



STÉFANI CAROLINE FERRIOLLI

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO EM DEFEITOS CRÍTICOS
DE CALVÁRIA DE RATOS COM USO DE DUAS MEMBRANAS DE
CORTICAL ÓSSEA BOVINA COM DIFERENTES ESPESSURAS.
ANÁLISES HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA**

STÉFANI CAROLINE FERRIOLLI

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO EM DEFEITOS CRÍTICOS
DE CALVÁRIA DE RATOS COM USO DE DUAS MEMBRANAS DE
CORTICAL ÓSSEA BOVINA COM DIFERENTES ESPESSURAS.
ANÁLISES HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA**

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 Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Prof. Assoc. Dra. Ana Paula
Farnezi Bassi

**ARAÇATUBA - SP
2020**

Aos meus pais, Simone e Júlio,

Dedico mais essa etapa que concluo na minha vida. Com todo amor, admiração e gratidão pelo incansável apoio ao longo de toda minha jornada e por fazerem sempre de tudo para que esse sonho fosse possível. Vocês são (e sempre serão) meus maiores e melhores exemplos. Amo muito vocês, infinitamente...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus,

Todos os dias porque em nenhum dia ele me deixou só. Por ter me guiado, me iluminado e me dado forças em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis da minha trajetória. Eu não tenho palavras para agradecer sua Misericórdia e seu Amor para comigo. Mesmo que eu não mereça, sempre está ali me amando, me guiando e me permitindo viver sua infinita misericórdia. Por todas as bênçãos que tenho recebido e por tudo que ainda está por vir.

Agradeço aos meus pais,

Mais do que dedicar, preciso agradecer a eles por todo amor, paciência, apoio e educação. Também agradeço por toda a compreensão nos momentos em que estive ausente em datas especiais para tornar esse sonho real. Por sempre terem me dado todo o suporte, ensinamentos e conselhos necessários desde meu início de vida para que eu chegasse até aqui. Não há palavras que expressem o quanto sou grata por ter vocês como pais! Eu amo vocês para sempre!

Agradeço a minha irmã,

Dra Evelin Ferriolli, por sempre estar ao meu lado e dividir comigo o prazer e os desafios dessa profissão maravilhosa. Obrigada por me ensinar muito todos os dias, é um privilégio ter você em minha vida e um orgulho te chamar de irmã. Amo você.

Agradeço aos meus avós,

Pessoas maravilhosas, de muita luta, que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Agradeço meu tio, Richard e minha tia, Iandra,

Pelo apoio e cuidado comigo desde pequeninha. Por sempre estarem ao meu lado e torcendo por mim a cada vitória, com muito amor e carinho, amo vocês.

Agradeço minhas tias,

Mulheres de força, garra e perseverança. Pessoas maravilhosas que sempre me apoiaram e torceram por mim. Por serem inspirações em minha vida.

Agradeço meus primos,

Irmãos que a vida me deu, que sempre estiveram ao meu lado e torceram por mim, comemorando a cada conquista minha. Obrigada por todo o carinho e apoio. Assim como agradei meus pais, agradeço a vocês por toda a compreensão nos momentos em que estive ausente em datas especiais para a conclusão dessa etapa e por fazerem dos momentos que estávamos juntos, únicos e especiais. Com certeza vocês também foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Amo vocês demais.

Agradeço minhas amigas de infância, Daniela Francischetti e Marina Francischetti,

Que estão ao meu lado desde sempre e torcendo por mim, me viram lutando desde o início e depois que comecei o caminho, mesmo distantes fisicamente, sempre transmitiram o carinho a alegria e amizade. Sou muito grata por ter vocês em minha vida. Amo vocês.

Agradeço aos meus amigos do projeto social, Amigos do Sopão,

Por torcerem por mim, por todos os momentos e por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Agradeço à Professora Dra. Ana Paula Farnezi Bassi,

Minha orientadora, obrigada por ter me aceitado como sua orientada tanto de Iniciação Científica como de TCC e por ter me deixado aprender tanto contigo. Pela oportunidade de acompanhar a clínica de Cirurgia em 2019 e por me fazer amar essa especialidade. Te agradeço muito por isso e espero um dia ser pelo menos um pouco da profissional que és.

Agradeço ao Professor Dr. Leonardo Perez Faverani,

Por todos seus ensinamentos, carinho e generosidade comigo... sempre muito disposto a ajudar! Muito obrigada por todas as conversas e conselhos, professor. És um exemplo de docente para mim.

Agradeço ao Prof. Stefan Fiuza de Carvalho Dekon

Por toda paciência e carinho, que nos anos de convivência, me ensinou muito, contribuindo para meu crescimento não só intelectual mas também pessoal. Por ter me acolhido como participante do Projeto Rondon e por toda a experiência e lição de vida que esse projeto incrível me trouxe.

Agradeço ao Prof Wilson Galhego Garcia Jr.,

Que sempre me estendeu as mãos em todos os projetos e contribuiu muito para meu crescimento tanto intelectual quanto pessoal.

Agradeço ao Dr. Vinicius Ferreira Bizelli,

Por toda paciência, carinho e colaboração na elaboração dessa tese.

Agradeço ao Dr. Márcio Luiz Ferro,

Por toda amizade, carinho, paciência em ensinar. Por ter me dado a oportunidade de acompanhar de perto seu trabalho e conhecer um pouco mais o profissional e pessoa incrível que és. Por todos os ensinamentos no consultório e por me motivar a ser sempre melhor na odontologia. Você é inspiração e espero ser uma profissional de excelência como tu és. Gratidão por tanto.

Agradeço a toda equipe do Instituto RMF,

Dr. Marcio Ferro, Dra. Amanda Valente, Dra. Camila Tavares, Dr. Vitor Santana, Dr. Guilherme Bergamo, Ingrid Theodoro, Daiane Fulaneto, Giovana Zambuza e Amanda Borges. Obrigado por sempre iluminar e alegrar meus dias, por me acolherem nessa família maravilhosa. Sou muito grata por poder compartilhar minha evolução com vocês e principalmente por aprender cada dia mais com cada um. Amo todos demais....

Agradeço a todos os demais professores,

Que passaram tanto pela minha vida escolar quanto acadêmica, os quais contribuíram para a minha formação pessoal e profissional e que me auxiliaram a chegar até aqui.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Pela oportunidade e excelente formação; estendendo os meus cumprimentos a todos os funcionários, em especial ao Seu Pedro da manutenção, que sempre me socorreu, Luciana, Gustavo, João e Edna da esterilização; Gabi, Sueli e Ivete do CDMAC por todas as vezes que não mediram esforços para nos auxiliar.

Agradeço às pessoas que a Faculdade de Odontologia de Araçatuba me proporcionou conhecer e me aproximar, em especial...

Dona Lídia de Oliveira,

Por todo amor, carinho e cuidado que teve para mim, durante todos esses anos, minha segunda mãe aqui em Araçatuba. Por me receber tão bem, junto a sua família, sempre com muita calma e alegria, por todas as conversas, conselhos, cafés da tarde. Por preparar sempre os melhores pratos e bolos deliciosos, principalmente naqueles dias que estávamos meio desanimadinhas, vinha com uma surpresa deliciosa para nos alegrar, responsáveis pelos meus quilinhos a mais durante a graduação. Tenho um amor e gratidão enorme por todos vocês, por tudo o que vivi na Pensão Oliveira e com certeza levarei todos em meu coração.

