



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
CÂMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**LUAN PIER BENETTI**

**AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR  
MEIO DO USO DE MEMBRANA DE COLÁGENO BOVINO  
ASSOCIADA À HIDROXIAPATITA EM DEFEITOS CRÍTICOS  
NA CALVÁRIA DE RATOS. ANÁLISES  
HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Implantodontia).

Orientadora: Ana Paula Farnezi Bassi

Araçatuba - SP  
2020

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B465a Benetti, Luan Pier.  
Avaliação da regeneração óssea guiada por meio do uso de membrana de colágeno associada à hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos : análises histomorfométrica e imunoistoquímica / Luan Pier Benetti. – Araçatuba, 2020  
50 f. : il. ; tab.

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

1. Materiais biocompatíveis 2. Regeneração 3. Osso e ossos  
4. Membranas I. T.

Black D7  
CDD 617.64

A DEUS, causa primária de todas as coisas, pelo dom da vida, pelas bênçãos recebidas todos os dias.

A toda minha família por todo o suporte e apoio, pelos exemplos de pessoas do bem, pelo aconchego, dedicação e amor.

À professora Ana Paula Farnezi Bassi, minha orientadora, por ter me acolhido e acreditado, e estimulado minha capacidade para que tudo isso fosse possível. Obrigado pela paciência e confiança, pela compreensão e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos técnicos de laboratório DIRCE, MARCO e PAULO, muito obrigado pela gentileza, e colaboração no processamento deste trabalho.

Aos COLEGAS DE PÓS-GRADUAÇÃO Júlio César, Juceléia, William, Edith Ramos e Vinícius Bizelli, pela parceria e disponibilidade por me ajudarem na realização deste trabalho.

Aos professores Leonardo Faverani, Roberta Okamoto, Letícia Theodoro, Daniela Ponzoni pela ajuda e orientações nas análises deste trabalho, com toda gentileza e disponibilidade.

À empresa JHS pelo fornecimento das membranas utilizadas nesta pesquisa.

À TODOS A MINHA GRATIDÃO ETERNA

**“FAÇA O QUE PUDER, COM O QUE TIVER, ONDE ESTIVER”**

**Theodore Roosevelt**

Benetti LP. Avaliação da regeneração óssea guiada por meio do uso de membrana de colágeno associada à hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos. Análises histomorfométrica e imunoistoquímica [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 2020.

## RESUMO

O uso de membranas que auxiliem no processo de regeneração óssea guiada (ROG) é uma vertente dos estudos de biomateriais compatíveis que auxiliam no processo de reparo por meio da osteopromoção. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a regeneração óssea guiada utilizando membranas de colágeno de origens diferentes em defeitos críticos criados em calvária de ratos. Materiais e métodos: foram utilizados 72 ratos Albinus Wistar divididos em 3 grupos, sendo 6 animais para cada grupo: grupo controle somente com coágulo; grupo que recebeu a membrana de colágeno porcina (Bio-Gide®) e grupo de membrana de colágeno bovino associado à hidroxiapatita sintética (Col.HAP-91®). Foram estudados os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios através de lâminas submetidas as análises histomorfométricas e imunohistoquímicas. Os resultados histológicos demonstraram que o grupo controle positivo (BioGide®) apresentou neoformação óssea mais avançada aos 30 dias em comparação ao grupo coágulo e grupo experimental (Col.HAP-91®). Aos 60 dias observou-se similaridade quanto a neoformação óssea entre os grupos BioGide® e Col.HAP.91®. Esses resultados foram corroborados pelos resultados da imunoistoquímica. Diante dos resultados obtidos conclui-se que, todas as membranas estudadas nesta pesquisa promoveram a ROG.

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

Benetti LP. Evaluation of guided bone regeneration through the use of a color membrane associated with hydroxyapatite in critical defects in rat calvaria. Histomorphometric and immunohistochemical study [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 2020.

## **ABSTRACT**

The use of membranes that aid in the guided bone regeneration (ROG) process is also a part of compatible biomaterial studies that aid in this repair process. Objective: To evaluate and compare guided bone regeneration using membranes from different origins in critical defects created in calvaria of rats. Materials and methods: We will use 72 Albinus Wistar rats divided into 3 groups, 6 of which were animals for each group: control group with clot only; group that received the porcine collagen membrane (BioGide®) and synthetic hydroxyapatite membrane group associated with collagen (Col.HAP-91®). The animals will be euthanized at 7, 15, 30 and 60 postoperative days. Laboratory procedures will be performed and histomorphometric and immunohistochemical analyzes will be performed. Histological results showed that the positive control group (BioGide®) presented more advanced bone formation at 30 days compared to the clot group and the experimental group (Col.HAP-91®). At 60 days, there was a similarity in bone neoformation between the BioGide® and Col.HAP.91® groups. These results were confirmed by iminohistochemistry. In view of the results obtained, it is concluded that all membranes studied in this research promoted guided bone regeneration.

**Keywords:** Biomaterial. Regeneration. Bone tissue. Membrane.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Defeito ósseo de 8mm de 18  
diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital,  
representada pela linha tracejada vermelha. Remoção da cortical da região de  
calvária.
- FIGURA 2 - Defeito crítico de 8mm. A. Membrana de colágeno bovina 18  
associada a HÁ (JHS, Biomateriais Sabará, Minas Gerais, Brasil). B.  
Membrana de colágeno porcino (Bio-Gide® Geistlich Wolhusen, Switzerland).  
C Coágulo
- FIGURA 3 - Fotomicrografias dos cortes histológicos referente aos grupos 25  
experimentais (CG; GB; CHP) em todos os períodos analisados (7, 15, 30 e  
60 dias), nos quais observamos a capacidade de reparação óssea de cada  
membrana.
- FIGURA 4 – Fotomicrografias dos cortes histológicos referente ao centro dos 26  
defeitos nos grupos experimentais (CG; GB; CHP) nos os períodos analisados  
(30 e 60 dias), nos quais observamos a capacidade de reparação óssea de  
cada
- FIGURA 5 - Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 25x em 28  
área delimitada (centro do defeito) referente controle positivo (BioGide®) nos  
períodos de 30 e 60 dias de reparação. As setas vermelhas representam as  
áreas com maior marcação celular de diaminobenzidina, denotando maior  
expressão da proteína osteopontina e osteocalcina.
- FIGURA 6 - Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 25x em 29  
área delimitada (centro do defeito) referente controle positivo (BioGide®) nos  
períodos de 30 e 60 dias de reparação. As setas vermelhas representam as  
áreas com maior marcação celular de diaminobenzidina, denotando maior  
expressão da proteína osteopontina e osteocalcina.
- FIGURA 7 - Grupo experimental (CHP) 7 dias. Grânulo de hidroxiapatita (HA) 41  
no centro do defeito. Objetiva original 40X - HE.
- FIGURA 8 - Grupo experimental (CHP) 7 dias. Células Gigantes (seta) no 41  
centro do defeito. Objetiva original 40X - HE.
- FIGURA 9 - Grupo experimental (CHP) 15 dias. Integridade da Membrana (M). 42  
Objetiva original de 12,5X - HE.

- FIGURA 10 - Centro do defeito aos 15 dias de pós-operatório, demonstrando 42  
pequenas ilhas de neoformação óssea (setas) (A). Aumento de 6,5x. (B) Ilhas  
ósseas (setas). Objetiva original de 40X - HE.
- FIGURA 11 - (A) Presença da membrana aos 30 dias pós-operatório (seta 43  
vermelha). (B) Maior neoformação óssea (TON e seta preta) e presença de  
partículas de Hidróxiapatita (\*) (B). Objetiva original de 6,5X - HE.
- FIGURA 12 - Centro do defeito aos 60 dias. A: centro do defeito fechado. B: 43  
Centro do defeito com tecido conjuntivo. Objetiva original de 12,5X - HE.
- FIGURA 13 - Presença de grânulos de hidroxiapatita no final do processo de 44  
reparo. Objetiva original de 25X - HE.
- FIGURA 14 - Grupo Controle Positivo (BG), 7 dias. (A) aumento de 6.3X: 44  
Presença da membrana (M) no centro do defeito (A), (B) aumento 12.5X, (C).  
Objetiva original de 25X - HE.
- FIGURA 15 - Grupo Controle Positivo (BG), 15 dias A. Observa-se 45  
remanescentes da membrana (M) entre as formações ósseas na região  
central do defeito ósseo. Aumento Original 100X -HE. B. – Remanescentes da  
membrana (M). Objetiva original 100X – HE.
- FIGURA 16 - Grupo Controle Positivo (BG), 30 dias.HE, Centro do defeito 45  
fechado por tecido ósseo neoformado. Aumento original de 12,5X - HE.
- FIGURA 17 - Grupo Controle Positivo (BG), 60 dias. Observa-se o tecido 46  
ósseo neoformado no interior da membrana (M). objetiva original 100X - HE.
- FIGURA 18 - Grupo Controle Coágulo 7 dias. Tecido de granulação (TG) com 46  
algumas fibras organizando-se de forma paralela à borda (B) do defeito e  
pequena neoformação osteóide (TO). H.E. Objetiva original 12,5X - HE.
- FIGURA 19 - FIGURA 19 - Grupo Controle Coágulo 15 dias. Trabéculas 47  
ósseas neoformadas delgadas (TO), com osteócitos recém aprisionados e  
osteoblastos (Os) alinhando-se com padrão organizado H.E. Objetiva original  
40X - HE.
- FIGURA 20 - FIGURA 20 - Grupo Coágulo 30 dias. (A) Tecido de granulação 47  
(TG) e formações osteóides (TO) próximas à borda do defeito (B). Objetiva  
Original 12,5X - HE. (B): Trabécula óssea neoformada (TO) com osteoblastos  
(Os) alinhados. Objetiva original 25X – HE.

