ROG e uso de membranas são: colapso total ou parcial da membrana; exposição da membrana por deiscência do tecido mole (infecção local); baixo nível de habilidade técnica do profissional. Entre as possibilidades existentes no mercado de membranas temos as absorvíveis e não absorvíveis. As primeiras membranas para ROG foram as não reabsorvíveis. Elas requeriam uma cirurgia subsequente para removê-las e eram frequentemente associadas à exposição, que conseqüentemente arriscava o sucesso clínico<sup>(14)</sup>. Atualmente, o material de membrana mais pesquisado e utilizado em procedimentos de ROG é constituído por uma estrutura especificamente formada por politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), que não pode ser quebrada quimicamente em condições fisiológicas. Apesar da alta

previsibilidade de regeneração óssea com utilização de membranas de e-PTFE, a principal desvantagem é que sua exposição pode causar contaminação bacteriana. A reação inflamatória da área pode levar a necessidade de remoção precoce da membrana<sup>(15)</sup>. Vários autores têm relatado uma redução na quantidade de osso regenerado nessas situações<sup>(15-17)</sup>.

Com relação as membranas absorvíveis, estas devem sofrer reabsorção e degradação macromolecular por meio da associação de hidrólise e degradação enzimática, processo que ocorre na presença de enzimas como a fosfatase ácida e collagenase. A bioreabsorção requer total eliminação dos produtos da degradação sem efeitos residuais locais<sup>(18)</sup>. Estas membranas foram criadas no intuito de eliminar um segundo tempo cirúrgico. Além disso, esses biomateriais têm sido alvo de intensa investigação. Uma nova geração de membranas constituídas de copolímero de poliláctico e poliglicólico e as de ácido poliláctico estão sendo estudadas<sup>(14)</sup>.

Entre as membranas hoje disponíveis no mercado temos as membranas de colágeno que atendem grande parte dos requisitos por serem biocompatíveis, hemostáticas, além de promoverem quimiotaxia para fibroblastos e osteoblastos, e serem semi-permeáveis permitindo a transferência de nutrientes<sup>(19-24)</sup>, e significativa reparação de defeitos intraósseos no periodonto<sup>(25)</sup> e, quando associadas a vários tipos de enxertos ósseos, podem melhorar a eficácia dos mesmos, aumentando a capacidade de estimular o reparo dos tecidos periodontais<sup>(26-28)</sup>.

Dentre as membranas de colágeno existentes no mercado, a que se destaca no mercado é a Bio-Gide<sup>®</sup>, que tem como desvantagem o alto custo. Atualmente, busca-se alternativas para auxiliar reparo do tecido ósseo e também diminuir o custo para o paciente com biomateriais de alto desempenho e custo reduzido<sup>(29)</sup>.

A membrana de colágeno bovino Lumina-coat<sup>®</sup>, é usada para regeneração de tecido oral, previne a permeação de tecido mole para dentro do defeito ósseo e fornece guia para a formação adequada de osso, tecido mole e o desenvolvimento de vasos sanguíneos, vascularizando-se homoganeamente durante o processo de cicatrização e levando a uma boa integração da membrana com o tecido adjacente, e apresenta um custo reduzido<sup>(30)</sup>.

Devido à osteopromoção da membrana, seu mecanismo de ação, na formação do novo tecido ósseo, apresenta características hidrófilas absorvendo o sangue na estrutura e carrega as células proteicas morfogenéticas; capacita a ação das células carregadas em sua estrutura para o estímulo da formação de tecido calcificado ao redor de suas fibras; após a formação da estrutura calcificada no local do sítio do defeito ósseo original, suas fibras passam a compor o tecido vivo neoformado<sup>(31)</sup>.

## **2 OBJETIVO**

## **2 OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar por meio de análise histomorfométrica e imunohistoquímica o potencial de regeneração óssea guiada da membrana de colágeno bovino e de colágeno bovino no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Inicialmente o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-Unesp), protocolo FOA nº 01062-2017 (Anexo I)

#### **3.1 Membrana Colagenosa Bovina – LUMINA-COAT®**

Composição: colágeno tipo I na forma de fibras dispostas como formada no tecido ósseo de origem bovina utilizado como matéria prima. Material desenvolvido por Critéria Biomateriais Ltda, São Carlos, SP, Brasil.

#### **3.2 Membrana Colagenosa Porcina – BIO-GIDE®**

Membrana de colágeno suíno (tipo I e III) natural absorvível com dupla camada. A face lisa deve ficar voltada para o tecido mole e a face porosa para o defeito. A Geistlich Bio-Gide (*Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland*) adere ao defeito e resiste a tensões e rupturas.

#### **3.3 Amostragem**

Para o desenvolvimento deste projeto, foram utilizados um total de 72 ratos (*Rattus norvegicus albinus, Wistar*), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em três grupos (n=24), 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, Brasil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água natural no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP.

Sendo assim, em cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico (DOC) na calvária (8 mm), onde todos foram preenchidos com coágulo sanguíneo, e divididos como discriminado a seguir:

- Grupo Coágulo (GC): sem aposição de membrana;
- Grupo Colágeno Bovino (GCB): aposição da membrana de colágeno bovino;
- Grupo Colágeno Porcino (GCP): aposição de membrana de colágeno porcino.

Em todos os grupos 6 animais foram submetidos à eutanásia em cada período pós-operatório para a análise.

### **3.4 Cirurgia Experimental**

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, Quetamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 40-87mg.Kg<sup>-1</sup> e 5-13mg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Adotou-se 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. Em seguida a tricotomia na região da calvária, antissepsia com



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

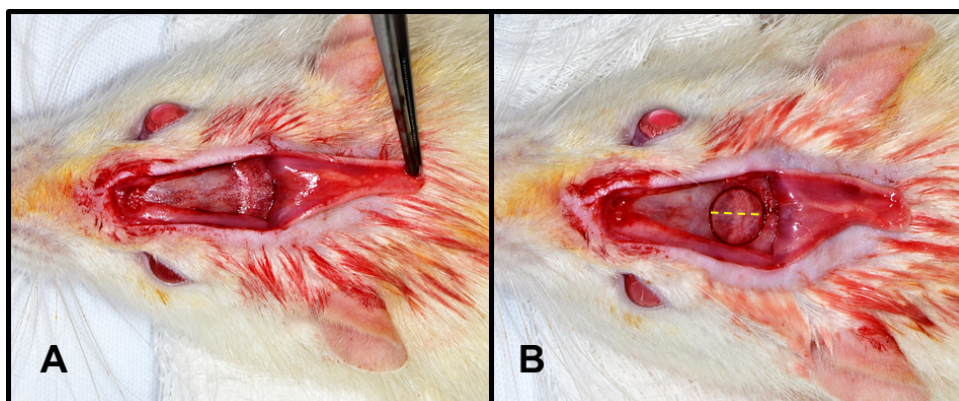
Foi realizado uma incisão em V de aproximadamente dois centímetros, com lâmina nº 15 (Swann-Morton Limited, Sheffield, Reino Unido) montada em cabo de bisturi nº 3 (Quinelato - Avenida Pennwalt, 285, Rio Claro, SP - Brasil) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Descolador de Molt, Quinelato - 18cm. nº 09. Avenida Pennwalt, 285, Rio Claro, SP - Brasil). Em seguida com auxílio de broca trefina de 7mm de diâmetro interno (Harte Instrumentos Cirúrgicos - Rua Bernardo Gonçalves, 112 Jd. Roberto Benedetti, Ribeirão Preto, SP - Brasil) acoplada em contra ângulo (Contra ângulo cirúrgico NSK 20:1 SG20 – Elly-Beinhorn-Strasse 8, Eschborn - Alemanha) com redução 20:1 a 800 rotações por minuto sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Lab Sanobiol, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil), confeccionado um DOC de 8mm de diâmetro, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 1). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo, sem aposição de membrana (GC), membrana de colágeno bovino (GCB) e membrana de colágeno porcino (GCP) sobre o defeito.

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados empregando-se o fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos.

