UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

ANA MAIRA PEREIRA BAGGIO

AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE MEMBRANAS ABSORVÍVEIS DE COLÁGENO ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS DE CALVÁRIAS DE RATOS

Araçatuba - SP
2020

ANA MAIRA PEREIRA BAGGIO

AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE MEMBRANAS ABSORVÍVEIS DE COLÁGENO ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS DE CALVÁRIAS DE RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado 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

Araçatuba – SP
2020

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram durante esta jornada. Deus, família, professores e amigos

Em especial à minha avó materna Rocca Zendira Rossi Pereira (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui, sem Ele nada disso seria possível.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA- UNESP, por ter me oferecido toda a infraestrutura e todos os recursos necessários que me permitiram uma ótima graduação.

A todos os professores e funcionários que permitiram, através de seus esforços diários, que minha graduação fosse concluída com êxito.

Aos meus pais, João Batista Baggio e Maria Lúcia Pereira Baggio que nunca mediram esforços para me ver feliz e realizada me apoiando em todos os momentos e escolhas. Obrigada por tudo que já fizeram e ainda fazem por mim, por sempre priorizarem minha educação e abrirem mão dos próprios sonhos pelos meus; por sempre me incentivarem e nunca me deixarem desanimar nessa jornada. Vocês são tudo para mim e nada disso seria possível sem vocês; essa conquista é nossa.

Ao meu irmão e melhor amigo, João Pedro Pereira Baggio por sempre acreditar em mim, ser meu companheiro, me ouvir, me apoiar e torcer tanto pela minha felicidade e pelo meu sucesso profissional.

A minha querida avó materna Rocca Zendira Rossi Pereira, mulher sábia, guerreira e de coração ímpar, que sempre serviu de inspiração para seus filhos e netos e estará sempre viva em nossos corações.

A todos os meus familiares, que de perto ou longe torceram por mim e me acompanharam até aqui.

A minha orientadora, profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi por todo suporte e paciência durante a graduação e por todos os ensinamentos. Obrigada por ter me acolhido com tanto carinho e ter me dado a oportunidade de realizar uma Inicicação Científica e estar um pouquinho mais próxima da pesquisa durante 3 anos da graduação. A maneira como a senhora trata seus pacientes

é admirável, e eu com certeza tenho isso como inspiração.

A minha banca avaliadora, prof. Dr. Leonardo Perez Faverani e profa. Dra. Daniela Ponzoni por disponibilizarem parte do seu tempo aceitando o meu convite e por todo conhecimento transmitido durante a graduação. Vocês são grandes influências da cirurgia/implantodontia para mim.

Também ao prof. Dr. Leonardo Perez Faverani por sempre ser muito prestativo e atencioso com seus alunos dentro e fora da nossa Liga Acadêmica, e nos ensinar mais do que a ciência, pois também nos ensinou sobre perseverança, humanidade e dedicação. O senhor sempre será um exemplo de profissional e de ser humano para mim.

A Liga Acadêmica de Cirurgia e Traumatologia bucomaxilofacial da FOA Unesp pela experiência única vivida. Obrigada por todo conhecimento adquirido, por todos os momentos de troca e pelas amizades construídas dentro do nosso grupo. Minha gratidão eterna a todos os membros e diretoria.

Ao pós-graduando Vinícius Bizelli por todo auxílio na execução deste projeto e na elaboração deste trabalho, pois sem sua ajuda nada disso seria possível.

Aos meus amigos de longa data, Bruno, Heloísa e Ana Luísa por sempre torcerem pelo meu sucesso e me tranquilizarem com palavras de conforto e incentivo nos momentos de angústia.

A pensão Oliveira de Araçatuba, que foi minha casa durante o primeiro ano da graduação, lugar onde aprendi e amadureci muito. Um agradecimento especial a dona Lídia de Oliveira que foi uma segunda mãe para mim e para todas as meninas em um ano tão complicado.

A Mirela Silva, Fernanda Camilo, Stéfani Ferriolli, Beatryce Sanchez e Ana Carolina Ribeiro por todos os momentos compartilhados até aqui, por terem se tornado minha família em Araçatuba desde o primeiro ano e por termos aprendido e crescido tanto juntas.

Ao apartamento 145, Fernanda e Mirela, por terem se tornado minhas irmãs, pelo convívio diário e por permitirem que nossa casa fosse um ambiente de paz e harmonia. Por todos os momentos bons e ruins, e pelas inúmeras histórias que teremos para contar.

A minha dupla nas clínicas Amanda Borges, sempre me ajudando e ensinando muito, além de ser uma amiga para todas as horas.

A Stéfani C. Ferriolli por ter sido minha companheira nas longas viagens de volta pra casa e por ser uma amiga que sempre pude contar.

Aos demais amigos ganhados na graduação, Carolina Hatty, Lívia Romanini, Amanda Maslem, Ana Carolina Lima, Julia Reis, Giovanna Benini, Isadora Delfraro, Camila Carneiro, Carolina Naomi, Leonardo Perazza, Guilherme Kato, Guilherme Manchini, João Matheus, Giovana Zambuza, Gabriel Andrade, Matheus Almeida, Larissa Mendes, Larissa Perez, Letícia Freire, Alana Semenzin e Maria Clara Ribeiro, por todos os momentos que vivemos juntos dentro e fora da Foa e ficarão sempre guardados na memória. Sentirei saudades e desejo muito sucesso a todos.

Ao time de vôlei da Unesp Araçatuba que me permitiu viver experiências únicas e continuar praticando um esporte que amo durante a graduação. Por todas as amizades construídas dentro da nossa equipe, vocês são muito especiais.

Muito Obrigada!

BAGGIO, A. M. P. **Avaliação histomorfométrica de membranas absorvíveis de colágeno associado à hidroxiapatita para regeneração óssea guiada em defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos.** 2020. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O uso de membranas que auxiliam no processo de regeneração óssea guiada (ROG) é também uma vertente dos estudos de biomateriais compatíveis que auxiliam nesse processo de reparo. O objetivo desse trabalho foi avaliar uma membrana de colágeno bovino associado a hidroxiapatita sintética (Col.HAP-91®) e comparar por meio de estudo microscópico e histomorfométrico a regeneração óssea guiada utilizando membranas de origens diferentes em defeitos críticos (8mm) criados em calvária de ratos. Foram utilizados 72 ratos Albinus Wistar divididos em 3 grupos sendo 24 para cada grupo: grupo controle somente com coágulo; grupo que recebeu a membrana de colágeno porcina e grupo de membrana de colágeno bovino associado a hidroxiapatita sintética (Col.HAP-91®). Os animais foram eutanasiados aos 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Decorrido os tempos experimentais, foram realizados os processos laboratoriais e as amostras submetidas à análise histomorfométrica. Os resultados obtidos mostraram que a membrana de colágeno bovino associado a hidroxiapatita sintética possui capacidade para realizar osteocondução e osteopromoção no processo de neoformação óssea, resultando em defeitos ósseos praticamente fechados em vários espécimes ao final do período de 60 dias.

Palavras-chave: Biomaterial. Regeneração. Tecido ósseo. Membrana.

BAGGIO, A. M. P. **Histomorphometric evaluation of absorbable collagen membranes associated with hydroxyapatite for guided bone regeneration in critical bone defects in rat calvaria.** 2020. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The use of membranes that assist in the guided bone regeneration process (ROG) is also an aspect of the studies of compatible biomaterials that assist in this repair process. The objective of this work was to evaluate a bovine collagen membrane associated with synthetic hydroxyapatite (Col.HAP-91®) and to compare guided bone regeneration using membranes of different origins in critical defects (8mm) created by calvaria using microscopic and histomorphometric studies. of rats. 72 Albinus Wistar rats were used, divided into 3 groups, 24 for each group: control group with only clot; group that received the porcine collagen membrane and group of bovine collagen membrane associated with synthetic hydroxyapatite (Col.HAP-91®). The animals were euthanized at 7, 15, 30 and 60 days postoperatively. After the experimental times, laboratory procedures and samples were submitted to histomorphometric analysis. The results obtained showed that the bovine collagen membrane associated with synthetic hydroxyapatite has the capacity to perform osteoconduction and osteopromotion in the bone neoformation process, resulting in bone defects that are practically closed in several specimens at the end of the 60-day period.

