

Edith Umasi Ramos

**AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR MEIO
HISTOLÓGICO, HISTOMÉTRICO, IMUNOISTOQUÍMICO E
PERFIL INFLAMATÓRIO DE MEMBRANAS REABSORVÍVEIS DE
COLAGENO PORCINO EM DEFEITOS CRÍTICOS EM CALOTAS
DE RATOS.**

Araçatuba -SP

2020



Edith Umasi Ramos

AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR MEIO HISTOLÓGICO, HISTOMÉTRICO, IMUNOISTOQUÍMICO E PERFIL INFLAMATÓRIO DE MEMBRANAS REABSORVÍVEIS DE COLAGENO PORCINO EM DEFEITOS CRÍTICOS EM CALOTAS DE RATOS.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, do Câmpus de Araçatuba – Unesp, para obtenção do Grau de "Mestre em ODONTOLOGIA" - Área de concentração em Implantodontia.

Orientadora: Prof. Associada. Ana Paula Farnezi Bassi

Araçatuba -SP

2020

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R175a Ramos, Edith Umasi.
Avaliação da regeneração óssea guiada por meio histológico, histométrico, imunoistoquímico e perfil inflamatório de membranas reabsorvíveis de colágeno porcino em defeitos críticos em calotas de ratos / Edith Umasi Ramos. – Araçatuba, 2020
94 f.: il.; tab.

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

1. Regeneração óssea 2. Regeneração tecidual guiada
3. Colágeno 4. Inflamação I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DEDICATÓRIA

A Deus, por ser guia e companhia de todos os dias ao longo transcorrer da minha vida.

Ao meu avô, Juan Ramos M. (QDG) com amor, carinho, e imenso respeito por ser exemplo de perseverança para todos na minha família.

A meu Irmão, Leroy com muito carinho e gratidão por o incansável apoio ao longo da minha caminhada.

A meus pais, Agustina e Máximo com imenso carinho e agradecimento por estarem presentes mesmo na distância.

AGRADECIMENTOS
ESPECIAIS

Agradecimentos especiais

À minha orientadora, **Profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi**, pelo acolhimento e orientação desde o momento que a conheci, obrigada pela confiança e por toda a imensa compreensão, paciência, motivação, instrução e carinho que a senhora transmite.

Ao **Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani**, por estar sempre disposto a ajudar e orientar no dia a dia, em tudo que for necessário, contribuição muito importante para meu desenvolvimento durante esta fase.

À **Profa. Ass. Dra. Daniela Ponzoni**, por toda a ajuda disponibilizada nos momentos mais necessários ao longo da trajetória da pós-graduação. Muita obrigada.

Ao **Prof. Dra. Francisley Ávila Souza**, por todo o apoio e respeito que sempre mostrou no dia a dia, sempre lembrarei de você

Ao **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior**, pelo apoio e confiança na minha pessoa, muito obrigada.

À **Profa. Dra. Roberta Okamoto**, por toda a ajuda disponibilizada durante minha trajetória da pós-graduação. Muita obrigada.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Prof. Dr. Wilson Roberto Poi**, com quem tive a oportunidade de ser aluna, e aprender

além de conhecimentos, experiências de vida, profissional e pessoa excepcional.

Ao Sr. **Marco Tanner**, por toda ajuda e amizade que demonstrou sempre durante a época da pós-graduação.

Aos meus companheiros e amigos da pós-graduação que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, **Guilherme del Arco, Luan Benetti, Vinicius, Júlio Silva**, obrigada pelas experiências compartilhadas e pelo apoio.

Aos amigos da pós-graduação: **Carolina Chapernete, Cássio Figueiredo, Ana Flávia Piqueira, Lais Sara, Henrique Hadad e Rodrigo Capalbo, Bruno Mendes, Bruna Jhunger, Breno Reis, Ramez**.

Aos funcionários e amigos do laboratório do prédio 5, os secretários **Renato de Oliveira e Paulo Gratão**, sou muito grato por vocês terem me ensinado sobre os processamentos laboratoriais.

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!

A **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"** - UNESP, na pessoa de seu diretor, **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Odontologia.

A Coordenação de **Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)**- Código de financiamento 001, pelo apoio durante a realização do curso de Mestrado em Odontologia podendo desenvolver o presente trabalho.

Epígrafe

“A persistência é o caminho do êxito. ”

(Charles Chaplin)

Resumo

Ramos EU. Avaliação da regeneração óssea guiada por meio histológico, histométrico, imunistoquímico e perfil inflamatório de membranas reabsorvíveis de colágeno porcino em defeitos críticos em calotas de ratos. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

Resumo

A regeneração óssea guiada (RGO) tornou-se uma prática comum e importante na odontologia, sendo necessário o uso de membranas para sua realização, uma vez que são barreiras que evitam o crescimento de tecido mole nas áreas de defeitos ósseos. Entre as características mais relevantes das membranas absorvíveis estão: o suporte sanguíneo (diretamente relacionado com a porosidade do material) e suporte mecânico ósseo que depende do tempo de reabsorção da membrana. O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar duas membranas de colágeno por meio de estudo histológico, histomorfométrico, imunistoquímico e por contagem de células inflamatórias o processo de regeneração óssea guiada utilizando a membrana de colágeno derivada de pericárdio porcino (Jason®-Instituto Straumann AG, Suíça) em defeitos críticos de 7 mm de diâmetro criados em setenta e duas calvárias de ratos (*Rattus Albinus*, variedade Wistar). Esses animais foram divididos em 3 grupos: grupo membrana de colágeno porcino (BioGide® - Geistlich Wohlhusen, Suíça), grupo membrana de colágeno de pericárdio porcino (Jason®-Instituto Straumann AG, Suíça) e grupo coágulo, sendo este preenchidos somente com coágulo sem membrana. Esses 3 grupos forma subdivididos em quatro subgrupos de acordo com os tempos avaliados: 7, 15, 30 e 60 dias. Como resultado tivemos na análise histológica e histométrica maior neoformação óssea com o grupo de membrana pericárdio porcino nos períodos de 7 dias (199 pontos) e não foi significativa, com 15 dias (494 pontos) estatisticamente significativo, com 30 dias (979 pontos) não significativa. Esses valores se modificam 60 dias, mostrando maior

superioridade a membrana de colágeno porcino (BioGide®- Geistlich Wohlhusen, Suíça) (1151 pontos) estatisticamente significativo. No análises global a membrana de colágeno porcino (Jason®-Instituto Straumann AG, Suíça) foi superior que a membrana de pericárdio porcino (BioGide®- Geistlich Wohlhusen, Suíça) ($p= 0,021$) estatisticamente significativo. A análise imunoistoquímica confirmou os achados histométricos, demonstrando maior presença da osteocalcina no grupo de pericárdio porcino aos 7 e 15 dias e presença da osteopontina pouco evidente. Já com a membrana de colágeno porcino a osteopontina foi mais imunomarcada aos períodos de 7 e 15 dias, e a presença de osteocalcina mais evidente aos 30 e 60 dias, corroborando com os resultados iniciais. Na contagem de células inflamatórias para o tempo de 7 dias não houve diferenças estatísticas, já na contagem de vasos sanguíneos houve diferença significativa no período de 15 dias com maior quantidade de vasos para membrana de colágeno porcino, com estes achados concluímos que tanto a membrana de colágeno de pericárdio porcino (Jason® -Instituto Straumann AG, Suíça) quanto a membrana de colágeno porcino (BioGide®-Geistlich Wohlhusen, Suíça) podem ser consideradas como material de escolha apropriada para regeneração óssea guiada, com maior proporção de osso neoformado com a membrana de colágeno porcino.

Palavras-chave: Regeneração óssea, regeneração tecidual guiada, colágeno, Inflamação.

Abstract

Ramos EU. Evaluation histological, histometric, immunohistochemistry analysis and inflammatory profile of bone-guided regeneration with membranes of reabsorbable porcine collagen in critical defects in rodent skullcaps. [dissertation] Araçatuba: São Paulo State University; 2020.

Abstract

Guided bone regeneration (RGO) has become a common and important practice in dentistry, requiring the use of membranes to perform it, since they are barriers that prevent the growth of soft tissue in areas of bone defects. Among the most relevant characteristics of absorbable membranes are: blood support (directly related to the porosity of the material) and mechanical bone support that depends on the time of membrane resorption. The goal of this study was to evaluate and compare two collagen membranes by means of histological, histomorphometric, immunohistochemical study and by inflammatory cell counting the guided bone regeneration process using the collagen membrane derived from porcine pericardium (Jason®-Instituto Straumann AG, Switzerland) in critical defects of 7 mm in diameter created in seventy-two calvaria of rats (*Rattus Albinus*, Wistar variety). These animals were divided into 3 groups: porcine collagen membrane group (BioGide® - Geistlich Wohlhusen, Switzerland), porcine pericardium collagen group (Jason®-Instituto Straumann AG, Switzerland) and clot group, which were filled with only a clot without membrane. These 3 groups were subdivided into four subgroups according to the evaluated times: 7, 15, 30 and 60 days. As a result, we had a greater bone neoformation in the histological and histometric analysis with the porcine pericardial membrane group in the periods of 7 days (199 points) and it was not statistically significant with 15 days (494 points), with 30 days (979 points) not significant. These values change 60 days, showing greater superiority to the porcine collagen membrane (BioGide®- Geistlich Wohlhusen, Switzerland) (1151 points) statistically significant. In the global analysis, the porcine collagen membrane (Jason®-Instituto Straumann AG, Switzerland) was superior than the porcine pericardium membrane (BioGide®- Geistlich Wohlhusen, Switzerland) ($p = 0.021$) statistically significant. The immunohistochemical analysis confirmed the histometric findings, showing a greater presence of osteocalcin in the porcine pericardium group at 7 and 15 days and the presence of osteopontin little evident. As for the porcine collagen membrane, osteopontin was more immunostained at 7 and 15 days, and the presence of osteocalcin was more evident at 30 and 60 days, corroborating the initial results. In the inflammatory cell count for the 7-day period, there were no statistical differences, whereas in the blood vessel count, there was a significant difference in the 15-day period with a greater number of vessels for porcine collagen membrane, with these findings we conclude that both the porcine pericardial collagen (Jason® - Straumann AG Institute, Switzerland) and porcine collagen membrane (BioGide®-Geistlich Wohlhusen, Switzerland) can be considered as the material of choice for guided bone regeneration, with a higher proportion of neoformed bone according to porcine collagen membrane.

Keywords: Bone regeneration, guided tissue regeneration, collagen.

Lista de Figuras

Figura 1	Distribuição dos grupos de estudo.....	62
Figura 2	Procedimento cirúrgico em calvaria de ratos. Aceso cirúrgico em calvaria de ratos (A), defeito ósseo de 8 mm no centro das calvarias (B), cortical removida do defeito crítico (C), membrana de colágeno no defeito cirúrgico (D), membrana de pericárdio suíno (E), membrana de colágeno suíno (F).....	62
Figura 3	Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS), Imagem 7 dias –Membrana (M) adaptada e justaposta aos cotos ósseos.....	63
Figura 4	Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS) 7 dias, (A) Aumento de 6.3X. Presença de membrana (M), junto ao coto protegendo o tecido de granulação (TG), (B) aumento 12.5X membrana colabada (M) no centro do defeito e já a presença de tecido ósseo neoformado (TON), (C) Aumento de 25X tecido ósseo neoformado no interior da membrana.....	63
Figura 5	Grupo membrana de pericárdio porcino (JS) 15 dias. Imagem panorâmica mostra a presença da membrana (M) adaptada sobre o defeito ósseo.....	64
Figura 6	Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS) 15 dias. (A) Aumento de 6.3X membrana e ilhas de tecido ósseo neoformado (TON), aumento (B), de 12.5X aumento. Presença da membrana (M) e tecido ósseo neoformado. (C) Aumento de 25X: Área de tecido ósseo neoformado (TON) entremeada com membrana M, setas pretas mostram a presença de vasos sanguíneos.	64
Figura 7	Grupo Pericárdio Suíno (JS) – 30 dias. Imagem panorâmica. Nota-se grande quantidade de tecido ósseo neoformado, e não há mais a presença da membrana integra protegendo o defeito.	65
Figura 8	Grupo Pericárdio Suíno (JS) – 30 dias: (A) Aumento de 6.3X. Fragmentos da membrana (Seta preta) localizada no interior do Tecido ósseo neoformado (TON), (B) aumento de 12.5X centro do defeito com a presença tecido conjuntivo denso (TC), (C), aumento 25X centro do defeito praticamente fechado com a presença de tecido ósseo neoformado (TON) e tecido conjuntivo (TC).	65
Figura 9	Imagem Grupo Pericárdio Suíno (JS) – 60 dias. Imagem panorâmica. Demostra o defeito ósseo reparado por um tecido ósseo neoformado.	66

Figura 10	Grupo Pericárdio Suíno (JS) – 60 dias. (A) Aumento de 6.3x: A imagem mostra o centro defeito fechado por tecido ósseo neoformado (TON) de um espécime, (B) Aumento 12.5X centro do defeito fechado por tecido ósseo neoformado (TON) de um espécime, (C) Aumento de 25X, centro do defeito reparado por tecido conjuntivo (TC).	66
Figura 11	Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 7 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana (M) na área de defeito ósseo.	67
Figura 12	Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 7 dias. (A) aumento de 6.3X: Presença da membrana (M) no centro do defeito (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X.....	67
Figura 13	Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 15 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo. Presença da membrana (M) sob um tecido conjuntivo frouxo (TC) organizado.	68
Figura 14	Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 15 dias. (A) Aumento de 6.3X. (B) Aumento de 12.5X e (C) Aumento de 25X. Presença da membrana sob um tecido conjuntivo frouxo (TC) organizado sem aspectos de um infiltrado inflamatório.	68
Figura 15	Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 30 dias, imagem panorâmica. A imagem demonstra um dos espécimen que aos 30 dias já teve praticamente concluído o processo de regeneração óssea guiada.	69
Figura 16	Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 30 dias. (A) aumento de 6,3X (A), (B) aumento de 12.5X (C) aumento de 25X. Presença de tecido ósseo neoformado (TON) no interior da membrana (M) juntamente com um tecido conjuntivo (seta) bem organizado e celularizado.	69
Figura 17	Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 60 dias, imagem panorâmica. A imagem demonstra um dos espécimen que aos 60 dias apresentou completo o processo de regeneração óssea guiada.	70
Figura 18	Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 60 dias aumento de 6X (A), aumento de 12X(B), aumento de 25X(C). Centro do defeito, com tecido ósseo neoformado (TON), presença de vasos sanguíneos (seta preta) no interior do tecido ósseo e fragmentos da membrana (seta vermelha). Presença também de tecido conjuntivo (TC).	70
Figura 19	Grupo Coágulo (Co) 7 dias, imagem panorâmica. Presença de tecido de granulação por toda extensão do defeito ósseo.....	71

Figura 20	Grupo coágulo (Co) 7 dias. (A) aumento de 6.3X (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X. Presença de tecido de granulação (TG) no centro do defeito.	71
Figura 21	Grupo Coágulo (Co) 15 dias, imagem panorâmica. Presença de tecido conjuntivo frouxo por toda extensão do defeito ósseo.	72
Figura 22	Grupo coágulo (Co) 15 dias. (A) aumento de 6.3X (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X. Presença de um tecido conjuntivo frouxo (TCF) ricamente celularizado (seta preta) e vascularizado (seta vermelha)	72
Figura 23	Grupo Coágulo (Co) 30 dias, imagem panorâmica. Presença de tecido conjuntivo denso por toda extensão do defeito ósseo.	73
Figura 24	Grupo coágulo (Co) 30 dias. (A) aumento de 6.3X (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X. Presença de um tecido conjuntivo denso, com menor quantidade de células e vasos sanguíneos.	73
Figura 25	Grupo Coágulo (Co) 60 dias, imagem panorâmica. Presença de tecido conjuntivo fibroso por toda extensão do defeito ósseo.	74
Figura 26	Grupo coágulo (Co) 60 dias. (A) aumento de 6.3X (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X. Presença de um tecido conjuntivo fibroso (TF) caracterizando o final do processo de reparo no defeito ósseo.	74
Figura 27	Foto micrografias dos cortes histológicos em aumento de 40x ao centro do DOC referente aos grupos (ST) membrana pericárdio suíno e grupo (BG) membrana colágeno suíno, nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de reparação, denotando áreas de expressão da proteína OP.	75
Figura 28	Foto micrografias dos cortes histológicos em aumento de 40x ao centro do DOC referente aos grupos (ST) membrana pericárdio suíno e grupo (BG) membrana colágeno suíno, nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de reparação, denotando áreas de expressão da proteína OC.	75
Figura 29	Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS) 7 dias, aumento de 100X – células inflamatórias (seta amarela) e vasos sanguíneos (Seta vermelha).....	76
Figura 30	Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS) 15 dias, aumento de 100X – células inflamatórias (seta amarela) e vasos sanguíneos (Seta vermelha).....	76
Figura 31	Grupo Membrana de colágeno suíno (BG) 7 dias, aumento de 100X – células inflamatórias (seta amarela) e vasos sanguíneos (Seta vermelha).....	77
Figura 32	Grupo Membrana de colágeno suíno (BG) 15 dias, aumento de 100X – células inflamatórias (seta amarela) e vasos sanguíneos (Seta vermelha).....	77

Figura 33	Descrição da membrana utilizada (A), Membrana com marca de água para identificação da superfície que deverá ser utilizada para fora (B).....	94
Figura 34	Incisão na calvaria do rato (A), trefina utilizada para confecção do defeito crítico (B).	94
Figura 35	Marcação do defeito (A), estrutura óssea sendo retirada para criação do defeito sem lesionar vasos sanguíneos (B).	94

Lista de Gráficos e Tabelas

Gráfico 1.	Proporção de formação de osso, membrana de pericárdio porcino grupo (JS), membrana de colágeno porcino grupo (BG), grupo Coágulo (Co).	78
Gráfico 2.	Comportamento de neoformação óssea: Grupo de membrana de colágeno porcino (BG) função logística sigmoide (A), grupo pericárdio porcino Jason (JS) função raiz quadrada (B).....	78
Gráfico 3.	Correlação de Pearson para número de células inflamatórias e neoformação óssea - grupo de membrana de pericárdio suíno (JS) e grupo de colágeno porcino (BG).....	79
Gráfico 4.	Correlação de Spearman para vasos sanguíneos e proporção de osso neoformado- grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo colágeno porcino (BG).	79
Gráfico 5.	Grupo de membrana de pericárdio porcino (JS) e grupo de membrana colágeno porcino (BG) - correlação de Spearman para vasos sanguíneos e proporção de células inflamatórias.	80
Tabela 1	Formação óssea.....	82
Tabela 2	Comparação entre grupos em relação a formação óssea.....	82
Tabela 3	Comparação por tempo entre grupos em relação a formação óssea	83
Tabela 4	Proporção de osso neoformado nos grupos pericárdio porcino (JS) e colágeno porcino (BG).....	84
Tabela 5	Comparação por períodos de tempo em cada Grupo (JS), (BG), (Co).	84
Tabela 6	Scores relacionados à imunomarcagem das proteínas OC e OP referentes a membrana pericárdio suíno grupo (ST) e membrana colágeno suíno grupo (BG), estes escores são classificados como nulo 0, leve 1 (+), moderado 2 (++) e intenso3 (+++).	85
Tabela 7	Correlação de Pearson geral para ambos grupos (JS) e (BG) em relação à formação óssea e vasos sanguíneos, formação óssea e células inflamatórias, e células inflamatórias com vasos sanguíneos.....	85
Tabela 8	Correlação de Pearson para Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) - Células inflamatórias e formação óssea.	85

Tabela 9	Teste T-Student para Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) - Células inflamatórias no tempo 7 e 15 dias	86
Tabela 10	Intensidade do processo inflamatório dos grupos de membrana pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino(BG)	86
Tabela 11	Correlação de Spearman Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) – Vasos sanguíneos e formação óssea.....	87
Tabela 12	Teste T-Student para Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) - Vasos sanguíneos no período de 7 e 15 dias	87
Tabela 13	Correlação de Spearman Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) – Vasos sanguíneos e células inflamatórias.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ROG	Regeneração Óssea Guiada
g	Gramas
mm	Milímetros
Co	Grupo Coágulo
JS	Grupo Jason (Jason® Institut Straumann AG, Suíça)
BG	Grupo Bio-Gide (BioGide® Geistlich Wohlhusen, Suíça)
Kg	Quilogramas
cm	Centímetros
OP	Osteopontina
OC	Osteocalcina
ml	Mililitros
HE	Hematoxilina e Eosina
AON	Área Óssea Neoformado
TON	Tecido Ósseo Neoformado
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
UNESP	Universidade Estadual Paulista
JPEG	Joint Photographics Experts Group (formato de arquivo)
Ltda	Sociedade de responsabilidade limitada
DS	Desvio Padrão
ANOVA	Análise de Variância

SUMÁRIO

1	<i>Introdução</i>	24
2	<i>Proposição</i>	28
3	<i>Material e Métodos</i>	30
	3.1 Delineamento experimental.....	30
	3.2 Procedimentos cirúrgicos	30
	3.3 Processamento das Peças.....	32
	3.4 Análise Histológica	32
	3.5 Análise Histométrica	32
	3.6 Análise Imunoistoquímica:	33
	3.7. Análise de Perfil Inflamatório.....	34
	3.8. Análise Estatística.....	35
4	<i>Resultados</i>	37
	4.1 Análise Histológica	37
	4.2 Análise Histométrica	40
	4.3 Análise Imunoistoquímica	43
	4.3.1 Grupo membrana de pericárdio suíno (JS).....	43
	4.3.2 Grupo membrana de colágeno suíno (GB).....	44
	4.4. Análise Perfil Inflamatório.....	45
5	<i>Discussão</i>	49
6	<i>Conclusão</i>	55
7	<i>Referências</i>	57
8	<i>Figuras</i>	62
9	<i>Tabelas</i>	82
10	<i>Anexos</i>	89

Introdução

1 Introdução

O processo de regeneração óssea guiada (ROG) é considerado um dos métodos para reconstrução alveolar¹, definida pelo uso de membrana como barreira para excluir a proliferação de epitélio e tecido conjuntivo, promovendo o crescimento de células formadoras de osso, este frequentemente é realizado associado ao procedimento de enxertia óssea².