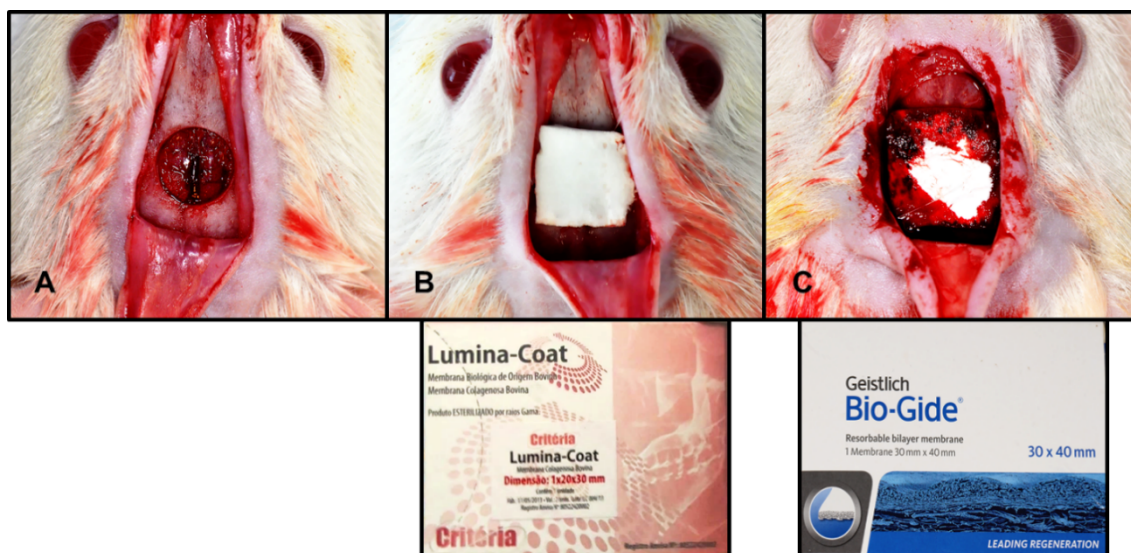
No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,1 mg/mL de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP), mantidos em gaiolas durante todo o

experimento com ração e água natural, e submetidos à eutanásia nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico.

**Figura 1:** A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representada pela linha tracejada amarela.



**Figura 2:** Defeito crítico de 8mm. A. Coágulo. B. Membrana de cortical bovina (Critéria Biomateriais Ltda, São Carlos, SP, Brasil). C. Membrana de colágeno porcino (Bio-Gide® Geistlich Wolhusen, Switzerland).



As calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas,

descalcificadas em EDTA 20% por 7 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos. As peças obtidas incluídas em parafina separadamente e fez-se cortes de 6 µm de espessura e montagem das lâminas. Em seguida separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

### **3.5 Análise Histomorfométrica**

As imagens das lâminas coradas com HE foram obtidas por meio do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbrugg, Switzerland) com o auxílio de lentes objetivas Carl Zeiss (2.5X0.07, 5X0.12, 10X e 40X0.65) acoplado a uma câmera de captação de imagem e conectado a um computador (Configuração: Intel Core i5<sup>®</sup> com sistema operacional Windows 7<sup>®</sup>) e Software para processamento e análise de imagens (AxioVision 4.9.1<sup>®</sup>0, Carl Zeiss by Imaging Associates Ltd, Jena, Deutschland).

As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos TIFF. A análise histomorfométrica foi realizada com as imagens obtidas com objetiva de 2.5X0.07, posteriormente montada as imagens panorâmicas das lâminas através do software Photoshop CS6, pela ferramenta Photomerge. Foi avaliado a área de tecido ósseo presente ao longo de toda imagem panorâmica obtida da lâmina excluindo apenas a área óssea dos cotos.

### **3.6 Análise Estatística**

Os dados obtidos nas análises foram convertidos em valores absolutos, de pixels, para valores percentuais relativos, 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 de homocedasticidade, para posterior aplicação do teste mais adequado (paramétrico ou não paramétrico), dependendo da distribuição dos dados na curva de normalidade. Utilizando o programa estatístico para pesquisa biológica Sigma Plot 12.3 (Systat Software, Inc., San Jose Califórnia, USA), em que foi adotado como nível de significância  $p < 0,05$  para todos os testes.

### **3.7 Análise Imunoistoquímica**

A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteocalcina (OC) e osteopontina (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto ao processo de mineralização óssea (OC) e regeneração óssea (OP).

Foram realizados experimentos de imunoistoquímica utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. Foi utilizado o anticorpo secundário biotinilado anti-cabra produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories) e o amplificador do sinal da marcação foi a Avidina Biotina (Kit Elite, Vector Laboratories), tendo a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno.

Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas semi-quantitativamente pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com

o número de células imunomarcadas no processo de reparo ósseo relacionado as membranas.

A análise foi realizada através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representam: marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), que sabidamente estarão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo, e serão consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos<sup>(32)</sup>.

## **4 RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise Histomorfométrica

#### 4.1.1 GC (Figura 3)

7 Dias: A cito arquitetura óssea apresentou hipervascularização na região do defeito ósseo e já com a presença de atividade fibroblástica.

15 Dias: Nota-se a borda do defeito ósseo indo em direção ao centro da ferida, neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, rico em osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. A neoformação óssea somente foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central. As lâminas analisadas revelaram abundante tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblastos e pouca matriz extracelular preenchendo a região central da ferida.

30 Dias: Presença de área óssea neoformada mais próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes apresenta-se preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado.

60 Dias: Nota-se preenchimento do defeito com tecido conjuntivo imaturo e presença de infiltrado inflamatório, sem sinais de neoformação óssea, comprovando ser um defeito crítico.

Ao analisar a fotomicrografia em maior aumento, nota-se a presença de tecido conjuntivo maduro, com presença de fibras colágenas e ausência de infiltrado inflamatório com discretas áreas de tecido osteóide (Figuras Anexo II).

#### 4.1.2 GCB (Figura 3)

7 Dias: Nota-se um tecido de granulação bem organizado sem sinais de processo inflamatório, membrana adaptada sobre o defeito com invasão celular.

15 Dias: Presença de tecido de granulação entremeado por tecido ósseo neoformado, junto ao coto, centro do defeito apresenta um tecido conjuntivo organizado, membrana ainda presente com ilhas de neoformação óssea em seu interior.

30 Dias: Nota-se a presença de tecido ósseo neoformado no centro do defeito e também há presença de partículas da membrana.

60 Dias: Presença de tecido ósseo neoformado maduro entremeado por tecido conjuntivo e sem remanescentes da membrana, presença de vasos sanguíneos em meio as áreas ósseas neoformadas.

Em análise da fotomicrografia em maior aumento, nota-se a presença de tecido ósseo jovem e maduro entremeado com tecido conjuntivo, presença de fibras colágenas, alta vascularização e ausência de infiltrado inflamatório, remanescentes de membrana (Figuras Anexo II).

#### 4.1.3 GCP (Figura 3)

7 Dias: Nota-se a presença da membrana de colágeno porcino em todo defeito preenchido por um tecido altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório.