Keywords: Biomaterial. Regeneration. Bone Tissue. Membrane.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital. Remoção da cortical da região de calvária 19

FIGURA 2 - Defeito crítico de 8mm. A. Coágulo B. Membrana de colágeno bovino associado a HA C. Membrana de colágeno porcino 19

FIGURA 3 - Grupo membrana de colágeno bovino (COP), 7 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo 21

FIGURA 4 - Células gigantes no centro do defeito aos 7 dias de pós-operatório. Aumento de 40x 21

FIGURA 5 - Grânulo de hidroxiapatita no centro do defeito aos 7 dias pós-operatório. Aumento 40x 22

FIGURA 6 - Grupo membrana de colágeno bovino (COP), 15 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo 22

FIGURA 7 - A - Centro do defeito aos 15 dias de pós operatório, demonstrando pequenas ilhas de neoformação óssea. Aumento de 6,5x. B - Ilhas ósseas e presença de células gigantes. Aumento de 40x 23

FIGURA 8 - Integridade da membrana (M). Aumento 12,5x 23

FIGURA 9 - Grupo membrana de colágeno bovino (COP), 30 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo 24

FIGURA 10 - A - Presença da membrana aos 30 dias pós operatório. B – Maior neoformação óssea e presença de partículas de hidroxiapatita. Aumento de 6,5X 24

FIGURA 11 - Grupo membrana de colágeno bovino (COP), 60 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo 25

FIGURA 12 – A, B - Presença de tecido conjuntivo. Aumento de 12,5x. C. Presença de grânulos de hidroxiapatita. Aumento de 25x

FIGURA 13 - Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 7 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo 26

FIGURA 14 - Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 7 dias. (A) aumento de 6,3x: Presença da membrana (M) no centro do defeito (A), (B) aumento 12,5x, (C) aumento de 25x 26

FIGURA 15 - Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 15 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana (M) na área de defeito ósseo. Presença da membrana sob um tecido conjuntivo frouxo (TC) organizado 27

FIGURA 16 - Grupo membrana de colágeno porcino (BG), 15 dias. (A) aumento de

6.3x (B) aumento de 12x (C) aumento de 25x. Presença de membrana sob um tecido conjuntivo frouxo (TC) organizado sem aspecto de infiltrado inflamatório 27

FIGURA 17 - Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 30 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo 28

FIGURA 18 - Grupo BG controle de 30 dias – aumento de 12,5x 28

FIGURA 19 - Corte histológico panorâmico corado em eosina e hematoxilina, mostrando a área total do defeito com uso de Bio-Gide® em 60 dias. Aumento original de 6,3x 29

FIGURA 20 - Grupo coágulo, 07 dias, imagem panorâmica 29

FIGURA 21 - Grupo GC – Controle 7 dias. Tecido de granulação (TG) com algumas fibras organizando-se de forma paralela à borda (B) do defeito e pequena neoformação osteóide (TO). H.E. Objetiva Original 12,5x 30

FIGURA 22 - GC, 15 dias, imagem panorâmica 30

FIGURA 23 – GC, 30 dias, imagem panorâmica 31

FIGURA 24 – GC, 30 dias. Aumento de 40X. A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito 31

FIGURA 25 – GC, 60 dias, imagem panorâmica 32

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Área de osso neoformado para os grupos aos 7, 15, 30 e 60 dias 33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BG	Grupo membrana de colágeno porcino
BIO-GIDE® (BG)	Membrana de colágeno porcino
COL.HAP-91® (COP)	Membrana de colágeno bovino associada a hidroxiapatita
COP	Grupo membrana de colágeno bovino
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
GC	Grupo coágulo
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e eosina
PTFE	Politetrafluoretileno
ROG	Regeneração óssea guiada
TON	Tecido ósseo neoformado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 OBJETIVOS 16

3 MATERIAIS E MÉTODOS 17

3.1 Delineamento do estudo 17

3.2 Cirurgia Experimental 17

3.3 Análise Histométrica 20

4 RESULTADOS 21

4.1 Análise Histológica 21

4.2 Análise Estatística 32

5 DISCUSSÃO 34

6 CONCLUSÃO 37

REFERÊNCIAS 38

ANEXO 41

1 INTRODUÇÃO

Com a finalidade de superar algumas deficiências associadas ao uso de enxertos autógenos, as atividades de pesquisa têm se voltado ao desenvolvimento de técnicas e biomateriais alternativos. Estudos documentam que por meio de membranas é possível selecionar o tipo celular do tecido mais indicado para repopular determinada ferida cirúrgica (ACEVEDO-ANDRADE *et al.,* 2004; CAFESSE *et al.,* 1988; IMBROMITO; CHAVEZ; TODESCAN, 2001).

Um dos primeiros estudos realizados para observar a capacidade de seleção celular foi feita por Dahlin et al. (1990). Eles avaliaram o potencial de regeneração óssea utilizando membranas em defeitos previamente criados e preenchidos por tecido conjuntivo fibroso. Para isso foram criados defeitos em mandíbulas de ratos permitindo que a cicatrização ocorresse normalmente por 12 semanas, quando se verificou que os defeitos estavam preenchidos por tecido conjuntivo fibroso. Tal tecido foi removido e os defeitos foram recobertos com membranas. Após seis semanas, todos os defeitos estavam preenchidos por tecido ósseo. Esse processo de regeneração apenas de tecido ósseo, passou a ser denominado regeneração óssea guiada (ROG) (DAHLIN *et al.,* 1990).

Portanto, a técnica denominada Regeneração Óssea Guiada (ROG), se baseia no conceito de osteopromoção e é caracterizada pelo uso de meios físicos para promover um selamento de um local anatômico. Esse selamento serve para prevenir que outros tecidos, principalmente o tecido conjuntivo, invadam a região uma vez que sua formação é mais rápida que a do tecido ósseo, interferindo na osteogênese. Portanto, a ROG também auxilia no direcionamento da formação óssea (ANDRADE-ACEVEDO *et al.,* 2004).

A literatura mostra que certos tecidos no interior do organismo possuem potencial biológico para regeneração, sempre que exista um ambiente adequado durante a cicatrização (SCHENK *et al.,* 1994). As principais indicações do uso das membranas biológicas em processos de ROG são: correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais (CORTELLINI; PINI PRATO; TONETTI, 1993); alvéolos após exodontias (WILSON; WEBER, 1993); deiscências e fenestrações após colocação de implantes mediatos e imediatos (BECKER *et al.,*1994).

Para neoformação óssea ser completa pela ROG, devem existir as seguintes condições: fonte de células osteogênicas (osso viável adjacente ao defeito); fonte adequada de vascularização; o local da ferida deve permanecer mecanicamente estável durante a cicatrização, já que os micromovimentos poderão influenciar no tecido a ser formado deve existir um espaço apropriado entre a membrana e a superfície óssea, impedindo o colapso deste espaço, permitindo que seja preenchido por um coágulo sanguíneo, sendo este espaço crítico, já que nele as células osteogênicas irão se multiplicar. As membranas devem possuir propriedades de permeabilidade que permita a difusão de plasma e nutrientes, porém não a passagem de células não osteogênicas; biocompatibilidade da membrana; proteger a delicada rede vascular durante a organização do coágulo (PHILLIPS; RAHN, 1988). Além disso, este biomaterial deve resistir a pressão dos tecidos adjacentes e forças externas.

Uma membrana deve ter rigidez suficiente (memória), para criar o espaço, entretanto deve também adaptar-se ao contorno ósseo. Quanto melhor a adaptação da membrana, mais completa será a regeneração (BUSER *et al.*,1990). Segundo Andrade-Acevedo *et al.* (2004) os problemas mais frequentemente associados à ROG e uso de membranas são: colapso total ou parcial da membrana; exposição da membrana por deiscência do tecido mole (infecção local); baixo nível de habilidade técnica do profissional.

As membranas são classificadas em absorvíveis e não absorvíveis, sendo esta última em especias as membranas de e-PTFE as primeiras membranas mais utilizadas e estudadas para ROG (BECKER *et al.,* 1994). Contudo, por necessitarem de uma segunda cirurgia subsequente para removê-las e por estarem frequentemente associadas à exposição, o que consequentemente arriscava o sucesso clínico, iniciou-se pesquisas com membranas absorvíveis (SCHMITZ *et al.,* 2000).

As membranas absorvíveis devem sofrer reabsorção e degradação macromolecular por meio da associação de hidrólise e degradação enzimática, processo que ocorre na presença de enzimas como a fosfatase ácida e colagenase. A bioreabsorção requer total eliminação dos produtos da degradação sem efeitos residuais locais (MINABE *et al.,* 2001). Estas membranas foram criadas no intuito de eliminar um segundo tempo cirúrgico. Além disso, esses biomateriais têm sido alvo de

intensa investigação.