As membranas para regeneração óssea guiada podem ser classificadas como absorvível e não absorvível, ²⁻⁵ de acordo com seu comportamento e constituição, e a escolha depende do tamanho e morfologia do defeito e o objetivo do tratamento¹. De um modo geral, as membranas não absorvíveis e absorvíveis estão indicadas para defeitos horizontais com bons resultados⁶, enquanto para defeitos verticais, geralmente, são indicadas as membranas não absorvíveis, embora estudos recentes mostraram que o uso de membranas absorvíveis à base de colágeno apresentam também bons resultados^{7,8} para estes casos.

Na Implantodontia as membranas de colágeno disponíveis no mercado atualmente para os procedimentos de ROG são derivadas de colágeno tipo I e III bovino e porcino, originário do tendão de Aquiles, da matriz dérmica, peritônio e pericárdio⁹. O uso de colágeno como membrana está baseado no fato de ser transferível de animal para humano, ter um papel ativo na formação de coágulo e promover uma rápida estabilização da ferida¹⁰.

Contudo, para que ocorra a formação óssea, dois requisitos são indispensáveis: o amplo suporte sanguíneo e suporte mecânico. Isto devido ao fato de que os osteoblastos sintetizam matriz óssea apenas próximos de vasos sanguíneos, sendo que a redução na tensão de oxigênio pode mudar as células genéticas para tecido fibroso, além do fato de que a formação de tecido ósseo organizado requer uma superfície mecânica estável¹¹. Dependendo da técnica de processamento e a origem de cada membrana, estas apresentam características e tempo de degradação diferentes; sendo

que, permanecer tempo suficiente para que reparo do defeito ocorra é uma das características fundamentais das membranas, que pode variar entre 16-24 semanas aproximadamente. Com relação as membranas de colágeno, a taxa de degradação são lentas, embora isto não garanta maior regeneração óssea^{9,12-14}. Além destes itens, também devem ter biocompatibilidade, fácil manipulação e fácil bioativação com os biomateriais¹².

No mercado, existe uma ampla variedade de membranas de colágeno, entre estas a membrana colágena porcino tipo I e III, são mais densas menos e porosas como a (BioGide® Geistlich Wohlhusen, Suíça), com um tempo de absorção de 2-4 semanas, sendo uma membrana das mais estudadas e utilizadas nos processos de regeneração óssea guiada¹⁵. Esta membrana não reticulada apresenta características semelhantes as membranas de colágeno humano^{16,17}. Composta por duas camadas, previne invaginação de tecido mole para interior do defeito, e guia para regeneração óssea. Esta membrana garante formação óssea eficiente, manutenção do espaço, previne migração de partículas e auxilia formação de coágulo, pode-se obter assim, mais osso e em qualidade superior¹⁶.

Outra membrana de colágeno recentemente introduzida no mercado é a membrana de derivado de pericárdio porcino (Jason® Institut Straumann AG, Suíça). Ela é composta por colágeno extraído do pericárdio de porcino, sendo formada por colágeno tipo I e III, com maior proporção de colágeno tipo I, tempo de degradação de 12-28 semanas, espessura reduzida, alta resistência a ruptura, facilmente moldável e adaptável a superfície óssea⁹.

Na ROG uns dos aspectos mais desafiadores é a manutenção de espaço frequentemente associados ao uso de membranas reabsorvíveis, devido a rápida biodegradação destas membranas, provocando a perda do volume ósseo causado pela perda de suporte mecânico, gerando insucesso na regeneração da estrutura óssea perdida¹⁸. O amplo suporte sanguíneo está relacionado com a porosidade das

membranas. Contudo, quanto maior porosidade, mais rápida é a reabsorção¹⁹. Embora as características descritas da membrana de colágeno de pericárdio porcino (Jason® Institut Straumann AG, Suíça), serem promissórias, existem apenas poucos estudos clínicos demonstrando a eficácia desta membrana na regeneração óssea, e sem estudos de modelo animal que sejam semelhantes a este, portanto esta pesquisa se torna relevante.

Proposição

2 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a regeneração óssea guiada promovida por dois tipos de membranas reabsorvíveis de colágeno: de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) e a membrana colágena porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) em defeitos críticos em calotas de ratos.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Delineamento experimental

O trabalho foi submetido e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP (CEUA), Processo n= 00372 2018 (Anexo A).

Setenta e dois ratos (*Rattus norvegicus albinus*, variedade Wistar), machos (3-4 meses) com aproximadamente 200 a 300 gramas de peso corporal foram selecionadas para o estudo. Vinte e quatro para cada grupo.

Grupo (Co) coágulo: o defeito foi preenchido com coágulo sem utilização de membrana.

Grupo (JS) Pericárdio Porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*): o defeito foi preenchido com coágulo e sobre o defeito colocado a membrana de pericárdio porcino.

Grupo (BG) Colágeno Porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*): o defeito foi preenchido com coágulo e sobre o defeito colocado a membrana de colágeno porcino.

Cada grupo foi dividido em 4 subgrupos (n=6 por grupo), para ser submetidos à eutanásia em quatro momentos do experimento: aos 7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia (Figura 1). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP alimentados com ração sólida balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brasil), contendo 1.4% Ca e 0,8P e água à vontade durante todo o experimento, exceto no período de 12 horas antecedentes ao ato cirúrgico.

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Após o jejum pré-operatório de doze horas, os animais foram submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) na dosagem de 0.07 ml para cada 100 g de peso corporal

para a indução anestésica, associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil) na dosagem de 0,03 ml para cada 100 gr. de peso, promovendo o relaxamento muscular, em seguida foi realizada a tricotomia na região da calvária, antissepsia com Polivinilpirrolidona iodada (PVPI 10%, Riodeine-Ind. Farmc., Rioquímica, Ltda), posteriormente a este procedimento foi realizada infiltração na região da calvaria dos ratos com 0,3 ml/kg 2% mepivacaina com epinefrina (1:100,000, Mepiadre 100, FDL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil).

Em seguida, foi realizada uma incisão em V na região de calota, 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). Posteriormente com auxílio de broca trefina de 7mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada ao contrângulo 20:1 de baixa rotação de em motor 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 8mm de diâmetro²⁰, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 2 A-C). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos somente com coágulo sanguíneo e sobre o defeito foi colocado nenhuma membrana no grupo coágulo, e as membranas de colágeno nos outros dois grupos. (Figura 2 D). Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos.

No pós-operatório 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) e dipirona sódica.

3.3 Processamento das Peças

Após as calvárias dos ratos removidas, foram fixadas em solução de formaldeído 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% (Ácido Etileno Diamino Tetracético, Merk) por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e receberão cortes de 6µm de espessura e foram montadas em lâminas. As lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

3.4 Análise Histológica

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.) as mensurações 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 Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas Image Lab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas). Foram avaliadas a área de tecido ósseo neoformado presente em toda área do defeito crítico, presença de membrana, tecido conjuntivo, inflamação e grau de resistência da membrana (colabamento).

3.5 Análise Histométrica

Mensurações foram realizadas após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.). Utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland). Essas imagens foram armazenadas como figuras (JPEG), e foram analisadas

no programa Image J (NIH, Bethesda, ML, USA). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas. A análise quantitativa dos defeitos foi realizada em todos os cortes corados com HE. Foram capturados e registrados 8 campos em objetiva de 12.5x, abrangendo a área total do defeito, na aba Plug-ins foi utilizada a ferramenta Grid para a confecção de uma aba contendo 423 cruces. As somas de todos os campos resultaram no total de tecido ósseo neoformado de cada animal, foi avaliada a área total do defeito ósseo e área de neoformação óssea. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores correspondente a área em centímetros quadrados, para permitir a aplicação do teste estatístico.

3.6 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 biotilado anti-cabra (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.

As imunimarcações foram avaliadas em diferentes áreas dos defeitos, para isto foram utilizados a osteopontina e osteocalcina já que estes marcam células da linhagem osteoblastica e matriz extracelular não mineralizada e mineralizada em momentos diferentes. A osteopontina (OP) está apresentasse no início da mineralização, além de ser importante

marcador das linhas de reversão no tecido ósseo, é a osteocalcina (OC) está presente na etapa final da mineralização, está proteína encontrasse marcada na etapa final e mineralização caracterizando um tecido mais maduro

3.7. Análise de Perfil Inflamatório

Foi realizado análise quantitativa nas lâminas de cada grupo, JS (*Jason® - Institut Straumann AG, Suíça*) e BG (*Bio-Gide® - Geistlich Wohlhusen, Suíça*), nos cortes representativos, em relação ao processo inflamatório. Esta análise foi realizada em 6 campos de um mesmo espécime em aumento de 100X, em todos os animais, nos tempos de 7 e 15 dias de cada grupo.

O critério considerado para este análise foi:

- **Intensidade do processo inflamatório**

A intensidade do processo inflamatório foi analisada com relação ao número médio aproximado de células inflamatórias, presentes em cada corte²¹.

Escore 1: Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível (menos de três células por campo)

Escore 2: Infiltrado inflamatório discreto (menos de 10 células por campo)

Escore 3: Infiltrado inflamatório moderado (entre 10 a 25 por campo)

Escore 4: Infiltrado inflamatório intenso (mas de 25 células por campo)

Para esta análise quantitativa foi utilizado o Software ImageJ® (Instituto Nacional de Saúde, EUA), com o auxílio da ferramenta Plugim "Cell counter", os campos selecionados foram fotografados em aumento de 100X, a traves de um microscópio acoplado (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland), foram realizadas as contagens dos números de células inflamatórias (polimorfonucleares, mononucleares, e osteoclastos), e o número de vasos sanguíneos em cada uma das laminas dos grupos de membrana de colágeno de

pericárdio suíno JS (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) e colágeno porcino BG (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) nos períodos de 7 e 15 dias²².

Estes resultados foram expressados como mediana, (mínimo e máximo) das unidades amostrais. Para posterior análise estática. Este análise foi realizada de maneira cega por um único operador.

6.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software SPSS versão 2.0 com um intervalo de confiança de 95% ²¹. A análise compara defeitos com as mesmas dimensões em períodos (7,15,30,60 dias) dos grupos JS (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*), (BG) (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) e grupo (Co) coágulo. Os dados utilizados no estudo foram media e desviação estandar, para avaliação da distribuição dos dados foram utilizados o teste de Shapiro-Wilk. Para análise da diferencia entre os valores médios das variáveis foi utilizado o analise de Varianza de medidas repetidas (ANOVA) e o teste de comparação multiple de Bonferroni. Para o analise quantitativo de perfil inflamatório e número de vasos sanguíneos foi realizado o teste de correlação de Pearson, posteriormente foram realizados dois testes no paramétricas de: Mann- Withey e W de Wilcoxon; e para avaliar a igualdade de médias foi realizado o teste T- student. Adotou-se um nível de significância de $P < 0.05$.

Resultados

4 Resultados

4.1 Análise Histológica

Grupo Jason Straumann (JS)

7 Dias: Na imagem panorâmica (Figura 3) pode-se verificar que há adaptação da membrana sobre o defeito, sendo que na figura 4A com aumento 6.3X nota-se o tecido de granulação sendo protegido pela membrana. Em um aumento de 12.5X, nota-se a presença de diversas camadas de membrana, característica que corresponde às descrições desta membrana (Figura 4B); e com aumento 25X pode-se observar tecido ósseo neoformado no interior da membrana, assim como grande quantidade de vasos sanguíneos, tecido conjuntivo frouxo bem organizado, ricamente celularizado (Figura 4C). Em algumas imagens foi observado a membrana colabada no centro do defeito, que poderia ser devido à alta flexibilidade desta membrana, ainda assim se observa presença de formação de tecido ósseo neoformado no interior da membrana, com tecido muito bem organizado de menor espessura

15 dias: Na imagem panorâmica (Figura 5) observa-se a membrana íntegra protegendo a área do defeito ósseo e a presença de tecido conjuntivo entremeado por áreas de tecido ósseo neoformado. Na análise com aumento de 6.3X (Figura 6A), observa-se a presença da camada superficial da membrana íntegra, presença de ilhas de osso no centro do defeito, tornando-se essa neoformação óssea no interior da membrana mais evidente no aumento de 12.5X (Figura 6B). Com o aumento de 25X observa-se presença de osso em toda a extensão com presença de membrana entremeado e tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado (Figura 6C).

30 dias: A figura 7 demonstra uma imagem panorâmica do reparo aos 30 dias com uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por um tecido conjuntivo denso. Realizando uma análise das imagens em maior aumento, verifica-se que no centro do defeito está parcialmente fechado, é possível observar fragmentos de membrana incorporada no interior do tecido ósseo neoformado (Figura 8A), no aumento de 12.5X (Figura 8B) observa-se no centro do defeito crítico tecido conjuntivo denso organizado e presença de partículas de

membrana com tecido ósseo neoformado (TON) com entremeado a esses fragmentos de membrana. No aumento de 25X o centro do defeito tecido está preenchido em alguns espécimes por tecido ósseo neoformado, e em outros por tecido conjuntivo denso entreamado por restos de membrana (Figura 8C)

60 dias: Pode ser observado na imagem panorâmica (Figura 9) o defeito praticamente preenchido por tecido ósseo. Em imagens mais detalhadas é possível notar que o centro do defeito está completamente fechado ou por tecido ósseo ou por tecido conjuntivo, sendo possível observar presença de tecido conjuntivo, no maior aumento de 12.5X e 25X ainda se observa restos da membrana no interior do tecido ósseo neoformado (Figura 10).

Grupo Bio-Gide (BG)

7 dias: Pode-se observar na imagem panorâmica (Figura 11) a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo. No aumento de 6.3X (Figura 12 A) nota-se a presença de tecido de granulação bem organizado e nos aumentos de 12,5 e 25X (Figura 12 B e C) verifica-se que esse tecido de granulação é altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório, e possível observar início de neoformação óssea próximo aos cotos. Também é possível observar células gigantes indicando fagocitose da membrana, com início de neoformação óssea no centro do defeito.

15 dias: Na imagem panorâmica observa-se a presença da membrana íntegra que recobre toda área do defeito ósseo (Figura 13). Nas análises com maior magnitude (6.3, 12.5 e 25X), pode-se observar um tecido conjuntivo frouxo com pouco infiltrado inflamatório, ainda bem vascularizado e áreas de tecido ósseo neoformado a partir do coto, com presença de tecido osteóide no centro do defeito (Figura 14A,B e C).

30 dias: A Figura 15 demonstra uma amostra do que foi observado nas imagens panorâmicas desse grupo, em que há praticamente todo defeito ósseo fechado em grande parte dos espécimes e alguns ainda com a presença de pequenas áreas de tecido conjuntivo denso. Nas imagens de maior aumento verifica-se que o centro do defeito que está preenchido

por tecido ósseo neoformado em sua maioria, mas também há espécimes onde há tecido conjuntivo fibroso organizado. A neoformação óssea ocorre a partir dos cotos em direção central. Observou-se abundante quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana (Figura 16 A, B e C).

60 dias: A imagem panorâmica mostra um defeito ósseo completamente regenerado por tecido ósseo (Figura 17) e em imagens mais detalhadas observa-se que a neoformação óssea nos cotos e no centro do defeito eram bastante semelhantes aos dos animais de 30 dias, mas com tecido ósseo neoformado preenchendo praticamente toda a cavidade. Com maior aumento no centro do defeito e nos cotos, presença de tecido ósseo neoformado, tecido conjuntivo, e tecido osteoide. Em algumas imagens foi observado presença de membrana remanescente (Figura 18 A, B e C).

Grupo coágulo (Co)

7 dias: Na vista panorâmica observa-se o defeito ósseo preenchido por um tecido de granulação (Figura 19) e quando se avaliou os detalhes em maior aumento pode observar hipervascularização no tecido ósseo neoformado (TON), e presença de atividade fibroblástica. Foi possível observar também na borda do defeito ósseo, em direção ao centro da ferida, neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, ricamente celularizado por osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. A neoformação óssea foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central, com abundante tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblastos e pouca matriz extracelular preenchendo a região central da ferida (Figura 20 A,B e C).

15 dias: Na imagem panorâmica verifica um tecido conjuntivo frouxo preenchendo o defeito ósseo (Figura 21) e em maior aumento observou-se a partir da borda do defeito ósseo indo em direção ao centro da ferida, uma neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, abundante em osteócitos e recoberto em suas superfícies por

osteoblastos. Foi observado neoformação óssea unicamente nos cotos do defeito cirúrgico, no centro do defeito crítico ausência de neoformação óssea, com presença de abundante tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblastos e escassa matriz extracelular preenchendo a região central da ferida (Figura 22A, B e C)

30 dias: A imagem panorâmica permite verificar que o defeito está ligeiramente menor com tecido ósseo neoformado nas bordas da ferida e o centro preenchido por tecido conjuntivo (Figura 23). Em aumentos maiores nota-se a presença de maior área óssea neoformada próximo aos cotos do defeito, e o restante da área preenchida por tecido conjuntivo frouxo não modelado. Foi observado área de osteotomia com os cotos ósseos esquerdos e direito com discreta neoformação óssea em suas margens, com o centro do defeito crítico preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Figura 24 A, B e C).