15 Dias: Presença de 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.

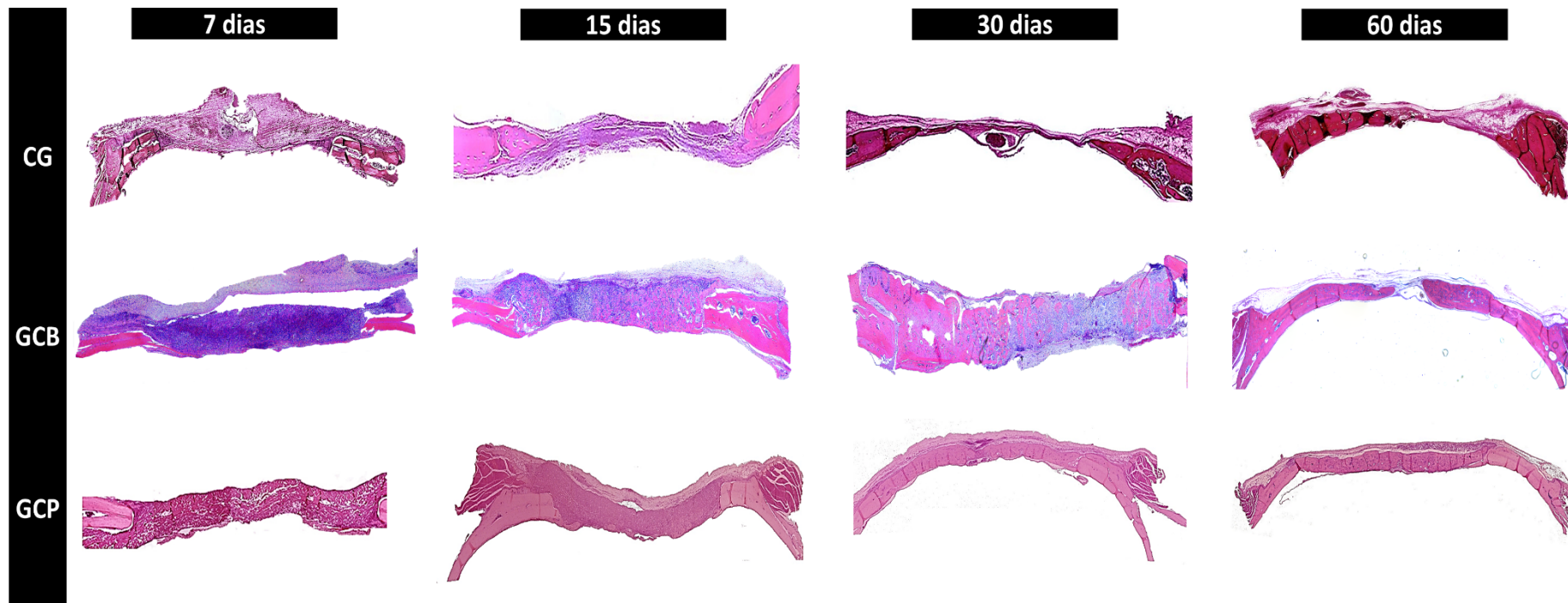


30 Dias: Nota-se uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana de colágeno porcino.

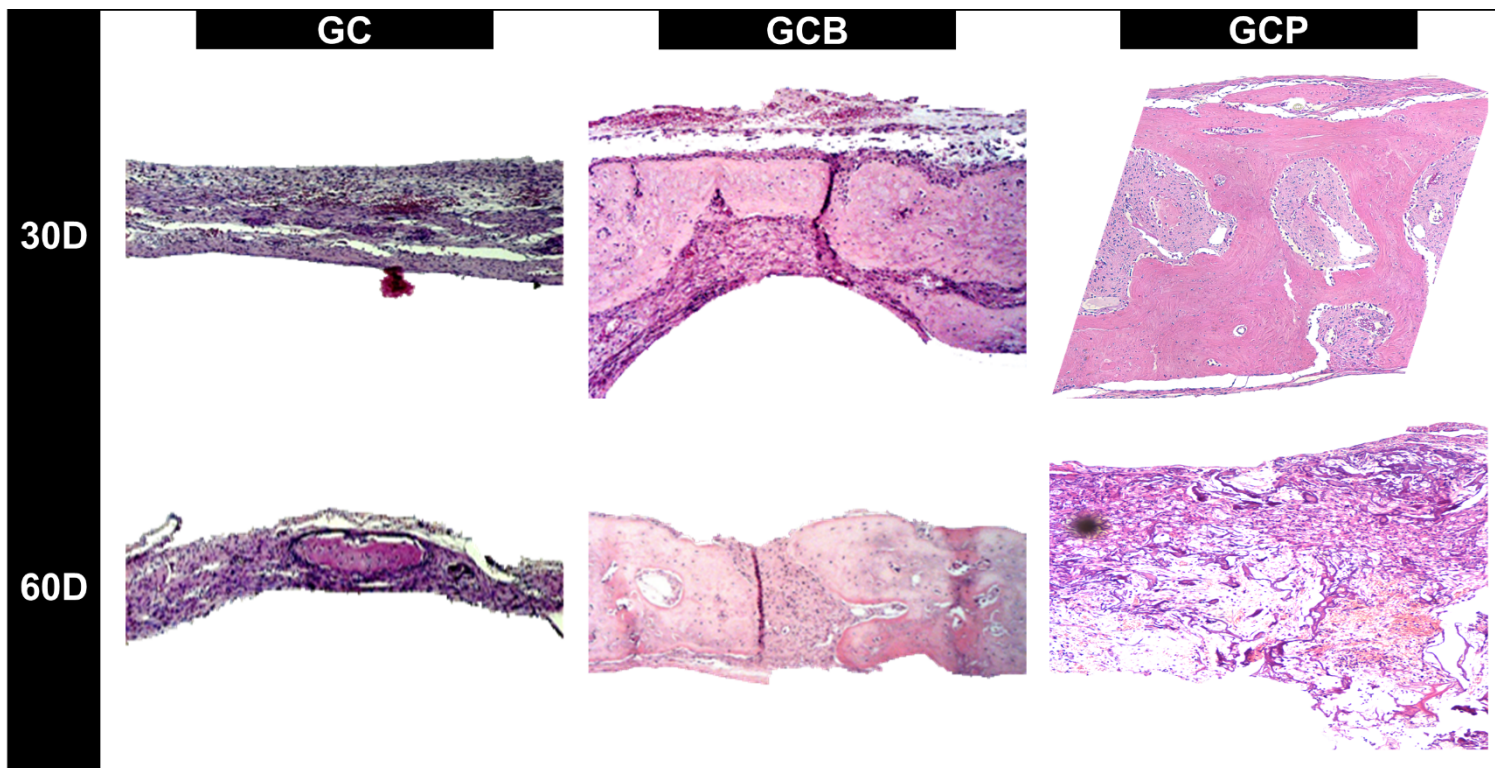
60 Dias: Aspecto de fechamento completo do defeito em alguns espécimes, e em outros o defeito praticamente fechado, sem presença de remanescentes de membrana.

Na observação das lâminas em um aumento de 40x 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 (Figuras Anexo II).

**Figura 3:** Fotomicrografias dos cortes histológicos em menor aumento (2,5x) referente aos grupos experimentais (GC; GCB; GCP) em todos os períodos analisados (7, 15, 30 e 60 dias), nos quais observamos a capacidade de reparação óssea de cada membrana.



**Figura 4:** Fotomicrografias de cortes corados com HE, 30 e 60 dias pós-operatório em maior aumento (GC, GCB, GCP). Aumento original de 12,5X



## 4.2 Análise Estatística

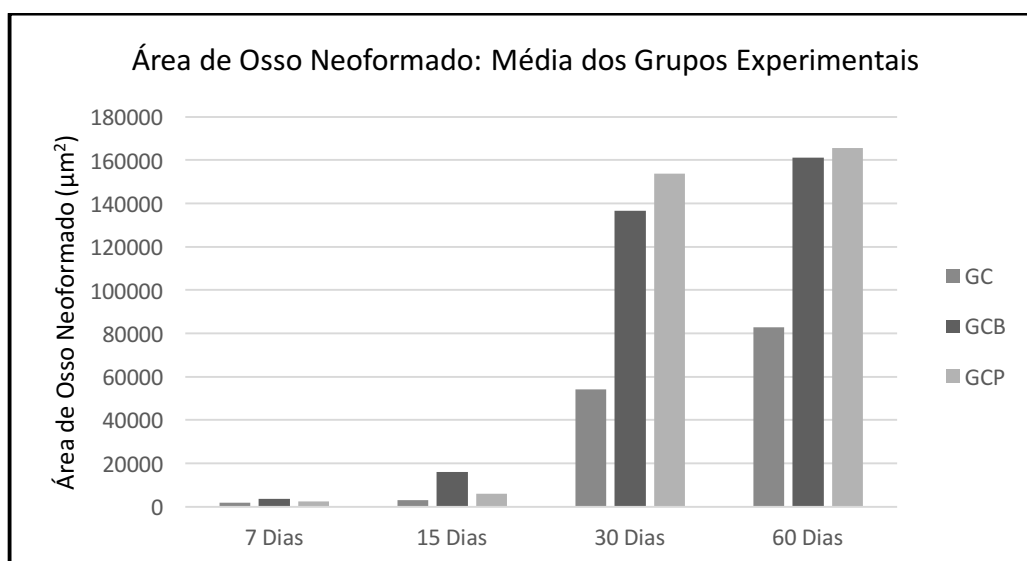
Todos os testes foram realizados no programa estatístico Sigma Plot 12.3 (Systat Software, Inc., San Jose Califórnia, USA). Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), o qual não identificou dados homogêneos ( $p < 0,05$ ), ou seja, o teste falhou. Assim, o teste Kruskal-Wallis foi aplicado, e todas as interações que mostraram alterações significantes estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, para a identificação precisa das alterações estatísticas, o pós-teste Tukey foi aplicado, considerando nível de significância de 5%.

Na avaliação histométrica da evolução cronológica do reparo ósseo (análise intragrupos), o grupo experimental (GCB) apresentou maior área de neoformação óssea aos 60 dias em comparação aos outros períodos analisados (7, 15 e 30 dias) ( $p < 0,05$ ). No entanto, não houve diferença estatística na formação de osso comparando o período de 30 dias com o último período analisado ( $p = 0,745$ ). Comparando com os grupos controles, os resultados do GC (controle negativo) e GCP (controle positivo) se mostraram similares entre os períodos 7 e 15 dias ( $p = 0,985$ ), e entre 30 e 60 dias ( $p = 0,422$ ), apresentando diferença apenas quando é comparado os dois períodos iniciais com os dois períodos finais ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 1).