Fernanda de Souza Camilo,

Por estar comigo em todos os momentos desde que cheguei em Araçatuba, minha companheira de quarto no primeiro ano, que aguentava todas as minhas ansiedades e desesperos pré prova, minha conselheira, minha salvadora, minha irmã mais velha, mesmo sendo a mais nova. Por sempre estar ao meu lado, independente da circunstância, por sempre cuidar de mim e por me ensinar a ser uma pessoa melhor e mais consciente. Por ter feito parte de uma das experiências mais enriquecedoras da minha vida, o Projeto Rondon. Você é extremamente especial para mim e com certeza meu presente de Deus nessa jornada, que levarei para vida toda. Amo você.

Mirela Caroline Silva,

Por fazer parte dessa jornada, me ajudar sempre em minhas dificuldades, estudando comigo inúmeras vezes altas horas da madrugada. Por me aconselhar, me deixar sempre mais próxima de Deus, por ser minha dupla e aguentar minha pressão caindo, segurando as pontas, por todos os momentos vividos, todas as risadas, por ser uma irmã para mim que eu vou levar para vida. Amo você.

Beatryce dos Santos Sanchez,

Por fazer parte desta jornada, por sempre torcer e lutar ao meu lado. Por todos os conselhos, toda paciência e carinho, por tornar essa jornada mais leve e por ter me mostrado esse lado maravilhoso da maternidade com o mais novo amor da tia, o mascotinho da turma, Henrique. Amo vocês demais.

Ana Maira Pereira Baggio,

Por fazer parte desta jornada, tornado a mais alegre, feliz e representar o interiorzão comigo, por sempre estar ao meu lado e torcendo por mim, por essa parceria, todos os conselhos, por todas as idas e vindas da nossa terrinha. Amo você

Ana Carolina Ribeiro,

Por fazer parte desta jornada, tornando a mais rosa, incrível e muito divertida, por todos os conselhos, por todo carinho, paciência, por aguentar minhas bagunças no quarto, por toda essa parceria de sempre topar tudo, por me ensinar a ser uma pessoa melhor, mais firme e calma. Amo você e vou levar para sempre.

Gabriela Bethânia Dietz de Oliveira,

Por fazer parte desta jornada tornando a muito mais fácil, me ajudar demais sempre, por todos os conselhos, puxões de orelha, por todas as conversas, desabafos, risadas, por todos os momentos que vivemos, por ser minha irmã mais velha aqui. Eu vou levar para sempre, gratidão demais por tudo. Amo você.

Warley Campos de Oliveira

Por fazer parte desta jornada, tornando a muito mais divertida, por ser meu parceiro sempre, por todas as risadas e momentos compartilhados, com certeza mais que um amigo, eu ganhei um irmão e vou levar para vida toda. Amo você

Agradeço também a Maria Clara R. Braz, Giovanna Benini, Izadora Delfraro, Camila Carneiro, Ana Carolina Lima, Larissa Raniero, Livia Romanini, Amanda Maslem, Carol Naomi, Carolina Hatty, Murilo Carvalho, Arthur Belão, Samyra Dote, Letícia Carpaneji, Isabela de Deus, Beatriz Alexandrelli e todas as meninas que já passaram pela Pensão Oliveira. Pela amizade durante a faculdade... muito obrigada por tudo que passamos juntas, vocês estarão sempre no meu coração.

A maioria das pessoas imagina que o importante, no diálogo, é a palavra. Engano, e repito: - O importante é a pausa. É na pausa que duas pessoas se entendem e entram em comunhão...

Nelson Rodrigues

FERRIOLLI, S. C. **Avaliação do processo de reparo em defeitos críticos de calvária de ratos com uso de duas membranas de cortical óssea bovina com diferentes espessuras. Análises histológica e histométrica.** 2020. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O uso de membranas que auxiliem no processo de regeneração óssea guiada (ROG) é também uma vertente dos estudos de biomateriais compatíveis que auxiliam nesse processo de reparo. O objetivo do trabalho foi avaliar e comparar por meio de estudo microscópico histológico e histomorfométrico o potencial de regeneração óssea de membranas de origens e espessuras diferentes em defeitos críticos criados em calvária de ratos. Para realizar a pesquisa, foram utilizados quarenta e oito ratos Albinus Wistar divididos em quatro grupos, (n = 12): GC – grupo livre de membrana (somente coágulo, controle negativo); BG – grupo membrana de colágeno porcino, (Bio-Gide® - controle positivo); GD – grupo membrana de cortical óssea bovina mais delgada (Gen-Derm® - grupo teste 1) e GDF - grupo membrana de cortical óssea bovina mais espessa (Gen-Derm Flex® - grupo teste 2). As eutanásias foram realizadas nos períodos experimentais de 30 e 60 dias pós operatórios. Os dados quantitativos da análise histométrica foram submetidos aos testes de ANOVA 2-fatores e pós teste Tukey $p < 0.05$; intervalo de confiança 95%. Os resultados histomorfométricos da membrana de cortical óssea bovina mais espessa (GDF) aos 30 e 60 dias foram promissores, demonstrando ótima capacidade de neoformação óssea ($p < 0.05$). O grupo GD apresentou resultados inferiores em ambos períodos experimentais, sendo superado pelos grupos BG e GDF ($p > 0.05$), contudo, também auxiliou no processo de ROG. No entanto, todas as membranas estudadas nesta pesquisa promoveram a ROG, sendo que esse processo foi melhor nos grupos controle positivo e test 2.

Palavras-chave: Biomateriais. Regeneração Óssea Guiada. Membranas absorvíveis.

FERRIOLLI, S. C. **Evaluation of the repair process in calvaria defects corrected by rats using two bovine cortical bone membranes with different thicknesses. Histological and histometric analyzes.** 2020. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The use of membranes that assist in the guided bone regeneration process (ROG) is also an aspect of studies of compatible biomaterials that assist in this repair process. The objective of the work was to evaluate and compare, through microscopic histological and histomorphometric study, the potential for bone regeneration of membranes of different origins and thicknesses in critical defects created in rat calvaria. To carry out the research, 48 Albinus Wistar rats were used, divided into four groups, (n = 12): CG - group without a membrane (only clot, negative control); BG - porcine collagen membrane group, (Bio-Gide® - positive control); GD - thinner bovine bone cortical membrane group (Gen-Derm® - test group 1) and GDF - thinner bovine bone cortical membrane group (Gen-Derm Flex® - test group 2). Euthanasias were performed in the experimental periods of 30 and 60 days after surgery. Quantitative data from histometric analysis were submitted to 2-factor ANOVA and Tukey's post-test $p < 0.05$; 95% confidence interval. The histomorphometric results of the thicker bovine bone cortical membrane (GDF) at 30 and 60 days were promising, showing excellent bone neoformation capacity ($p < 0.05$). The GD group showed lower results in the two experimental periods, being surpassed by the BG and GDF groups ($p > 0.05$), but it also helped in the ROG process. However, all membranes studied in this research promoted ROG, and this process was better in the positive control and test 2 groups.

Keywords: Biomaterials. Guided bone regeneration. Absorbable membrane.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Retalho de espessura total descolado expondo a calvária do rato. C. Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital já com a remoção da cortical da região de calvária	24
FIGURA 3 - Cortes histológicos panorâmicos corados em eosina e hematoxilina, mostrando a área total do defeito com uso de membranas (Bio-Gide, Gem Derm, Gem Derm Flex e coágulo). Aumento original de 6,3X	26
FIGURA 4 - Corte longitudinal obedecendo a margem de segurança ao redor de todo o defeito, separando-o. Obs: Defeito ósseo em duas partes iguais para a inclusão em parafina no mesmo bloco	26
FIGURA 5 - Corte representativo de 6 µm de cada bloco de parafina, já montados em lâminas para análise	28
FIGURA 6 - Secção panorâmica histológica corada com Hematoxilina e Eosina. As imagens mostram a área central do defeito de cada grupo (GD), (GFD) e (BG) em uma magnificação de 25x para os tempos de 30 (A) e 60 (B) dias, respectivamente	29

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Área de Osso neoformado para os grupos experimentais aos 30 e 60 dias.....	33
---	-----------

LISTA DE SIGLAS

µm	Micrômetro
AON	Área de osso neoformado
BG	Bio-Gide®
e- PTFE	Politetrafluoretileno expandido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GC	Grupo controle
GD	Gen-Derm®
GDF	Gen-Derm Flex®
HE	Hematoxilina e Eosina
JPEG	Joint Photographic Experts Group
mm	Milímetro
n =	Número de ratos
PH	Potencial Hidrogeniônico
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante
ROG	Regeneração óssea guiada
RTG	Regeneração tecidual guiada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 PROPOSIÇÃO.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Análise Histológica/Histomorfométrica.....	26
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Avaliação morfológica (microscópica).....	28
4.2 Análise histométrica.....	32
5 DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
ANEXOS.....	43

1 INTRODUÇÃO

O interesse em realizar técnicas cirúrgicas que corrigissem defeitos ósseos dos rebordos alveolares e superar as contra-indicações às próteses implanto suportadas tiveram seu início no fim da década de 80 início da década de 90. As técnicas propostas incluíam aumento vertical de rebordo com enxerto autógeno retirado de crista ilíaca tanto para reconstruções de maxila quanto de mandíbulas atroficas, levantamento de seios maxilares, enxertos onlay, para aumento em espessura ou técnicas de divisão da crista e plastia da extensão alveolar.¹⁻² Nesse mesmo período a técnica de regeneração óssea guiada (ROG) utilizando-se as membranas, com base nos casos relatados e de estudos clínicos a curto prazo da regeneração em defeitos ósseos em pacientes com implantes passaram a ser discutidos e realizados com frequência.³⁻⁸

Certamente o uso das membranas para pacientes com implantes foi desencadeada pela aplicação clínica da regeneração periodontal conhecida como regeneração tecidual guiada (RTG), que teve seu início nos anos 80 com Nyman et al.¹⁻² O objetivo do uso dessas membranas foi demonstrado por vários estudos em animais que documentaram a possibilidade de selecionar células de determinados tecidos e impedir que células de outros tecidos repopulassem uma ferida.⁹⁻¹¹ Posteriormente, estudos foram realizados com o uso de membranas para a regeneração apenas de tecido ósseo, sendo esse processo denominado regeneração óssea guiada (ROG).¹²

Um dos primeiros trabalhos a estudarem esse processo foi descrito por Dahlin et al.¹³ que avaliaram o potencial de regeneração óssea utilizando membranas em defeitos previamente criados e preenchidos por tecido conjuntivo fibroso. Após 12 semanas tal tecido foi removido e os defeitos foram recobertos com membranas. Após seis semanas, todos os defeitos estavam preenchidos por tecido ósseo.

A técnica denominada de Regeneração Óssea Guiada (ROG), se baseia no conceito de osteopromoção e é caracterizado 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. A ROG também auxilia no direcionamento da formação óssea.¹¹

Desta forma a membrana é colocada em contato direto com o defeito ósseo circundante posicionando o periósteo sobre a mesma. A literatura mostra que certos tecidos no interior do organismo possuem potencial biológico para regeneração, sempre que exista um ambiente adequado durante a cicatrização.¹⁴ As principais indicações do uso das membranas biológicas em processos de ROG são: correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais¹⁵; alvéolos após exodontias¹⁶; deiscência e fenestrações após colocação de implantes mediatos e imediatos.¹⁷

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 da membrana neste espaço (sendo este espaço crítico) e desta forma que este seja preenchido por um coágulo sanguíneo, já que nele as células osteogênicas irão se multiplicar; as membranas devem possuir propriedades de permeabilidade que permita a difusão de plasma e nutrientes, porém não a passagem de células não osteogênicas; biocompatibilidade da membrana; proteger a delicada rede vascular durante a organização do coágulo.¹⁸

Para criação e manutenção do volume desse espaço bem como de uma geometria adequada, a membrana deve suportar seu peso e resistir à pressão dos tecidos adjacentes e forças externas, como a mastigação. O colapso da membrana está diretamente relacionado com a eliminação do espaço. A manutenção do espaço durante todo processo de cicatrização depende, também, da integridade física da membrana. Uma membrana deve ter rigidez suficiente (memória), para criar o espaço, entretanto deve também adaptar-se ao contorno ósseo, permitindo que retorne à sua forma, já que o mesmo não possui memória. Quanto melhor a adaptação da membrana, mais completa será a regeneração.¹⁹

Segundo Andrade-Acevedo et al.¹¹ os problemas mais frequentemente associados à ROG e uso de membranas são: colapso total ou parcial da membrana;

exposição da membrana por deiscência do tecido mole (infecção local); baixo nível de habilidade técnica do profissional. Entre as possibilidades existentes no mercado de membranas temos as absorvíveis e não absorvíveis. As primeiras membranas para ROG foram as não reabsorvíveis. Elas requeriam uma cirurgia subsequente para removê-las e eram frequentemente associadas à exposição, que consequentemente arriscava o sucesso clínico.²⁰ Atualmente, o material de membrana mais pesquisado e utilizado em procedimentos de ROG é constituído por uma estrutura especificamente formada por politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), que não pode ser quebrada quimicamente em condições fisiológicas. Apesar da alta previsibilidade de regeneração óssea com utilização de membranas de e-PTFE, a principal desvantagem é que sua exposição pode causar contaminação bacteriana. A reação inflamatória da área pode levar a necessidade de remoção precoce da membrana.²¹ Vários autores têm relatado uma redução na quantidade de osso regenerado nessas situações.²¹⁻²³

Com relação as membranas absorvíveis, estas devem sofrer reabsorção e degradação macromolecular por meio da associação de hidrólise e degradação enzimática, processo que ocorre na presença de enzimas como a fosfatase ácida e collagenase. A biorreabsorção requer total eliminação dos produtos da degradação sem efeitos residuais locais.²⁴ Estas membranas foram criadas no intuito de eliminar um segundo tempo cirúrgico. Além disso, esses biomateriais têm sido alvo de intensa investigação. Uma nova geração de membranas constituídas de copolímero de polilático e poliglicólico e as de ácido polilático estão sendo estudadas.²⁰

A natureza física e a quantidade de fragmentos gerados por degradação por hidrólise podem ter um efeito significativo na resposta tecidual local, podendo conduzir à uma reabsorção óssea.²⁵ Assim muitos fatores podem interferir na biodinâmica óssea e no reestabelecimento do arcabouço ósseo e a forma de ação desses fatores irão interferir diretamente no reestabelecimento do tecido ósseo neoformado assim como nos resultados estéticos-funcionais.²⁶

Em 2004, Oliveira et al.²⁷ realizaram um trabalho com uma membrana absorvível de cortical de osso bovino mostrando ser bem tolerada pelos tecidos e completamente reabsorvida depois de 30 a 60 dias por células mono e multinucleadas que desaparecem ao final do processo. Recentemente foi lançado no mercado uma

membrana de cortical bovina com uma diferença de espessura com a finalidade de melhorar o processo de ROG. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a ação osteopromotora de 3 tipos de membranas existentes, baseado na metodologia da confecção de defeitos críticos provocados em calvária de ratos.²⁸

2 PROPOSIÇÃO

A proposta deste projeto foi avaliar por meio da análise histológica e histomorfométrica o potencial de osteopromoção de 2 diferentes tipos de membranas: GemDem® (membrana cortical óssea bovina delgada) e GemDerm Flex® (membrana de cortical óssea bovina mais espessa), comparadas com a membrana de colágeno porcino Bio-Guide® no processo de regeneração óssea guiada instaladas em defeitos ósseos críticos de calvárias de ratos aos 30 e 60 dias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Animal processo FOA: 00217-2016 e seguiu as orientações do ARRIVE Guidelines. (Anexo A e B)

Para o desenvolvimento deste projeto, foi utilizado um total de 48 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais serão divididos em quatro grupos (n=12 por grupo), submetidos à eutanásia em dois períodos experimentais, aos 30 (n=6) e 60 (n=6) dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas (3 animais por gaiola), 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 será realizado um defeito ósseo crítico na calvária (8mm), como discriminado a seguir:

- **GRUPO CG (Controle Negativo)** – n=12: O defeito ósseo crítico será preenchido com coágulo sanguíneo sem o recobrimento do defeito, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia).
- **GRUPO BG (GONTROLE POSITIVO)** (Bio-Guide® Geistlich Wolhusen, Switzerland) - n=12: O defeito ósseo crítico será preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia);
- **GRUPO GD (teste 1)** – (Gem-Derm® Baumer, Mogi Mirim/SP, Brasil) - n=12: O defeito ósseo crítico será preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito uma membrana de cortical óssea bovina delgada, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia).
- **GRUPO GDF (teste 2)** – (Gem-Derm Flex® Baumer, Mogi Mirim/SP, Brasil) – n=12: O defeito ósseo crítico será preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de cortical óssea bovina espessa, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia).

A divisão dos grupos experimentais foi realizada pelo método de randomização com loteria manual, no qual, em um envelope, foram colocados 48 papéis com a

nomenclatura de cada grupo. Sendo assim, os animais foram sorteados aleatoriamente.

Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/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%, 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.

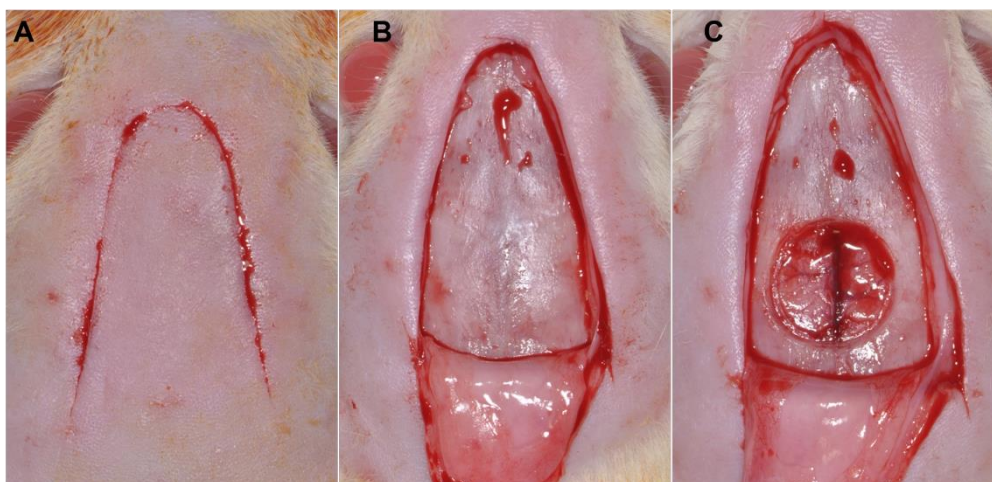
Foram realizadas incisão em V no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2cm, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha). Em seguida com auxílio de broca trefina de 7mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8mm de diâmetro,²⁹ na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 01). De acordo com os tratamentos propostos em cada grupo, os defeitos foram preenchidos. Grupo GC somente com coágulo sanguíneo e os demais grupos preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino para o grupo BG (Bio-Guide® – n=12), com uma membrana de cortical bovino delgada para o grupo GD (Gem-Derm® - n=12)

e com a membrana de cortical bovina mais espessa para o grupo GDF (Gem-Derm Flex® - n=12) (FIGURA 02)

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

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). 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. Retalho de espessura total descolado expondo a calvária do rato. C. Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital já com a remoção da cortical da região de calvária



Fonte: Elaborada pelo autor (2020)

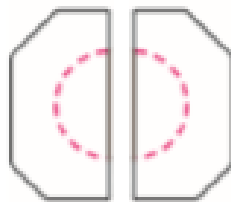
FIGURA 2 Defeito crítico de 8mm. A Coágulo. B. Controle Positivo -Membrana de colágeno porcino (Bio-Guide® Geistlich Wolhusen, Switzerland). C. Grupo Experimental 1 -Membrana de cortical bovina (Gem Derm® Baumer, Mogi das Cruzes/SP) D: Grupo Experimental. 2- Menbrana de cortical bovina espessa (Gem Derm® Flex Baumer, Mogi das Cruzes/SP)



Fonte: Elaborada pelo autor (2020)

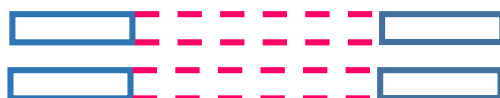
A eutanásia dos animais ocorreu nos períodos de 30 e 60 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico. As calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos (figura 3). As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e receberam cortes de 6µm de espessura sendo assim, montadas em lâminas histológicas para realizar a coloração em hematoxilina e eosina (HE) (figura 4).

FIGURA 2 - Cortes histológicos panorâmicos corados em eosina e hematoxilina, mostrando a área total do defeito com uso de membranas (Bio-Gide, Gem Derm, Gem Derm Flex e coágulo). Aumento original de 6,3X



Fonte: Elaborada pelo autor (2020)

FIGURA 3 - Corte longitudinal obedecendo a margem de segurança ao redor de todo o defeito, separando-o. Obs: Defeito ósseo em duas partes iguais para a inclusão em parafina no mesmo bloco



Fonte: Elaborada pelo autor (2020)

3.1 Análise Histológica/Histomorfométrica

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.) as mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e foram projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas).

Foi avaliada a área de tecido ósseo presente na região central dos defeitos ósseos. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos, de pixels, para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

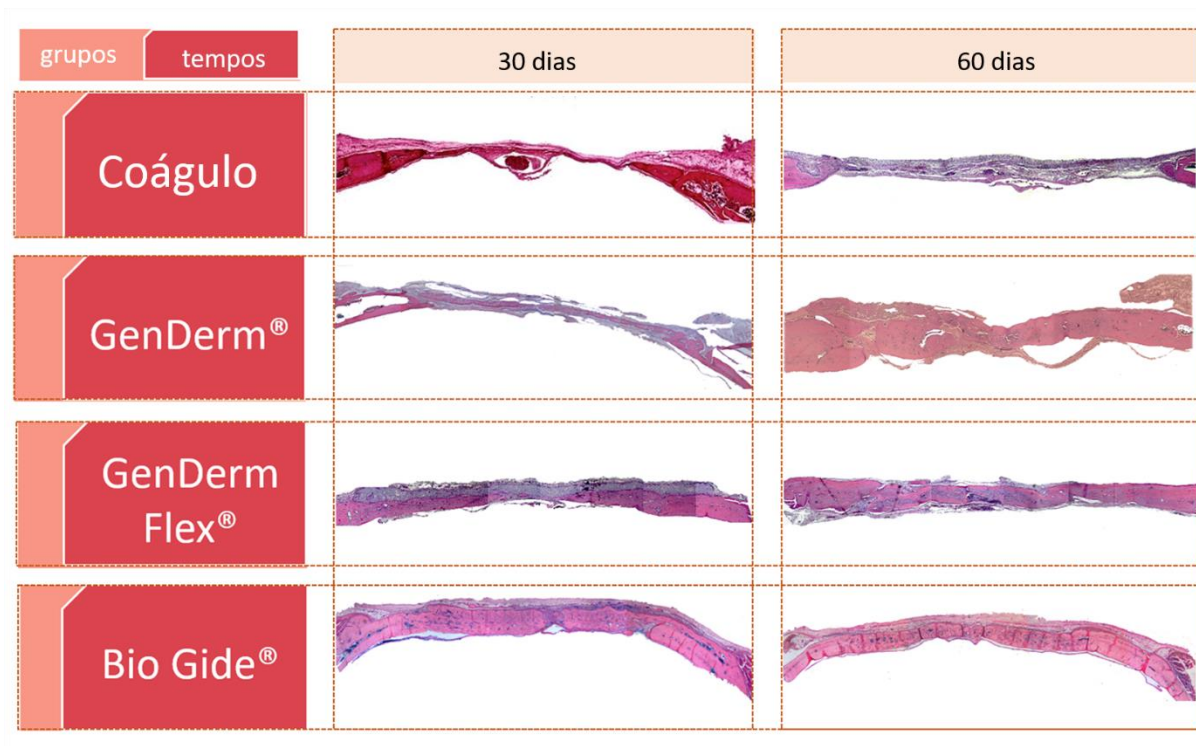
Todos os testes foram realizados no programa estatístico Sigma Plot 12.3 (Systat Software, Inc., San Jose alifornia, USA). Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), o qual identificou se tratar de dados homogêneos ($p > 0,05$). Assim, o teste ANOVA 2 fatores foi aplicado para as interações “membranas versus períodos”. Todas as interações mostraram alterações significantes estatisticamente ($p < 0,05$). Adicionalmente, para a identificação precisa das alterações estatísticas, o pós-teste Tukey foi aplicado, em que para todos os testes, o nível de significância de 5 % foi considerado.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação morfológica (microscópica)

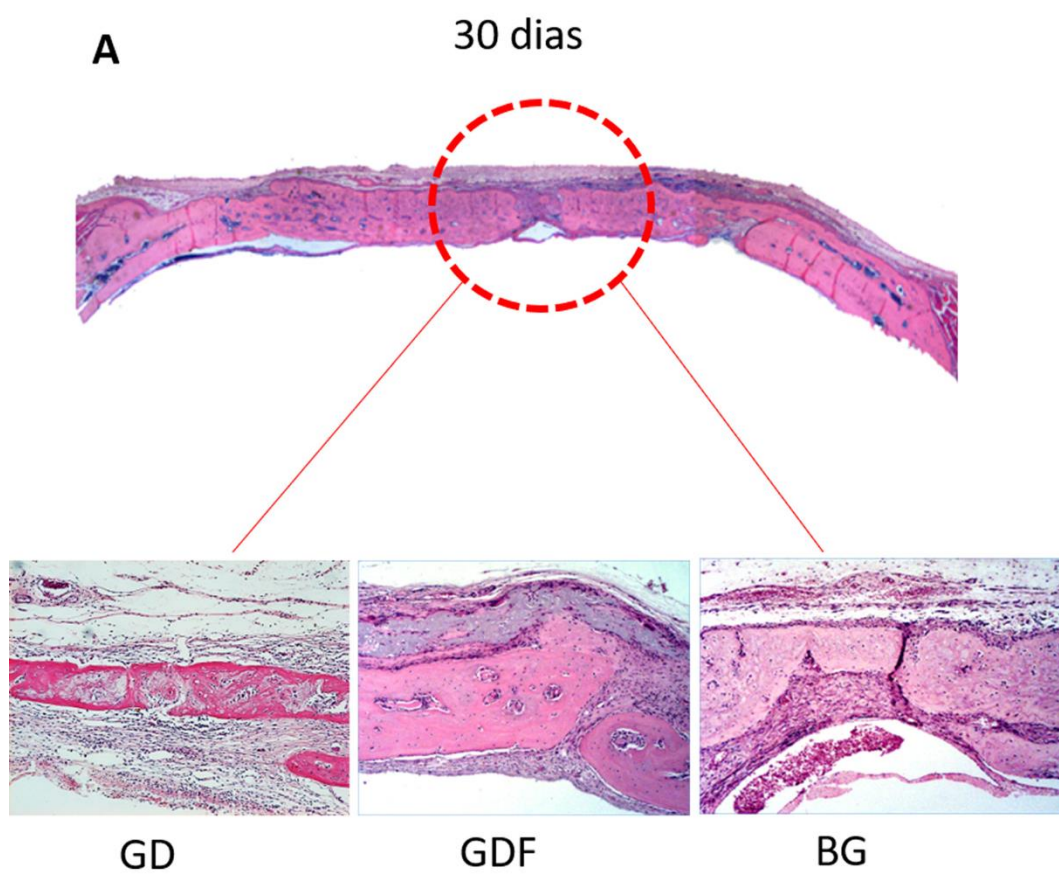
Os resultados foram avaliados por meio de microscópio óptico com padronização da leitura das lâminas para todos os grupos (Figuras 05 e 06 A e B).

FIGURA 4 - Corte representativo de 6 μ m de cada bloco de parafina, já montados em lâminas para análise

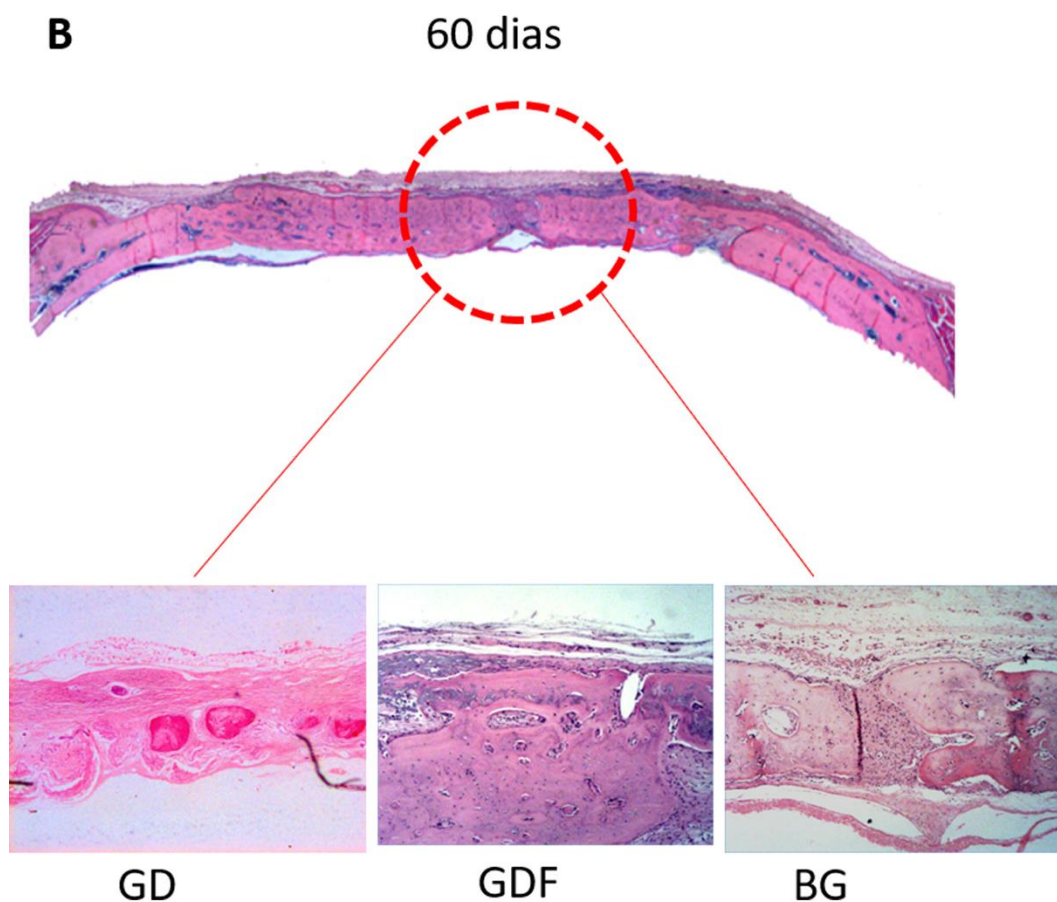


Fonte: Elaborada pelo autor (2020)

FIGURA 5 - Secção panorâmica histológica corada com Hematoxilina e Eosina. As imagens mostram a área central do defeito de cada grupo (GD), (GDF) e (BG) em uma magnificação de 25x para os tempos de 30 (A) e 60 (B) dias, respectivamente



Fonte: Elaborada pelo autor (2020)



Fonte: Elaborada pelo autor (2020)

Grupo GC (controle negativo)

30 dias: Neste período o Grupo Coágulo apresentava uma área óssea neoformada maior próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes estava preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado. Observa-se áreas de osteotomia com os cotos ósseos esquerdo e coto direito com discreta neoformação óssea em suas margens. Ao centro do defeito crítico, entre os cotos, é possível notar ausência de neoformação óssea com o defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso.

60 Dias: Nota-se uma maior aproximação dos cotos do defeito, contudo, sem o fechamento do defeito, sendo o espaço preenchido por um tecido conjuntivo fibroso.

Grupo BG (Bio-Gide® - controle positivo)

30 Dias: Verifica-se uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana de colágeno porcino (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland). 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.

60 Dias: Há imagens da neoformação óssea tanto no coto esquerdo quanto no coto direito como 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.

Grupo GD - (Gen Derm® - teste 1)

30 dias: Área defeito ainda se encontra não reparado, com tecido ósseo em neoformação em direção ao centro do defeito. As imagens em maior aumento demonstram áreas de neoformação óssea ao redor dos fragmentos de membrana.

60 dias: Presença de neoformação óssea em grande parte do defeito, mas sem o fechamento completo do mesmo. Praticamente não se nota a presença mais de fragmentos da membrana. Em um espécime houve o fechamento completo do defeito.

Grupo GDF (Gen-Derm Flex® - teste 2)

30 dias: Nota-se a presença de uma neoformação óssea a partir do coto em direção ao centro do defeito. O remanescente da membrana é observado na parte superior do defeito sendo envolvida por tecido conjuntivo rico em fibroblastos e rico em vascularização. Junto ao coto ósseo, observa-se presença de tecido conjuntivo ainda recoberto pela membrana. Na parte superior do defeito ósseo nota-se a presença da membrana sendo envolvida por tecido ósseo neoformado como também tecido ósseo

no seu interior Adjacente a superfície externa da membrana, pode-se observar algumas células gigantes, e entre a membrana e o tecido ósseo neoformado, observa-se tecido conjuntivo desenvolvido e fibroblastos dispostos paralelamente à membrana. Foi possível verificar em alguns espécimes o fechamento do defeito.

60 Dias: Junto ao coto uma neoformação grande óssea com a presença ainda de remanescente de membrana totalmente envolvida por tecido ósseo no seu interior e exteriormente por tecido conjuntivo fibroso. No centro do defeito em grande parte dos espécimes foi observado o fechamento do defeito, contudo encontramos espécimes onde o defeito não foi fechado. Ainda em maior aumento pode-se observar a presença de células gigantes junto ao remanescente de membrana

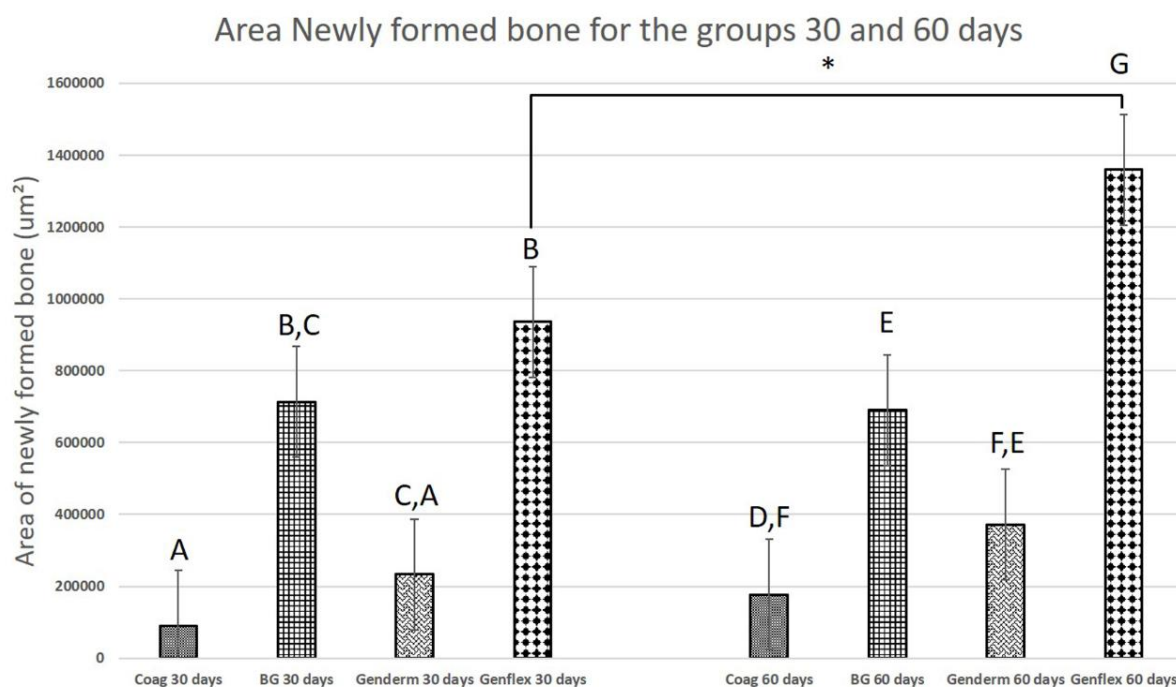
4.2 Análise histométrica

Na análise histométrica, para a evolução cronológica, fator tempo (30 e 60 dias) do reparo ósseo, sendo essa análise intra grupo, apenas o grupo GDF demonstrou diferença estatística significativa (pós teste Tukey $p = 0.021$). Os outros grupos não demonstraram diferença estatística: GC ($p=0,645$); BG ($p=0,896$) e GD ($p=0,442$) porém, nesse último, um potencial de neoformação óssea pode ser observado. Para a análise inter grupos, o grupo GDF demonstrou o melhor resultado para a neoformação óssea comparados com o grupo controle positivo (pós teste Tukey $p=0,01$). Os grupos GD e CG não demonstraram diferença estatística entre si ($p=0,560$).

Independente do período analisado (30 e 60 dias), os maiores valores de AON foram observados para o grupo GDF, com resultados similares ao grupo BG, seguidos do grupo GD e GC.

(Genderm Flex[®]>BG[®]>Genderm[®]> Coágulo) ($p<0,05$).

GRÁFICO 1 - Área de Osso neoformado para os grupos experimentais aos 30 e 60 dias



Fonte: Elaborada pelo autor (2020)

5 DISCUSSÃO

O objetivo primário da ROG é a obtenção de uma regeneração óssea bem sucedida na área de defeito ósseo com alta previsibilidade e baixo risco de complicações. Secundariamente procura-se com a ROG obter um resultado bem sucedido com menor número de intervenções cirúrgicas, baixa morbidade para o paciente e um período de reparo diminuído. É notório que nos últimos 20 anos, progressos significativos ocorreram no desenvolvimento de técnicas e material para que a ROG ocorra de forma esperada.³⁰⁻³¹

Quando é realizado defeito controle (coágulo sem membrana), o processo de reparo ocorre de forma padrão, ou seja, a formação óssea fica restrita às margens dos defeitos, sendo que o centro do defeito fica reparado por um tecido conjuntivo fibroso. Quando uma membrana é utilizada, está resulta em uma mudança na quantidade de osso e regeneração tecidual, ou seja, o espaço criado durante a cirurgia separou o compartimento interno do externo, sendo que o interno preenchido inicialmente por coágulo sanguíneo passa por um processo de cicatrização e no final há maior neoformação óssea dos grupos onde a membrana foi utilizada em relação ao grupo sem membrana.³²

A questão é: Existe diferenças no padrão e na quantidade de neoformação óssea com diferentes tipos de membranas? Atualmente existe no mercado uma grande variedade de membranas para ROG. Para selecionar o material mais adequado, estes deverão estar baseados nas necessidades clínicas além de ter que apresentar algumas características básicas, entre elas a biocompatibilidade, oclusão celular, integração tecidual, formação e manutenção do espaço, manejo clínico na cirurgia e suscetibilidade limitada às complicações.^{33,34}

Pelo resultado obtido nesta pesquisa foi possível observar que a membrana denominada como grupo controle positivo (Bio-Gide®) manteve seu alto nível de atuação já tão bem descrito na literatura^{35,36} em comparação as membranas testes. O colágeno apresenta muitas vantagens como biomaterial. Além de poder ser preparado em diferentes formas como membranas, filmes e esferas, apresenta como características biológicas: não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, facilmente absorção pelo corpo e baixa antigenicidade.^{37,38}

No entanto, seu custo de purificação é extremamente alto e, quando isolado, apresenta alguma variabilidade quanto ao tamanho das fibras, impurezas e densidade de ligações cruzadas que estabilizam a estrutura de suas fibrilas.³⁸ Além disso, o colágeno causa alternância no comportamento celular, sofre contração e suas propriedades mecânicas são inadequadas, por isso devem ser manuseados com cuidado.^{38,39} Outro fator é a variabilidade do colágeno dependendo da fonte, impurezas, variabilidade na degradabilidade enzimática e propriedades de manipulação complexas.⁴⁰

Desta forma, buscar alternativas de materiais que possam assumir a função de barreira é importante. Os resultados obtidos nesta pesquisa tanto pelo grupo experimental 1 (Gem-Derm®) como pelo grupo experimental 2 (Gem-Derm Flex®), mostra que membranas de cortical bovina são adequadas para procedimentos de ROG como também demonstrou Oliveira et al.²⁷ Este fato ficou demonstrado quando é avaliada tanto a histologia quanto a histometria, resultado este que está em concordância com os obtidos por Bernabé et al.⁴¹ Contudo, ao analisar o grupo experimental 1 e o grupo experimental 2 verifica-se que o primeiro obteve uma área de neoformação óssea menor quando comparado com o segundo grupo, que teve um comportamento biológico muito próximo ao do grupo controle positivo (BioGide®). Esse fato foi reforçado pela imunoistoquímica que demonstrou que na análise entre esses dois grupos, ambos se comportaram de forma muito semelhante, tanto na comparação da osteopontina quanto da osteocalcina.

É importante lembrar que os processos de reparos são diferentes. No grupo controle positivo (BioGide®), quando da presença da membrana, ocorre neoformação óssea em forma de grumos sugerindo reabsorção parcial e penetração de tecido ósseo, provavelmente devido a sua alta permeabilidade o que permite a penetração de sangue no seu interior. Não apresenta células gigantes, e o tecido conjuntivo é menos celularizado e há penetração de tecido no seu interior. Parece que há maior neoformação óssea nos grupos com um processo de reabsorção mais rápida. Aos 30 e 60 dias houve fechamento de mais animais, parecendo que o volume ósseo obtido aos 30 dias é mantido até o final do processo de reparo aos 60 dias. Já no grupo experimental 2 (Gem-Derm Flex®), a neoformação óssea é mais progressiva dando a entender que desempenhou o papel de barreira com manutenção do espaço biológico.

Pelas análises das lâminas apresentou um processo de reabsorção mais lenta, e em alguns animais foi possível verificar a presença da membrana quase na integralidade aos 60 dias.

O fator espessura da membrana também parece interferir nos resultados de ROG quando comparamos os dois grupos constituído de cortical bovina (grupo experimental 1 e 2), variando somente a espessura. Foi possível observar que o grupo onde há maior espessura da membrana de cortical bovina (grupo experimental 2), o processo de ROG foi mais efetivo quando comparado ao grupo de espessura mais delgada (grupo experimental 1). Este fato pode estar relacionado a manutenção por mais tempo da integridade da membrana favorecendo o processo reparativo do defeito ósseo.

Desta forma, foi possível verificar neste trabalho que a variação de espessura influenciou significativamente nos resultados, uma vez que a membrana mais espessa permitiu uma quantidade de tecido ósseo neoformado maior que sua similar mais delgada. Assim, parece que a oclusão celular se tornou mais efetiva e com isso os resultados foram mais adequados.

6 CONCLUSÃO

Dentro da metodologia empregada foi possível concluir que as membranas estudadas nesta pesquisa promoveram a ROG em defeitos críticos em calotas de ratos. O grupo controle positivo e o grupo experimental 2 obtiveram melhores comportamentos biológico e maior índice de neoformação óssea no processo de ROG.

REFERÊNCIAS

1. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982;9:290-6.
2. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potencial of periodontal ligament. An experimental study im monkey. *J Clin Periodontol*. 1982;9: 257-65.
3. Lazzara RJ. Immediate implant placement into extraction sites: Surgical and restorative advantages. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1989;9:332-43.
4. Nyman s, Lang NP, Buser D, Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants*..1990;5:9-14.
5. Busser D, Bragger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 1990;1:22-32.
6. Becker W, Becker BE. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1990;10:376-91.
7. Dahlin C, Andersson L, Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 1991;2:159-65.
8. Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone augmentation around titanium dental implants in dehiscd defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992;7:233-45.
9. Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol*. 1988;59:589-94.
10. Imbronito AV, Chaves VEA, Todescan JI. Regeneração óssea guiada: revisão da literatura. *Periodontia Rev*. 2001;10:45-50.

11. Acevedo-Andrade R, Trentin MS, Shiblin JA. Bases clínicas e biológicas da regeneração óssea guiada (ROG) associada à barreiras ou membranas. *Rev Bras Implant Prótese Implantantes*. 2004;11:251-7.
12. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1988;81:672-6.
13. Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1990;24:13-9.
14. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994;9:13-29.
15. Cortellini P, Piniprato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *J Periodontol*. 1993;64:261-8.
16. Wilson GJ, MacGregor DC, Klement P, Weber BA, Binnington AG, Pinchuk L. A compliant Corethane/Dacron composite vascular prosthesis. Comparison with 4-mm ePTFE grafts in a canine model. *ASAIO J*. 1993;39:M526-31.
17. Becker W, Dahlin C, Becker BE, Lekholm U, van Steenberghe D, Higuchi K, et al. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994;9:31-40.
18. Phillips JH, Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. *Plast Reconstr Surg*. 1990;85:891-7.
19. Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 1990;1:22-32.
20. Schmitz JP. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a guide membrane of guided bone regeneration case report. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58:888-93.

21. Jovanovic SA, Nevins M. Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1995;15:56-69.
22. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K, et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol*. 1992;63:929-40.
23. Simion M; Trisi P; Piattelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technic associated with osseointegrated implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1994;14:496-511.
24. Minabe M, Kodama T, Kogou T, Fushimi H, Sugiyama T, Takeuchi K, et al. Clinical significance of antibiotic therapy in guided tissue regeneration with a resorbable membrane. *Periodontal Clin Investig*. 2001;23(1):20-30.
25. Hardwick R; Hayes B.K; Flynn C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. *J Periodontol*. 1995;66:495-505.
26. Stal S, Tjelmeland K, Hicks J, Bhatia N, Eppley B, Hollier L. Compartmentalized bone regeneration of cranial defects with biodegradable barriers: an animal model. *J Craniofac Surg*. 2001;12(1):41-7.
27. Oliveira RC, Menezes R, Cestary TM, Taga EM, Taga R, Buzalaf MAR, et al. Tissue response to a membrane of demineralized bovine cortical Bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. *Braz Dent J*. 2004;15: 3-8.
28. Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20:372-8.
29. Furlaneto FA, Nagata MJ, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messori MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:311-8.

30. Park JW, Bae SR, Suh JY, Lee DH, Kim SH, Kim H, Lee CS. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: a pilot study. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87:203-14.
31. Buser D. 20 anos de regeneração óssea guiada na implantodontia. 2nd ed. São Paulo: Quintessence Editora; 2010.
32. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994;9:13-29
33. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000.1998;17:22-35.
34. Werkmeister JA, Ramshaw JA. Collagen-based biomaterials. *Clin Mater. Mat*. 1992;9:137-8.
35. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol*. 2001;72:215-29.
36. Behfarnia P, Mohammad Khorasani M, Birang R, Abbas FM. Histological and histomorphometric analysis of animal experimental dehiscence defect treated with three bio absorbable GTR collagen membrane *Dent Res J*. 2012;9:574–81.
37. Pati F, Datta P, Adhikari B, Dhara S, Ghosh K, Das Mohapatra PK. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100:1068-79.
38. Vaissiere, G; Chevallay B; Herbage D; Damour O. Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. *Med Biol Eng Comput*. 2000;38:205-10.
39. Kucharz EJ. The Collagens: biochemistry and pathophysiology. In: Kucharz EJ. *Biosynthesis of Collagen*. Berlin: Springer-Verlag; 1992. p. 31-53.

40. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Gryn timer M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater Res*. 2017;21:9.
41. Bernabé PFE, Melo LGN, Cintra LTA, Gomes-Filho JE, Dezan Jr E, Nagata MJH. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clin Oral Impl Res*. 2012;23:384–8.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética em Animal



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos comparando diferentes membranas de colágeno: Bio-Gide®, GenDerm® e GenDerm Flex®. Avaliação histométrica, imunoistoquímica e micro CT", Processo FOA nº 00217-2016, 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 01 de junho de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Outubro de 2017.

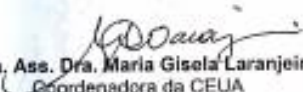
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Novembro de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Repair process evaluation in calvarial defects in rats comparing different collagen membranes: Bio-Gide®, GenDerm® and GenDerm Flex®. Histometrical evaluation, Immunohistochemistry and micro CT", Protocol FOA nº 00217-2016, 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 June 01, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 01, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 01, 2017.


 Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
 Coordenadora da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Aracatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
 Rua José Bonifácio, 1192 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
 Fone (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B - ARRIVE Guidelines



The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

	ITEM	RECOMMENDATION	Section/ Paragraph
Title	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	Title Pg1
Abstract	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	Abstract Pg 2
INTRODUCTION			
Background	3	a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale. b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.	a: 1; P2/P3 b: NA
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	1 Pg
METHODS			
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal (Scientific Procedures) Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	2 P1
Study design	6	For each experiment, give brief details of the study design including: a. The number of experimental and control groups. b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when). c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals). A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.	a: 2 P2 b: 2 P2 c: 2 P2
Experimental procedures	7	For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example: a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s). b. When (e.g. time of day). c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze). d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug doses used).	a: 2.1 P1- P8 b: 2.1 P1 c: 2.1 P1 d: 2.1 P1
Experimental animals	8	a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range). b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.	a: 2 P2 b: NA

The ARRIVE guidelines. Originally published in PLoS Biology, June 2010⁷

Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free (SPF); type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.	a: 2 P2 b: 2 P2 c: 2.1 P1 - P6
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	a: 2 P2 b: NA c: NA
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	a: 2 P2 b: 2.1 P1
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	2.1 P6, 3.2, 3.3, 3.5
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	a: 2.4 b: 2.2, 2.3, 2.5 c: 2.4
RESULTS			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	NA
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.	a: 3.2/3.2 b: NA
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	3.2
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	a: NA b: NA
DISCUSSION			
Interpretation/ scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results. c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.	a: 4 P1, P6, P9, P10 a P11 b: 4 P12 c: NA
Generalisability/ translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	4 P3
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	6



References:

1. Kilbenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
2. Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:c332.