



IZABELA FORNAZARI DELAMURA

**Avaliação de uma nova membrana nacional de colágeno de peixe
na regeneração óssea guiada. Análise do perfil inflamatório e
imunohistoquímica em defeitos críticos em calvária de ratos**

**Evaluation of a new national fish collagen membrane in guided
bone regeneration. Analysis of the inflammatory and
immunohistochemical profile in critical defects in rat calvaria**

Araçatuba

2022

IZABELA FORNAZARI DELAMURA

Avaliação de uma nova membrana nacional de colágeno de peixe na regeneração óssea guiada. Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e de perfil inflamatório.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de bacharel em odontologia.

Orientadora: Professora Associada Ana Paula Farnezi Bassi

Araçatuba

2022

*Os resultados deste trabalho dedico à minha querida mãe,
Adriana Maria Fornazari, com todo meu amor e infinitos
agradecimentos, cujo apoio incondicional me deu forças para seguir em
frente. Sem ela, nada disso teria sido possível.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. **Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor Prof. **Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pelo carinho e atenção sempre oferecidos.

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

Meus sinceros agradecimentos a todos **os Professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** por todo ensinamento, pela dedicação e inspiração. Obrigada por serem mestres e me ensinarem uma profissão tão linda e altruísta.

A agência de Fomento **FAPESP**, Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo. pelo apoio financeiro desta pesquisa como bolsa de iniciativa. (Processo nº 2021/00939-1).

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

AGRADECIMENTOS

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade de estudar em uma instituição que preza a formação de profissionais de qualidade, altruístas e atenciosos. Aspiro honrar essa instituição, desempenhado todo dia minha profissão para o bem melhor do próximo.

A minha orientadora **Prof^a. Dr.^a Ana Paula Farnezi Bassi**, por ter me aceitado como sua orientada no terceiro ano de graduação e me ensinado a amar a área da pesquisa. Por me ensinar tanto e me ajudar a crescer pessoalmente, por ter sido a mais que a minha orientadora, uma figura materna dentro da universidade. Obrigada por realizar meu sonho de ter feito iniciação científica dentro da área da cirurgia e me preparado para um futuro próspero.

Ao Professor **Leonardo Perez Faverani**, que muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico. Por ter sido um professor que me inspirou, me ajudou a crescer pessoalmente e contribui enormemente para que eu concluísse um sonho. Obrigada por ser um mestre de coração tão grande, professor.

Ao Doutorando **Vinicius Ferreira Bizelli**, pela nossa amizade e companheirismo, por tudo que me ensinou nesses anos. Por cada minuto que doou para me ensinar, não só sobre a vida na graduação mas sobre tudo, foi meu parceiro em cada momento da iniciação científica, me ajudou em cada dificuldade e me fez rir, deixando tudo mais leve. É uma honra aprender com você e espero continuar aprendendo todos os dias.

Agradeço por isso aos meus avós paternos **Nadir Marinoto Delamura e Waldomiro Delamura**, pelo orgulho que sentiam de minhas conquistas, por sempre darem a mim a melhor versão de vocês, pelo amor sempre oferecido,

sonhos. Aos meus queridos avós maternos **Antônia Jorge Marques Fornazari e José Fornazari**, que formaram uma família alicerçada no trabalho, valorizando e incentivando cada passo dado por mim, com um entusiasmo ímpar a cada conquista alcançada. Meus primeiros exemplos. Meu sucesso é todo de vocês.

Aos meus tios paternos **Paulo Roberto Delamura e Luciana Rincão Delamura**, por todo apoio, pelo amor incondicional e afetivo, por serem meus pais adotivos e me ajudarem nessa longa estrada. Aos meus queridos tios maternos **Rosa Fornazari e José Luiz Hermógenes** pelos conselhos, amizades, por tudo que fizeram por mim para a realização desse sonho. Aos familiares, padrinhos, madrinhas, tios, tias, primos e primas, obrigado por estarem presentes em absolutamente todos os momentos importantes da minha vida, me ensinando o valor da presença e da palavra.

Ao meu namorado **Bruno Fernando Farias Barbosa**, minha eterna admiração com a seriedade e capacidade que lida com os deveres acadêmicos, sendo espelho e, portanto, o responsável pela qualidade que concluo esta etapa. Ao amor oferecido, o companheirismo dividido e o futuro planejado, obrigado por estar comigo.

A minha psicóloga **Lara S. Zuque** que acreditou em mim e na minha capacidade, me ajudou a ter uma nova percepção da vida e lidar com os meus problemas de forma inteligente e me concedeu um novo desenvolvimento pessoal.

Aos amigos de graduação, **Leticia Gabriella de Souza Rodrigues, Ana Flavia Folhas Natali, Ruan Henrique Delmonica Barra, Pedro Coiado, Vitor Hugo Sampaio, Natalia Cristina de Souza Moraes, Priscila Marchesini**, por fazerem com que esses seis anos fossem leves e prazerosos, me presenteando com suas amizades. Em especial a **Beatriz da Silva Araújo**, por ter sido meu braço direito, minha dupla e confidente, sentirei saudades das nossas clinicas juntas.

Agradeço também ao **Caio Daniel de Oliveira Secate**, por ser meu irmão e me apoiar nesses anos de moradia estudantil e graduação. A minha amiga **Bruna Stefani Costa e Silva** por me entender em cada momento e me fazer rir, deixando a vida mais leve.

Aos meus amigos da iniciação científica **Arthur Henrique Alécio Viotto**, **Julia Maria Batista da Silva**, **Nátalia Saori Izumi**, **Nathalia Matos** que caminharam junto comigo, obrigada por torcerem pelo meu sucesso, assim como torço pelo de vocês.

Agradeço também aos pós-graduandos **Júlio de Oliveira**, **Ana Maira Pereira Baggio**, **Maísa Silva**, **Izabella Sol**, **João Matheus Fonseca e Santos**, **Stefani Barbosa**, **Nathalia dos Santos Sanches**, **Stefani Caroline Ferriolli** e **Paulo Matheus Honda** por dividirem seus conhecimentos e me ensinarem todos os processos e técnicas necessárias para a conclusão do meu trabalho.

Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre. Porque alguém disse e eu concordo que o tempo cura, que a mágoa passa, que decepção não mata. E que a vida sempre, sempre continua.

Simone de Beauvoir

DELAMURA, IF. Avaliação de uma nova membrana nacional de colágeno de peixe na regeneração óssea guiada. Análise do perfil inflamatório e imunohistoquímica em defeitos críticos em calvária de ratos (TCC). Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2022.

RESUMO

O uso de membranas que auxiliem no processo de regeneração óssea guiada (ROG) é uma das finalidades dos estudos de biomateriais compatíveis que auxiliam no processo de reparo ósseo. O objetivo deste trabalho é avaliar a ROG utilizando a membrana de colágeno de peixe em defeitos críticos criados em calvária de ratos. Foram utilizados 96 ratos Albinus Wistar divididos em 4 grupos, n=6: grupo controle somente com coágulo (GC); grupo que recebeu a membrana de colágeno de peixe (CP) associada à hidroxiapatita (CHP, JHS, Minas Gerais); grupo da membrana de colágeno bovino (CB) associada à hidroxiapatita (Col.Hap-91[®], JHS, Minas Gerais); e grupo da membrana de colágeno porcina (GB), (Bio-Gide[®], Geistlich). Cada grupo foi constituído de 04 subgrupos, de acordo com os tempos de eutanásia: 7, 15, 30 e 60 dias. Após a eutanásia, as peças foram processadas e os trâmites laboratoriais realizados. Para avaliação dos dados coletados, serão submetidas às análises histomorfométrica, imunoistoquímica e perfil inflamatório. Para as comparações serão utilizados os testes de ANOVA One-way com pós-teste de Tukey, se os dados forem paramétricos; e Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, se os dados forem não paramétricos ($p < 0,05$). Conclui-se que, os resultados obtidos por este trabalho as membranas aqui estudadas tiveram um bom comportamento biológico e promoveram osteointegração e todas auxiliaram no processo de regeneração óssea guiada.

Palavras-chaves: biomaterial, regeneração, tecido ósseo, membrana

DELAMURA, IF. Evaluation of a new national fish collagen membrane in guided bone regeneration. Analysis of the inflammatory and immunohistochemical profile in critical defects in rat calvaria. Araçatuba: School of Dentistry, Universidade Estadual Paulista; 2022

ABSTRACT

The use of membranes that assist in the guided bone regeneration (GBR) process is one of the purposes of studies of compatible biomaterials that assist in the bone repair process. The objective of this work is to evaluate the GBR using the fish collagen membrane in critical defects created in rat calvaria. 96 Albinus Wistar rats will be divided into 4 groups, n=6: control group with clot only (GC); group that received fish collagen membrane (CP) associated with hydroxyapatite (CHP, JHS, Minas Gerais); bovine collagen (BC) membrane group associated with hydroxyapatite (Col.Hap-91®, JHS, Minas Gerais); and porcine collagen (GB) membrane group, (Bio-Gide®, Geistlich). Each group consisted of 04 subgroups, according to the times of euthanasia: 7, 15, 30 and 60 days. After euthanasia, the pieces were processed and the laboratory procedures performed. To evaluate the collected data, they will be submitted to histomorphometric, immunohistochemical and inflammatory profile analyses. For comparisons, the One-way ANOVA tests with Tukey's post-test will be used, if the data are parametric; and Kruskal-Wallis with Dunn's post test, if the data are non-parametric ($p < 0.05$). It is concluded that the results obtained by this work, the membranes studied here had a good biological behavior and promoted osseointegration and all of them helped in the guided bone regeneration process.

Keywords: Biomaterial. Regeneration. Bone tissue. Membrane

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) – tricotomia da área de interesse (B) – antissepsia do local. (C) – Incisão em forma de “v” no sentido occipito-frontal e descolamento total do retalho, expondo a calvária do animal. (D) - Trefina de 8mm de diâmetro externo em posição sob alta irrigação de soro fisiológico. (E) - Defeito crítico confeccionado antes da remoção do tampão ósseo. (F) - Reposicionamento do retalho sob o defeito crítico para sutura. (G) - Sutura com pontos interrompidos simples e assepsia. 8
- Figura 2 - (A) – tricotomia da região (B) antissepsia da região de interesse. (C) – Incisão em forma de “v” no sentido occipito-frontal. (D) – Descolamento total do retalho, expondo a calvária do animal. (E) Membrana Bio-gide. (F) - Trefina de 8mm de diâmetro externo. (G) – Remoção do tampão Ósseo. (H) Aposição da membrana sob o defeito – Reposicionamento do retalho sob a membrana para sutura. (I) – Medicação pós-cirúrgica dos animais. 9
- Figura 3 - (A) – tricotomia da calvária. (B)- antissepsia da região de interesse. (C) – Incisão em forma de “v” no sentido occipito-frontal. (D) – Descolamento total do retalho, expondo a calvária do animal. (E) - Trefina de 8mm de diâmetro externo em posição sob alta irrigação de soro fisiológico. (F) - Defeito crítico confeccionado antes da remoção do tampão ósseo. (G) - Aposição da membrana sob o defeito. (H) – Reposicionamento do retalho sob a membrana para sutura. (I) – Sutura com pontos interrompidos simples. 10
- Figura 4 - (A) – tricotomia e antissepsia da região de interesse. (B) – Incisão em forma de “v” no sentido occipito-frontal. (C) – Descolamento total do retalho, expondo a calvária do animal. (D) - Trefina de 8mm de diâmetro externo em posição sob alta irrigação de soro fisiológico. (E) - Defeito crítico confeccionado antes da remoção do tampão ósseo. (F) - Aposição da membrana sob o defeito. (G) – Reposicionamento do retalho sob a membrana para sutura. (H) - Sutura com pontos interrompidos simples. (I) – Assepsia da área; 11
- Figura 5 – (A): Calota com visão inferior coletada após o período de eutanásia, em processo de descalcificação em EDTA. (B): Calota com visão da porção superior, evidenciando o defeito e aposição de membrana. (C): Calota reduzida e cortada para início do processo de inclusão. 12
- Figura 6 - (A) blocos contendo peças de calotas dos grupos Bio-gide; Col-Hap 91; Membrana de peixe e Coágulo incluídos em parafina para realização dos cortes histológicos. (B) peça posicionada no micrótomo no momento em que os cortes histológicos eram realizados. (C) Caixa contendo as lâminas confeccionadas. 13
- Figura 7 - À esquerda, software ImageJ utilizado para traçado de grade. À direita, grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica em um aumento da objetiva de 100x. 15

- Figura 8 - À esquerda, software ImageJ utilizado para contagem celular. À direita, cada célula (bolas amarelas) que toca a intersecção das linhas com as colunas contam uma célula, e cada conjunto de vasos sanguíneos (bolas vermelhas) representam a neovascularização. 16
- Figura 9 - Software ImageJ utilizado para calibragem da ferramenta régua na magnificação de escolha para ser realizada a histometria. Na imagem a calibragem foi realizada em uma régua na magnificação de 6,3x, a unidade de medida foi escolhida em μ . 17
- Figura 10 - Software ImageJ utilizado para calibragem da medida a ser realizada. Foi escolhido a opção de mediar a Área total demarcada pela ferramenta polígono. 17
- Figura 11 - Representação do uso da ferramenta polígono no software ImageJ para a medida da estrutura de interesse. Na imagem observamos a delimitação de uma área na qual foi observada a presença de tecido ósseo neoformado (μ m). 18
- Figura 12 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos BG, CP, CB e GC em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 6,3x. O defeito crítico de 8 mm de diâmetro externo, está delimitado pelo [] e indicado pelo símbolo +, os * amarelos indicam o local dos cotos ósseos 21
- Figura 13 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 25x. Na região central nota-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) com bastante diferenciação celular e a membrana (M) íntegra. 22
- Figura 14 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e a última em 25x. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) do coto em direção a região central, com mudança de direção das fibras e na imagem de maior aumento, notamos grandes vasos sanguíneos com células gigantes (V). 23
- Figura 15 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,3x nas duas primeiras e 12,5x nas duas últimas. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) associado a áreas de tecido osteóide e fragmentos de membrana (M) em processo de degradação. 24
- Figura 16 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,3x e 12,5x respectivamente. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) associado a áreas de tecido osteóide e ainda resquícios de fragmentos de membrana (M) com algumas áreas entremeadas de tecido conjuntivo maduro. 24
- Figura 17 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CB aos 07 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x. Observamos grânulos de hidroxapatita no centro do defeito (H) e presença de células gigantes (seta) na imagem ao lado. 25

- Figura 18 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CB aos 15 dias de reparo ósseo. Figura A. Magnificação de 6,5x, demonstrando pequenas ilhas de neoformação óssea (setas) (A). Figura B com magnificação de 12,5x possível evidenciar a integridade da membrana (M). 26
- Figura 19 - Fotomicrografias do defeito do grupo CB aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,5x e 12,5x respectivamente, mostrando maior neoformação óssea (TON) e presença ainda de partículas de hidroxiapatita. 26
- Figura 20 - Fotomicrografias do defeito do grupo CB aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x nas duas primeiras imagens, demonstrando fechamento do defeito e outro espécime com presença de tecido conjuntivo (sem fechamento total). Na última imagem, com aumento de 25x, presença de grânulos de hidroxiapatita no final do processo de reparo ósseo. 27
- Figura 21 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Na região do coto (C) nota-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) e a membrana (M) íntegra, envolvendo as duas partes. No centro do defeito, nota-se nitidamente a presença da membrana (M) e um tecido conjuntivo (TC) bem celularizado. 28
- Figura 22 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Próximo aos cotos (CO), nota-se a área de tecido ósseo neoformado (TON) envolto por tecido conjuntivo (TC) altamente vascularizado (V). No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito. 28
- Figura 23 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Na região do coto ósseo, nota-se a presença de área de tecido ósseo neoformado (TON) envolta por grandes vasos sanguíneos (V). No centro do defeito, a área de tecido ósseo neoformado (TON) aparece envolta por tecido conjuntivo (TC). 29
- Figura 24 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. O coto ósseo (C) já se confunde com a área total de tecido ósseo neoformado (TON), sendo possível observar grandes vasos sanguíneos (V) e o tecido ósseo ativo pela presença de osteócitos viáveis. No centro do defeito, grande área de tecido ósseo neoformado (TON) é visualizada, garantindo quase o fechamento total do defeito. 30
- Figura 25 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo GC aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Um grande tecido de granulação (TG), e a presença de vasos sanguíneos (V), são observados. 31
- Figura 26 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo GC aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Nota-se um tecido conjuntivo (TC) levemente vascularizado, vasos sanguíneos (V) distribuídos pelo defeito e pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (TON). 32
- Figura 27 -Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Tecido conjuntivo (TC) 33

mais organizado com pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (TON) envolvidas por grandes aglomerados celulares (células osteoprogenitoras).

Figura 28 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Tecido conjuntivo organizado (TC), áreas de tecido ósseo neoformado (TON), espalhadas pelo defeito e grandes vasos sanguíneos (V), próximos a áreas de neoformação óssea. 34

Figura 29 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos) no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas significantes inter grupos para o período de 15 dias, o * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias. Nas fotomicrografias ao lado realizadas em uma magnificação de 100x, as setas amarelas (↑) indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos. 35

Figura 30 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise da quantidade de vasos sanguíneos no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas demonstram diferença estatística significativa para o período de 15 dias, não houve diferença estatística para o período de 7 dias. O * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias. Nas fotomicrografias ao lado realizadas em uma magnificação de 100x, as setas amarelas (↑) indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos. 36

Figura 31 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (BG, CP, CB e CG) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. As letras minúsculas demonstram diferença estatística significativa inter grupos para os tempos de 30 e 60 dias, nos períodos de 7 e 15 dias, não houve diferença estatística entre os grupos analisados. 38

Figura 32 - Fotomicrografias dos grupos BG, CP e CB, durante os períodos de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x, evidenciando as imunomarcações de osteopontina (setas amarelas). 39

Figura 33 - Fotomicrografias dos grupos BG, CP e CB, durante os períodos de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x, evidenciando as imunomarcações de osteocalcina (setas amarelas). 40

LISTA DE SIGLAS

%	porcento
µm	microlitro
µm	micrômetro
3D	tridimensional
AON	área do osso neoformado
BG	Bio-gide®
BV	volume ósseo
BV/TV	porcentagem de volume ósseo
CB	colágeno bovino
CG	coágulo
CP	colágeno peixe
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
e-PTFE	politetrafluoretileno expandido
g	grama
h	horas
hAMSC	célula tronco mesenquimal
HE	hematoxicilina e eosina
kg	quilograma
ml	mililitro
ml/kg	mililitro por quilograma
mm	milímetro

mm ³	milímetro cúbico
°C	graus Celsius
OC	osteocalcina
OP	osteocalcina
Po.tot	porcentagem da porosidade óssea total
PTFE	politetrafluoretileno
ROI	região de interesse
Tb.N	número de trabéculas ósseas
Tb.S	separação do trabeculado
Tb.th	espessura do trabeculado ósseo
UI	unidade internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO	5
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
3.1 Delineamento Experimental	6
3.1.1 Cirurgia Experimental	6
3.1.2 Grupos experimentais	8
3.2 Análises	12
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	14
4.1. Análise Histológica	14
4.2 Analise Histométrica	14
4.2.1 Análise imunoistoquímica	18
4.3 Análise estatística	19
5 RESULTADOS	20
5.1 Análise Histológica (morfologia)	20
5.2 Análise Histométrica	34
5.2.1 Perfil Inflamatório (células e vasos sanguíneos)	34
5.2.2 Área de osso neoformado (AON)	36
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO	48

1 INTRODUÇÃO

O conceito de Regeneração Óssea Guiada (ROG) consiste no uso de uma membrana como barreira, associada ou não ao uso de enxertos ósseos particulado e/ou substitutos ósseos sobre um defeito antes do fechamento primário, controlando assim, o crescimento tecidual. Este conceito do uso de uma membrana para regeneração tem sido usado por mais de 40 anos, cujo objetivo é permitir a neoformação celular de um tecido desejado para preencher um espaço e impedir o crescimento de outros tipos celulares indesejáveis.¹ Nesta época, começaram os primeiros estudos em defeitos bilaterais criados em mandíbula de ratos². Em um lado, o defeito não era protegido com nenhum material, do outro, cobria-se a área do defeito com membrana de teflon para impedir que fibroblastos e outras células do tecido conjuntivo repovoassem a área do defeito criado. Análises histológicas mostraram após 6 semanas que o lado não protegido pela membrana houve pequena ou nenhuma regeneração, enquanto o lado protegido pela membrana de teflon, mostrou-se totalmente regenerado.

Desta forma, acredita-se que as membranas criam um ambiente protetor para a integração do enxerto pela exclusão de componentes celulares e humorais que causam reabsorção óssea^{3,4}. Esse processo recebe a denominação de regeneração óssea guiada (ROG)². Com a técnica de ROG, há a criação e manutenção de um espaço onde as células osteogênicas derivadas do osso hospedeiro podem ocupar e, subsequentemente, melhorar a regeneração óssea^{2,5,6}.

A membrana é colocada em contato direto com o defeito ósseo circundante posicionando o periósteo sobre a mesma. A literatura mostra que certos tecidos no interior do organismo possuem potencial biológico para regeneração, sempre que exista um ambiente adequado durante a cicatrização.⁷ As principais indicações do uso das membranas biológicas em processos de ROG são: correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais⁸, alvéolos após exodontias⁹, deiscência e fenestrações após instalação de implantes mediatos e imediatos.¹⁰

Historicamente, estudos experimentais com as membranas começaram desde 1950, já em 1980 os estudos de Nyman sobre a técnica de regeneração tecidual guiada (RTG) geraram muitas pesquisas que culminaram no desenvolvimento do uso das membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), membrana não absorvível, em estudos realizados para RTG e ROG. Esses estudos, confirmaram o conceito de que a aplicação da membrana de e-PTFE, cria uma barreira fisiológica que separa os tecidos e células que participam dos eventos de cicatrização. Becker et al. (1992)¹¹, propôs estudos para comparar a promoção de osso ao redor de implantes com o uso de membrana de ePTFE e a mesma associada ao osso cortical

seco desmineralizado (DFDB), com combinação de plaquetas (PDGF) e com o uso de insulina como fator de crescimento (PDGF-IGF) instalados em alvéolos frescos de cachorros. Os resultados mostraram a eficácia da membrana quando usada só e associada com PDGF-IGF promovendo o crescimento ósseo ao redor dos implantes enquanto foi questionada a ineficácia quando associada ao DFDB. Na mesma época, num estudo em cães, foi demonstrado que a membrana cria o espaço que facilita a proliferação de células angiogênicas e osteogênicas provenientes da medula óssea, sem a interface de fibroblastos¹¹. Já nos anos 90 concordaram que a ROG baseado no uso de membranas de e-PTFE (não absorvíveis) associado ao uso de enxertos ósseos ou substitutos ósseos tinha desvantagens e ficou claro que com o uso de membranas absorvíveis estas desvantagens poderiam ser melhoradas¹².

Baseado nas pesquisas existentes até agora pode se classificar as membranas em dois grandes grupos, membranas absorvíveis e não absorvíveis, as não absorvíveis são basicamente de PTFE (politetrafluoretileno) e e-PTFE (politetrafluoretileno expandido), dentre as biodegradáveis, existem dois grupos, os polímeros naturais com base de colágeno, derivado de diversas fontes e os poliésteres sintéticos alifáticos¹³. Segundo Simion et al, 1996¹⁴ ao comparar a ROG usando membrana de PTFE e ácido poliglicólico, concluíram que as membranas não absorvíveis proporcionam maior formação óssea que membranas absorvíveis. Baseado na necessidade de melhora das membranas biodegradáveis surgiram muitas pesquisas melhorando a qualidade do material¹⁵. Em estudo comparativo entre membranas absorvíveis de colágeno e de polímero polilático, concluíram que estas últimas são mais adequadas e eficientes na ROG¹⁶. O uso de membranas bioabsorvíveis e biodegradáveis de colágeno e poliésteres, como ácido poliglicólico, ácido polilático e polímeros (epsilon-caprolactone[®]) foi discutido por Hutmacher et al. (1996)¹⁷ com o objetivo de observar sua eficácia na ROG além de sua biocompatibilidade, propriedades mecânicas e esterilização.

A principal vantagem das membranas absorvíveis em relação às não absorvíveis, é que um segundo tempo cirúrgico para sua remoção não é necessário¹²; outra característica das membranas biodegradáveis é que apresenta menos complicações na linha de incisão, nos casos de deiscência de suturas, e maior porcentagem de formação tecidual¹. Existem 2 tipos de membranas absorvíveis com base nos polímeros orgânicos: membrana de colágeno e membrana de ácido polilático¹⁸. A membrana colágena tem propriedades vantajosas para ROG, como compatibilidade com tecido mole, hemostasia e facilidade de uso¹.

As membranas de colágeno absorvível dominam os procedimentos de ROG na prática clínica atualmente e sua utilização tornou-se tratamento padrão para ROG e apresenta várias vantagens em comparação com as membranas não absorvíveis: estabiliza a ferida, permite

vascularização precoce, atrai os fibroblastos através da quimiotaxia e são semipermeáveis, o que facilita a transferência dos elementos nutritivos. Devido à propriedade hidrofílica da membrana, facilita a técnica cirúrgica e sua estabilização sobre o enxerto, além de não necessitar de cirurgia para remoção¹⁹.

Uma das mais utilizadas e documentadas membranas de colágeno, é derivada de suínos e não reticulada (Bio-Gide, Geistlich). As características de hidrofilia e maleabilidade desta membrana a tornam fácil de ser adaptada sobre o enxerto e, quando colocada em dupla camada, ocorre uma melhor estabilização, dispensando assim a utilização de tachinhas ou parafusos para fixação, além disso quando expostas não causam infecção local porque os tecidos moles geralmente cicatrizam por segunda intenção¹².

Atualmente existem muitas membranas no mercado, e todas apresentam diferenças entre si e tentam de alguma forma apresentar desempenho semelhante ou melhor que a líder de mercado, Bio-Gide^{®20}. Assim, a busca por membranas com alto desempenho continua sendo motivo de pesquisa para melhorar os resultados desta técnica, sendo demonstrado ao longo dos estudos que a membrana é a peça-chave para o sucesso da ROG²¹.

Atualmente, existem novas membranas sendo testadas comercialmente, entre elas membranas feitas a partir de colágeno bovino e colágeno de peixe. O colágeno bovino embora mais comum ainda não tem muitas referências de pesquisas que validem sua utilização na fabricação de membranas, e o colágeno de peixe é uma nova fonte de obtenção de produto.

Durante o processamento dos recursos pesqueiros, uma parte significativa é descartada ou utilizada para a produção de farinha e óleo de peixe de baixo valor. No entanto, a porção descartada é uma rica fonte de proteínas valiosas, como colágeno, vitaminas, minerais e outros compostos bioativos. O colágeno é uma proteína vital no corpo vivo como um componente de uma proteína estrutural fibrosa na matriz extracelular, tecido conjuntivo e bloco de construção de ossos, tendões, pele, cabelo, unhas, cartilagem e articulações. Nos últimos anos, o uso de colágeno de peixe como um biomaterial cada vez mais valioso tem chamado considerável atenção de pesquisadores biomédicos, devido às suas propriedades físico-químicas aprimoradas, estabilidade e resistência mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade²².

Neste contexto, a busca por fontes que viabilizem a extração do colágeno também vem sendo estudadas. O colágeno do Tipo I é o mais abundante em peixes de água doce e marinhos, sendo extraído da pele, escamas, barbatanas, bexiga natatória, ossos, espinha e músculos e é amplamente utilizado para a área de engenharia de tecidos. Certas espécies de peixes, escamas e mucosas fornecem barreira adicional para impedir o acesso de patógenos através da pele aos tecidos subcutâneos e sistema vascular, podendo apresentar um efeito imunomodulador na

cicatrização de feridas²³ e no tratamento de queimaduras nos seres humanos²⁴. Baseado nesses princípios, surge uma alternativa na regeneração óssea guiada com a possibilidade de utilização da membrana de colágeno extraído do peixe. Alguns trabalhos iniciais já foram realizados quanto aos testes de citotoxicidade com o colágeno de peixe o qual possui biocompatibilidade e não apresentou nenhum efeito citotóxico para cultura celular de *hAMSC*²⁵.

Baseado nessas características promissoras do colágeno de peixe, a empresa JHS, está desenvolvendo uma membrana com o uso desse material associada à hidroxiapatita. Sabendo-se que ainda há poucos trabalhos sobre esse novo material e entendendo a importância dos trabalhos pré-clínicos para que biomateriais possam ser validados, este projeto foi então elaborado para ser mais uma fonte de análise importante para fomentar o possível uso desse material nos processos de regeneração óssea guiada.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho se propôs a avaliar por meio da análise histométrica, o potencial de auxiliar na neoformação pela membrana de colágeno de peixe associada à hidroxiapatita (CHP) no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos.

Objetivos específicos

- Comparar o nível de eficácia das membranas absorvíveis de Colágeno de peixe (JHS, Minas Gerais) e Colágeno Bovino associada à hidroxiapatita (JHS, Minas Gerais) em relação a membrana de colágeno porcino mais utilizada comercialmente (BioGide®) e por meio dos estudos de histomorfometria, imunistoquímica dos diferentes grupos experimentais e controle.
- Determinar a biocompatibilidade da membrana absorvível de colágeno de peixe e colágeno bovino por meio da análise histológica.
- Comparar o nível de eficácia da membrana de colágeno porcino (BioGide®) com a membrana absorvível de Colágeno de Peixe associada à hidroxiapatita e Colágeno Bovino associada à hidroxiapatita para ROG por meio da análise histométrica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Previamente à aquisição e acomodação dos animais, bem como antes da execução de qualquer intervenção, o presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (**Protocolo n°100/2021**).

Os 96 animais (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 300g, foram recebidos e ambientados no biotério da disciplina de Diagnóstico e Cirurgia FOA/UNESP. Foram mantidos sob as seguintes condições durante todo o período experimental: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 25^\circ\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas (5 animais por gaiola), onde tiveram ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum*. Os animais se apresentaram saudáveis e em condições de sofrerem os procedimentos operatórios.

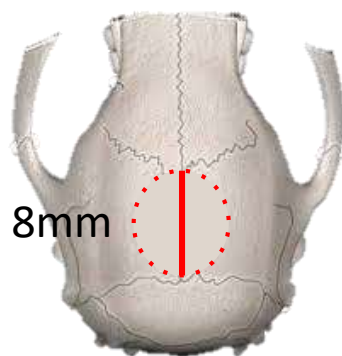
3.1.1 Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 70mg/Kg e 5mg/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Foi realizada a tricotomia manual na região da calvária, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Logo após a tricotomia e a antissepsia dos animais, foi realizada uma incisão linear no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 (dois) cm, com lâmina n° 15 (Feather

Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi n° 3 (Hu-Friedy, Alemanha), com o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha). Em seguida com auxílio de broca trefina de 7mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8 mm de diâmetro (Furlaneto *et al.* 2007), na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter.



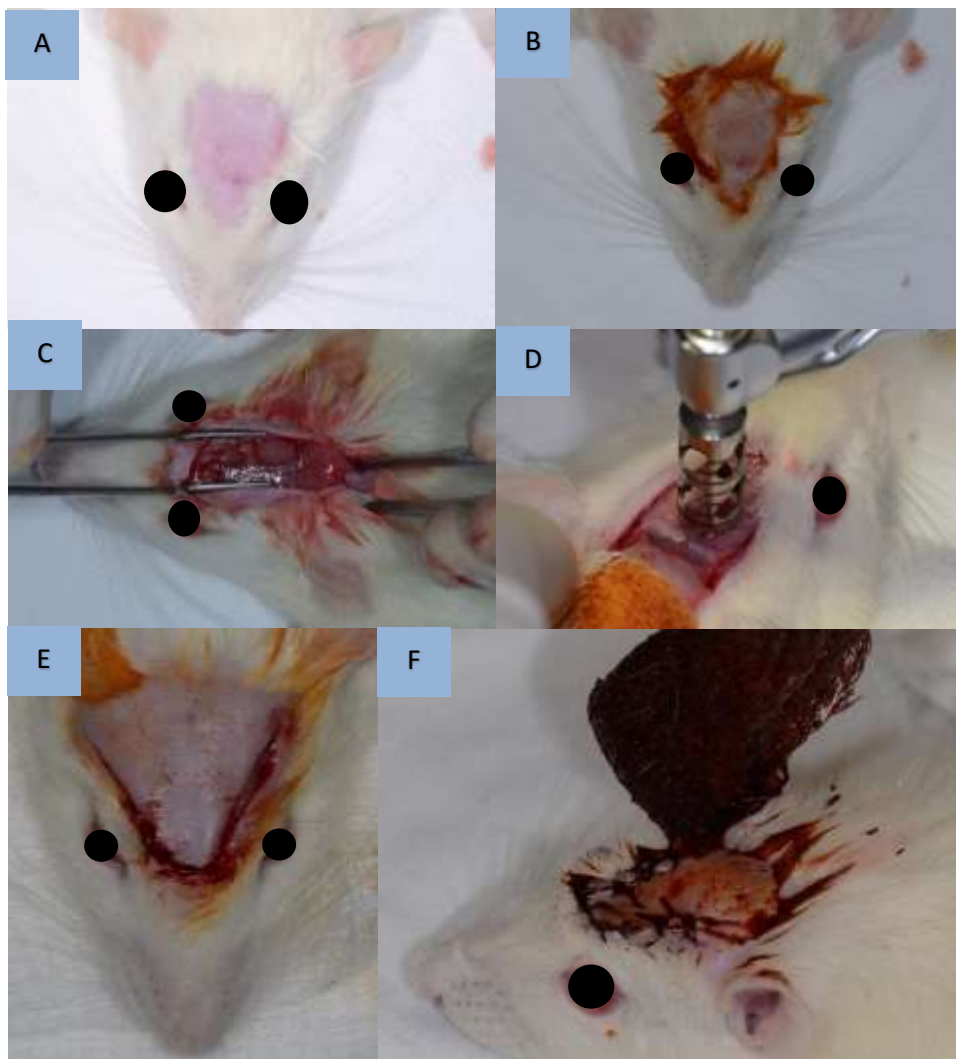
Como foi proposto, os defeitos foram devidamente preenchidos somente com coágulo sanguíneo e os demais grupos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito foi colocado uma membrana de colágeno porcino (Grupo Bio-Gide[®] – n=24), uma membrana de colágeno bovino associada à hidroxiapatita (Grupo Col.Hap91[®] - n=24) e a membrana de colágeno de peixe associada à hidroxiapatita (CHP – n=24).