Os maiores valores de AON foram observados para o GCP que foi similar em 30 e 60 dias ( $p = 0,721$ ), houve similaridade entre os grupos CB e CP nos períodos de 30 ( $p = 0,762$ ) e 60 dias ( $p = 0,980$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Comparação de Grupo x Tempo

Resultado de Grupo x Tempo	
<b>7 Dias</b>	p>0,05 (similares)
<b>15 Dias</b>	p>0,05 (similares)
<b>30 Dias</b>	(GCB = GCP (p=0,762)) > GC (p<0,05)
<b>60 Dias</b>	(GCB = GCP (p=0,980)) > GC (p<0,05)

**Gráfico 1:** Área de Osso neoformado para os grupos experimentais.

### 4.3 Análise Imunoistoquímica

As imunomarcações foram avaliadas na região central do defeito crítico, e com o objetivo de caracterizar as etapas de neoformação óssea foi utilizada a proteína (OP) e para mineralização óssea foi utilizada a proteína (OC). A (OC) apresenta-se marcada em osteoblastos na etapa final de mineralização, caracterizando um tecido ósseo mais maduro, enquanto a (OP), apresenta-se marcada positivamente em osteócitos, sendo, portanto, um marcador de tecido ósseo imaturo/jovem.

#### 4.3.1 OC – GCB (Figura 4, Tabela 2)

7 dias: Foi possível observar a presença de marcação positiva moderada para esta proteína próximo aos cotos e no centro do DOC, na forma de precipitados sobre o tecido ósseo formado, nos osteócitos e em células do tecido conjuntivo, evidenciando uma possível atividade osteoblástica.

15 dias: Foi possível observar matriz extracelular marcada positivamente vindo do coto em direção ao centro do DOC, com score moderado.

30 dias: Foi possível observar trabéculas ósseas em formação e marcação positiva com score moderado.

60 dias: Foi possível observar imunomarcação moderada a intensa, evidenciando a maturação óssea e o fechamento do defeito.

#### 4.3.2 OC GCP (Figura 4, Tabela 2)

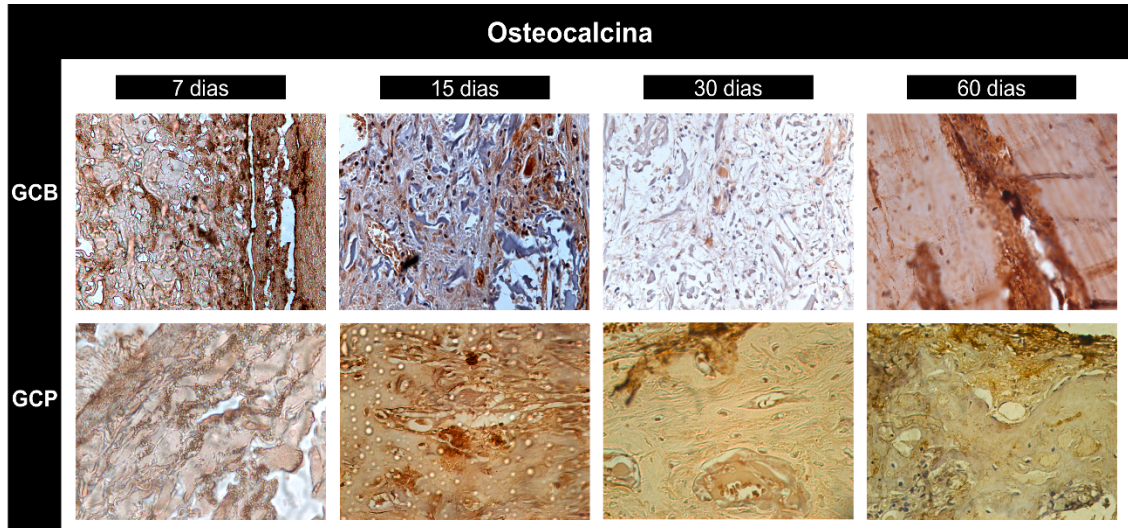
7 dias: Neste grupo foi possível observar imunomarcação com score moderado na matriz extracelular, para esta proteína.

15 dias: Foi possível observar imunomarcação com score moderado na matriz extracelular.

30 dias: Foi possível observar imunomarcação com score leve na matriz extracelular, e moderada nos cotos do DOC.

60 dias: Foi possível observar imunomarcação com score leve na matriz extracelular, e trabéculas ósseas mais organizadas.

**Figura 5:** Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 40x ao centro do DOC referente aos GCB e GCP nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de reparação, denotando áreas de expressão da proteína OC.



#### 4.3.3 OP – GCB (Figura 5, Tabela 2)

7 dias: Matriz extracelular imunomarcada positivamente com score moderado, evidenciando o início do processo de formação óssea.

15 dias: Foi possível observar imunomarcacão leve, com poucas células marcadas.

30 dias: Foi possível observar imunomarcacão leve em algumas áreas de matriz extracelular, e também algumas células.

60 dias: Foi possível observar matriz extracelular com imunomarcacão moderada.

#### 4.3.4 OP – GCP (Figura 5, Tabela 2)

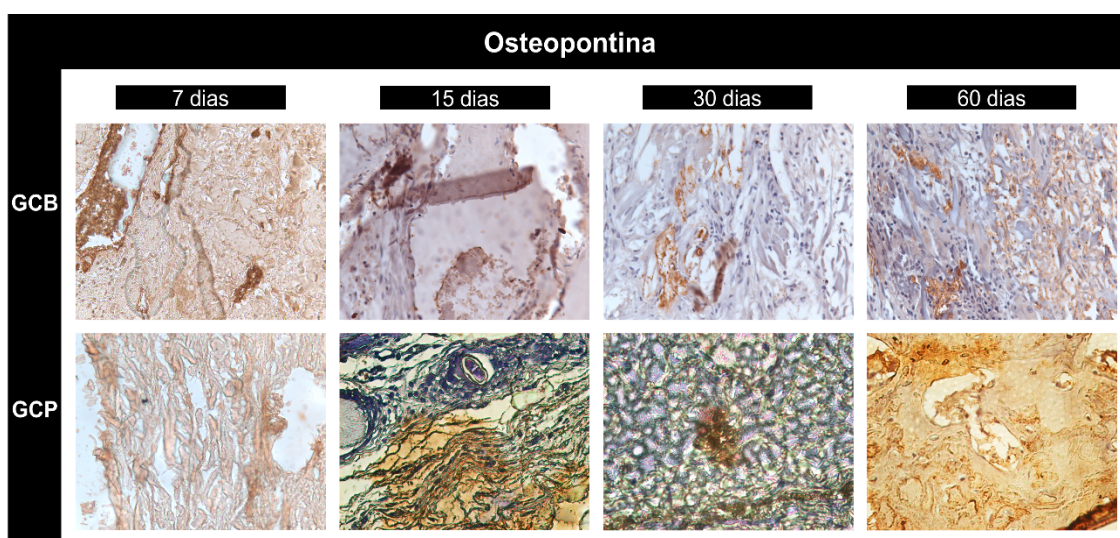
7 dias: Neste grupo foi possível observar matriz extracelular imunomarcada positivamente com score moderado, evidenciando o início do processo de formação óssea.

15 dias: Imunomarcção moderada para esta proteína.

30 dias: Foi possível observar imunomarcção leve para esta proteína.

60 dias: Foi possível observar imunomarcção leve para esta proteína, marcando já um processo de maturação óssea, onde há ocorre menor marcação para esta proteína.

**Figura 6:** Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 40x ao centro do DOC referente aos GCB e GCP nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de reparação, denotando áreas de expressão da proteína OP.





**Tabela 2:** Scores representativos relacionados à imunomarcção das proteínas OC e OP referente aos GCB e GCP, sendo os scores classificados como nulo (0), leve (+), moderado (++) e intenso (+++).

Groups	OC	OP
GCB 7D	++	++
GCB 15D	++	+
GCB 30D	++	+
GCB 60D	+++	++
GCP 7D	++	++
GCP 15D	++	++
GCP 30D	+++	+
GCP 60D	+++	+

## **5 DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

O principal objetivo da ROG é obter um osso com volume e qualidade adequado na área de defeito crítico com alta previsibilidade e baixo risco de complicações. Secundariamente, a ROG é utilizada afim de obter um bom resultado com menos intervenções cirúrgicas, baixa morbidade para o paciente e um período de reparo reduzido. Sabe-se que nos últimos 20 anos, houve avanços significativos no desenvolvimento de técnicas e materiais para a ROG ocorra de forma previsível<sup>(33, 34)</sup>.

Os defeitos ósseos considerados de tamanho crítico são aqueles que não são capazes de se regenerar espontaneamente ao longo da vida do animal, ou seja, sem o auxílio de um biomaterial ou uma membrana para osteocondução. Portanto, a utilização dos biomateriais e/ou enxertos autógenos são materiais capazes de auxiliar no reparo ósseo, desta forma estes reparos serão significativamente superior quando comparados ao com um reparo somente utilizando-se o coágulo<sup>(35)</sup>. O defeito ósseo criado neste estudo, medindo 8 mm de diâmetro externo, é considerado crítico, de acordo com vários trabalhos<sup>(35-37)</sup>, incluindo os resultados aqui apresentados, uma vez que foi possível verificar tanto pela análise histológica como pela análise histométrica que o defeito não conseguiu ser reparado. Assim, a utilização de um grupo controle negativo (coágulo sem membrana) tem por objetivo avaliar e comparar como ocorre a reparação de maneira padrão, isto é, a formação óssea é restrita às margens dos defeitos e o centro é preenchido por um tecido conjuntivo fibroso.