FIGURA 21 - Grupo Coágulo 60 dias. Centro do defeito. 60 dias. Ausência de 48  
crescimento ósseo. Formação de tecido conjuntivo fibroso (TC). Objetiva  
original 12,5X - HE.

## **LISTA DE FIGURAS**

GRÁFICO 1 – Área de Osso neoformado para os grupos aos 15, 30 e 60 dias 22

## **LISTA DE FIGURAS**

TABELA 1 - Escores atribuídos à quantidade de Osteopontina (OPN) e 30 Osteocalcina (OC) nos grupos controle positivo e experimental.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |                                     |
|--------|-------------------------------------|
| AON =  | Área de Neoformação Óssea           |
| CEUA = | Comitê de Ética no Uso de Animais   |
| CHP =  | Grupo experimental (COL.HAP-91®)    |
| Cm =   | Centímetros                         |
| DOC =  | Defeito Ósseo Crítico               |
| g =    | Gramas                              |
| GB =   | Grupo Controle positivo (Bioguide®) |
| GC =   | Grupo Coágulo                       |
| HE =   | Hematoxilina e Eosina               |
| Kg =   | Kilograma                           |
| M =    | Membrana                            |
| mg =   | Miligramas                          |
| mL =   | Mililitros                          |
| mm =   | Milímetros                          |
| OC =   | Osteocalcina                        |
| OPN =  | Osteopontina                        |
| OS =   | Osteoblastos                        |
| ROG =  | Regeneração Óssea Guiada            |
| TG =   | Tecido de Granulação                |
| TO =   | Formações osteóides                 |

## SUMÁRIO

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO                 | 12 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA      | 15 |
| 3 OBJETIVOS                  | 23 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS        | 24 |
| 4.1 ANÁLISE HISTOMÉTRICA     | 26 |
| 4.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA | 27 |
| 5 RESULTADOS                 | 28 |
| 5.1 ANÁLISE HISTOMÉTRICA     | 28 |
| 5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA      | 29 |
| 5.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA | 39 |
| 6 DISCUSSÃO                  | 43 |
| 7 CONCLUSÃO                  | 47 |
| REFERÊNCIAS                  | 48 |
| ANEXOS                       | 54 |

## 1. INTRODUÇÃO

A osteopromoção é a capacidade que barreiras como as membranas, possuem em selecionar o tipo celular do tecido mais indicado para repopular determinada ferida cirúrgica por meio de um selamento do local anatômico<sup>1-3</sup>. 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<sup>3</sup>.

Dahlin et al.<sup>5</sup> foram os primeiros a avaliarem o potencial de regeneração óssea utilizando membranas em defeitos previamente criados e preenchidos por tecido conjuntivo fibroso que foi removido e os defeitos foram recobertos com membranas e após seis semanas, todos os defeitos estavam preenchidos por tecido ósseo. Para esse processo onde a regeneração ocorre apenas por tecido ósseo, denomina-se regeneração óssea guiada (ROG)<sup>4</sup>. A partir desse estudo, outros trabalhos iniciaram as pesquisas buscando materiais que pudessem ser utilizados como barreiras biológicas efetivas no processo de ROG<sup>6-7</sup>

Entre as principais indicações do uso das membranas biológicas em processos de ROG estão: correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais<sup>8</sup>, alvéolos após exodontias<sup>9</sup>; deiscência e fenestrações após colocação de implantes mediatos e imediatos<sup>10</sup>.

Para que o processo de ROG ocorra existem pré-requisitos que devem ser observados como: o defeito ósseo deve possuir fonte de células osteogênicas viáveis; a área a ser regenerada deve fornecer adequada de vascularização; o local da ferida a ser regenerado 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<sup>11</sup>.

Também é fundamental que 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<sup>12</sup>. Além disso, este biomaterial deve resistir à 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<sup>13</sup>.

As membranas de PTFE são as mais estudadas, contudo, o fato de necessitar de dois tempos cirúrgicos fez com que as pesquisas percorressem o caminho para o desenvolvimento de membranas com potencial de absorção<sup>14</sup>. Hoje membranas de colágeno, cortical bovina e de polímeros absorvíveis são focos de pesquisa uma vez possuem a capacidade de absorção e não há necessidade de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção<sup>7-15</sup>.

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.<sup>3-16</sup>

Uma das mais utilizadas e documentadas membranas de colágeno, é derivada de suínos e não reticulada (Bio-Gide<sup>®</sup>, Geistlich, Wohlhusen, Suíça). As características de hidrofília 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<sup>1-17</sup>.

As membranas podem servir também como suporte do crescimento celular por possuir uma estrutura que mimetiza a matriz extracelular, permitindo assim crescimento, proliferação, migração e diferenciação de tecidos específicos para uma futura implantação.<sup>4-18</sup> A matriz extracelular é composta de uma interligação de fibras proteicas (colágeno e elastina), proteoglicanas e depósitos de minerais no caso do tecido ósseo. Pensando neste aspecto, algumas membranas vêm associando a sua composição nanopartículas de HA, pois sua estrutura, além de ser mantida por mais tempo, é mais favorável para os osteoblastos<sup>19-20-21-22</sup>.

Atualmente há no mercado uma membrana de colágeno bovino associada à hidroxiapatita, a Col.Hap-91<sup>®</sup>. (JHS, Biomateriais Sabará, Minas Gerais, Brasil), sendo

composta por 25% de colágeno bovino e 75% de Hidroxidoapatita, biocompatível e absorvível. 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<sup>23</sup>.

Assim, este trabalho teve como objetivo de estudar a ação osteopromotora de 2 tipos de membranas existentes no mercado: a colágeno porcino e a nova membrana de colágeno bovino associada a HA, baseado na metodologia da confecção de defeitos críticos provocados em calvária de ratos<sup>24</sup>.

### **3. OBJETIVOS**

A proposta deste projeto foi avaliar por meio da análise histomorfométrica e imunohistoquímica o potencial de regeneração óssea guiada da membrana de colágeno bovino associada à hidroxiapatita sintética (Col.Hap-91<sup>®</sup>, JHS, Biomateriais Sabará, Minas Gerais, Brasil,) em defeitos ósseos críticos em calota de ratos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### Cirurgia experimental:

Para o desenvolvimento deste projeto, foram utilizados um total de 72 ratos (*Rattus norvegicus 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 três 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, Brazil) 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 (de 8 mm), como discriminado a seguir:

- **Grupo Experimental** (*Col.Hap-91*<sup>®</sup>, *JHS: Biomateriais Sabará, Minas Gerais, Brasil*) (**CHP**): n=24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno bovino associado a hidroxiapatita sintética sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia)
- **Grupo Controle Positivo** (*Bio-Gide*<sup>®</sup> - *Geistlich Wohlhusen, Suíça*) (**BG**): n=24: O defeito ósseo crítico foi 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 (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia);
- **Grupo Coágulo (Controle Negativo) (GC)**: n=24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo sem o recobrimento do defeito, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 15,30 e 60 dias após a cirurgia).

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

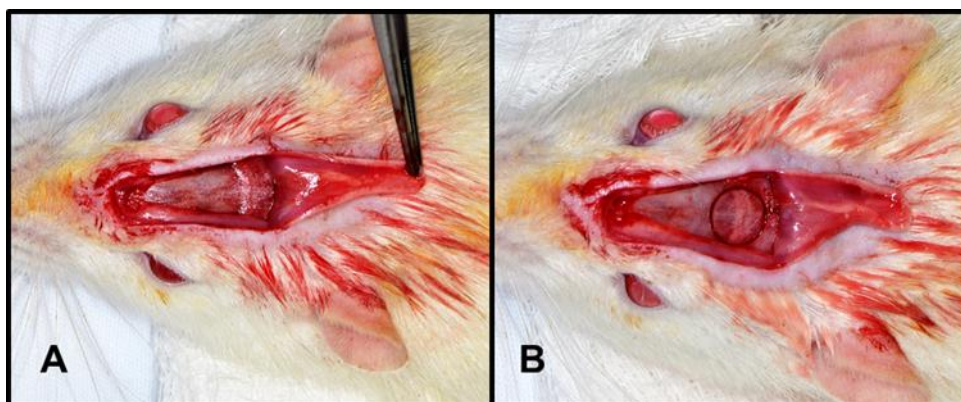
região da calvária, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Foi realizada incisão triangular no sentido de aproximadamente 2 (dois) cm, 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 final de 8 mm de diâmetro, sendo 1mm a mais devido à espessura da trefina, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 1). Após a trefinação, o descolamento total do fragmento será realizado com auxílio de um instrumento Holleback 3S. De acordo com os tratamentos propostos os defeitos serão preenchidos somente com coágulo sanguíneo e os demais grupos preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino (Grupo Bio-Gide® – n=24) ou com uma membrana colágeno bovino associado a hidroxiapatita grupo experimental (Grupo COL.HAP-91® - 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, 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 0,2 ml 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. Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representada pela linha tracejada vermelha. Remoção da cortical da região de calvária.**



Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 1: Defeito crítico de 8mm. A. Membrana de colágeno bovina associada a HÁ (JHS, Biomateriais Sabará, Minas Gerais, Brasil). B. Membrana de colágeno porcino (Bio-Gide® Geistlich Wolhusen, Switzerland). C Coágulo**



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 receberão cortes de 6 µm de espessura e serão 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 conhecerá quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconheceu o respectivo grupo da secção.

#### **4.1 Análise histométrica**

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. Para a comparação entre os valores médios obtidos nos diferentes grupos e períodos experimentais, foi inicialmente submetido ao teste estatístico de homocedasticidade, para posterior aplicação do teste mais adequado (paramétrico ou não paramétrico), dependendo da distribuição dos dados na curva de normalidade. Foi utilizado o programa estatístico para pesquisa biológica SigmaStat 3.1 (Systat Software, Inc), em que foi adotado como nível de significância  $p < 0,05$  para todos os testes.

## 4.2 Análise imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi realizada por meio da detecção pela imunoperoxidase. A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. Posteriormente, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) e o bloqueio da biotina endógena através de leite destanado. Os anticorpos primários foram contra osteocalcina (OC) (Santa Cruz Biotechnology) e osteopontina (Santa Cruz Biotechnology).

Foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-cabra produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories), o amplificador foi a Avidina e Biotina (Vector laboratories) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Após a revelação das reações com o cromógeno, foi feita a contra-coloração dos cortes histológicos utilizando a Hematoxilina de Harris. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas semi-quantitativamente pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo ósseo. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) e a intensidade das imunomarcações foi determinada semiquantitativamente, com escores de 1 a 4, sendo 1 para ausência de imunomarcação e 4 para marcação intensa.

## 5- RESULTADOS

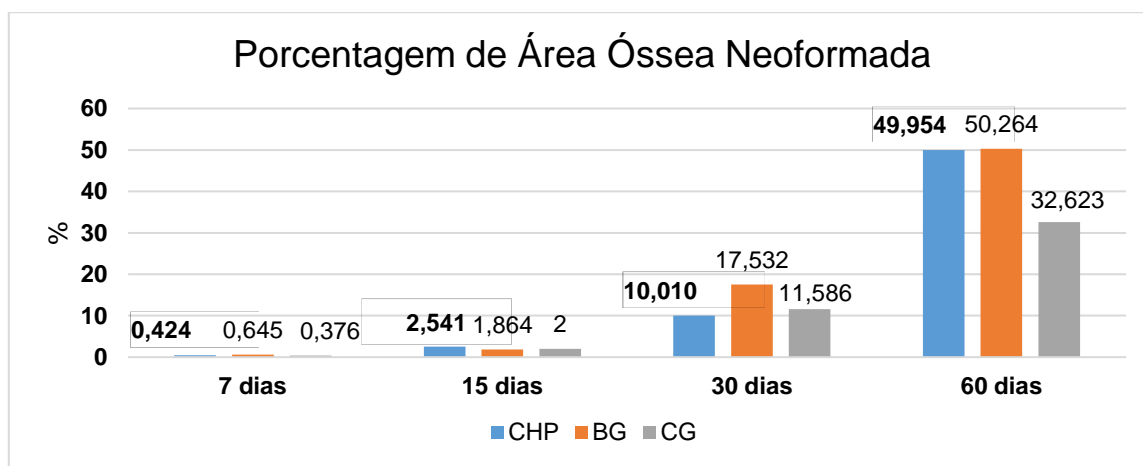
### 5.1 Análise histométrica

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 Sigma Plot 12.3 (Systat Software, Inc., San Jose California, USA).

Na avaliação histométrica da evolução cronológica do reparo ósseo (análise intragrupos), o grupo controle positivo (BioGide®) apresentou maior área de neoformação óssea em nos períodos de 7, 30 e 60 dias ( $p < 0,05$ ).

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).

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



Fonte: Autor, 2020

## **5.2 - Análise morfológica (microscópica)**

### **GRUPO EXPERIMENTAL (COL.HAP91®)**

**7 DIAS** – Observou-se presença de alguns grânulos de hidroxiapatita (Figura 7) 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 8). Notou-se discreta orientação das fibras colágenas numa possível tentativa de organização destas. Início de neoformação óssea junto aos cotos.

**15 Dias** - Ainda é possível observar a integridade da membrana (Figura 9). O tecido conjuntivo denso organizado evidencia um maior direcionamento das fibras colágenas. Nota-se uma diminuição da reação inflamatória com presença de células gigantes, fagocitando os grânulos de hidroxiapatita e a presença de ilhas de neoformação óssea na região central e também a partir dos cotos do defeito. É possível observar em algumas lâminas a presença de grânulos de hidroxiapatita que compõem o biomaterial no interior do conjuntivo. Infiltração dos grânulos demonstrando sua porosidade (Figura 10).

**30 dias** – É possível constatar o processo de degradação da membrana em alguns espécimes, em outros, porém, nota-se a presença da membrana quase íntegra. Há presença de tecido conjuntivo fibroso organizado, intercalado com maior neoformação óssea e pequenas partículas de grânulos de hidroxiapatita envolvidos por neoformação óssea. O centro do defeito ainda não fechado (Figura 11).

**60 dias** - Alguns espécimes tiveram o defeito preenchido por neoformação óssea, outros quase fechados, notando-se a presença de periósteo (Figura 12). É possível observar ainda a presença de fragmentos da membrana e dos grânulos de hidroxiapatita (Figura 13).

### **GRUPO CONTROLE POSITIVO (BIOGIDE®) – Figuras 3 e 4**

**7 dias** - Pode-se observar na imagem panorâmica a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo. No aumento de 6.3x (14A) nota-se a presença de tecido de granulação bem organizado e nos aumentos de 12,5x e 25x (

14 B e C) verifica-se que esse tecido de granulação é altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório, e possível observar início de neoformação óssea próximo aos cotos. Também é possível observar células gigantes indicando fagocitose da membrana, com início de neoformação óssea no centro do defeito.

**15 dias:** Na imagem panorâmica observa-se a presença da membrana íntegra que recobre toda área do defeito ósseo. Nas análises com maior magnitude pode-se observar um tecido conjuntivo frouxo com pouco infiltrado inflamatório, ainda bem vascularizado e áreas de tecido ósseo neoformado a partir do coto, com presença de tecido osteóide no centro do defeito (FIGURA 5 A, B).

**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 (Figura 16).

**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. (Figura 17).

### **GRUPO CONTROLE NEGATIVO (COÁGULO) – Figuras 3 e 4**

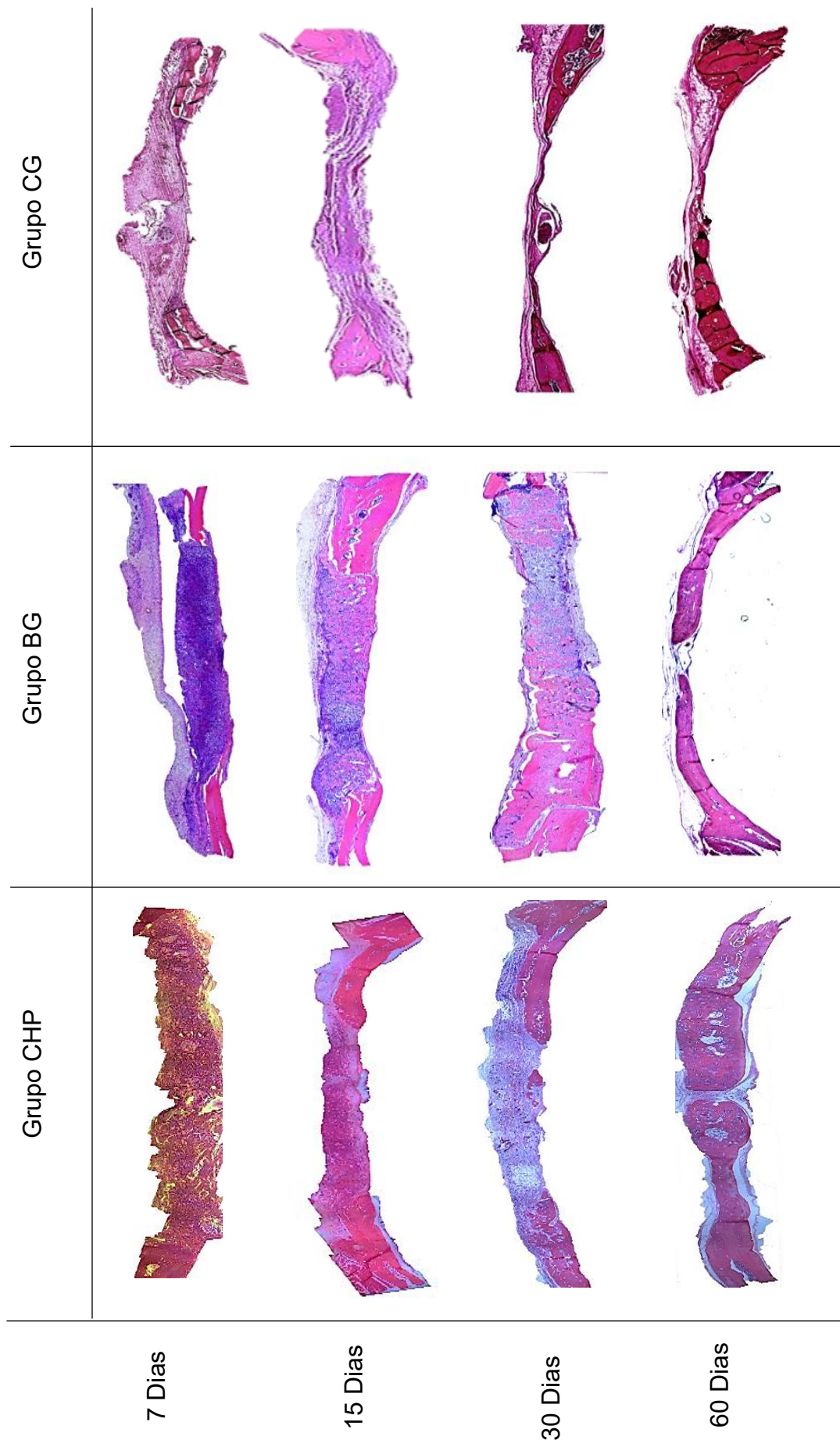
**7 dias** - Todos os espécimes apresentaram pequena formação osteóide junto ao coto. A maior parte da cavidade foi preenchida por um tecido de granulação com algumas fibras organizando-se de forma paralela às bordas do defeito, adjacente à dura-máter. O tecido estava bem vascularizado e havia muitos fibroblastos na região. O infiltrado inflamatório era do tipo linfoplasmocitário e as fibras colágenas ainda estavam delgadas. Algumas células multinucleadas do tipo macrófagos foram vistas próximos à área óssea em formação e alguns osteoclastos demonstraram início de reabsorção nas bordas da ferida, mas ainda não há indícios da presença de osteoclastos nas trabéculas neoformadas (Figura 18).

**15 Dias** – Infiltrado inflamatório moderado. Observou-se neoformação óssea restrita às proximidades das bordas dos defeitos na maioria dos espécimes deste grupo (Figura 19), com alguma neoformação óssea pequena na porção central.

**30 dias** - Alguns osteoclastos puderam ser vistos próximos às bordas e às formações osteóides. O tecido estava bem vascularizado, podendo serem observadas algumas áreas hemorrágicas nos espécimes. As fibras colágenas estavam orientadas de forma paralela e houve elevado número de fibroblastos. O infiltrado inflamatório continuou moderado no grupo de 30 dias, distribuído ao longo do defeito. Os osteoblastos estavam bem organizados ao redor das trabéculas (Figura 20 A, B)). Em todos os espécimes a espessura do tecido osteóide neoformado foi menor que a do tecido ósseo original da calota.

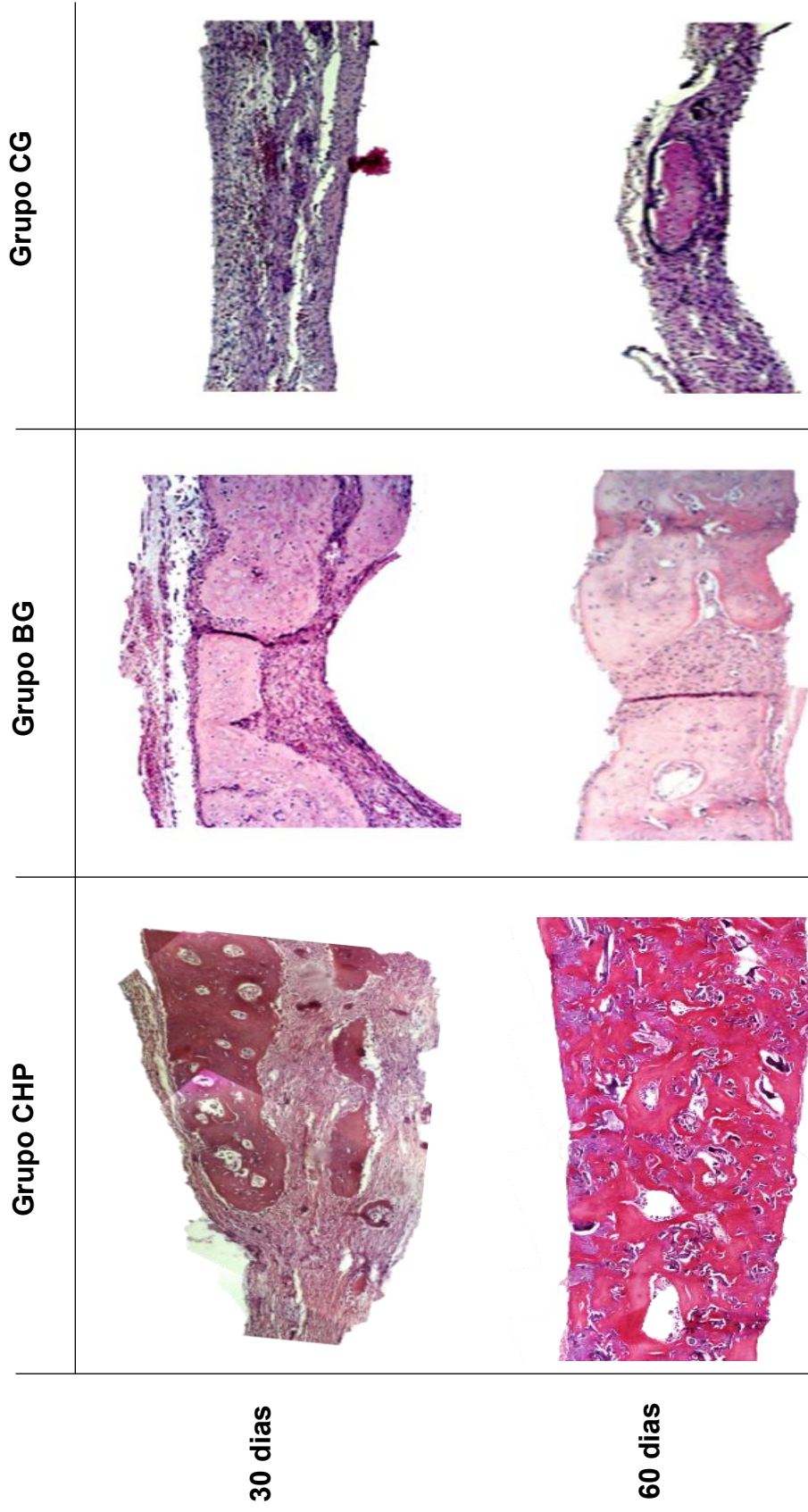
**60 Dias:** Nota-se uma maior aproximação dos cotos do defeito, contudo, sem o fechamento do defeito, sendo o espaço preenchido por um tecido conjuntivo fibroso (Figura 21).

**FIGURA 23** – Fotomicrografias dos cortes histológicos referente aos grupos experimentais (CG; GB; CHP) em todos os períodos analisados (7, 15, 30 e 60 dias), nos quais observamos a capacidade de reparação óssea de cada membrana.



Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 24** – Fotomicrografias dos cortes histológicos referente ao centro dos defeitos nos grupos experimentais (CG; GB; CHP) nos os períodos analisados (30 e 60 dias), nos quais observamos a capacidade de reparação óssea de cada membrana.



Fonte: Autor, 2020

### 5.3 - Análise Imunohistoquímica

Foram realizadas reações imunohistoquímicas utilizando anticorpos contra as proteínas Osteocalcina (OC) e Osteopontina (OPN). O objetivo foi obter marcações para análise qualitativa que representariam a expressão destas proteínas caracterizando mineralização óssea nos diferentes grupos e períodos estudados. Para esta análise foi utilizada um SCORE de imunomarcacão<sup>43</sup> que variou de 0 a 4, onde 0 sem Imunomarcacão (ausência de rotulagem na matriz extracelular e ausência completa de células imunoreativas), 1 Imunoexpressão baixa (rotulagem fraca da matriz extracelular e aproximadamente um quarto das células imunoreativas), 2 Imunoexpressão moderada (rotulagem moderada da matriz extracelular e aproximadamente metade das células imunoreativas), 3 Imunoexpressão forte (forte rotulagem da matriz extracelular e aproximadamente três quartos das células imunoreativas) e 4 Imunoexpressão muito severa (rotulagem extremamente forte da matriz extracelular e aproximadamente todas as células imunoreativas). Na tabela 1 estão representados os escores de expressão das proteínas.

#### **GRUPO CONTROLE POSITIVO (Bio-Gide®)**

**Osteopontina:** Aos 7 e 15 dias nota-se imunomarcacão moderada da matriz extracelular (++) para esta proteína. As fotomicrografias do reparo ósseo aos 30 dias denota marcação leve (+) para a proteína osteopontina. Aos 60 dias, é possível observar a presença moderada (++) deste biomarcador novamente. (Figura 18).

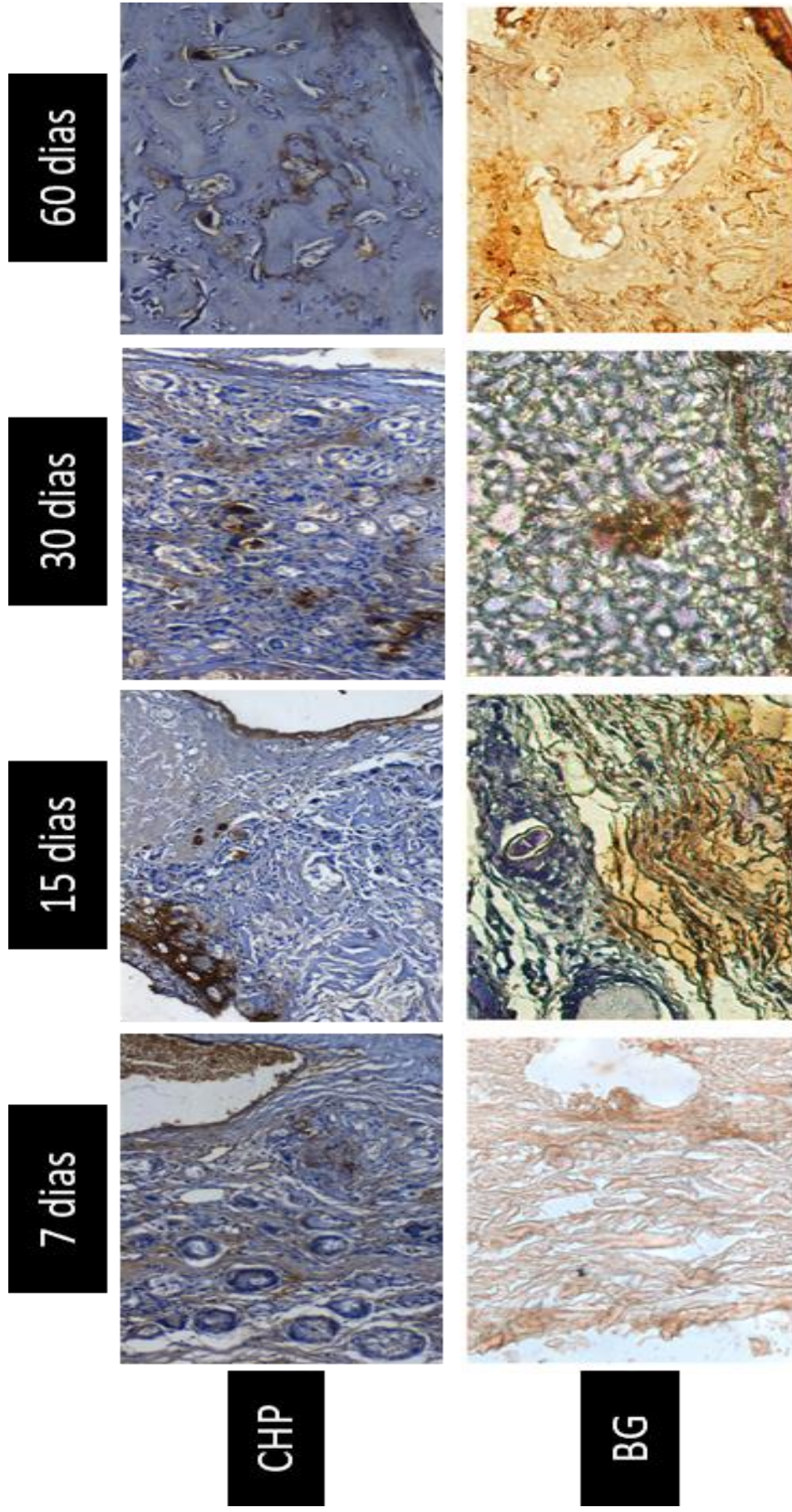
**Osteocalcina:** Aos 7 e 15 dias, marcação moderada (++) da matriz extracelular. A fotomicrografia do reparo ósseo aos 30 e 60 dias de reparo ósseo, é possível observar marcação intensa (+++) para o biomarcador osteocalcina em região de coto ósseo e centro do defeito (Figura 19).

#### **GRUPO EXPERIMENTAL (COL.HAP91®)**

**Osteopontina:** Nos períodos de 7 e 15 dias marcação intensa e moderada, respectivamente, indicando possível aumento da atividade osteoblástica. Aos 30 dias apresenta marcação moderada (++) . Aos 60 dias, é possível notar a presença de uma marcação leve (++) (Figura 18).

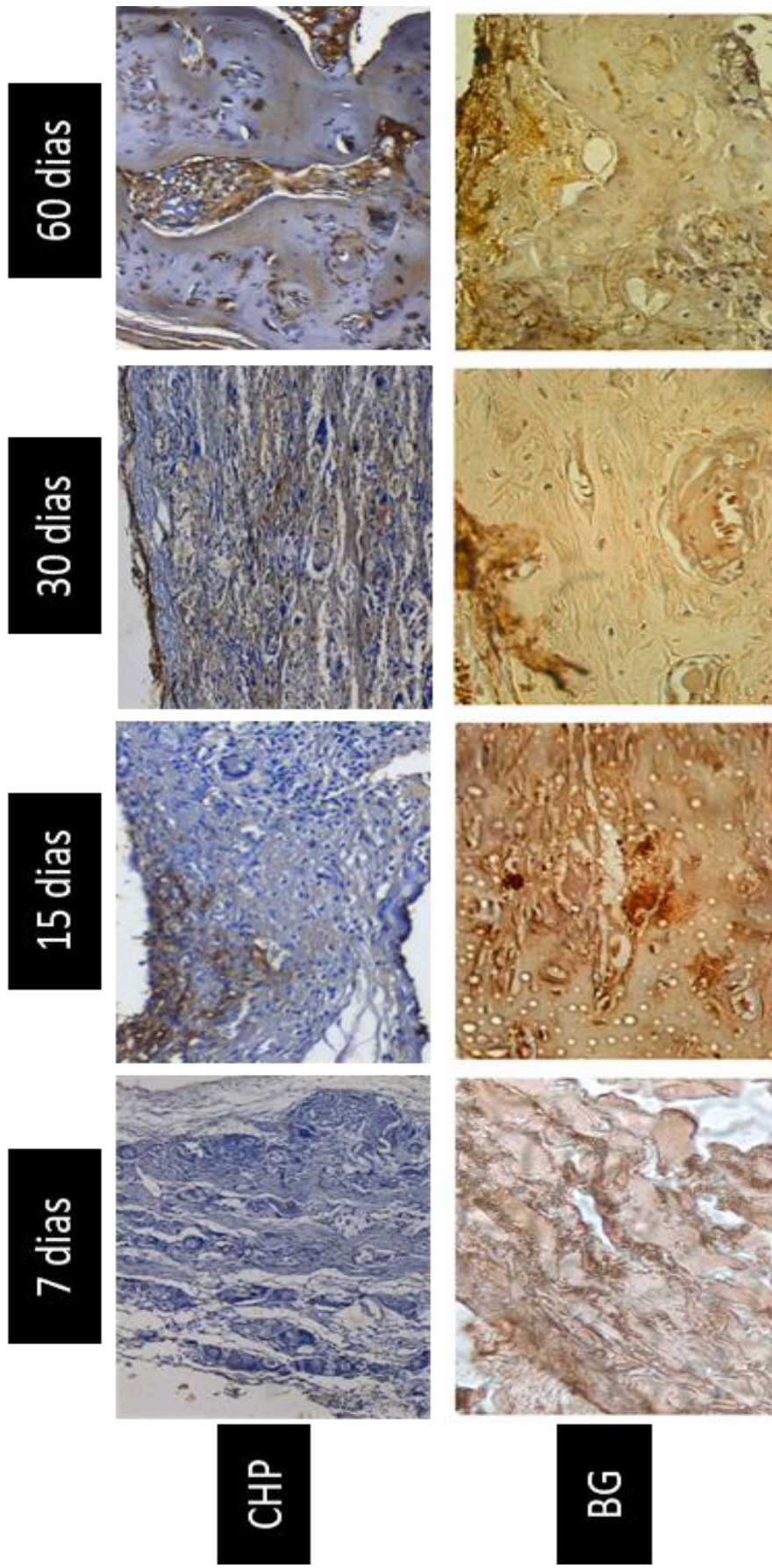
**Osteocalcina:** Aos 7 nota-se imunomarcacão leve (+). Aos 15, 30 e dias ocorre uma marcação moderada (++) para o biomarcador osteocalcina em região de coto ósseo e centro do defeito (Figura19).

**FIGURA 5 - Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 25x em área delimitada (centro do defeito) referente controle positivo (BioGide®) nos períodos de 30 e 60 dias de reparação. As setas vermelhas representam as áreas com maior marcação celular de diamminobenzidina, denotando maior expressão da proteína osteopontina e osteocalcina.**



Fonte: Autor,2020

Figura 6: Fotomicrografias dos cortes histológicos em aumento de 40x ao centro do DOC referente aos GCB e GCP nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de reparação, denotando áreas de expressão da proteína OC.



Fonte: Autor, 2020

**TABELA 1 - Escores atribuídos à quantidade de Osteopontina (OPN) e Osteocalcina (OC) nos grupos controle positivo e experimental.**

| Grupos                            | OPN | OC  |
|-----------------------------------|-----|-----|
| COL.HAP-91 <sup>®</sup> - 30 DIAS | 2/3 | 2   |
| COL.HAP-91 <sup>®</sup> - 60 DIAS | 1   | 3   |
| BioGide <sup>®</sup> - 30 Dias    | 1   | 2   |
| BioGide <sup>®</sup> - 60 Dias    | 1   | 2/3 |

Fonte: Autor, 2020

## 6 DISCUSSÃO

O tecido ósseo possui uma considerável capacidade de reparação quando ocorre o comprometimento de sua estrutura, seja por fratura, processos patológicos ou cirurgias. Todavia, um defeito ósseo de maior extensão pode não ter sua estrutura e função completamente reparados<sup>25-26</sup>.

Por isso, a obtenção de um reparo ósseo satisfatório na correção destes defeitos faz se necessário o emprego de técnicas de enxertia. Nestas técnicas podem ser utilizados enxertos autógenos, alógenos, xenógenos, por implantes aloplásticos, sem ou com a utilização das membranas, sendo as membranas fundamentais para o processo de regeneração óssea guiada (ROG)<sup>27</sup>.

O objetivo fundamental da ROG é a obtenção de uma regeneração óssea bem-sucedida na área de defeito ósseo com alta previsibilidade e baixo risco de complicações. Além disso, a ROG busca alcançar um resultado satisfatório com menor número de intervenções cirúrgicas, envolvendo baixa morbidade para o paciente e um período de reparo diminuído. É evidente que, nos últimos 20 anos, progressos significativos ocorreram no desenvolvimento de técnicas e material para que a ROG ocorra de forma esperada<sup>28-29</sup>.

O defeito criado no grupo controle negativo (coágulo sem membrana) demonstrou um processo de reparo de forma padrão para defeito chamados de críticos, ou seja, a formação óssea fica restrita às margens dos defeitos, sendo que o centro do defeito fica reparado por um tecido conjuntivo fibroso, comprovando que sem a presença de uma membrana ou um biomaterial o mesmo por si só não formará um tecido ósseo<sup>8-30</sup>.

Ao fazer o uso de uma barreira mecânica, ou seja, uma membrana, almeja-se que ocorra um aumento na quantidade de osso neoformado e, portanto, maior área de regeneração tecidual, sendo maior neoformação óssea se comparado ao controle negativo, fato esse observado no presente estudo onde pudemos constatar que houve uma neoformação óssea significativamente superior nos dois grupos onde uma membrana foi utilizada como barreira.

A finalidade de avaliarmos diferentes tipos de membranas é verificar se o processo de ROG ocorre de maneira diferente entre elas e se a quantidade e/ou a qualidade de osso neoformado possui alguma similaridade. Neste trabalho estamos avaliando duas membranas de colágeno de origens diferente: porcina X bovina, sendo

que a membrana experimental ainda está associada a um biomaterial que é a hidroxiapatita. Assim, temos que observar dois fatores importantes: o colágeno e a presença desse biomaterial.

Em geral toda membrana que tem sua base de colágeno sofre tratamento de reticulação para melhorar sua resistência mecânica, entretanto, quando realiza-se esse processo geralmente por uso de glutaldeído, esse tratamento acaba por gerar especialmente nos primeiros dias um processo inflamatório mais intenso<sup>31-32</sup>. No nosso estudo, nem a membrana de colágeno porcino e nem a membrana de colágeno bovino, possuem esse tipo de tratamento, e pudemos observar que a reação inflamatória inicial de ambas foi muito semelhante, o que permitiu um processo de reparo inicial muito próximo nos períodos de 7 e 15 dias.

Nos tempos finais de reparo pode-se verificar que a membrana do grupo controle positivo (Bio-Gide®) manteve seu alto nível de atuação já tão bem descrito na literatura<sup>8-33</sup> em comparação a membrana experimental. Ela possui um padrão fisiológico de reparo onde nos tempos iniciais temos um predomínio da imunomarcagem de OPN e a partir de 30 dias entra a fase de maturação óssea e sobressai a presença de Osteocalcina. Observa-se que ela promove uma osteopromoção precoce e praticamente a neoformação óssea total dela ocorre aos 30 dias, havendo somente uma maturação desse tecido neoformado ao final desse processo.

A necessidade de buscar membranas alternativas a ela, muito se deve ao seu alto custo. Neste caso, a membrana objeto deste trabalho também tem sua base o colágeno só que de origem bovina e em especial ela está associada a um biomaterial, que nesta situação também atua como osteocondutor pois as partículas de hidroxiapatita acabam por penetrar no interior do coágulo auxiliando o processo de reparo, e este fato foi observado em todos os espécimes avaliados nesta pesquisa. Estudos de membranas associadas a presença de HA têm demonstrado que essa associação é muito interessante pois como visto no trabalho Chen e Chang<sup>29</sup>, a HA adicionada às nanofibras de PCL melhorou significativamente a cicatrização óssea em defeitos provocados na calvária e observaram que estas não afetavam negativamente a diferenciação osteogênica, permitindo o crescimento e diferenciação de células mesenquimais, além disso, observaram que a produção mineral pelas células foi proporcional à concentração de HA na nanofibra<sup>34</sup>

Ao analisar o grupo experimental em sua histometria, este obteve uma área de neoformação óssea menor quando comparado com o grupo controle positivo (BioGide®), aos 30 dias, mas ao final do processo embora tenha uma neoformação óssea menor quantitativamente essa não se mostrou estatisticamente significativa, apresentando assim uma boa performance. Essa performance foi comprovada na análise da expressão das proteínas OPN e OC, onde verificou-se haver uma sequência biológica adequada embora ligeiramente atrasada quando comparada a Grupo Controle positivo. Na membrana controle positivo, pode-se notar uma atividade maior da OPN aos 7 e 15 dias e da membrana experimental essa atividade foi mais expressiva aos 15 e 30 dias, demonstrando que a Bio-Gide tem um processo de osteopromoção mais rápida, contudo, a membrana experimental tem uma boa atuação também. Quanto a osteocalcina, observou-se no grupo controle positivo (BioGide®) uma marcação mais expressa aos 30 e 60 dias, uma vez que o comportamento dessa membrana é o de neoformação óssea precoce até os 30 dias, após esse período notamos somente uma mineralização do tecido neoformado. Já a membrana do grupo experimental (COL.HAP-91®), apresentou uma maior imunomarcagem da OC aos 60 dias, demonstrando que está ainda em fase de maturação do tecido ósseo.

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. Na análise das lâminas do grupo experimental (COL.HAP-91®), a membrana cumpre seu papel de barreira promovendo a manutenção da citoarquitetura da calota do animal, impedindo o colapso no defeito. Também, foi possível notar a presença de fragmentos da membrana ainda no período de 30 dias, mas já sem a função de barreira propriamente dita. 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, permitiu observar um defeito ósseo praticamente fechado em muitos todos os 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 HÁ que auxiliaram na neoformação óssea ao redor dos grânulos no interior do tecido de granulação.

## **7 CONCLUSÃO**

Dentro da metodologia utilizada, as membranas estudadas nesta pesquisa promoveram a ROG em defeitos críticos em calotas de ratos. O grupo controle positivo obteve os melhores comportamentos biológico e maior índice de neoformação óssea em todos os períodos no processo de ROG, contudo a membrana experimental apresentou bom desempenho biológico, permitindo a tanto a osteopromoção quanto a osteoindução em função da presença de grânulos de HA.

## REFERÊNCIAS

1. Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol.* 1988;59(9):589-94.
2. Imbronito AV, Chaves VEA, Todescan JI. Regeneração óssea guiada: revisão da literatura. *Rev SOBRAPE.* 2001;1-11.
3. Andrade-Acevedo R, Trentin MS, Shibli JA. Bases clínicas e biológicas da regeneração óssea guiada (ROG) associada à barreiras ou membranas. *Rev Bras Implantodont Prótese Implante.* 2004;11(43):251-7.
4. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects guided tissue regeneration. *Plastic Reconstr Surg.* 1988;81(5):672-6.
5. 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(1):13-9.
6. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994;9(1):13-29.
7. Caballé-Serrano J, Abdeslam-Mohamed Y, Munar-Frau A, Fujioka-Kobayashi M, Hernández-Alfaro F, Miron R. Adsorption and release kinetics of growth factors on barrier membranes for guided tissue/bone regeneration: A systematic review. *Arch Oral Biol.* 2019;100:57-68.
8. Cortellini P, Piniprato G, Tonetti MS. Periodonto regeneration of human infrabony defects. *J Periodont.* 1993;64(4):254-60.
9. 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(3):526-1.
10. 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(1):31-40.
11. Retzepi, M., & Donos, N. (2010). Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clinical Oral Implants Research*, 21(6), 567–576.

12. Phillips JH, Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft resorption. *Plast Reconstr Surg.* 1988;85(6):891-7.
13. Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 1990;1(1):22-32.
14. 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(1):31-40.
15. Soldatos NK, Stylianou P, Koidou VP, Angelov N, Yukna R, Romanos GE. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int.* 2017;48(2):131-147.
16. Böstman, O.M. Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants. *J Bone Joint Surg Br*, v. 73, p. 679-682, 1991.
17. Buser, D. 20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry. 2ht. ed. Chicago: Quintessence, 2010.
18. Góes, A.M.; Oréfice, R.L.; Bretas, R.S.B.; Ribeiro Neto, W.A.; Pereira, I.H.L.; Ayres, E. C.; Paula, A.C.C.; Averous, L. Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth. *Electrospinning, characterization and cell viability. Polymer Degradation and Stability*, v. 97, p. 2037e2051, 2012.
19. Cui, W.; Li, X.; Xie, C.; Zhuang, H.; Zhou, S.; Weng, J. Hydroxyapatite nucleation and growth mechanism on electrospun fibers functionalized with different chemical groups and their combinations. *Biomaterials*, v. 31, p. 4620e9, 2010.
20. Nirmala, R.; Nam, K.T.; Park, D.K.; Woo-II, B.; Navamathavan, R.; Kim, H.Y. Structural, thermal, mechanical and bioactivity evaluation of silver-loaded bovine bone hydroxyapatite grafted poly( $\epsilon$ - caprolactone) nanofibers via electrospinning. *Surf Coat Technol*, v. 205, p. 174e81, 2010.
21. Armentano, I.; Dottori, M.; Fortunati, E.; Mattioli, S.; Kenny, J.M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polym Deg Stabil*, v. 95, p. 2126e46, 2010.

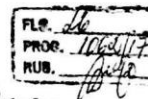
22. Wutticharoenmongkol, P.; Pavasant, P.; Supaphol, P. Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2602e10, 2007.
23. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath 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(11):929-40.
24. Park JW, Bae SR, Suh JY, Lee DH, Kim SH, Kim H, et al. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: a pilot study. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(1):203-14.
25. Bosch, C., Melsen, B., & Vargervik, K. (1995). Guided Bone Regeneration in Calvarial Bone Defects Using Polytetrafluoroethylene Membranes. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 32(4), 311–317.
26. Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1), 66.
27. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. 2017;125(5):315-337.
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*. 2008;20(4):372-8.
29. Buser D. 20 anos de regeneração óssea guiada: em implantodontia. 2nd ed. São Paulo: Quintessence; 2010.
30. Behfarnia P, Khorasani MM, 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(5):574-81.
31. Goissis, G., Marcantonio, E., Marcantônio, R. A. C., Lia, R. C. C., Cancian, D. C. J., & Carvalho, W. M. de. (1999). Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials*, 20(1), 27–34.

32. Veríssimo DM, Leitão RF, Ribeiro RA, et al. Polyanionic collagen membranes for guided tissue regeneration: Effect of progressive glutaraldehyde cross-linking on biocompatibility and degradation. *Acta Biomater.* 2010;6(10):4011-4018.
33. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000.*1998 17:22-35.
34. Chen, J.P.; Chang, Y.S. Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Col. Surf B. Biointerf.*, v. 86, n. 1, p. 169-175, 2011

## ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Análise histológica, histométrica, imunoistoquímica e micro-CT da osteopromção 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 DESTA 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.

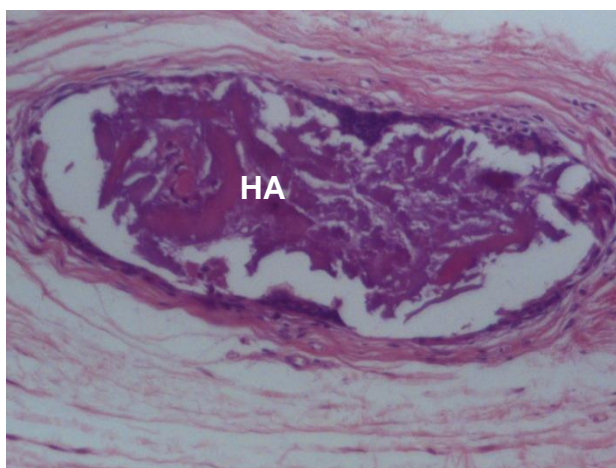
**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** March 01, 2020.

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

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

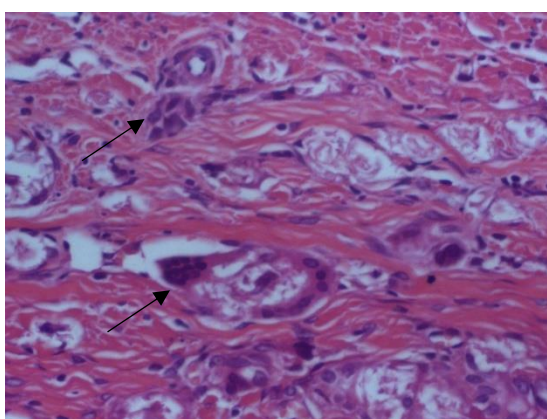
Anexo B – Imagens das Lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina.

**FIGURA 7 – Grupo experimental (CHP) 7 dias. Grânulo de hidroxiapatita (HA) no centro do defeito. Objetiva original 40X - HE.**

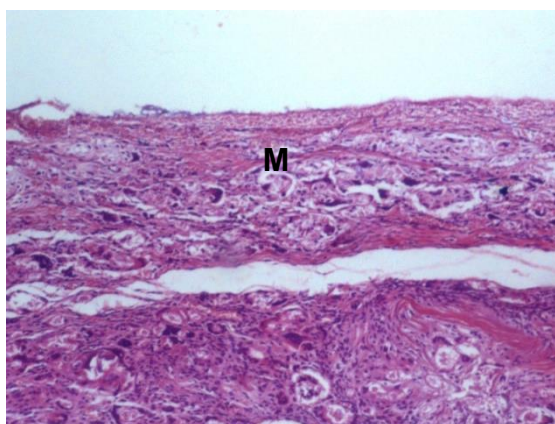


Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 8 – Grupo experimental (CHP) 7 dias. Células Gigantes (seta) no centro do defeito. Objetiva original 40X - HE.**

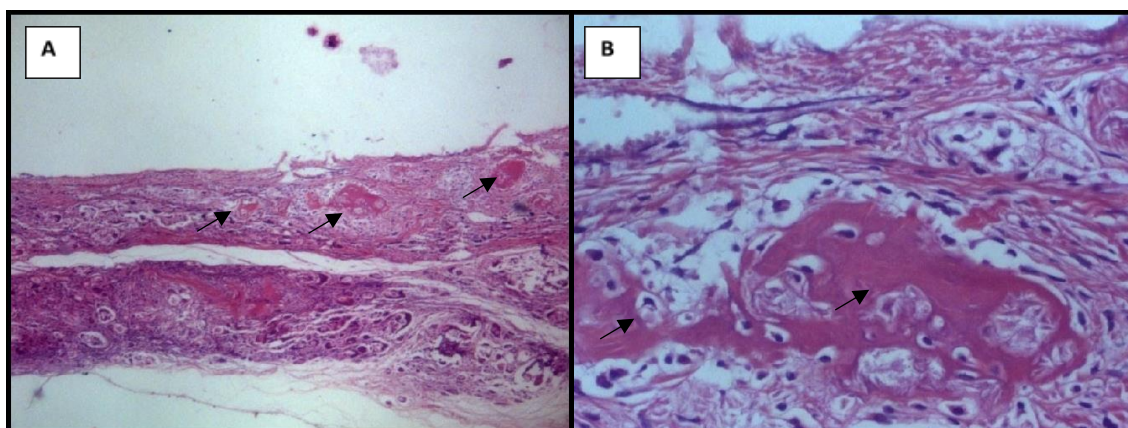


**FIGURA 9 – Grupo experimental (CHP) 15 dias. Integridade da Membrana (M). Objetiva original de 12,5X - HE.**



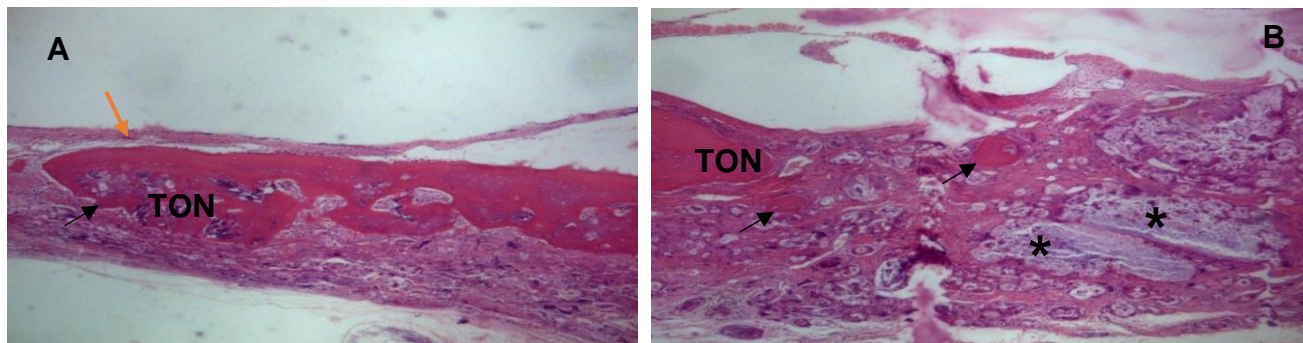
Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 10 – Grupo experimental (CHP). Centro do defeito aos 15 dias de pós-operatório, demonstrando pequenas ilhas de neoformação óssea (setas) (A). Aumento de 6,5x. (B) Ilhas ósseas (setas). Objetiva original de 40X - HE.**



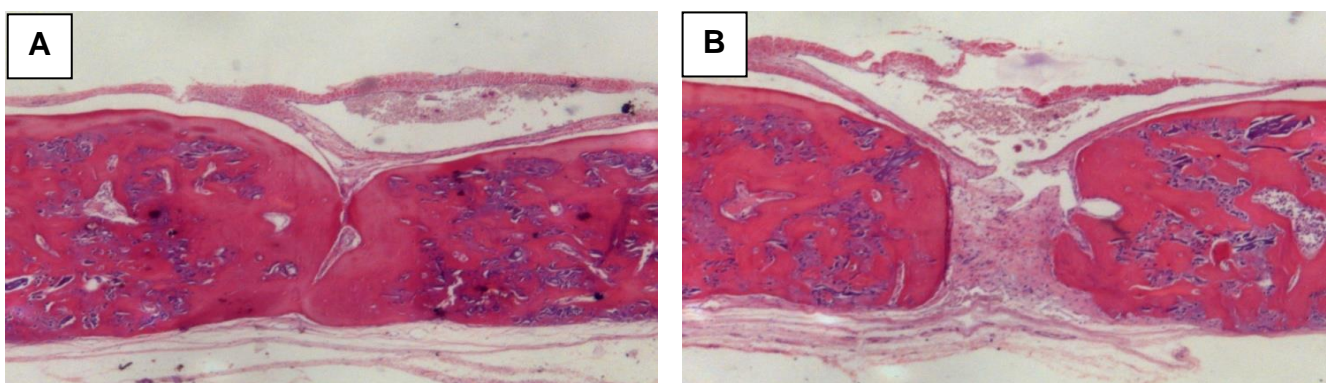
Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 11 – (A) Presença da membrana aos 30 dias pós-operatório (seta vermelha). (B) Maior neoformação óssea (TON e seta preta) e presença de partículas de Hidróxiapatita (\*) (B). Objetiva original de 6,5X - HE.**



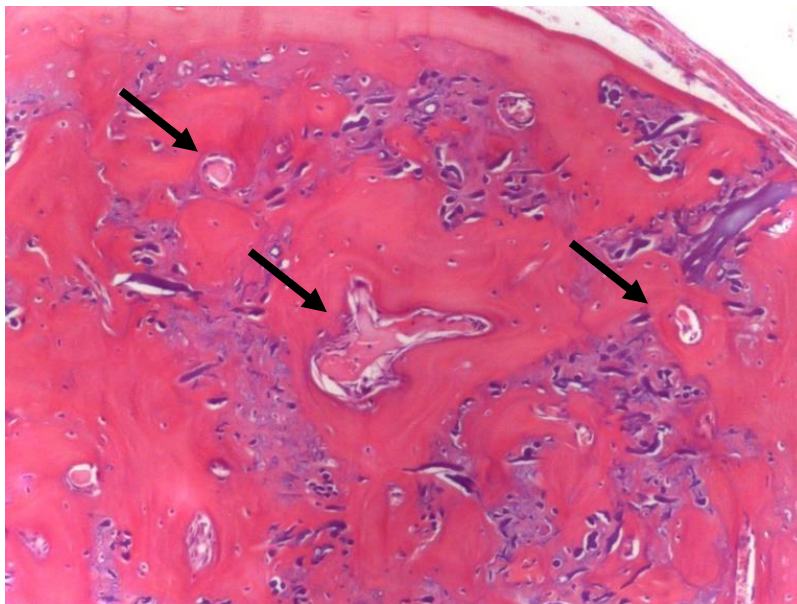
Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 12 – Centro do defeito aos 60 dias. A: centro do defeito fechado. B: Centro do defeito com tecido conjuntivo. Objetiva original de 12,5X - HE.**



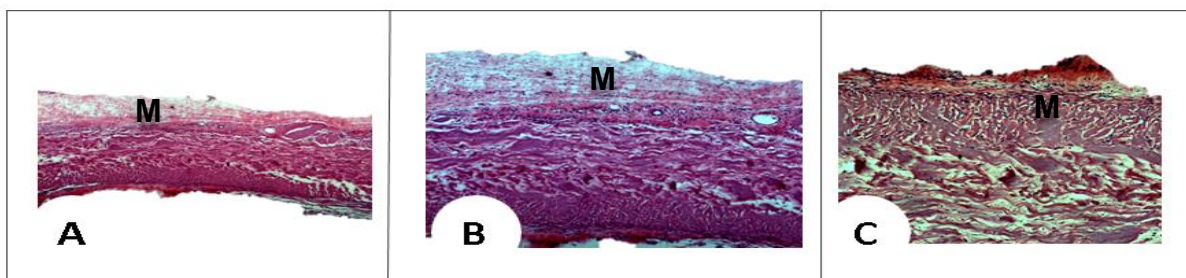
Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 13 – Presença de grânulos de hidroxiapatita no final do processo de reparo. Objetiva original de 25X - HE.**



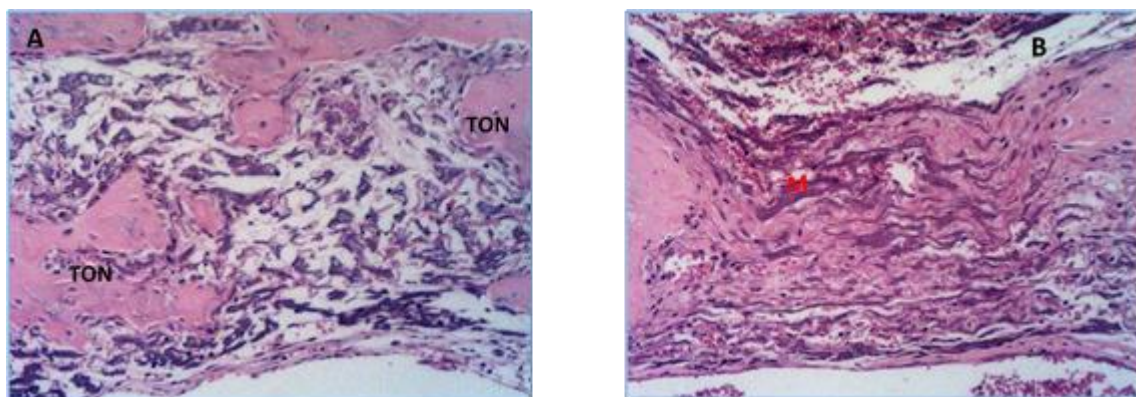
Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 14 - Grupo Controle Positivo (BG), 7 dias. (A) aumento de 6.3X: Presença da membrana (M) no centro do defeito (A), (B) aumento 12.5X, (C). Objetiva original de 25X - HE.**



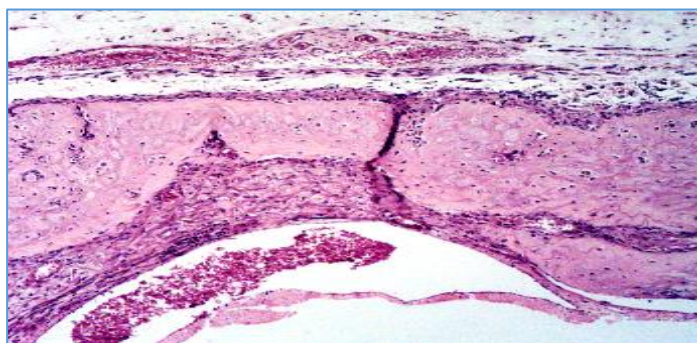
Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 15 - Grupo Controle Positivo (BG), 15 dias A. Observa-se remanescentes da membrana (M) entre as formações ósseas na região central do defeito ósseo. Aumento Original 100X -HE. B. – Remanescentes da membrana (M). Objetiva original 100X - HE.**



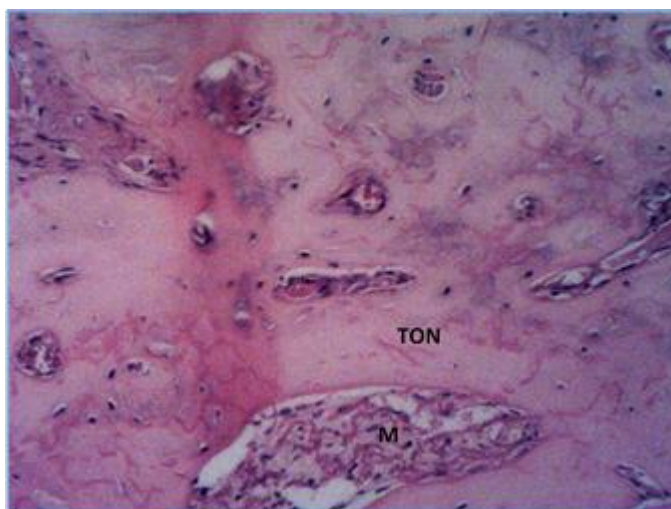
Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 16 - Grupo Controle Positivo (BG), 30 dias, H.E., Centro do defeito fechado por tecido ósseo neoformado. Aumento original de 12,5X - HE.**



Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 17. - Grupo Controle Positivo (BG), 60 dias. Observa-se o tecido ósseo neoformado no interior da membrana (M). objetiva original 100X - HE.**



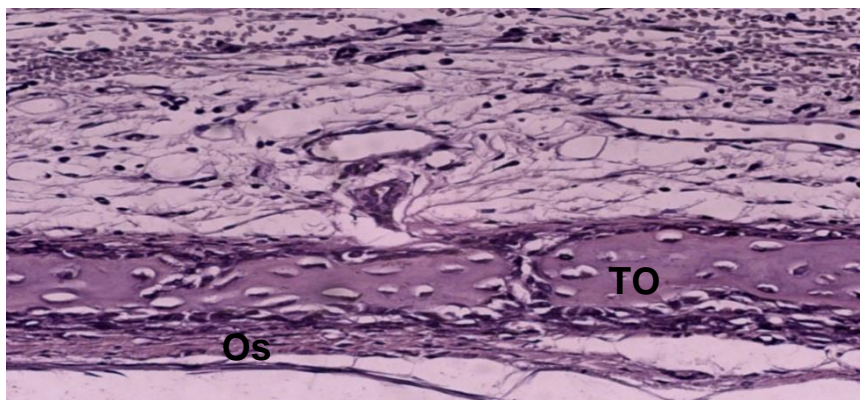
Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 18 - Grupo Controle Coágulo 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 - HE.**



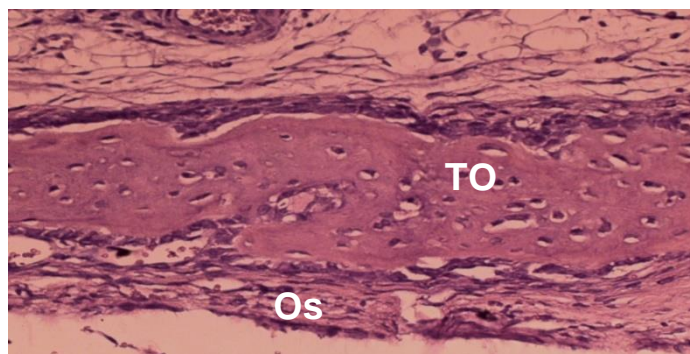
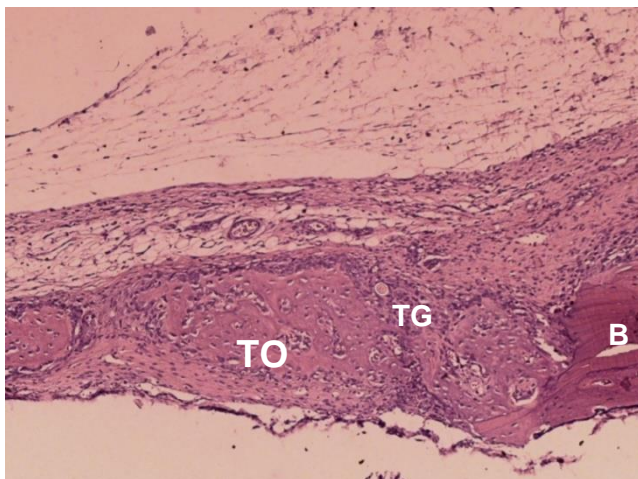
Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 19 - Grupo Controle Coágulo 15 dias. Trabéculas ósseas neoformadas delgadas (TO), com osteócitos recém aprisionados e osteoblastos (Os) alinhando-se com padrão organizado H.E. Objetiva original 40X - HE.**



Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 20 - Grupo Coágulo 30 dias. (A) Tecido de granulação (TG) e formações osteóides (TO) próximas à borda do defeito (B). Objetiva Original 12,5X - HE. (B): Trabécula óssea neoformada (TO) com osteoblastos (Os) alinhados. Objetiva original 25X - HE.**



Fonte: Autor, 2020

**FIGURA 21 - Grupo Coágulo 60 dias. Centro do defeito. 60 dias. Ausência de crescimento ósseo. Formação de tecido conjuntivo fibroso (TC). Objetiva original 12,5X - HE.**