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

3.1.2 Grupos experimentais

Grupo Coágulo

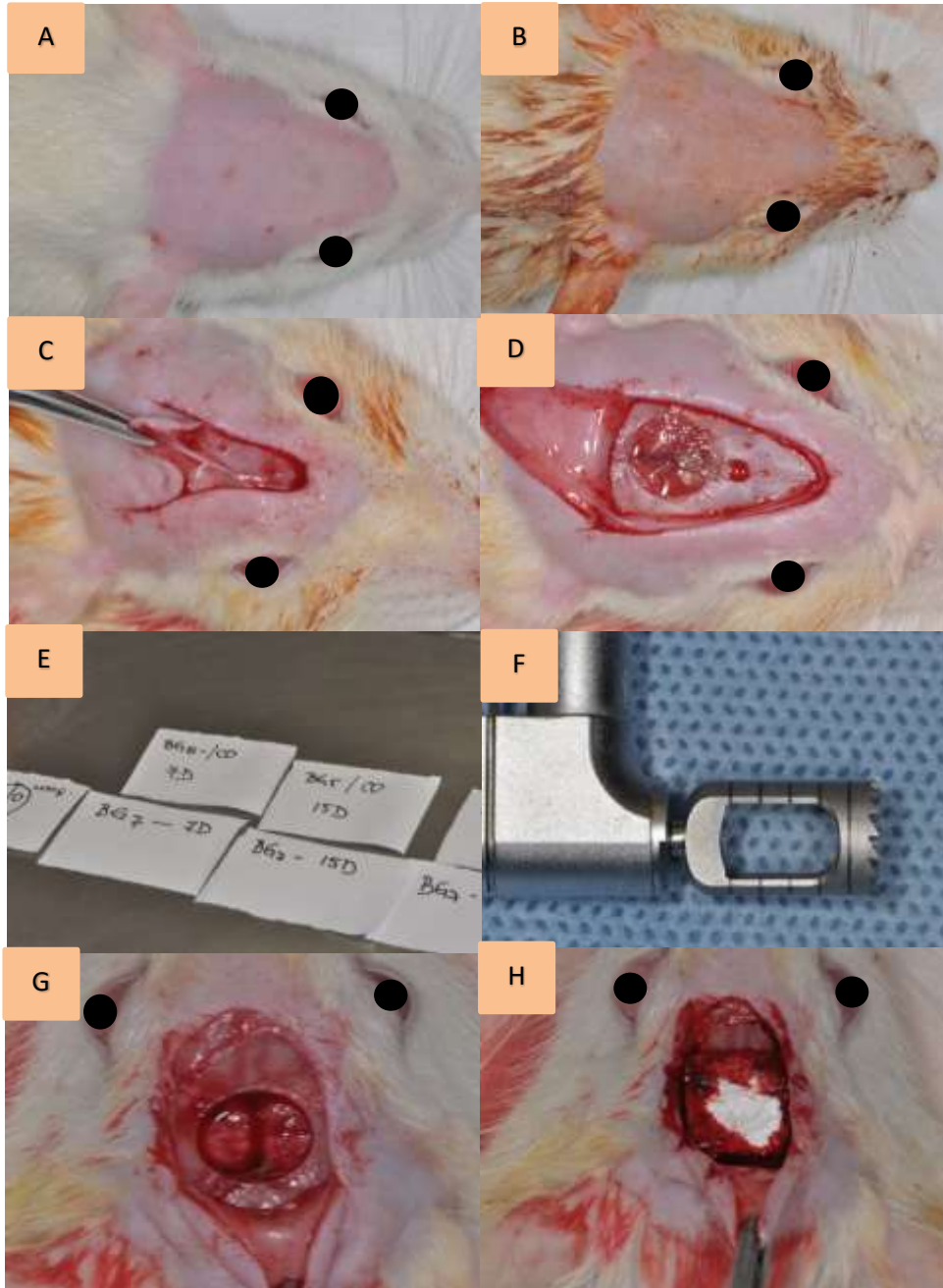
Figura 1 - (A) – tricotomia da área de interesse (B) – antissepsia do local. (C) – Incisão em forma de “v” no sentido occipito-frontal e descolamento total do retalho, expondo a calvária do animal. (D) - Trefina de 8mm de diâmetro externo em posição sob alta irrigação de soro fisiológico. (E) - Reposicionamento do retalho sob o defeito crítico para sutura. (F) - Sutura com pontos interrompidos simples e assepsia.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Grupo Bio-gide

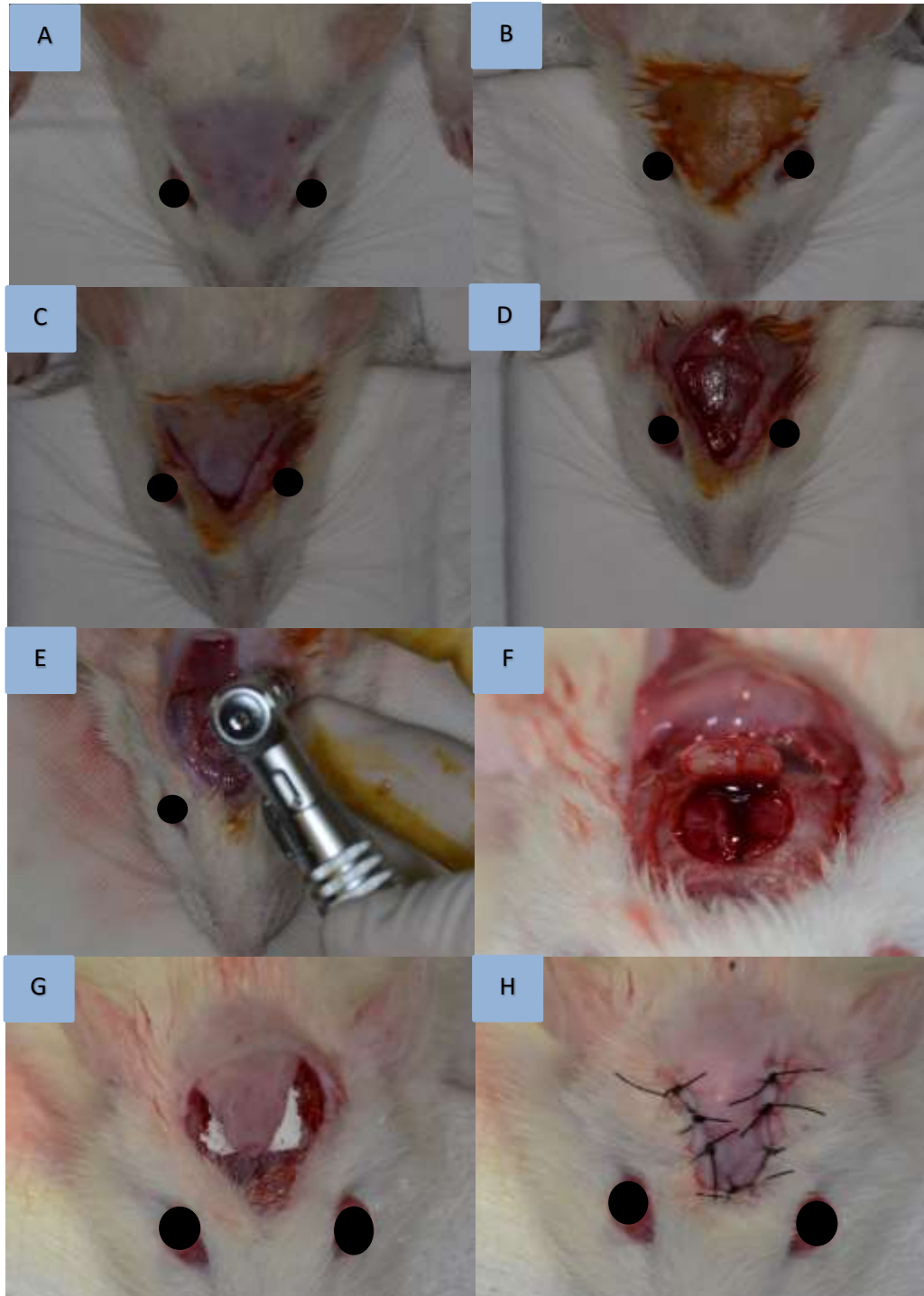
Figura 2 - (A) – tricotomia da região (B) antissepsia da região de interesse. (C) – Incisão em forma de “v” no sentido occipito-frontal. (D) – Descolamento total do retalho, expondo a calvária do animal. (E) Membrana Bio-gide. (F) - Trefina de 8mm de diâmetro externo. (G) – Remoção do tampão Ósseo. (H) Aposição da membrana sob o defeito – Reposicionamento do retalho sob a membrana para sutura.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

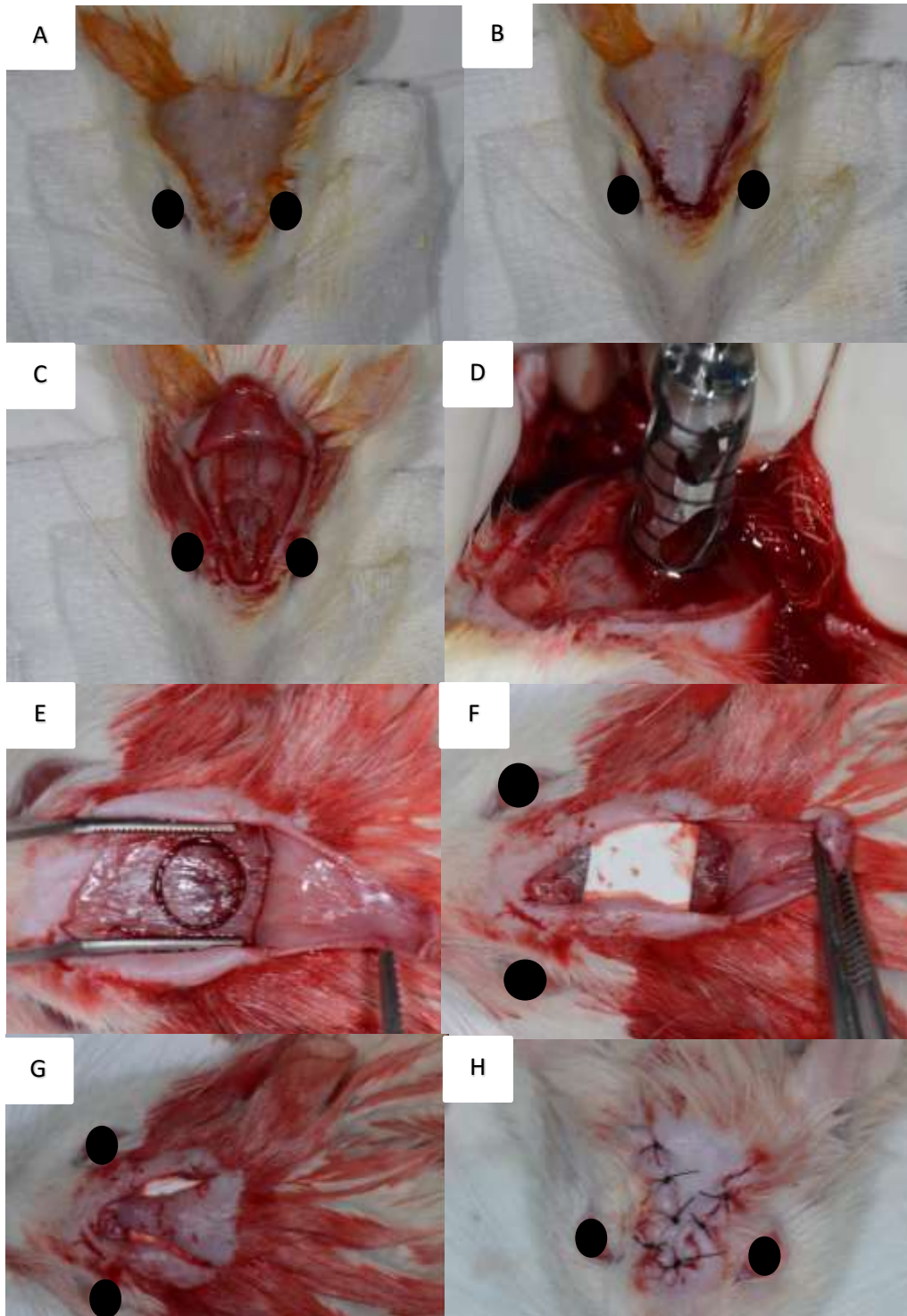
Membrana Col.Hap 91

Figura 3 - (A) – tricotomia da calvária. (B)- antissepsia da região de interesse. (C) – Incisão em forma de “v” no sentido occipito-frontal. (D) – Descolamento total do retalho, expondo a calvária do animal. (E) - Trefina de 8mm de diâmetro externo em posição sob alta irrigação de soro fisiológico. (F) - Defeito crítico confeccionado antes da remoção do tampão ósseo. (G) - Aposição da membrana sob o defeito. (I) – Sutura com pontos interrompidos simples.



Grupo Membrana de Peixe

Figura 4. (A) – tricotomia e antissepsia da região de interesse. (B) – Incisão em forma de “v” no sentido occipito-frontal. (C) – Descolamento total do retalho, expondo a calvária do animal. (D) - Trefina de 8mm de diâmetro externo em posição sob alta irrigação de soro fisiológico. (E) - Defeito crítico confeccionado antes da remoção do tampão ósseo. (F) - Aposição da membrana sob o defeito. (G) – Reposicionamento do retalho sob a membrana para sutura. (H) - Sutura com pontos interrompidos simples.

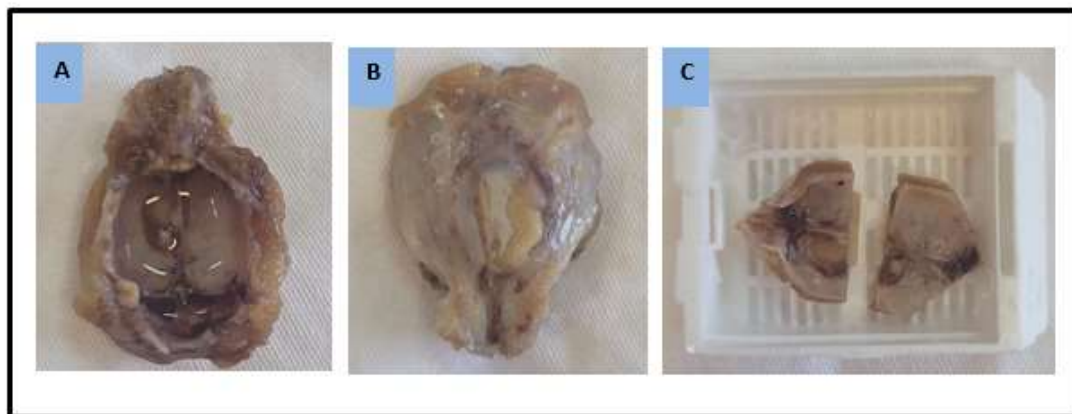


No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais estão sendo mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico.

Após os períodos descritos, os animais foram submetidos a eutanásia e as calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e estão sendo descalcificadas em EDTA 10% por 5 semanas.

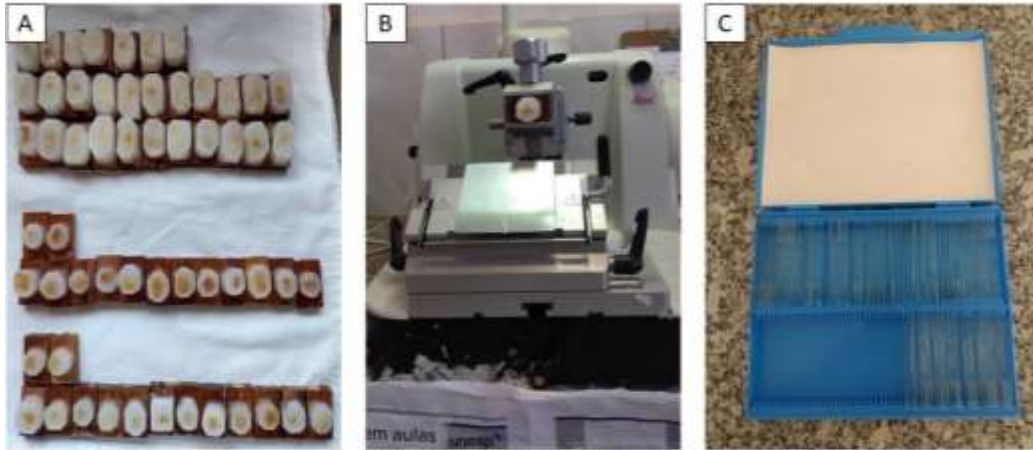
Figura 5 - (A): Calota com visão inferior coletada após o período de eutanásia, em processo de descalcificação em EDTA. (B) Calota com visão da porção superior, evidenciando o defeito e aposição de membrana. (C): Calota reduzida e cortada para início do processo de inclusão.



Elaborado pelos autores (2022)

3.2 Análises

Figura 6 - (A) blocos contendo peças de calotas dos grupos Bio-gide; Col-Hap 91; Membrana de peixe e Coágulo incluídos em parafina para realização dos cortes histológicos. (B) peça posicionada no micrótomo no momento em que os cortes histológicos eram realizados. (C) Caixa contendo as lâminas confeccionadas.



Elaborado pelos autores (2022)

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1. Análise Histológica

Após a obtenção das lâminas, estas foram avaliadas histologicamente quanto a capacidade de neoformação óssea, presença de infiltrado inflamatório, formação de tecido conjuntivo, absorção e/ou manutenção dos materiais estudados.