Quando adicionamos a barreira mecânica ou seja, uma membrana, espera-se que ocorra um aumento na quantidade de osso neoformado e portanto maior área de regeneração tecidual, sendo maior neoformação óssea se comparado ao controle<sup>(9)</sup>. Assim, quando estudamos o uso de diferentes membranas, o que se

deseja avaliar é se o processo de ROG ocorre de maneira diferente entre elas e se a quantidade e/ou a qualidade de osso neoformado é a mesma.

Hoje temos uma grande variedade de membranas para ROG que estão disponíveis no mercado. A seleção da membrana a ser utilizada deve basear-se nas necessidades clínicas e deve conter propriedades básicas, como biocompatibilidade, oclusão celular, integração tecidual, formação e manutenção de espaço, facilidade de manuseio e susceptibilidade limitada a complicações<sup>(38-41)</sup>.

As membranas de colágeno são obtidas por meio de diferentes tecidos animais (tendão, pele, intestino), bovino ou suíno<sup>(38, 42)</sup>. Embora o colágeno tenha inúmeras vantagens, como baixa imunogenicidade, atração de fibroblastos gengivais e biocompatibilidade<sup>(41, 42)</sup>, a taxa de degradação é alta e pode não ser mantida por tempo suficiente para adequada reparação tecidual<sup>(38)</sup>. A previsibilidade da membrana de colágeno depende não apenas do tipo de colágeno que compreende, mas também dos processos químicos e físicos aos quais esse colágeno foi submetido para eliminar impurezas, estabilizar as fibras e assim melhorar suas propriedades mecânicas e reduzir a velocidade de degradação do colágeno<sup>(38, 41, 42)</sup>.

Com os resultados obtidos nesta pesquisa foi possível observar que a membrana do GCP (Bio-Gide<sup>®</sup>) manteve seu alto nível de atuação já tão bem descrito na literatura<sup>(43-46)</sup>. A membrana usada no GCP, tem composição baseada nos colágenos puros, tipos I e III de origem suína, sem reticulação ou aditivos químicos, que são refinados para remover antígenos<sup>(47)</sup>. O período de degradação descrito em a literatura varia de 8 semanas<sup>(48)</sup> em 4-6 meses<sup>(47, 49, 50)</sup>. Neste estudo, foi observada a presença da membrana nos quatro períodos avaliados por meio da análise morfológica e não foi observada a presença de células gigantes assim como também não foi possível observar reação inflamatória aguda. Sua reabsorção ocorreu em

forma de grumos sugerindo reabsorção parcial (cerca de 8 semanas) e penetração de tecido ósseo, provavelmente devido a sua alta permeabilidade o que permite a penetração de sangue no seu interior. Aos 30 e 60 dias, mais defeitos foram fechados, e o volume ósseo obtido aos 30 dias parece ser mantido até o final do processo de reparo aos 60 dias<sup>(43, 49)</sup>.

A membrana utilizada no grupo experimental GCB (Lumina-coat<sup>®</sup>) é composta por colágeno tipo I extraído da cortical óssea bovina descalcificada. O grupo CB apresentou tecido conjuntivo fibrocelular e apenas fragmentos da membrana de foram detectados no período de 30 dias e, menos frequentes ainda aos 60 dias. Esses resultados corroboram estudos prévios de Costa et al., Accorsi-Mendonca et al. e Bernabé et al., que observaram que aos 30 dias havia fragmentos de membrana<sup>(35)</sup> ou ausência completa deste<sup>(36, 51)</sup>.

No GCP, a neoformação óssea foi mais progressiva. Um processo de reabsorção mais lento foi observado através da análise microscópica em comparação ao GCB. A presença de células gigantes multinucleadas foram observadas na superfície externa da membrana no grupo GCB no período de 30 dias, o que sugere a reabsorção desse biomaterial, como relatado anteriormente<sup>(35)</sup>. Fato confirmado no período de 60 dias, onde pouco foi observado remanescentes de membrana.

Ao comparar a histometria dos grupos CB e CP, o segundo apresentou maior área de neoformação óssea em relação ao primeiro, o que pode estar diretamente relacionado ao tipo de degradação desta membrana onde é possível observar a presença dela ainda no período mais tardio e presença de células gigantes. Embora ocorra uma degradação mais rápida da membrana no GCP, esta assume sua função de forma adequada fazendo com que o volume total de osso formado aos 30 dias seja mantido até o final do reparo. Já a membrana de colágeno bovino embora

tenha seu remanescente presente aos 60 dias, sua função como “barreira” foi um pouco menor do que a do GCP, conseqüentemente permitiu o crescimento do tecido conjuntivo no centro do DOC e inibiu a neoformação óssea, por isso e não houve neoformação óssea completa que permitisse o fechamento do DOC.

A avaliação imunoistoquímica evidenciou comportamento biológico diferente entre os grupos CB e CP. O grupo CP apresentou alguns detalhes importantes, demonstrando eventos mais bem sequenciados, isso porque a osteopontina apresentou-se mais imunomarcada aos 7 e 15 dias onde de fato temos mais a presença de tecidos osteoide, e posteriormente aos 30 e 60 dias verifica-se somente com uma marcação leve. É nesse momento que a osteocalcina aumenta sua atividade e apresenta-se como uma imunomarcacão intensa, uma vez que já esta presente um tecido ósseo maduro. Em relação ao GCB. a proteína, osteopontina teve imunomarcacão leve aos 07 dias e moderada no período de 15 dias, mantendo-se desta forma até os 60 dias. Isso pode ser devido ao fato da hidrólise da membrana e a desorganização do tecido atrasando a maturação do osso na região. Quanto a marcação da osteocalcina para esse grupo manteve-se moderada nos períodos iniciais e passou a intensa aos 60 dias corroborando com os achados histométricos.

Uma das principais limitações encontradas neste estudo foi a falta de trabalhos utilizando a membrana de colágeno bovino deste experimento, provavelmente devido à sua recente comercialização. Os resultados desta pesquisa, demonstraram que essa membrana apresenta potencial para auxiliar o processo de ROG, não demonstrando diferença estatística na neoformação óssea em relação ao GCP, que é uma membrana já consagrada com estudos na literatura relatando sua eficácia.

## **6 CONCLUSÃO**

## **6 CONCLUSÃO**

Dentro da metodologia empregada foi possível concluir que as membranas estudadas nesta pesquisa promoveram ROG em defeitos críticos em calotas de ratos.



## REFERÊNCIAS

1. Rüedi TP, Bassett CA. Repair and remodeling in Millipore-isolated defects in cortical bone. *Acta Anat (Basel)*. 1967;68(4):509-31.
2. Dahlin C. Scientific background of guided bone regeneration. In: Dahlin C, Schenk R, editor. *Guided bone regeneration in implant dentistry*. Chicago: Quintessence; 1994. p. 31-48.
3. Bashutski JD, Wang HL. Periodontal and endodontic regeneration. *J Endod*. 2009 Mar;35(3):321-8.
4. Cortell-Ballester I, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Effects of Collagen Resorbable Membrane Placement After the Surgical Extraction of Impacted Lower Third Molars. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Aug;73(8):1457-64.
5. Ignatius AA, Ohnmacht M, Claes LE, Kreidler J, Palm F. A composite polymer/tricalcium phosphate membrane for guided bone regeneration in maxillofacial surgery. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(5):564-9.
6. Kim HS, Kim JT, Jung YJ, Ryu SC, Son HJ, Kim YG. Preparation of a Porous Chitosan/Fibroin-Hydroxyapatite Composite Matrix for Tissue Engineering. *Macromol Res*. 2007;15(1):65-73.
7. Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, Koyama T, Nagatsuka H, Suzuki K, et al., Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. *Biomaterials*. 2002 May;23(9):2027-33.
8. Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*. 1990;24(1):13-9.

9. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1994;9(1):13-29.
10. Tonetti MS, Pini-Prato G, Cortellini P. Periodontal regeneration of human intrabony defects. IV. Determinants of healing response. *Journal of periodontology*. 1993;64(10):934-40.
11. Wilson GJ, MacGregor DC, Klement P, Weber BA, Binnington AG, Pinchuk L. A compliant Corethane/Dacron composite vascular prosthesis. Comparison with 4-mm ePTFE grafts in a canine model. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*. 1993;39(3):M526-31.
12. Phillips JH, Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone-graft resorption. *Plastic and reconstructive surgery*. 1988;82(5):872-7.
13. al. A-ARe. Bases clínicas e biológicas da regeneração óssea guiada (ROG) associada à barreiras ou membranas. *Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implantes* 2004;11:6.
14. Schmitz JP, Lemke RR, Zardeneta G, Hollinger JO, Milam SB. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a Guidor membrane for guided bone regeneration: case report. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(8):888-93.
15. Jovanovic SA, Nevins M. Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 1995;15(1):56-69.
16. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K, et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting

bone formation around immediate extraction socket implants. *Journal of periodontology*. 1992;63(11):929-40.