60 dias: A imagem panorâmica dos espécimes permite verificar que o defeito se encontra ligeiramente menor com áreas de neoformação óssea próximo aos cotos e o no centro a presença de tecido conjuntivo denso (Figura 25). Essas observações foram também encontradas nas análises com maior aumento sendo que nas proximidades dos cotos, apresentassem sem sinais de neoformação óssea, com preenchimento de tecido conjuntivo imaturo, com presença de infiltrado inflamatório e neutrófilos polimorfonucleares (Figura 26 A, B e C).

4.2 Análise Histométrica

No teste de Bonferroni foi observado que comparado o grupo da membrana de pericárdio porcino JS (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*), com o grupo de colágeno porcino BG (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) existe um nível de significância de 0,021 ($P < 0,05$) com superioridade da membrana colágeno porcino (BG) média de 735 pontos, entre o grupo de membrana de pericárdio porcino (JS) comparado como grupo coágulo (Co) o nível de significância é de 0,00 ($P < 0,05$) com superioridade da membrana pericárdio porcino (JS) com média de 683 pontos, finalmente entre grupo de membrana de colágeno porcino BG (*Bio-*

Gide[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) e grupo coágulo (Co) com uma média de 219 pontos, existe também um nível de significância de 0,00 ($P < 0,05$) com superioridade da membrana colágeno porcino (BG) (Tabela 1 e 2) (Gráfico 1)

Também foi feita uma comparação nos grupos em relação aos tempos pesquisados, observando-se que no tempo de 7 dias não existe diferença significativa na formação de osso entre os grupos de membrana de colágeno de pericárdio porcino grupo (JS) média de 199.20, e membrana de colágeno porcino grupo (BG) média 196.20, não houve diferenças significativas $p = 1.0$ ($P > 0,05$). Comparando grupo de membrana de pericárdio porcino grupo (JS) com o grupo coágulo (Co) não existe diferença significativa $p = 0,08$ ($P > 0,05$) embora o grupo (JS) seja superior, e entre os grupos de colágeno porcino grupo (BG) e grupo coágulo (Co) também não existe diferença significativa $p = 0,106$ ($P > 0,05$), com escores mais altos para a membrana de colágeno porcino grupo (BG). (Tabela 3) (Tabela 4)

Para o tempo de 15 dias se observa que existe diferença significativa entre os grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) com uma média de 494.20 e a membrana de colágeno porcino (BG) com uma média de 343.60 com uma significância de $p = 0.01$ ($P < 0,05$), para grupos de membrana de colágeno de pericárdio porcino grupo (JS) e grupo coágulo (Co) também existe diferença significativa $p = 0.00$ ($P < 0,05$), e finalmente para grupo de membrana de colágeno porcino grupo (BG) com grupo coágulo (Co) existe diferença significativa $p = 0.00$ ($P < 0,05$) (Tabela 3), (Tabela 4) e (Gráfico 1).

Aos 30 dias observamos que não houve diferença estatística significativa entre os grupos de membrana de pericárdio porcino grupo (JS) com uma média de 979.8 e membrana de colágeno porcino grupo (BG) com uma média de 888.2 com um nível significância de $p = 0.052$ ($P > 0,052$), já comparando os grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e grupo coágulo (Co) existe diferença estatística significativa $p = 0.00$ ($P < 0,05$), e entre os grupos de membrana de colágeno porcino (BG) e grupo coágulo (Co) existe também diferença estatística significativa $p = 0.00$ ($P < 0,05$).

Por último para o tempo de 60 dias existe diferença significativa para o grupo de pericárdio porcino (JS) com uma média de 1151.6 e grupo de colágeno porcino (BG) com uma média de 1423 com um nível significância de $p=0.00$ ($P<0,05$) mostrando ser superior a membrana do grupo pericárdio porcino (BG); também entre o grupo de pericárdio porcino (JS) e grupo coágulo (Co) $p=0,00$ ($P<0,05$) aqui mostrando ser superior o grupo de pericárdio porcino (JS), da mesma forma entre o grupo de membrana de colágeno porcino (BG) e grupo coágulo (Co) $p=0,00$ ($P<0,05$) existe diferença significativa com superioridade do grupo membrana colágeno porcino (BG) (Tabela 3). (Tabela 4) (Gráfico 1).

Em outra análise feita para avaliar o comportamento da formação óssea em relação aos tempos avaliados 7, 15, 30, 60 dias observamos que para o grupo da membrana de pericárdio porcino (JS) existe diferença significativa entre todos os tempos $p=0,00$ ($P<0.05$) o que significa que a proporção de formação óssea é superior com maior tempo, para o grupo da membrana de colágeno porcino grupo (BG) observamos diferenças significativas, também nos 4 tempos avaliados $p=0,00$ ($P<0.05$) interpretando-se também que quanto maior o tempo maior neoformação óssea, e para o grupo coágulo não existe diferença significativa no tempo de 7 e 15 dias $p=1$ ($P>0,05$), isso significa que não existe maior neoformação óssea com o passar do tempo, e para os tempos de 30 e 60 dias já existe diferenças significativas com relação aos 7 dias, existindo algum tipo de formação óssea (Tabela 5) (Gráfico 1).

Para esta análise, primeiro foram avaliados os dados registrados no estudo, mediante a prova de igualdade de Levene de variâncias, observando-se que os comportamentos dos dados são normais não existindo variabilidade extremas, existindo um equilíbrio entre os dados encontrados já que o resultado deste teste foi de 0.085 ($P>0,05$), baseado neste resultado se observa que cumpre com princípio de homogeneidade se realizou o teste de Anova. Como resultado do teste de variância se observou que existe diferença significativa em relação ao tipo de membrana $p= 0,00$ indicando que uma delas é superior em relação aos outros grupos, como a finalidade de saber qual membrana da pesquisa é superior se realizou a prova de comparações de Bonferroni, como uma margem de erro de 5%.

Nos gráficos analisados podemos notar que o comportamento do grupo de membrana de colágeno porcino (BG) tem similitude com a forma de uma curva sigmoide (Gráfico 2A) indicando que inicialmente existe neoformação óssea leve, passa a ter uma neoformação óssea elevada e finalmente estabiliza, já com o grupo de pericárdio porcino (JS) a forma do gráfico é semelhante a uma raiz quadrada (Gráfico 2B) que nos indica que a neoformação óssea inicial é rápida, e posteriormente apresenta neoformação óssea estabilizada.

4.3 Análise Imunoistoquímica

4.3.1 Grupo membrana de pericárdio suíno (JS)

OSTEOPONTINA (OP)

7 dias: há uma discreta imunomarcção presente na matriz extracelular ao redor das células da linhagem osteoblástica (score 1) (Figura 27) (Tabela 6).

15 dias: observa-se imunomarcção na matriz extracelular e nas células da linhagem osteoblástica, presentes de forma moderada no centro do defeito (score 2) (Figura 27) (Tabela 6).

30 dias: observa-se discreta imunomarcção positiva tanto nas células como em algumas áreas onde se observa a matriz extracelular com áreas caracterizadas pela precipitação de minerais (score 1) (Figura 27) (Tabela 6).

60 dias: observa-se discreta imunomarcção na matriz extracelular não mineralizada (score 1) (Figura 27) (Tabela 6).

OSTEOCALCINA (OC)

7 dias: Se observa áreas de matriz mineralizada com moderada marcação para osteocalcina. Muitas regiões mostram as áreas bem características de minerais precipitados sobre a matriz óssea recém-formada (score 2) (Figura 28) (Tabela 6)

15 dias: Observa-se áreas de matriz mineralizada com marcação intensa para osteocalcina. Presença de células também marcadas positivamente para esta proteína. Notar

o aspecto de tecido ósseo recém-formado, mas já com as marcações da osteocalcina nas áreas de mineralização (escore 3) (Figura 28) (Tabela 6).

30 dias: Observa-se marcação intensa para osteocalcina nas áreas de matriz mineralizada e algumas células marcadas positivamente para esta proteína (escore 3) (Figura 28) (Tabela 6).

60 dias: Observa-se áreas de matriz extracelular mineralizada com regiões de precipitação da osteocalcina, mostrando a mineralização do tecido neoformado. Presença de células da linhagem osteoblástica também marcadas positivamente (escore 2) (Figura 28) (Tabela 6).

4.3.2 Grupo membrana de colágeno suíno (GB)

OSTEOPONTINA (OP)

7 dias: Neste grupo foi possível observar imunomarcção com score moderado na matriz extracelular, para esta proteína (escore 2) (Figura 27) (Tabela 6).

15 dias: Foi possível observar imunomarcção com score moderado na matriz extracelular (escore 2) (Figura 27) (Tabela 6).

30 dias: Foi possível observar imunomarcção com score leve na matriz extracelular, e moderada nos cotos do DOC (escore 1) (Figura 27) (Tabela 6).

60 dias: Foi possível observar imunomarcção com score leve na matriz extracelular, e trabéculas ósseas mais organizadas (escore 3) (Figura 27) (Tabela 6).

OSTEOCALCINA (OC)

7 dias: Neste grupo foi possível observar matriz extracelular imunomarcada positivamente com score moderado, evidenciando o início do processo de formação óssea (escore 2) (Figura 28) (Tabela 6).

15 dias: Imunomarcção moderada para esta proteína (escore 2) (Figura 28) (Tabela 6).

30 dias: Foi possível observar imunomarcção leve para esta proteína (escore 3) (Figura 28) (Tabela 6).

60 dias: Foi possível observar imunomarcção leve para esta proteína, marcando já um processo de maturação óssea, no qual ocorreu menor marcação para esta proteína (escore 1) (Figura 28) (Tabela 6).

4.4. Análise Perfil Inflamatório

Para as análises de perfil inflamatório realizou-se teste de correlação de Pearson, no qual foi correlacionado a presença de células inflamatórias com a neoformação óssea. Observamos que de um modo geral existe correlação entre o número de células inflamatórias e a proporção de osso neoformado, com um valor de -0.718 o que indica que existe uma correlação inversa alta e negativa, e uma significância bilateral de 0.000 ($p > 0,05$), demonstrando que quanto maior o número de células inflamatórias menor proporção de tecido ósseo, e quanto menor número de células inflamatórias, maior proporção de tecido ósseo neoformado (Tabela 7)

Já na análise de ambos grupos separadamente, observamos que para o grupo de pericárdio suíno (JS) existe uma correlação inversa e alta com valor de -0.852 , e um nível de significância bilateral de $0,002$ ($p < 0,005$); e para grupo de colágeno porcino (BG) uma significância de $0,000$, ($P < 0,05$), com um valor de correlação de $r = -0.900$, correlação negativo e elevado, o que indica que a menor quantidade de células inflamatórias maior proporção de neoformação óssea, e a maior quantidade de células inflamatórias, menor quantidade de osso neo-formado nas áreas analisadas (Figura 29-32)(Tabela 8)

Para o análise de ambos grupos em função ao tempo, foi realizado o teste t de Student, para avaliar a igualdade de médias, com esta análise podemos observar que não existe diferença significativa comparando o número de células inflamatórias dos grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG), nos tempos 7 e 15 dias, com um valor de $p = 0.818$ e $p = 0.381$ respectivamente ($p > 0.05$), além disso observou-

se maior número de células inflamatórias no grupo de pericárdio porcino (JS) aos 7 e 15 dias (Tabela 9) (Gráfico 3)

Para o análise da intensidade do processo inflamatório com relação ao número de células inflamatórias no tempo de 7 e 15 dias foi observado uma média no valor de score 2.5 e 2 respectivamente para o grupo de membrana colágeno porcino (BG) e uma média de 2.7 e 2.7 para tempos 7 e 15 do grupo de membrana de pericárdio porcino, que corresponde a um infiltrado inflamatório discreto, com uma intensidade maior de processo inflamatório no grupo pericárdio porcino. (Tabela 10)

Para o análises de número de vasos sanguíneos com neoformação óssea se aplicou o teste correlação de Spearman e observou-se que existe uma correlação direta positiva moderada, com um valor de 0,487, com um nível de significância bilateral significativa de 0.030 ($P < 0,05$). (Tabela 7) Analisando de maneira independente em ambos grupos se observou que para o grupo pericárdio porcino (JS) e grupo colágeno porcino (BG) existe uma correlação positiva direta alta com valores de 0,891 e 0,969 respectivamente, isto significa que quando há um maior número de vasos sanguíneos existe maior proporção de tecido ósseo neorformado, e quando há menor número de vasos menor proporção de tecido ósseo neorformado. (Tabela 11). Com nivel significância bilateral de 0,001 para grupo (JS) e 0,000 para grupo (BG) ($p < 0,005$). Também foi realizado o teste de t de Student para avaliar se há diferença significativa entre as médias do número de vasos sanguíneos entre os dois grupos de membrana de colágeno de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG), observando-se que não existe diferença estatísticas significativas para o tempo de 7 dias com um valor de $p = 2.12$ ($P > 0,05$), e para o tempo de 15 dias uma diferença já estatisticamente significativa com valor de $p = 0.008$ ($P < 0,05$), com um score mais elevado para o grupo de membrana de colágeno porcino (BG), interpretando-se que no início no tempo de 7 dias em ambos grupos existe um comportamento celular e uma proporção de vasos sanguíneos semelhantes entre os dois grupos. Contudo, no período de 15 dias observou-se um maior

aumento de quantidade de vasos sanguíneos para o grupo da membrana de colágeno porcino (BG) comparado com grupo de membrana de pericárdio porcino (JS) (Tabela 12) (Gráfico 4)

Outro teste de correlação foi realizado para observar se existe relação entre número de células inflamatórias e o número de vasos sanguíneos. Nesta situação verificou-se que existe uma relação inversa negativa e elevada de -847, o que significa que a maior número de células inflamatórias, existe menor número de vasos sanguíneos, e o quando há um menor número de células inflamatórias existe maior número de vasos sanguíneos, com uma significância bilateral com um valor de $p=0.000$ ($p>0.05$). (Tabela 7). Na análise dos dois grupos observamos um coeficiente de correlação de 0.-959 para grupo de pericárdio porcino (JS) e 0, -907 para grupo de colágeno porcino (BG), com uma significância bilateral de 0,00 para grupo (JS) e 0,00 para grupo (BG) ($P<0,05$) (Tabela 13) (Gráfico 5).

Discussão

5 Discussão

O colágeno é o componente principal das membranas absorvíveis utilizadas na ROG, tem a capacidade de permitir uma boa proliferação, migração e diferenciação celular, além de ser altamente biocompatíveis e biodegradáveis, mas este tipo de membrana possui como desvantagem ter uma estabilidade dimensional reduzida. Com a finalidade de melhorar esta propriedade se utilizam diferentes recursos, como: formação de reticulações inter o intra moleculares, mineralização e membranas de multicamadas²⁴.

Sabe-se que a estabilidade da membrana depende do tempo da reabsorção ou do tempo de degradação²⁵, neste contexto a membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) tem um tempo de degradação de 12 – 28 semanas²⁶, e a membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) se degrada em 16- 24 semanas descrita pelos fabricantes, isto quer dizer que a membrana de pericárdio porcino grupo (JS) e a membrana colágeno porcino grupo (BG) têm tempos de início de degradação semelhantes, com uma média de 5 meses. A literatura mostra que as membranas requerem um tempo de 6 meses para auxiliar o processo de regeneração de tecido ósseo e de 4 semanas para regeneração periodontal²⁷, neste trabalho na análise histológica no período de 15 dias a membrana de pericárdio porcino grupo (JS) nota-se a presença de uma camada de membrana íntegra superficial, esta característica também está presente com a membrana colágeno porcino grupo (BG). Considerando que o processo de reparo dos ratos é 4 vezes mais rápido que o processo de reparo em humanos²⁸ aos 15 dias de pós-operatório no rato seriam aproximadamente 60 dias em humanos, contudo aos 30 dias praticamente nenhuma das membranas estava íntegra correspondendo um período de 120 dias ou 4 meses, isso significa que entre 60 e 120 dias essas membranas deixam de ser barreiras no processo de ROG.

Outro fator importante a ser relatado é a baixa resistência mecânica da membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) em relação a membrana colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*), sendo isso observado em alguns espécimes no qual no centro do defeito foi possível notar o colapamento da membrana e a

espessura de osso formado ao final dos 60 dias ser mais delgada quando comparado com a membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*). Fato que é comprovado no resultado histométrico mostrando diferença significativa neste período de tempo.

Em nosso estudo a membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) apresenta a característica de possuir fibras de colágeno entrecruzadas com diferentes orientações na estrutura, isto proporciona maior resistência a ruptura^{9,26}, e a membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) se caracteriza por ser membrana de dupla camada com uma camada externa compacta e uma camada interna porosa^{26,29}. No estudo de Rothamel et al., 2012⁹ foi observado que a membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) quando comparada com uma membrana de dupla camada (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) a primeira permitiu maior nível de proliferação celular de osteoblastos depois de 7 dias⁹, fato que indicaria maior formação óssea, estes achados puderam ser observados também neste estudo, havendo maior proporção de formação óssea com a membrana de pericárdio porcino grupo (JS), apesar de não ser estatisticamente significativo esta diferença entre ambos grupos aos 7 dias, no período de 15 dias também houve maior proporção óssea com a membrana de pericárdio porcino grupo (JS) no qual houve diferença significativa. Deste modo, ao analisarmos esses dois períodos verifica-se que existe uma proporção de área de neoformação óssea superior da membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*), em relação a membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*). Este fato, pode ter ocorrido em função de uma maior estabilidade mecânica proporcionada pela membrana de pericárdio porcino, fundamental para a formação de estrutura óssea. Este achado é corroborado com o escore de osteocalcina elevado que indica que está em etapa finais de mineralização e que houve um processo mais acelerado com a membrana de pericárdio porcino. Outro fato que foi observado com a membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) no período de 60 dias é a existência de uma imunomarcção moderada

para osteopontina, isto pode ter ocorrido uma vez que neste período está começando o processo de remodelação observando-se presença de linhas reversão de tecido próximo aos cotos, o que significa que existe osso em diferentes níveis de neoformação.

Na análise histométrica global das medias dos dois grupos (JS) e (BG) foi obtido uma diferença estatisticamente significativa da proporção de osso neoformado, com níveis superiores para grupo da membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) em relação a membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*). Sabe-se que a formação de tecido ósseo requer superfície estável²⁵, neste trabalho pode-se observar uma boa estabilidade da membrana de pericárdio porcino no início possivelmente por ser uma estrutura da membrana com fibras entrelaçadas de colágeno diferentemente orientado²⁶. Este fato poderia ter contribuído para uma formação de tecido ósseo precoce em tempos iniciais (7 e 15 dias), contudo essas estruturas não se mantem estável a ponto de continuar em ritmo acelerado nos tempos de 30 e 60 dias, sendo este fenômeno observado nos resultados da imunistoquímicos em que praticamente a osteopontina não foi imunomarcada e a osteocalcina estava em escore mais elevado somente aos 7 e 15 dias. Já com a membrana de colágeno porcino observou-se uma estrutura estável até 15 dias, demonstrando processo de reparo mais ordenado e fisiológico, em que aos 7 e 15 dias temos a presença de uma imunomarcção mais alta para osteopontina e aos 30 e 60 dias observa-se de forma mais significativa a presença da osteocalcina.

A maior neoformação óssea também é dependente do maior aporte de vasos sanguíneos pois estes são os que proporcionam os nutrientes e facilita a formação óssea^{15,25}. Neste sentido, a membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) possui a metade da espessura e é 3 vezes menor de densidade quando comparado com membrana colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*)²⁶, assim é de se supor que o aporte vascular dela deverá ser maior, contudo nos resultados obtidos neste trabalho demonstrou que em relação a quantidade de vasos sanguíneos existe um número menor número para a membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) em

relação a membrana colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*), este fato contrapõe a alta porosidade descrita no catálogo do produto e no estudo de Ortolany et al.²⁶. Ao analisar detalhadamente por período se observa que estatisticamente não é significativa a diferença em relação ao número de vasos presentes nos dois grupos aos 7 dias, no entanto, no período de 15 dias existe uma maior quantidade de vasos para a membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) comparado com a membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) sendo presente uma diferença estaticamente significativa assim como a presença de células inflamatórias aos 15 dias ser maior na membrana de pericárdio porcino. Esses dois fatores interferem na quantidade de neoformação de tecido ósseo observado aos 30 e 60 dias sendo isso já bem discutido por Patino et al., 2003. Uma hipótese que podemos imaginar é que a degradação da membrana de pericárdio porcino provoca uma reação inflamatória maior que a membrana de colágeno porcino, e nesta fase esses dois eventos passam a ser cruciais para o volume final de tecido ósseo neoformado.

Nesta pesquisa na análise histológica da membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) foi observado no período de 15 dias uma camada superficial de membrana assim como fragmentos de entremeado de membrana composta de colágeno tipo I e III³⁰, sugerindo como maior proporção de colágeno tipo III, responsável das propriedades elásticas e de modulo de elasticidade superior comparada com a membrana colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*), também composta por colágeno tipo I e III²⁶, com um tempo de biodegradação de 2-4 semanas associado a alto grau de vascularização, rápida integração tisular²⁹.

Merli et al., 2015 com intuito de comparar neoformação óssea utilizando membrana colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) associado a osso bovino anorgânico com membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) associado a osso sintético para reabilitação horizontal em humanos, observaram que não existe diferenças significativas entre estes dois grupos, com pouca diferença de perda de osso

peri-implantar com as duas contudo, com melhores efeitos membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*)³¹. Neste aspecto os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com os achados de Merli et al., 2015, uma vez que demonstrou um comportamento de neoformação óssea semelhante nos períodos iniciais e até 30 dias. Estes achados poderiam explicar os resultados clínicos obtidos no trabalho de Merli et al., 2015.

Assim, foi possível verificar que as duas membranas possuem bons comportamentos biológicos, e efetivamente auxiliam nos processos de RGO, sendo que a membrana de membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) tem um período mais curto para finalizar a neoformação óssea já que com 15 apresenta níveis de mineralização superior que a membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*), no entanto no período de 60 dias a membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) atingiu proporção de neoformação óssea superior que a membrana de pericárdio suíno (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*). Poderia se sugerir que a estabilidade mecânica aportada pela membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) permite uma proporção de formação óssea superior nos períodos iniciais quando comparada com a membrana colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*), isto poderia ser útil quando a formação óssea requerida é indispensável que seja em períodos mais curtos. Lembrando que a proporção óssea formada com a membrana colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) uma vez atingida a estabilidade é estatisticamente superior que membrana de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) fato que permite um resultando promissor e consolidado na literatura para a regeneração óssea guiada.

Conclusão

6 Conclusão

Podemos concluir que a regeneração óssea guiada avaliada por meio histológico, histométrico imunoistoquímico, e perfil inflamatório de membranas reabsorvíveis de colágeno de pericárdio porcino (*Jason*[®] - *Institut Straumann AG, Suíça*) e a membrana colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) em defeitos críticos em calota de ratos foi efetiva, sendo que a quantidade de tecido ósseo neoforado foi estatisticamente superior a membrana colágeno porcino (*Bio-Gide*[®] - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) no período pesquisado.

Referências

7 Referências.

1. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci.* 2017;125:315-337.
2. Hasegawa H, Kaneko T, Kanno C, et al. Evaluation of a Newly Designed Microperforated Titanium Membrane with Beta-Tricalcium Phosphate for Guided Bone Regeneration in Dog Mandibles. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019;34:1132-1142.
3. Shin S-I, Herr Y, Kwon Y-H, Chung J-H. Effect of a Collagen Membrane Combined With a Porous Titanium Membrane on Exophytic New Bone Formation in a Rabbit Calvarial Model. *J Periodontol.* 2013;84:110-116.
4. Von Arx. T, Broggin. N, Jensen. SS, Bornstein. MM., Schenk. RK, Buser. D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2005;20:843-853.
5. McGinnis. M, Larsen. F, Miloro. M, Beck. FM. Comparison of resorbable and nonresorbable guided bone regeneration materials: a preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 1998;13:30-35.
6. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: Biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21:567-576.
7. Keestra JAJ, Barry O, De Jong L, Whal G. Long-term effects of vertical bone augmentation: A systematic review. *J Appl Oral Sci.* 2016;24:3-17.
8. Donos N, Mardas N, Chadha V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: Systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). *J Clin Periodontol.* 2008;35(SUPPL. 8):173-202.

9. Rothamel D, Fienitz T, Schwarz F, Smeets R. Biocompatibility and Biodegradation of a Native Porcine Pericardium Membrane: Results of In Vitro and In Vivo Examinations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27:146-154.
10. Nuyttens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res*. 2011;127(SUPPL. 2):S26-S29.
11. Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Cellular inflammatory response to porcine collagen membranes. *J Periodontal Res*. 2003;38:458-464.
12. Caballé-Serrano J, Munar-Frau A, Ortiz-Puigpelat O, Soto-Penalosa D, Peñarrocha M, Hernández-Alfaro F. On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. *J Clin Exp Dent*. 2018;10:e477-e483.
13. Wessing B, Urban I, Montero E, et al. A multicenter randomized controlled clinical trial using a new resorbable non-cross-linked collagen membrane for guided bone regeneration at dehiscenced single implant sites: interim results of a bone augmentation procedure. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28:e218-e226.
14. Lee S-W, Kim S-G. Membranes for the Guided Bone Regeneration. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2014;36:239-246.
15. Mish. CE, Suzuki. JB. Exodontia, Enxerto de Alvéolo e Regeneração Óssea com Membrana. In: Elseiver, ed. *Implantes Contemporaneos*. 3rd ed. Michigan; 2011:881-901.
16. Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®). *Biomaterials*. 1997;18:535-538.
17. Amoian B, Moudi E, Majidi M, Tabatabaei SA. A histologic, histomorphometric, and radiographic comparison between two complexes of CenoBoen/CenoMembrane and Bio-Oss/Bio-Gide in lateral ridge augmentation: A clinical trial. *Dent Res J*. 2016;13:446-453.

18. Buser D. *20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. (Quintessence, ed.). Chicago; 2010.
19. Zhang Q, Yao K, Liu L, et al. Evaluation of porous collagen membrane in guided tissue regeneration. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1999;27:245-253.
20. Furlaneto FAC, Nagata MJH, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messora MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: A histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:311-318.
21. Brizeno LAC, Assreuy AMS, Alves APNN, et al. Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat model: Implication of TNF- α , IL-1 β and FGF-2. *Life Sci*. 2016;155:36-47.
22. Andrade TAM, Iyer A, Das PK, et al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. *Brazilian J Med Biol Res*. 2011;44:1036-1047.
23. Queiroz TP, Souza FÁ, Okamoto R, 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;66:1233-1240.
24. Wang J, Qu Y, Chen C, et al. Fabrication of collagen membranes with different intrafibrillar mineralization degree as a potential use for GBR. *Mater Sci Eng C*. 2019;104.
25. Imbronito. AV, Arana Chavez. VE, Todescan. JH. Regeneração óssea guida. *Periodontia Rev*. 2001;10:45-50.
26. Ortolani. E, Quadrini. F, Bellisario. D, Loredana. S, Polimeni. A, Santarsiero. A.

- Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. *Ann Ist Super Sanita*. 2015;51:229-235.
27. Ghanaati S. Non-cross-linked porcine-based collagen I-III membranes do not require high vascularization rates for their integration within the implantation bed: A paradigm shift. *Acta Biomater*. 2012;8:3061-3072.
 28. Okamoto. T, de Russo . MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba*. 1973;2:153-169.
 29. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently crosslinked collagen membranes: An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16:369-378.
 30. Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, et al. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials*. 2005;26:6158-6166.
 31. Merli. M, Moscatelli. M, Mariotti. G, Pagliaro. U, Raffaelli. E, Nieri. M. Comparing membranes and bone substitutes in a one-stage procedure for horizontal bone augmentation. A double-blind randomised controlled trial. *Eur J Oral Implant*. 2015;8:27-81. ¹

¹ Formatado de acordo com as normas da revista **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** (Anexo B)

Figuras

8 Figuras.

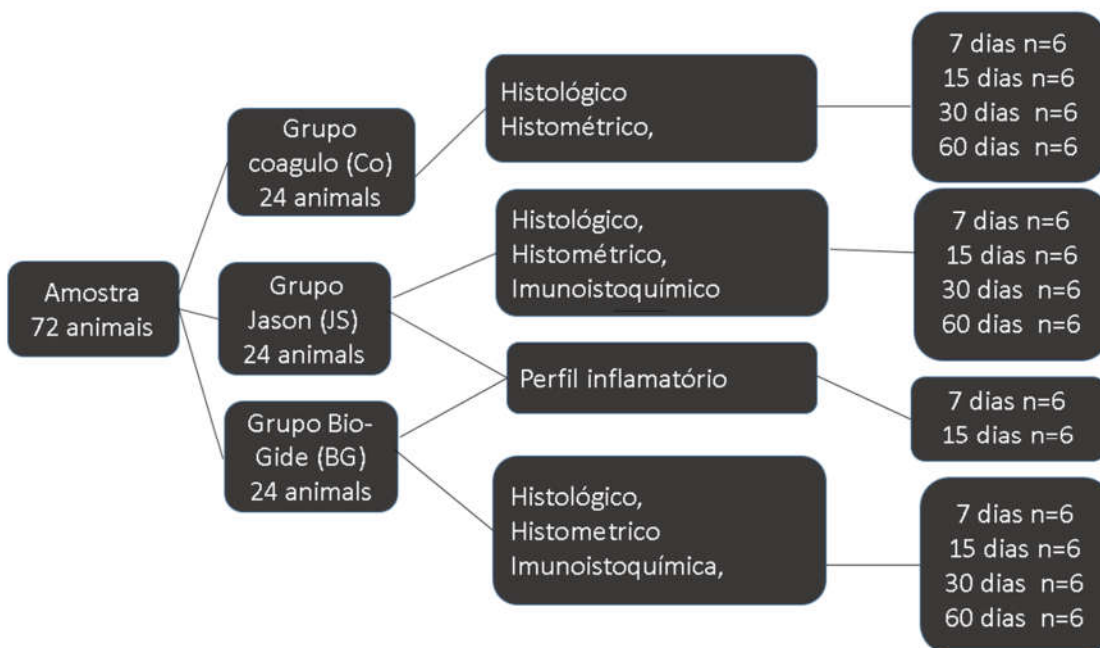


Figura 1. Distribuição dos grupos de estudo

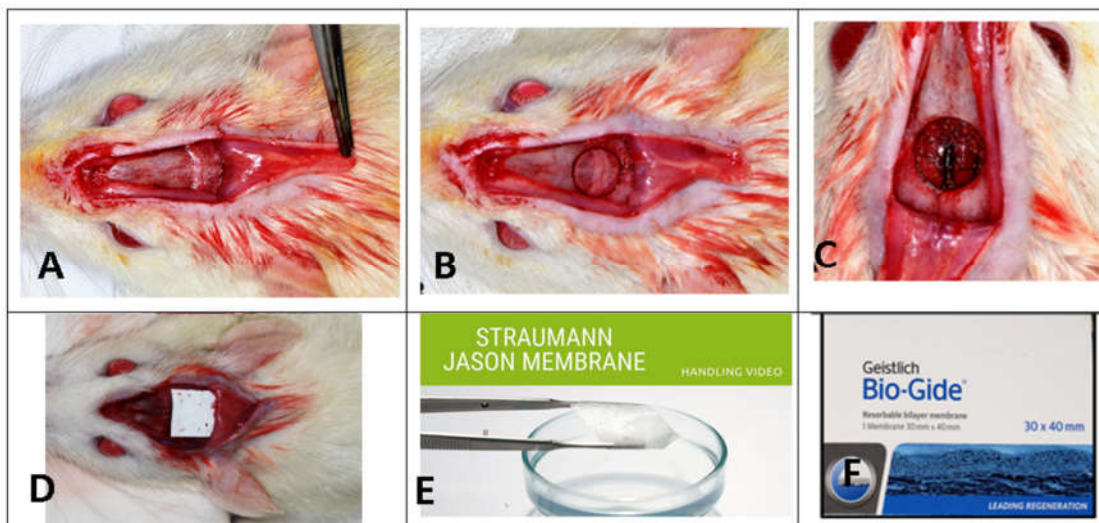


Figura 2. Procedimento cirúrgico em calvaria de ratos. Acesso cirúrgico em calvaria de ratos (A), defeito ósseo de 8 mm no centro das calvarias (B), cortical removida do defeito crítico (C), membrana de colágeno no defeito cirúrgico (D), membrana de pericárdio suíno (E), membrana de colágeno suíno (F)

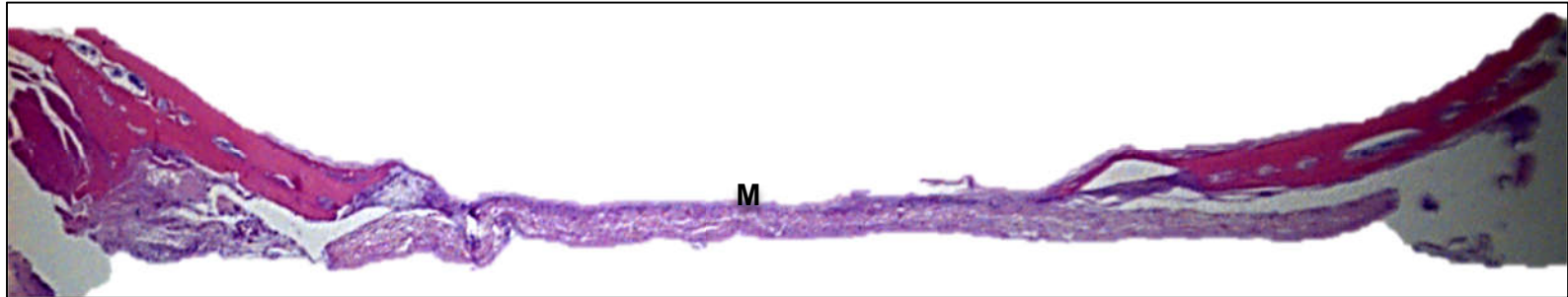


Figura 3. Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS). Imagem 7 dias –Membrana (M) adaptada e justaposta aos cotos.

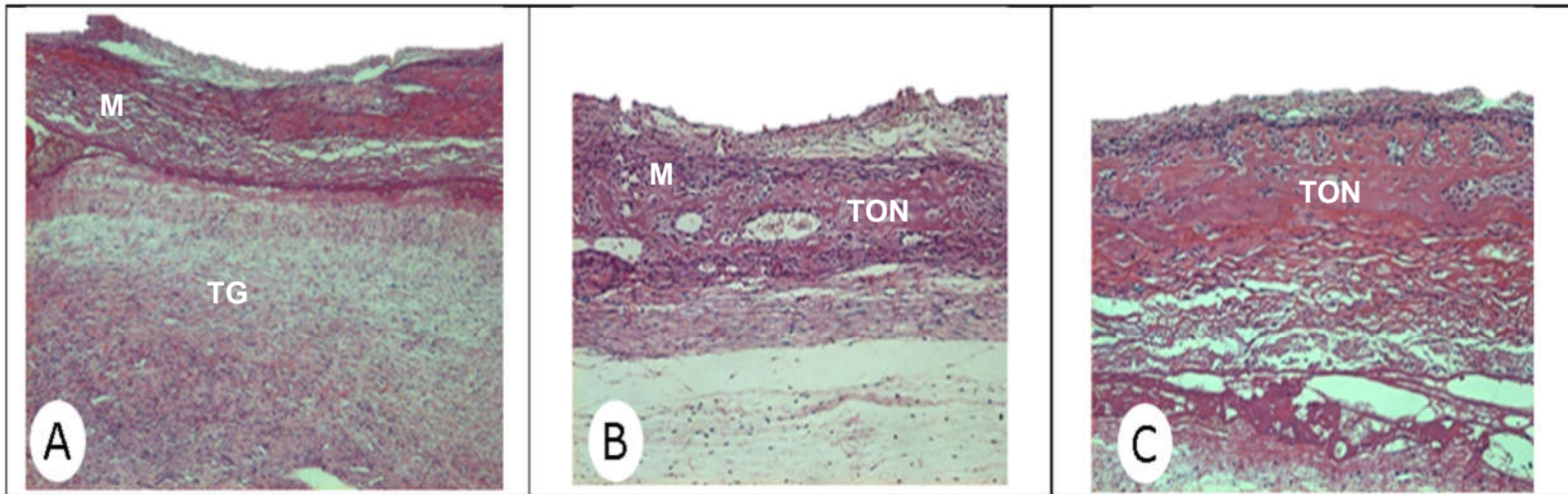


Figura 4. Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS) 7 dias, (A) Aumento de 6.3X. Presença de membrana (M), junto ao coto protegendo o tecido de granulação (TG), (B) aumento 12.5X membrana colabada (M) no centro do defeito e já a presença de tecido ósseo neoformado (TON), (C) Aumento de 25X tecido ósseo neoformado no interior da membrana.

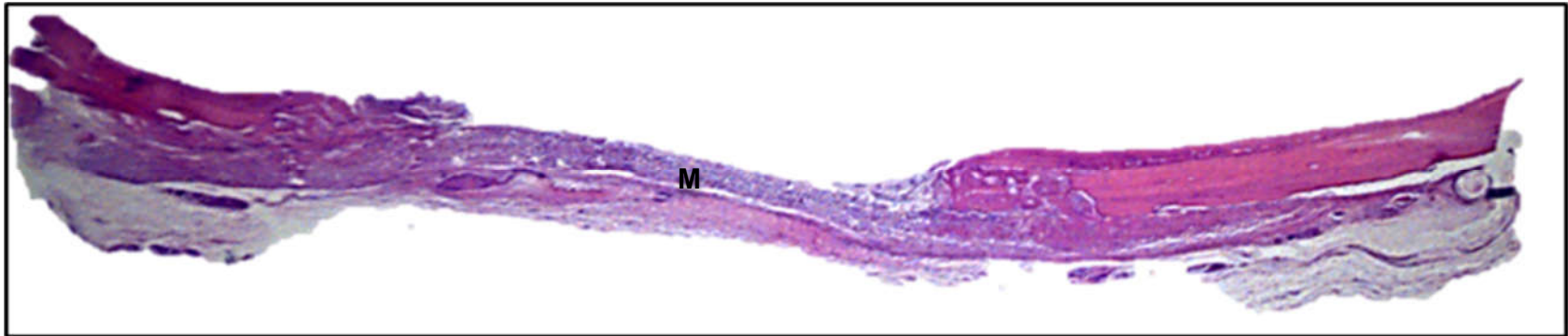


Figura 5. Grupo membrana de pericárdio porcino (JS) 15 dias. Imagem panorâmica mostra a presença da membrana (M) adaptada sobre o defeito ósseo

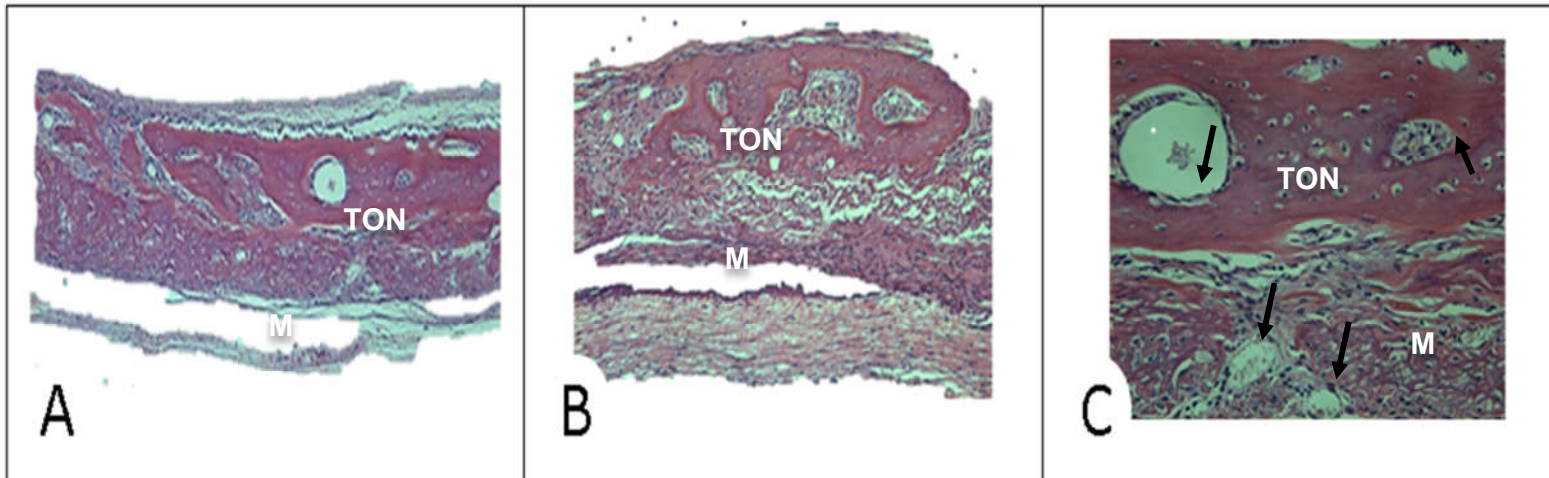


Figura 6. Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS) 15 dias. (A) Aumento de 6.3X membrana e ilhas de tecido ósseo neoformado (TON), aumento (B), de 12.5X aumento. Presença da membrana (M) e tecido ósseo neoformado. (C) Aumento de 25X: Área de tecido ósseo neoformado (TON) entremeada com membrana M, setas pretas mostram a presença de vasos sanguíneos.

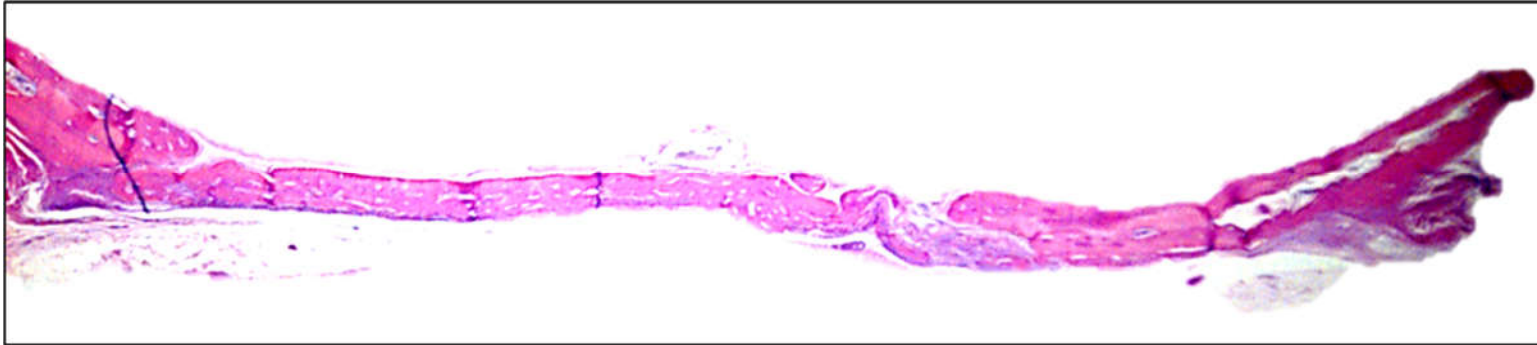


Figura 7. Grupo Pericárdio Suíno (JS) – 30 dias. Imagem panorâmica. Nota-se grande quantidade de tecido ósseo neoformado, e não há mais a presença da membrana íntegra protegendo o defeito.

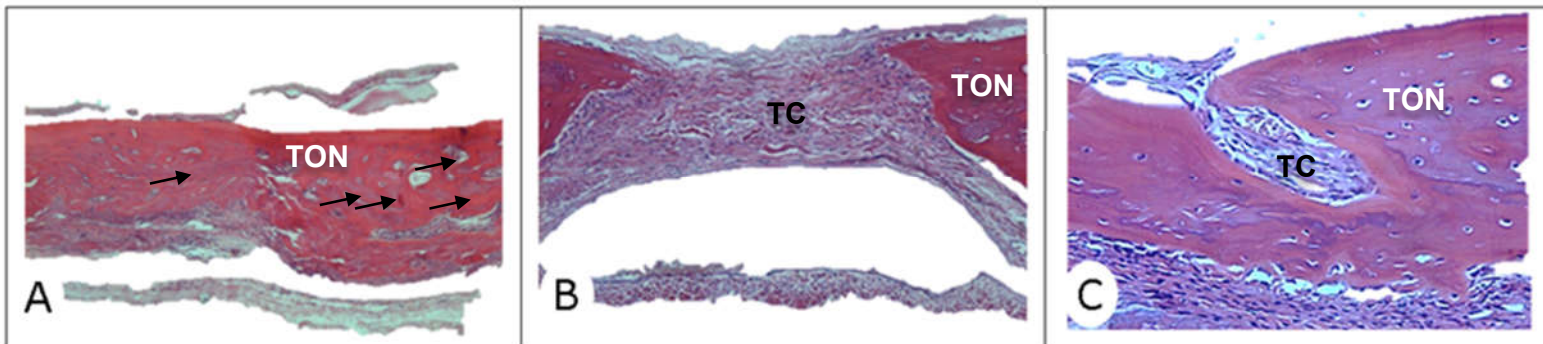


Figura 8. Grupo Pericárdio Suíno (JS) – 30 dias: (A) Aumento de 6.3X. Fragmentos da membrana (Seta preta) localizada no interior do Tecido ósseo neoformado (TON), (B) aumento de 12.5X centro do defeito com a presença tecido conjuntivo denso (TC), (C), aumento 25X centro do defeito praticamente fechado com a presença de tecido ósseo neoformado (TON) e tecido conjuntivo (TC).

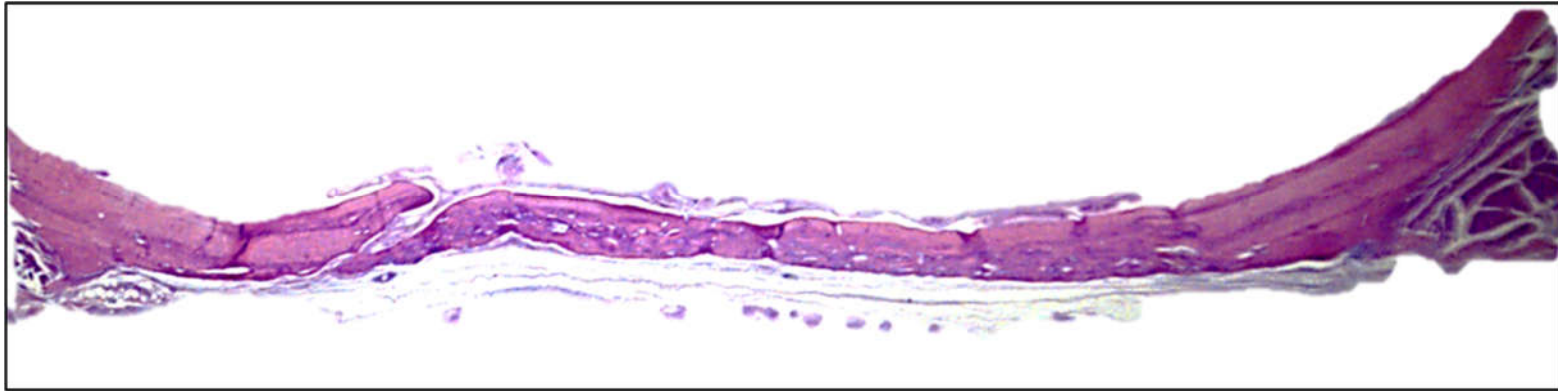


Figura 9. Imagem Grupo Pericárdio Suíno (JS) – 60 dias. Imagem panorâmica. Demonstra o defeito ósseo reparado por um tecido ósseo neoformado.



Figura 10. Grupo Pericárdio Suíno (JS) – 60 dias. (A) Aumento de 6.3x: A imagem mostra o centro do defeito fechado por tecido ósseo neoformado (TON) de um espécime, (B) Aumento de 12.5x: centro do defeito fechado por tecido ósseo neoformado (TON) de um espécime, (C) Aumento de 25x, centro do defeito reparado por tecido conjuntivo (TC).

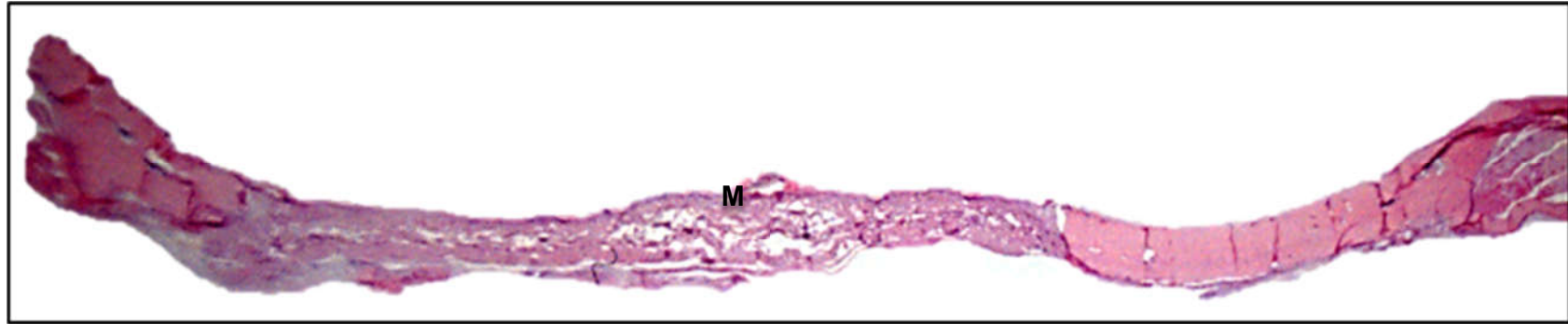


Figura 11. Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 7 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo.

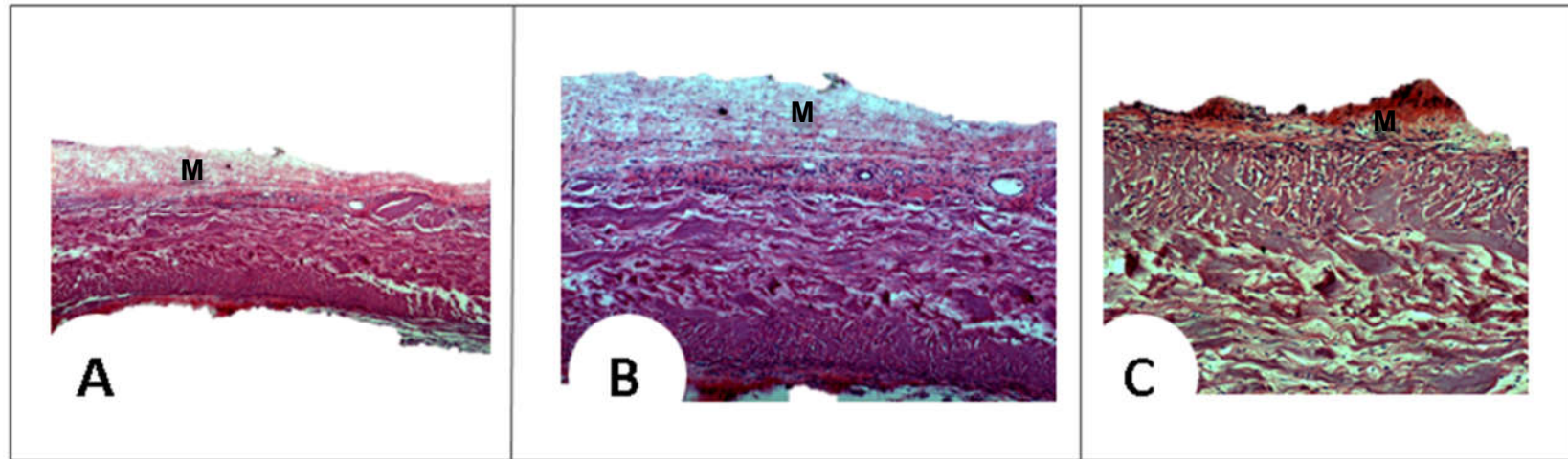


Figura 12. Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 7 dias. (A) aumento de 6.3X: Presença da membrana (M) no centro do defeito (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X.

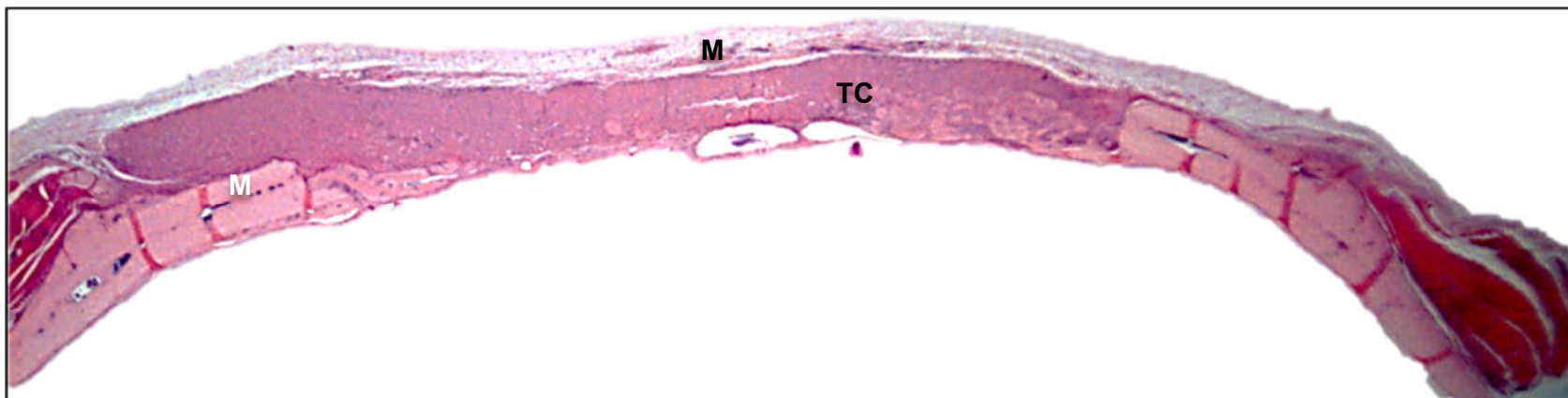


Figura 13. Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 15 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana (M) na área de defeito ósseo. Presença da membrana sob um tecido conjuntivo frouxo (TC) organizado.

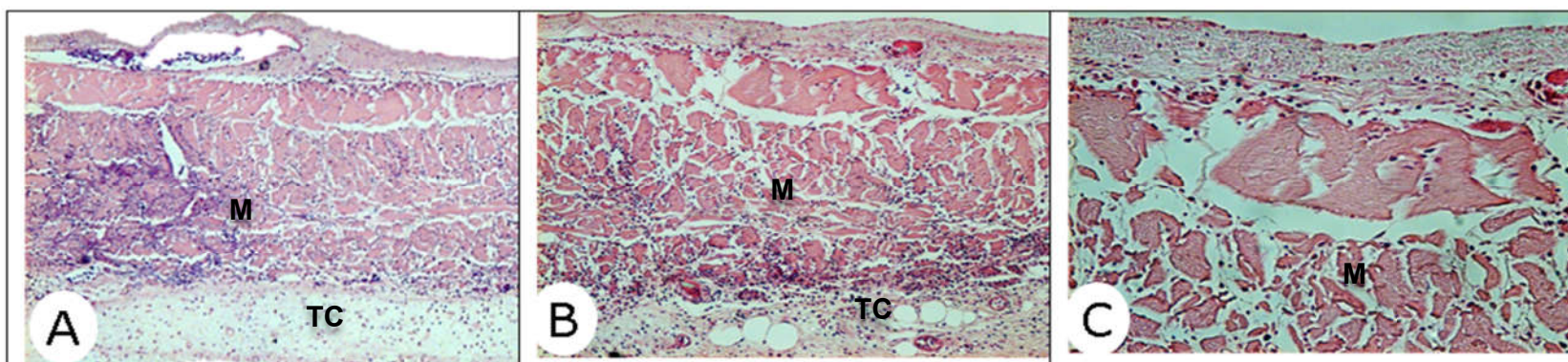


Figura 14. Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 15 dias. (A) Aumento de 6.3X. (B) Aumento de 12.5X e (C) Aumento de 25X. Presença da membrana sob um tecido conjuntivo frouxo (TC) organizado sem aspectos de um infiltrado inflamatório.

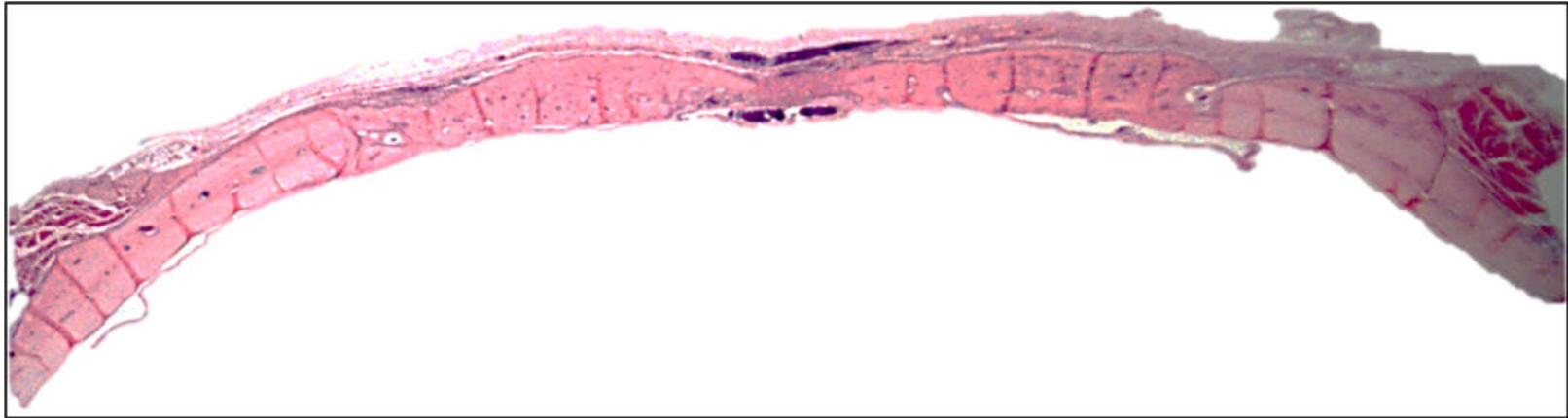


Figura 15. Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 30 dias, imagem panorâmica. A imagem demonstra um dos espécimes que aos 30 dias já teve praticamente concluído o processo de regeneração óssea guiada.

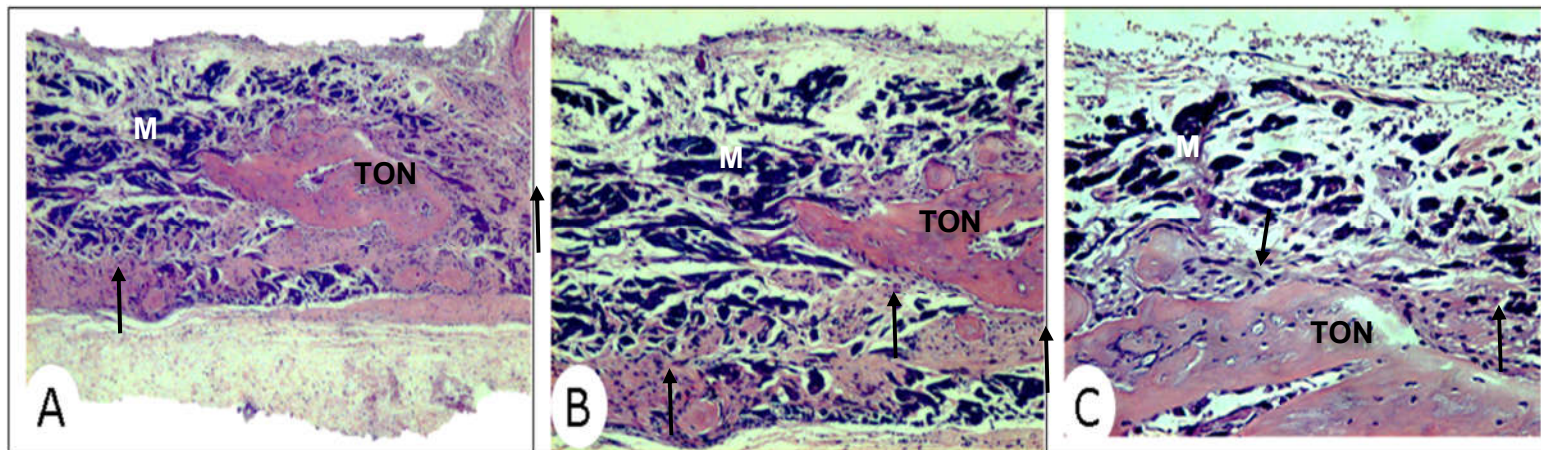


Figura 16. Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 30 dias. (A) aumento de 6,3X (A), (B) aumento de 12,5X (C) aumento de 25X. Presença de tecido ósseo neoformado (TON) no interior da membrana (M) juntamente com um tecido conjuntivo (seta) bem organizado e celularizado.

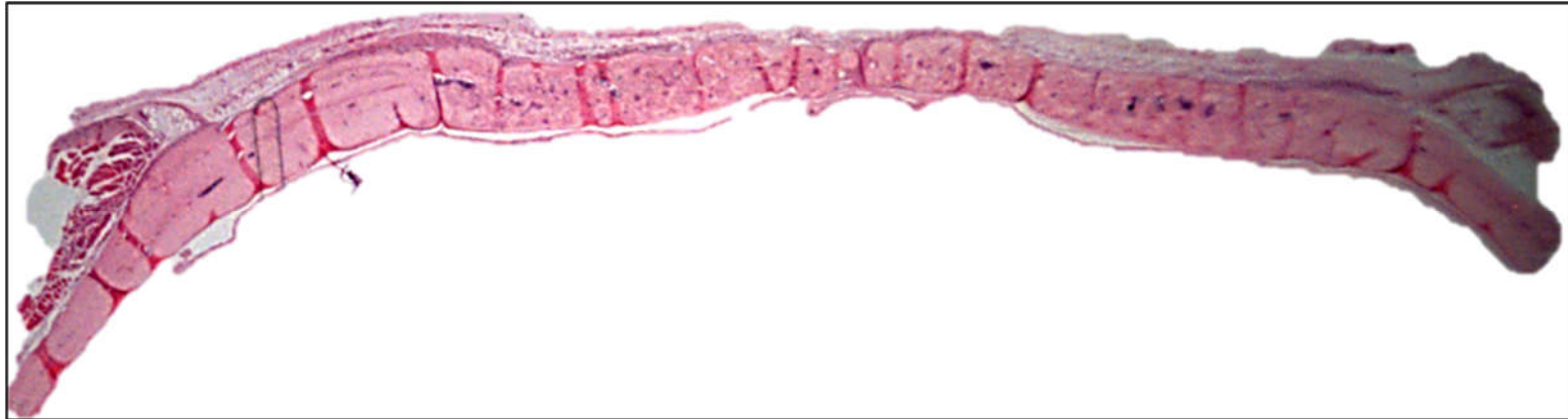


Figura 17. Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 60 dias, imagem panorâmica. A imagem demonstra um dos espécimen que aos 60 dias apresentou completo o processo de regeneração óssea guiada.

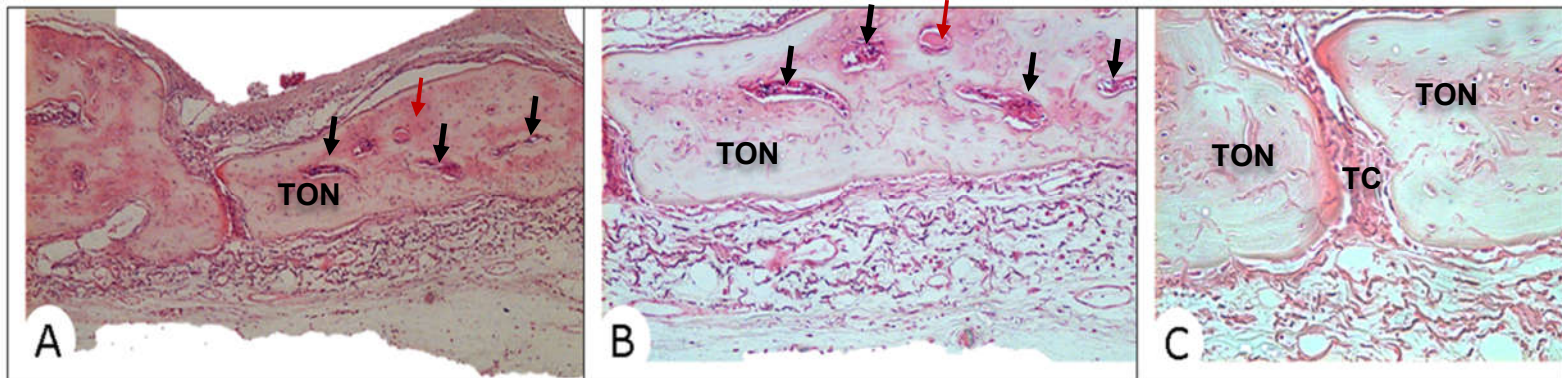


Figura 18. Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 60 dias aumento de 6X (A), aumento de 12X(B), aumento de 25X(C). Centro do defeito, com tecido ósseo neoformado (TON), presença de vasos sanguíneos (seta preta) no interior do tecido ósseo e fragmentos da membrana (seta vermelha). Presença também de tecido conjuntivo (TC).

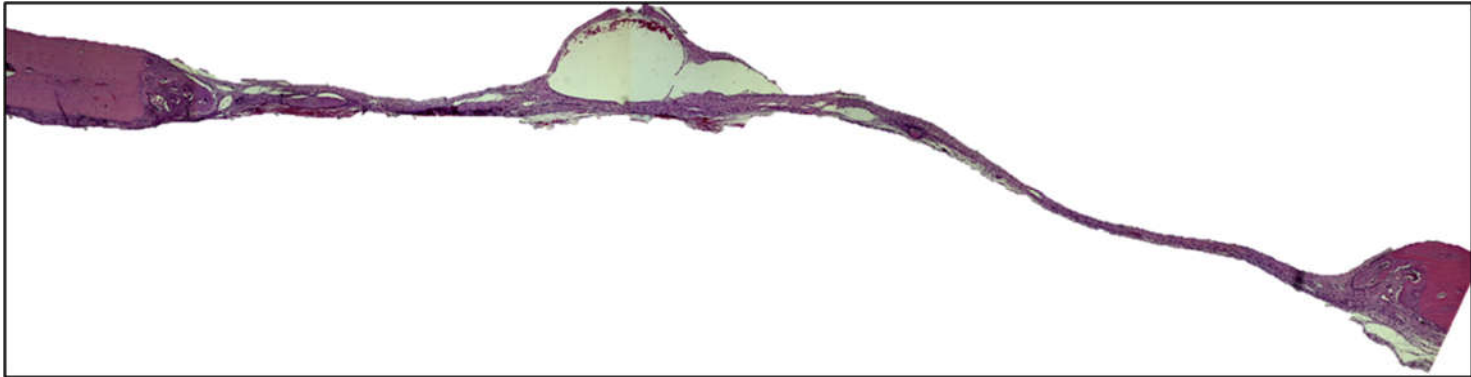


Figura 19. Grupo Coágulo (Co) 7 dias, imagem panorâmica. Presença de tecido de granulação por toda extensão do defeito ósseo.

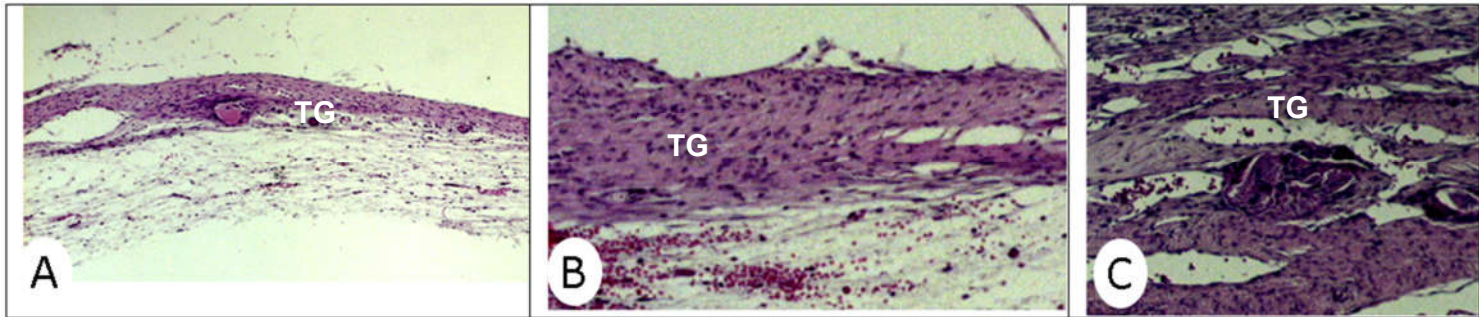


Figura 20. Grupo coágulo (Co) 7 dias. (A) aumento de 6.3X (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X. Presença de tecido de granulação (TG) no centro do defeito.

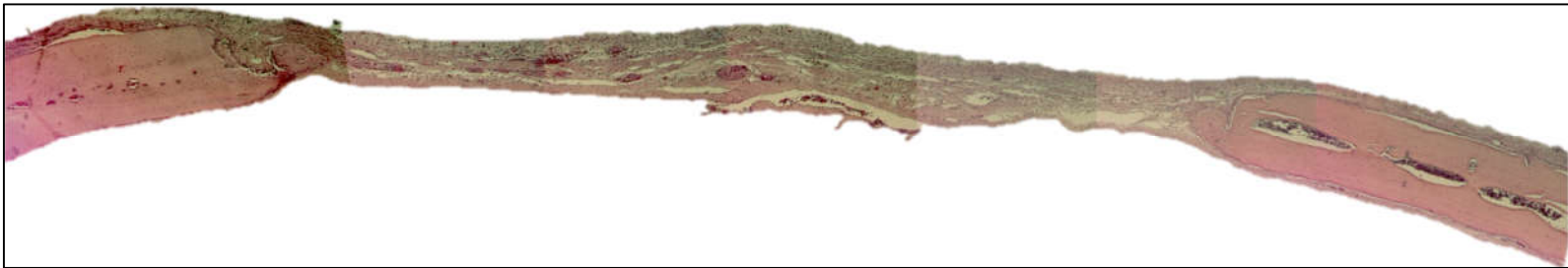


Figura 21. Grupo Coágulo (Co) 15 dias, imagem panorâmica. Presença de tecido conjuntivo frouxo por toda extensão do defeito ósseo.

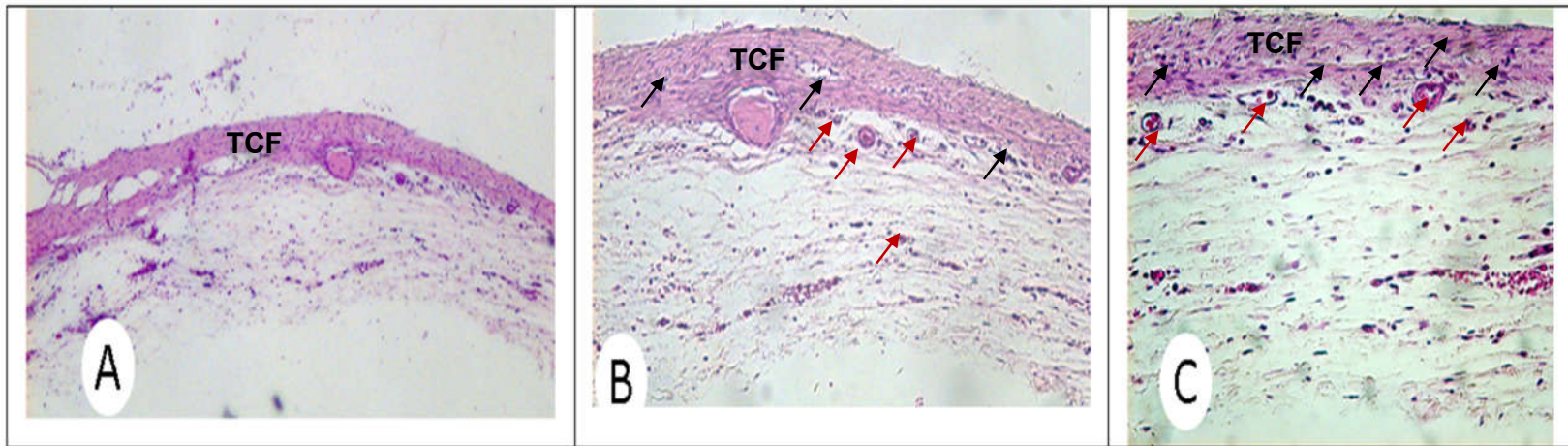


Figura 22. Grupo coágulo (Co) 15 dias. (A) aumento de 6.3X (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X. Presença de um tecido conjuntivo frouxo (TCF) ricamente celularizado (seta preta) e vascularizado (seta vermelha)

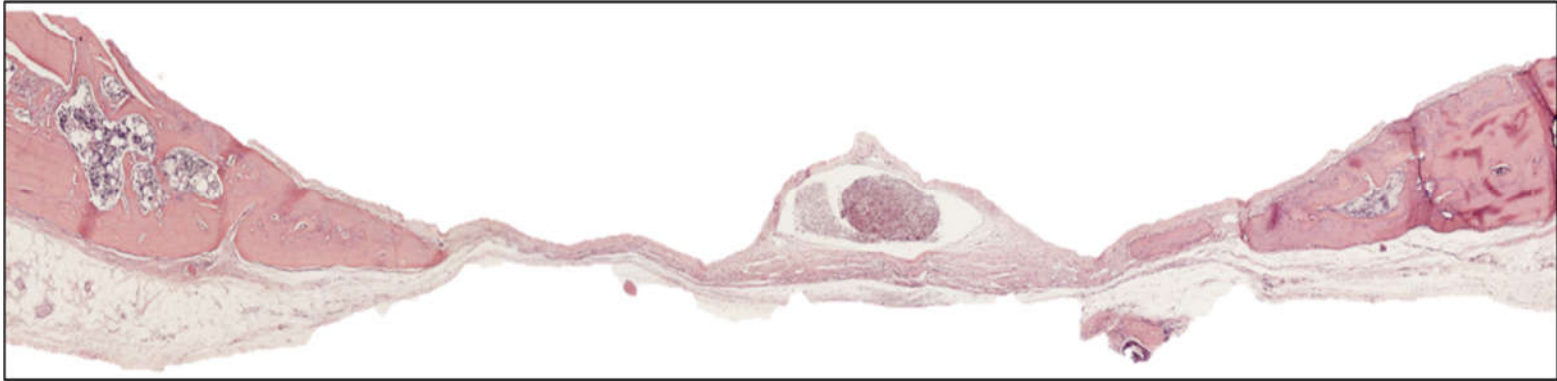


Figura 23. Grupo Coágulo (Co) 30 dias, imagem panorâmica. Presença de tecido conjuntivo denso por toda extensão do defeito ósseo.

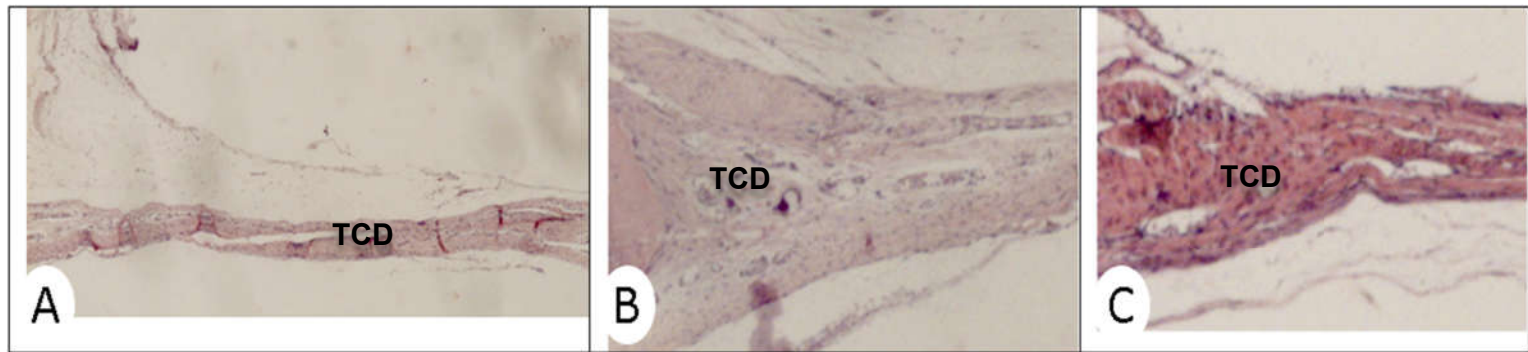


Figura 24. Grupo coágulo (Co) 30 dias. (A) aumento de 6.3X (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X. Presença de um tecido conjuntivo denso, com menor quantidade de células e vasos sanguíneos.

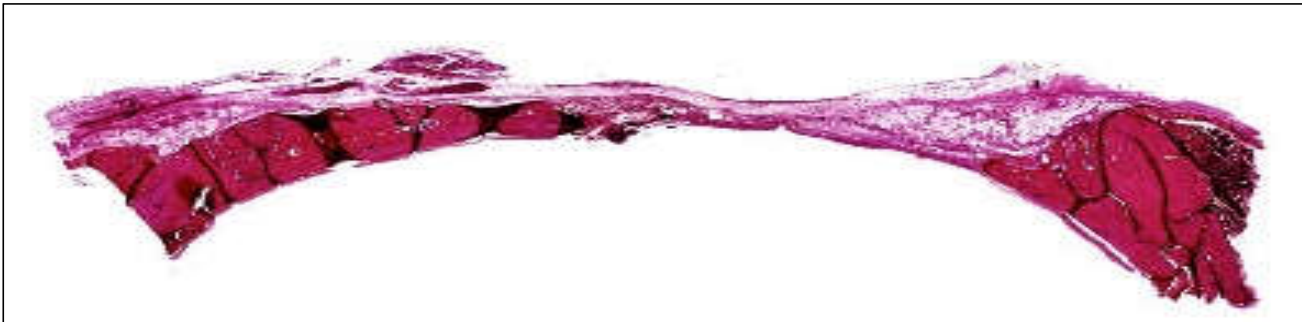


Figura 25. Grupo Coágulo (Co) 60 dias, imagem panorâmica. Presença de tecido conjuntivo fibroso por toda extensão do defeito ósseo.

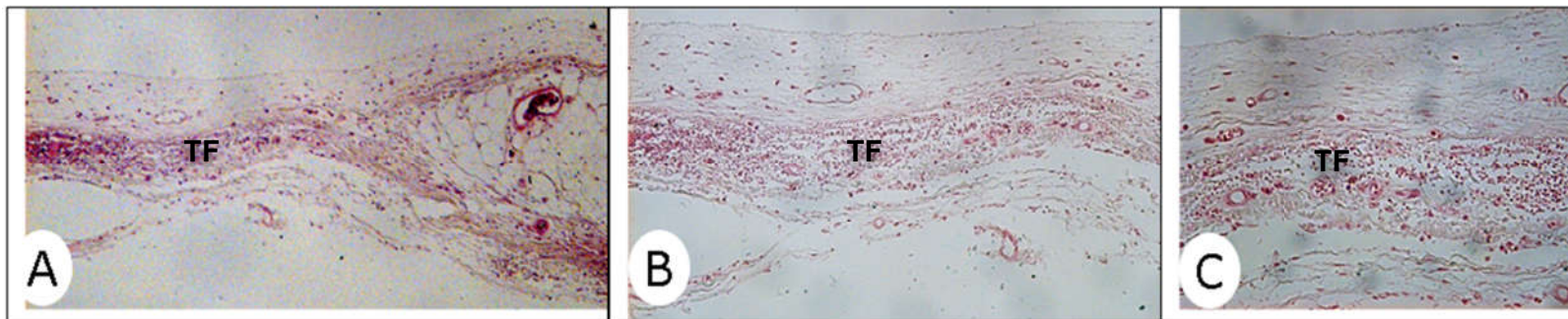


Figura 26. Grupo coágulo (Co) 60 dias. (A) aumento de 6.3X (A), (B) aumento 12.5X, (C) aumento de 25X. Presença de um tecido conjuntivo fibroso (TF) caracterizando o final do processo de reparo no defeito ósseo

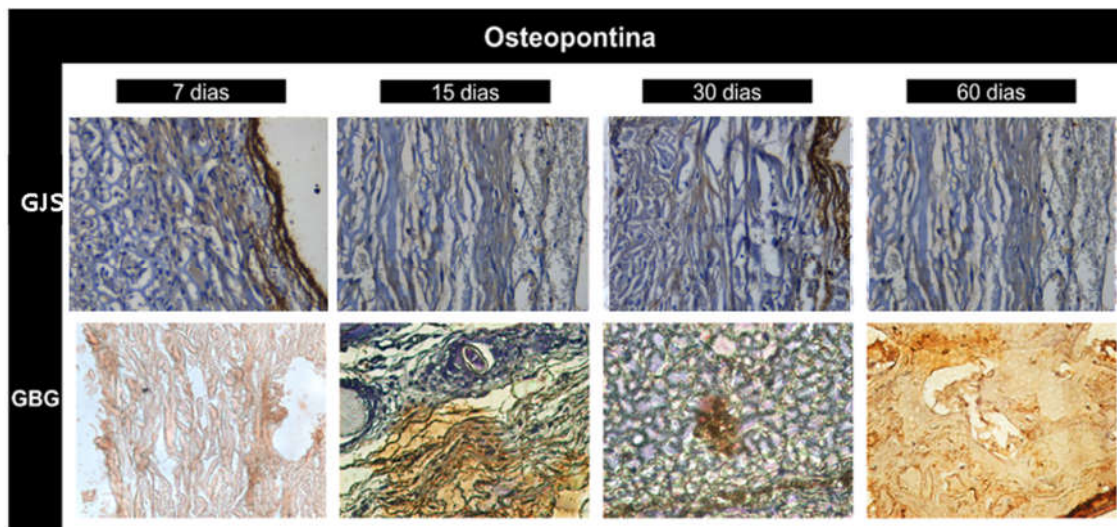


Figura 27. Foto micrografias dos cortes histológicos em aumento de 40x ao centro do DOC referente aos grupos (ST) membrana pericárdio suíno e grupo (BG) membrana colágeno suíno, nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de reparação, denotando áreas de expressão da proteína OP.

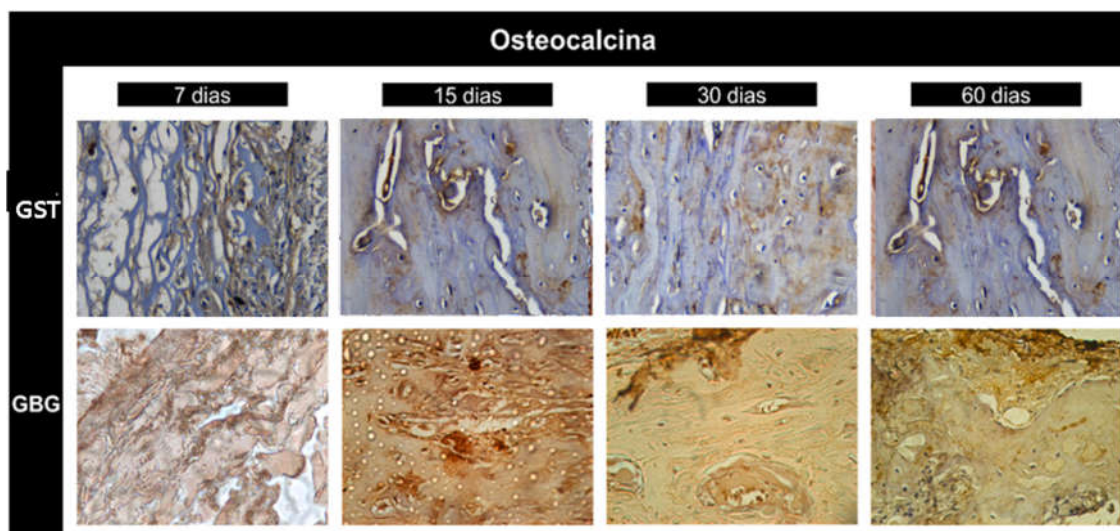


Figura 28. foto micrografias dos cortes histológicos em aumento de 40x ao centro do DOC referente aos grupos (ST) membrana pericárdio suíno e grupo (BG) membrana colágeno suíno, nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de reparação, denotando áreas de expressão da proteína OC.

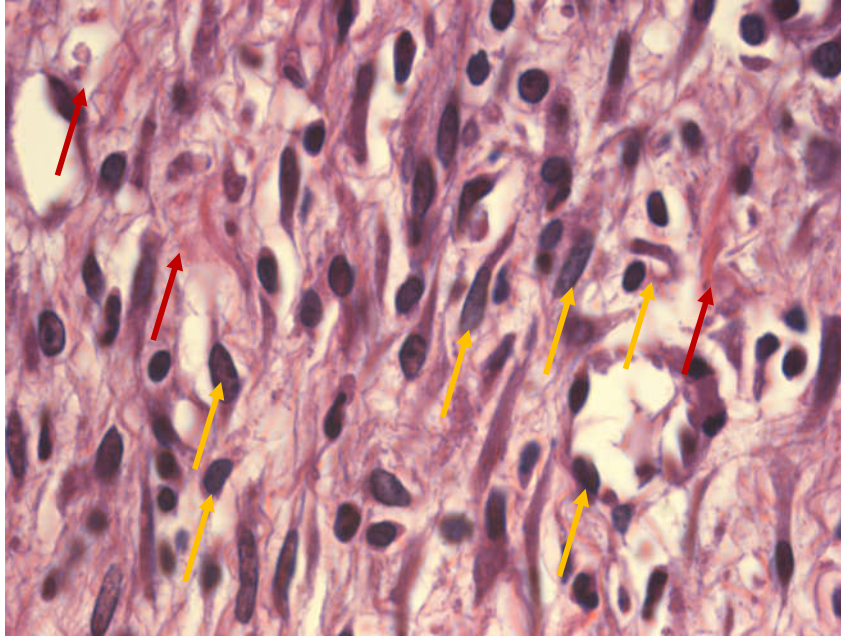


Figura 29. Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS) 7 dias, aumento de 100X – células inflamatórias (seta amarela) e vasos sanguíneos (Seta vermelha)

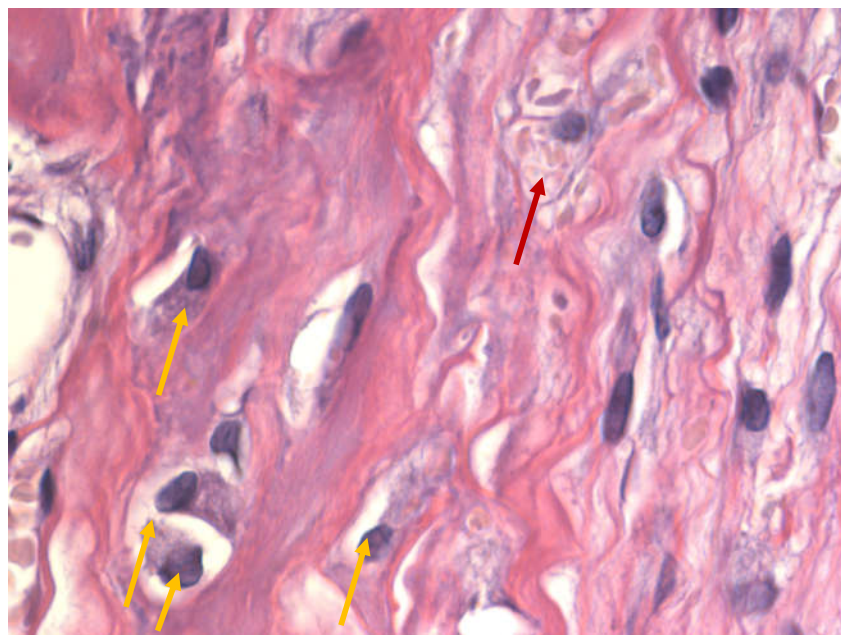


Figura 30. Grupo Membrana de pericárdio suíno (JS) 15 dias, aumento de 100X – células inflamatórias (seta amarela) e vasos sanguíneos (Seta vermelha)

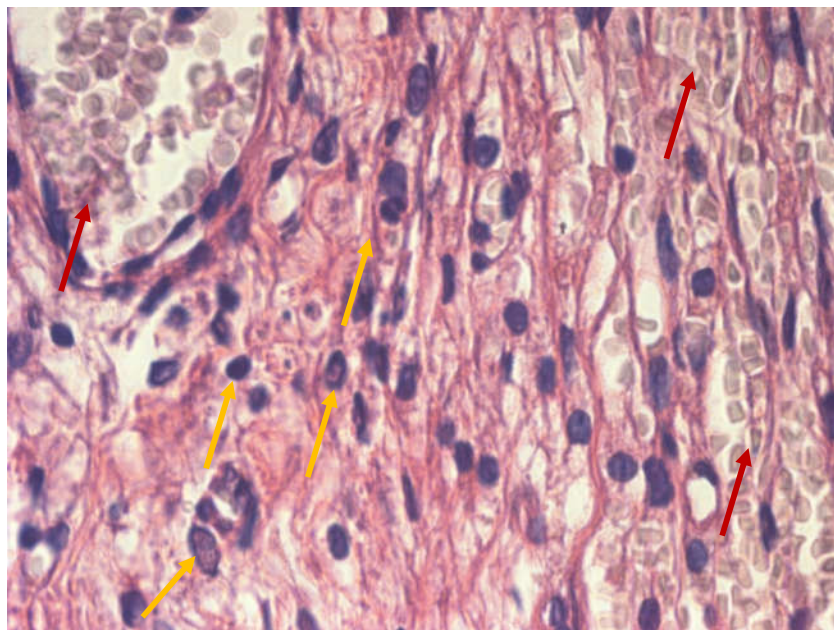


Figura 31. Grupo Membrana de colágeno suíno (BG) 7 dias, aumento de 100X – células inflamatórias (seta amarela) e vasos sanguíneos (Seta vermelha)

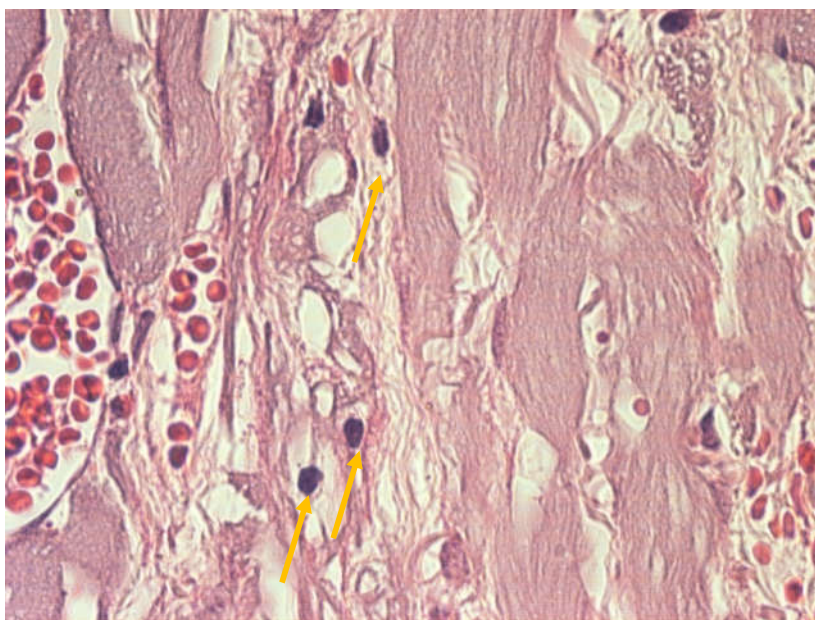


Figura 32. Grupo Membrana de colágeno suíno (BG) 15 dias, aumento de 100X – células inflamatórias (seta amarela) e vasos sanguíneos (Seta vermelha)

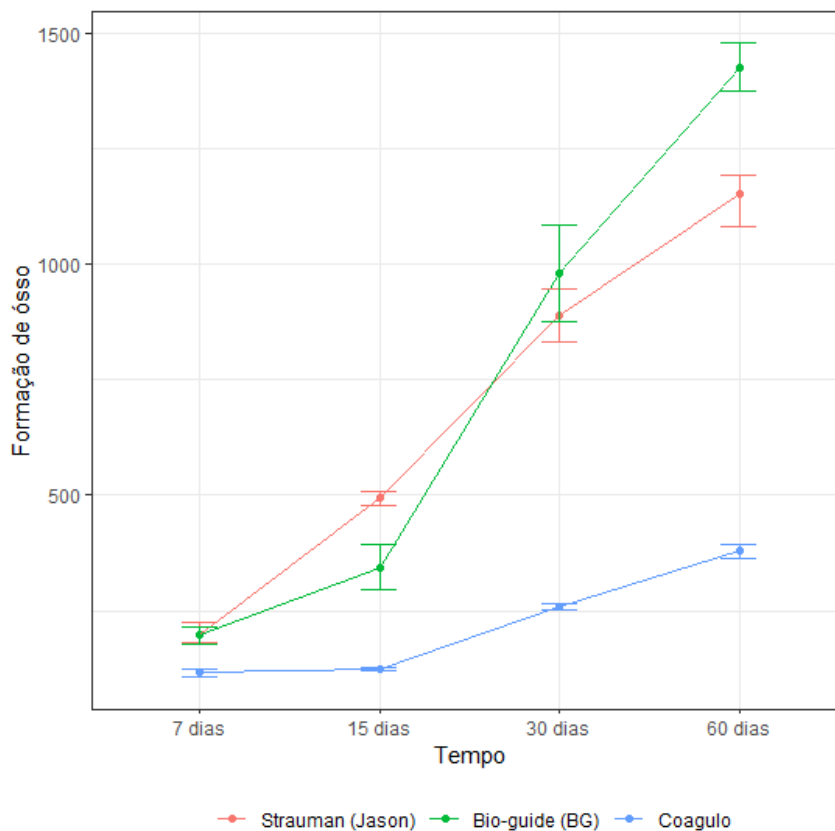


Gráfico 1. Proporção de formação de osso, membrana de pericárdio porcino grupo (JS), membrana de colágeno porcino grupo (BG), grupo Coágulo (Co).

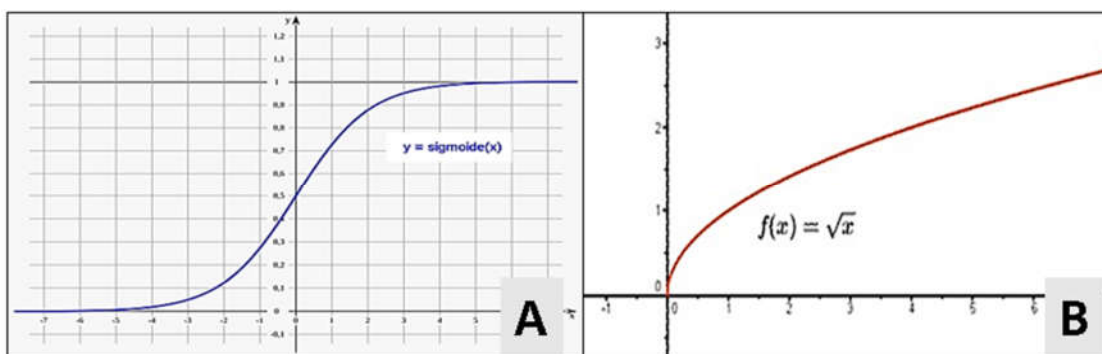


Gráfico 2. Comportamento de neoformação óssea: Grupo de membrana de colágeno porcino (BG) função logística sigmoide (A), grupo pericárdio porcino Jason (JS) função raiz quadrada (B).

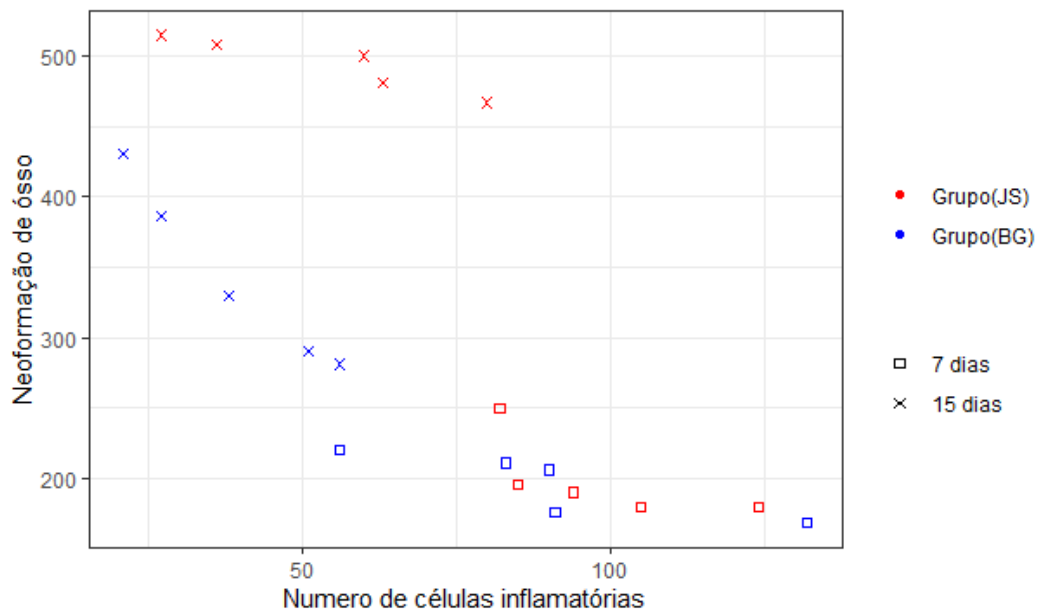


Gráfico 3. Correlação de Pearson para número de células inflamatórias e neoformação óssea - grupo de membrana de pericárdio suíno (JS) e grupo de colágeno porcino (BG)

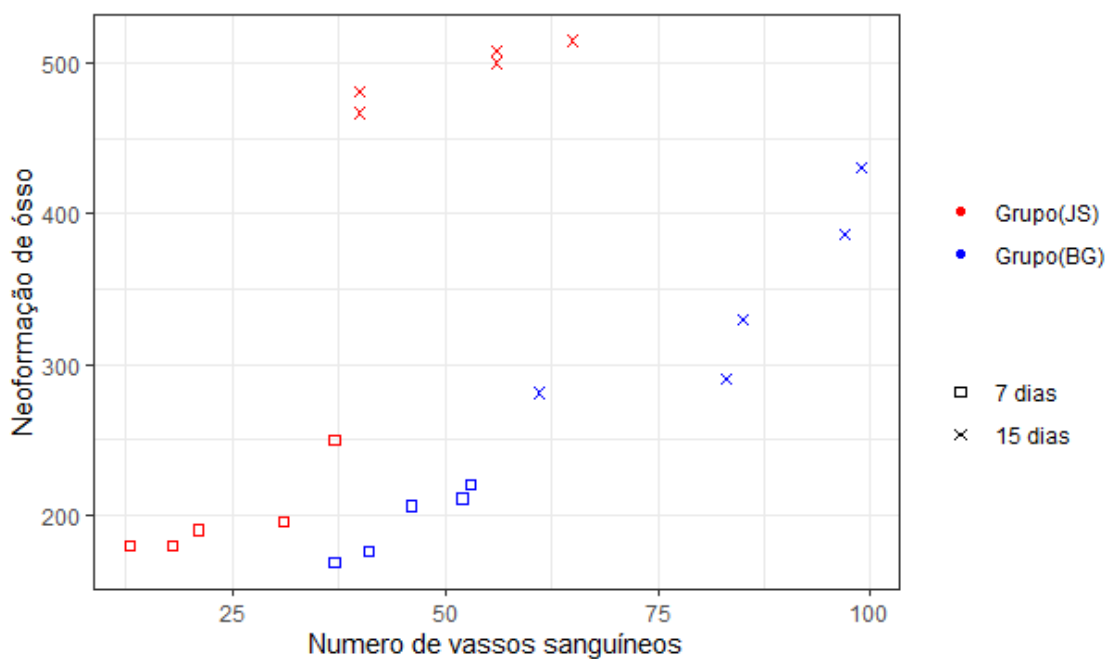


Gráfico 4. Correlação de Spearman para vasos sanguíneos e proporção de osso neoformado - grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo colágeno porcino (BG).

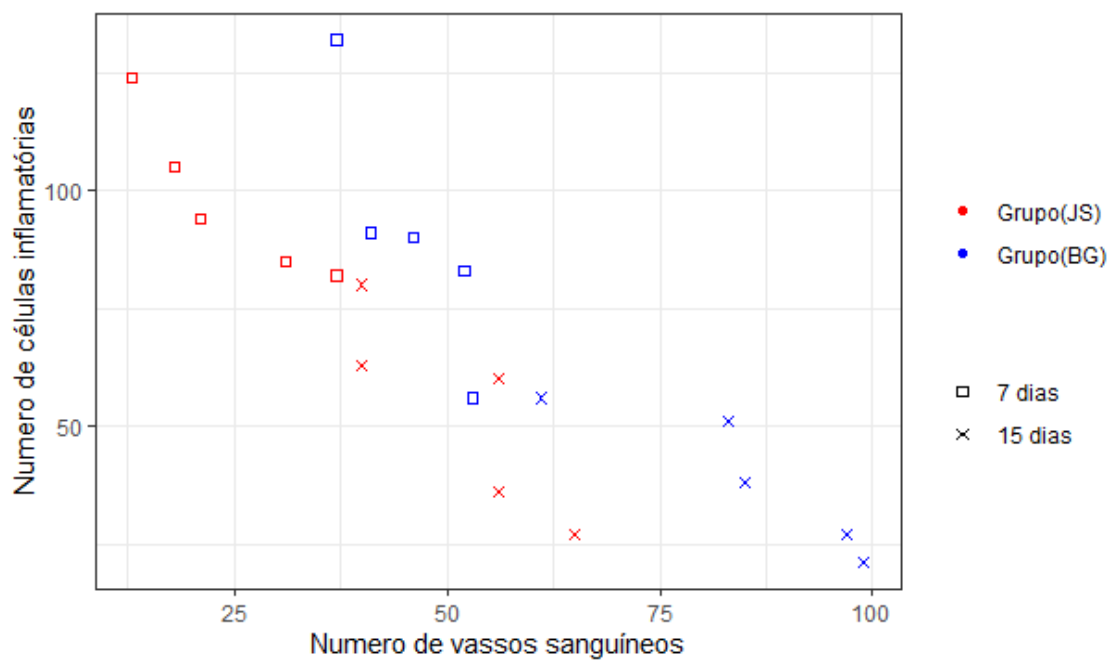


Gráfico 5. Grupo de membrana de pericárdio porcino (JS) e grupo de membrana colágeno porcino (BG) - correlação de Spearman para vasos sanguíneos e proporção de células inflamatórias.

Tabelas

9 Tabelas.

Grupos	Média	DS
Grupo (JS)	683.300	377.479
Grupo (BG)	735.650	512.852
Grupo (Co)	219.100	112.363

Tabela 1. Formação óssea

DS= Desvio Padrão, Intervalo de confiança 95%, grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG), grupo coágulo (Co).

Grupos	Diferença de Médias	Significância
Grupo (JS) Grupo (BG)	-52.350	0,021
Grupo (JS) Grupo (Co)	464.200	0,000
Grupo (BG) Grupo (Co)	516.550	0,000

Tabela 2. Comparação entre grupos em relação a formação óssea

P<0,005, grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG), grupo coágulo (Co).

Tempo/ Grupos	Media	Dif. Médias	Significância	95% Intervalo de confiança			
				Significância			
				Limite inferior	Limite superior		
7 dias	Grupo (JS)	Grupo (BG)	3.000	1.000	-89.324	95.324	
		Grupo (Co)	115.6	83.6000	0.088	-8.724	175.924
	Grupo (BG)	Grupo (Co)		80.6000	0.106	-11.724	172.924
15 dias	Grupo (JS)	Grupo (BG)		150.600*	0.001	58.276	242.924
		Grupo (Co)	122.4	371.800*	.000	279.476	464.124
	Grupo (BG)	Grupo (Co)		221.200*	.000	128.876	313.524
30 dias	Grupo (JS)	Grupo (BG)		-91.600*	.052	-183.924	0.724
		Grupo (Co)	258.4	629.800	0.000	537.476	722.124
	Grupo (BG)	Grupo (Co)		721.400	0.000	629.076	813.724
60 dias	Grupo (JS)	Grupo (BG)		-217.400	0.000	363.724	-179.076
		Grupo (Co)	380	771.600	0.000	679.276	863.924
	Grupo (BG)	Grupo (Co)		1043.000	0.000	950.676	1135.324

Tabela 3. Comparação por tempo entre grupos em relação a formação óssea

P<0,005, grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG), grupo coágulo (Co).

Grupos	7 dias	DS	15 dias	DS	30 dias	DS	60 dias	DS
Grupo (BG)	196.20	22.8	343.60	64.0	888.2	72.7	1423	64.7
Grupo (JS)	199.20	29,2	494.20	19.8	979.8	139.8	1151.6	77.7
P<0.05	1.00		0,01		0.052		0.00	

Tabela 4. Proporção de osso neoformado nos grupos pericárdio porcino (JS) e colágeno porcino (BG)

DP= Desvio Padrão, Intervalo de confiança 95%, grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG), grupo coágulo (Co).

Grupos	Tratamento	Dif. Médias	Significância	95% Intervalo de confiança Significância		
				Limite inferior	Limite superior	
Grupo (JS)	7 dias	15 dias	-295.000	0.000	-397.418	-192.582
		30 dias	-689.000	0.000	-791.418	-586.582
		60 dias	-952.400	0.000	-1054.818	-849.982
Grupo (BG)	7 dias	15 dias	-147.400	0.001	-249.818	-44.982
		30 dias	-783.600	0.000	-886.018	-681.182
		60 dias	-1226.800	0.000	-1329.218	-1124.382
Grupo (Co)	7 dias	15 dias	-6.800	1.000	-109.218	95.618
		30 dias	-142.800	0.002	-245.218	-40.382
		60 dias	-264.400	0.000	-366.818	-161.982

Tabela 5. Comparação por períodos de tempo em cada Grupo (JS), (BG), (Co).

P<0,005, grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG), grupo coágulo (Co).

Grupos	Osteocalcina	Osteopontina
Grupo ST 7 dias	++	+
Grupo BG 7 dias	++	++
Grupo ST 15 dias	+++	++

Grupo BG 15 dias	++	++
Grupo ST 30 dias	+++	+
Grupo BG 30 dias	+++	+
Grupo ST 60 dias	++	+
Grupo BG 60 dias	+++	+

Tabela 6. Scores relacionados à imunomarcção das proteínas OC e OP referentes a membrana pericárdio suíno grupo (ST) e membrana colágeno suíno grupo (BG), estes escores são classificados como nulo 0, leve 1 (+), moderado 2 (++) e intenso 3 (+++).

		Vasos sanguíneos	Células inflamatórias
Formação óssea	Correlação de Pearson	.487	-.718
	Significância bilateral	0.30	.000
Células inflamatórias	Correlação de Pearson	-.847	
	Significância bilateral	0.00	

Tabela 7. Correlação de Pearson geral para ambos grupos (JS) e (BG) em relação à formação óssea e vasos sanguíneos, formação óssea e células inflamatórias, e células inflamatórias com vasos sanguíneos

Grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG).

Grupos		Formação óssea	Células inflamatórias
Grupo (JS)	Correlação de Pearson	1	-.852
	Significância bilateral		.002
Grupo (BG)	Correlação de Pearson	1	-.900
	Significância bilateral		.000

Tabela 8. Correlação de Pearson para Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) - Células inflamatórias e formação óssea.

P<0,005

Grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG).

Grupos	7 dias			15 dias		
	Média	DP	Média de erro	Média	DP	Média de erro
			standard			standard
Grupo (JS)	86.40	36.624	16.379	80.50	37.099	18.549
Grupo (BG)	64.80	19.331	8.645	48.75	32.046	16.023
	p =0.818			p= 0.381		

Tabela 9. Teste T-Student para Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) - Células inflamatórias no tempo 7 e 15 dias

P<0,005, Desvio Padrão (DS), grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG).

	Tempo	Score
		Inflamatório
Grupo (JS)	7 dias	2.7
Grupo (BG)	7 dias	2.5
Grupo (JS)	15 dias	2,7
Grupo (BG)	15 dias	2.0

Tabela 10. Intensidade do processo inflamatório dos grupos de membrana pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG)

Grupos	Formação óssea	Vasos sanguíneos
--------	----------------	------------------

Grupo (JS)	Células	Correlação de Spearman	1.000	0.891
		Significância bilateral		0.001
Grupo (BG)	Células	Correlação de Spearman	1.000	0.969
		Significância bilateral		0.000

Tabela 11. Correlação de Spearman Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) – Vasos sanguíneos e formação óssea.

Grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG),

Grupos	7 dias			15 dias		
	Média	DP	Média de erro standard	Média	DP	Média de erro standard
Grupo (JS)	42.20	23.467	10.495	33.20	9.257	4.140
Grupo (BG)	68.50	34.113	17.056	62.25	14.408	7.204
	p = 0.212			p = 0.008		

Tabela 12. Teste T-Student para Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) - Vasos sanguíneos no período de 7 e 15 dias

P<0,005, grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG).

Grupos	Células	Células inflamatórias		Vasos sanguíneos	
		Correlação de Spearman	Significância bilateral	Correlação de Spearman	Significância bilateral
Grupo (JS)	Células	Correlação de Spearman	0.00	0.-959	
		Significância bilateral		0.00	
Grupo (BG)	Células	Correlação de Spearman	0.00	-.907**	
		Significância bilateral		0.00	

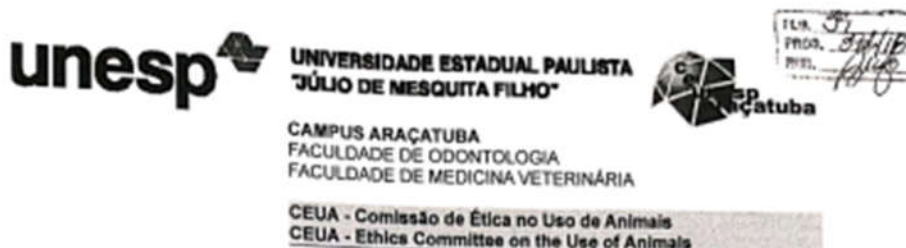
Tabela 13. Correlação de Spearman Grupos de membrana de pericárdio porcino (JS) e membrana de colágeno porcino (BG) – Vasos sanguíneos e células inflamatórias.

Grupo membrana de pericárdio porcino (JS), grupo de membrana colágeno porcino (BG),

Anexos

10 Anexos.

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética no uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Potencial de regeneração óssea de colágeno porcino (JASON Strauman). Estudo histológico, histomorfométrico, imunológico, e micro CT em defeitos ósseos de calvaria de ratos", Processo FOA nº 00372-2018, 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 20 de Julho de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 20 de Agosto de 2021.

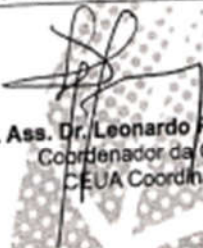
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Setembro de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Potencial for regeneration of porcine collagen membrane. A histological, histomorphometric, immunohistochemical, and micro CT study of bone defects in rodent skullcaps", Protocol FOA nº 00372-2018, 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 July 20, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 20, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 20, 2021.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
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 B – Normas para publicação.

JOMI

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants

GUIDELINES FOR AUTHORS MANUSCRIPT SUBMISSION

Submit manuscripts via JOMI's online submission service: www.manuscriptmanager.com/jomi

Manuscripts should be uploaded as a PC Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. No paper version is required.

Acceptable material. Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles concerned with reports of basic or clinical research, clinical applications of implant research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant field are invited.

Number of authors. Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial board.)

Review/editing of manuscripts.

Manuscripts will be reviewed by the editor in-chief and will be subjected to blind review by the appropriate associate editor and reviewers with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval. Adherence to guidelines. Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

ONLINE ONLY ARTICLES

All biomechanics (FE) articles and technology and case reports will appear in online format only. Articles are listed in the issue's Table of Contents and abstracts are printed in the issue. Full text of articles is available online.

MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997; 126:36–47).

See <http://www.icmje.org> Manuscripts should be double-spaced with at least a one-inch margin all around.

- Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.
- Title page. Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
- Abstract/key words. The abstract should include a maximum of 350 words. A list of key words should be provided, not to exceed six. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following four sections: Purpose, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Abstracts of short communications should also be structured but should be a maximum of 250 words. For all other types of articles (ie, literature reviews, technical and case reports), abstracts should not exceed 250 words and need not be structured.
- Article text. Currently there is no article page limit (within reason).
- Acknowledgments. Persons who have made substantive contributions to the study can be acknowledged at the end of the article. Also specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- Legends. Figure legends should be typed as group at the end of the manuscript. Detailed legends are encouraged. For photomicrographs, specify original magnification and stain.
- Tables. Each table should be logically organized, typed on a separate page at the end of the manuscript, and numbered consecutively. Table title and footnotes should be typed on the same page as the table.
- Abbreviations. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- Trade names. Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name should be included parenthetically at first mention.
- Numbers. Per SI convention, authors are requested to use decimal points rather than commas for fractional numbers.

REFERENCES

- All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.
- The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.
- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
- Avoid using abstracts as references.

- Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style:

1. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010; 25:525–531.

Book reference style:

1. Wikesjo UME, Hanisch O, Sigurdsson TJ, Caplanis N. Application of rhBMP-2 to alveolar and periodontal defects. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:269–286.

ARTICLE ACCEPTANCE

Article acceptance is pending receipt of images judged to be of sufficient quality for publication (see the guidelines below). Once a manuscript is accepted, authors should submit high-resolution digital image files (on disk) to:

Managing Editor

International Journal of Oral and Maxillofacial Implants
Quintessence Publishing Co, Inc
4350 Chandler Drive

Hanover Park, IL 60133

The disk/package should be labeled with the first author's name, shortened article title, and article number.

DIGITAL IMAGES/ACCEPTED ARTICLES

When preparing final images to send, consider the following points:

- Resolution must be at least 300 dpi when the image is 3 inches wide.
- Images saved in TIFF format are preferred, but JPG or EPS files are acceptable.
- Images grouped together must be saved as individual files.
- Images containing type should either be saved as a layered file or provided along with a second file with type removed.
- Line art (graphs, charts, drawings) should be provided as vector art (AI or EPS files)
- Please do not embed images into other types of documents (eg, Word, Excel, PowerPoint, etc.).

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and can be uploaded as a separate document with the article submission, or it can be mailed (see address above) or faxed (630-736-3634) to the JOMI Managing Editor.

PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons, otherwise faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Managing Editor (630-736-3634).

REPRINTS

Reprints can be ordered from the publisher.

Authors receive a 40% discount on quantities of 100 or 200.

Anexo C – Imagens material e métodos



Figura 33. Descrição da membrana utilizada (A), Membrana com marca de água para identificação da superfície que deverá ser utilizada para fora (B).



Figura 34. Incisão na calvaria do rato (A), trefina utilizada para confecção do defeito crítico (B).

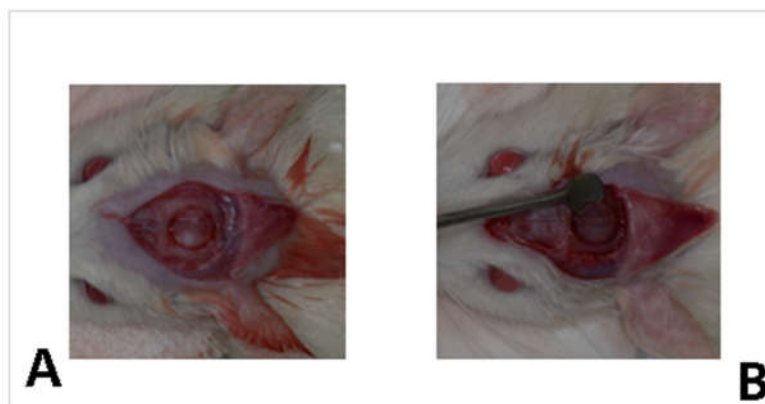


Figura 35. Marcação do defeito (A), estrutura óssea sendo retirada para criação do defeito sem lesionar vasos sanguíneos (B).