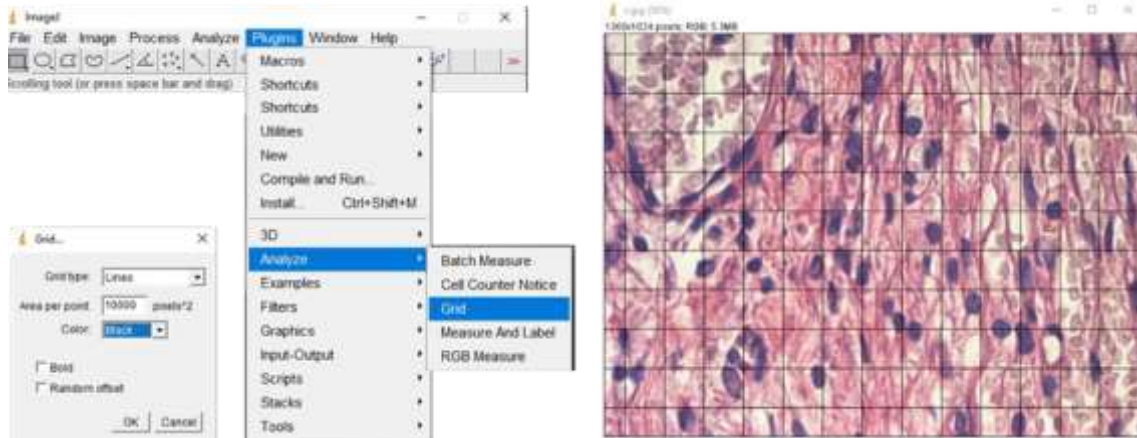
4.2. Análise Histométrica

Após a obtenção das lâminas, estas foram avaliadas histologicamente quanto a capacidade de neoformação óssea, presença de infiltrado inflamatório, formação de tecido conjuntivo, absorção e/ou manutenção dos materiais estudados. As amostras foram codificadas de maneira que somente a orientadora sabia a quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises.

A partir dos cortes semiseriados em cada período de eutanásia 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 ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e foram projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas).

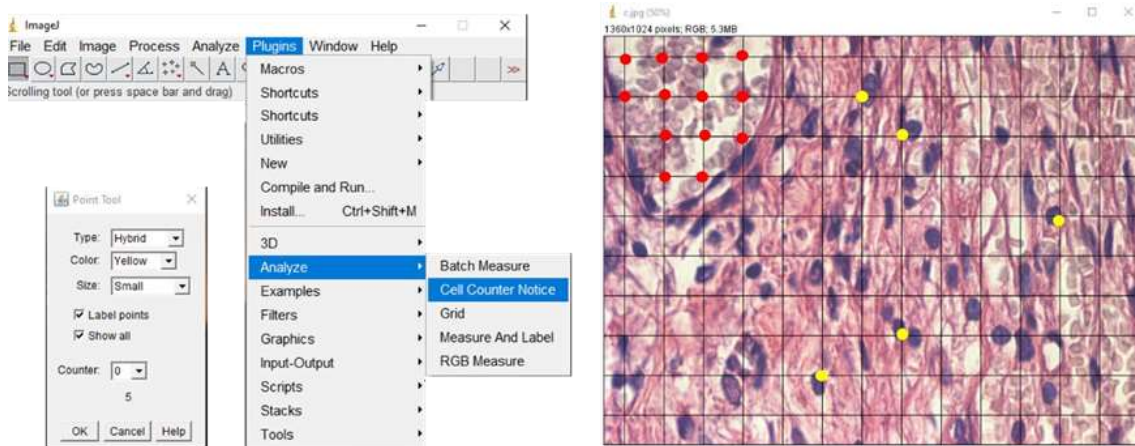
O perfil inflamatório das membranas foi realizado a partir da quantificação de células inflamatórias (linfócitos) e vasos sanguíneos. Para isso, foram realizadas fotomicrografias em um aumento de 100x, das quais 3 imagens eram realizadas por secção histológica: a primeira, ao centro do defeito; a segunda, à direita; e a terceira, à esquerda; sendo que 2 secções histológicas por animal foram escolhidas das amostras obtidas nos tempos experimentais de 7 e 15 dias para os grupos CHP, Col.Hap.91[®] e Bio-Gide[®], totalizando 72 imagens. Após a obtenção das imagens, no software Image J, uma grade contendo 130 pontos foi inserida em cada imagem, e cada célula com característica linfocitária (mononucleares) que tocasse o ponto era contada; para os vasos sanguíneos, o conjunto de pontos inseridos dentro do mesmo vaso era quantificado (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - À esquerda, software ImageJ utilizado para traçado de grade. À direita, grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica em um aumento da objetiva de 100x.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

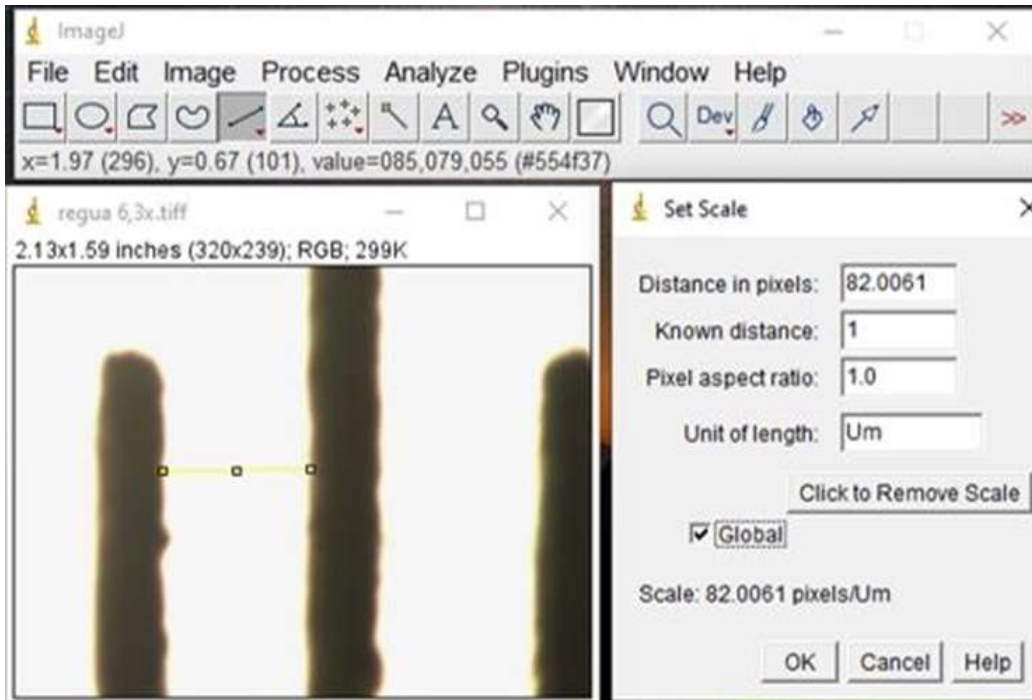
Figura 8 - À esquerda, software ImageJ utilizado para contagem celular. À direita, cada célula (pontos amarelos) que toca a intersecção das linhas com as colunas contam uma célula, e cada conjunto de vasos sanguíneos (pontos vermelhos) representam a neovascularização.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

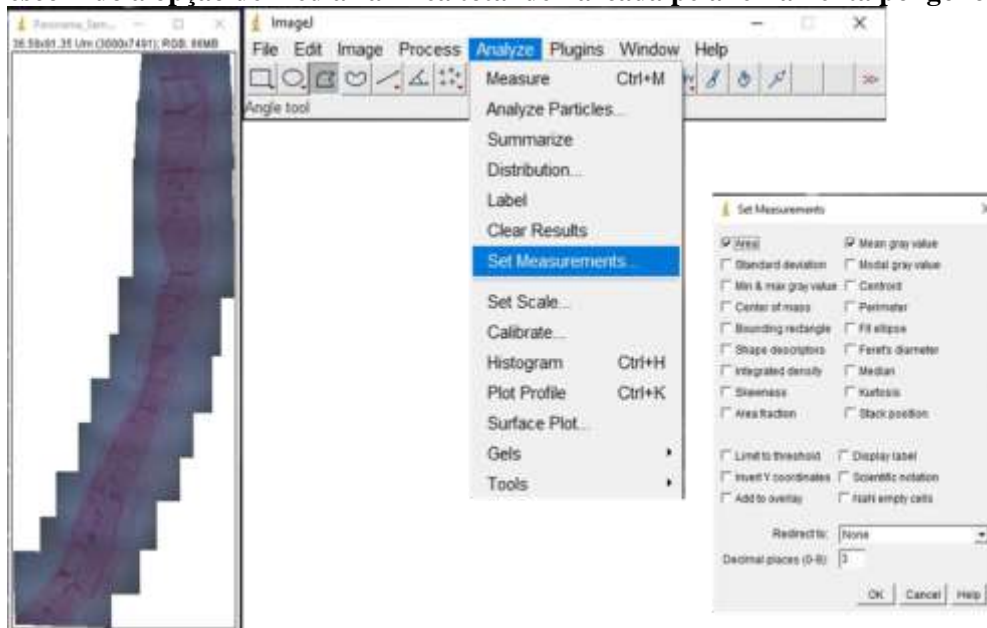
A quantidade de osso neoformado foi quantificada a partir da reconstrução panorâmica das secções histológicas em um aumento de 6.3x. Com o software ImageJ, a ferramenta régua foi utilizada para a calibragem de acordo com a magnificação escolhida para a histometria. A distância conhecida, calibrada em 1 e a unidade de medida em micrômetros (μm) (Figura 9). Após a calibragem da régua, a ferramenta polígono é utilizada e habilitada para contagem da área após a imagem estar aberta no software (Figura 10). Com a imagem aberta, a ferramenta do polígono é executada, delimitando a área a ser contada, os resultados são salvos e somados ao final do processo, representando a quantidade de neoformação óssea (Figura 11). Fotomicrografias foram realizadas próximas ao coto ósseo e no centro do defeito em um aumento de 40x. Para isso, no software ImageJ, utilizando a ferramenta Polígono, a área de osso neoformado foi dimensionada para todos os grupos em todos os períodos experimentais.

Figura 9 - Software ImageJ utilizado para calibragem da ferramenta régua na magnificação de escolha para ser realizada a histometria. Na imagem a calibragem foi realizada em uma régua na magnificação de 6,3x, a unidade de medida foi escolhida em μ .



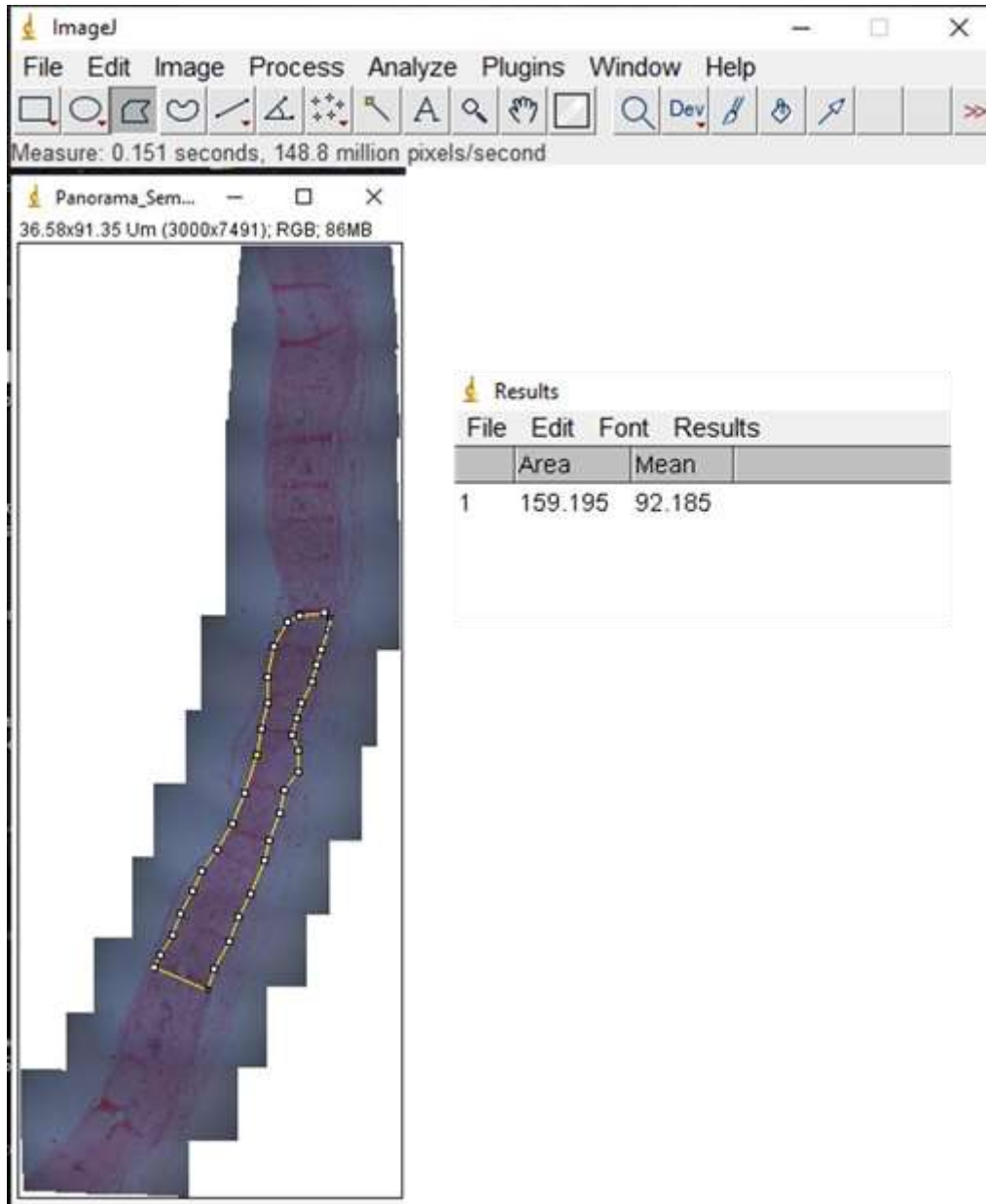
Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

Figura 10 - Software ImageJ utilizado para calibragem da medida a ser realizada. Foi escolhido a opção de medir a Área total demarcada pela ferramenta polígono.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

Figura 11 - Representação do uso da ferramenta polígono no software ImageJ para a medida da estrutura de interesse. Na imagem observamos a delimitação de uma área na qual foi observada a presença de tecido ósseo neoformado (μm^2).



Fonte: Elaborado pelo autores (2022)

4.2.1 Análise imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi realizada a partir das lâminas obtidas dos cortes semiseriados em cada período de eutanásia, por meio da detecção pela imunoperoxidase. A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. Posteriormente, metade das lâminas obtidas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) e o bloqueio da biotina endógena através de leite desnatado. Os anticorpos primários foram

contra osteocalcina (OC) (Santa Cruz Biotechnology) e osteopontina (OP) (Santa Cruz Biotechnology).

Foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-cabra produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories), o amplificador foi a Avidina e Biotina (Vector laboratories) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Após a revelação das reações com o cromógeno, foi feita a contra-coloração dos cortes histológicos utilizando a hematoxilina de Harris. 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. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) e a intensidade das imunomarcações foi determinada semiquantitativamente, com escores de 1 a 4, sendo 1 para ausência de imunomarcação e 4 para marcação intensa.

4.3 Análise estatística

Avaliando comparativamente a relação dos grupos em relação aos tempos de 7 e 15 dias (intra grupos), houve diferença estatisticamente significativa somente no grupo colágeno de peixe (CP) com $p = 0,006$ e não houve diferença nos grupos colágeno porcino (BG) ($p = 0,054$) e colágeno bovino (CB) ($p = 0,789$). No tempo de 07 dias, avaliando a relação entre os grupos, quanto ao conteúdo celular, o grupo GB apresentou menor quantidade de células inflamatórias, seguido pelo grupo CP, porém sem diferença estatística ($p = 0,658$) e o grupo CB atingiu a maior quantidade de linfócitos, porém sem diferença para o grupo GB ($p < 0,053$). No momento da mesma avaliação, já no período de 30 dias, notamos o mesmo padrão de resposta inflamatória, com o grupo CB atingindo maior número de células, com diferença estatística para o grupo GB ($p < 0,001$) e para o grupo CP ($p = 0,002$). Não houve diferença entre os grupos CP e o BG em relação ao conteúdo celular no período de 15 dias.

Na avaliação da quantidade de vasos sanguíneos, em uma análise comparativa intra grupos, apenas o grupo colágeno de peixe (CP) apresentou uma maior neovascularização dos 7 aos 15 dias ($p = 0,01$) durante o processo de reparo ósseo que foi estatisticamente significativa. Em relação aos grupos, não houve diferença, grupo BG ($p = 0,096$) e grupo CB ($0,945$). Comparando os resultados entre os grupos, no período de 7 dias, não houve diferença significativa na capacidade osteogênica. Já no período de 15 dias, houve diferença estatística significativa na quantidade de formar novos vasos sanguíneos para o grupo BG ($p < 0,05$) em relação ao grupo CB. Não houve diferença entre os grupos CB e CP ($p = 0,073$), muito embora o grupo colágeno de peixe tenha tido um desempenho melhor em relação a capacidade de formar vasos sanguíneos.