17. Simion M, Trisi P, Piattelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 1994;14(6):496-511.

18. Minabe M, Kodama T, Kogou T, Fushimi H, Sugiyama T, Takeuchi K, et al. Clinical significance of antibiotic therapy in guided tissue regeneration with a resorbable membrane. *Periodontal clinical investigations : official publication of the Northeastern Society of Periodontists*. 2001;23(1):20-30.

19. Alpar B, Leyhausen G, Günay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig*. 2000 Dec;4(4):219-25.

20. Locci P, Calvitti M, Belcastro S, Pugliese M, Guerra M, Marinucci L, et al. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *J Periodontol*. 1997 Sep;68(9):857-63.

21. Rothamel D, Schwarz F, Fienitz T, Smeets R, Dreiseidler T, Ritter L, Happe A, Zöller J. Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012 Jan-Feb;27(1):146-54.

22. Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials*. 1997 Apr;18(7):535-8.

23. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wüstefeld M, Sager M, Ferrari D, et al. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-

type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Apr;19(4):402-15.

24. Wang HL, Modarressi M, Fu JH. Utilizing collagen membranes for guided tissue regeneration-based root coverage. *Periodontol 2000.* 2012 Jun;59(1):140-57.

25. Chen CC, Wang HL, Smith F, Glickman GN, Shyr Y, O'Neal RB. Evaluation of a collagen membrane with and without bone grafts in treating periodontal intrabony defects. *J Periodontol.* 1995 Oct;66(10):838-47.

26. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Nedic M, Vasilic N, Wolinsky LE, et al. A controlled re-entry study on the effectiveness of bovine porous bone mineral used in combination with a collagen membrane of porcine origin in the treatment of intrabony defects in humans. *J Clin Periodontol.* 2000 Dec;27(12):889-96.

27. Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Simion M, Rasperini G, Lynch SE, et al. Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Gide. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998 Aug;18(4):321-31.

28. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):106-16.

29. Kuchler U, Rybaczek T, Dobask T, Heimel P, Tangl S, Klehm J, Menzel M, Gruber R. Bone-conditioned medium modulates the osteoconductive properties of collagen membranes in a rat calvaria defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Apr;29(4):381-388.

30. N6ia CF, Ortega-Lopes R, Kluppel LE, S6 BC. Sandwich Osteotomies to Treat Vertical Defects of the Alveolar Ridge. *Implant Dent.* 2017 Feb;26(1):101-105.

31. Nóia CO-L, R; Sá, BCM; Silveira CS; Oliveira Júnior HC. Tratamento da Atrofia Vertical Posterior de Mandíbula. 2016.
32. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Junior IR, et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(6):1233-40.
33. Park JW, Bae SR, Suh JY, Lee DH, Kim SH, Kim H, et al. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: a pilot study. *Journal of biomedical materials research Part A.* 2008;87(1):203-14.
34. Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clinical oral implants research.* 2009;20(4):372-8.
35. Costa NM, Yassuda DH, Sader MS, Fernandes GV, Soares GD, Granjeiro JM. Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm(R) membrane in rat calvarial defect model. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications.* 2016;61:63-71.
36. Accorsi-Mendonca T, Zambuzzi WF, Bramante CM, Cestari TM, Taga R, Sader M, et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. *Journal of materials science Materials in medicine.* 2011;22(4):997-1004.
37. Maciel J, Momesso GA, Ramalho-Ferreira G, Consolaro RB, Perri de Carvalho PS, Faverani LP, et al. Bone Healing Evaluation in Critical-Size Defects Treated With Xenogenous Bone Plus Porcine Collagen. *Implant dentistry.* 2017;26(2):296-302.

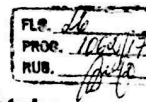
38. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *European journal of oral sciences*. 2017;125(5):315-37.
39. Chang H, Kim S, Hwang JW, Kim S, Koo KT, Kim TI, et al. Comparative, randomized, double-blind clinical study of alveolar ridge preservation using an extracellular matrix-based dental resorbable membrane in the extraction socket. *Journal of periodontal & implant science*. 2017;47(3):165-73.
40. Buser D, Bragger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clinical oral implants research*. 1990;1(1):22-32.
41. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *The open dentistry journal*. 2014;8:56-65.
42. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Grynypas M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials research*. 2017;21:9.
43. Behfarnia P, Khorasani MM, Birang R, Abbas FM. Histological and histomorphometric analysis of animal experimental dehiscence defect treated with three bio absorbable GTR collagen membrane. *Dental research journal*. 2012;9(5):574-81.
44. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *Journal of periodontology*. 2001;72(2):215-29.
45. Pati F, Datta P, Adhikari B, Dhara S, Ghosh K, Das Mohapatra PK. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2012;100(4):1068-79.

46. Vaissiere G, Chevallay B, Herbage D, Damour O. Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. *Medical & biological engineering & computing*. 2000;38(2):205-10.
47. Jiang X, Liu H, Peng C. Clinical and Radiographic Assessment of the Efficacy of a Collagen Membrane in Regenerative Endodontics: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *Journal of endodontics*. 2017;43(9):1465-71.
48. Schliephake H, Neukam FW, Hutmacher D, Becker J. Enhancement of bone ingrowth into a porous hydroxylapatite-matrix using a resorbable polylactic membrane: an experimental pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994;52(1):57-63.
49. Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology*. 2008;96(1):1-11.
50. Palachur D, Prabhakara Rao KV, Murthy KR, Kishore DT, Reddy MN, Bhupathi A. A comparative evaluation of bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) and type I collagen membrane (Bio-Gide) with bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) and fibrin fibronectin sealing system (TISSEEL) in the treatment of intrabony defects: A clinico-radiographic study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2014;18(3):336-43.
51. Bernabe PF, Melo LG, Cintra LT, Gomes-Filho JE, Dezan E, Jr., Nagata MJ. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clinical oral implants research*. 2012;23(3):384-8.

## ANEXO I: Comitê de Ética



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 "Análise histológica, histométrica, imunoistoquímica e micro-CT da osteopromoção em defeitos críticos em calvária de ratos com membrana de colágeno bovino e membrana de colágeno porcino", Processo FOA nº 01062-2017, 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 12 de Dezembro de 2017.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 01 de Fevereiro de 2020.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 01 de Março de 2020.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Histological, histometric, immunohistochemical and micro-CT analysis of osteopromotion in critical defects in calvaria of rats with bovine collagen membrane and porcine collagen membrane", Protocol FOA nº 01062-2017, 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 December 12, 2017.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** February 01, 2020.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** March 01, 2020.

Prof. Ass. Dr. **Renato Bassi Farnezi**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

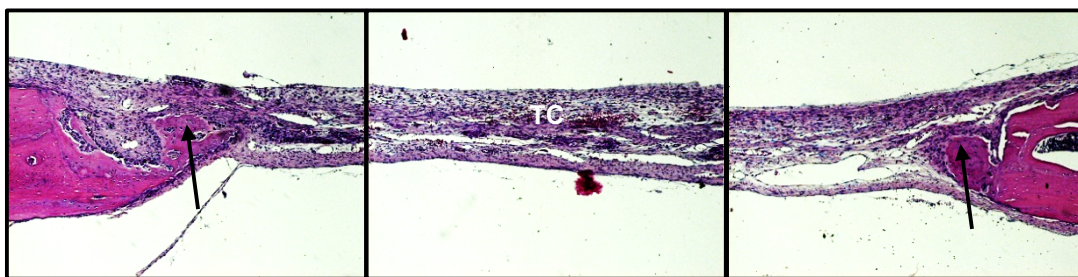
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br



## ANEXO II: Lâminas Histológicas em Maior Aumento

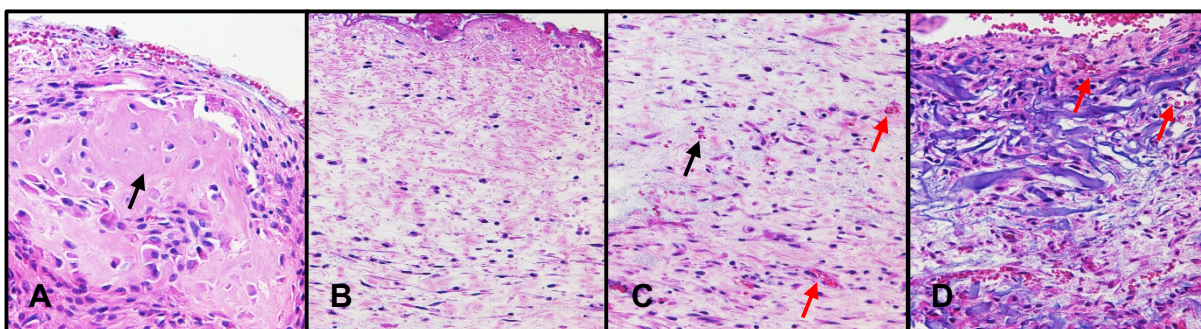
### A.II.1 Grupo Coágulo (GC) (Sem Membrana)

**Figura 7:** A. Coto direito. 30 dias. Discreta neoformação indicada pela seta. B. Centro do defeito. 30 dias. Ausência de crescimento ósseo. Formação de tecido conjuntivo fibroso (T.C). C. Coto esquerdo. 30 dias. Discreta neoformação indicado pela seta. HE, aumento original de 10X.

