



BRUNA STEFANI DA COSTA E SILVA

**Comparação da atividade osteopromotora de
uma nova membrana nacional de pericárdio
bovino no processo de regeneração óssea
guiada. Avaliações histológica,
histomorfométrica e perfil inflamatório**

**Araçatuba
2023**

BRUNA STEFANI DA COSTA E SILVA

**Comparação da atividade osteopromotora de
uma nova membrana nacional de pericárdio
bovino no processo de regeneração óssea
guiada. Avaliações histológica,
histomorfométrica e 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: Profa. Ass. Ana Paula
Farnezi Bassi

Dedico este trabalho a minha mãe, Sandra Cristina Rodrigues da Costa, com todo meu amor, cujo apoio incondicional me deu forças quando por vezes a caminhada se tornou difícil. Sem o apoio dela, 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, principalmente aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia **Paulo, Marco e Renato**, por todos ensinamentos, paciência e ajuda.

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.

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

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a Deus, o maior orientador da minha vida. Ele nunca me abandonou nos momentos de necessidade.

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, onde nunca me imaginei, mas que se tornou minha segunda casa. Grata pela oportunidade de estudar em uma instituição de tamanha excelência, que preza pela formação de profissionais de qualidade. Desejo honrar essa instituição enquanto exercer a profissão.

A minha orientadora **Prof^a. Dr.^a Ana Paula Farnezi Bassi**, por ter me orientado desde o meu terceiro ano de graduação, 2021, sendo inspiração desde o primeiro contato com a cirurgia e traumatologia - na aula de Pré Operatório em 2020. Obrigada por fazer eu me apaixonar ainda mais pela pesquisa, por todo o preparo - independente do caminho que eu escolher.

Ao Professor **Leonardo Perez Faverani**, que muito me ensinou, e ajudou, sendo um dos meus exemplos de profissional e ser humano. Obrigado, professor.

Aos doutorandos **Ana Maira Pereira Baggio** e **Vinicius Ferreira Bizelli**, por toda ajuda prestada. Esse trabalho não seria possível sem vocês. É uma honra aprender com pessoas como vocês.

Agradeço aos meus pais, e ao meu padrasto **Reginaldo Aparecido de Andrade**, por todo o esforço pra fazer esses 6 anos de graduação serem possíveis, em especial a minha mãe **Sandra Cristina Rodrigues da Costa**, que é pra mim um exemplo de resiliência, que por vezes abdicou de sonhos e coisas pra si para que eu conseguisse estar onde estou.

Agradeço aos meus avós maternos, não mais presentes nesse plano, mas que sempre foram os meus maiores incentivadores, desde que eu me lembro. Minha vó, **Sonia Maria dos Santos Costa**, que partiu em 2018, e

sempre acreditou no meu potencial mesmo quando eu duvidava. Ao meu avô, **Otacílio Rodrigues da Costa**, minha perda em 2023, que com orgulho falava sobre a neta estudante da FOA, futura dentista, que me incentivava desde as primeiras sílabas juntadas na alfabetização, ou então com os infinitos cadernos de tabuada. Amo vocês, eternamente, e não há um dia em que eu não sinta saudades. Espero continuar sendo orgulho para vocês, obrigada por todos os princípios ensinados.

A minha tia-avó **Priscilla B. Tucunduva**, por ser um exemplo tão próximo de profissional e pessoa. Obrigada também por todo apoio e ensinamentos.

Aos meus amigos de graduação, **Vitor Hugo Martim Dourado, Juliana de Aguiar Silveira Meira, Samuel José Braga, Gustavo Nobrega Nilo, Mirella Gasperoni, Filipe Scurissa Melchert, Evelyn de Moura, Laise Mayne Dias, Leticia Gabriella de Souza**, obrigada por todo carinho, suporte, risadas e horas de estudo. Aos que foram minhas duplas, é uma honra dividir a profissão com vocês e um prazer viver dentro e fora das clínicas o que de melhor os anos de graduação poderiam nos oferecer.

Aos moradiers, **Francieli da Silva Flores** (responsável pela minha mudança em 2019), **Caio Daniel Secate, Bruna Maziero de Jesus, José Roberto Virginio de Matos, Marcos Eduardo Gomes Alves**, obrigada por todos esses anos de convivência diária, vocês fizeram parte da minha família Araçatubense, a caminhada sem sombra de dúvidas foi mais leve com vocês.

Agradeço também a **Izabela Fornazari Delamura**, por ser uma irmã e me apoiar em todos esses anos de convivência. Me inspiro em você, é pra mim um exemplo de mulher, filha, ser humano, profissional e pesquisadora. Obrigada por cada risada, pelos puxões de orelha quando necessário e por ser ombro amigo em todas as vezes que precisei.

Ao meu ex namorado, mas ainda amigo **Leonardo Pupin Machado**, que viveu de perto boa parte dessa trajetória, se fazendo presente em todos os momentos, sendo um dos ombros em que pude me apoiar para concluir essa caminhada.

Às minhas amigas de longa data, **Natalia Santana da Silva, Sabrina de Souza Lyra, Ana Julia Paes Simões**, que mesmo com os quilômetros de distância e a ausência da vida adulta, se fizeram presentes nos momentos bons e ruins, mostrando o quão consolidada é a nossa amizade.

Aos meus amigos da iniciação científica **Arthur Henrique Alécio Viotto, Julia Maria Batista da Silva, Nátalia Saori Izumi, Natália Tinti, Douglas Biagi** que caminharam junto comigo, obrigada por toda ajuda, torço pelo sucesso de vocês.

SILVA, BSC. **Comparação da atividade osteopromotora de uma nova membrana nacional de pericárdio bovino no processo de regeneração óssea guiada. Avaliações histológica, histomorfométrica e perfil inflamatório (TCC).** Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba-SP, 2023.

RESUMO

O uso de membranas que contribuem no importante processo de regeneração óssea guiada (ROG) é uma vertente dos estudos de biomateriais compatíveis que auxiliam nesse reparo. O objetivo do trabalho é avaliar e comparar o potencial de osteopromoção de uma membrana colágena de pericárdio bovino na regeneração de óssea de defeitos críticos criados em calvária de ratos. É importante reforçar a relevância deste estudo, visto que há pouquíssimos trabalhos relacionados ao potencial de osteopromoção de pericárdios bovino, porcino ou equino, na literatura. 72 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* Wistar, machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 300g. Os animais foram divididos em três grupos experimentais (GT1): Grupo membrana de colágeno de pericárdio bovino (Techgraft-Baumer®), (GC+): Grupo membrana de colágeno porcino (BioGide®-Geistlich - Controle Positivo), (GC-): Grupo Coágulo (Controle Negativo) de forma aleatória, referente aos períodos de eutanásia de 07,15, 30 e 60 dias. Cada grupo incluirá 06 animais (n=6), sendo 24 animais por material. Após o procedimento cirúrgico, as peças foram tratadas de acordo com as análises propostas, seguindo os devidos protocolos das análises: Histológica, Histométrica e Perfil inflamatório. Para comparações foram utilizados os seguintes testes: para dados paramétricos, One way ANOVA com pós-teste de Tukey; e para dados não paramétricos, Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. O nível de significância estatística estabelecido será de 5%.

Palavras-chave: biomaterial, regeneração, tecido ósseo, membrana.

SILVA, BSC. **Comparison of the osteopromotive activity of a new national bovine pericardium membrane in the process of guided bone differentiation. Hitological, histomorphometric evaluations and inflammatory profile (TCC).** Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The use of membranes that contribute to the important process of guided bone regeneration (GBR) is a branch of studies in compatible biomaterials that aid in this repair. The objective of this work is to evaluate and compare the osteopromotion potential of a collagen membrane derived from bovine pericardium in the regeneration of bone from critical defects created in the rat calvaria. It's important to emphasize the relevance of this study, as there are very few works related to the osteopromotion potential of bovine, porcine, or equine pericardium in the literature. 72 male adult *Rattus norvegicus albinus* Wistar rats (3 to 4 months old), weighing approximately 300g, were used in this study. The animals were divided into three experimental groups (GT1): Bovine pericardium collagen membrane group (Techgraft- Baumer®), (GC+): Porcine collagen membrane group (BioGide®- Geistlich - Positive Control), (GC-): Clot group (Negative Control) randomly assigned, corresponding to euthanasia time points of 07, 15, 30, and 60 days. Each group included 06 animals (n=6), making a total of 24 animals per material. After the surgical procedure, the specimens were processed according to the proposed analyses, following the appropriate analysis protocols: Histological, Histometric, and Inflammatory Profile analyses. For comparisons, the following tests were used: for parametric data, One-way ANOVA with Tukey's post-test; and for non-parametric data, Kruskal-Wallis with Dunn's post-test. The established level of statistical significance is 5%.

Key words: Biomaterial. Regeneration. Bone tissue. Membrane

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representada pela linha tracejada vermelha.....21
- Figura 2 – (A) defeito crítico de 8mm tido como padrão para todos os grupos. Preenchidos com coágulo sanguíneo e recobertos com a membrana referente a cada grupo: (B) GT1: Techgraft®. (C) GC+: BioGide® e (D) GC-: apenas coágulo.....21
- Figura 3 – Corte longitudinal obedecendo a margem de segurança ao redor de todo o defeito, separando o defeito ósseo em duas partes (sendo essas iguais) para inclusão em parafina.22
- Figura 4 - Software ImageJ utilizado para contagem de células e vasos sanguíneos. Grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica em um aumento da objetiva de 100x.24
- Figura 5 - Software ImageJ utilizado para calibragem da ferramenta régua na magnificação de escolha para ser realizada a histometria e a seguir a contagem da área óssea através da ferramenta polígono.25
- Figura 6 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos GC+, GT1 e GC- em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 4x.26
- Figura 7 - Fotomicrografias do grupo GT1 aos 7 dias de reparo ósseo, em aumentos de 4x e 10x. A e C: a área de defeito ósseo (entre *) revela a presença da membrana (M) de pericárdio bovino colabada e logo abaixo o tecido conjuntivo frouxo (CF). B e D: começo de neoformação óssea (NO) nos cotos, e diferentes graus de maturação do tecido conjuntivo (denso – CD, e fibroso – CF).27
- Figura 8 - Fotomicrografias do grupo GT1 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4x e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e membrana (M) colabada. B e D: margens com início de neoformação óssea (NO) e mineralização do tecido. C: Margens com início de neoformação óssea.28
- Figura 9 - Fotomicrografias do grupo GT1 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4x e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e remanescente da membrana. B e D: Margens com osso maduro (OM), ilhas de neoformação e trabéculas preenchidas por medula. C: ao centro presença de tecido conjuntivo denso e fechamento do defeito.....29
- Figura 10 - Fotomicrografias do grupo GT1 aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea por todo defeito (NO). B e D tecido ósseo maduro (OM) às margens do defeito apresentando ainda de tecido conjuntivo denso (CD). C: ao centro neoformação óssea entremeado por tecido conjuntivo denso, presença de perióstio (seta).30

- Figura 11 - Fotomicrografias do grupo GC+ aos 7 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4x e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana (M) de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo. B e D: início de formação óssea às margens do defeito (NO), tecido conjuntivo denso (CD), que serve como espécie de arcabouço para o desenvolvimento do osso neoformado. C: diferença nos tecidos abaixo da membrana (M), tecido conjuntivo frouxo e neoformação óssea (NO) entremeada por um conjuntivo denso (CD), que sugere a interação entre esses diferentes tipos de tecidos durante o processo de reparo ósseo.31
- Figura 12 - Fotomicrografias do grupo GC+ aos 15 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana de colágeno suíno em toda a extensão do defeito ósseo (M) e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CF). B e D: Maturação do tecido ósseo as margens do defeito (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD).....32
- Figura 13 - Fotomicrografias do grupo GC+ aos 30 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro e restos da membrana (M). B e D: Maturação do tecido ósseo às margens do defeito (MON), diminuição das trabéculas e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD). C: presença de remanescentes da membrana (M) envolta por tecido conjuntivo fibroso organizado (CF) e osso neoformado (NO). Acima, presença de periósteo (seta).33
- Figura 14 - Fotomicrografias do grupo GC+ aos 60 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: Osso maduro (OM) as margens do defeito apresentado ilhas de neoformação (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD). C: defeito fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro, com restos da membrana (M) de colágeno porcino ao centro e abaixo um tecido de granulação bem organizado.34
- Figura 15 - Fotomicrografia panorâmica do grupo GC- aos 7 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4x e 10x. – A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: início de neoformação óssea próximo aos cotos (NO). C: efeito preenchido por tecido conjuntivo (CD/CF).....35
- Figura 16 - Fotomicrografia panorâmica do grupo GC- aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: Cotos apresentando neoformação óssea (NO) e presença de tecido conjuntivo denso (CD). C: Defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo e denso.36
- Figura 17 - Fotomicrografia panorâmica do grupo GC- aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4x e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: Cotos apresentando neoformação óssea. C:

defeito preenchido por tecido conjuntivo com presença de ilhas de neoformação óssea (NO).	37
Figura 18 - Fotomicrografia panorâmica do grupo GC- aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x. A: Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: cotos apresentando neoformação óssea. C: tecido ósseo neoformado (NO) e conjuntivo denso (CD).	38
Figura 19 - gráfico comparativo das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (gc+, gt1 e gc-), maiusculo para os tempos experimentais de todos os tempos (7, 15, 30 e 60 dias).	40
Figura 20 - gráfico comparativo das médias e desvio padrão intra e intergrupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos), para os tempos experimentais de 7 e 15 dias.	41
Figura 21 - gráfico comparativo das médias e desvio padrão intra e intergrupos para a análise de capacidade angiogênica (nº de vasos sanguíneos) para os tempos experimentais de 7 e 15 dias.	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1	CARACTERÍSTICA DAS MEMBRANAS:.....	18
3.2	DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	19
3.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	19
3.4	EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL.....	22
3.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	22
3.5.1	Análise Histológica E Histomorfométrica	22
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	25
4	RESULTADOS	26
4.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA	26
4.1.1	Histométrica	38
4.1.2	Perfil Inflamatório.....	40
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXOS	51

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, com registros datando de cerca de 4000A.C., biomateriais, materiais naturais ou sintéticos com a finalidade de reparar ou substituir tecidos, órgãos ou funções do organismo, têm sido utilizados pela humanidade a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida dos pacientes¹. Há mais de um século, guiados por estudos clínicos e experimentais, pesquisadores buscam desenvolver materiais com características adequadas para substituição total ou parcial de tecidos biológicos no corpo humano decorrente da existência de patologias e traumatismos diversos a fim de restaurar da melhor forma possível a anatomia ideal e a função da região comprometida. Os avanços mais significativos ocorreram após a II guerra mundial, com o surgimento do termo osseointegração, conceito sugerido por Per-Ingvar Brånemark, médico ortopedista². Desse modo, baseado no conceito de Brånemark, as pesquisas passaram a focar em materiais que diminuíssem o tempo para aposição óssea (osseointegração).

Dentro do escopo da odontologia, diariamente biomateriais são apresentados, e esses, são colocados em contato direto com tecidos vivos, incluindo o osso alveolar.

Os biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos do hospedeiro. Assim sendo, para se utilizar um biomaterial com segurança, o mesmo deve apresentar características básicas como: a biocompatibilidade, alta osteocondutividade, e a bioatividade³.

Além disso, os biomateriais podem ser classificados em autógenos (material orgânico obtido e empregado no mesmo indivíduo – de um local para o outro), homogêneo (obtido de um indivíduo diferente, mas de mesma espécie), heterogêneo (material obtido e empregado em espécies diferentes – e os principais nesses casos são os bovinos, eventualmente porcinos e caprinos), e aloplásticos/sintéticos (podendo ser de natureza metálica,

cerâmica ou plástica). Enxertos heterólogos/xenólogos são aqueles que descendem de osso animal, e apresenta propriedades de osteocondução, sendo bons arcabouços para a neoformação óssea ⁴. As diferenças antigênicas destes materiais são mais manifestadas que em enxertos do tipo alógeno, por isso, esses exigem um tratamento para prevenção de rejeição ⁵.

Quando se trata de reabilitações, a implantodontia é uma opção de tratamento, mas há limitações, como a necessidade de altura e volume ósseo adequados. Então, para corrigir essas deficiências ósseas quando existentes, existem técnicas como a ROG (regeneração óssea guiada) ⁶. A ROG, tem como base o conceito de osteopromoção, que é caracterizada pelo uso de meios físicos (membranas) para selar um local, e assim prevenir que outros tecidos que se desenvolvem em tempos diferentes dispute e invada o espaço que é de interesse que se forme osso, como por exemplo, o tecido conjuntivo, que pode interferir no processo de osteogênese ⁷.

Para a execução da técnica da ROG, são usados substitutos ósseos e membranas, sendo as membranas absorvíveis muito usadas na odontologia pois possuem a propriedade de estimular regeneração óssea em defeitos ósseos presentes na cavidade bucal ⁸. Quando esses são usados corretamente criam um ambiente conveniente para a formação do novo osso. ⁹

Quando se pensa em uma membrana ideal para ROG, ela teria que ter as seguintes características: ser rígida o suficiente para aguentar a compressão dos tecidos sobre/adjacentes (além de forças externas e da mastigação), e ter um grau de plasticidade que a permita ser moldada no formato do defeito ósseo existente (possibilitando que o osso volte a ter a forma que tinha anteriormente)¹⁰, deve ter boa permeabilidade (para passagem de plasma - coágulo com células osteogênicas) porém sem permitir a passagem de células não osteogênicas ⁴.

Existem dois tipos de membranas (básicos): não reabsorvíveis e reabsorvíveis. As não reabsorvíveis trazem a não praticidade de um ato cirúrgico para remoção da mesma, além do risco de contaminação ser mais elevado^{11, 12}. As reabsorvíveis têm recebido atenção pois possuem resultados semelhantes as não reabsorvíveis, mas com a vantagem de não precisar de um segundo tempo cirúrgico para a remoção dessa ¹³.

O material objeto de estudo desta pesquisa é uma membrana colágena de pericárdio bovino Techgraft® (Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo), composta majoritariamente de colágeno tipo I recentemente desenvolvida com o intuito de promover desempenho maior ou semelhante ao de membranas pré existentes oriundas de outras fontes colagenosas como a líder de mercado Bio-Gide® (Geistlich), uma das membranas mais utilizadas e documentadas, derivada de derme suína e não reticulada, na atividade osteopromotora da ROG. ¹⁴

2 OBJETIVO

Esse trabalho tem por objetivo avaliar o potencial de osteopromoção de uma nova membrana de colágeno derivado do pericárdio bovino Techgraft® (Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo) introduzida no mercado no processo de regeneração óssea guiada, em comparação com a membrana de derme suína (Bio-Gide® - Geistlich Wohlhusen, Suíça) em defeitos críticos em calotas de ratos.

Hipótese nula: A membrana teste não apresentaria diferente da membrana controle no efeito de osteopromoção no processo de ROG em defeitos ósseos críticos criados em calota de ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Antes de ocorrer a aquisição dos animais e acomodação dos mesmos, assim como qualquer intervenção, é importante enfatizar que o projeto foi submetido previamente ao comitê de ética em experimentação animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (protocolo nº0402/2022). A aprovação obtida pelo comitê é resultado do cumprimento das diretrizes nacionais para o uso de animais em pesquisas científicas – objetivo de garantir o bem-estar dos animais usados em experimentos, além da utilização responsável e ética desses recursos¹⁵.

72 animais foram recebidos e ambientados no biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da FOA/UNESP (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, com peso aproximado de 300g. Mantidos sob condições específicas, como ciclos de 12 horas de iluminação e 12 horas de escuro (simulando um ritmo diurno-noturno adequado), temperatura entre 22 e 25°C, além de sistema de ventilação e exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora. A umidade relativa do ar em torno de 55%. Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, com um máximo de 5 animais por gaiola (proporcionando espaço suficiente para movimentação). Em relação a alimentação, os animais receberam alimentação balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) e água ad libitum. Todos os cuidados citados acima foram tomados com a intenção de garantir o bem-estar e segurança dos animais envolvidos na pesquisa, a fim dos animais se apresentarem saudáveis e em condições de sofrerem os procedimentos operatórios.

3.1 Característica Das Membranas:

Para o estudo, foram selecionadas 1 marca nacional de membrana de colágeno bovino e 1 marca importada de colágeno porcino, consideradas de grande utilização na prática de cirurgias maxilofaciais.

- (GT1) Techgraft® (Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo) é uma membrana biológica acelular de pericárdio bovino,

composta principalmente de colágeno tipo I de alta resistência (espessura de 150 à 250 micra) e com tempo de reabsorção compatível com o reparo ósseo de 4 a 6 meses.

- (GC⁺) Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) é uma membrana colágena natural proveniente da derme suína, líder para regeneração de tecido oral, de fácil adaptação, biocompatível e elevada hidrofília. É uma membrana bicamada; uma camada compacta e lisa é coberta por um filme particularmente denso, projetado para evitar a invasão de tecidos moles em um defeito ósseo protegido pela membrana, atuando também como guia para a formação adequada de osso, tecido mole e o desenvolvimento de vasos sanguíneos.

3.2 Distribuição Dos Grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos dentro de cada material, de maneira randomizada, pelo método do sorteio manual, referente aos períodos de eutanásia de 07,15, 30 e 60 dias. Cada grupo contendo 06 animais ($n = 6$), levando a um total de 72 ($N=72$), sendo 24 animais por grupo. Em cada calota foi confeccionado um defeito ósseo, tido como crítico, de 08 mm de diâmetro interno com uma broca trefina (Sistema Neodent, Brasil), todos preenchidos apenas com coágulo sanguíneo, e revestidos conforme os grupos: Grupo teste 1 (GT1) que recebeu a membrana Techgraft® ($n=24$); Grupo controle positivo (GT+) que recebeu a membrana Biogide® ($n=24$) e Grupo controle negativo (GC-) preenchido apenas com coágulo – não recebendo nenhum tipo de biomaterial ($n=24$).

3.3 Procedimento Cirúrgico

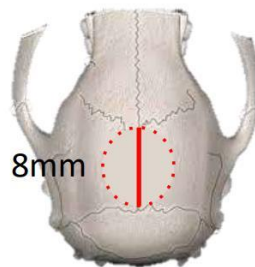
Os animais foram submetidos a um período de jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da combinação da administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Rompum – Bayer AS

– Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 70mg/Kg e 5mg/Kg, respectivamente. Todo o procedimento cirúrgico foi conduzido seguindo com rigor um protocolo asséptico, incluindo a esterilização de todo instrumental utilizado (garantindo a não contaminação), delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis por parte da equipe envolvida. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Em seguida, realizou-se a tricotomia (remoção de pelos da área circunscrita à incisão operatória) 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. Posteriormente, foi realizada infiltração anestésica local utilizando-se 0,3ml/kg de cloridrato de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre – Nova DFL, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro), com o objetivo de proporcionar analgesia e hemostasia do campo operatório, reduzindo possível desconforto e fazendo o controle de sangramento. Então serão acomodados em posição dorsal, e receberão duas incisões longitudinais em forma de V com lâmina nº 15 montada em cabo de bisturi nº3, seguida de descolamento total do retalho com descolador tipo Molt para a confecção dos defeitos cirúrgicos críticos.¹⁶

Os defeitos ósseos foram realizados com o auxílio de uma trefina de 8 mm de diâmetro externo (Sistema Neodent, Curitiba - Brasil) sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9% e 800 RPM em motor elétrico, conforme recomendação do fabricante. A confecção dos defeitos constituirá na perfuração total do osso parietal mantendo a integridade da dura-máter (Figura 1).

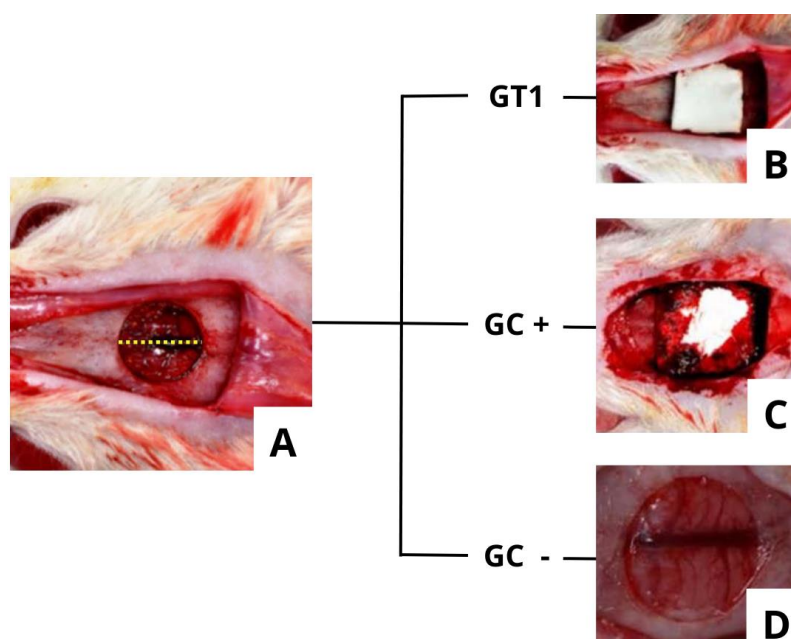
Figura 1 – Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representada pela linha tracejada vermelha.



Fonte: elaborada pelo próprio autor (2023)

De acordo com o tratamento proposto, os defeitos foram preenchidos apenas com o coágulo sanguíneo e recobertos com a respectiva membrana do grupo (Figura 2). Ao fim do procedimento, os tecidos moles foram reposicionados e suturados com 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 ¹⁷

Figura 2 – (A) defeito crítico de 8mm tido como padrão para todos os grupos. Preenchidos com coágulo sanguíneo e recobertos com a membrana referente a cada grupo: (B) GT1: Techgraft®. (C) GC+: BioGide® e (D) GC-: apenas coágulo.

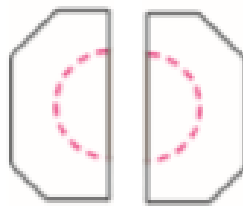


Fonte: elaborado pelo autor (2023)

3.4 Eutanásia E Coleta De Material

A eutanásia dos animais ocorreu por meio de sobredosagem de anestesia geral com a administração intramuscular de cloridrato de ketamina (50 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (5 mg/Kg), nos dias pré-estabelecidos anteriormente (7, 15, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico). As amostras coletadas serão processadas inicialmente com a remoção das calvárias dos ratos, fixadas em solução de paraformaldeído a 4% durante 48 horas. Posteriormente, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 10% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois em diferentes concentrações (70%-100%) e diafanizadas em xilol. Em seguida, as calvárias serão cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando o defeito ósseo (figura 3). As peças obtidas serão incluídas em parafina, receberão cortes semi-seriados de 6µm de espessura. De cada peça serão obtidas 6 lâminas, das quais, 03 lâminas serão destinadas a coloração em hematoxilina e eosina (H/E) e com elas serão realizadas as análises histológicas e histométricas e perfil inflamatório ^{17, 18}.

Figura 3 – Corte longitudinal obedecendo a margem de segurança ao redor de todo o defeito, separando o defeito ósseo em duas partes (sendo essas iguais) para inclusão em parafina.



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

3.5 Análise Dos Resultados

3.5.1 Análise Histológica E Histomorfométrica

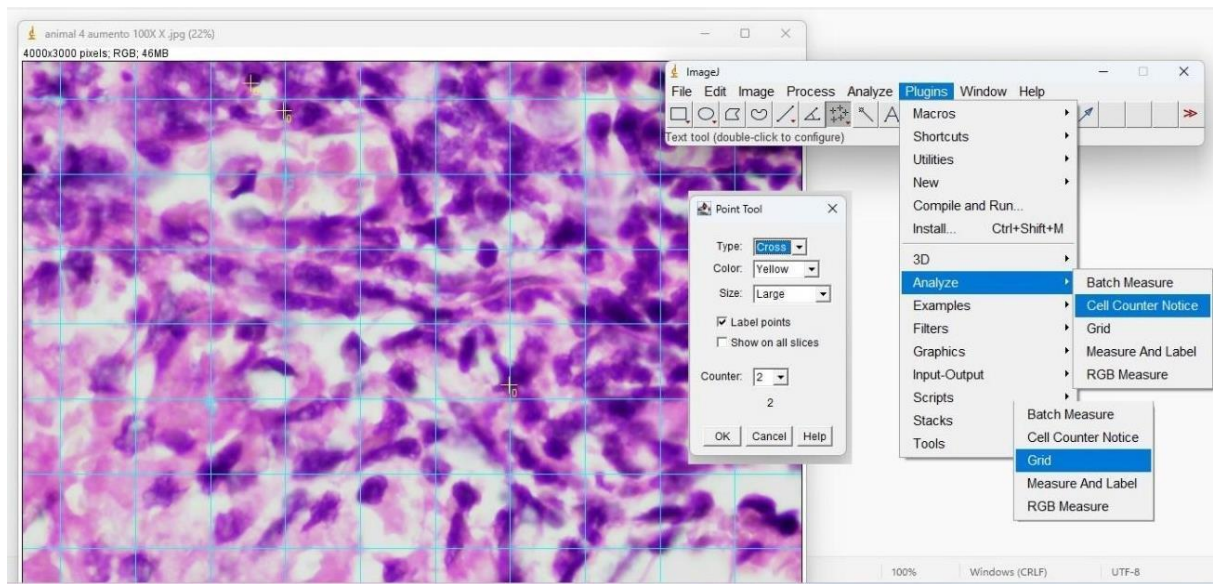
Após as lâminas serem obtidas, essas foram avaliadas quanto a capacidade de neoformação óssea, presença de infiltrado inflamatório e

formação de tecido conjuntivo. Usando a coloração HE (Merck & Co., Inc.), as medições foram realizadas com 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 captadas foram salvas em arquivos no formato JPEG para posterior análise. Para análise histológica (qualitativa e descritiva) foram realizadas fotomicrografias nos aumentos 4x, 10x e 100x, sendo a reconstrução panorâmica realizada no aumento de 4x (para representação da localização da área analisada) e os outros aumentos (10x e 100x) para confirmar os achados histológicos.

O perfil inflamatório das membranas foi feito a partir da quantificação de linfócitos (células inflamatórias) e vasos sanguíneos. Fotomicrografias no aumento de 100x foram usadas para realização da análise e 3 imagens eram realizadas por secção histológica: a primeira, ao centro do defeito; a segunda, à direita; e a terceira, à esquerda. No software Image J, em cada imagem foi aplicado uma grade com 130 pontos, 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 (Figura 4).

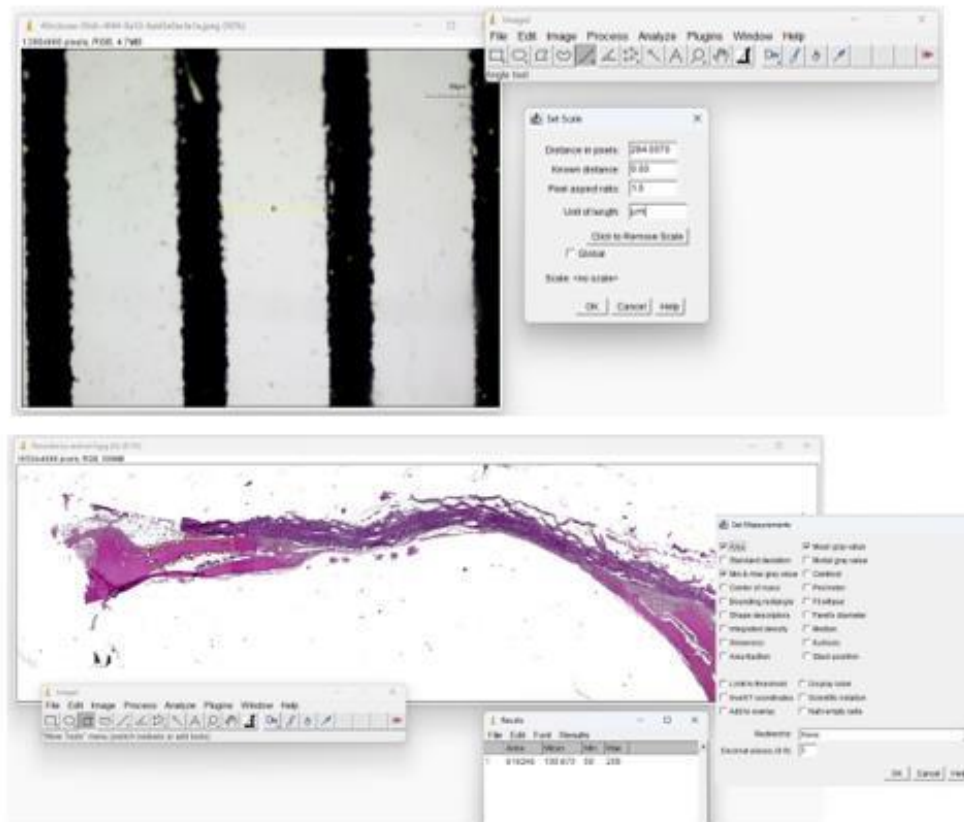
Figura 4 - Software ImageJ utilizado para contagem de células e vasos sanguíneos. Grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica em um aumento da objetiva de 100x.



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Já para a contagem da quantidade de osso neoformado, uma reconstrução panorâmica das secções histológicas foi feita, em um aumento de 4x. Com o software ImageJ, a ferramenta régua foi utilizada para a calibragem de acordo com a mensuração escolhida para a histometria. Após a calibragem da régua, a ferramenta polígono é utilizada e habilitada para contagem da área após a imagem ser aberta no software. 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 5).

Figura 5 - Software ImageJ utilizado para calibragem da ferramenta régua na magnificação de escolha para ser realizada a histometria e a seguir a contagem da área óssea através da ferramenta polígono.



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

3.6 Análise Estatística dos Resultados

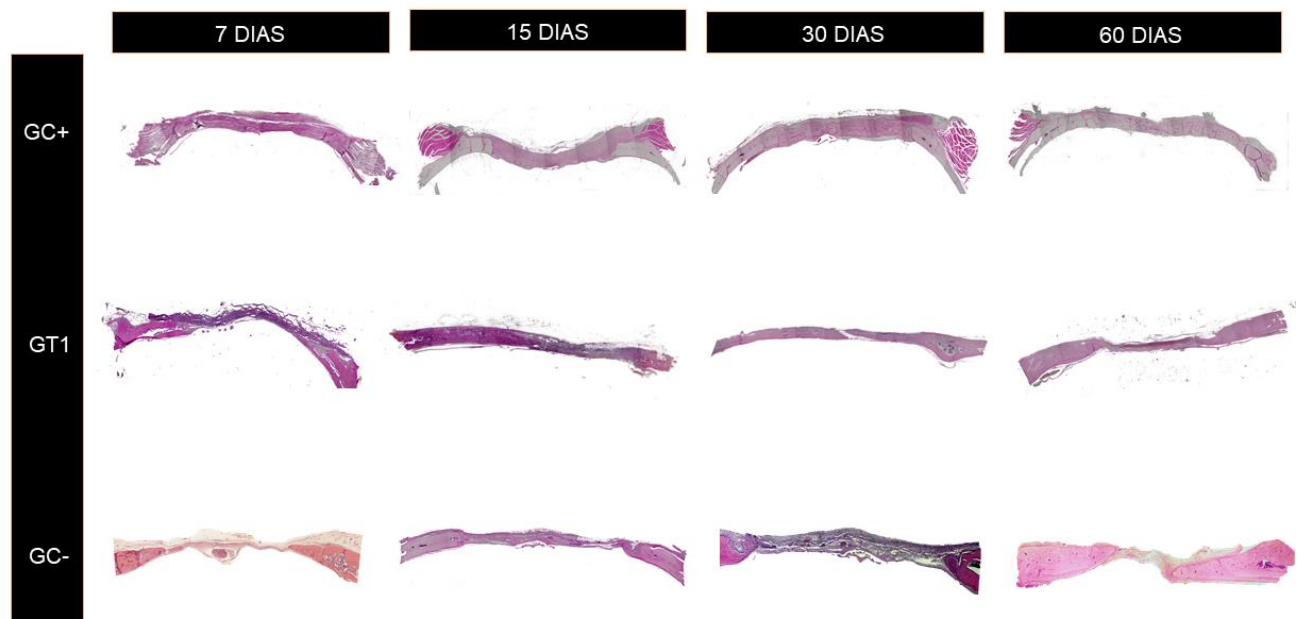
Os dados coletados a partir da análise histométrica foram tabulados e posteriormente testados no software SigmaPlot 12.0 (Exact Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, EUA), com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

Para a realização de uma descrição histológica com detalhes, utilizou-se reconstruções panorâmicas obtidas a partir de fotomicrografias tiradas em aumento de 4x (imagens que proporcionam uma visão ampla e geral das estruturas histológicas presentes na amostra em estudo). Mas, para garantir a precisão e identificação precisa das estruturas (visto que a baixa ampliação das imagens em 4x podem limitar a resolução necessária para identificar estruturas microscópicas específicas), foram realizadas confirmações adicionais em maiores aumentos.

Figura 6 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos GC+, GT1 e GC- em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 4x.



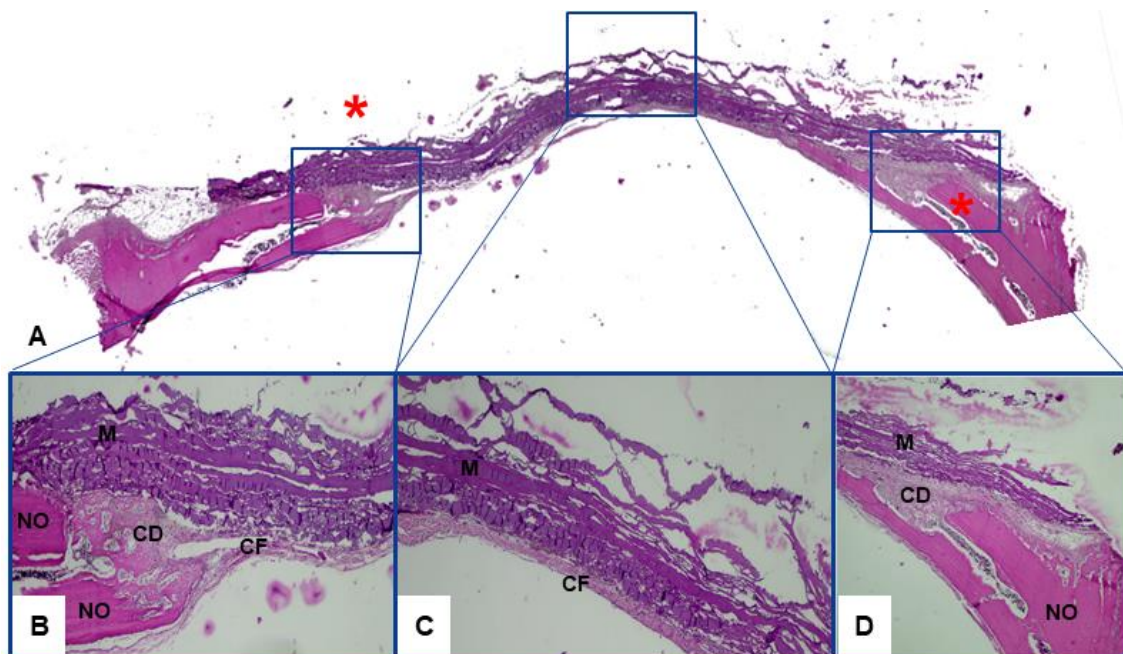
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

GT1 (Techgraft®)

7 dias: na reconstrução panorâmica no aumento de 4x, é possível observar a presença da membrana íntegra e colabada, além de devidamente adaptada sobre os cotos. Logo abaixo da membrana, há um tecido conjuntivo frouxo, pouco organizado. A área central do tecido conjuntivo

demonstrou uma menor organização quando comparada com as áreas adjacentes. Outra observação importante é a presença de neoformação óssea na área dos cotos (que afila-se em direção ao centro, demonstrando uma diminuição progressiva da quantidade de osso neoformado). Além das características já citadas, também se nota um infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos, monócitos), na região estudada. Vasos sanguíneos também são observados, e indicam um sistema vascular ativo na área em análise. (figura 7)

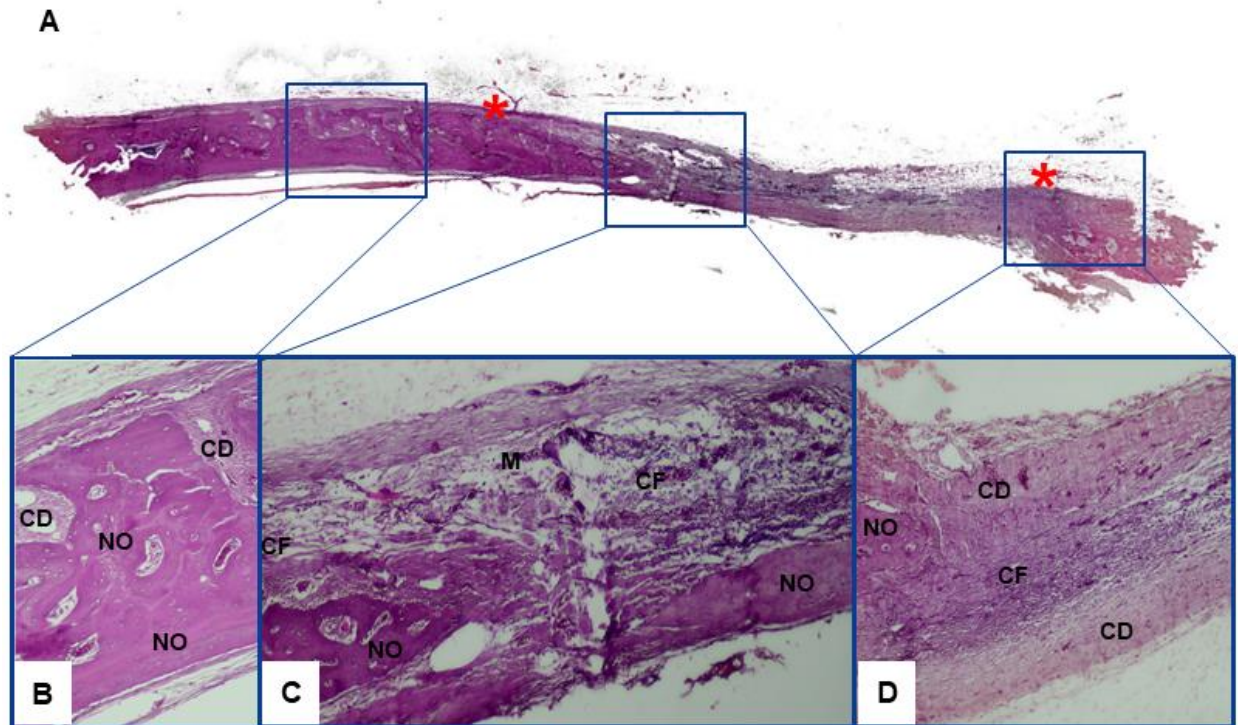
Figura 7 - Fotomicrografias do grupo GT1 aos 7 dias de reparo ósseo, em aumentos de 4x e 10x. A e C: a área de defeito ósseo (entre *) revela a presença da membrana (M) de pericárdio bovino colabada e logo abaixo o tecido conjuntivo frouxo (CF). B e D: começo de neoformação óssea (NO) nos cotos, e diferentes graus de maturação do tecido conjuntivo (denso - CD, e fibroso - CF).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

15 dias: identificada a presença da membrana que ainda se encontra íntegra, envolta por tecido conjuntivo, frouxo (CF) no centro e denso (CD) nas margens (o que indica que há uma diferenciação clara entre o centro e a periferia). Nos cotos é possível observar ilhas de maturação de tecido, demonstrando transição organizada do tecido de granulação para tecido ósseo, indicando que está ocorrendo uma reparação óssea (figura 8).

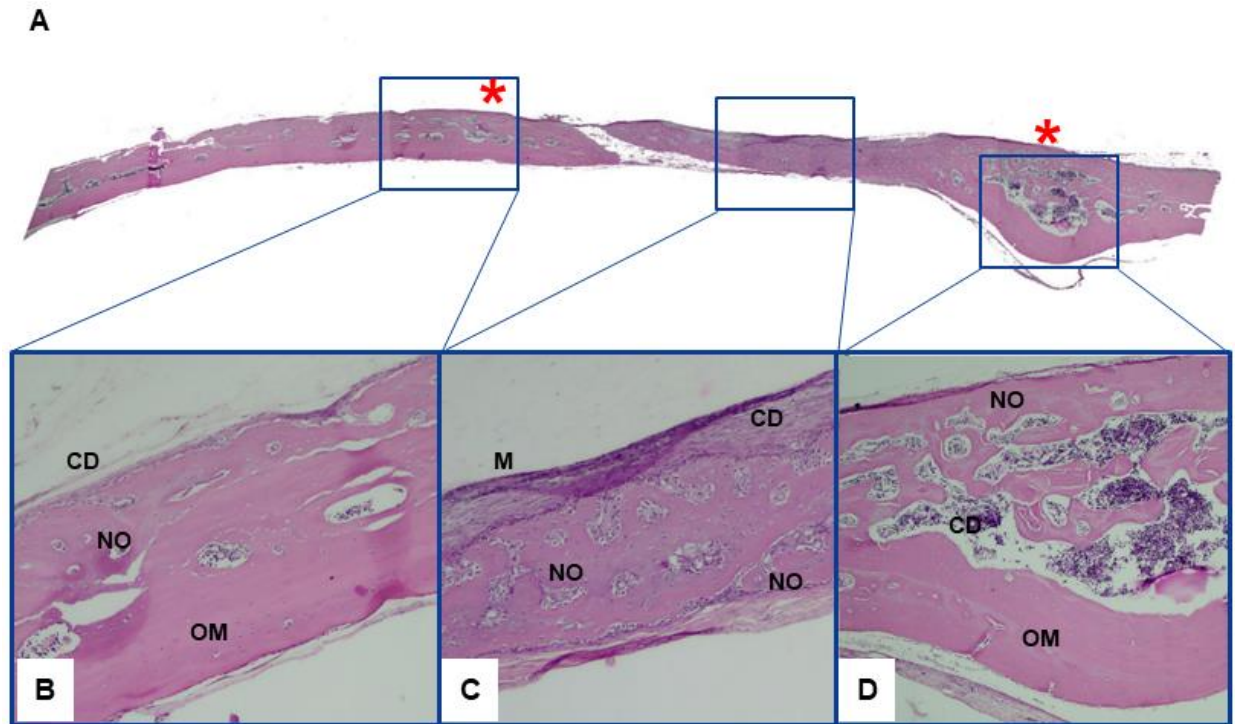
Figura 8 - Fotomicrografias do grupo GT1 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4x e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e membrana (M) colabada. B e D: margens com início de neoformação óssea (NO) e mineralização do tecido. C: Margens com início de neoformação óssea.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

30 dias: A membrana não se encontra mais íntegra, é possível observar apenas fragmentos remanescentes (envoltos por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo denso – o que sugere o papel importante da membrana na regeneração, fornecendo suporte estrutural e/ou estímulos). Nota-se a presença de uma neoformação óssea no centro, o que indica um processo ativo de regeneração, o que permite o fechamento do defeito ósseo, apresentando um tecido ósseo mais trabecular (figura 9).

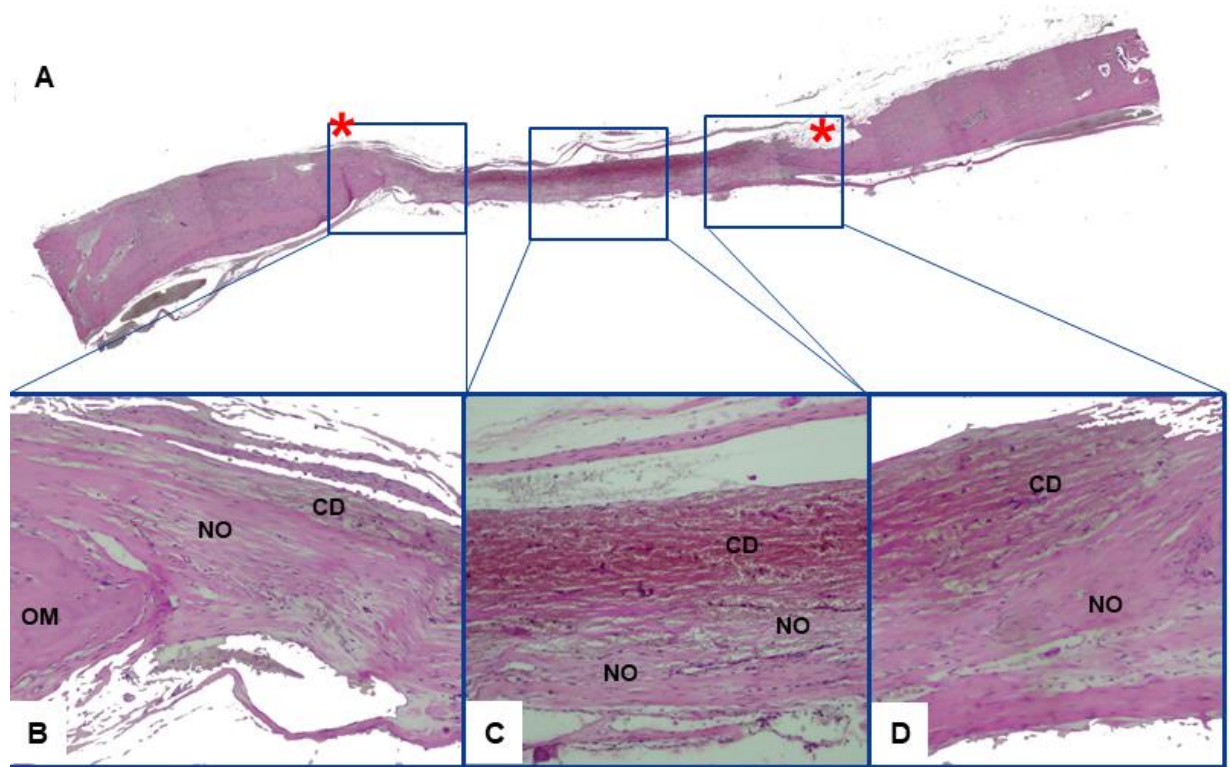
Figura 9 - Fotomicrografias do grupo GT1 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4x e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e remanescente da membrana. B e D: Margens com osso maduro (OM), ilhas de neoformação e trabéculas preenchidas por medula. C: ao centro presença de tecido conjuntivo denso e fechamento do defeito.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

60 dias: a maioria dos espécimes apresentou neoformação óssea completa ao longo do defeito (resultando em seu fechamento, indicando eficaz processo de regeneração), com áreas onde se encontrava tecido conjuntivo denso em meio ao tecido ósseo neoformado e acima, a presença do periósteo (que desempenha papel de importância na formação óssea com o fornecimento de células progenitoras). No entanto, a ausência de remanescentes da membrana e maior quantidade de tecido conjuntivo resultaram em uma formação óssea menor em comparação ao grupo GC+ (figura 10).

Figura 10 - Fotomicrografias do grupo GT1 aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea por todo defeito (NO). B e D tecido ósseo maduro (OM) às margens do defeito apresentando ainda de tecido conjuntivo denso (CD). C: ao centro neoformação óssea entremeado por tecido conjuntivo denso, presença de periósteo (seta).

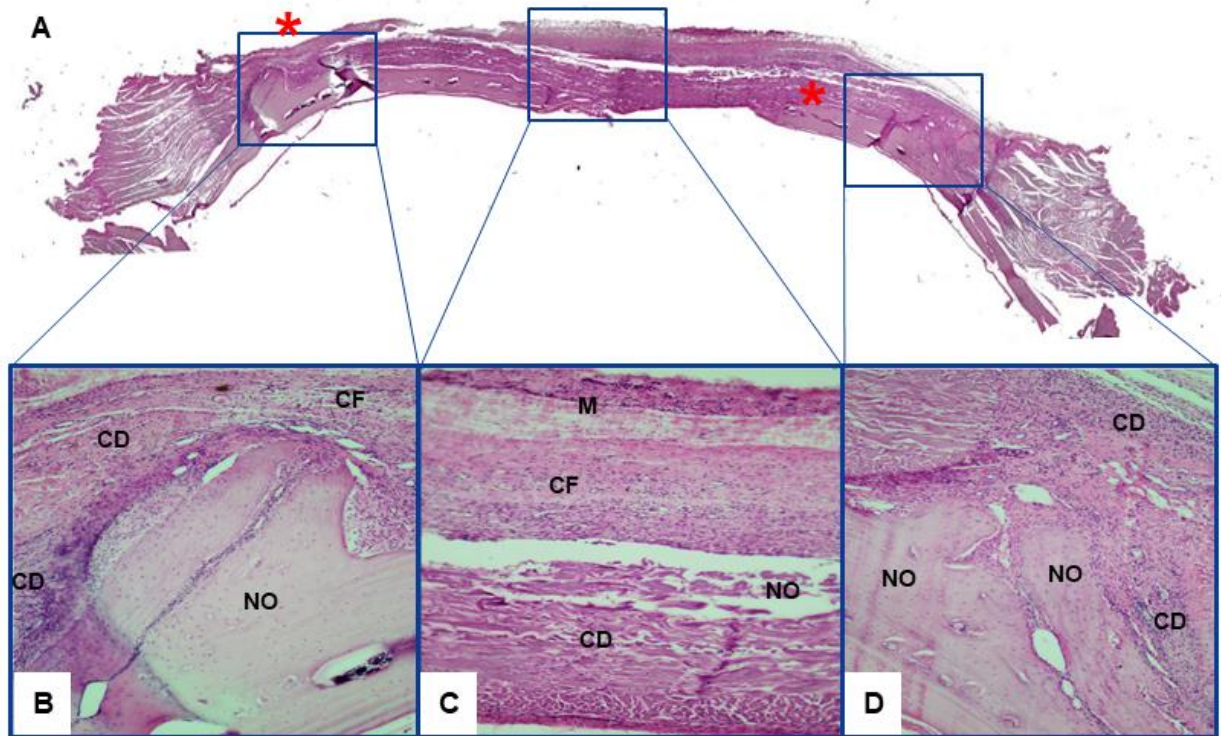


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

GC+ (Bio-Gide® - controle positivo)

7 dias: na reconstrução panorâmica realizada no aumento de 4x, foi observada a membrana íntegra em toda a extensão do defeito, proporcionando suporte e direcionamento para o processo de regeneração, junto com um tecido de granulação organizado (indicando um processo de cicatrização em andamento). Além disso, há um leve infiltrado inflamatório. O tecido conjuntivo justaposto ao coto apresentou início de neoformação óssea, indicando a progressão do processo de reparo (figura 11).

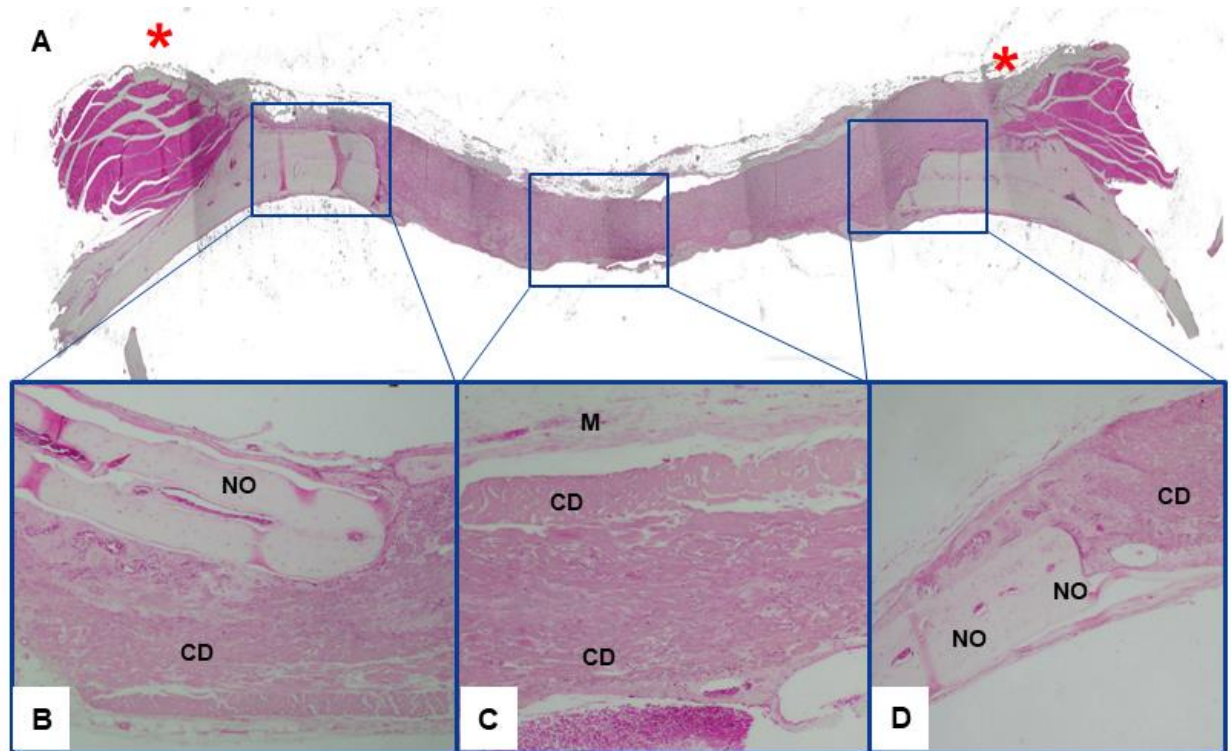
Figura 11 - Fotomicrografias do grupo GC+ aos 7 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4x e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana (M) de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo. B e D: início de formação óssea às margens do defeito (NO), tecido conjuntivo denso (CD), que serve como espécie de arcabouço para o desenvolvimento do osso neoformado. C: diferença nos tecidos abaixo da membrana (M), tecido conjuntivo frouxo e neoformação óssea (NO) entremeada por um conjuntivo denso (CD), que sugere a interação entre esses diferentes tipos de tecidos durante o processo de reparo ósseo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

15 dias: na imagem de aumento 4x, é possível observar a membrana íntegra recobrindo toda a área do defeito ósseo, e adaptada sobre os cotos. Além disso, é possível reconhecer o tecido conjuntivo ao centro do defeito - maduro, com poucos sinais de infiltrado inflamatório, e bem vascularizado, apontando que há um processo de reparo em curso. Outro aspecto de relevância é a presença de áreas de tecido osso neoformado a partir dos cotos (figura 12).

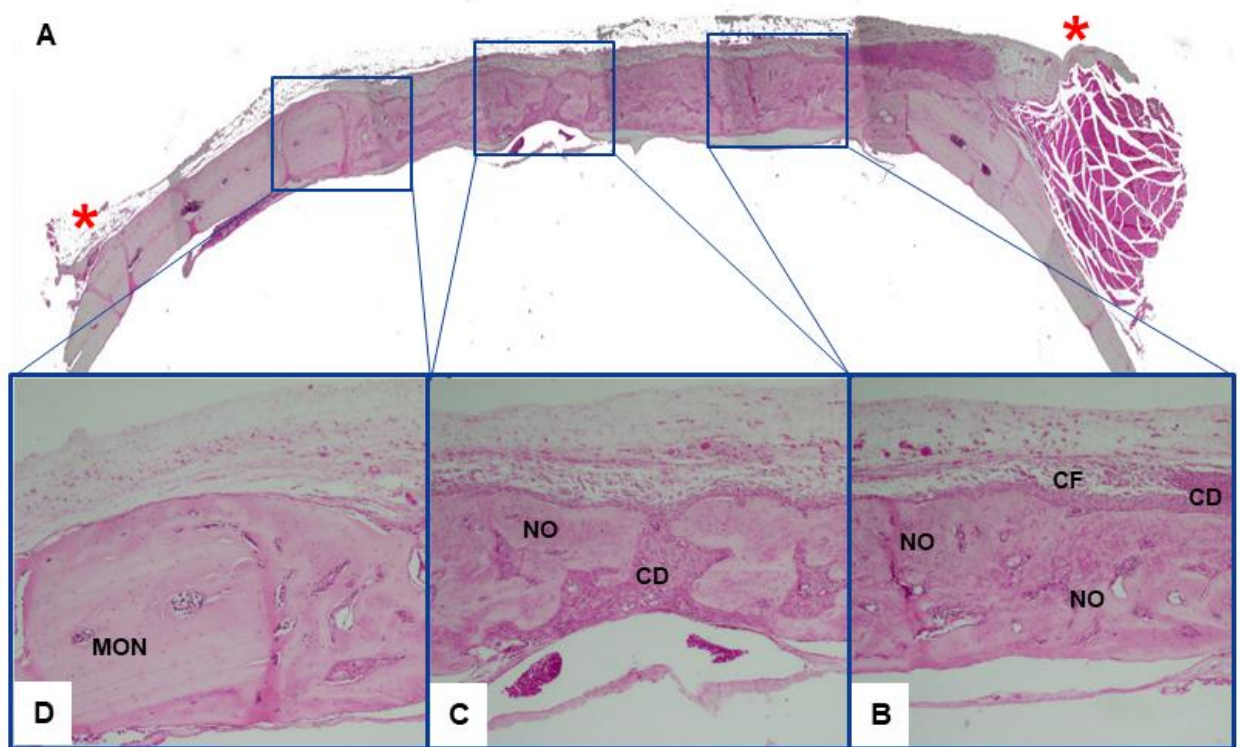
Figura 12 - Fotomicrografias do grupo GC+ aos 15 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana de colágeno suíno em toda a extensão do defeito ósseo (M) e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CF). B e D: Maturação do tecido ósseo as margens do defeito (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

30 dias: a reconstrução da imagem em 4x revela uma quantidade considerável de tecido ósseo neoformado, além da presença de periósteo (indicado pela seta). No centro do defeito é possível notar a presença de remanescentes da membrana, posicionados entre o tecido neoformado e tecido conjuntivo. A formação de tecido ósseo neoformado a partir dos cotos foi um achado comum nos espécimes analisados, confirmando que o reparo está ocorrendo no sentido central - processo de inicia a partir das extremidades dos cotos e avança em direção ao centro do defeito (figura 13).

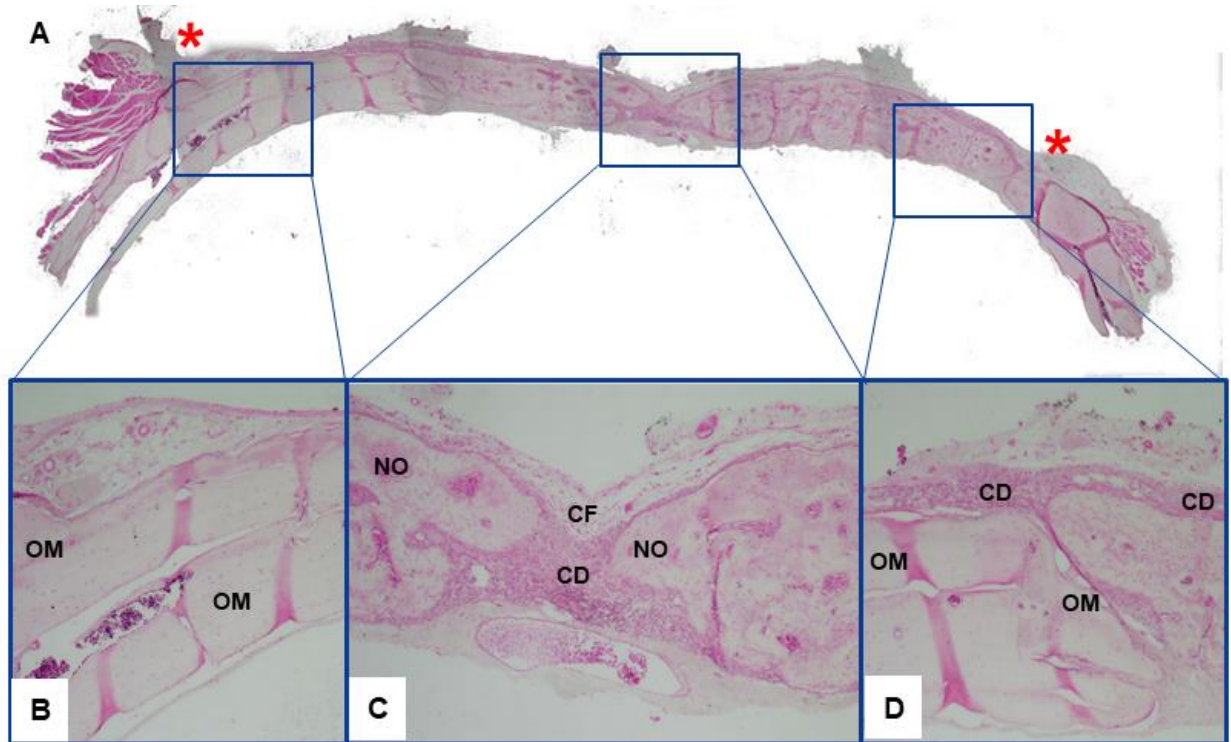
Figura 13 - Fotomicrografias do grupo GC+ aos 30 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro e restos da membrana (M). B e D: Maturação do tecido ósseo às margens do defeito (MON), diminuição das trabéculas e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD). C: presença de remanescentes da membrana (M) envolta por tecido conjuntivo fibroso organizado (CF) e osso neoformado (NO). Acima, presença de periósteo (seta).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

60 dias: membrana com suas características semelhantes ao grupo de 30 dias (indicando estabilidade ao longo do período de análise). O tecido ósseo encontrado entre as camadas da membrana demonstra uma organização e mineralização maior em comparação ao estágio anterior (30 dias) – essa organização mais avançada é observada pela redução das lacunas antes presentes. A diminuição dessas trabéculas e lacunas tornam o osso mais compacto e resistente (figura 14).

Figura 14 - Fotomicrografias do grupo GC+ aos 60 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: Osso maduro (OM) as margens do defeito apresentado ilhas de neoformação (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD). C: defeito fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro, com restos da membrana (M) de colágeno porcino ao centro e abaixo um tecido de granulação bem organizado.

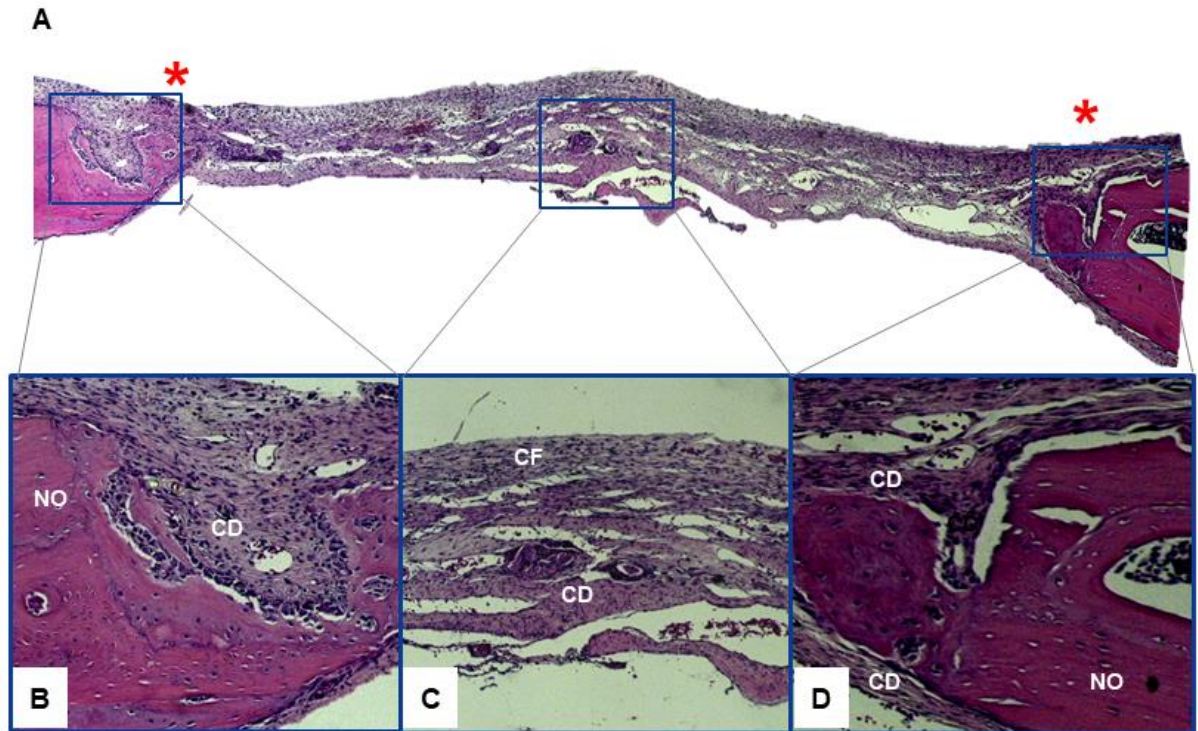


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

GC- (coágulo - controle negativo)

7 dias: em análise panorâmica é possível visualizar o defeito ósseo preenchido por tecido de granulação ao centro, quando na borda, ocorre uma neoformação óssea, especialmente notável nos cotos da ferida cirúrgica, indicando processo de regeneração em andamento. A neoformação óssea é ausente no centro da ferida (figura 15).

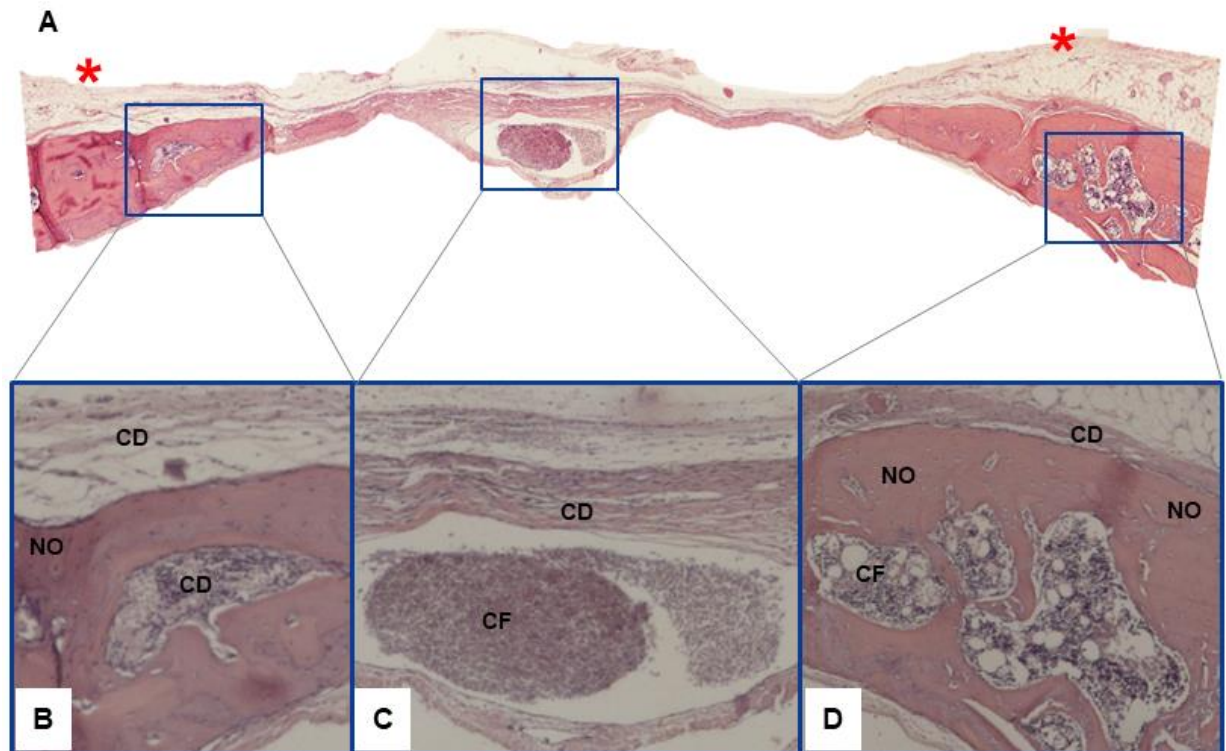
Figura 15 - Fotomicrografia panorâmica do grupo GC- aos 7 dias de reparo ósseo nos aumentos de 4x e 10x. – A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: início de neoformação óssea próximo aos cotos (NO). C: efeito preenchido por tecido conjuntivo (CD/CF).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

15 dias: tecido conjuntivo frouxo preenche o defeito ósseo, tecido de granulação rico em células e matriz extracelular. Em um aumento maior, das bordas do defeito em direção ao centro da ferida é notável a presença de neoformação óssea. Esse tecido neoformado apresenta características de tecido ósseo primário, e está distribuído aleatoriamente. Os achados citados sugerem que a regeneração óssea está acontecendo de forma mais efetiva a partir dos cotos, e a região central apresenta um processo de reparo menos avançado (figura 16).

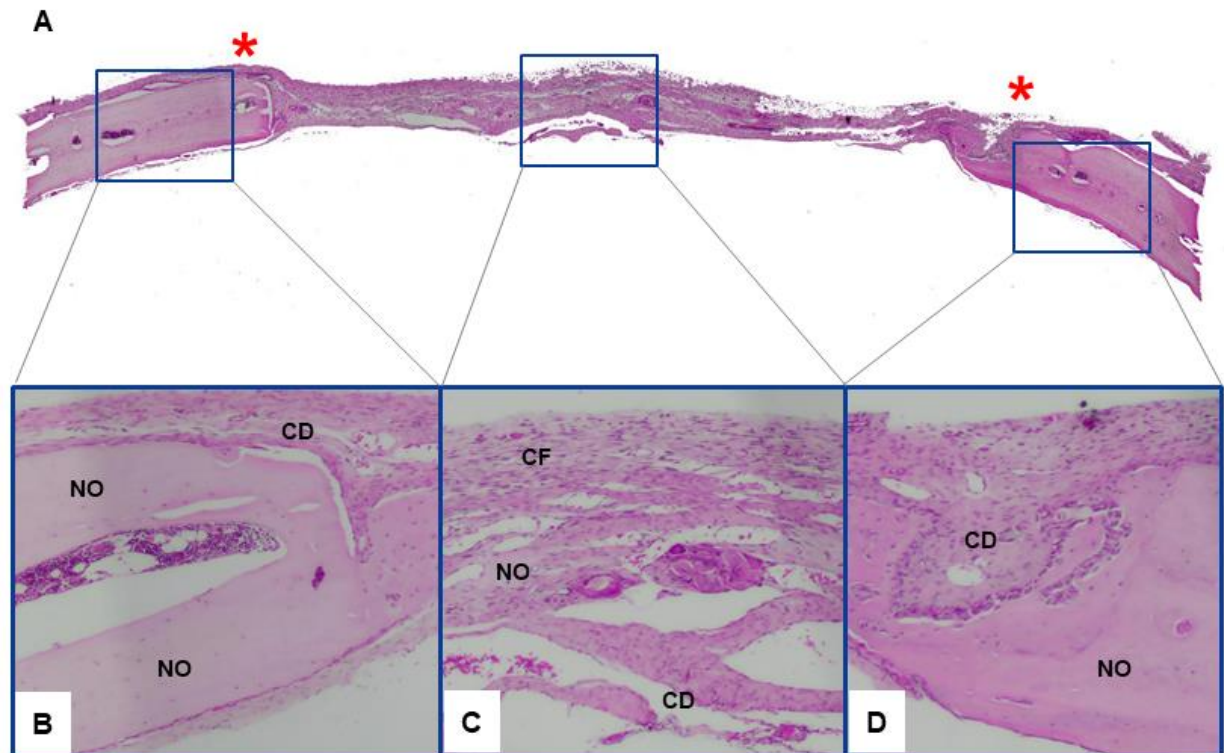
Figura 16 - Fotomicrografia panorâmica do grupo GC- aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: Cotos apresentando neoformação óssea (NO) e presença de tecido conjuntivo denso (CD). C: Defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo e denso.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

30 dias: nesse período foi notada uma maior neoformação óssea próximo aos cotos, apresentando regeneração óssea mais avançada. Mas, o espaço entre os cotos se manteve preenchido por tecido conjuntivo denso, com pequenas ilhas de neoformação óssea, sem o fechamento do defeito (figura 17).

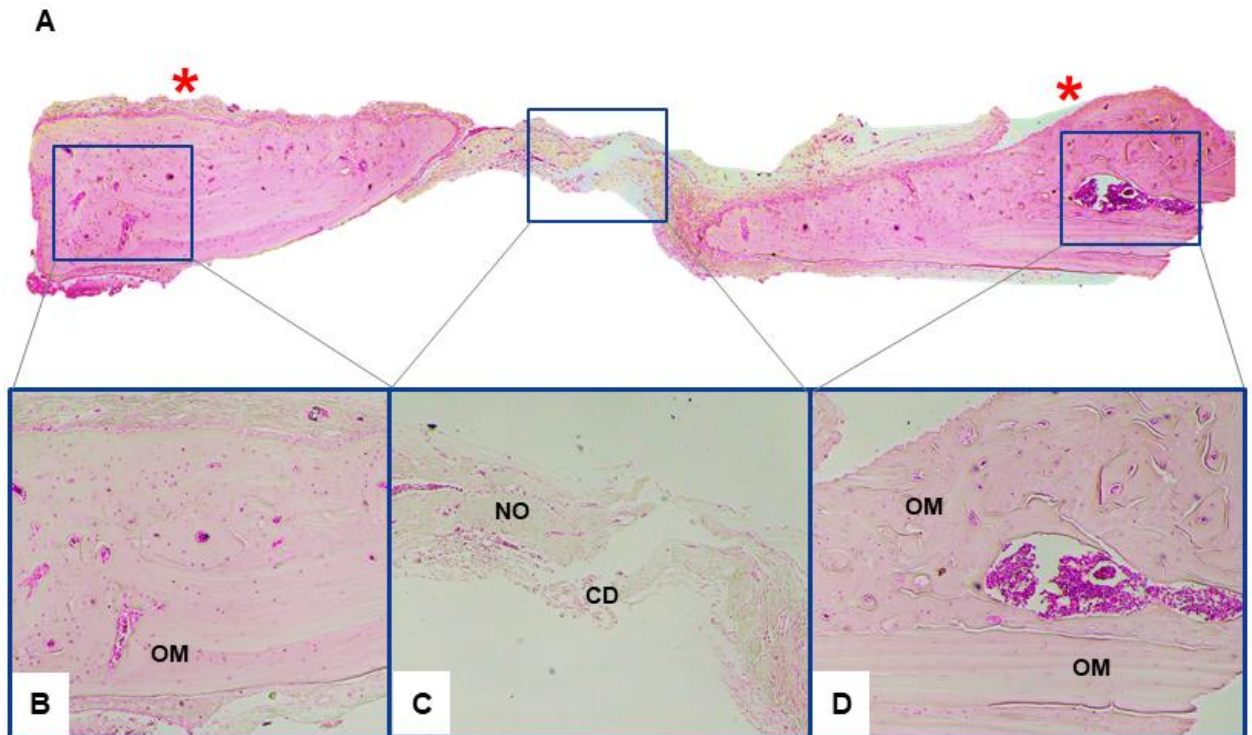
Figura 17 - Fotomicrografia panorâmica do grupo GC- aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4x e 10x. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: Cotos apresentando neoformação óssea. C: defeito preenchido por tecido conjuntivo com presença de ilhas de neoformação óssea (NO).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

60 dias: é notável a aproximação dos cotos do defeito, no entanto, o fechamento completo do defeito ósseo ainda não ocorreu, e o espaço entre os cotos continua preenchido por tecido conjuntivo. Os resultados desse período são consistentes com os do período anterior. Esses achados sugerem que ao longo do período de observação não houve muitos avanços em relação a neoformação óssea e a mineralização do tecido conjuntivo (figura 18).

Figura 18 - Fotomicrografia panorâmica do grupo GC- aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x. A: Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). B e D: cotos apresentando neoformação óssea. C: tecido ósseo neoformado (NO) e conjuntivo denso (CD).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.1.1 Histométrica

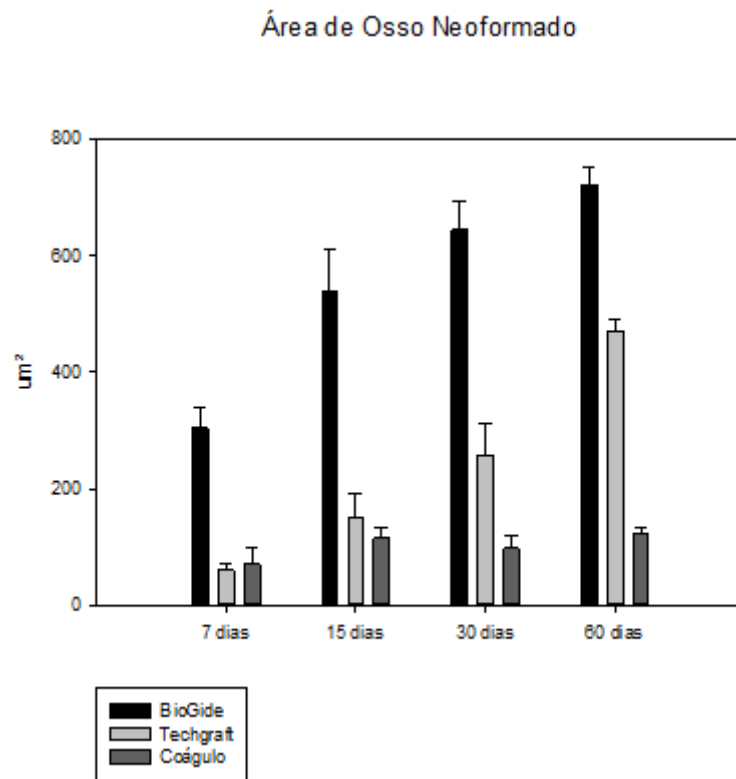
Na análise intragrupos do tecido ósseo neoformado, o grupo GC+ apresentou diferença estatística apenas entre os tempos de 60, 30 e 15 dias em comparação com o tempo de 7 dias ($p < 0,05$) apesar de demonstrar um crescente aumento da quantidade de osso neoformado. O grupo GT1 apenas evidenciou diferença estatística no tempo de 60 dias ($p < 0,05$) e o grupo GC- teve o resultado esperado e não apresentou diferença estatística entre nenhum tempo analisado ($p > 0,05$). Na análise intergrupos, o grupo GC+ apresentou diferença estatística em todos os tempos para todos os grupos ($p < 0,05$). O grupo GT1 foi diferente estatisticamente para o grupo GC+ ($p = 0,006$) demonstrando menor quantidade de osso neoformado e sendo superior ao grupo COAG ($p < 0,001$).

Aos 7 dias de reparo ósseo, o grupo GC+ apresentou maior neoformação óssea em relação aos demais grupos. Em 15 dias, o grupo GC+ ainda apresenta uma maior quantidade de osso neoformado em relação aos demais grupos, o grupo GT1 demonstra diferença estatística para o grupo GC-.

No período de 30 dias, em um momento mais tardio de reparo ósseo, o grupo GC- permaneceu apresentando desempenho esperado, o GC+ teve o aumento mais expressivo na quantidade de osso neoformado apresentando diferença estatísticas para os grupos GT1 e GC-. O GT1, apesar de apresentar crescente formação óssea, ainda apresenta diferença estatística para GC-.

No último tempo experimental analisado, aos 60 dias, o GC+ melhor desempenhou o potencial de osteopromoção, apresentando diferença estatística para o grupo GC- e GT1 que também apresentou diferença estatística em relação ao GC-. Neste último período podemos analisar que o GT1 também teve um aumento significativo na área de osso neoformado.

Figura 19 - gráfico comparativo das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (gc+, gt1 e gc-), maiusculo para os tempos experimentais de todos os tempos (7, 15, 30 e 60 dias).

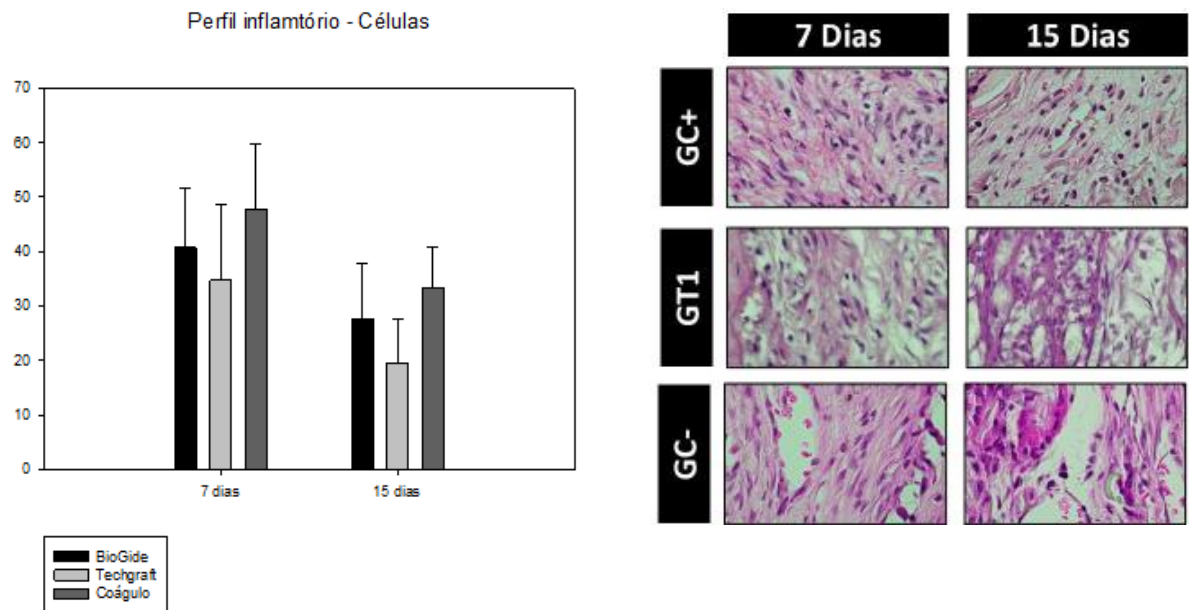


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.1.2 Perfil Inflamatório

Na análise do perfil inflamatório todos os grupos tiveram uma diminuição da quantidade de células inflamatórias do período de 7 para 15 dias não apresentando diferença estatística para nenhuma das relações intra e intergrupos.

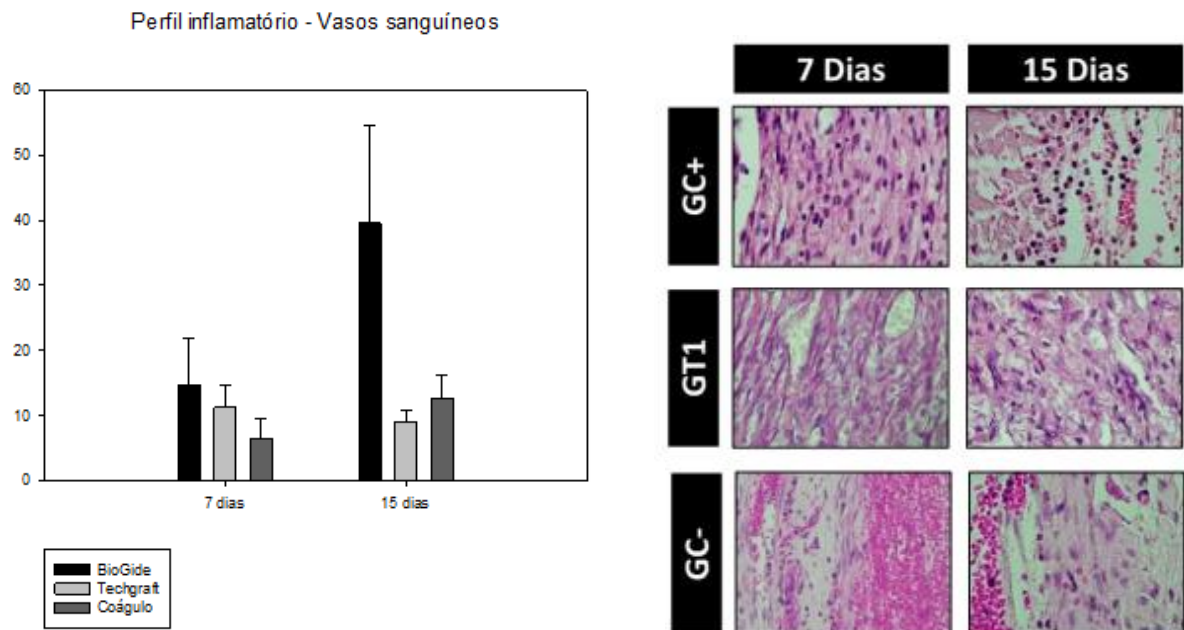
Figura 20 - gráfico comparativo das médias e desvio padrão intra e intergrupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos), para os tempos experimentais de 7 e 15 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Ao avaliarmos a quantidade de vasos sanguíneos, foi observado uma capacidade de neovascularização do grupo GC+ sendo diferente estatisticamente de 7 para 15 dias ($p < 0,001$) e também para os grupos GT1 e GC- aos 15 dias ($p < 0,001$) que não apresentaram diferença estatística entre si ($p = 0,473$).

Figura 21 - gráfico comparativo das médias e desvio padrão intra e intergrupos para a análise de capacidade angiogênica (nº de vasos sanguíneos) para os tempos experimentais de 7 e 15 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5 DISCUSSÃO

O uso do colágeno na produção de membranas tem ganhado destaque como uma escolha preferencial na área de engenharia de tecidos, devido às suas características, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade e afinidade celular ¹⁹. Mas, cabe mencionar algumas dificuldades associadas à produção dessas membranas, que podem suceder em propriedades mecânicas inferior (limitando sua efetividade como suporte para regeneração tecidual), rápida degradação (a membrana pode se decompor mais rápido que o esperado, comprometendo assim a integridade estrutural – afetando de forma negativa o processo de cicatrização), reações inflamatórias exacerbadas (variável de indivíduo para indivíduo, mas que de forma geral afeta a cicatrização) e uma limitada capacidade de neoformação óssea (embora haja afinidade entre o colágeno e as células ósseas, pode ocorrer dificuldade na estimulação de crescimento e diferenciação celular necessários para regeneração adequada) ²⁰. Portanto, essas características foram analisadas nas membranas no presente estudo ^{14, 21-22}.

O objetivo era avaliar o potencial regenerativo de uma membrana nacional feita a partir do pericárdio bovino, comparando-a com uma membrana de colágeno da derme porcina, amplamente reconhecida no mercado nacional e internacional. Para validar os resultados, foi incluído o grupo nomeado de controle negativo, onde esse foi projeto para certificarmos que a completa reparação de um defeito crítico de 8mm não ocorreria sem que houvesse a presença de uma membrana. E, de fato nossos resultados comprovaram essa hipótese. A decisão de não utilizar biomateriais adicionais possibilitou a avaliação verdadeira do potencial regenerativo das membranas ^{18, 23-24}.

A membrana de colágeno porcino utilizada como grupo controle positivo foi a Bio-Gide[®], cujo desempenho foi consistente com os resultados encontrados em outras publicações ^{18, 22, 25-27}, provando nossas descobertas e fortalecendo a confiabilidade do nosso estudo. A membrana de pericárdio

bovino testada nesse estudo foi a Techgraft®, que é produzida através da reticulação do colágeno tipo I, modificadas por hidrólise dos grupos carboxiamidas, utilizando uma solução de dimetilsulfóxido equilibrada por uma solução tampão fosfato. Posteriormente, são liofilizadas (desidratadas) e estilizadas²⁸ – esse processo de fabricação tem como objetivo remover elementos celulares do pericárdio, resultando em uma matriz composta apenas por colágeno tipo I e fibras elásticas, visando melhorar as propriedades mecânica da membrana^{29, 30}.

Nesse contexto, é importante destacar que a análise da reação inflamatória está associada à biocompatibilidade da membrana e à sua estabilidade no processo de ROG. Além do que, o tratamento realizado no colágeno em sua fabricação também desempenha papel importante nesse aspecto – diferentes tipos de tratamento podem resultar em respostas inflamatórias variadas^{28, 31}. No entanto, é importante ressaltar que nenhuma das membranas testadas apresentou infiltrado inflamatório intensamente pronunciado, o que seria fora dos parâmetros esperados, além de não haver sinais de necrose tecidual. Sendo esses resultados encorajadores e indicativos de que as membranas avaliadas no estudo apresentam resposta inflamatória controlada, dentro dos limites aceitáveis, o que é crucial para a eficácia do processo de ROG, uma vez que inflamação excessiva pode comprometer a regeneração tecidual e prejudicar resultados clínicos.

Ao analisarmos os parâmetros comportamentais, qualitativos e quantitativos ao longo dos períodos, observamos que o grupo GC+ apresentou uma reação inflamatória leve aos 7 dias, porém, essa resposta diminui ainda mais aos 15 dias, como também foi possível ver no grupo GT1. O grupo GC+, apesar de ter apresentado um comportamento seletivo para a entrada de células devido à sua dupla camada, permitiu que houvesse uma vascularização, que se manteve favorável desde o início e foi maior do que os demais grupos, isso resultou em uma neoformação

óssea superior, com maior espessura no centro do defeito ósseo, quando comparado aos grupos GT1 e GC-.

6 CONCLUSÃO

Com base nas informações aqui apresentadas e considerando que a membrana de derme suína é reconhecida como “padrão ouro” a ser utilizado em procedimentos de regeneração óssea guiada (ROG) ^{25, 32}, e que a mesma demonstrou semelhança nos dados estatísticos em associação com os dados histológicos analisados, conclui-se que a membrana nacional de pericárdio bovino pode ser considerada com uma alternativa pertinente à membrana de derme suína utilizada mundialmente para ROG.

Esse resultado é significativo, uma vez que a fabricação nacional desse material o torna mais acessível para a prática clínica realizada no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. Quim Nova 2010;33(6):1352-8.
2. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. J Prosthet Dent 1983;50:399-410.
3. SINHORETI, Mário Alexandre Coelho; VITTI, Rafael Pino e CORRER-SOBRINHO, Lourenço. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent. [online]. 2013, vol.67, n.4, pp. 256-261. ISSN 0004-5276.
4. SOUZA, S. L. S; et al. Biomateriais na instalação de implantes osseointegrados. In: SALLUM, Antonio Wilson; et al. Periodontologia e implantodontia, soluções estéticas e recursos clínicos. Napoleão: Nova Odessa, 2010.
5. Claudino J, Alves LAC. Biomateriais: uma realidade para as cirurgias de enxerto em Odontologia: revisão da literatura. 2019; 37(2):174-7.
6. FERRIOLLI, Stéfani Caroline et al. REABSORÇÃO ÓSSEA GUIADA EM CALVÁRIA DE RATOS USANDO-SE MEMBRANAS DE CORTICAL ÓSSEA BOVINA. In: II Congresso Nacional de Inovações em Saúde (CONAIS) - Fortaleza - Ceará, 2021 Pereira, Silva Elves. Biomaterias utilizados na implantodontia/Elves da Silva Pereira Sete Lagoas, 2021. 29p
7. Soares, Murilo Via Real. Biomaterials used in odontology practice: a literature review. 2015. 27 pages. Final Academic Paper Course Concluding (Graduation in Odontology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.
8. Pereira, Silva Elves. Biomaterias utilizados na implantodontia/Elves da Silva Pereira Sete Lagoas, 2021. 29p
9. Mizutani FS, Ciotti DL, Reino DM, Faveri M. Como selecionar e como combinar corretamente as membranas e enxertos para as cirurgias de regeneração óssea em Implantodontia: um guia para a tomada de decisões. Full Dent. Sci. 2019; 10 (40):16-9.
10. Catirse ABCEB, Reis AC, Nascimento C, Souza FCPP. Manual de Materiais Dentários. Universidade de São Paulo, faculdade de odontologia de Ribeirão Preto: Biomateriais na Implantodontia, 2020. P 274-84. Disponível
11. PONTORIERO, R et al. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. A clinical study of degree III

- involvements. *Journal Of Clinical Periodontology*, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 170-174, mar. 1989. Wiley. Tempro & Nalbandian, 1993
12. TEMPRO, Paulette J.; NALBANDIAN, John. Colonization of Retrieved Polytetrafluoroethylene Membranes: morphological and microbiological observations. *Journal Of Periodontology*, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 162-168, mar. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1993.64.3.162>.
 13. CATON, Jack G.; GREENSTEIN, Gary. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 9-15, fev. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.1993.tb00202.x>.
 14. FERRIOLLI, S. C. Comparação da atividade osteopromotora de membranas nacionais de pericárdio bovino no processo de regeneração óssea guiada. 2023. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.
 15. Du Sert, N.P.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M.T.; Padeiro, M.; Browne, W.J.; Oliveira, A.; Cuthill, I.C.; Dirnagl, U.; Emerson, M.; et al. Relato de pesquisas com animais: Explicação e elaboração das diretrizes ARRIVE 2.0. *PLoS Biol.* 2020, 18, e3000411.
 16. 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.
 17. Messoria, M.R.; Nagata, M.J.H.; Dornelles, R.C.M.; Bomfim, S.R.M.; Fucini, S.E.; Garcia, V.G.; Bosco, A.F. Cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico tratados com plasma rico em plaquetas: Um estudo histológico e histométrico em calvária de ratos. *J. Res. Periodontal* 2008, p. 43, pp. 217–223.
 18. Hassumi, J.S.; Mulinari-Santos, G.; Fabris, A.L.D.S.; Jacó, R.G.M.; Gonçalves, A.; Rossi, A.C.; Freire, A.R.; Faverani, L.P.; Okamoto, R. Cicatrização óssea alveolar em ratos: Micro-TC, análise imuno-histoquímica e molecular. *J. Appl. Oral Sci.* 2018, 26, e20170326.
 19. Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobbato L, Bressan E, Nastri L. Selection of collagen membranes for bone regeneration: a literature review. *Materials*. 2020;13(3):786. doi: 10.3390/ma13030786.
 20. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(23):2347-59. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00102- 2.

21. Baek YJ, Kim JH, Song JM, Yoon SY, Kim HS, Shin SH. Chitin-fibroin-hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration: micro-computed tomography evaluation in a rat model. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2016;38(1):14. doi: 10.1186/s40902-016-0060-6.
22. Danieleto-Zanna CF, Bizelli VF, Ramires GADA, Francatti TM, Carvalho PSP, Bassi APF. Osteopromotion capacity of bovine cortical membranes in critical defects of rat calvaria: histological and immunohistochemical analysis. *Int J Biomater*. 2020;2020:6426702. doi: 10.1155/2020/6426702
23. Chandra RV, Sneha K, Reddy AA. Non-cross-linked versus cross-linked collagen membrane in maxillary sinus perforation repair: a comparative histologic study in a rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020;35(1):91–9. doi: 10.11607/jomi.7600.
24. Vajgel, A.; Mardas, N.; Farias, A.C.; Petrie, A.; Cimões, R.; Dono, N. Uma revisão sistemática sobre o modelo de defeito de tamanho crítico. *Clin. Implante Oral. Res*. 2014, 25, 879–893
25. Bassi, A.P.F.; Bizelli, V.F.; Francatti, T.M.; De Moraes-Ferrerira, A.C.R.; Pereira, J.C.; AlSharani, H.M.; Lucas, F.A.; Faverani, L.P. Bone Regeneration Assessment of Polycaprolactone Membrane on Critical-Size Defects in Rat Calvaria. *Membranes (Basel)*. Feb 2021, 11, 2, 124.
26. Ortolani E, Quadrini F, Bellisario D, Santo L, Polimeni A, Santarsiero A. Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. *Ann Ist Super Sanita*. 2015;51(3):229-35. doi: 10.4415/ANN_15_03_11
27. Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials*. 2005;26(31):6158-66. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.023.
28. Bet MR, Goissis G, Lacerda CA. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxyamide side chains. *Biomacromolecules*. 2001;2(4):1074-9. doi: 10.1021/bm0001188
29. Abou Neel EA, Bozec L, Knowles JC, Syed O, Mudera V, Day R, Hyun JK. Collagen--emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):429-56. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.010.
30. Cury DP, Dias FJ, Miglino MA, Watanabe IS. Structural and ultrastructural characteristics of bone-tendon junction of the

- calcaneal tendon of adult and elderly wistar rats. PLoS One. 2016;11(4):e0153568. doi: 10.1371/journal.pone.0153568.
31. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. Clin Oral Implants Res. 2004;15(4):443-9. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.01039.x.
 32. Ottenbacher N, Alkildani S, Korzinskas T, Pissarek J, Ulm C, Jung O, Sundag B, Bellmann O, Stojanovic S, Najman S, Zechner W, Barbeck M. Novel histomorphometrical approach to evaluate the integration pattern and functionality of barrier membranes. Dent J. 2021;9(11):127. doi: 10.3390/dj9110127.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Regeneração óssea de defeito crítico em calvárias de ratos fazendo uso de dois tipos de membranas de colágeno: análise histométrica, microtomográfica, imunoistoquímica e perfil inflamatório"**, Processo FOA nº 0402-2022, sob responsabilidade de Ana Paula Farnazi Bassi apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Maio de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 15 de Junho de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 16 de Julho de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Bone regeneration of critical defect in calvaria of mice using two types of membranes collagen: histometric, microtomographic, immunohistochemistry and inflammatory profile"**, Protocol FOA nº 0402-2022, under the supervision of Ana Paula Farnazi Bassi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 30, 2022.

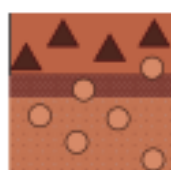
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 15, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 15, 2023.

Prof. Dr. 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: 16015-090 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO B



membranes

an Open Access Journal by MDPI

Editor-in-Chief

Prof. Dr. Spas D. Kolev

Section Editors-in-Chief

Prof. Dr. Shiro Suetsugu
Prof. Dr. Giulio C. Sarti
Prof. Dr. Benjamin S. Hsiao
Prof. Dr. Wojciech Kujawski
Prof. Dr. Clàudia Fontàs
Prof. Dr. Philippe Knauth
Prof. Dr. Efrem Curcio

Message from the Editor-in-Chief

You are cordially invited to contribute a research article or a comprehensive review for consideration and publication in *Membranes* (ISSN 2077-0375). *Membranes* is an international, peer-reviewed open access journal of membrane technology published monthly online by MDPI. Articles contributing to better understanding of transport processes in all types of membranes are also welcome. The scientific community and the general public have unlimited and free access to the content as soon as it is published. We would be pleased to welcome you as one of our authors.

Author Benefits

-  **Open Access** Unlimited and free access for readers
-  **No Copyright Constraints** Retain copyright of your work and free use of your article
-  **2021 Impact Factor: 4.562 (Journal Citation Reports - Clarivate, 2022)**
-  **Rapid Publication** Manuscripts are peer-reviewed and a first decision provided to authors approximately 13.2 days after submission; acceptance to publication is undertaken in 3.3 days (median values for papers published in this journal in the first half of 2022)
-  **No Space Constraints, No Extra Space or Color Charges** No restriction on the length of the papers, number of figures or color
-  **Discounts on Article Processing Charges (APC)** If you belong to an institute that participates with the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP)
-  **High Visibility** Indexed within Scopus, SCIE (Web of Science), Ei Compendex, PubMed, PMC, CAPus / SciFinder, Inspec, and other databases
-  **Journal Rank** JCR - Q1 (*Polymer Science*) / CiteScore - Q2 (*Chemical Engineering (miscellaneous)*)

Endereço eletrônico: <https://www.mdpi.com/journal/membranes>