As membranas de colágeno absorvível dominam os procedimentos de ROG na prática clínica atualmente e a 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 remoção (ANDRADE-ACEVEDO *et al*., 2004; BOSTMAN, 1991; TRENTIN; SHIBLIN, 2004).

Uma das mais utilizadas e documentadas membranas de colágeno, é derivada de suínos e não reticulada (Bio-Gide®, Geistlich, Wohlhusen, Suíça). 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 intenção (BUSER, 2010; CAFFESSE *et al.*, 1988). A associação de membranas com materiais osteocondutores também é uma vertente de inúmeras pesquisas, em especial com a hidroxiapatita (ARMENTANO *et al.,* 2010; CUI *et al.,* 2010; NIRMALA *et al.,* 2010; WUTTICHAROENMONGKOL; PAVASANT; SUPAPHOL, 2007). Esta cerâmica possui propriedades semelhantes ao tecido mineral do osso e dentes humanos incrementado a composição das membranas (FOOK et al., 2010). A Col.Hap-91® (JHS, Biomateriais Sabará, Minas Gerais, Brasil), é uma membrana xenógena bovina composta por 25% de colágeno e 75% de hidroxiapatita, sendo a princípio biocompatível e absorvível (ONO et al., 2000). Os poros de sua estrutura auxiliam na formação óssea de modo que atua como uma barreira impedindo o crescimento do tecido fibroso indesejado e auxiliando na estabilidade do material enxertado.

2 OBJETIVOS

A proposta deste trabalho é avaliar o pontencial de osteopromoção de uma membrana de colágeno bovino associada a hidroxiapatita sintética (Col.Hap-91) durante o processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos aos 7, 15, 30 e 60 dias por meio da análise histomorfométrica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal, protocolo: FOA n: 01062-2017 (Anexo).

3.1 Delineamento do estudo

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi utilizado um total de 72 ratos (Rattus novergicus albinus, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em 3 grupos (n= 6 por grupo), submetidos à eutanásia em quatro momentos do experimento, aos 7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brasil) contendo 1.4%Ca e 0.8%P e água ad libitum no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba - UNESP.

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

• **Grupo Experimental (**Col.Hap-91®, JHS, Biomateriais Sabará, Minas Gerais, Brasil **- COP)** – n=24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de hidroxiapatita sintética associada ao colágeno.

● **Grupo Controle Positivo (**Bio-Gide®, Geistlich Wolhusen, Switzerland **- BG)** – n= 24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino.

● **Grupo Controle Negativo (**Coágulo **- GC)** – n= 24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo sem o recobrimento do defeito.

Em cada um dos 3 grupos, 6 ratos foram submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia).

3.2 Cirurgia Experimental

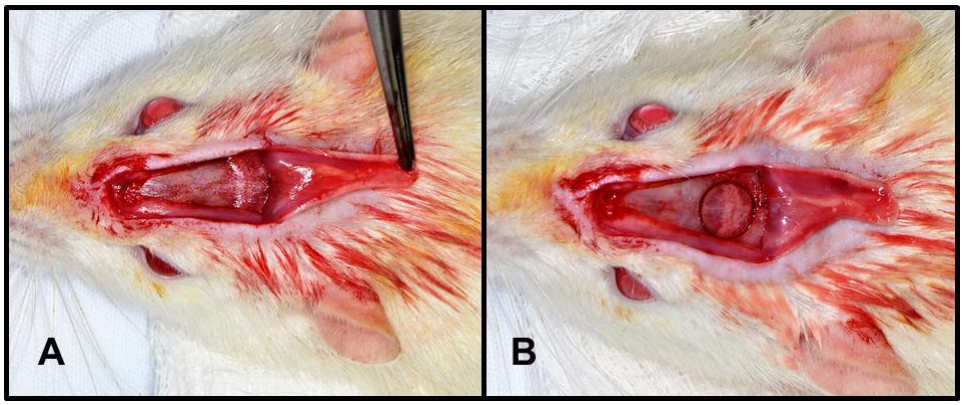
Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina associado à Xilazina, na dosagem de 70 mg/Kg e 30 mg/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Em seguida foi realizada a tricotomia na região da calvária, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%), associado ao PVPI tópico e aposição de campos estéreis.

Foi realizada incisão em “V” no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 (dois) cm, com lâmina n°15 montada em cabo de bisturi n° 3 e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt. Em seguida com auxílio de broca trefina de 7 mm de diâmetro interno acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9%, foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8mm de diâmetro na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 1). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos somente com coágulo sanguíneo (Grupo Controle Negativo - n = 24) e os demais grupos preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno associada com hidroxiapatita (Grupo Experimental 1 Col.Hap-91® - n=24) e o Grupo Controle Positivo foi recoberto por uma membrana de colágeno porcino (Grupo Bio-Gide® - n=24) (Figura 2). Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0), com pontos interrompidos no plano mais externo.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular

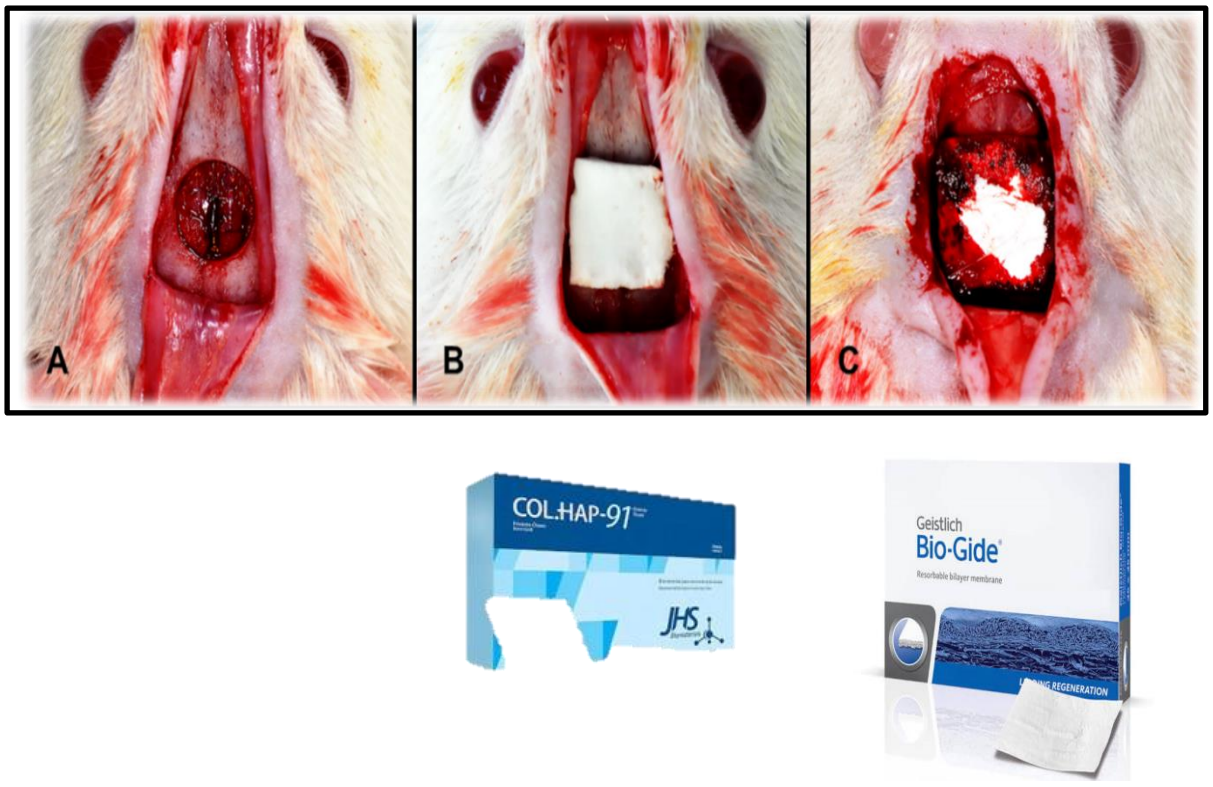
de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

FIGURA 1 - A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital. Remoção da cortical da região de calvária



Fonte: Autor, 2020

FIGURA 2 - Defeito crítico de 8mm. A. Coágulo B. Membrana de colágeno bovina associado a HA C. Membrana de colágeno porcino



Fonte: Autor, 2020

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

As calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e receberam cortes de 6µm de espessura e foram montadas em lâminas. As lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

Previamente a realização da análise histométrica as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conhecia quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

3.3 Análise Histométrica

Para a realização da análise histológica, após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.) as mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico acoplado a uma câmera de captação de imagem e conectado a um microcomputador com um software analisador de imagens digitalizadas ImageJ 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas).