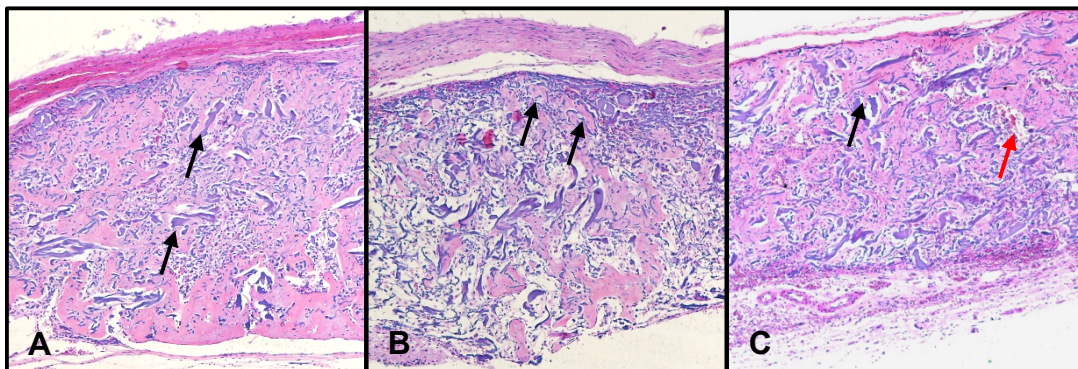


### A.II.2 Grupo Colágeno Bovino (GCB) (Lumina-Coat® - Criteria Biomateriais)

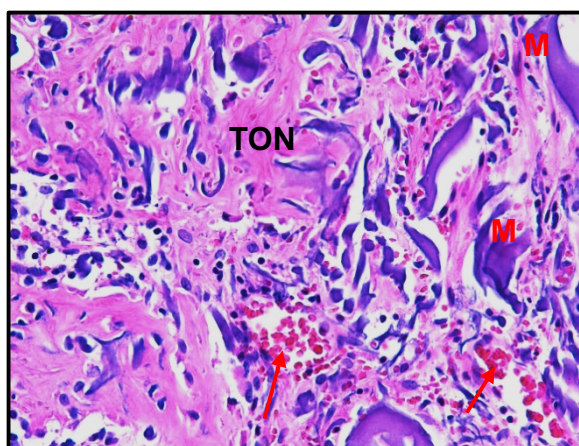
**Figura 8:** 7 dias. A. Ilha de neoformação óssea entre periósteo e membrana, vascularização regional. B. Tecido de granulação, alta vascularização com fibras colágenas organizadas paralelamente ausência de infiltrado inflamatório. C. Vasos sanguíneos e tecido de granulação. D. Membrana com invasão de vasos sanguíneos e células sanguíneas. HE, aumento de 40x.



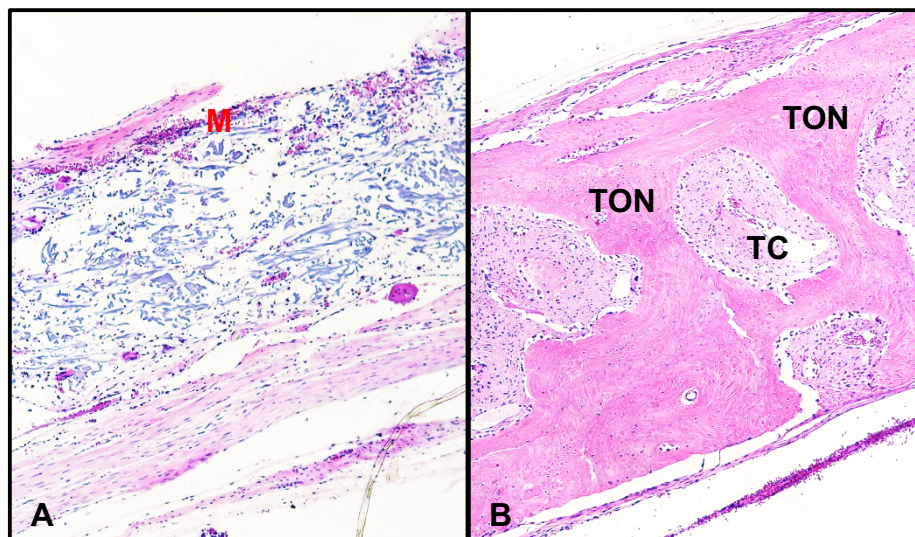
**Figura 9:** 15 dias. A. Fragmentos de membrana no interior do tecido ósseo neoformado (TON). B. Centro do defeito, ilhas de neoformação óssea no interior da membrana e tecido conjuntivo organizado. C. membrana parcialmente absorvida com áreas de TON, presença de vasos sanguíneos. HE, aumento original 10x



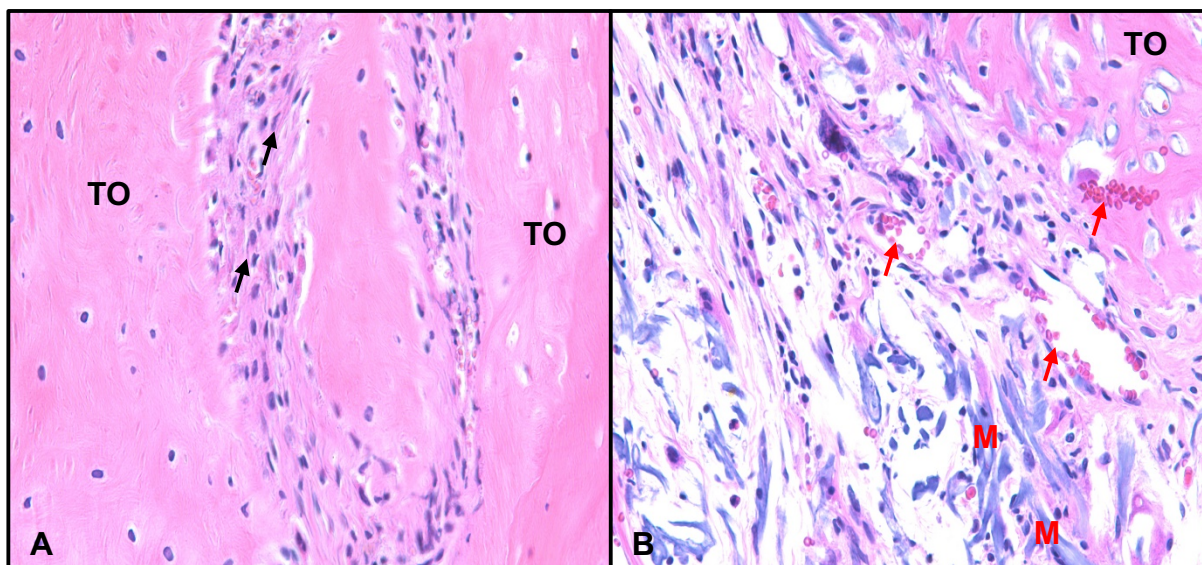
**Figura 10:** 15 dias. Centro do defeito, partículas de membrana (M), TON e vasos sanguíneos. HE, aumento original 40x



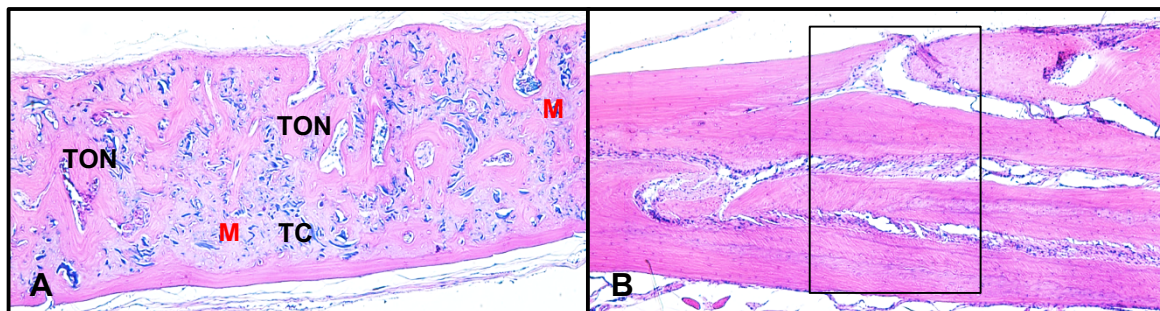
**Figura 11:** 30 dias. A. Centro do defeito com membrana presente, tecido conjuntivo organizado, alta vascularização. B. Próximo ao coto, área de TON entremeado por tecido conjuntivo. HE, aumento original 10x



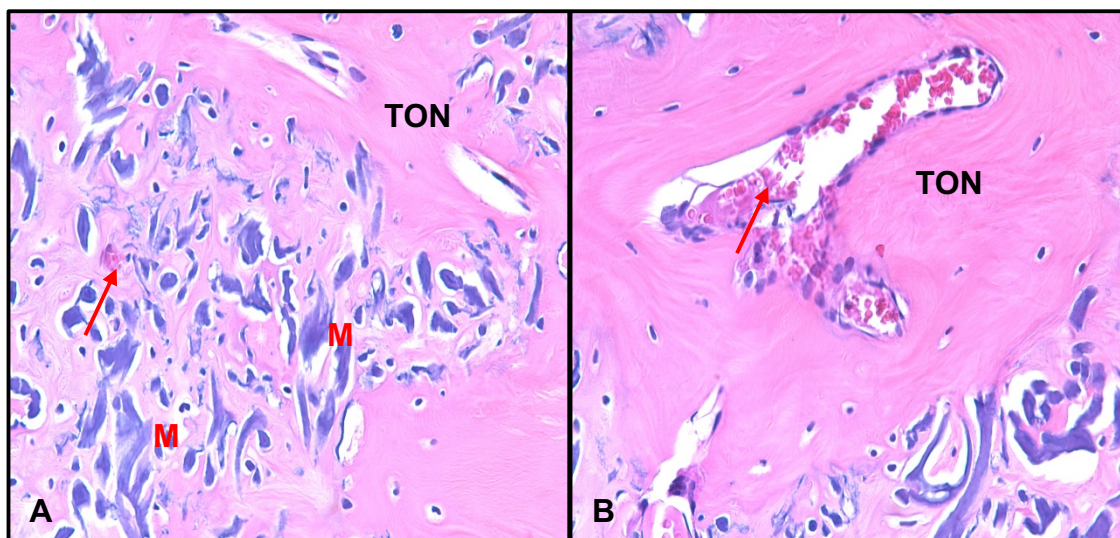
**Figura 12:** 30 dias. A. Próximo ao coto, área de TON entremeado por tecido conjuntivo. B. Centro do defeito com membrana presente, tecido conjuntivo organizado, alta vascularização. HE, aumento original 40x



**Figura 13:** 60 dias. A. TON maduro entremeado por tecido conjuntivo e remanescentes de membrana. B. Centro do defeito fechado. HE, aumento original 5x

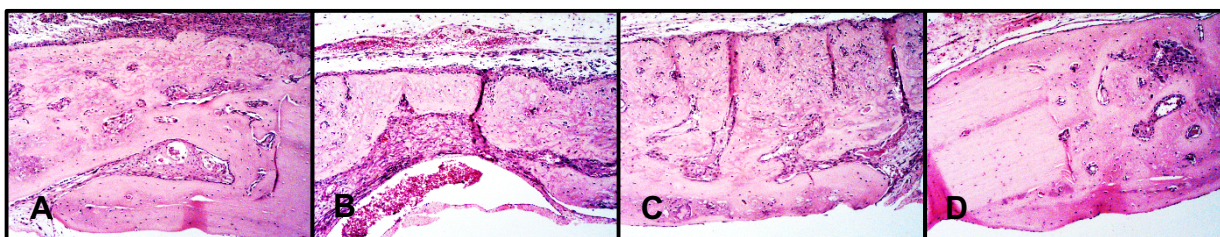


**Figura 14:** 60 dias. A. TON maduro entremeado por tecido conjuntivo e remanescentes de membrana. B. Centro do defeito fechado. HE, aumento original 40x

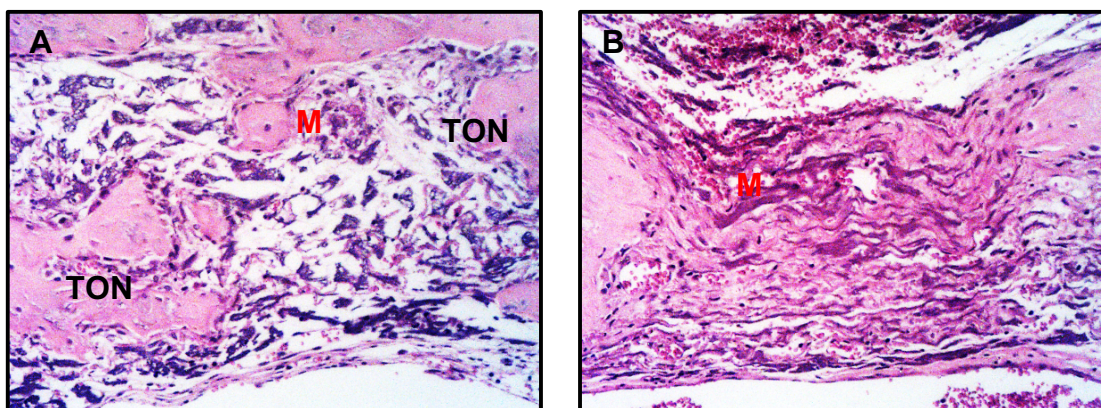


### A.II.3 Grupo Colágeno Porcino (GCP) (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen)

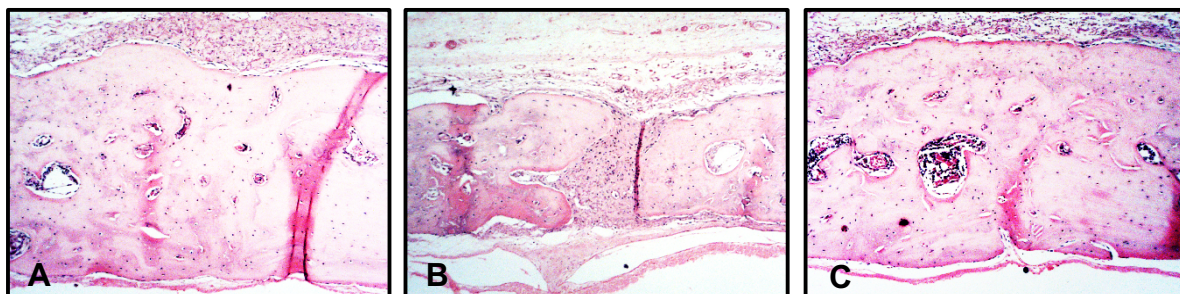
**Figura 15:** 30 dias. A. Observa-se o limite da osteotomia e tecido ósseo neoformado em direção ao centro do defeito ósseo. É possível notar remanescentes do colágeno da membrana no tecido ósseo neoformado. B. No centro do defeito ósseo, observa-se o seu reparo total. C. Em direção ao centro do defeito ósseo, observa-se tecido ósseo neoformado desenvolvendo-se no interior da membrana e mais ao centro, tecido ósseo mais desenvolvido (maduro) tendo ainda algumas áreas de tecido conjuntivo no seu interior D. No lado contralateral, observa-se tecido ósseo neoformado a partir do coto ósseo como também no interior da membrana. A imagem assinalada no interior do tecido ósseo neoformado sugere que houve reabsorção da membrana e remanescentes dela encontram-se incrustadas nele. HE, aumento original 40x.



**Figura 16:** 30 dias A. Observa-se remanescentes da membrana (M) entre as formações ósseas na região central do defeito ósseo (HE, aumento original 100x). B. – Remanescentes da membrana (M) observados na figura 15 (HE, aumento original 100x).



**Figura 17:** 60 dias – A: Observa-se a região onde foi realizada a osteotomia e a neoformação óssea no interior da membrana em direção ao centro do defeito além de remanescentes da membrana transpassando a margem do defeito (da osteotomia). B: Centro do defeito ósseo com reparo parcial. C: Região contralateral mostrando a região onde foi realizada a osteotomia e o tecido ósseo neoformado em direção ao centro do defeito ósseo (HE, aumento original 40x). (HE, aumento original 40x).



**Figura 18:** 60 dias. Observa-se o tecido ósseo neoformado no interior da membrana (M) (HE, aumento original 100x)