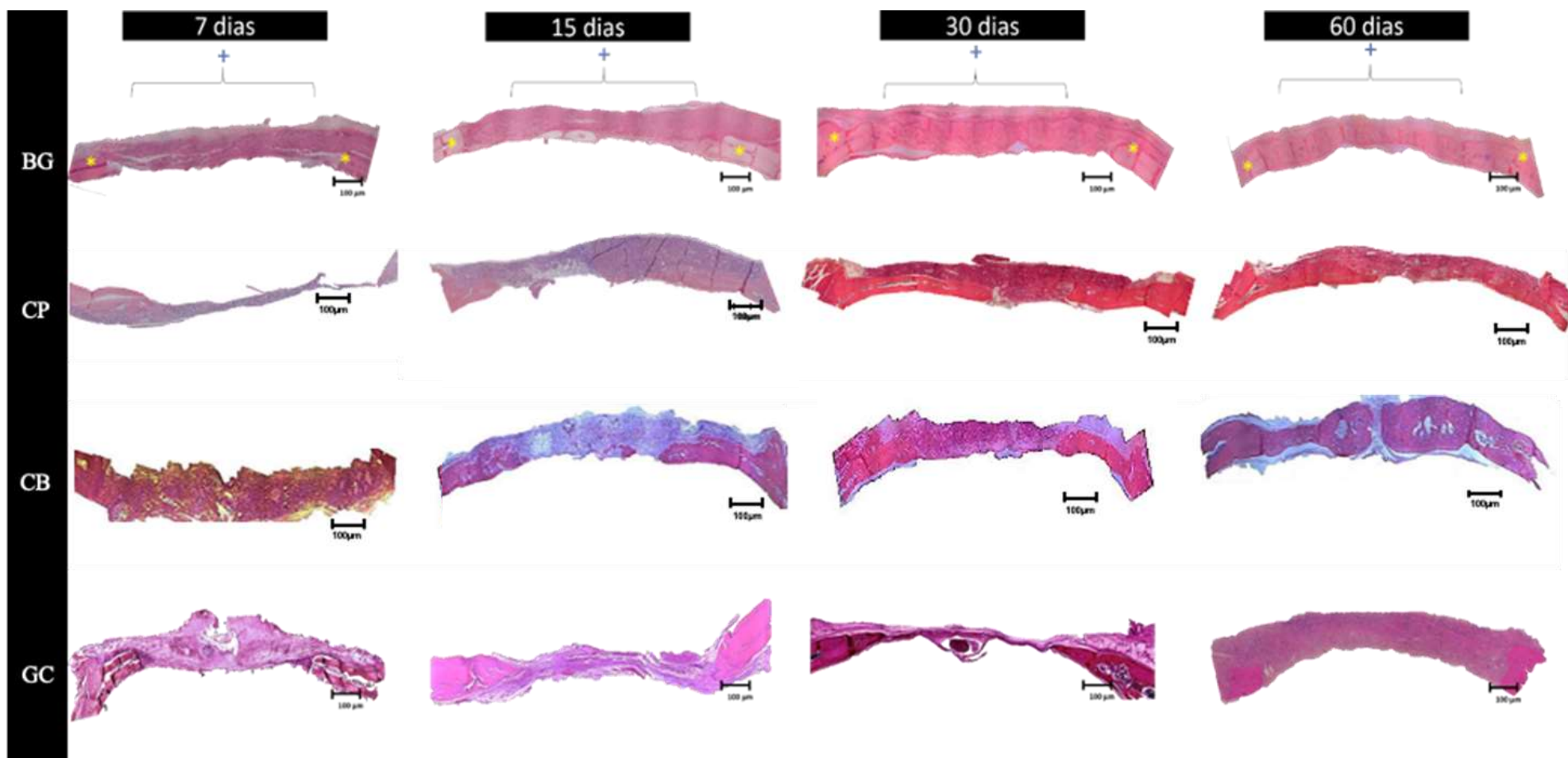
5 RESULTADOS

Todos os animais foram incluídos nos resultados, tendo em vista que não ocorreram complicações trans e pós-operatórias.

5.1 Análise Histológica (morfologia)

A partir de reconstruções panorâmicas (Figura 15) das fotomicrografias realizadas em um aumento de 6,3x foi realizada a descrição histológica com a confirmação das estruturas encontradas nos maiores aumentos.

Figura 12. Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos BG, CP, CB e GC em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 6,3x. O defeito crítico de 8 mm de diâmetro externo, está delimitado pelo [] e indicado pelo símbolo +, os * amarelos indicam o local dos cotos ósseos

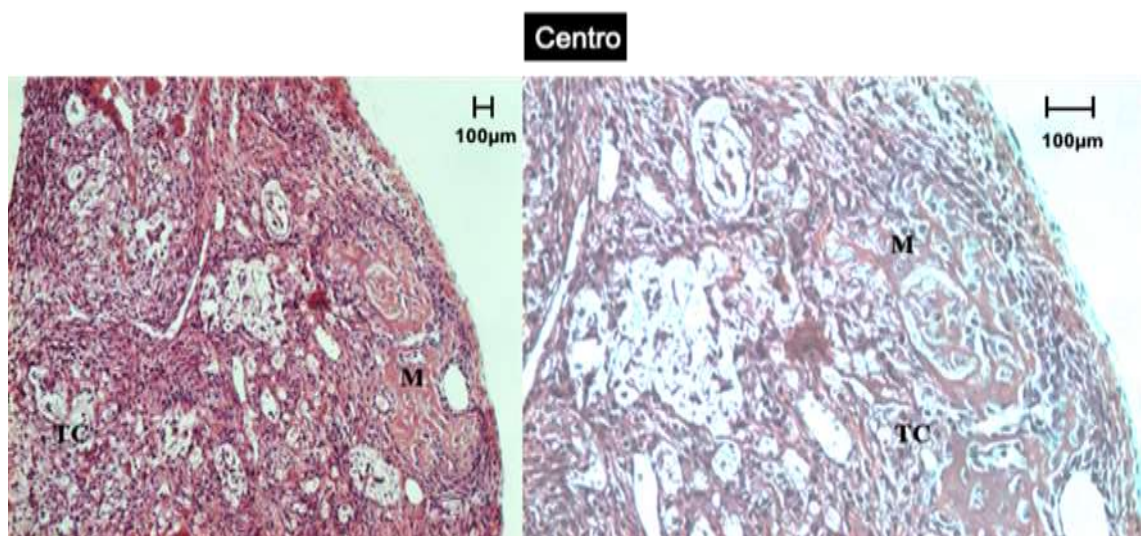


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Grupo colágeno de peixe + hidroxiapatita (CP)

7 dias: a membrana encontra-se íntegra, recobrendo todo o defeito. Presença de tecido de granulação ricamente vascularizado e celularizado abaixo da membrana com início da deposição de fibras colágenas. Há invasão celular no interior da membrana onde é possível notar pequenas ilhas de um tecido diferenciado compatível com um tecido osteóide, o que demonstra permeabilidade da membrana. (Figura 13).

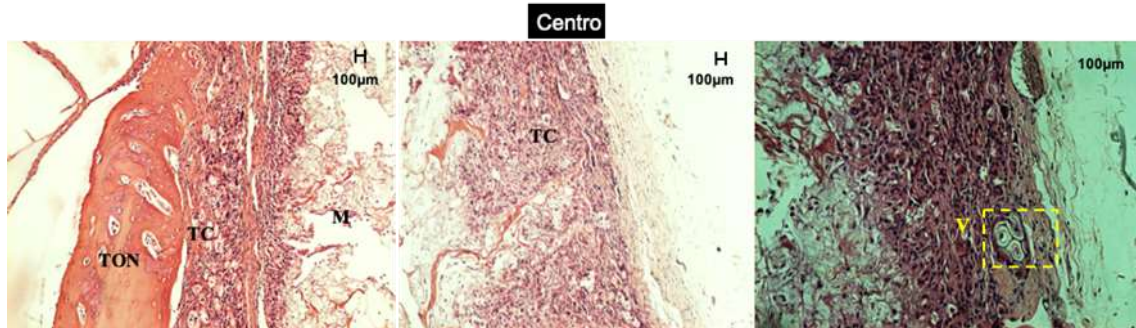
Figura 13 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 25x. Na região central nota-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) com bastante diferenciação celular e a membrana (M) íntegra.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

15 dias: observa-se organização das fibras colágenas (feixes) do tecido de granulação apresentando-se mais paralelos indicando um início de maturação do tecido de granulação e foi observado também a presença de células gigantes (macrófagos). A membrana ainda se encontra integrada envolvida por perióstio, isolada do meio com bastante tecido conjuntivo fibroso ricamente celularizado. No centro do defeito com a membrana, temos muitas células, vasos sanguíneos, demonstrando maturação lenta e fibras ainda dispostas de forma irregular. Evidenciamos uma neoformação óssea do coto em direção ao centro do defeito com perióstio espesso, bastante celularizado e em algumas áreas com reação menos intensa com menos células inflamatórias, (Figura 14).

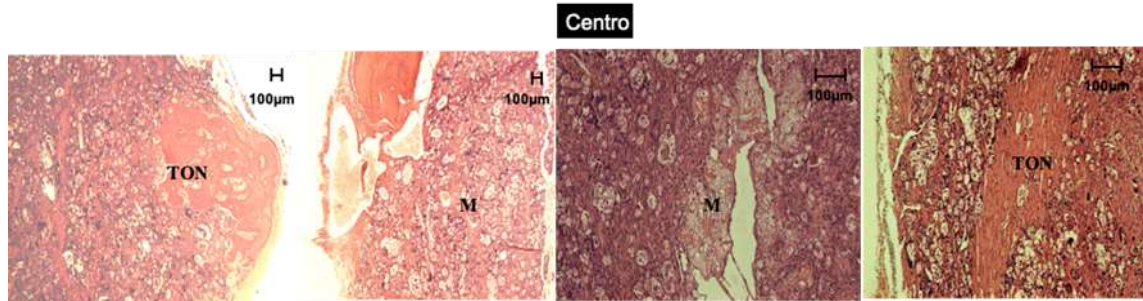
Figura 14 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e a última em 25x. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) do coto em direção a região central, com mudança de direção das fibras e na imagem de maior aumento, notamos grandes vasos sanguíneos com células gigantes (V).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

30 dias: evidencia-se formação de ilhas de tecido ósseo na região central do defeito com resíduo de membrana, em processo de degradação, perdendo função como barreira na regeneração óssea. Presença ainda de muito tecido conjuntivo fibroso celularizado (mais maduro) na periferia, entremeada com tecido ósseo neoformado. Nota-se fragmentos da membrana dispersos no meio do defeito, em processo de degradação, com neoformação de vasos sanguíneos na região central. Formação de tecido ósseo do coto em direção ao centro com alguns pontos com a presença de osteócitos indicando um tecido ósseo mais maduro (Figura 15).

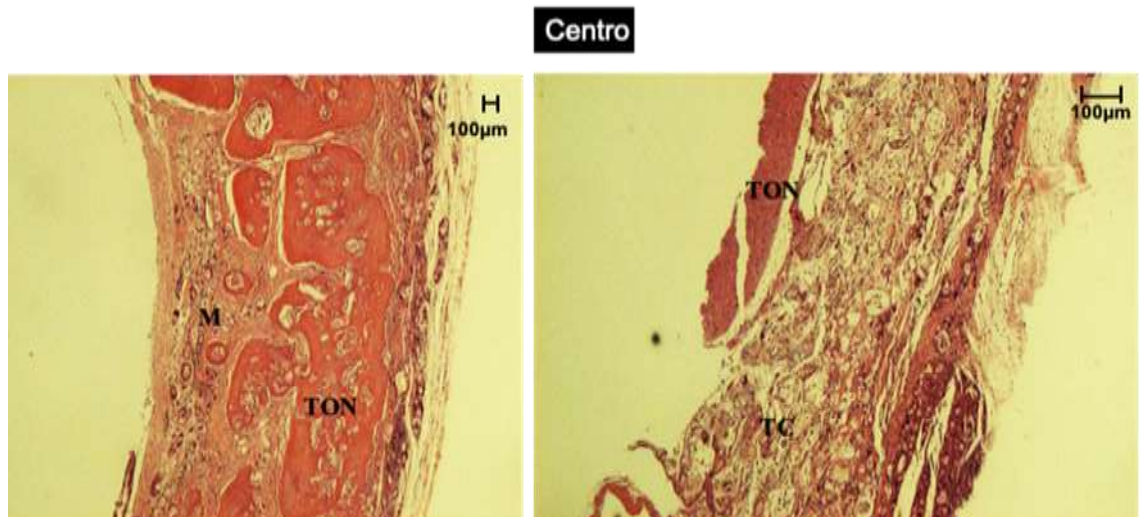
Figura 15 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,3x nas duas primeiras e 12,5x nas duas últimas. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) associado a áreas de tecido osteóide e fragmentos de membrana (M) em processo de degradação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

60 dias: Não foi possível observar o fechamento total do defeito, mas em quase todos os espécimes verificou-se que a neoformação óssea praticamente preencheu o defeito. Nota-se ainda a presença de fragmentos de membrana e áreas de tecido conjuntivo maduro com disposição paralela das fibras e pouco celularizado (Figura 16).

Figura 16 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,3x e 12,5x respectivamente. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) associado a áreas de tecido osteóide e ainda resquícios de fragmentos de membrana (M) com algumas áreas entremeadas de tecido conjuntivo maduro.

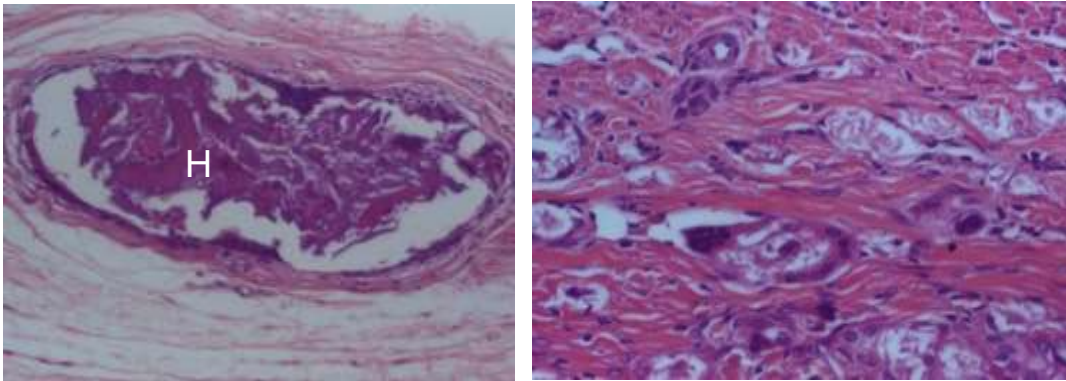


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Grupo colágeno bovino + hidroxiapatita (CB)

7 dias: observou-se a presença de alguns grânulos de hidroxiapatita (Figura 20) por vezes no meio da membrana e outras vezes no meio do tecido de granulação. Um tecido infiltrado inflamatório mais intenso em algumas lâminas e um tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado com muitas células gigantes (Figura 17). Notou-se discreta orientação das fibras colágenas numa possível tentativa de organização destas. Início de neoformação óssea junto aos cotos.

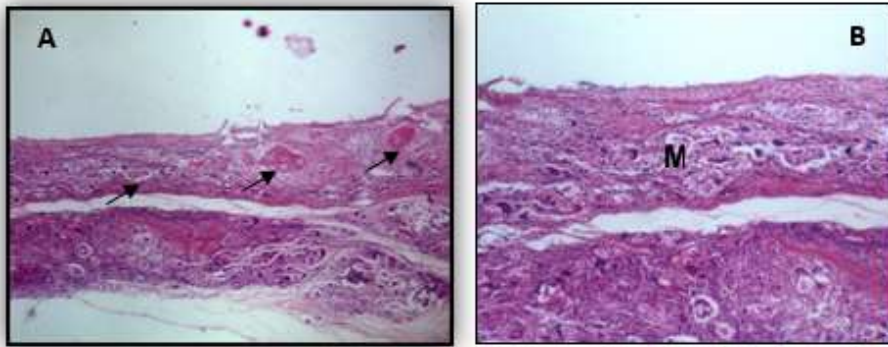
Figura 17 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CB aos 07 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x. Observamos grânulos de hidroxiapatita no centro do defeito (H) e presença de células gigantes (seta) na imagem ao lado.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

15 dias: ainda é possível observar a integridade da membrana. O tecido conjuntivo denso organizado evidencia um maior direcionamento das fibras colágenas. Nota-se uma diminuição da reação inflamatória com presença de células gigantes, fagocitando os grânulos de hidroxiapatita e a presença de ilhas de neoformação óssea na região central e também a partir dos cotos do defeito. É possível observar em algumas lâminas a presença de grânulos de hidroxiapatita que compõem o biomaterial no interior do conjuntivo. Infiltração dos grânulos demonstrando sua porosidade (Figura 18).

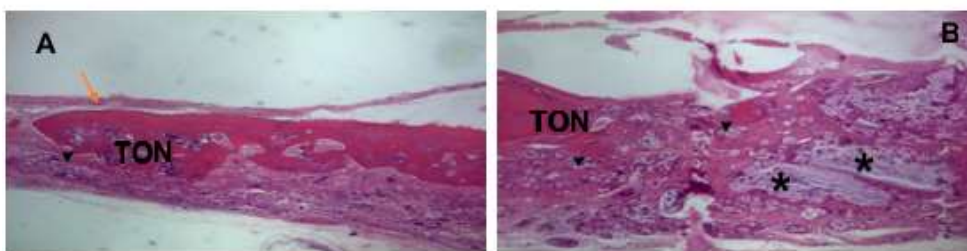
Figura 18 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CB aos 15 dias de reparo ósseo. Figura A. Magnificação de 6,5x, demonstrando pequenas ilhas de neoformação óssea (setas) (A). Figura B com magnificação de 12,5x possível evidenciar a integridade da membrana (M).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

30 dias: é possível constatar o processo de degradação da membrana em alguns espécimes, em outros, porém, nota-se a presença da membrana quase íntegra. Há presença de tecido conjuntivo fibroso organizado, intercalado com maior neoformação óssea e pequenas partículas de grânulos de hidroxiapatita envolvidos por neoformação óssea. O centro do defeito ainda não foi fechado (Figura 19).

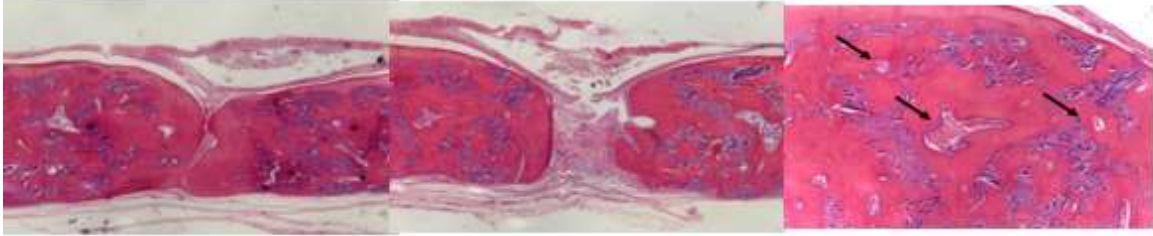
Figura 19 - Fotomicrografias do defeito do grupo CB aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,5x e 12,5x respectivamente, mostrando maior neoformação óssea (TON) e presença ainda de partículas de hidroxiapatita.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

60 dias: alguns espécimes tiveram o defeito preenchido por neoformação óssea, outros quase fechados, notando-se a presença de periósteo. É possível observar ainda a presença de fragmentos da membrana e dos grânulos de hidroxiapatita (Figura 20).

Figura 20 - Fotomicrografias do defeito do grupo CB aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x nas duas primeiras imagens, demonstrando fechamento do defeito e outro espécime com presença de tecido conjuntivo (sem fechamento total). Na última imagem, com aumento de 25x, presença de grânulos de hidroxiapatita no final do processo de reparo ósseo.

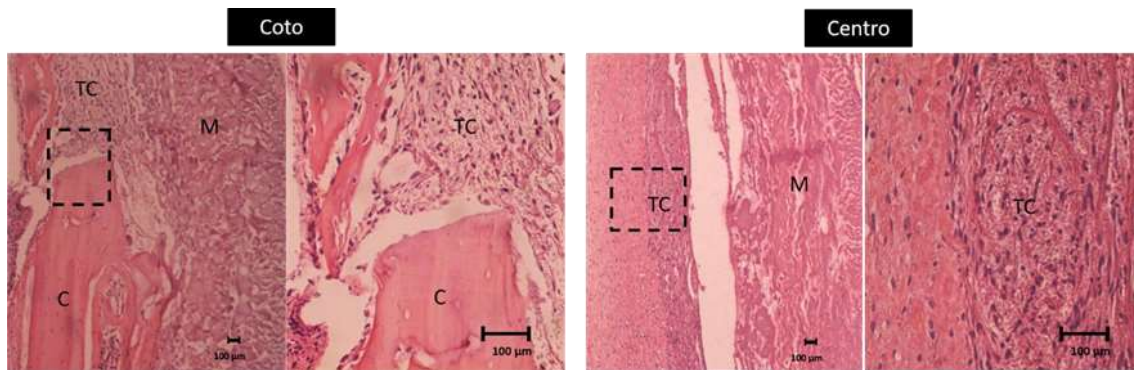


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Grupo colágeno porcino (BG)

7 dias: pode-se observar na reconstrução panorâmica em um aumento de 6.3x, a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo e um tecido de granulação bem organizado. No aumento de 12,5x, e 40x no centro do defeito, verifica-se que esse tecido de granulação é altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório e nitidamente a presença da membrana englobando todo o defeito. Próximo aos cotos, nos mesmos aumentos, é possível observar a presença da membrana envolvendo o coto e o tecido conjuntivo justaposto ao coto (Figura 21).

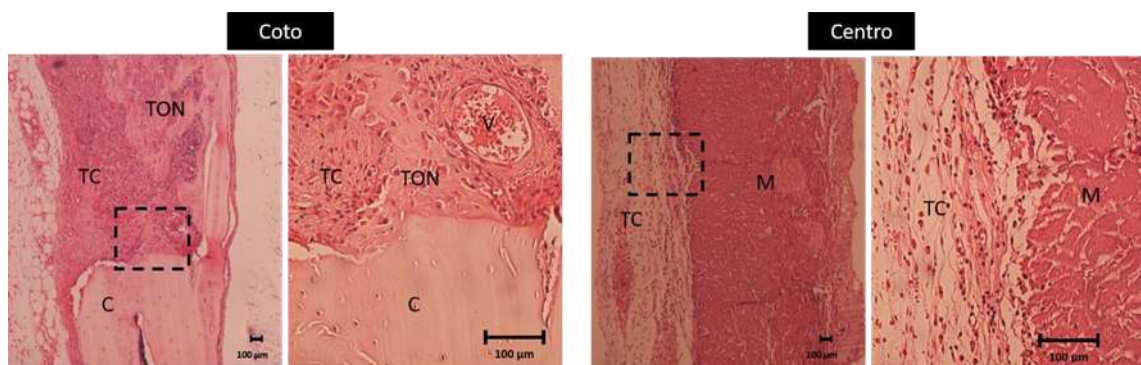
Figura 21 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Na região do coto (C) nota-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) e a membrana (M) íntegra, envolvendo as duas partes. No centro do defeito, nota-se nitidamente a presença da membrana (M) e um tecido conjuntivo (TC) bem celularizado.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

15 dias: Na imagem panorâmica na magnitude de 6,3x, observa-se a presença da membrana íntegra que recobre toda área do defeito ósseo. Nas análises com maior magnitude 12,5x e 40x, 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 conjuntivo no centro do defeito (Figura 22).

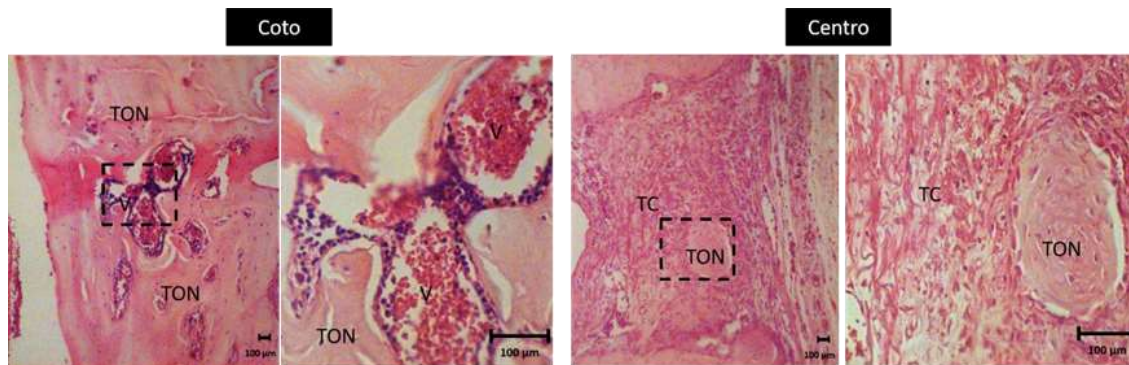
Figura 22 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Próximo aos cotos (CO), nota-se a área de tecido ósseo neoformado (TON) envolto por tecido conjuntivo (TC) altamente vascularizado (V). No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

30 dias: a reconstrução panorâmica (6,3x), demonstra que há praticamente neoformação óssea em todo o defeito ósseo de grande parte dos espécimes, alguns ainda com a presença de pequenas áreas de tecido conjuntivo denso. Nas imagens de maior aumento (12,5x e 40x) verifica-se que o centro do defeito apresenta sítios com tecido ósseo maduro e quase o fechamento total do defeito e outros espécimes nota-se a presença de tecido conjuntivo fibroso organizado. A neoformação óssea a partir dos cotos foi observada em todos os espécimes, confirmando que o reparo acontece no sentido central. Observou-se abundante quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana (Figura 23).

Figura 23. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Na região do coto ósseo, nota-se a presença de área de tecido ósseo neoformado (TON) envolta por grandes vasos sanguíneos (V). No centro do defeito, a área de tecido ósseo neoformado (TON) aparece envolta por tecido conjuntivo (TC).

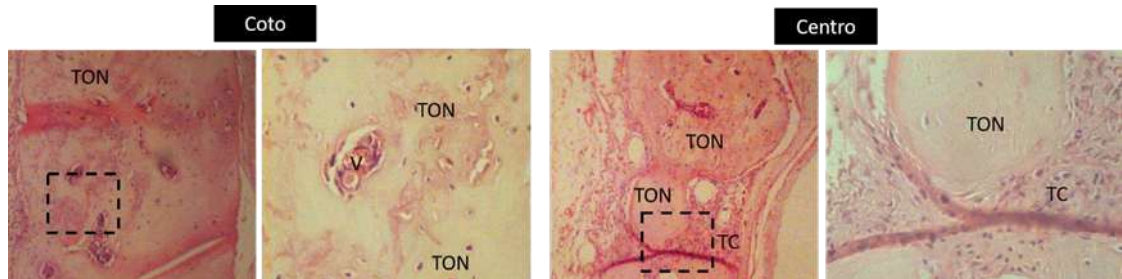


Fonte:

Elaborado pelo autor (2022)

60 dias: A imagem panorâmica (6,3x) mostra um defeito ósseo completamente regenerado por tecido ósseo e em imagens mais detalhadas observa-se que a neoformação óssea nos cotos e no centro do defeito foram semelhantes aos espécimes do grupo de 30 dias, mas com tecido ósseo neoformado preenchendo praticamente toda a cavidade. Com maior aumento (12,5x e 40x) no centro do defeito e nos cotos, observa-se a presença de tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo. Em algumas imagens foi observado presença de membrana remanescente (Figura 24).

Figura 24 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. O coto ósseo (C) já se confunde com a área total de tecido ósseo neoformado (TON), sendo possível observar grandes vasos sanguíneos (V) e o tecido ósseo ativo pela presença de osteócitos viáveis. No centro do defeito, grande área de tecido ósseo neoformado (TON) é visualizada, garantindo quase o fechamento total do defeito.

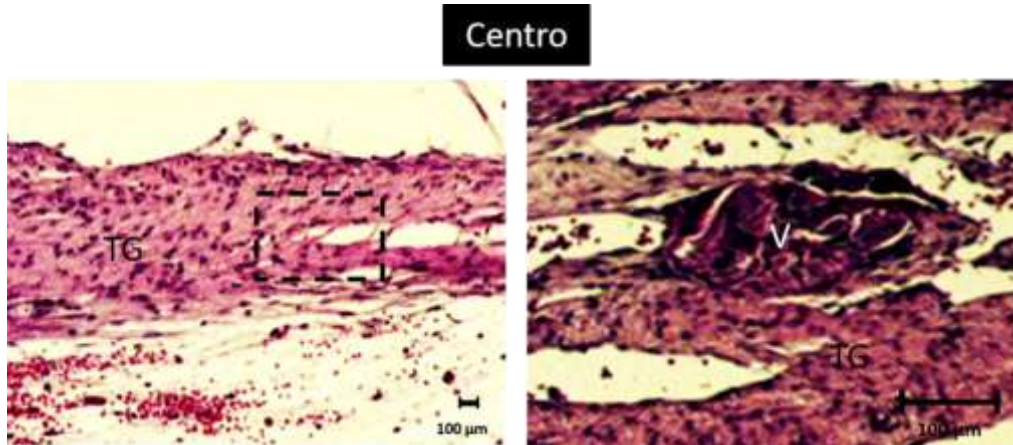


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Grupo coágulo (GC)

7 dias: na vista panorâmica, observa-se o defeito ósseo preenchido por um tecido de granulação 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 25).

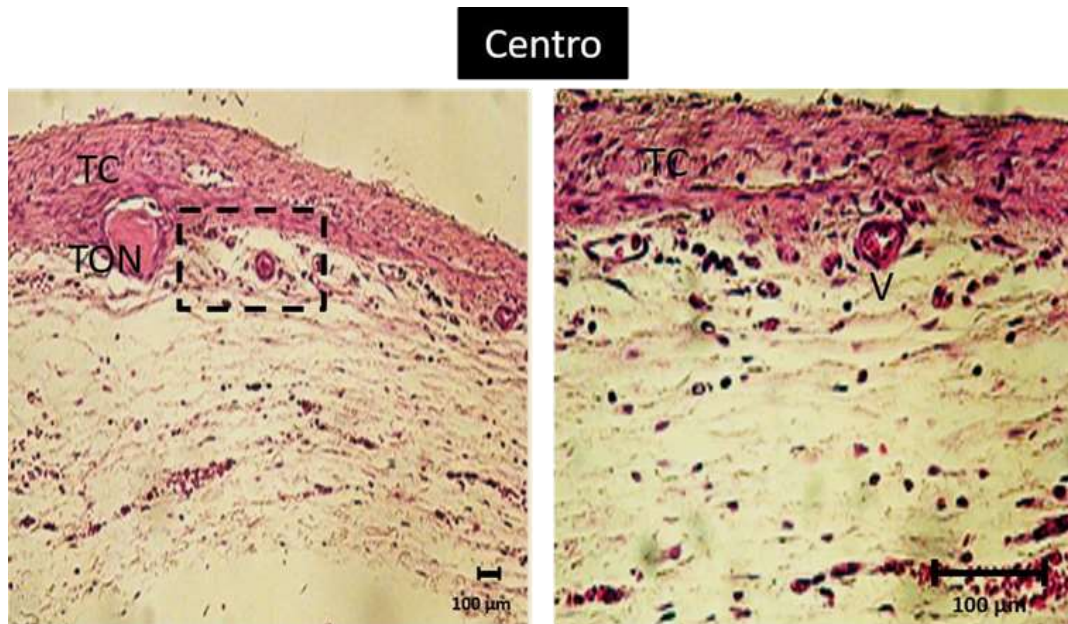
Figura 25 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo GC aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Um grande tecido de granulação (TG), e a presença de vasos sanguíneos (V), são observados.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

15 dias: na imagem panorâmica verifica um tecido conjuntivo frouxo preenchendo o defeito ósseo 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 26).

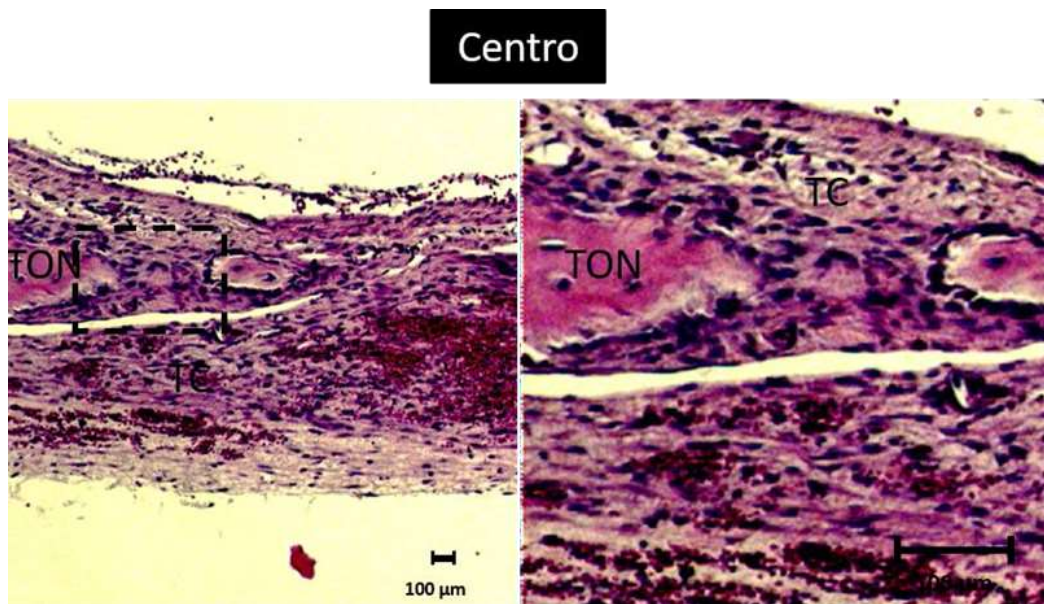
Figura 26 - Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo GC aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Nota-se um tecido conjuntivo (TC) levemente vascularizado, vasos sanguíneos (V) distribuídos pelo defeito e pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (TON).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

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. 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 27).

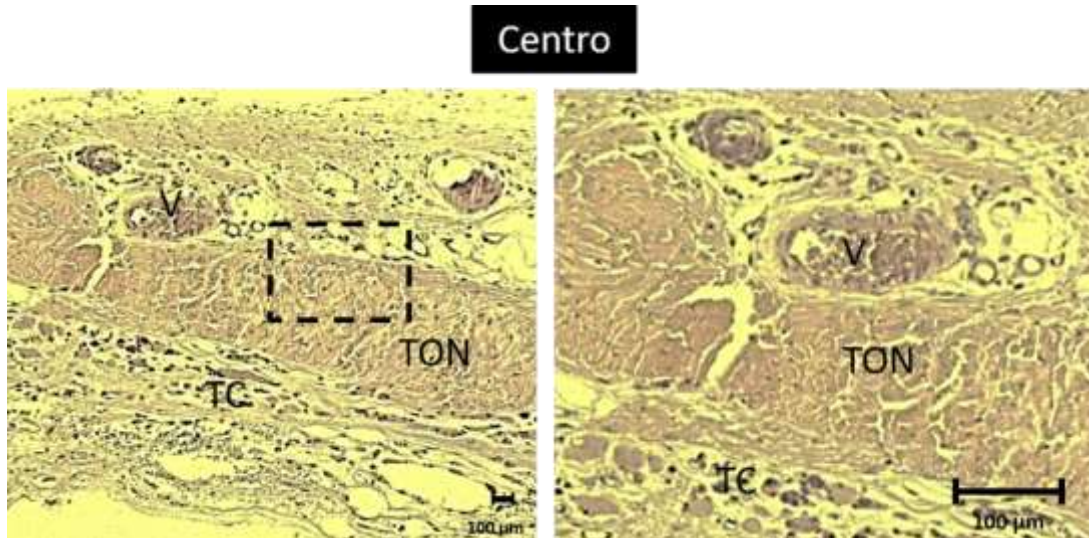
Figura 27 -Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Tecido conjuntivo (TC) mais organizado com pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (TON) envolvidas por grandes aglomerados celulares (células osteoprogenitoras).



Fonte: elaborado pelo autor (2022)

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 no centro a presença de tecido conjuntivo denso. 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 28).

Figura 28 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Tecido conjuntivo organizado (TC), áreas de tecido ósseo neoformado (TON), espalhadas pelo defeito e grandes vasos sanguíneos (V), próximos a áreas de neoformação óssea.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

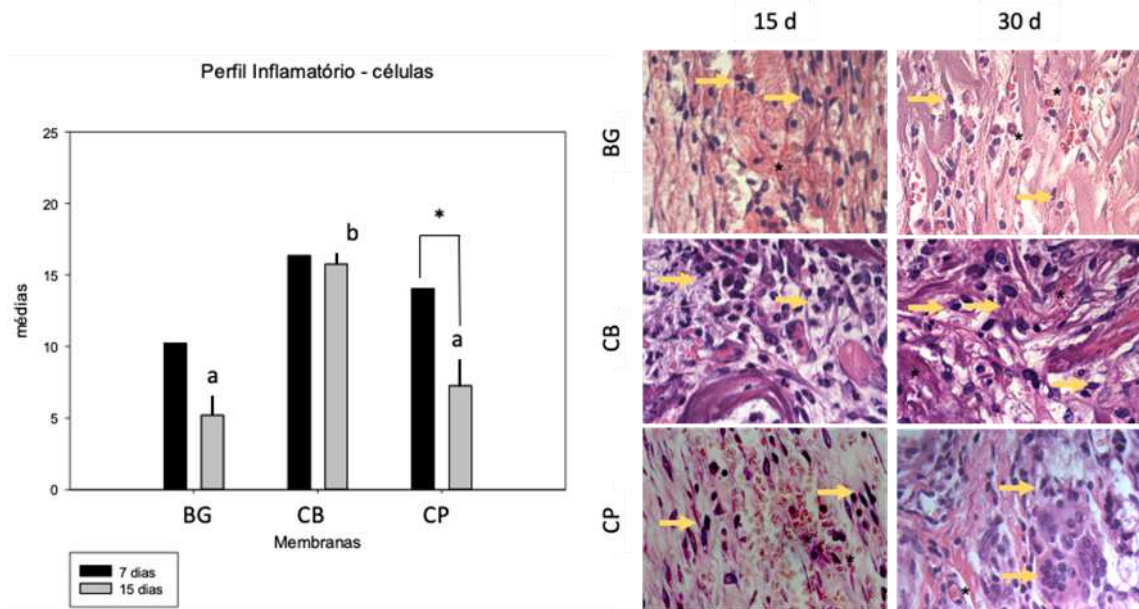
5.2 Análise Histométrica

Os resultados obtidos foram interpretados de maneira a traçar o perfil inflamatório e avaliar a capacidade osteopromotora de cada membrana testada em comparação com o controle positivo (BG).

5.2.1 Perfil Inflamatório (células e vasos sanguíneos)

Avaliando comparativamente a relação dos grupos em relação aos tempos de 7 e 15 dias (intra grupos), houve diferença estatisticamente significante somente no grupo colágeno de peixe (CP) com $p = 0,006$ e não houve diferença nos grupos colágeno porcino (BG) ($p = 0,054$) e colágeno bovino (CB) ($p = 0,789$). No tempo de 07 dias, avaliando a relação entre os grupos, quanto ao conteúdo celular, o grupo GB apresentou menor quantidade de células inflamatórias, seguido pelo grupo CP, porém sem diferença estatística ($p = 0,658$) e o grupo CB atingiu a maior quantidade de linfócitos, porém sem diferença para o grupo GB ($p < 0,053$). No momento da mesma avaliação, já no período de 15 dias, notamos o mesmo padrão de resposta inflamatória, com o grupo CB atingindo maior número de células, com diferença estatística para o grupo GB ($p < 0,001$) e para o grupo CP ($p = 0,002$). Não houve diferença entre os grupos CP e o BG em relação ao conteúdo celular no período de 15 dias (Figura 29).

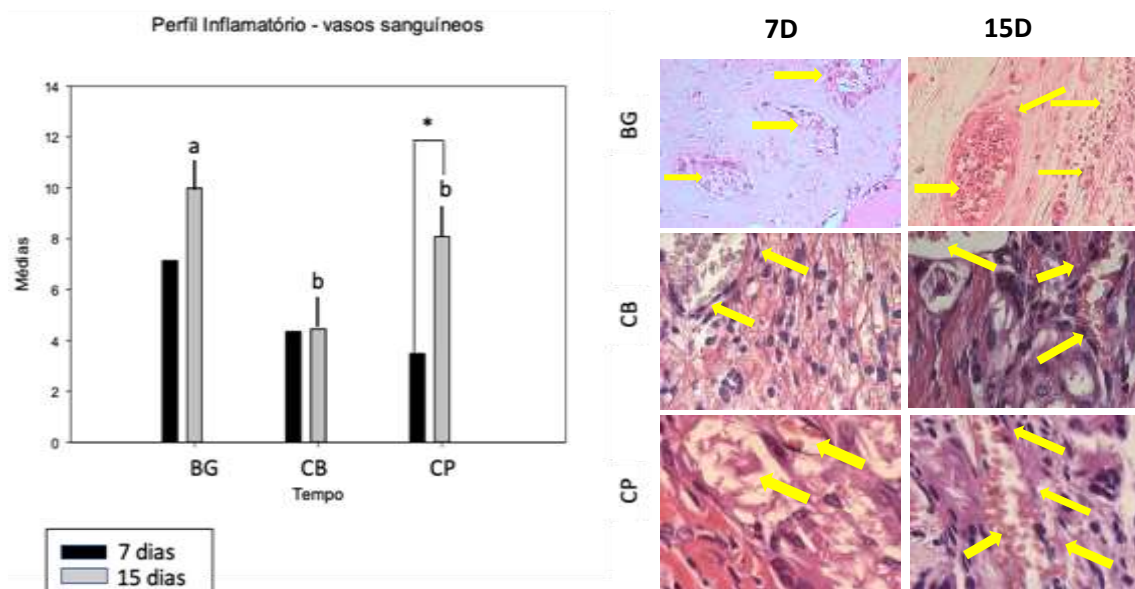
Figura 29 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos) no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas significantes inter grupos para o período de 15 dias, o * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias. Nas fotomicrografias ao lado realizadas em uma magnificação de 100x, as setas amarelas (↑) indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Na avaliação da quantidade de vasos sanguíneos, em uma análise comparativa intra grupos, apenas o grupo colágeno de peixe (CP) apresentou uma maior neovascularização dos 7 aos 15 dias ($p = 0,01$) durante o processo de reparo ósseo que foi estatisticamente significativa. Em relação aos grupos, não houve diferença, grupo BG ($p = 0,096$) e grupo CB ($0,945$). Comparando os resultados entre os grupos, no período de 7 dias, não houve diferença significativa na capacidade osteogênica. Já no período de 15 dias, houve diferença estatística significativa na quantidade de novos vasos sanguíneos para o grupo BG ($p < 0,05$) em relação ao grupo CB. Não houve diferença entre os grupos CB e CP ($p = 0,073$), muito embora o grupo colágeno de peixe tenha tido um desempenho melhor em relação a capacidade de formar vasos sanguíneos (Figura 30).

Figura 30 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise da quantidade de vasos sanguíneos no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas demonstram diferença estatística significativa para o período de 15 dias, não houve diferença estatística para o período de 7 dias. O * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias. Nas fotomicrografias ao lado realizadas em uma magnificação de 100x, as setas amarelas (↑) indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

5.2.2 Área de osso neoformado (AON)

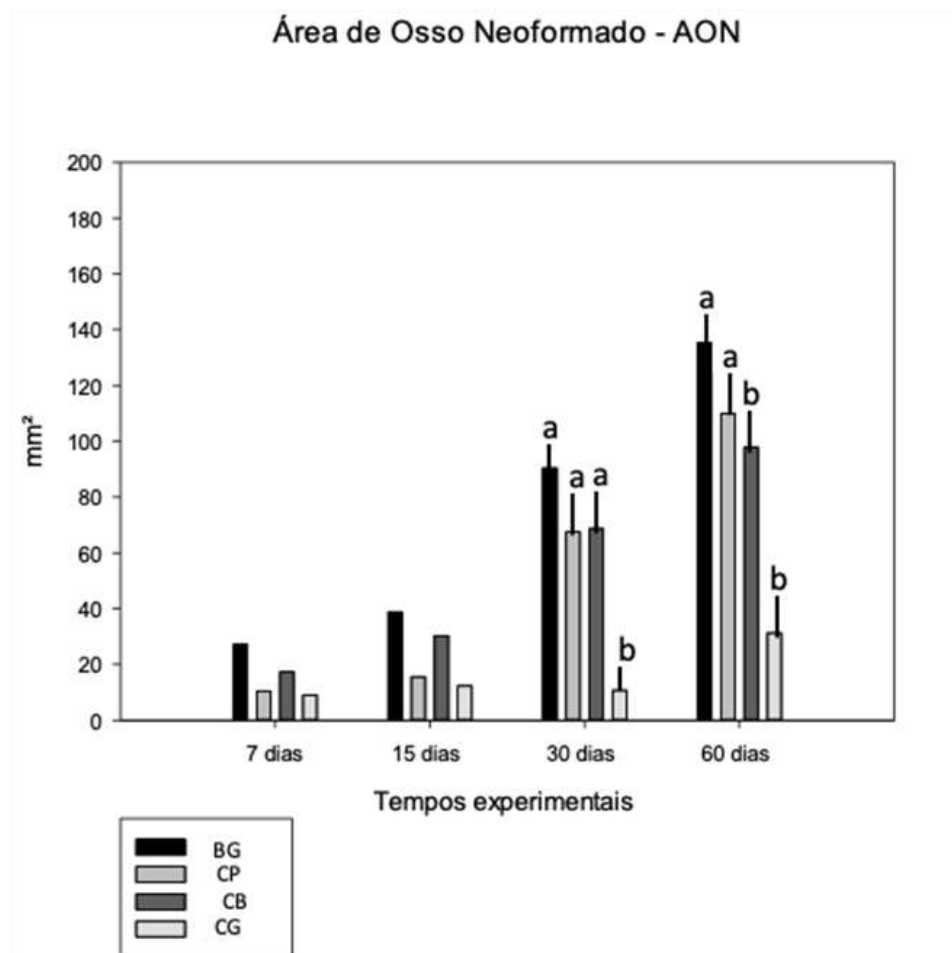
Em uma análise comparativa do fator membranas, apenas a comparação entre o grupo CB x CP ($p=0,969$) não apresentou diferença estatística, sugerindo um comportamento semelhante entre os grupos. O fator tempo por sua vez, só não teve influência no resultado, demonstrando não haver diferença estatística apenas na comparação entre 7 e 15 dias ($p=0,504$) (Figura 30).

Aos 7 dias de reparo ósseo, todos os grupos se comportaram de maneira similar em relação a neoformação óssea, não apresentando diferença estatística entre nenhum deles. Aos 15 dias, apesar de uma maior quantidade de osso neoformado observada nas amostras dos grupos BG e CB, novamente nenhuma diferença estatística foi apresentada entre os grupos (Figura 30).

Aos 30 dias, em um período mais tardio do processo de reparo ósseo, o grupo coágulo permaneceu apresentando o desempenho esperado, e o grupo CP teve o aumento mais

expressivo na quantidade de osso neoformado, não apresentando diferença significativa para o grupo BG ($p = 0,180$) e nem para o grupo CB ($p = 1,000$). No último tempo experimental analisado, aos 60 dias, o grupo BG teve o melhor desempenho no processo de neoformação óssea, seguido pela membrana de colágeno de peixe, e sem diferença estatística significativa ($p = 0,199$) entre esses grupos. O grupo CB teve um desempenho inferior em relação às outras membranas, com diferença significativa para o grupo GB (0,013) mas não significativa para o grupo CP ($p = 0,774$) (Figura 31).

Figura 31. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (BG, CP, CB e CG) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. As letras minúsculas demonstram diferença estatística significativa inter grupos para os tempos de 30 e 60 dias, nos períodos de 7 e 15 dias, não houve diferença estatística entre os grupos analisados.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

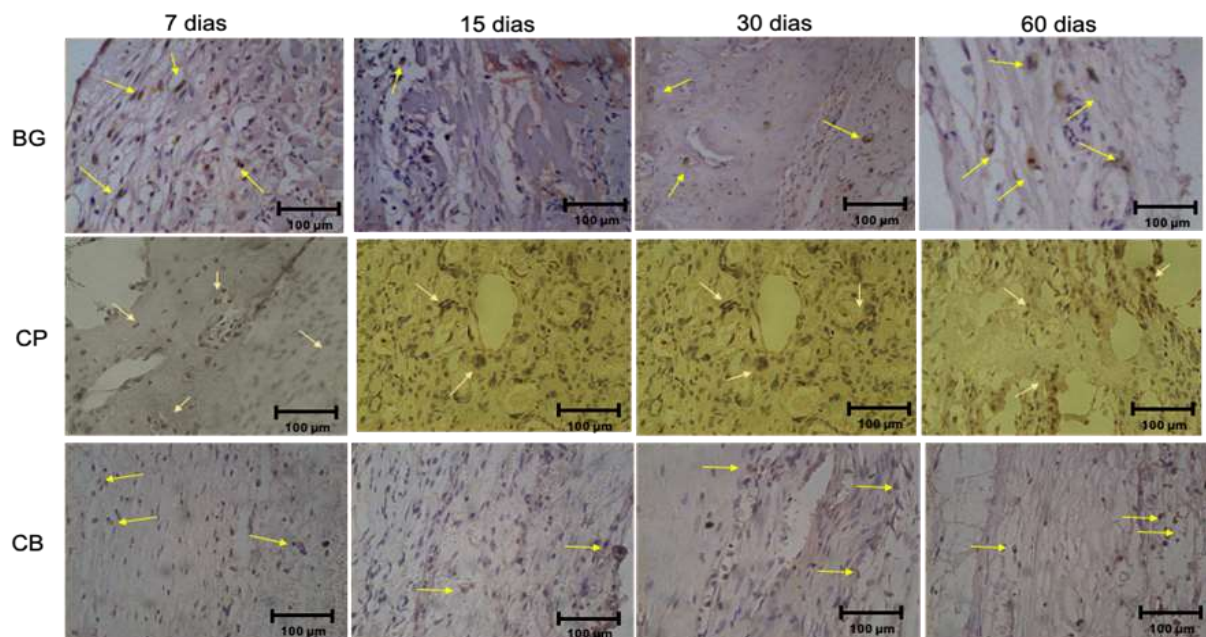
Análise Imunoistoquímica

As avaliações imunoistoquímicas foram realizadas através de análise qualitativa subjetiva com atribuição de escores, em que foi caracterizada a imunomarcagem para

osteocalcina e osteopontina que sinalizam o processo de formação e reabsorção óssea.

Para a proteína osteopontina (OP), marcador importante que caracteriza a etapa precoce de mineralização do tecido ósseo, observamos aos 07 e 15 dias pós-operatórios no grupo BG, moderada marcação extracelular; para o grupo CP marcação intensa e moderada; e para o grupo CB, marcação intensa e moderada, respectivamente, indicando possível aumento da atividade osteoblástica. Com 30 dias pós-operatórios, notamos imunomarcação leve para o grupo GB; para o grupo CP marcação moderada; imunomarcação moderada para o grupo CB; Já no período de 60 dias pós-operatórios, para o grupo GB, marcação moderada; para o grupo CP moderada; e para o grupo CB, marcação leve (Figura 32).

Figura 32 - Fotomicrografias dos grupos BG, CP e CB, durante os períodos de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x, evidenciando as imunomarcações de osteopontina (setas amarelas).

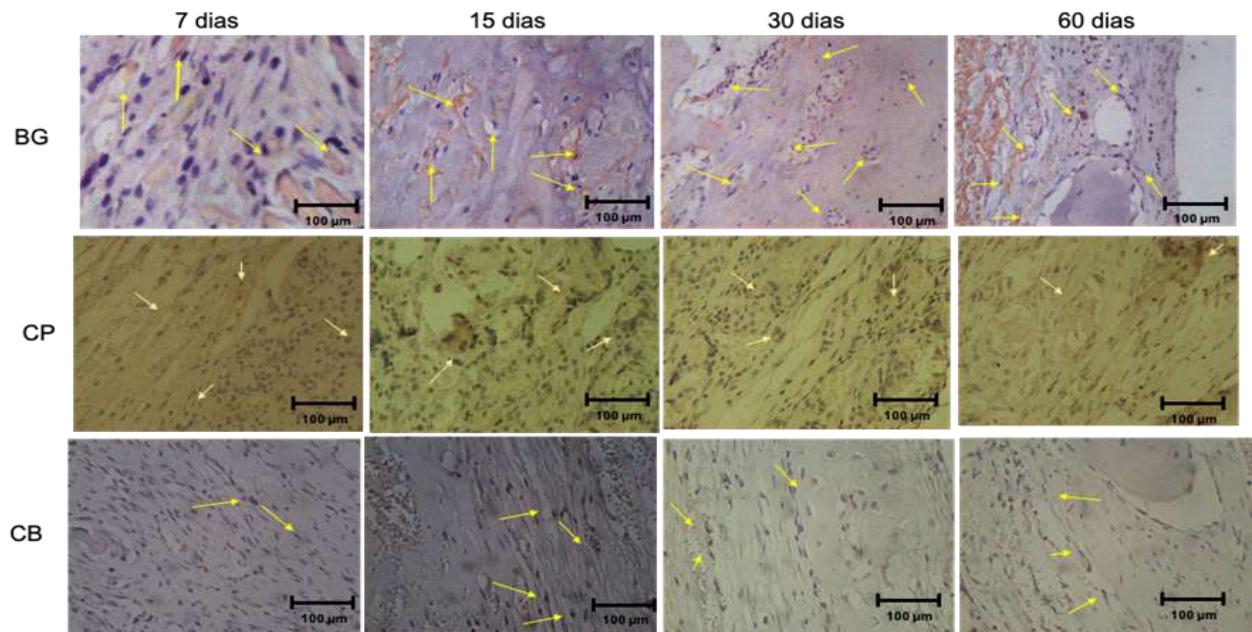


Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

Em se tratando da osteocalcina (OC), proteína que caracteriza o fenótipo osteoblástico, que sinaliza a fase tardia da mineralização, notamos aos 07 e 15 dias pós-operatórios, marcação moderada para o grupo BG; já para o grupo CP moderada em ambos os tempos; e para o grupo CB, marcação leve e moderada, respectivamente. No tempo de 30 dias pós-operatórios, para o grupo BG, observamos uma marcação intensa para osteocalcina; para o grupo CP marcação intensa; e para o grupo CB, temos uma presença moderada desta proteína na matriz extracelular. Já no tempo final de 60 dias, para o grupo BG, ainda observamos uma marcação intensa; no

grupo CP, moderada; e por último, no grupo CB, marcação moderada (Figura 33).

Figura 33 - Fotomicrografias dos grupos BG, CP e CB, durante os períodos de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x, evidenciando as imunomarcações de osteocalcina (setas amarelas).



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

6 DISCUSSÃO

O princípio básico da engenharia de tecidos é que células, genes, e proteínas sejam carregadas por meio de um material biodegradável, denominado de arcabouço, para regenerar o tecido³⁰. Nesse contexto, as membranas são barreiras que auxiliam na manutenção e proteção da região a ser regenerada, sem que esse processo de reparo seja prejudicado, facilitando a organização do tecido a ser reparado³¹.

Assim, quando pensamos na utilização de membranas alguns pontos devem ser observados: permeabilidade, tanto vascular quanto celular, baixa reação inflamatória, resistência mecânica e integridade da membrana até que um tecido neoformado seja produzido sem que ocorra a interferência de tecidos não desejados nas áreas de reparo^{32, 33}.

O uso do colágeno como matéria prima para confecção de membrana, apresenta muitas vantagens como: a durabilidade média adequada do efeito de barreira, por ser absorvida permite que seja realizado um procedimento cirúrgico de etapa única, o que diminui a morbidade do paciente e o risco para os tecidos recém-regenerados, possui boa integração tecidual, com menor risco da exposição da membrana e radiolucidez que permite a imagem do osso regenerado durante a cicatrização³⁴.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial regenerativo da membrana de colágeno de peixe em comparação com uma membrana de colágeno bovino e outra de colágeno porcino líder no mercado nacional e internacional. A realização de um grupo que denominamos de controle negativo, foi para que pudessemos certificar que um processo de reparo em um defeito crítico de 8mm não aconteceria sem a presença de algum biomaterial, o que foi possível comprovar em nossos resultados.

De uma forma geral, verificou-se que todas as membranas avaliadas obtiveram uma boa resposta de osteopromoção ao final dos 60 dias. A membrana de colágeno porcino ainda apresenta melhor desempenho no tocante a quantidade de neoformação óssea e baixa resposta inflamatória nos tempos iniciais como já foi descrito por Danieletto-Zanna et al, 2020; Bassi et al, 2020; Bassi et al, 2021 e Ramirez et al 2021, apresentando praticamente o fechamento total dos defeitos críticos com osso neoformado, em períodos mais curtos, demonstrando ter eventos biológico bem definidos e mais rápidos quando comparada as membranas avaliadas nesta pesquisa.

A membrana de colágeno bovino também apresentou bom desempenho, e provavelmente, por apresentar na sua composição hidroxiapatita, esse material além de ter a propriedade de osteopromoção, em algumas lâminas podemos observar que os grânulos de

hidroxiapatita também tiveram o papel de osteocondutor o que também melhora o desempenho dessa membrana e pode ser observado principalmente nos resultados imunohistoquímicos onde a osteopontina se manteve elevado desde os tempos iniciais inclusive mantendo sua resposta nos tempos finais, indicando que a atividade osteoblástica para neoformação óssea é ativa até o último período avaliado.

A membrana de colágeno de peixe apresentou-se também satisfatória nesse processo de osteopromoção apresentando como resultado final uma porcentagem de neoformação óssea superior à da membrana de colágeno bovina, tendo também uma manutenção de sua atividade osteoblástica inclusive nos tempos finais como pode ser observado nos resultados imunohistoquímicos, o que de forma semelhante à da membrana de colágeno bovino, reforça a ideia de uma manutenção da formação óssea após o período de 60 dias avaliados.

A análise da reação inflamatória está em geral está relacionada à boa resistência mecânica e sua estabilidade ao longo do processo de ROG; que o habilita como um bom material para essa função, tendo a sua eficiência comprovada como barreira em vários estudos. Contudo ela também está associada ao tratamento que o colágeno propriamente dito recebe ao longo de sua fabricação. Isso ocorre devido ao fato desse material sofre degradação rápida, e ter baixa resistência mecânica. Assim, alguns tratamentos são realizados para melhorar esse desempenho por meio de processos de reticulação que pode ser realizado de diversas formas, físico (adição de HA, por exemplo) e químicos, sendo estes os mais comuns. Dependendo do tipo de tratamento químico usado, eles podem resultar em processos inflamatórios mais intensos, interferindo na qualidade da membrana e nas suas características biológicas e capacidade de osteopromoção^{35, 36, 37}.

Nenhuma das membranas testes apresentou infiltrado inflamatório muito intenso e fora da curva normal esperado, além disso, constatamos uma boa aplicabilidade da membrana de peixe, corroborando com outros estudos^{38, 39, 40, 41}. Esses resultados positivos podem estar associados com a forma com que as membranas estudadas sofreram seus processos de reticulações que permitiu que todas tivessem boa permeabilidade vascular e celular e manutenção de suas estruturas até que um tecido consistente fosse formado. No caso da membrana de colágeno bovino essa reticulação deve ter ocorrido pela adição de partículas de HA, dando a ela uma maior resistência mecânica e a manutenção da sua integridade até praticamente aos 30 dias. Já na membrana de colágeno de peixe tudo indica que também foram adicionadas camadas a mais para torná-la mais resistente e estável, junto com a associação de HA. Podemos observar esses fatos nas análises histológicas, em que o infiltrado inflamatório esteve dentro da normalidade, houve permeabilidade vascular e celular, manutenção da

estrutura das membranas até 30 dias em quase todos os espécimes

No que diz respeito a resistência mecânica, foi observado histologicamente que a quantidade em espessura de osso neoformado nos defeitos protegidos com a membrana teste de peixe, apresentaram-se mais delgados quando comparados aos resultados obtidos pelas membranas de colágeno porcino e bovino. A espessura da membrana de peixe utilizada na nossa pesquisa foi relativamente maior quando, comparada com as outras, contudo, ela não foi suficiente para manter a resistência mecânica necessária e com isso acaba colabando um pouco em direção ao centro do defeito, diminuindo o espaço a ser regenerando e conseqüentemente tendo uma neoformação óssea mais delgada. Outro ponto que podemos pensar é que o fato de ser mais espessa também pode ter interferido de alguma forma na seletividade de passagem de células que promovam neoformação óssea.

O principal desafio das membranas de barreira absorvíveis fabricadas é manter a membrana até que a formação óssea esteja completa e então integrá-la com o tecido circundante ou ser absorvida pelo corpo hospedeiro. A integridade da membrana deve durar de 4 a 6 meses para apoiar a formação e maturação de novo osso. A seleção e combinação de biomaterial apropriado foram importantes para alcançar as propriedades ideais de membrana como barreira. Portanto, as propriedades físicas e mecânicas adequadas da membrana reabsorvível devem ser acompanhadas de propriedades de biocompatibilidade^{42, 43}.

Desta forma, entende-se hoje que a busca cada vez mais específica e padronizada de materiais fazem toda a diferença nos resultados das reconstruções ósseas. Não somente o tipo de biomaterial irá influenciar na quantidade e na qualidade de osso neoformado, mas o material osteopromotor tem papel tão importante quanto a escolha do material osteocondutor/osteoadutor a ser escolhido.

7 CONCLUSÃO

Desta forma, entende-se hoje que a busca cada vez mais específica e padronizada de materiais fazem toda a diferença nos resultados das reconstruções ósseas. Não somente o tipo de biomaterial irá influenciar na quantidade e na qualidade de osso neoformado, mas o material osteopromotor tem papel tão importante quanto a escolha do material osteocondutor/osteoadutor a ser escolhido. Neste contexto, com os resultados obtidos por este trabalho, concluímos que as membranas aqui estudadas tiveram um bom comportamento biológico, e todas auxiliaram no processo de regeneração óssea guiada.

REFERÊNCIAS

1. MISCH, Carl. **Implantes dentais contemporâneos**. Elsevier Brasil, 2011.
2. GOTTLAW, J. et al. Dahlin, C., A. Linde, et al.(1988)." Healing of bone defects by guided tissue regeneration." *Plastic and Reconstructive Surgery* 81 (5): 672-6. Fiorellini J, Howell T, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, Tolijaric j, Jones A, Nevins M: Randomized study evaluation rhBMP-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol*; 76 (4): 605-13 (2005). **Plastic and reconstructive surgery**, v. 81, n. 5, p. 672-6, 1988.
3. DONOS, Nikolaos; KOSTOPOULOS, Lambros; KARRING, Thorkild. Alveolar ridge augmentation using a resorbable copolymer membrane and autogenous bone grafts: an experimental study in the rat. **Clinical Oral Implants Research**, v. 13, n. 2, p. 203-213, 2002.
4. ZENG, Ni et al. Evaluation of novel resorbable membranes for bone augmentation in a rat model. **Clinical oral implants research**, v. 27, n. 2, p. e8-e14, 2016.
5. HÄMMERLE, Christoph HF; JUNG, Ronald E. Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontology** 2000, v. 33, n. 1, p. 36-53, 2003.
6. KITAYAMA, Shuzo et al. Regeneration of rabbit calvarial defects using biphasic calcium phosphate and a strontium hydroxyapatite- containing collagen membrane. **Clinical oral implants research**, v. 27, n. 12, p. e206-e214, 2016.
7. SCHENK, Robert K. et al. Padrão de cicatrização da regeneração óssea em defeitos protegidos por membrana: estudo histológico na mandíbula canina. **Jornal internacional de implantes orais e maxilofaciais** , v. 9, n. 1, 1994.
8. CORTELLINI, Pierpaolo; PRATO, Giovanpaolo Pini; TONETTI, Maurizio S. Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. **Journal of periodontology**, v. 64, n. 4, p. 254-260, 1993.
9. WILSON, G. J. et al. A compliant Corethane/Dacron composite vascular prosthesis. Comparison with 4-mm ePTFE grafts in a canine model. **ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)**, v. 39, n. 3, p. M526-31, 1993.
10. BECKER, William et al. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets: A study in dogs. **Journal of Periodontology**, v. 62, n. 11, p. 703-709, 1991.
11. BECKER, William et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet- derived growth factors and insulin- like growth factor- I or demineralized

- freeze- dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **Journal of Periodontology**, v. 63, n. 11, p. 929-940, 1992.
12. BUSER, D. years of Guided Bone Regeneration (Decision criteria for a Simultaneous GBR procedure). **Chicago. Quintessence Books**, v. 2009, p. 123-152, 20.
 13. SHEIKH, Zeeshan et al. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. **Biomaterials research**, v. 21, n. 1, p. 1-20, 2017.
 14. SIMION, Massimo et al. Regeneração óssea guiada usando membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis: um estudo histológico comparativo em humanos. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants** , v. 11, n. 6, 1996.
 15. IMBRONITO, Ana Vitória; ARANA CHAVEZ, Victor Elias; TODESCAN, José Hildebrando. Reneração óssea guiada. **Periodontia Revista**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 45-50, 2001.
 16. MILLER, Neal et al. Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes: a histomorphometric study in a rabbit model. **Journal of clinical periodontology**, v. 23, n. 12, p. 1051-1059, 1996.
 17. HUTMACHER, Dietmar; HÜRZELER, Markus B.; SCHLIEPHAKE, Henning. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 11, n. 5, 1996.
 18. ROMEO E, Lops D, Chiapasco M, Ghisolfi M, Vogel G. Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part II: radiographic outcome. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 2, p. 179-187, 2007.
 19. BÖSTMAN, OM Implantes absorvíveis para fixação de fraturas. **JBJS**, v. 73, n. 1, pág. 148-153, 1991.
 20. ROTHAMEL, Daniel et al. Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 27, n. 1, p. 146, 2012.
 21. LEE, Sang-Woon; KIM, Seong-Gon. Membranes for the guided bone regeneration. **Maxillofacial plastic and reconstructive surgery**, v. 36, n. 6, p. 239, 2014.
 22. SUBHAN, Fazli et al. Uma revisão sobre os avanços e aplicações recentes do colágeno de peixes. **Revisões críticas em ciência dos alimentos e nutrição** , p. 1-11, 2020.

23. DOS SANTOS VOLOSKI, Ana Paula et al. β -Glucan improves wound healing in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish & shellfish immunology**, v. 93, p. 575-579, 2019.
24. TIHISTA, Serrana; ECHAVARRÍA, Estrella. Effect of omega 3 polyunsaturated fatty acids derived from fish oil in major burn patients: A prospective randomized controlled pilot trial. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 107-112, 2018.
25. YAMADA, Shizuka et al. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
26. BECKER, William et al. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 9, n. 1, 1994.
27. LIM, Ye-Seon et al. Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications. **Marine drugs**, v. 17, n. 8, p. 467, 2019.
28. FURLANETO Fac, et al. Cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico tratados com vidro bioativo / sulfato de cálcio: estudo histológico e histométrico em calvária de rato. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18. n. 3, p 311-318, 2007.
29. FARNEZI BASSI, Ana Paula et al. Is the Bacterial Cellulose Membrane Feasible for Osteopromotive Property?. **Membranes**, v. 10, n. 9, p. 230, 2020.
30. YAMADA, Shizuka et al. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
31. DANIELETTO-ZANNA, Carolina Ferrairo et al. Osteopromotion capacity of bovine cortical membranes in critical defects of rat calvaria: Histological and immunohistochemical analysis. **International journal of biomaterials**, v. 2020, 2020.
32. SALAMANCA, Eisner et al. In vitro and in vivo study of a novel porcine collagen membrane for guided bone regeneration. **Materials**, v. 9, n. 11, p. 949, 2016.
33. BEHFARNIA, Parichehr et al. Histological and histomorphometric analysis of animal experimental dehiscence defect treated with three bio absorbable GTR collagen membrane. **Dental Research Journal**, v. 9, n. 5, p. 574, 2012.
34. SBRICOLI, Luca et al. Selection of collagen membranes for bone regeneration: a literature review. **Materials**, v. 13, n. 3, p. 786, 2020.
35. WANG, Jing et al. Fabrication of collagen membranes with different intrafibrillar mineralization degree as a potential use for GBR. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109959, 2019.
36. ALPAR, Berna et al. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts

- and human osteoblast-like cells. **Clinical oral investigations**, v. 4, n. 4, p. 219-225, 2000.
37. ROTHAMEL, Daniel et al. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. **Clinical oral implants research**, v. 15, n. 4, p. 443-449, 2004.
38. JIN, Shue et al. Fish collagen and hydroxyapatite reinforced poly (lactide-co-glycolide) fibrous membrane for guided bone regeneration. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 5, p. 2058-2067, 2019.
39. KUMAR, BB Santosh et al. Evaluation of a bioresorbable collagen membrane of fish origin in the treatment of periodontal intrabony defects: A prospective clinical study. **Dental Research Journal**, v. 10, n. 2, p. 225, 2013.
40. YAMAMOTO, Kohei et al. The characterization of fish (tilapia) collagen sponge as a biomaterial. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015.
41. SONG, Wen-Kui et al. Physicochemical and biocompatibility properties of type I collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for biomedical applications. **Marine drugs**, v. 17, n. 3, p. 137, 2019.
42. PRIPATNANONT, Prisana et al. Physical and biological performances of a semi-resorbable barrier membrane based on silk fibroin-glycerol-fish collagen material for guided bone regeneration. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 36, n. 5, p. 930-942, 2021.
43. SASAKI, Jun-Ichi et al. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry. **Biomaterial Investigations in Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 54-63, 2021.

ANEXO – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação de uma nova membrana nacional de colágeno de peixe na regeneração óssea guiada. Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e de perfil inflamatório", Processo FOA nº 0100-2021, 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 26 de Novembro de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 26 de Novembro de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 26 de Dezembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of a new national fish collagen membrane in guided bone regeneration. Histomorphometric, immunohistochemical and inflammatory profile evaluation", Protocol FOA nº 0100-2021, 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 November 26, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 26, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 26, 2022.

Prof. Associado João Carlos Callera
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