Para a análise estatística, inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro- Wilk), o qual identificou se tratar de dados homogêneos ($p>0,05$). Assim, o teste ANOVA 2 fatores foi aplicado para as interações “Grupo experimental versus períodos”. Todas as interações mostraram alterações significantes estatisticamente ($p<0,05$). Adicionalmente, para a identificação precisa das alterações estatísticas, o pós-teste Holm-Sidak foi aplicado, em que para todos os testes, o nível de significância de 5% foi considerado. Todos os testes foram realizados no programa estatístico SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA).

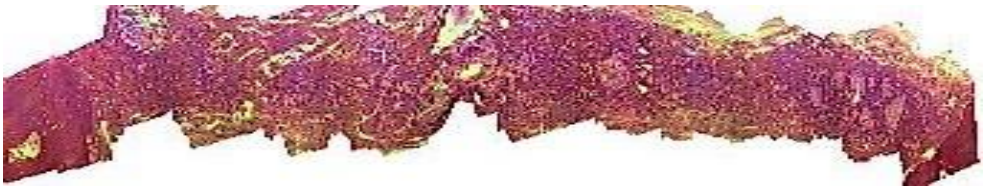
4 RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

GRUPO EXPERIMENTAL (COL.HAP91®)

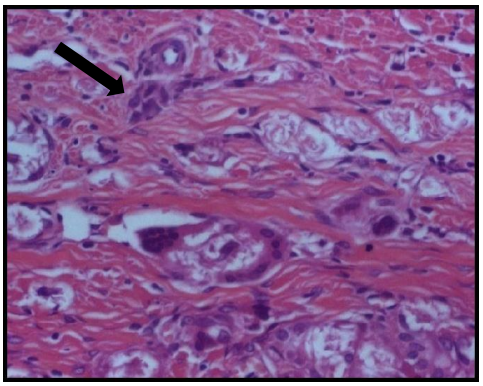
7 DIAS – Observou-se presença de alguns grânulos de hidroxiapatita (Figura 3) por vezes no meio da membrana e outras vezes no meio do tecido de granulação. Um tecido infiltrado inflamatório mais intenso em algumas lâminas e um tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado com muitas células gigantes (Figura 4). Notou-se discreta orientação das fibras colágenas numa possível tentativa de organização destas. Também foi possivel notar a presença de particulas de hidroxiapatita (Figura 5).

FIGURA 3 - Grupo membrana de colágeno bovino (COP), 7 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo



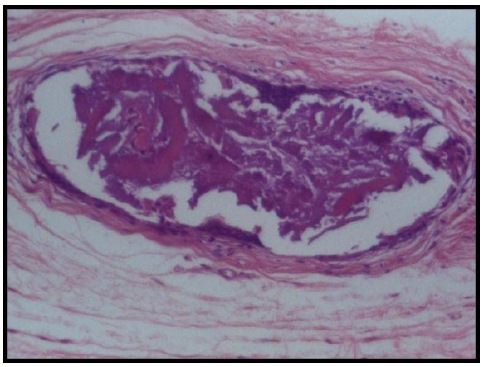
Fonte: Autor, 2020

FIGURA 4 - Células gigantes no centro do defeito aos 7 dias de pós-operatório. Aumento de 40x



Fonte: Autor, 2020

FIGURA 5 - Grânulo de hidroxiapatita no centro do defeito aos 7 dias pós-operatório. Aumento 40x



Fonte: Autor, 2020

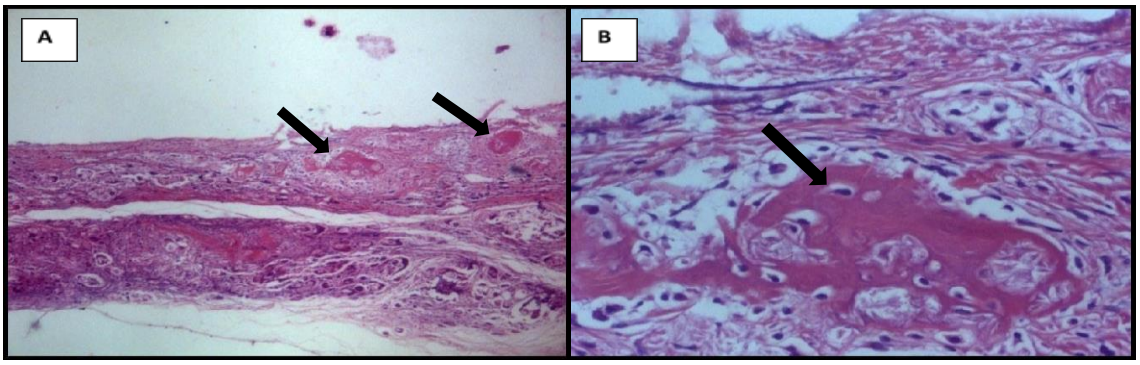
15 DIAS – Nota-se a presença de um tecido conjuntivo denso organizado evidenciando um maior direcionamento das fibras colágenas (Figura 6). Há uma diminuição da reação inflamatória com presença de células gigantes, fagocitando os grânulos de HA e a presença de ilhas de neoformação óssea na região central (Figura 7) e também a partir dos cotos do defeito. Ainda é possível observar a integridade da membrana (Figura 7) e em algumas lâminas a presença de grânulos de hidroxiapatita que compõem o biomaterial no interior do conjuntivo, com infiltração dos grânulos demonstrando sua porosidade.

FIGURA 6 - Grupo membrana de colágeno bovino (COP), 15 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo



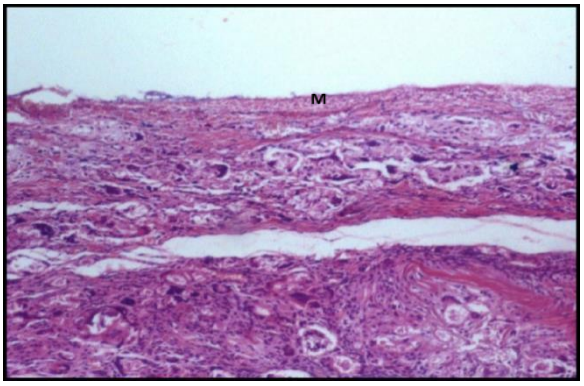
Fonte: Autor, 2020

FIGURA 7 - A - Centro do defeito aos 15 dias de pós operatório, demonstrando pequenas ilhas de neoformação óssea. Aumento de 6,5x. B - Ilhas ósseas e presença de células gigantes. Aumento de 40x



Fonte: Autor, 2020

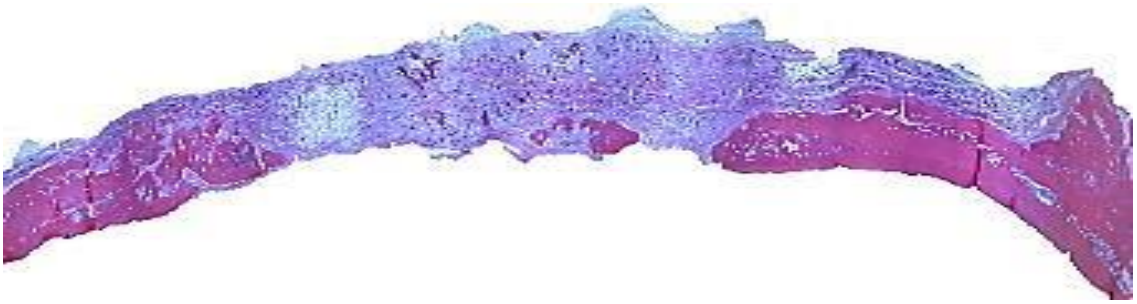
FIGURA 8 - Integridade da membrana (M). Aumento 12,5x



Fonte: Autor, 2020

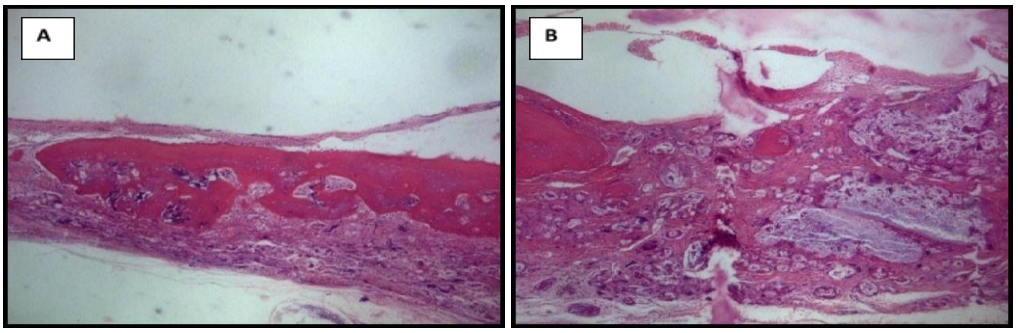
30 DIAS – É possível constatar o processo de degradação da membrana em alguns espécimes, em outros, porém, nota-se a presença da membrana quase íntegra. Há presença de tecido conjuntivo fibroso organizado, intercalado com maior neoformação óssea e pequenas partículas de grânulos de hidroxiapatita envolvidos por neoformação óssea (Figura 09, 10). O centro do defeito ainda não fechado.

FIGURA 9 - Grupo membrana de colágeno bovino (COP), 30 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo



Fonte: Autor, 2020

FIGURA 10 - A - Presença da membrana aos 30 dias pós operatório. B – Maior neoformação óssea e presença de partículas de hidroxiapatita. Aumento de 6,5X



Fonte: Autor, 2020

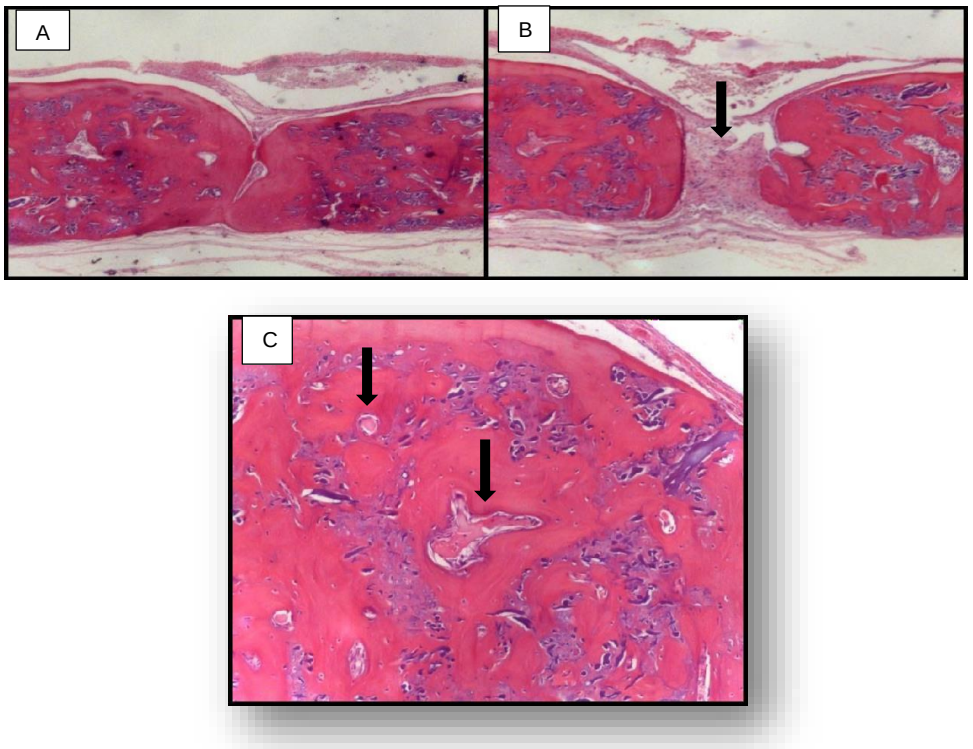
60 DIAS - Alguns espécimes tiveram o defeito preenchido por neoformação óssea, outros quase fechados, notando-se a presença de periósteo (Figura 11). É possível observar ainda a presença de fragmentos da membrana e dos grânulos de hidroxiapatita (Figura 12).

FIGURA 11 - Grupo membrana de colágeno bovino (COP), 60 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo



Fonte: Autor, 2020

FIGURA 12 – A, B - Presença de tecido conjuntivo. Aumento de 12,5x. C – Presença de grânulos de hidroxiapatita. Aumento de 25x



Fonte: Autor, 2020

GRUPO CONTROLE POSITIVO (BIO-GIDE®)

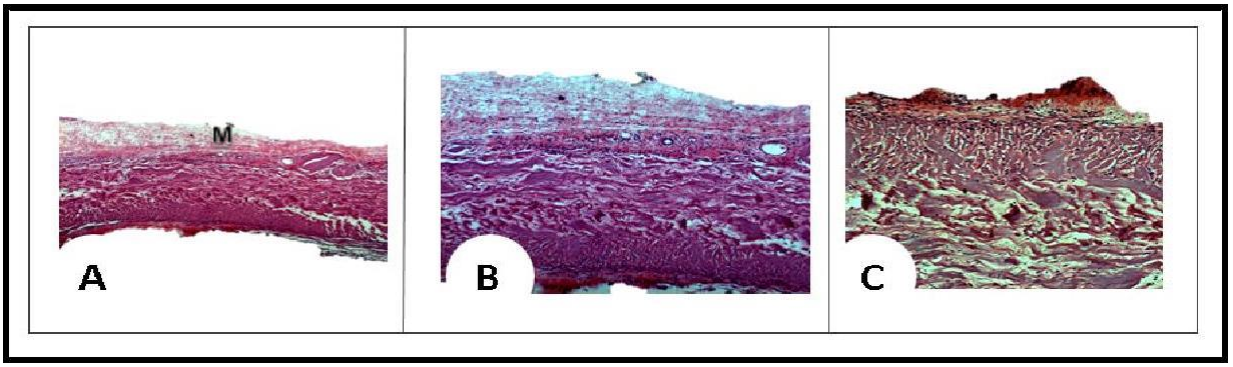
7 DIAS - Pode-se observar na imagem panorâmica (Figura 13) a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo. No aumento de 6.3x (Figura 14 A) nota-se a presença de tecido de granulação bem organizado e nos aumentos de 12,5 e 25x (Figura 14, B e C) verifica-se que esse tecido de granulação é altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório, e é possível observar início de neoformação óssea próximo aos cotos. Também é possível observar células gigantes indicando fagocitose da membrana, com início de neoformação óssea no centro do defeito.

FIGURA 13 - Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 7 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo



Fonte: Autor, 2020

FIGURA 14 - Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 7 dias. (A) aumento de 6.3x: Presença da membrana (M) no centro do defeito (A), (B) aumento 12.5x, (C) aumento de 25x



Fonte: Autor, 2020

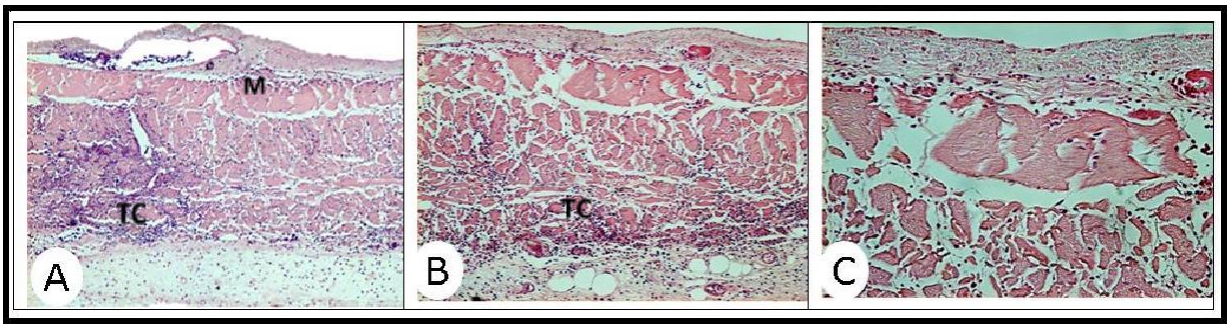
15 DIAS: Na imagem panorâmica observa-se a presença da membrana íntegra que recobre toda área do defeito ósseo (Figura 15). Nas análises com maior magnitude (6.3,12.5 e 25x), pode-se observar um tecido conjuntivo frouxo sem infiltrado inflamatório significativo, ainda bem vascularizado e áreas de tecido ósseo neoformado a partir do coto, com presença de tecido osteóide no centro do defeito (Figura 16 A, B e C).

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



Fonte: Autor, 2020

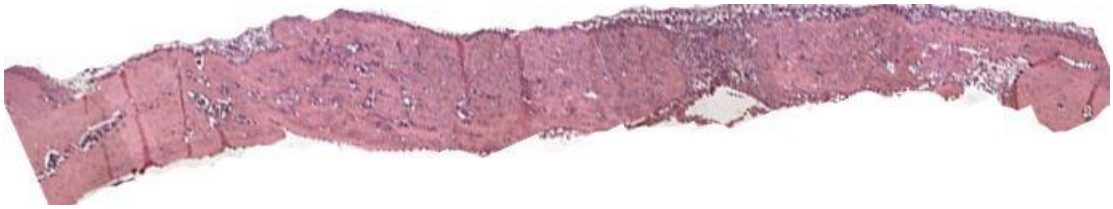
FIGURA 16 - Grupo membrana de colágeno porcino (BG), 15 dias. (A) aumento de 6.3x (B) aumento de 12x (C) aumento de 25x. Presença de membrana (M) sob um tecido conjuntivo frouxo (TC) organizado sem aspecto de infiltrado inflamatório



Fonte: Autor, 2020

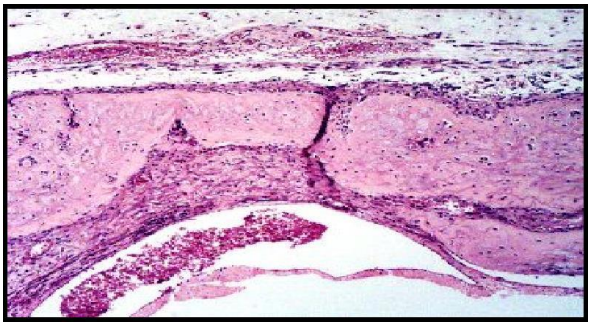
30 DIAS: Verifica-se uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana de colágeno porcino *(*Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland) (Figura 17). Na observação das lâminas nota-se a presença de neoformação óssea a partir dos cotos ósseos e no centro do defeito, com a presença de remanescente da membrana entre a área de tecido ósseo neoformado e o tecido conjuntivo organizado sobre a membrana remanescente. Em alguns espécimes verificou-se o fechamento do defeito (Figura 18).

FIGURA 17 - Grupo membrana de colágeno suíno (BG), 30 dias, imagem panorâmica. Mostra a membrana sob a área de defeito ósseo



Fonte: Autor, 2020

FIGURA 18 - Grupo BG controle de 30 dias – aumento de 12,5x



Fonte: Autor, 2020

60 DIAS: Há imagens da neoformação óssea tanto no coto esquerdo quanto no coto direito como no centro do defeito. Eram as mesmas dos animais sacrificados com 30 dias, mas com imagem mais nítida de tecido ósseo neoformado preenchendo praticamente toda a cavidade. Verifica-se também a presença de membrana

remanescente, tecido conjuntivo fibroso bem organizado (Figura 19).

FIGURA 19 - Corte histológico panorâmico corado em eosina e hematoxilina, mostrando a área total do defeito com uso de Bio-Gide® em 60 dias. Aumento original de 6,3x

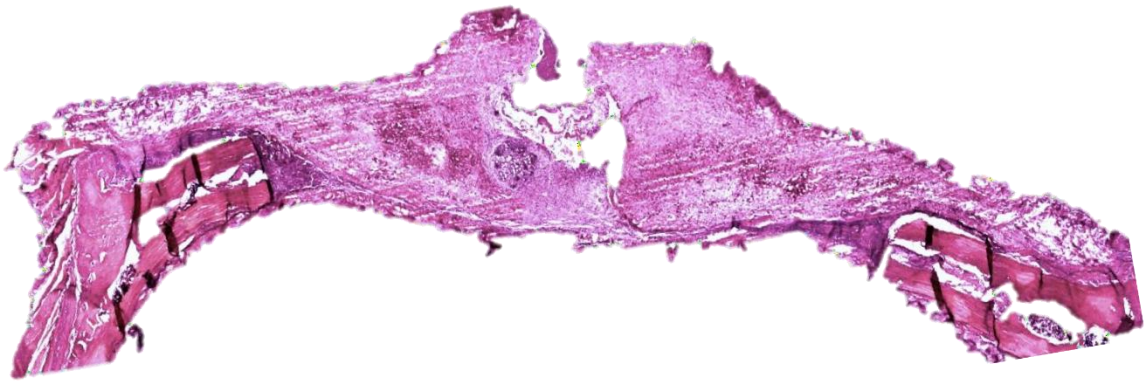


Fonte: Autor, 2020

GRUPO CONTROLE NEGATIVO (COÁGULO)

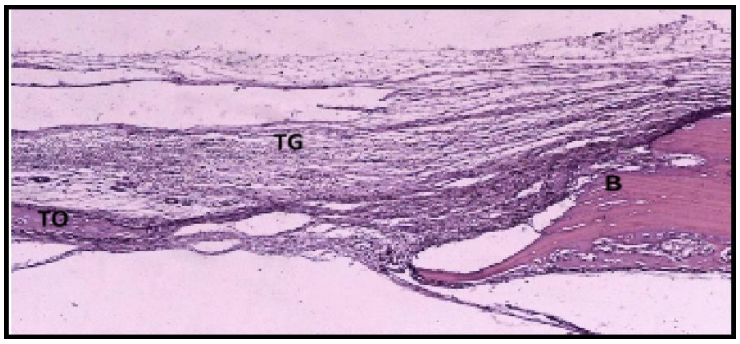
7 DIAS - A citoarquitetura das secções microscópicas aos 7 dias para os defeitos sem membrana mostrou hipervascularização no tecido ósseo neoformado (TON) e presença de atividade fibroblástica. Verificou-se na borda do defeito ósseo, indo em direção ao centro da ferida, neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, ricamente celularizado por osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. O inicio da neoformação óssea somente foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central, com abundância de tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblasto e pouca matriz extracelular preenchendo a região central da ferida. (Figura 20, 21).

FIGURA 20 - Grupo GC, 07 dias, imagem panorâmica



Fonte: Autor, 2020

FIGURA 21 - Grupo GC – Controle 7 dias. Tecido de granulação (TG) com algumas fibras organizando-se de forma paralela à borda (B) do defeito e pequena neoformação osteóide (TO). H.E. Objetiva Original 12,5x



Fonte: Autor, 2020

15 DIAS: A neoformação óssea continua apenas nos cotos da ferida cirúrgica, com tecido ósseo primário, sendo ausente na região central, que está preenchida por tecido conjuntivo. (Figura 22).

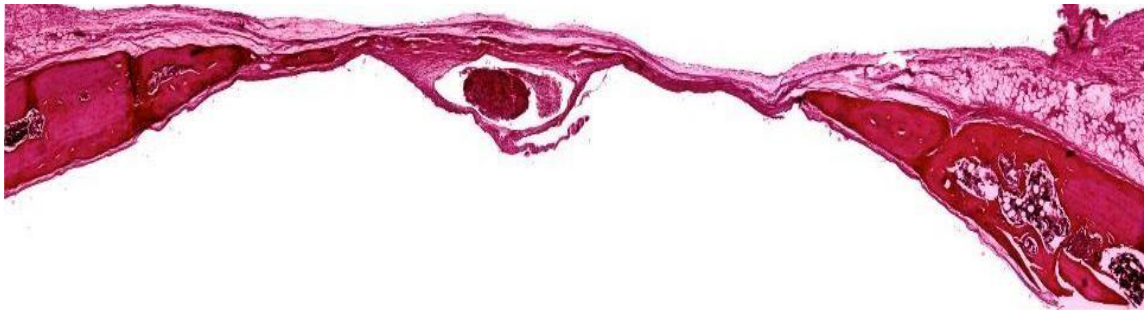
FIGURA 22 – GC, 15 dias, imagem panorâmica



Fonte: Autor, 2020

30 DIAS – No período de 30 dias (Figura 23), o GC apresentou uma área óssea neoformada maior próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes estava preenchido por um tecido conjuntivo.

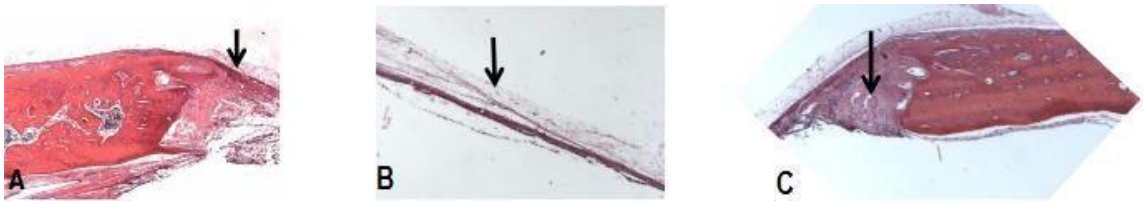
FIGURA 23 - GC, 30 dias, imagem panorâmica



Fonte: Autor, 2020

Foi possível observar, em maior aumento, indicados pela seta, a área de osteotomia com os cotos ósseos esquerdo (Figura 24A) e direito (Figura 24C) com discreta neoformação óssea em suas margens, e o centro do defeito crítico preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Figura 24B).

FIGURA 24 – GC, 30 dias. Aumento de 40X. A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito



Fonte: Autor, 2020

60 DIAS - O osso neoformado pareceu mais maduro do que os de 30 dias, contudo, desconsiderou-se a sua análise histológica por falhas no processamento das lâminas do grupo de 60 dias (Figura 25).

FIGURA 25 - GC 60 dias, imagem panorâmica



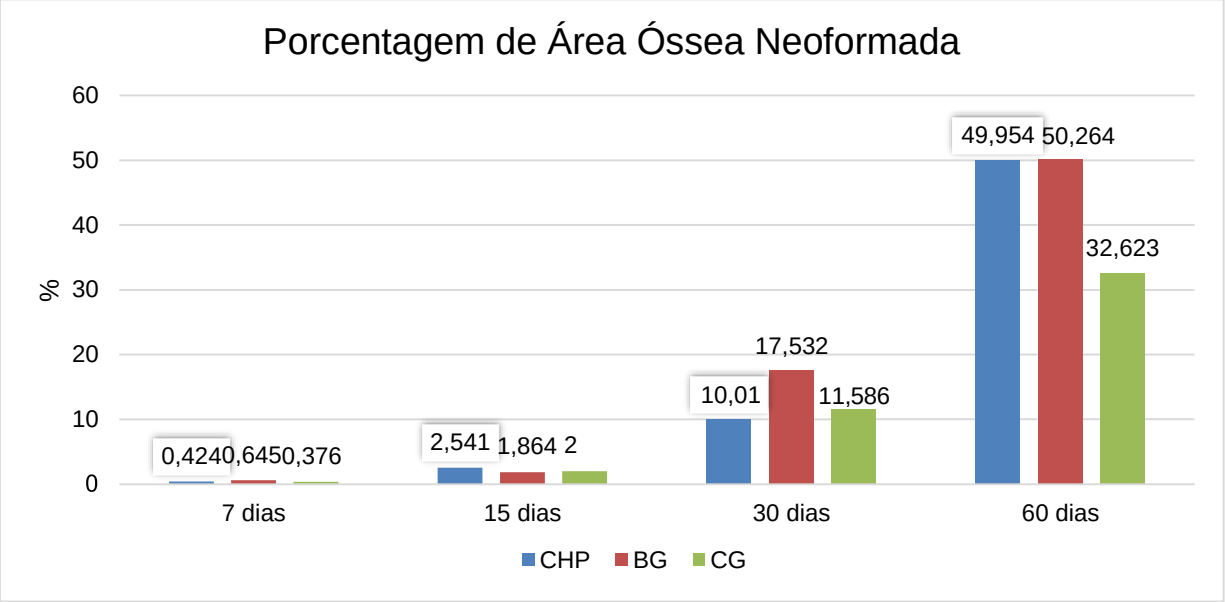
Fonte: Autor, 2020

4.2 Análise Estatística

Na avaliação histométrica da evolução cronológica do reparo ósseo (análise intragrupos), o grupo controle positivo (BioGide®) apresentou maior área de neoformação óssea em todos os períodos em comparação aos grupos experimental (Col.Hap-91®) e controle negativo (coágulo) ($p<0,05$).

Nos períodos de 7 e 15 dias entre os 3 grupos houve similaridade estatística na neoformação óssea. As diferenças estatísticas apareceram na comparação entre grupos no período de 30 dias, onde o grupo controle positivo (BioGide®) despontou como melhor resultado. Aos 60 dias pós-operatório o grupo experimental (Col.Hap-91®) obteve neoformação similar ao grupo controle positivo, sem diferença estatística, enquanto o grupo controle negativo (coágulo) apresentou os menores resultados para este período.

GRÁFICO 1 - Área de Osso neoformado para os grupos aos 7, 15, 30 e 60 dias.



Fonte: Autor, 2020

5 DISCUSSÃO

Membranas absorvíveis vêm sendo cada vez mais utilizadas como barreira física na técnica da Regeneração Óssea Guiada (ROG), principalmente por não necessitarem de um segundo tempo cirúrgico (BUSER, 2010; SILVA; OLIVEIRA; SOUZA, 2014). È necessário que todas as membranas utilizadas em ROG apresentem alta biocompatibilidade e exerçam sua fução de barreira evitando o colapso, protegendo o coágulo sanguíneo de ser movido e permitindo que células osteoprogenitoras exerçam suas atividades (QUESADA; BRENNER; FELTRACO, 2011; ROTHAMEL *et al.*, 2005; SILVA; OLIVEIRA; SOUZA, 2014). A hidroxiapatita e o colágeno são alguns dos vários materiais que vêm recebendo atenção especial em diversas pesquisas na busca dos materiais ideais para a osteocondução, biocompatibilidade e resistência biomecânica durante o processo de reparo dos defeitos ósseos (SHIRANE *et al*., 2010).

No presente estudo foram confeccionados defeitos críticos de 8 mm de diâmetro em calvárias de ratos, sobre os quais foram utilizadas as membranas de colágeno porcina (Bio-Gide®), a membrana de hidroxiapatita sintética associada ao colágeno bovino (Col.HAP-91®) e um grupo controle somente com coágulo sanguíneo. Os resultados obtidos demonstraram que os espécimes em que foi utilizada a membrana de colágeno porcina (Bio-Gide®) obtiveram uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado em 30 dias. Aos 60 dias verificou-se tecido ósseo neoformado preenchendo praticamente toda a cavidade e a presença de membrana remanescente em fragmentos.

Nos espécimes que receberam a membrana de hidroxiapatita sintética associada ao colágeno bovino (Col.HAP-91®) verificou-se em 30 dias que alguns espécimes apresentaram degradação da membrana, outros porém, apresentavam a membrana quase íntegra. Nota-se a presença de tecido conjuntivo fibroso organizado e intercalado com neoformação óssea e pequenas partículas de grânulos de hidroxiapatita envolvidos por neoformação óssea (menor quando comparada com a Bio-Gide®). Já em 60 dias alguns espécimes tiveram o defeito todo preenchido por tecido ósseo e outros quase fechados, observando-se a presença de periósteo, fragmentos da membrana e grânulos de hidroxiapatita, demonstrando ativo processo de remodelação óssea. Em seu estudo, Brunel et al. (2001) submeteram 14 pacientes

a procedimentos de ROG com membrana de colágeno e enxerto de hidroxiapatita e após 8 meses, também encontraram importante quantidade de grânulos residuais de hidroxiapatita, além de ativa reabsorção óssea e osteócitos, o que garantiu bons resultados (QUESADA; BRENNER; FELTRACO, 2011).

A hidroxiapatita tem boa condutibilidade óssea (NANDI *et al.,* 2008), a qual influencia na sua velocidade de reabsorção, sendo regulada principalmente pela porosidade do material. O contato direto e estável da hidroxiapatita com o osso estimula a osteogênese e, portanto, a sua osteointegração (SHIRANE *et al.,* 2010). O grau de reabsorção e o tempo que a membrana permanecerá no organismo cumprindo a função de barreira para a ROG são fatores extremamente importantes (SILVA; OLIVEIRA; SOUZA, 2014). Em nosso estudo nota-se que a presença da hidroxiapatita na membrana Col.HAP-91®, não alterou a biocompatibilidade e não induziu nenhuma reação inflamatória importante que pudesse interferir na osteopromoção, mas sim contribuiu para o processo de ROG, pois ao redor dos grânulos pudemos observar a presença de tecido ósseo neoformado.

Membranas absorvíveis têm obtido resultados satisfatórios (DUPOIRIEUX *et al.*, 2001) e as membranas de colágeno vêm sendo cada vez mais utilizadas por serem biocompatíveis, absorvíveis e por permitirem colonização por células osteogênicas (SILVA; OLIVEIRA; SOUZA, 2014). Esses resultados positivos podem estar associados com as particularidades do colágeno, um polímero natural, que permite a fácil manipulação das membranas e consequente facilidade de adaptação desta no defeito, além de função hemostática, semipermeabilidade permitindo a passagem de nutrientes, quimiotaxia por fibroblastos quando há reação inflamatória e alta resistência e estabilidade que o habilita como um bom material para ROG, tendo a sua eficiência comprovada como barreira em vários estudos (QUESADA; BRENNER; FELTRACO, 2011; SHIRANE *et al.,* 2010; SILVA; OLIVEIRA; SOUZA, 2014; ZITMANN; NAF; SCHARER, 1997).

As membranas absorvíveis provenientes do colágeno representam um avanço da implantodontia. Tanto a membrana Bio-Gide® como a Col.HAP-91®, apresentaram resultados similares quanto à neoformação óssea aos 7 e 15 dias pós operatório. Aos 30 dias a membrana Bio-Gide® apresentou um salto de neoformação óssea maior quando comparada a Col.HAP-91®, entretanto aos 60 dias foi possível

constatar que ambas apresentaram resultados satisfatórios, cumprindo seu papel de barreira mecânica e consequentemente favorecendo a eficácia da regeneração óssea guiada.

Entretanto, a presença de grânulos de hidroxiapatita na sua composição permitiu que parte desses grânulos ficassem no interior do coágulo e/ou tecido de granulação, o que em última análise também funcionou como um material osteocondutor nesse processo de neoformação óssea ao final do período de 60 dias, permitindo observar um defeito ósseo praticamente fechado em muitos espécimes.

Desta forma, podemos verificar que essa membrana realizou duas funções nesse processo de regeneração óssea: osteopromoção quando protegeu o defeito no seu papel de barreira física e de osteocondução devido a presença dos grânulos de HA que auxiliaram na neoformação óssea ao redor dos grânulos no interior do tecido de granulação.

6 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que a membrana de colágeno bovino associada à hidroxiapatita (Col.HAP-91®) cumpriu sua função de barreira promovendo a ROG em defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO-ANDRADE, R. *et al.* Bases clínicas e biológicas da regeneração óssea guiada (ROG) associada à barreiras ou membranas. **Revista Bra de Implant e Prótese sobre Implantes**., v. 11, n. 43, p. 251-257, 2004.

ARMENTANO, I. *et al.* Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. **Polym. Deg. Stabil**., v. 95, n. 11, p. 2126-2146, 2010.

BECKER, W. *et al.* Immediate placement as titanium implants into fresh extraction sockets protected by e-PTFE membrane barriers: A clinical multicenter study. **Int J Oral Maxillofac Implants**., v. 9, n.1, p. 31-40, 1994.

BOSTMAN, O. M. Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants. **J. Bone Joint Surg. Br**., v. 73, n. 4, p. 679-682, 1991.

BRUNEL, G. *et al*. Bioabsorbable Materials for Guided Bone Regeneration Prior to Implant Placement and 7-Year Follow-up: report of 14 cases. **J periodontal**., v. 72, n. 2, p. 257-264, 2001.

BUSER, D. **20 years of guided bone regeneration in implant dentistry**. 2. ed. Chicago: Quintessence, 2010.

BUSER, D. *et al.* Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 1, n. 1, p. 22-32, 1990.

CAFESSE, R. G. *et al*. New Attachment Achieve guided tissue regeneration in beagle dogs. **J. Periodontol**., v. 59, n. 9, p. 589-594, 1988.

CORTELLINI, P.; PINI PRATO, G.; TONETTI, M. S. Periodonto regeneration of human infrabony defects. **J. Periodontol.**, v. 64, n. 4, p. 261-268, 1993.

CUI, W. *et al.* Hydroxyapatite nucleation and growth mechanism on electrospun fibers functionalized with different chemical groups and their combinations. **Biomaterials**, v. 31, n. 17, p. 4620- 4629, 2010.

DAHLIN, C. *et al.* Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique: an experimental study in monkeys. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg Hand. Surg**., v. 24, n. 1, p. 13-19, 1990.

DUPOIRIEUX, L. *et al.* Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**., v. 30, n. 1, p. 58-62, 2001.

FOOK, A. C. B. M.; APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. **Matéria (Rio J.)** vol.15 no.3 Rio de Janeiro, 2010.

IMBRONITO, A. V.; CHAVEZ, V. E. A. TODESCAN, J. I. Regeneração óssea guiada:

revisão da literatura. **Periodontia Rev.**, v. 10, n. 2, p. 45-50, 2001.

MINABE, M. *et al.* Clinical significance of antibiotic therapy in guided tissue regeneration with bioresorbable membrane. **Periodontal Clin. Investig**., v. 23, n. 1, p. 20-30, 2001.

NANDI, S. K. *et al.* Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. **J. Vet. Sci**., v. 9, n. 2, p. 183-191, 2008.

NIRMALA, R. *et al.* Structural, thermal, mechanical and bioactivity evaluation of silver-loaded bovine bone hydroxyapatite grafted poly(ε- caprolactone) nanofibers via electrospinning. **Surf. Coat Technol**., v. 205, n. 1, p. 174-181, 2010.

PARK, J. W. *et al.* Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: a pilot study. **J. Biomed. Mater. Res**., v. 87, n. 1, p. 203-214, 2008.

PHILLIPS, J. H.; RAHN, B. A. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft resorption. **Plast. Reconstr. Surg**., v. 82, n. 5, p. 872-877, 1988.

QUESADA, G. A. T.; BRENNER, F. B.; FELTRACO, L. T. Análise das membranas de colágeno bovino, comparativamente às membranas de politetrafluoretileno expandido, como barreira de proteção em regenerações ósseas guiadas para posterior colocação de implantes e no tratamento de periimplantes com e sem o uso de enxertos bovinos. **Rev. Dentística on line**, v. 10, n. 20, p. 29-38, 2011.

ROTHAMEL, D. *et al.* Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. **Clin. Oral Implants Res**., v. 16, n. 3, p. 369-378, 2005.

SCHENK, R. K. *et al.* Healing pattern Membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **Int. J. Oral Maxilofac. Implants**, v. 9, n. 1, p. 13- 29, 1994.

SCHMITZ, J. P. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a guir membrane of guided bone regeneration case report. **J. Oral Maxillofac. Surg**., v. 58, n. 8, p. 888-893, 2000.

SHIRANE, H. Y. *et al.* Implantes de biomateriais em falha óssea produzida na fíbula de ratos. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 45, n. 5, p. 478-482, 2010.

SILVA, E. D.; OLIVEIRA, L. J.; SOUZA, P. E. A. Membranas de colágeno em Implantodontia: revisão de literatura. **Arq. Bras. Odontol**., v.10, n. 1, p. 26-31, 2014.

TRENTIN, M. S.; SHIBLIN, J. A. Bases clínicas e biológicas da regeneração óssea guiada (ROG) associada à barreiras ou membranas. **Rev. Bras. Implantodont. Prótese Implante**., v. 11, n. 43, p. 251-257, 2004.

WILSON, G. J.; WEBER, B. A. A compliant Corethane/Dacron composite vascular

prosthesis: comparison with 4-mm ePTFE grafts in a canine model. **J. ASAIO**., v. 39, n. 3, p. 526-531, 1993.

WUTTICHAROENMONGKOL, P.; PAVASANT, P.; SUPAPHOL, P. Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles. **Biomacromolecules**., v. 8, n. 8, p. 2602-2610, 2007.

ZITZMANN, N. U.; NAF, R.; SCHARER, P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**., v. 12, n. 6, p. 844-852, 1997.

ANEXO

Comitê de ètica em Experimentação em Animais

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

ceua unesp araçatuba

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Análise histológica, histométrica, imunoistoquímica e micro-CT da osteopromoção em defeitos críticos em cálvária de ratos com membrana de colágeno bovino e membrana de colágeno porcino"**, Processo FOA nº 01062-2017, sob responsabilidade de Ana Paula Farnezi Bassi apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 12 de Dezembro de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Fevereiro de 2020.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Março de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Histological, histometric, immunohistochemical and micro-CT analysis of osteopromotion in critical defects in calvaria of rats with bovine collagen membrane and porcine collagen membrane"**, Protocol FOA nº 01062-2017, under the supervision of Ana Paula Farnezi Bassi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 12, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 01, 2020.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 01, 2020.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais