

YNARA MARIA GOMES DE SOUSA

**Comparação de dois substitutos ósseos de origem bovina
no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos**

**Araçatuba – SP
2026**

YNARA MARIA GOMES DE SOUSA GOMES

**Comparação de dois substitutos ósseos de origem bovina
no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientadora: Prof.^a Assoc. Dr.^a Daniela Ponzoni

**Araçatuba – SP
2026**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G633c Gomes, Ynara Maria Gomes de Sousa.
Comparação de dois substitutos ósseos de origem bovina no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos / Ynara Maria Gomes de Sousa Gomes. – Araçatuba, 2026
47 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientadora: Profa. Daniela Ponzoni

1. Materiais biocompatíveis 2. Regeneração óssea
3. Xenoenxertos 4. Colágeno I. T.

Black D7
CDD 617.6

À minha mãe, Maria do Perpétuo Socorro Gomes do Nascimento, que através do seu amor, me deu forças para acreditar que tudo é possível.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** por me permitir trilhar um caminho que não apenas correspondeu aos meus sonhos, mas superou tudo o que um dia imaginei. A Ele, que permanece ao meu lado em cada passo, devo a força, a alegria e a confiança que sustentam o propósito d'Ele para a minha vida. Como bem está escrito na bíblia: “O cavalo prepara-se para o dia da batalha, mas do Senhor vem a vitória” (Provérbios 21:31), reconheço que, embora tenha tido muito esforço, cada conquista só foi possível porque Ele esteve à frente de tudo.

Agradeço profundamente a **Santa Catarina de Alexandria**, por ser presença fiel em cada capítulo da minha jornada de estudos. Santa Catarina de Alexandria, conto contigo, conta também tu comigo.

À minha mãe, **Maria do Perpétuo Socorro Gomes do Nascimento**, dedico um agradecimento que ultrapassa qualquer palavra. Se eu sou alguém que acredita que tudo é possível, é porque ela está sempre lá, fazendo o impossível se tornar realidade. Tudo o que sou e tudo o que conquistei se entrelaça ao amor, sacrifício e fé que ela deposita em mim todos os dias. Estou aqui porque ela acreditou e continua acreditando.

Ao meu pai, **Fábio Murilo da Costa Sousa**, agradeço o afeto apoio que sempre me ofereceu. Obrigada por cada palavra de incentivo e cada gesto de cuidado. Carrego seu apoio comigo em cada etapa dessa caminhada, e ele fez e sempre fará diferença.

À minha irmã mais velha, **Yamila Larisse Gomes de Sousa**, minha inspiração diária, exemplo e quem tenho uma admiração profunda. A tenho como referência, como alguém que trilhou o caminho do mestrado antes de mim e me incentiva a ser o melhor que posso. Crescemos juntas, compartilhando sonhos desde pequenas, e hoje é emocionante perceber que estamos realizando muitos deles, cada uma à sua maneira, mas sempre lado a lado. Estendo esse agradecimento ao meu cunhado **Antônio Neto Viana**, que além de me incentivar constantemente, é uma grande inspiração como professor, nossas trocas de ideias sempre me motivam e enriquecem minha trajetória.

À minha irmã mais nova, **Yane Fábria Gomes de Sousa**, que vi crescer e hoje se tornou uma mulher que me enche de orgulho. Obrigada por tudo que faz por mim, pela

presença forte, por sua ajuda em cada detalhe e por ser, desde sempre, aquela que chegou como uma grande notícia na minha vida, e que hoje continua trazendo as melhores, enchendo meu coração de alegria e orgulho.

Aos meus avós paternos, **Maria José da Costa Sousa (vovó Mazé)** e **Antônio Ferreira de Sousa (vovô Samarone)**, e aos meus avós maternos, **Agnelo Torres do Nascimento Filho (vovô Guinú)** e **Luzia Gomes do Nascimento (vovó Luzia)**, agradeço por terem me ensinado, de formas únicas, o significado mais puro do amor. Carrego comigo a bênção do amor verdadeiro que recebo de todos eles. Ao meu **vovô Guinú**, *in memoriam*, deixo um agradecimento especial. Vive em mim a sua voz que sempre dizia para eu ir atrás dos meus sonhos, sem medo, com coragem e com vontade. E é por causa dele que a palavra medo nunca fez parte do meu vocabulário.

Ao meu primo querido, **Níckollas Maxwell**, que é também um irmão para mim, agradeço pelo apoio incansável, pela parceria e pela amizade que me sustentam.

À minha **família inteira**, deixo meu amor e gratidão por acreditarem em mim e torcerem pela minha caminhada.

À minha orientadora, **Profª Drª Daniela Ponzoni**, meu agradecimento especial. Tive a honra de encontrar não apenas uma orientadora, mas uma mulher extremamente inteligente, admirável, calma e paciente. Uma pessoa que consegue transformar qualquer inquietação em tranquilidade, e que nunca deixou de acreditar em mim. Sua presença fez toda diferença na minha formação e no meu crescimento pessoal e científico. Sou eternamente grata por ser ela a minha orientadora nessa trajetória.

Ao **Mateus Torres**, amigo que compartilha comigo cada etapa dessa jornada em Araçatuba, agradeço pela parceria, companheirismo e pela sensação de família que ele me oferece todos os dias enquanto longe das nossas.

Aos meus amigos do **Piauí**, que mesmo distantes fazem parte de algo muito precioso na minha vida: um amor construído na amizade verdadeira, na torcida recíproca e agora na saudade. Represento todos citando **Ana Lígia, Keven Nascimento, Yarla Maria, Millyam Karem, Francisco Varner, Francisco Roger e Andréia Lustosa**.

À minha **psicóloga**, agradeço por me acompanhar em um percurso que, como a vida, é feito de altos e baixos, movimentos, rupturas e reconstruções. Sua escuta e compreensão me ajudaram a sustentar a travessia, a elaborar conflitos e a reencontrar

equilíbrio quando o mundo interno ameaçava se desorganizar. Sua presença faz diferença. Sou muito grata por me ouvir.

Aos meus amigos da pós-graduação, do grupo CTBMF FOA/UNESP, **Arthur Henrique Alécio Viotto**, **Matheus Henrique Faccioli Raghianti**, **Juliana de Aguiar Silveira Meira**, **Luma Caroline Vendrame**, **Camila Cerantula Moura**, **Jozeias Fernandes de Sousa**, agradeço a rotina dividida: em aulas, plantões, clínicas, congressos e na vida. Agradeço também ao amigo **Otávio Senji Ivasa Aoki**, que tornou meus dias em Araçatuba mais leves. Ao meu grupo de pesquisa, agradeço pela colaboração no desenvolvimento do trabalho: **João Paulo Schmitt Lopes**, **Izabella Sol**, **Marcos Eduardo Gomes Alves**, **Martina Andreia Lage Nunes** (a quem registro também um carinho especial pela pequena **Helena**, que ainda estava no forinho) e aos alunos de iniciação científica de modo geral. Ao grupo de pesquisa OBRESC, **Maísa Pereira**, **Maria Eduarda Santana** e **Paulo Matheus**, obrigada por toda ajuda, disponibilidade e apoio. Minha gratidão também às amigas **Ana Paula Miranda** e **Francieli Flores**, que estiveram ao meu lado dentro e fora da pós de uma maneira especial. A presença delas foi imensamente essencial.

Aos professores que me formaram não apenas como profissional, mas como ser humano: à minha primeira professora, **Tia Regina Célia**, irmã da minha mãe, e a todas da minha família que dedicaram suas vidas à docência, eu agradeço. Venho de uma geração de mulheres fortes, minhas avós e minha mãe, que também são professoras e inspiram meu amor pelo ensino. É desse legado de força feminina que despertei para a arte de ensinar, e isso me enche de orgulho e gratidão. Agradeço também aos professores que marcaram a minha trajetória: **Fátima Basílio**, **Antônia Silva**, **Juvenildo Santos**, **Socorro Costa**, **Prof^a Dr^a Maria Cândida de Almeida Lopes** e **Prof Dr. Alexandre Henrique de Melo Simpício**. Agradeço aos professores da UNESP, especialmente ao **Prof Dr. Francisley Ávila Souza**, por seu acolhimento, incentivo, generosidade.

Aos professores **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, **Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho** e **Prof. Dr. André Luis da Silva Fabris**, pelos ensinamentos transmitidos nos plantões e nas clínicas, que contribuíram para minha formação prática. À **Prof.^a Dr.^a Ana Paula Farnezi Bassi**, e **Prof.^a Dra. Alessandra Marcondes Aranega**, reconheço e valorizo todas as oportunidades e experiências proporcionadas ao longo dessa trajetória. À **Prof.^a Dr.^a Roberta Okamoto**, pela gentileza desde o primeiro

contato no dia da prova e pela enorme admiração que tenho por sua inteligência; agradeço a honra de tê-la em minha banca. À **Prof.^a Dr.^a Mariza Akemi Matsumoto**, pela disponibilidade do laboratório e pela receptividade. Ao **Prof. Dr. Edilson Ervolino, Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho** e ao **Rômulo Sales-Jr**, por terem contribuído com o desenvolvimento da análise de birrefringência.

Aos funcionários que fazem essa instituição funcionar e que tanto me ajudaram no dia a dia, **Fausto, Celinha, Marco, Paulo, Lucas, Cristiane Elis, Luís Felipe, Cristiane, Bianca, João, Karen, Natália e Giseli**, deixo meu agradecimento sincero.

Ao **Marlus da Silva Pedrosa**, registro o meu reconhecimento e admiração. Ter alguém com tamanha trajetória acadêmica e científica como parte da minha banca é uma grande honra. Sua dedicação à pesquisa é inspiradora e um exemplo. Além de tudo, dividir esta conquista com um conterrâneo piauiense torna este momento ainda mais especial e significativo para mim.

Ao **Hospital Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba**, pelo espaço proporcionado para o contínuo aperfeiçoamento clínico. Aproveito para agradecer a todos os pacientes atendidos durante os plantões e ambulatórios, meu sincero reconhecimento pela confiança depositada em nossos cuidados.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA/UNESP**, na pessoa do **Diretor Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem** e **Vice-diretor Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra**. Sou grata pelo conhecimento que adquiri ao longo dessa trajetória em uma das instituições mais renomadas do país.

Às empresas **Regener** e **Implacil**, pela confiança na pesquisa e pelo fornecimento dos materiais essenciais para o desenvolvimento do estudo.

E, por fim, agradeço **aos animais, in memoriam**, que contribuíram para o avanço da ciência e para a construção deste trabalho.

*“O mundo é repleto de coisas óbvias que
ninguém, em hipótese alguma, observa”*

Arthur Conan Doyle

RESUMO

SOUSA, Y. M. G. **Comparação de dois substitutos ósseos de origem bovina no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos.** 2026. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

A regeneração óssea guiada (ROG) corresponde a uma técnica fundamental na implantodontia, consolidada como uma abordagem que possibilita a formação de um arcabouço ósseo adequado para a instalação de implantes dentários. Entre os biomateriais, os enxertos xenógenos de origem bovina destacam-se pela biocompatibilidade e propriedades osteocondutoras. Este estudo avaliou o reparo ósseo de defeitos críticos em calvárias de ratos preenchidos por dois substitutos ósseos à base de hidroxiapatita e colágeno com diferentes concentrações. Foram utilizados 54 ratos Wistar submetidos à confecção de defeito crítico de 5 mm e preenchidos com materiais de acordo com os grupos: CS (Coágulo Sanguíneo), EX (Extra Graft[®]), BO (Bio-Oss Collagen[®]), recobertos por membrana de colágeno (Green Membrane[®]). Os animais foram eutanasiados aos 7, 14 e 28 dias, e as amostras analisadas por microtomografia e histomorfometria. Aos 14 e 28 dias, o grupo EX apresentou maior porcentagem de volume ósseo ($p < 0,05$) e melhor microarquitetura trabecular em comparação com o grupo BO e CS. Aos 28 dias, o grupo EX demonstrou valores maiores em relação ao grupo BO. O grupo EX também exibiu maior deposição inicial de matriz colágena, vascularização e neoformação óssea mais evidente, com sinais de integração e remodelação tecidual até os 28 dias. Os resultados sugerem que o biomaterial EX é uma opção promissora para a ROG, devido à sua capacidade osteocondutora e integração tecidual.

Palavras-chave: biomateriais; regeneração óssea; enxerto xenógeno; colágeno.

ABSTRACT

SOUSA, Y. M. G. **Comparison of two bovine bone substitutes in the repair of critical defects in rat calvaria.** 2026. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

Guided bone regeneration is a fundamental technique in implant dentistry, established as an approach that enables the formation of a suitable bone framework for the placement of dental implants. Among biomaterials, xenogeneic grafts of bovine origin stand out for their biocompatibility and osteoconductive properties. This study evaluated the bone repair of critical defects in rat calvaria filled with two bone substitutes based on hydroxyapatite and collagen at different concentrations. Fifty-four Wistar rats were used, subjected to the creation of a 5 mm critical defect and filled with materials according to the groups: CS (Coágulo Sanguíneo), EX (Extra Graft®), BO (Bio-Oss Collagen®), covered by a collagen membrane (Green Membrane®). The animals were euthanized at 7, 14, and 28 days, and the samples were analyzed by microtomography and histomorphometric. At 14 and 28 days, the EX group showed a higher percentage of bone volume ($p < 0.05$) and better trabecular microarchitecture compared to the BO and CS groups. At 28 days, the EX group showed higher values compared to the BO group. The EX group also exhibited greater initial deposition of collagen matrix, vascularization, and more evident bone neoformation, with signs of tissue integration and remodeling up to 28 days. The results suggest that the EX biomaterial is a promising option for guided bone regeneration due to its osteoconductive capacity and tissue integration.

Keywords: biomaterials; bone regeneration; xenograft; collagen.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem representativa do fluxograma de distribuição dos animais em grupos de acordo com os tempos e tratamentos utilizados 16
- Figura 2 - Imagens representativas da cirurgia experimental. (A) Tricotomia na região fronto-parietal (B) Antissepsia com solução de polivinil pirrolidona iodo tópico (PVPI 10%) e anestesia local com Cloridrato de Mepivacaína 2% com Epinefrina 1:100.000 (C) Incisão em “V” em região fronto-parietal. (D) Osteotomia bicortical em região central da calota com uso de trefina 5 mm (E) Defeito ósseo em região central da calota (F) Substituto ósseo em posição (G) Estabilização da membrana. (H) Sutura 18
- Figura 3 - Imagens representativas do fluxograma do tempo de trabalho 19
- Figura 4 - Análise por microtomografia computadorizada do reparo ósseo em defeitos críticos. (A) Volume Ósseo; (B) Volume Ósseo por Volume de Tecido (BV/TV); (C) Número de Trabéculas (Tb.N.); (D) Separação Trabecular (Tb.Sp); (E) Espessura Trabecular (Tb.Th); (F) Porosidade Total (Po.Tot). Diferenças estatisticamente significativas indicadas nas figuras 24
- Figura 5 - Reconstruções tridimensionais obtidas por microtomografia computadorizada dos grupos BO e EX nos períodos de 14 e 28 dias 24
- Figura 6 - Fotomicrografias panorâmicas dos grupos CS, BO e EX em todos os períodos experimentais de 7, 14 e 28. As imagens superiores à cada panorâmica representam a área ampliada (40x) do tecido na área do coto esquerdo, centro do defeito e coto direito 25
- Figura 7 - Fotomicrografias da região dos cotos ósseos e do centro do defeito do grupo CS na magnificação de 40x 26
- Figura 8 - Fotomicrografias da região dos cotos ósseos e do centro do defeito do grupo BO na magnificação de 40x 27
- Figura 9 - Fotomicrografias da região dos cotos ósseos e do centro do defeito do grupo EX na magnificação de 40x 28
- Figura 10 - Avaliação histométrica de osso neoformado dos grupos CS, BO e EX aos 7, 14 e 28 dias 29

Figura 11 - Comparações das médias e desvio padrão inter e intragrupos para a análise de células inflamatórias nos períodos de 7, 14 e 28 dias. * indica diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 7 dias ($p < 0.05$), # indica diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 14 dias ($p < 0.05$) 30

Figura 12 - Comparações das médias e desvio padrão inter e intragrupos para a análise de capacidade angiogênica (vasos sanguíneos) nos períodos de 7, 14 e 28 dias. * indica diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 7 dias ($p < 0.05$), # indica diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 14 dias ($p < 0.05$) 31

Figura 13 - Representação da coloração PSR para identificar a maturidade das fibras de colágeno nos grupos BO e EX, aos 14 e 28 dias 32

Figura 14 – Análise da maturação das fibras colágenas avaliadas por Picrosirius Red sob luz polarizada. Quantificação das fibras colágenas maduras (Red). Quantificação das fibras colágenas imaturas (Green) 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
BO	Controle Positivo - <i>Bio-Oss Collagen</i> [®]
BV	<i>Bone Volume</i> (Volume Ósseo)
BV/TV	<i>Bone Volume / Tissue Volume</i> (Volume Ósseo por Volume de Tecido)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CS	Coágulo Sanguíneo
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EX	Grupo Teste - <i>Extra Graft</i> [®]
FOA-UNESP Paulista	Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista
HAp	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e Eosina
kVp	<i>Kilovolt Peak</i> (Pico de Quilovoltagem)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Tamponada por Fosfato)
Po.tot	<i>Total Porosity</i> (Porosidade Total)
PVPI	Povidona-Iodo
ROG	Regeneração Óssea Guiada
ROI	<i>Region of Interest</i> (Região de Interesse)
rpm / RPM	<i>Revolutions per Minute</i> (Rotações por Minuto)
Tb.N	<i>Trabecular Number</i> (Número de Trabéculas)
Tb.Sp	<i>Trabecular Separation</i> (Separação Trabecular)
Tb.Th	<i>Trabecular Thickness</i> (Espessura das Trabéculas)
UI	Unidade Internacional
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VOI	<i>Volume of Interest</i> (Volume de Interesse)
μCT	Micro-Tomografia Computadorizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1 Desenho do Estudo	15
2.2 Animais	15
2.3 Grupos Experimentais	15
2.4 Procedimento Cirúrgico	16
2.5 Cuidados Pós-Operatórios	18
2.6 Eutanásia	18
2.7 Análises	19
2.7.1 Avaliação da Microarquitetura Óssea por Micro-tomografia Computadorizada – μCT	19
2.7.2 Análise Histológica e Histomorfométrica	20
2.7.2.1 Análise do Perfil Inflamatório	20
2.7.2.2 Análise de Birrefringência	20
2.7.3 Análise Estatística	20
3 RESULTADOS	22
3.1 Avaliação por Micro-tomografia Computadorizada – μCT	22
3.2 Avaliação Histológica	24
3.2.1 Grupo CS	24
3.2.2 Grupo BO	25
3.2.3 Grupo EX	26
3.2.4 Análise Histomorfométrica - Osso Neoformado	27
3.2.5 Análise Histomorfométrica - Perfil Inflamatório	29
3.2.6 Análise de Birrefringência	31
4 DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea guiada (ROG) corresponde a uma técnica fundamental na implantodontia, consolidada como uma abordagem que possibilita a formação de um arcabouço ósseo adequado para a instalação de implantes e contribui para o sucesso clínico e longevidade das reabilitações implantossuportadas, uma vez que esses desfechos estão relacionados à quantidade e qualidade do tecido ósseo presente no sítio receptor [1-4]. O avanço dos biomateriais e técnicas cirúrgicas têm permitido resultados clínicos mais previsíveis [5].

O enxerto xenógeno de origem bovina tem se destacado devido à sua biocompatibilidade, propriedades osteocondutoras e viabilidade econômica [6]. Em comparação com os enxertos autógenos, considerados o padrão-ouro, permite ampla disponibilidade, dispensa um segundo sítio cirúrgico, reduz o tempo operatório e a morbidade [7]. A matriz óssea do osso xenógeno apresenta propriedades físico-químicas que favorecem a integração com o tecido receptor e a ROG sem riscos de rejeição imunológica [8, 9].

As diferentes apresentações dos biomateriais xenógenos podem influenciar na adaptação e a estabilidade no leito receptor, o que pode resultar no comprometimento do reparo ósseo [10]. Além disso, todos os tipos de enxerto apresentam limitações relacionadas ao fornecimento, à imunogenicidade e ao desempenho mecânico, o que impulsiona a inovação no desenvolvimento de biomateriais [5]. Essas limitações motivaram o avanço de composições que associem a hidroxiapatita (HAp) e o colágeno, visando melhor coesão, manipulação e manutenção do volume do enxerto [11].

Atualmente, o colágeno está sendo amplamente investigado no campo da ROG como um material substituto, devido à sua biocompatibilidade, hidrofília, baixo potencial imunogênico, adaptabilidade e atuação como arcabouços fundamentais capazes de transportar agentes bioativos. Além disso, pode ser processado em várias formas, como scaffolds, esponjas, membranas, hidrogéis e materiais compósitos [12]. Estudos clínicos têm evidenciado melhora significativa em parâmetros associados ao volume ósseo, além de destacarem a simplicidade da técnica [13, 14]. Um estudo que avaliou a regeneração óssea em calvárias de coelhos utilizando biomateriais com

diferentes concentrações de colágeno, demonstrou resultados mais favoráveis para as formulações com maior teor desse componente [15].

Estruturas à base de hidroxiapatita e colágeno têm demonstrado potencial para otimizar o reparo ósseo e favorecer a osseointegração, em razão da sinergia entre as propriedades osteocondutoras da hidroxiapatita e a matriz orgânica do colágeno [11]. Entretanto, o impacto das diferentes concentrações de colágeno no reparo ósseo ainda não está completamente elucidado. Esse estudo teve o objetivo de avaliar o reparo ósseo de defeitos críticos em calvárias de ratos preenchidos por dois substitutos ósseos à base de hidroxiapatita e colágeno com diferentes concentrações, um composto por 90% de grânulos de hidroxiapatita bovina e 10% de colágeno (Bio-Oss Collagen[®]) e outro por 75% de hidroxiapatita bovina e 25% de colágeno (Extra Graft[®]).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho do Estudo

O presente estudo foi conduzido conforme às diretrizes da ARRIVE guidelines [16] e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA - UNESP) sob o protocolo N° 707/2024 (Anexo A).

2.2 Animais

Foram utilizados cinquenta e quatro ratos *Wistar* (*Rattus Norvegicus Albinus*) machos, adultos e com peso entre 300-350 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade (FOA/UNESP). Esses animais foram mantidos no biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, alojados em gaiolas plásticas padrão, contendo três animais por gaiola, sob controle de temperatura e ciclo de luz do ambiente, com livre acesso à ração sólida e água *ad libitum* durante todo o período experimental. O cálculo amostral foi realizado de acordo com estudo prévio [17]. Para a determinação do poder estatístico da amostra, foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), e um poder de teste de 80%, com alpha definido como 0,05 (seis ratos por grupo) para comparar os diferentes grupos por tempo de análise.

2.3 Grupos Experimentais

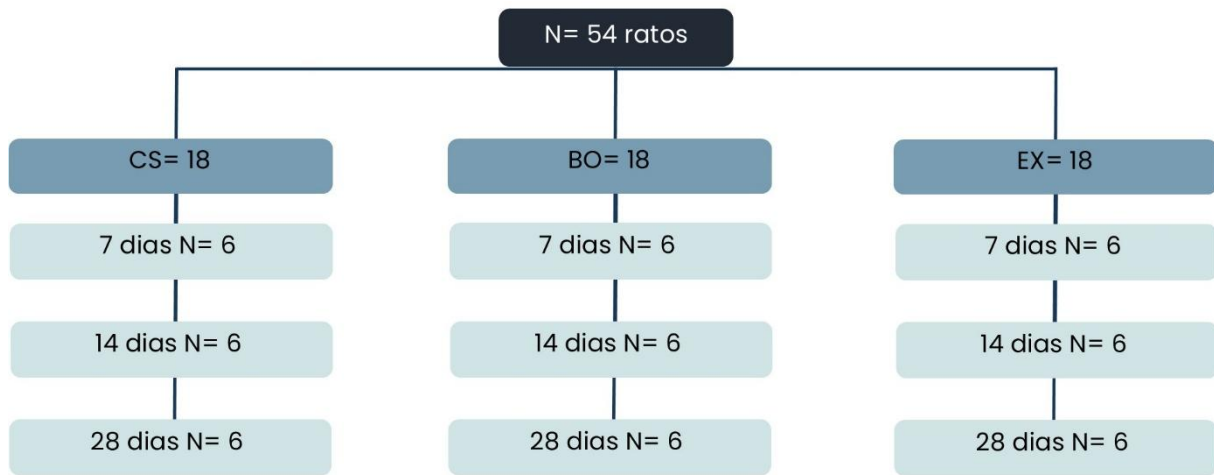
Os animais foram distribuídos em três grupos de acordo com o tratamento proposto:

- **Grupo CS:** defeito crítico preenchido por coágulo sanguíneo para a representação do grupo controle negativo (N = 18);
- **Grupo BO:** defeito crítico preenchido por composto xenógeno bovino Bio-Oss Collagen® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) para a representação do grupo controle positivo (N = 18);
- **Grupo EX:** defeito crítico preenchido por composto xenógeno bovino Extra

Graft XG-13® (Implacil De Bortoli, São Paulo, Brazil) (N = 18).

As cavidades de todos os grupos foram recobertas por membrana acelular Green Membrane® (Regener biomaterials, Curitiba, Brazil) de medidas 40 mm x 25 mm x 1 mm, que consiste em uma membrana orgânica natural, derivada do tendão bovino, composta por 100% de colágeno tipo I, biocompatível e estéril.

Figura 1 – Imagem representativa do fluxograma de distribuição dos animais em grupos de acordo com os tempos e tratamentos utilizados



Fonte: Elaborado pela própria autora

2.4 Procedimento Cirúrgico

Todos os animais foram mantidos em jejum por 12 h antes do procedimento cirúrgico. Em seguida, procedeu-se à pesagem, para realização da anestesia geral sob sedação com aplicação intramuscular de 90 mg/kg de Cloridrato de Cetamina 10% (Vetaset® - Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo) associada à 10 mg/kg de Cloridrato de Xilazina 2% (Dopaser® - Laboratório Calier do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil). Foi realizada a tricotomia na região fronto-parietal do animal (Figura 1- A), seguida de antissepsia com solução de polivinil pirrolidona iodo tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil).

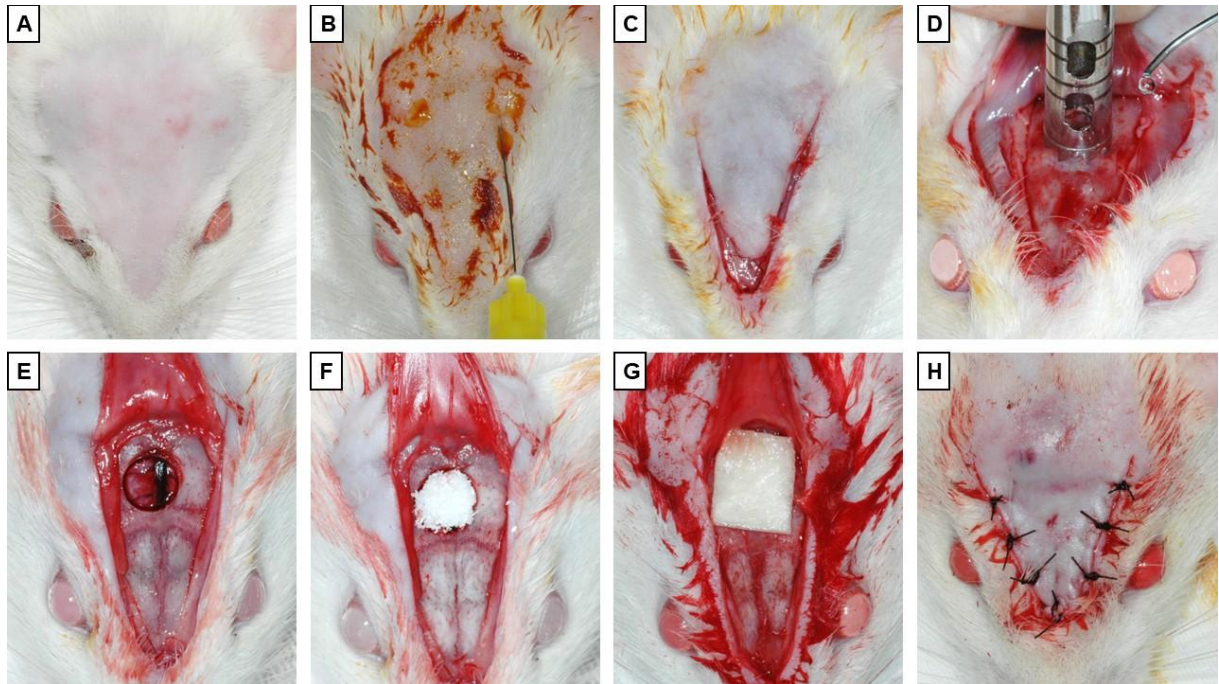
No intuito de analgesia local e hemostasia do campo operatório foi empregada a anestesia local de Cloridrato de Mepivacaína 2% com Epinefrina 1:100.000 (Mepiadre® - DFL Indústria e Comércio S.A., Jacarepaguá RJ, Brasil) (Figura 1- B). O acesso cirúrgico foi realizado por meio de uma incisão linear em forma “V” de 2 centímetros com uma lâmina de bisturi 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japan)

(Figura 1- C) montada em um cabo número 3 (Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA), seguido por descolamento mucoperiosteal do retalho e exposição do osso parietal.

Uma osteotomia bicortical da região central do osso parietal foi realizada com uma broca trefina de 5 mm de diâmetro interno (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil), acoplada em um contra ângulo redutor 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, SC, Brasil), conectado a uma peça de mão (BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) com velocidade de 1200 rpm e torque de 35 N (Figura 1- D). A calota craniana foi cuidadosamente removida com um descolador de periósteo, com a finalidade de preservar a integridade da dura-máter (Figura 1- E). Em seguida o defeito crítico foi preenchido (Figura 1- F) conforme os três grupos de tratamentos propostos (CS, BO, EX), com auxílio de um aplicador de biomaterial (Dental Bone Graft Carrier Titanium 3.5/3.9 mm de diâmetro, Osung, EUA). O volume de biomaterial utilizado para o preenchimento dos defeitos foi padronizado com base no cálculo do volume do defeito crítico criado. Considerando o formato cilíndrico do defeito de 5 mm de diâmetro interno, o volume foi determinado por meio da fórmula $V = \pi r^2 h$, onde r corresponde ao raio do defeito (2,5 mm) e h à espessura da calota craniana. A espessura média da calota craniana de ratos *Wistar* machos adultos, com aproximadamente 3 meses de idade e peso entre 300 g e 350 g, é de aproximadamente 1,0 mm [18]. Dessa forma, o volume calculado foi de aproximadamente 19,6 mm³ por defeito, sendo esse valor utilizado como referência para padronização da quantidade de biomaterial inserida em todos os grupos experimentais. Com o intuito de preservar o espaço do defeito ósseo sem interferência de tecidos moles, todos os defeitos foram recobertos por uma membrana absorvível (Green Membrane®, Regener biomaterials, Curitiba, PR, Brasil) (Figura 1- G). Para finalização do procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) em plano único externo (Figura 1- H).

Figura 2 - Imagens representativas da cirurgia experimental. (A) Tricotomia na região fronto-parietal (B) Antissepsia com solução de povidona-iodo tópico (PVPI 10%) e anestesia local com Cloridrato de Mepivacaína 2% com Epinefrina 1:100.000 (C) Incisão em “V” em região fronto-parietal. (D) Osteotomia bicortical em região central da calota com uso de trefina 5 mm (E) Defeito ósseo em região

central da calota (F) Substituto ósseo em posição (G) Estabilização da membrana. (H) Sutura



Fonte: Elaborado pela própria autora

2.5 Cuidados Pós-Operatórios

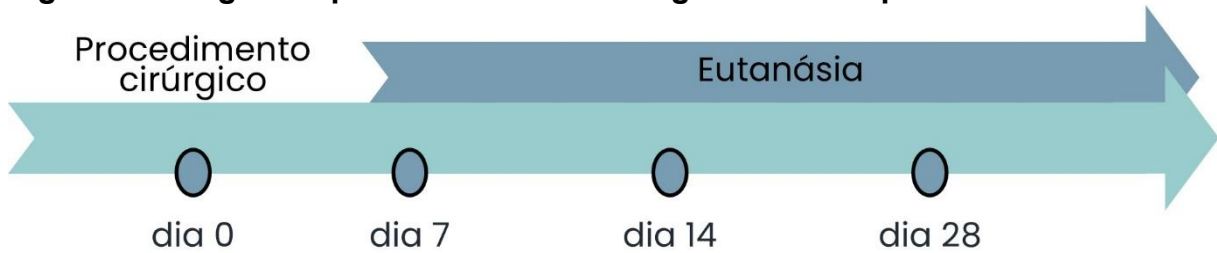
No pós-operatório imediato, todos os animais receberam, via intramuscular, 24.000 UI/kg de Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal Ltd., São Paulo, Brasil) e de 50 a 100mg/kg de Dipirona Sódica (Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltd., São Paulo, Brasil), via intraperitoneal. Os animais foram monitorados quanto ao bem-estar geral e complicações pós-operatórias.

2.6 Eutanásia

Aos 7, 14 e 28 dias de pós-operatório, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de uma dose tripla de anestésico, utilizando a cetamina 10%, 270 mg/kg (Vetaset® - Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) associado a xilazina 2%, 30 mg/kg (Dopaser® - Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brazil), administrada por via intraperitoneal. Os períodos experimentais foram estabelecidos com base nas fases biológicas do reparo ósseo, correspondendo,

respectivamente, à fase inflamatória e proliferativa inicial, à fase de neoformação óssea e à fase de maturação e remodelação do tecido ósseo [19; 20]. Em seguida, as calvárias foram coletadas e fixadas em formol neutro tamponado a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto- Hospitalar Ltd., Catanduva, SP, Brasil) por 48 h, sendo então submetidas à descalcificação e processamento histológico.

Figura 3 - Imagens representativas do fluxograma do tempo de trabalho



Fonte: Elaborado pela própria autora

2.7 Análises

2.7.1 Avaliação da Arquitetura Óssea por Microtomografia Computadorizada – μ CT

Foram selecionados, de forma aleatória, 04 amostras por grupo e por tempo de eutanásia (14 e 28 dias). O período de 7 dias não foi incluído na análise microtomográfica devido ao predomínio da fase inflamatória e proliferativa inicial do reparo ósseo, caracterizada majoritariamente por tecido não mineralizado, o que inviabiliza a obtenção de parâmetros morfométricos confiáveis por meio da microtomografia computadorizada [21]. Após fixação em formaldeído 10% durante 48 h e posterior lavagem em água corrente por 24 h, as peças foram mantidas em álcool 70%, e submetidas à avaliação em microtomógrafo computadorizado (Skyscan 1172, Kontich, Belgium). Foram utilizados os seguintes parâmetros: tamanho do pixel 11,87 μ m, 50 kVp, filtro de 0,5 mm de alumínio, rotação 0.6° e rotação do arco de 180°. Após a digitalização, as imagens obtidas foram importadas para o NRecon Reconstruction Software (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para a reconstrução tridimensional (3D) das calotas na escala de cinza, na qual as linhas vermelhas delimitaram a área reconstruída e a linha verde o centro da região de interesse. Após a obtenção das imagens em 3D, o Software DataViewer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) foi

utilizado para a determinação do volume de interesse (VOI) através do alinhamento da peça nos 3 planos (sagital, coronal e axial) e cálculo das médias de volume para delimitação do ROI (5 x 5mm), e os cortes foram salvos para análise óssea pelo Software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Os parâmetros morfométricos avaliados foram volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura das trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), separação das trabéculas (Tb.Sp) e porosidade total (Po.tot). Todos os dados foram tabulados para posterior análise estatística.

2.7.2 Análise Histológica e Histomorfométrica

Após fixação em formaldeído 10% por 48 h, as amostras foram lavadas em água corrente e desmineralizadas em solução constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por 8 semanas. Após a descalcificação, as peças foram gradualmente desidratadas em alcóois (70 a 100%), com posterior diafanização com xilol e inclusão em parafina. Na sequência, microtomia com seções axiais seriadas de 5 µm de espessura (Leica Biosystems), montagem de lâminas e coloração em hematoxilina e eosina (HE). Um único investigador (cego em relação à alocação dos grupos) realizou a análise histológica qualitativa descritiva em todas as amostras. As fotos foram montadas em panorâmica para análise qualitativa. A descrição histológica foi realizada a partir das panorâmicas obtidas através do scanner de lâminas (Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant, State University of New York, USA) e a confirmação das estruturas encontradas nos maiores aumentos. A avaliação descritiva considerou a presença e a distribuição de tecido ósseo neoformado, tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório e a presença ou ausência dos biomateriais nas áreas experimentais. Para a análise histomorfométrica, os cortes histológicos foram fotografados com aumentos de 4x e 40x. As imagens obtidas foram salvas em formato JPEG e analisadas por meio da ferramenta *hands free* do software ImageJ® (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A partir dessa análise, a área de osso neoformada foi selecionada dentro da área do defeito ósseo e separada da área correspondente ao tecido conjuntivo e ao biomaterial, quando presente.

2.7.2.1 Análise do Perfil Inflamatório

Para a avaliação do perfil inflamatório, foi realizada a contagem das células inflamatórias, bem como de vasos sanguíneos. Para isso, uma lâmina de cada animal, em cada tempo experimental, foi selecionada. De cada lâmina, foram obtidas três imagens fotomicrográficas em microscópio de luz (DM 4000B, Leica), acoplado a um sistema de captura de imagens composto por processador de imagens coloridas (software Leica Qwin V3, Leica), câmera digital colorida (DFC 500, Leica) e computador (Intel Core i5, Intel Corp., Santa Clara, CA, USA; Windows 10, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

As imagens foram obtidas com aumento de 100×, sendo uma fotografia realizada no centro do defeito ósseo, uma à direita e outra à esquerda. A análise das imagens foi realizada por um avaliador previamente calibrado e cego quanto aos grupos experimentais e aos períodos de avaliação, a fim de reduzir possíveis vieses de mensuração. As imagens foram analisadas no software ImageJ®, no qual foi aplicada uma grade (*grid*) contendo 130 pontos. Foram contabilizadas todas as células inflamatórias e os conjuntos de vasos sanguíneos que tocavam as intersecções dos pontos da grade.

2.7.2.2 Análise de birrefringência

Os níveis de maturação das fibras colágenas foram avaliados em cortes histológicos corados com Picrosirius Red (PSR) e analisados sob microscopia de luz polarizada. As imagens foram obtidas em microscópio óptico com filtro polarizador, sob ampliação de 400x, e analisadas por meio do software Leica LAS (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). A classificação das fibras colágenas foi realizada com base no padrão de birrefringência observado sob luz polarizada. Fibras com tonalidades amarelo-esverdeadas foram consideradas finas e imaturas, enquanto fibras com tonalidades vermelho-amareladas foram classificadas como espessas e maduras. Após a seleção das cores correspondentes a cada tipo de fibra colágena, o software calculou automaticamente a área marcada para cada espectro cromático e foram submetidas à análise estatística para determinação da média e do desvio padrão para cada grupo, em cada intervalo de tempo experimental.

2.7.3 Análise Estatística

A análise dos dados foi executada no software GraphPad Prism 8.0.1. A distribuição dos dados foi verificada utilizando o teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Após a confirmação da distribuição normal das amostras, teste ANOVA 2-fatores e o pós-teste de Tukey para comparações múltiplas foram realizados, avaliando-se a significância intra e intergrupos. Todos os testes estatísticos foram considerados com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

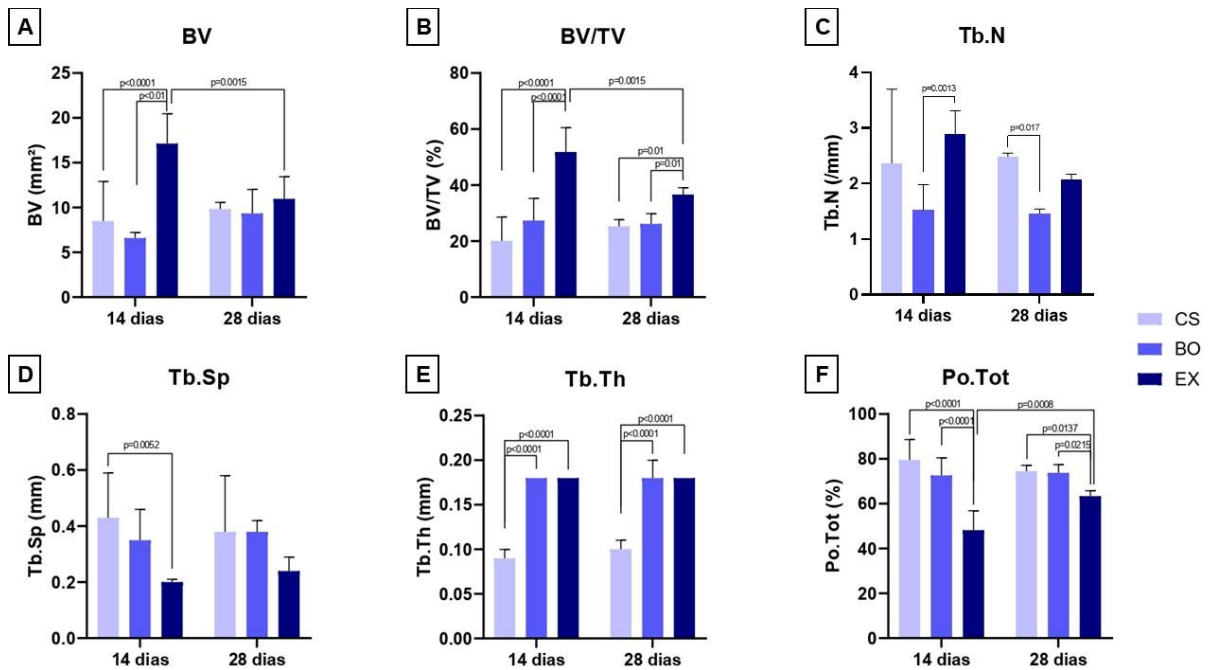
3.1 Avaliação por Micro-tomografia Computadorizada – μ CT

A análise microtomográfica revelou diferenças significativas entre os grupos ao longo dos períodos avaliados. Aos 14 dias, o grupo EX apresentou maior volume ósseo (BV) que CS e BO ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Além disso, observou-se diferença significativa entre os períodos para o próprio grupo EX, com BV aos 28 dias sendo inferior ao valor obtido aos 14 dias ($p = 0,0015$). A proporção de volume ósseo por volume de tecido (BV/TV) seguiu padrão semelhante, com EX exibindo valores mais elevados que CS e BO aos 14 dias ($p < 0,0001$ para ambas as comparações) e permanecendo superior aos dois grupos aos 28 dias ($p = 0,01$ e $p = 0,001$, respectivamente).

Na avaliação dos parâmetros microestruturais relacionados à qualidade do tecido ósseo, no número de trabéculas (Tb.N), EX apresentou valores significativamente maiores que BO aos 14 dias ($p = 0,0013$), enquanto aos 28 dias CS mostrou valores superiores a BO ($p = 0,017$). A separação trabecular (Tb.Sp) foi menor no grupo EX em comparação ao CS aos 14 dias ($p = 0,0052$), sem diferenças relevantes entre os grupos aos 28 dias. A espessura trabecular (Tb.Th) foi consistentemente maior nos grupos BO e EX em relação ao CS tanto aos 14 quanto aos 28 dias ($p < 0,0001$ em todas as comparações). Quanto à porosidade total (Po.Tot), o grupo CS apresentou valores mais altos que BO e EX aos 14 dias ($p < 0,0001$ para ambos). Aos 28 dias, a porosidade permaneceu maior em CS quando comparado a EX ($p = 0,0137$), e BO apresentou porosidade superior à de EX ($p = 0,0008$).

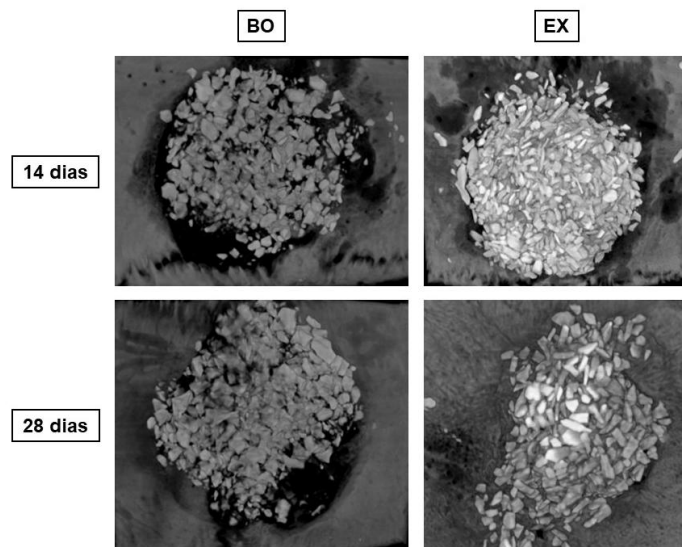
Os grupos preenchidos com biomateriais apresentaram maior neoformação óssea e microarquitetura mais favorável em comparação ao coágulo sanguíneo, com destaque para o grupo EX, que demonstrou desempenho superior na maior parte dos parâmetros avaliados.

Figura 4 - Análise por microtomografia computadorizada do reparo ósseo em defeitos críticos. (A) Volume Ósseo; (B) Volume Ósseo por Volume de Tecido (BV/TV); (C) Número de Trabéculas (Tb.N.); (D) Separação Trabecular (Tb.Sp); (E) Espessura Trabecular (Tb.Th); (F) Porosidade Total (Po.Tot). Diferenças estatisticamente significativas indicadas nas figuras



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 5 - Reconstruções tridimensionais obtidas por microtomografia computadorizada dos grupos BO e EX nos períodos de 14 e 28 dias

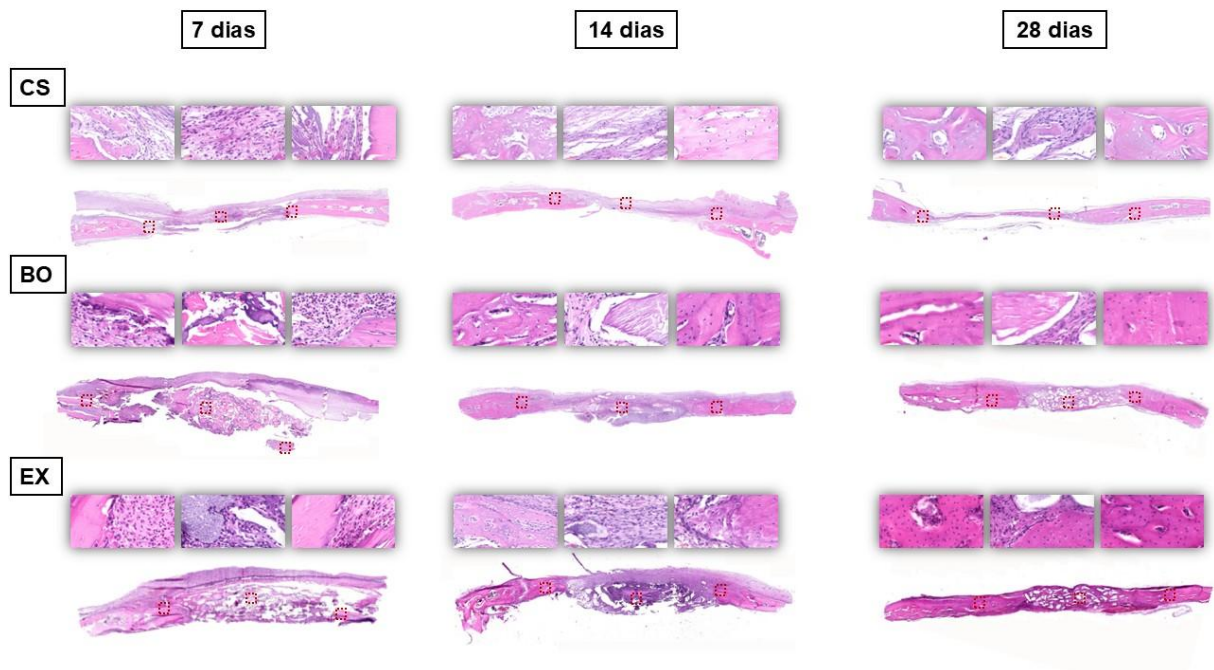


Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.2 Avaliação Histológica

A avaliação histológica permitiu identificar padrões distintos de reparação tecidual ao longo dos períodos experimentais.

Figura 6 - Fotomicrografias panorâmicas dos grupos CS, BO e EX em todos os períodos experimentais de 7, 14 e 28 dias. As imagens superiores à cada panorâmica representam a área ampliada (40x) do tecido na área do coto esquerdo, centro do defeito e coto direito



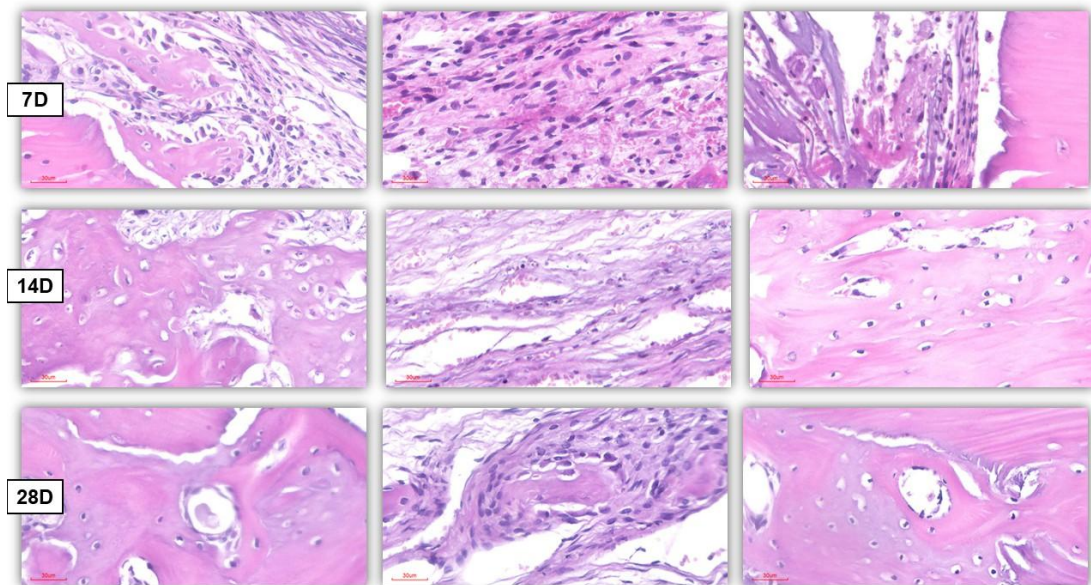
Fonte: Elaborado pela própria autora

3.2.1 Grupo CS

Aos 7 dias o defeito encontrava-se predominantemente preenchido por tecido de granulação, sem formação óssea na região central. Na reconstrução panorâmica, observa-se o arcabouço da membrana ainda bem definido, permeado por células inflamatórias e matriz conjuntiva. Observou-se apenas discreta neoformação óssea restrita às bordas, composta por tecido ósseo imaturo, enquanto o tecido de granulação apresentava macrófagos, neoformação vascular, fibroblastos e matriz extracelular pouco organizada. Aos 14 dias, a neoformação óssea permanecia limitada aos cotos e o centro do defeito mostrava-se preenchido por tecido conjuntivo fibroso mais organizado, acompanhado de intensa atividade fibroblástica e neoformação vascular. É possível observar a membrana em avançado processo de

degradação. No 28º dia, verificou-se avanço do processo de regeneração, com expansão da formação óssea a partir das margens dos cotos; contudo, a porção central ainda era composta por tecido conjuntivo frouxo não modelado, com pequenas ilhotas de osso neoformado distribuídas periféricamente e presença de células osteoprogenitoras. É evidenciado o arcabouço da membrana com colabamento para o interior dos defeitos na maioria dos espécimes.

Figura 7 - Fotomicrografias da região dos cotos ósseos e do centro do defeito do grupo CS na magnificação de 40x



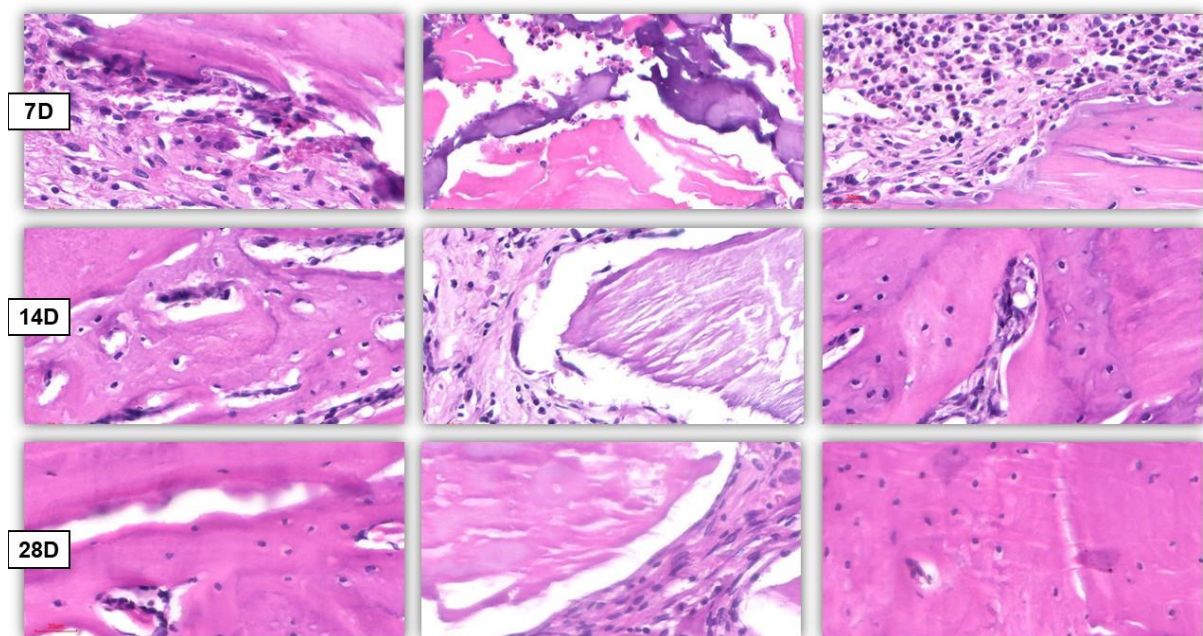
Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.2.2 Grupo BO

Aos 7 dias numerosos grânulos de hidroxiapatita encontravam-se distribuídos ao longo do defeito, sem sinais iniciais de remodelação, envolvidos por tecido conjuntivo vascularizado e infiltrado inflamatório moderado. Na reconstrução panorâmica, observa-se o arcabouço da membrana ainda bem definido, permeado por células inflamatórias e matriz conjuntiva. Aos 14 dias, os grânulos mantinham-se estáveis e amplamente integrados ao tecido conjuntivo, que apresentava maior organização das fibras colágenas e redução do infiltrado inflamatório. Pequenas ilhas de neoformação óssea eram identificadas tanto no centro quanto nas margens do defeito. A imagem panorâmica demonstra o arcabouço da membrana em avançado

processo de degradação. No 28º dia, o tecido conjuntivo mostrava maturação progressiva, com áreas mais expressivas de osso neoformado envolvendo os grânulos, indicando início da integração e remodelação do biomaterial. Foi possível observar ainda, a degradação contínua do arcabouço da membrana, já amplamente permeada por tecido conjuntivo.

Figura 8 - Fotomicrografias da região dos cotos ósseos e do centro do defeito do grupo BO na magnificação de 40x



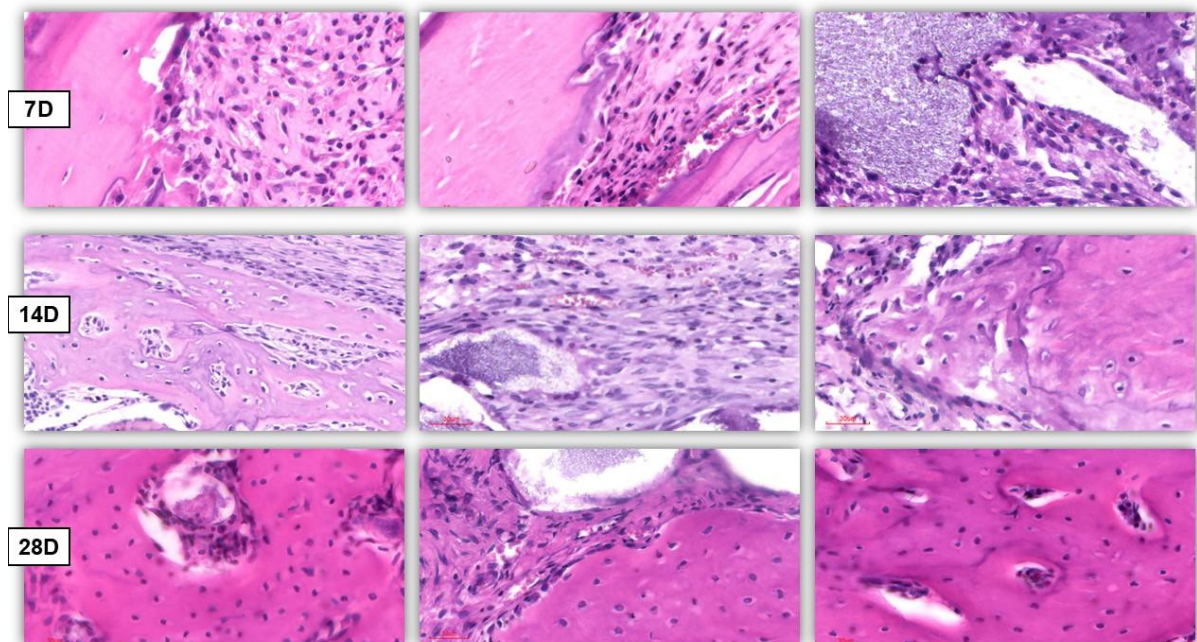
Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.2.3 Grupo EX

Aos 7 dias havia extensa distribuição de grânulos de hidroxiapatita por todo o defeito, circundados por abundante matriz colágena recém-depositada, tecido conjuntivo jovem e intensa vascularização, acompanhados por infiltrado inflamatório compatível com fase inicial de reparo. O arcabouço colágeno da membrana permanece íntegro. Aos 14 dias, os grânulos permaneciam envolvidos por tecido conjuntivo mais organizado, com maior alinhamento das fibras colágenas, presença de vasos sanguíneos e células multinucleadas associadas à remodelação do biomaterial. A neoformação óssea era mais evidente nas proximidades dos cotos e o arcabouço da membrana encontrava-se em processo progressivo de reabsorção, já

amplamente permeado por células do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. No 28º dia, a maioria dos espécimes apresentava defeitos em estágio avançado de reparação, demonstrando tendência ao fechamento parcial ou quase completo, com grânulos de hidroxiapatita ainda presentes na região central. Em maior maturação tecidual, observavam-se áreas de osso neoformado envolvendo os grânulos, vasos sanguíneos e células gigantes multinucleadas, caracterizando processo ativo de remodelação. Verificava-se também, a degradação contínua do arcabouço colágeno da membrana.

Figura 9 - Fotomicrografias da região dos cotos ósseos e do centro do defeito do grupo EX na magnificação de 40x



Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.2.4 Análise Histomorfométrica – Osso neoformado

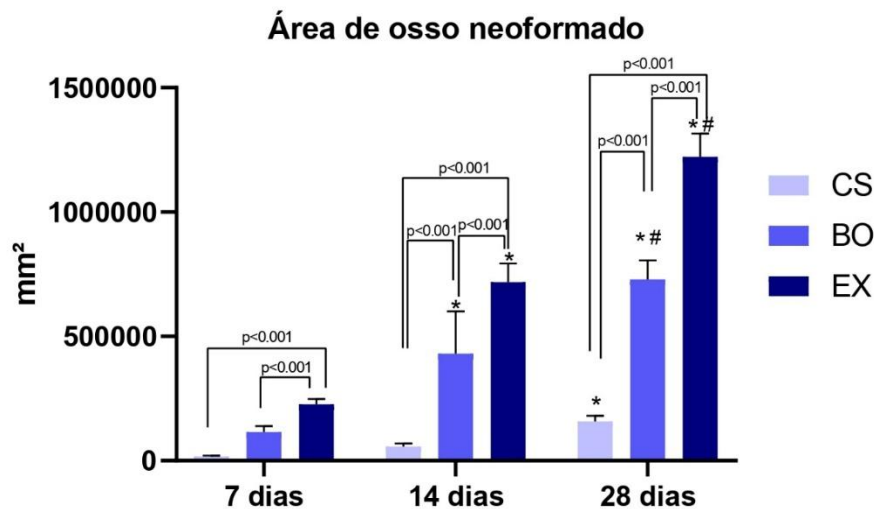
A análise histomorfométrica demonstrou aumento progressivo da área de osso neoformado em todos os grupos ao longo dos períodos experimentais, com diferenças quantitativas significativas entre os tratamentos. De maneira geral, os valores obtidos corroboraram os achados da análise histológica descritiva.

O grupo CS apresentou os menores valores de área de osso neoformado em todos os tempos avaliados, evidenciando formação óssea limitada e progressão lenta

do reparo ($p < 0.05$). O grupo BO apresentou valores intermediários, com aumento significativo da área óssea ao longo do tempo, porém mantendo padrões quantitativos inferiores ao grupo teste nos períodos intermediário e tardio.

O grupo EX apresentou valores superiores de área de osso neoformado, especialmente aos 14 e 28 dias, indicando maior eficiência no processo de reparo ósseo ($p < 0.05$). A progressão temporal intragrupo foi mais acentuada nesse grupo, refletindo maior quantidade de tecido ósseo neoformado quando comparado aos grupos CS e BO.

Figura 10 - Avaliação histométrica de osso neoformado dos grupos CS, BO e EX aos 7, 14 e 28 dias. * indica diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 7 dias ($p < 0.05$), # indica diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 14 dias ($p < 0.05$)



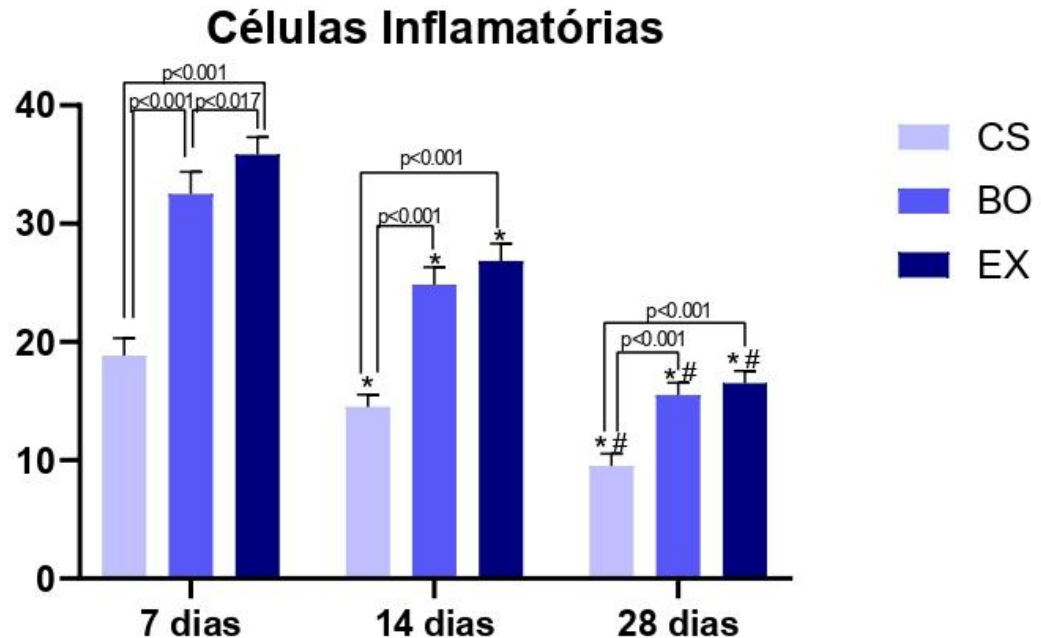
Fonte: Elaborado pela própria autora

3.2.5 Análise Histomorfométrica - Perfil Inflamatório

A análise histomorfométrica da contagem de células inflamatórias evidenciou diferenças estatísticas na comparação intra e intergrupos ao longo dos períodos experimentais.

Figura 11 - Comparações das médias e desvio padrão inter e intragrupos para a análise de células inflamatórias nos períodos de 7, 14 e 28 dias. * indica

diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 7 dias ($p < 0.05$), # indica diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 14 dias ($p < 0.05$)



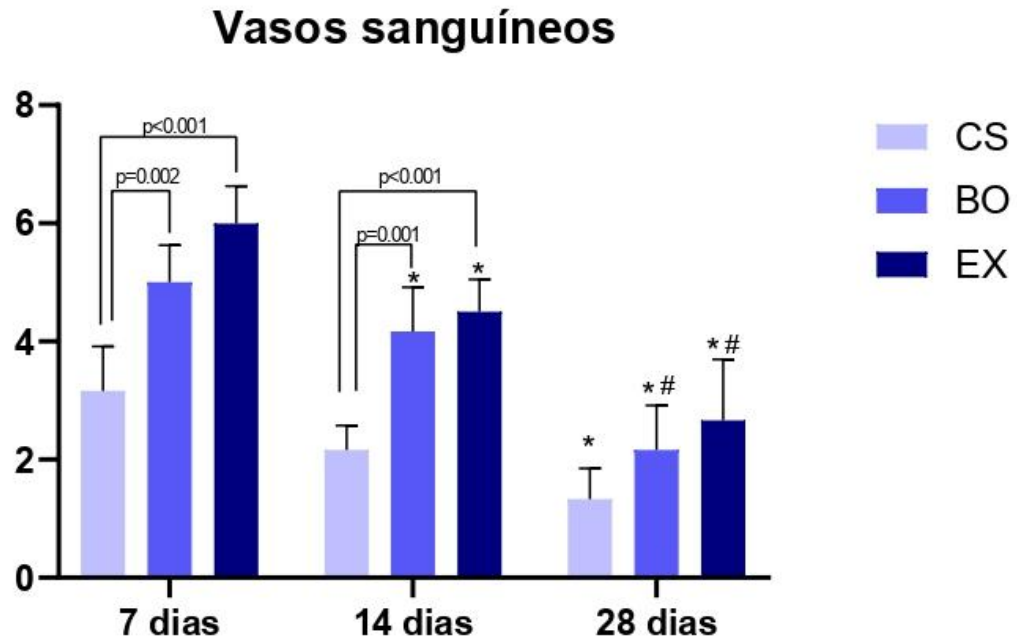
Fonte: Elaborado pela própria autora

Na análise intragrupo, observou-se redução na quantidade de células inflamatórias entre os períodos de 7, 14 e 28 dias em todos os grupos avaliados ($p < 0,001$). Na análise intergrupos, aos 7 dias, os grupos BO e EX apresentaram maior contagem de células inflamatórias quando comparados ao grupo CS ($p < 0,001$), sendo o grupo EX aquele com os maiores valores. Aos 14 dias, manteve-se o padrão, com os grupos tratados apresentando valores superiores ao controle negativo, destacando-se o grupo EX em relação ao BO ($p < 0,001$). No período de 28 dias, apesar da redução da resposta inflamatória, os grupos BO e EX continuaram apresentando contagens maiores que o grupo CS ($p < 0,001$), com o grupo EX mantendo valores discretamente superiores ao BO.

A avaliação da capacidade angiogênica demonstrou diferenças estatísticas na comparação intra e intergrupos ao longo dos períodos experimentais.

Figura 12 - Comparações das médias e desvio padrão inter e intragrupos para a análise de capacidade angiogênica (vasos sanguíneos) nos períodos de 7, 14 e 28 dias. * indica diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 7 dias

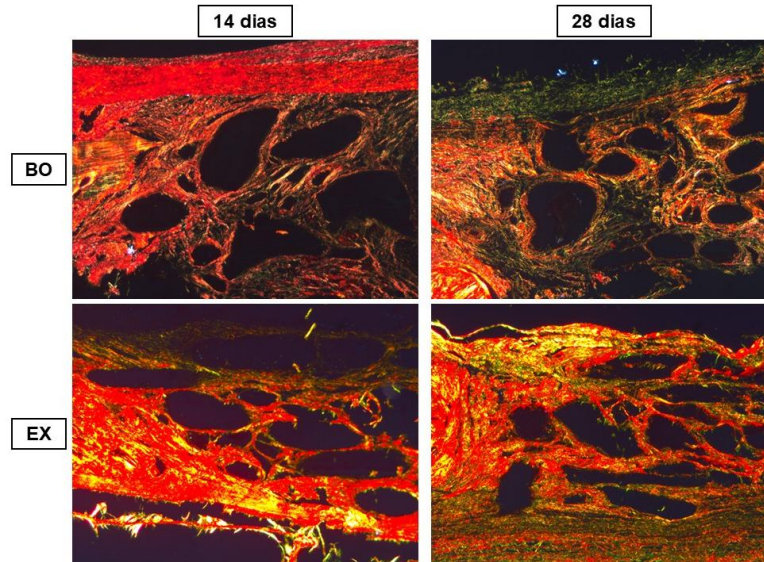
($p < 0.05$), # indica diferença estatística comparado ao mesmo grupo em 14 dias ($p < 0.05$)



Na análise intragrupo, observou-se redução do número de vasos sanguíneos em todos os grupos ao longo do tempo, com diferenças estatísticas aos 28 dias quando comparados aos períodos de 7 e 14 dias ($p < 0,05$). Na análise intergrupos, aos 7 dias, os grupos BO e EX apresentaram maior densidade vascular em comparação ao grupo CS ($p = 0,002$ e $p < 0,001$, respectivamente). Aos 14 dias, manteve-se o padrão, com os grupos BO e EX apresentando valores superiores ao controle negativo ($p < 0,001$). No período de 28 dias, apesar da redução do número de vasos sanguíneos em todos os grupos, os grupos BO e EX continuaram apresentando maior densidade vascular quando comparados ao grupo CS, com diferenças estatisticamente significativas, sendo observados ainda valores discretamente superiores no grupo EX.

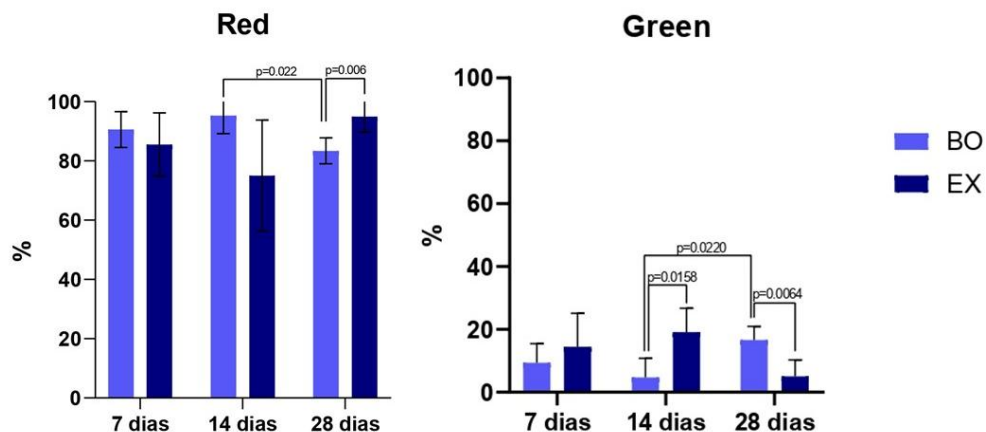
3.2.6 Análise de birrefringência

Figura 13 – Representação da coloração PSR para identificar a maturidade das fibras de colágeno nos grupos BO e EX, aos 14 e 28 dias na região de coto esquerdo e lateral do defeito



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 14 – Análise da maturação das fibras colágenas avaliadas por Picrosirius Red sob luz polarizada. Quantificação das fibras colágenas maduras (Red). Quantificação das fibras colágenas imaturas (Green)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Na análise das fibras colágenas maduras, aos 14 dias, o grupo BO foi superior ao grupo EX ($p = 0,022$). Aos 28 dias, o grupo EX demonstrou valores maiores em relação ao grupo BO ($p = 0,006$). Quanto às fibras colágenas imaturas, aos 14 dias, o grupo EX foi superior ao grupo BO ($p = 0,0158$), enquanto aos 28 dias, o grupo BO apresentou valores superiores ao EX ($p = 0,0064$).

4 DISCUSSÃO

Este estudo se destaca ao investigar o comportamento de diferentes biomateriais em um modelo experimental de defeito crítico em calvária de ratos, incluindo um grupo controle composto apenas por coágulo sanguíneo. A avaliação de períodos precoces de reparo permitiu caracterizar de forma detalhada as fases iniciais da regeneração óssea e a interação direta entre os biomateriais e os tecidos hospedeiros. Além disso, a combinação de análise histológica e microtomografia computadorizada possibilitou uma visão abrangente da dinâmica de reparo em cada grupo experimental.

O grupo CS evidenciou o potencial espontâneo do reparo e o impacto dos biomateriais na ROG. Para assegurar a criação de um defeito crítico, definido como aquele cujo reparo completo não ocorre sem auxílio de materiais osteocondutores [22], foi incluído o grupo CS, preenchido exclusivamente pelo coágulo sanguíneo. Para impedir que o espaço fosse invadido por tecido mole, os defeitos de todos os grupos foram recobertos por membrana absorvível. Aos 28 dias no grupo CS, os achados demonstraram que o defeito de 5 mm, preenchido em sua maioria por tecido conjuntivo frouxo, foi adequado para este modelo, em concordância com estudos prévios [23]. A análise histomorfométrica revelou redução progressiva da resposta inflamatória e da densidade vascular ao longo do tempo; contudo, quando comparado aos grupos tratados, o grupo CS apresentou contagens significativamente inferiores de células inflamatórias e vasos sanguíneos em todos os períodos avaliados. Esses achados indicam que, embora o coágulo sanguíneo seja capaz de desencadear uma resposta inflamatória e angiogênica inicial, essa resposta mostrou-se limitada para sustentar um ambiente favorável à neoformação óssea, conforme esperado para defeitos críticos sem intervenção. Assim, o grupo CS permitiu caracterizar a resposta biológica intrínseca ao defeito ósseo, evidenciando a necessidade da utilização de biomateriais osteocondutores.

A utilização de membranas reabsorvíveis permitiu manter a estabilidade do defeito e criar um ambiente propício para a regeneração, atuando como barreira física capaz de impedir a migração de tecidos moles e favorecer a osteogênese guiada. Esse isolamento possibilitou avaliar de forma fiel o comportamento intrínseco dos biomateriais em estudo, já que o arcabouço da membrana sustentou a manutenção

do espaço e a organização inicial do coágulo, fatores essenciais para o estabelecimento de uma matriz osteocondutora [24]. A integração progressiva da membrana aos tecidos adjacentes, evidenciada pela sua permeação por células inflamatórias e fibras conjuntivas nas análises histológicas, está alinhada com relatos prévios que descrevem o potencial das membranas reabsorvíveis em favorecer neoformação óssea, especialmente quando associadas a biomateriais [25]. Assim, seu uso contribuiu de maneira decisiva para a padronização do reparo e para a interpretação confiável dos resultados obtidos.

Os três grupos apresentaram neoformação óssea nos períodos experimentais, porém com desempenhos distintos. O EX demonstrou maiores valores de volume ósseo aos 14 e 28 dias em comparação ao CS e ao BO. Parâmetros microestruturais, como BV/TV, número de trabéculas, espessura trabecular e porosidade também foram favoráveis no grupo EX, que apresentou microarquitetura mais densa e organizada nos dois períodos avaliados. Histologicamente, este grupo exibiu maior deposição inicial de matriz colágena, vascularização e neoformação óssea mais evidente, com sinais de integração e remodelação tecidual até os 28 dias, enquanto o CS mostrou reparo limitado às margens do defeito e o BO sustentou resposta mais lenta e fibrosa. Embora todos os tratamentos tenham permitido algum grau de reparo ósseo, os dados quantitativos e qualitativos apontam o EX como biomaterial de melhor desempenho nos períodos avaliados. Esses achados estão em consonância com resultados previamente descritos na literatura, conduzidos em modelos animais distintos, reforçando a consistência do desempenho biológico do material [15].

Achados satisfatórios do grupo EX podem ser compreendidos através de sua composição, especialmente pela maior disponibilidade de colágeno tipo I associado aos grânulos de hidroxiapatita. O colágeno tipo I é a proteína mais abundante na porção orgânica do osso, que corresponde aproximadamente à 90% do total de colágeno do corpo e desempenha papel fundamental na adesão celular, proliferação de osteoblastos e deposição inicial de matriz extracelular [26]. Biomateriais que replicam essa composição, com maiores concentrações de colágeno, melhoram suas propriedades mecânicas e biológicas, visto que favorecem a adesão e proliferação celular sobre o arcabouço, aumentando o número de células presentes no local e, conseqüentemente, viabilizando o seu uso em procedimentos de ROG [27]. Assim, o colágeno presente no EX parece ter associação com os seus achados histológicos e

com sua melhor adaptação ao leito receptor, aspectos que, em conjunto, podem explicar o aumento observado no volume ósseo já aos 14 dias.

Apesar das vantagens biológicas do colágeno tipo I [26], trata-se de um componente estrutural susceptível à degradação por collagenases, enzimas amplamente expressas por fibroblastos, macrófagos e outras células envolvidas no reparo tecidual [28]. Essa susceptibilidade pode justificar a diminuição observada nos valores de BV do grupo EX entre 14 e 28 dias, uma vez que a degradação da matriz de colágeno pode levar à diminuição temporária da porção mineral [29]. Assim, mesmo que a atividade celular estimulada pelo colágeno tipo I seja benéfica à iniciação do processo de reparo, também pode contribuir para maior remodelação e reabsorção do arcabouço, diminuindo momentaneamente a densidade mineral [30]. Como EX apresenta maior proporção de colágeno em sua formulação, pode ser mais propenso à ação de degradação enzimática e gerar mais espaços disponíveis para subsequente deposição óssea. A redução de BV aos 28 dias, portanto, pode ser uma fase de transição em que a remodelação da matriz colágena antecede o preenchimento por tecido ósseo, comportamento já descrito em biomateriais com maior proporção de componente orgânico [31, 32]. Não se descarta a possibilidade de que a reabsorção do biomaterial contribua para essa oscilação, visto que biomateriais menos densos e com maior porção de colágeno costumam apresentar maior dinamismo na fase proliferativa da regeneração [33].

O grupo BO apresentou comportamento mais gradual no que diz respeito à deposição mineral, com aumento progressivo do volume ósseo entre os períodos analisados. Esse padrão pode estar relacionado à menor proporção de colágeno em sua composição, o que reduz a ação de collagenases e preserva por mais tempo a estrutura inicial do biomaterial, proporcionando um processo de neoformação óssea mais lento, porém contínuo [29]. A estabilidade física conferida pelos grânulos de hidroxiapatita do grupo BO pode ter contribuído para a manutenção do arcabouço, resultando no aumento progressivo dos parâmetros mineralizados ao longo do reparo [34]. Esse comportamento mais estável contrasta com o dinamismo observado no grupo EX e reforça que a composição e a proporção entre os componentes orgânicos e inorgânicos desempenham papel essencial na remodelação dos biomateriais.

A qualidade do osso neoformado nos defeitos foi avaliada por meio do padrão de orientação e da largura das fibras colágenas, identificadas por meio da análise de

birrefringência. Nessa análise, as fibras de colágeno tipo I predominantemente são identificadas pela tonalidade vermelha, associadas a tecido ósseo mais maduro e organizado, enquanto a birrefringência verde corresponde ao colágeno tipo III, característico de estágios iniciais de reparo tecidual [35, 36]. Embora ambos os biomateriais avaliados (EX e BO) sejam compostos por colágeno associado à hidroxiapatita, observaram-se padrões distintos de maturação óssea. Aos 14 dias, o grupo EX apresentou maior porcentagem de fibras verdes, compatível com uma fase inicial de formação óssea. Entretanto, aos 28 dias, esse mesmo grupo exibiu aumento significativo de fibras vermelhas e redução das fibras verdes, enquanto o grupo BO manteve uma maior proporção de colágeno tipo III nesse período tardio. Esse achado sugere que a maturação óssea no grupo EX ocorreu de forma mais rápida quando comparada ao controle BO. Um estudo prévio avaliou a qualidade óssea após enxertia com Bio-Oss, e observou elevada proporção de colágeno tipo III no tecido recém-formado [37]. Segundo os autores, a mineralização e a maturação óssea tardia observadas nesse contexto podem estar relacionadas à alta estabilidade das partículas de Bio-Oss, associada a uma deposição colágena mais desorganizada pelos osteoblastos, o que corrobora os achados do presente estudo.

Os resultados deste estudo ajudam a compreender como cada biomaterial pode se comportar clinicamente em procedimentos de ROG. O EX, por apresentar maior deposição inicial de matriz colágena, melhor integração ao leito receptor e desempenho superior nos parâmetros de microtomografia e histologia, mostra-se vantajoso em situações que demandam rápida estabilização tecidual e estímulo inicial à osteocondução, como defeitos pequenos a moderados [38]. Em contraste, o BO demonstrou comportamento mais lento, porém constante, com manutenção estrutural prolongada devido à maior estabilidade dos grânulos de hidroxiapatita, o que pode ser relevante em reconstruções que necessitam de arcabouço mineral mais duradouro para suportar cargas subsequentes ou preservar volume em médio prazo [39]. A presença do grupo coágulo reforça que, na ausência de um substituto ósseo, o reparo é limitado e parcialmente imprevisível, enfatizando o papel clínico dos biomateriais na regeneração [40]. A escolha clínica deve integrar o desempenho biológico observado e os fatores contextuais como acessibilidade, disponibilidade e necessidade específica de cada caso clínico.

Os avanços no desenvolvimento de biomateriais voltados à ROG têm se intensificado nas últimas décadas, impulsionados sobretudo pela crescente compreensão sobre como propriedades estruturais podem influenciar diretamente a dinâmica de neoformação óssea e a integração tecidual. Estudos recentes demonstram que o equilíbrio entre fases orgânicas e inorgânicas são determinantes para modular a migração celular, vascularização e remodelação inicial do arcabouço [5]. Sob essas condições, os dados aqui discutidos precisam ser analisados com moderação e senso crítico. Limitações metodológicas podem ter influenciado as conclusões, como a ausência de análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura, testes mecânicos, de caracterização físico-química. Deve-se considerar ainda que o modelo experimental em calvária de ratos, embora amplamente utilizado, não reproduz plenamente as demandas biomecânicas e a complexidade regenerativa de defeitos ósseos em humanos. Assim, estudos futuros para ampliar a compreensão sobre o comportamento biológico dos biomateriais investigados e fortalecer sua possível translação clínica, são necessários.

5 CONCLUSÃO

Ambos os biomateriais avaliados, EX e BO, demonstraram desempenho favorável na neoformação óssea, confirmando sua capacidade osteocondutora e integração ao leito receptor, ainda que apresentando padrões distintos de reparo ao longo do tempo. O grupo EX exibiu melhor desempenho, principalmente nas fases iniciais, com maiores valores de volume ósseo, angiogênese mais pronunciada nas fases iniciais, melhor microarquitetura trabecular e padrões histológicos mais favoráveis em relação à CS e BO.

REFERÊNCIAS

1. Buser D, Urban I, Monje A, Kunrath MF, Dahlin C. Guided bone regeneration in implant dentistry: Basic principle, progress over 35 years, and recent research activities. *Periodontol 2000*. 2023;93(1):9-25. doi: 10.1111/prd.12539.
2. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1988;81(5):672-676. doi: 10.1097/00006534-198805000-00004.
3. Nyman S. Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1991;18(6):494-498. doi:10.1111/j.1600-051x.1991.tb02322.x.
4. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(6):567-576. doi:10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x.
5. Sabouri Z, Dequeecker M, Anees H, Rastegar Adib F, Jamous R, Zheng J, *et al*. Recent advances in biomaterials for bone regeneration: Bridging innovation and clinical translation. *Materials Today Bio*. 2026; 36:102685. doi:10.1016/j.mtbio.2025.102685.
6. Duarte ND, Frigério PB, Chica GEA, Okamoto R, Buchaim RL, Buchaim DV, Messoria MR, Issa JPM. Biomaterials for guided tissue regeneration and guided bone regeneration: a review. *Dent J*. 2025;13(4):179. doi: 10.3390/dj13040179.
7. Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone grafts and substitutes in dentistry: a review of current trends and developments. *Molecules*. 2021;26(10):3007. doi: 10.3390/molecules26103007.
8. Garcia VG, Dall’Agnol G de S, Campista CCC, Bury LL, Ervolino E, Longo M, *et al*.. Evaluation of Two Anorganic Bovine Xenogenous Grafts in Bone Healing of Critical Defect in Rats Calvaria. *Braz Dent J*. 2024;35:e24–6119. doi: 10.1590/0103-6440202406119.
9. De Pace R, Molinari S, Mazzoni E, Perale G. A Review of Current Treatment Strategies. *Journal of Clinical Medicine* . 2025; 14(6):1838. doi: 10.3390/jcm14061838.

10. Ivanova N, Ivanov S, Peev S, Dikova T. Types of Bone Substitutes and Their Application in Regenerative Medicine: A Systematic Review. *J Funct Biomater*. 2025;16(9):341. Published 2025 Sep 9. doi:10.3390/jfb16090341
11. Pinteala T, Sirbu P, Anghel N, Rosca I, Voicu G, Calin M, *et al*. Integrating hydroxyapatite and bovine bone mineral into cellulose–collagen matrices for enhanced osteogenesis. *Materials Advances*. 2024; 5:9573–9585. doi:10.1039/D4MA00456F.
12. Li R, Xu S, Guo Y, Cao C, Xu J, Hao L, Luo S, Chen X, Du Y, Li Y, Xie Y, Gao W, Li J, Xu B. Application of collagen in bone regeneration. *J Orthop Translat*. 2025; 50:129-43. doi: 10.1016/j.jot.2024.10.002.
13. Xu D, Yao C, Gu M. Clinical study of Bio-Oss powder and Bio-Oss collagen for site preservation during implantology. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2020;29(4):414-7.
14. Wang J, Cui W, Zhao Y, Lei L, Li H. Clinical and radiographic evaluation of Bio-Oss granules and Bio-Oss Collagen in the treatment of periodontal intrabony defects: a retrospective cohort study. *J Appl Oral Sci*. 2024;32: e20230268. doi: 10.1590/1678-7757-2023-0268.
15. Gehrke SA, Aramburú Júnior J, Treichel TLE, Rodriguez F, Aza P, Dedavid BA. Comparative evaluation of two collagen-based biomaterials with different compositions used for bone graft: an experimental animal study. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2022; 20:22808000221119650. doi: 10.1177/22808000221119650.
16. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(4):256-60. doi: 10.1016/j.joca.2012.02.010.
17. Puttini IO, Poli PP, Maiorana C. Evaluation of Osteoconduction of Biphasic Calcium Phosphate Ceramic in the Calvaria of Rats: Microscopic and Histometric Analysis. *J Funct Biomater*. 2019;10(1):7. doi: 10.3390/jfb10010007
18. Huang J, Ratnayake J, Dias GJ. Critical size defect in a rat calvaria model using trephination: An animal model for investigating potential bone regenerative scaffolds. *MethodsX*. 2025;14:103355. Published 2025 May 9. doi:10.1016/j.mex.2025.103355

19. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
20. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012;7(10):1918-1929. doi:10.1038/nprot.2012.113
21. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-1486. doi:10.1002/jbmr.141
22. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990;1(1):60-8. doi: 10.1097/00001665-199001000-00011.
23. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(8):879-93. doi: 10.1111/clr.12194
24. Shi X, Li X, Tian Y, Qu X, Zhai S, Liu Y, Jia W, Cui Y, Chu S. Physical, mechanical, and biological properties of collagen membranes for guided bone regeneration: a comparative in vitro study. *BMC Oral Health*. 2023;23(1):510. doi: 10.1186/s12903-023-03223-4.
25. Wang Y, Yan F, Chen L, et al. Crosslinked Versus Non-Crosslinked Resorbable Collagen Membranes for Periodontal Regeneration: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Non-Inferiority Clinical Trial. *J Periodontal Res*. 2025;60(11):1086-1100. doi:10.1111/jre.13382
Naomi R, Ridzuan PM, Bahari H. Current insights into collagen type I. *Polymers*. 2021;13(16):2642 doi: 10.3390/polym13162642.
26. Tierney CM, Haugh MG, Liedl J, Mulcahy F, Hayes B, O'Brien FJ. The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009;2(2):202-9. doi: 10.1016/j.jmbbm.2008.08.007.
27. Rico-Llanos GA, Borrego-González S, Moncayo-Donoso M, Becerra J, Visser R. Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers*. 2021;13(4):599. doi: 10.3390/polym13040599.

28. Adamiak K, Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking: review. *Int J Biol Macromol*. 2020; 161:550-60. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075.
29. Krane SM. Is collagenase (matrix metalloproteinase-1) necessary for bone and other connective tissue remodeling? *Clin Orthop Relat Res*. 1995;(313):47-53.
30. Zhu W, Li C, Yao M, Wang X, Wang J, Zhang W, Chen W, Lv H. Advances in biomimetic mineralized collagen and inorganic metallic elements from natural bone for bone repair. *Regen Biomater*. 2023;10:rbad030. doi: 10.1093/rb/rbad030.
31. Feng Y, Shi Y, Tian Y, Yang Y, Wang J, Guo H, Banitaba SN, Khademolqorani S, Li J. The collagen-based scaffolds for bone regeneration: a journey through electrospun composites integrated with organic and inorganic additives. *Processes*. 2023;11(7):2105. doi: 10.3390/pr11072105.
32. Zhang D, Wu X, Chen J, Lin K. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioact Mater*. 2017;3(1):129-38. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.08.004.
33. Xie H, Ruan S, Zhao M, Long J, Ma X, Guo J, Lin X. Preparation and characterization of 3D hydroxyapatite/collagen scaffolds and its application in bone regeneration with bone morphogenetic protein-2. *RSC Adv*. 2023; 13:23010-23020. doi: 10.1039/D3RA03034B.
34. Trzaskowska, M., Vivcharenko, V., Benko, A. *et al*. Biocompatible nanocomposite hydroxyapatite-based granules with increased specific surface area and bioresorbability for bone regenerative medicine applications. *Sci Rep* 2024 (14), 28137. doi: 10.1038/s41598-024-79822-0
35. López De Padilla CM, Coenen MJ, Tovar A, De la Vega RE, Evans CH, Müller SA. Picrosirius Red Staining: Revisiting Its Application to the Qualitative and Quantitative Assessment of Collagen Type I and Type III in Tendon. *J Histochem Cytochem*. 2021;69(10):633-643. doi:10.1369/00221554211046777
36. Nogueira DMB, Figadoli ALF, Alcantara PL, et al. Biological Behavior of Xenogenic Scaffolds in Alcohol-Induced Rats: Histomorphometric and Picrosirius Red Staining Analysis. *Polymers (Basel)*. 2022;14(3):584. Published 2022 Jan 31. doi:10.3390/polym14030584

37. Kudsi R, Dawson DR, Gonzalez OA, et al. Relationship between bone quality and shrinkage in maxillary sinus augmentation using synthetic alloplast versus xenograft. *J Periodontal Implant Sci.* 2025;55(4):306-320. doi:10.5051/jpis.2401320066
38. Minardi S, Taraballi F, Cabrera FJ, Van Eps J, Wang X, Gazze SA, Fernandez-Mourev JS, Tampieri A, Francis L, Weiner BK, Tasciotti E. Biomimetic hydroxyapatite/collagen composite drives bone niche recapitulation in a rabbit orthotopic model. *Mater Today Bio.* 2019; 2:100005. doi: 10.1016/j.mtbio.2019.100005
39. Okuda T, Ioku K, Yonezawa I, Minagi H, Gonda Y, Kawachi G, Kamitakahara M, Shibata Y, Murayama H, Kurosawa H, Ikeda T. The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials.* 2008;29(18):2719-28. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.028.
40. Gandhi Y. Biomaterials for guided bone regeneration: science and rationale. *J Maxillofac Oral Surg.* 2025;24(4):877-85. doi: 10.1007/s12663-025-02668-0.

ANEXOS

Anexo A – Comitê de Ética Local



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 "**Comparação de dois substitutos ósseos de origem bovina no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos**", Processo FOA nº 707-2024, sob responsabilidade de Daniela Ponzoni apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 21 de Outubro de 2024.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 05 de Agosto de 2026.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 05 de Setembro de 2026.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Comparison of two bovine bone substitutes in bone repair of critical defects in rat calvaria**", Protocol FOA nº 707-2024, under the supervision of Daniela Ponzoni presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 21, 2024.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 05, 2026.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 05, 2026.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator