



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Câmpus Araçatuba
Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

LETÍCIA DE FREITAS MENDES BRASIL

Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de chá verde e membrana de colágeno porcino. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica.

Araçatuba

2017

LETÍCIA DE FREITAS MENDES BRASIL

Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de chá verde e membrana de colágeno porcino. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"** – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.
Orientador: Prof.^a Assistente Dr.^a Ana Paula Farnezi Bassi

Araçatuba

2017

Dedicatória

*Dedico este trabalho a Deus, por ser quem Ele é.
Pelo sustento, força, amor, bondade, sabedoria,
equilíbrio, capacitação, inteligência, paciência a
mim concedidos constantemente, sem os quais nada
do que foi construído teria sido possível. Pelos
pequenos grandes milagres diários responsáveis
pela conclusão bem-sucedida dessa trajetória.*

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Sandra da Silva Freitas**, por estar sempre presente, acreditando e confiando em mim mais do que qualquer um. Pelos sacrifícios imensuráveis e pelo investimento de uma vida que contribuíram para que eu chegasse onde estou. Obrigada por desde sempre me obrigar a superar meus limites e extrair o melhor de mim, mesmo quando eu não queria. Apesar de todas as falhas, colocou em mim um bom alicerce; e pode ser que um dia eu pense que não, contudo tudo o que eu construir estará embasado em você.

À minha tia **Cláudia Regina da Silva Freitas**, por ser minha segunda mãe e destinar a mim tanto tempo, esforço, dedicação e amor ainda que não tivesse a obrigação de fazê-lo. Obrigada pelos conselhos conversas, tardes e noites de final de semana, por sempre pensar em mim e querer tanto o meu bem.

A meu irmão **João Mendes Brasil Júnior**, que mesmo sendo tão pequeno me traz um benefício enorme. Alguém que chegou de surpresa e tem me ensinado a ser irmã/mãe, a ter maturidade e descobrir como nossas atitudes podem influenciar e moldar o caráter dos que estão ao nosso redor. Aquele que me faz ser melhor a cada dia com o intuito de deixar bom exemplo.

À minha avó **Anísia Alves da Silva**, que já não se encontra aqui presente, porém eu não poderia deixar de citá-la por tamanha importância que teve desde o início de tudo. Queria que estivesse viva para prestigiar esse dia. Hoje só agradeço a Deus por permitir que você cumprisse tão bem o seu papel.

A meu pai **João Mendes Brasil**, que talvez não fez mais por falta de condições, mas do fundo do meu coração gostaria que tivesse tido uma contribuição maior em tudo o que tenho vivido. Contudo, mesmo da sua ausência, extraí um aprendizado maravilhoso: eu posso conseguir tudo o que eu quiser, independente de quem esteja comigo.

A meu avô **David da Silva Freitas**, tios e primos **Sônia Aparecida Alves Chaves, Reinaldo Alves Chaves, Isabelle Alves Chaves, Laís Alves Chaves, Lindon Jocélio Gonçalves, André Luís Freitas, Claudete Soares, Roseli Mota, Auro Alves da Silva, Jônatas Alves da Silva** e todos os demais familiares, por contribuírem de alguma forma com meu caráter e minha formação emocional e psicológica. Obrigada por, ainda que de forma indireta, me ensinarem a ser uma pessoa melhor. O êxito de hoje certamente tem uma parcela de cada um de vocês.

A meus líderes espirituais **Cléo Ribeiro Rossafa, Celso Filho dos Santos, Lais Stefany Splendori dos Santos, Willian e Victória Mendes** por serem exemplos de fé, disciplina, perseverança e integridade que me

levaram a Deus e espelharam em mim uma boa conduta. Por todos os bons conselhos e direções, por se permitirem serem usados por Deus para ajudarem não só a mim, mas a muitos.

A todos do **Ministério Mudança de Vida** por serem minha segunda família, proporcionando a mim momentos maravilhosos, alegrias, paz, boas amizades, aprendizado, crescimento, força e suporte para poder ir além. Vocês todos são uma benção na minha vida.

À minha orientadora **Ana Paula Farnezi Bassi** pelo aprendizado e grande oportunidade concedida na realização desse projeto. Por acreditar no meu potencial, pelas cobranças feitas, pela paciência, pelos desentendimentos que de certa forma foram importantes para gerar maturidade. Por mostrar que se importa e sempre fornecer suporte e atenção necessários.

Aos amigos **Erika Kiyoko Chiba, Karen Lumi Nakasato, Laís Kawamata de Jesus, Lara Mariano Pinheiro, e Pedro Henrique Chaves de Oliveira** pelo companheirismo diário, pelos conselhos, ensinamentos de vida e por todos os conhecimentos compartilhados. Obrigada por serem tão motivadores, aguentarem minhas chatices, por me respeitarem e acreditarem em mim até mais do que eu mesma acredito.

Aos amigos **Jéssica Freire** e **Vitor Santana** pela companhia, pelas trocas de experiência, conversas, risadas e por tornarem bem mais agradáveis cada viagem de ônibus até a faculdade.

Aos colegas **Cássio Figueiredo**, **Izabela Minari** por estarem a frente, me ajudando a trilhar um bom caminho no início da minha jornada na graduação.

Aos colegas **Ana Flávia Piquera**, **Jéssica Coelho**, **Jéssica Ferreira**, **Letícia Gonçalves**, **Luanna Gonçalves**, **Luísa Salzedas**, **Luiza Moreira**, **Malena Castro** e **Willian Jacometo** por serem tão bondosos comigo e facilitarem minha vida em situações diversas durante todo esse tempo. Tudo teria sido bem mais difícil sem vocês.

À **Tamires Melo Francati**, aos pós-graduandos **Guilherme Ramirez** e **Gustavo Momesso**, aos professores **Leonardo Perez Faverani** e **Roberta Okamoto**, todos os funcionários do **Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada** e demais envolvidos direta ou diretamente na realização e conclusão desse projeto de pesquisa.

Ao professor **Roelf Justino Cruz Rizzolo** e todo o **Departamento de Ciências Básicas** por me fornecerem a primeira oportunidade de iniciação científica ainda no início da graduação, propiciando experiências que me ajudaram demasiadamente a conhecer e desenvolver meu potencial.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP**,
administradores, professores e servidores por me proverem de todo o
suporte necessário em cada etapa da minha caminhada dentro dessa
universidade.

Ao **CNPQ** pela bolsa PIBIC de iniciação científica concedida em
2014 ainda sob orientação do Professor Roelf.

À **FAPESP** por financiar esse projeto, permitindo a construção do
que hoje se apresenta como meu Trabalho de Conclusão de Curso.

A todos da **Turma 59** por serem a minha turma. Por poder ter o
privilégio de trabalhar/estudar ao lado de pessoas tão capazes e
diferenciadas, com um potencial incrível.

Epigrafe

O que é a fé? É a convicção segura de que alguma coisa que nós queremos vai acontecer. É a certeza de que o que nós esperamos está nos aguardando, ainda que o não possamos ver adiante de nós.

Hebreus 11.1 (Bíblia Viva)

BRASIL, L. F. M. **Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de chá verde e membrana de colágeno porcino. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica.** 2017. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar a eficácia da membrana de celulose bacteriana (chá verde) no reparo ósseo de defeitos críticos de em calota de ratos machos adultos quando comparada à membrana de colágeno porcino. Foram utilizados 72 ratos machos adultos divididos em três grupos experimentais: grupo coágulo (GC), grupo colágeno porcino (CP) e grupo chá verde (CV). Os períodos de estudo foram de 7, 14 30 e 60 dias após a criação do defeito cirúrgico de 8mm de diâmetro e aposição da membrana. Foram realizadas as análises histológica, histométrica e imunoistoquímica. Foi possível observar que aos 30 dias de reparo, o grupo CP apresentou melhor preenchimento do defeito cirúrgico, com maior quantidade de tecido ósseo. Enquanto que o grupo CV apresentou preenchimento do defeito com grande quantidade de tecido conjuntivo maduro. Os dados obtidos na análise histométrica revelaram que aos 30 e 60 dias a área de osso neoformado teve grande discrepância para o grupo CP em relação ao CV e GC (Teste de Tukey - $P < 0,05$). Por outro lado, os resultados referentes à análise por imunoistoquímica evidenciaram marcações moderada e intensa para as proteínas osteocalcina (OC) e osteopontina (OP) tanto para o grupo CP quanto para o CV aos 60 dias de reparo. Pode-se concluir que apesar de a membrana de chá verde apresentar aspectos promissores no reparo de tecido mole, neste estudo não permitiu o reparo ósseo em calotas de ratos, quando comparada à membrana de colágeno porcino

Palavras-chaves: Reparo ósseo. Membrana. Biodegradáveis. Celulose

BRASIL, L. F. M. **Evaluation of bacterial cellulose and porcine collagen membrane on rats calvaria repair. Histometric, histological and immunochemistry analysis.** 2017. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

This present study aimed evaluate the efficiency of bacterial cellulose membrane in the bone repair of critical-size defects in male adult rat calvaria compared to porcine collagen membrane. It was used 72 adult male rats divided into three experimental groups: Clot group (CG), porcine collagen group (PC) and bacterial cellulose group (BC). The study period were 7, 15, 30 and 60 days after the surgical defect of 8mm of diameter and position of the membrane. It were performed the histologic, histometric and imunohistochemistry analysis and possible to observe that at 30 and 60 days, PC group showed higher filling of the surgical wound with higher amount of new formed bone. The BC group showed a mature connective tissue filling the defect. Data from histometric analysis showed that at 30 and 60 days the new bone formed area was discrepant for PC group compared with BC and CG group (Tukey test – $P < 0,05$). On the other hands, immunohistochemistry analysis showed a moderate and intense immunolabeling of osteocalcin and osteopontin at 60 days of bone repair for PC and BC group. It was possible to conclude that despite the BC membrane showing promising aspects in the soft tissue repair, did not allow bone repair in rats calvaria, compared to porcine collagen membrane.

Key words: Bone repair. Membrane. Biodegradable. Cellulose.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Membranas.....	32
Figura 1A – Membrana de colágeno porcino.....	32
Figura 1B – Membrana de chá verde.....	32
Figura 2 – Procedimento cirúrgico.....	34
Figura 2A – Acesso cirúrgico a calvária.....	34
Figura 2B – Broca trefina 8mm.....	34
Figura 2C – Remoção da cortical óssea.....	34
Figura 3 – GC. 7 dias. HE. Imagem panorâmica (125x).....	37
Figura 4 – GC. 15 dias. Imagem panorâmica (125x).....	38
Figura 5 – GC. 30 dias. HE. Imagem panorâmica (125x).....	38
Figura 6 – GC. 30 dias. HE. Aumento de 400X.....	39
Figura 6A – Coto esquerdo.....	39
Figura 6B – Centro do defeito crítico	39
Figura 6C – Coto direito.....	39
Figura 7 – GC. 60 dias. HE. Imagem panorâmica (125x).....	39
Figura 8 – GC. 60 dias. HE. Aumento de 400x.....	40
Figura 9 – CP. 7 dias. HE. Aumento de 250x.....	41
Figura 10 – CP. 15 dias. HE. Aumento de 250x.....	41
Figura 11 – CP. 30 dias. HE. Aumento de 250x.....	42
Figura 12 – CV. 7 dias. HE. Aumento de 250x.....	43
Figura 13 – CV. 15 dias. HE. Imagem panorâmica (125x).....	43
Figura 14 – CV. 15 dias. HE. Aumento de 250x.....	44
Figura 15 – CV. 30 dias. HE. Aumento de 250x.....	44
Figura 16 – Comparação CP e CV aos 60 dias. HE. Imagem panorâmica e aumento de 250x.....	45

Figura 16A – CP 60 dias.....	45
Figura 16B – CV 60 dias.....	45
Figura 17 – Grupos CP e CV. Áreas de maior imunomarcção para osteocalcina.....	47
Figura 18 – Grupos CP e CV. Áreas de maior imunomarcção para osteopontina (setas vermelhas).....	48

Lista de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Valores mensurados da área de neoformação óssea entre os grupos e períodos analisados.....	46
--	----

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Scores representativos relacionados à imunomarcação das proteínas osteocalcina (OC) e osteopontina(OP) referente aos grupos colágeno porcino (CP) e chá verde(CV).....	48
--	----

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

CP – Grupo colágeno porcino

CV – Grupo chá verde

GC – Grupo coágulo

GTR – Guided tissue regenerate

HE – Hematoxilina-eosina

OC – Osteocalcina

OP – Osteopontina

TC – Tecido conjuntivo

TON – Tecido ósseo neoformado

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 PROPOSIÇÃO.....	28
3 MATERIAL E MÉTODO.....	30
3.1 Desenvolvimento da manta de chá verde.....	31
3.2 Amostras.....	31
3.3 Cirurgia experimental.....	32
3.4 Análise Histológica.....	34
3.5 Análise Histométrica.....	34
3.6 Análise Imunoistoquímica.....	35
3.7 Análise Estatística.....	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Avaliação histológica.....	37
4.1.1 Grupo coágulo (GC).....	37
4.1.2 Grupo colágeno porcino (CP).....	40
4.1.3 Grupo chá verde (CV).....	42
4.2 Análise Histométrica.....	45
4.3 Análise Imunoistoquímica.....	46
4.3.1 Grupo colágeno porcino (CP).....	46
4.3.2 Grupo chá verde (CV).....	47
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO 1.....	61

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Regeneração óssea guiada (Guided Tissue Regenerate – GTR), técnica empregada para facilitar a regeneração óssea, consiste em uma membrana biocompatível fazendo o papel de barreira física para evitar que o tecido conjuntivo adjacente invada o defeito ósseo, criando assim, espaço favorável para a regeneração óssea¹. Isso porque, durante a cicatrização, o tecido epitelial migra rapidamente para a ferida, o que torna a regeneração óssea mais difícil².

As principais propriedades que essas membranas devem ter são: reabsorção, biocompatibilidade, falta de citotoxicidade e estabilidade mecânica, ou seja, capacidade de manter espaço durante o processo de reparo ósseo³⁻⁵.

Uma das membranas que atende grande parte desses requisitos, são as membranas à base de colágeno, por ser biocompatível, hemostática, promover quimiotaxia para fibroblastos e osteoblastos, e ser semipermeável permitindo a transferência de nutrientes,⁶⁻¹¹ além de promover significativa reparação de defeitos intraósseos no periodonto,¹² e, quando associadas a vários tipos de enxertos ósseos, podem melhorar a eficácia dos mesmos, aumentando a capacidade de estimular o reparo dos tecidos periodontais¹³⁻¹⁵. Dessa forma esse tipo de membrana é amplamente utilizada em cirurgia bucomaxilofacial e considerada de alto padrão no processo de cicatrização do osso. Entre as membranas de colágeno, a que se destaca no mercado é a Bio-Gide® (Geistlich).

Atualmente, busca-se outras opções para auxiliar reparo do tecido ósseo, visto que, apesar de muito eficientes, as membranas colágenas apresentam um alto custo. Neste sentido, uma das alternativas é a exploração da celulose, que além de apresentar boas propriedades biomecânicas é um polímero natural, biodegradável e renovável. Por isso tornou-se assunto de uma série de investigações na engenharia tecidual.

Uma das maneiras de se obter a celulose é pela síntese bacteriana (celulose bacteriana), que resulta em uma celulose com melhores

propriedades que aquela extraída diretamente da planta, mostrando uma alta resistência mecânica, alta capacidade de reter água¹⁶, cristalinidade, elevado grau de biocompatibilidade e resistência à degradação, o que a torna apta para ser usada como matéria-prima na fabricação de membranas e scaffolds direcionados a uma variedade de tecidos, incluindo tecido ósseo¹⁷⁻¹⁹. Ademais, esse material já tem sido aplicado como um ótimo substituto da pele no tratamento de queimaduras profundas²⁰⁻²² e extensas perdas das camadas de derme e epiderme em feridas crônicas ou agudas, trazendo redução da dor e melhoria no processo de reparo ao acelerar o desenvolvimento do tecido de granulação e novo epitélio, além de diminuir a formação de cicatriz^{19, 21}. Nesse contexto, foi recentemente desenvolvida uma membrana celulósica produzida pela ação de algumas espécies de leveduras sobre o chá verde (Nanoskin®); e já está sendo utilizada como auxiliar no reparo de lesões na pele, oferecendo ótimos resultados.

A membrana de celulose permanece por um longo período no organismo sem ser degradada²⁰⁻²¹, porém seu contato com os tecidos não gera toxicidade ou inflamação^{21,23}.

Pesquisas em engenharia tecidual apresentam biomateriais contendo celulose bacteriana eficientes também no processo de reparo ósseo, sendo explorados principalmente na forma de scaffolds^{20, 24-26}.

Objetivos

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da membrana de chá verde e da membrana no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos quando comparado com à membrana colágeno porcino.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento da manta de Chá Verde:

A celulose bacteriana matéria-prima, cujo nome comercial é Nanoskin®, foi fornecida a partir de Innovatec (São Carlos SP, Brasil). O processo de fermentação acético foi conseguido através da utilização de glicose como uma fonte de carboidratos e chá verde como fonte de nitrogênio. As bactérias foram então inoculadas no meio de cultura e, depois de serem adicionadas, o meio foi autoclavado a 100 °C. Os resultados deste processo foram vinagre e uma biomassa de nanobiocelulose. A celulose bacteriana é produzida por bactérias Gram-negativas, *Gluconacetobacter xylinus*, e pôde ser extraída a partir do meio de cultura numa estrutura 3D pura formada por uma rede ultrafina de nanofibras de celulose.²⁷

3.2 Amostras:

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP com o número de protocolo: 2015-00965 (Anexo I).

Sendo assim, 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 três grupos (n=24 por grupo), submetidos à eutanásia em quatro momentos do experimento, aos 7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP.

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

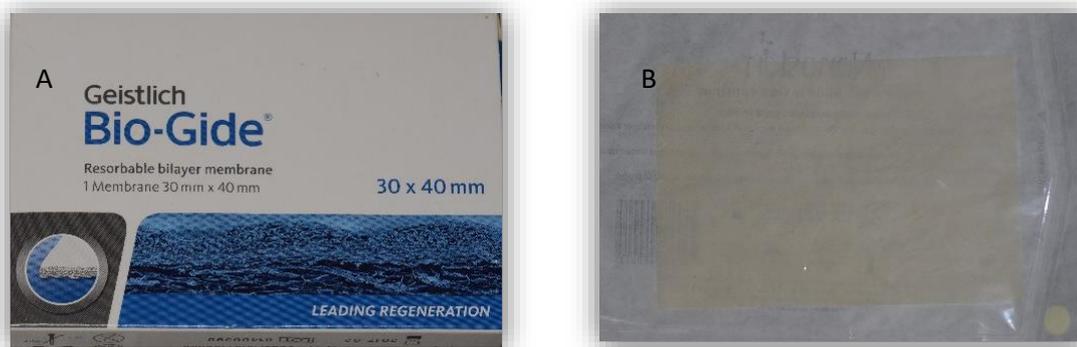
- Grupo Coágulo (Controle Negativo) – n= 24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo sendo 6 ratos submetidos a

eutanásia em cada período para a análise (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia);

- Grupo colágeno porcino (Controle Positivo) – n= 24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland) sendo 6 ratos submetidos a eutanásia em cada período para a análise (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia) (Fig. 1B);

- Grupo chá verde (Grupo Experimental) – n=24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de chá verde, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia) (Fig.1A).

Figura 1 – Membranas. A – Membrana de colágeno porcino; B – Membrana de chá verde



Fonte: Do autor.

3.3 Cirurgia experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de oito 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 **em "V"** no sentido occipito-frontal 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) (Fig. 2A). Em seguida com auxílio de broca trefina de 7mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em contra-ângulo de implante sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8 mm de diâmetro (Furlaneto, 2007), na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Fig. 2B e C). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino Bio-Gide®- Geistlich (Grupo colágeno porcino – n=24) ou com uma membrana chá verde Nanoskin® -**Innovatec's** (Grupo chá verde – n=24) ou não foi inserido nenhuma membrana correspondendo ao Grupo coágulo (n=24).

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).

Figura 2 - Procedimento cirúrgico. A - Acesso cirúrgico à calvária. B - Broca trefina 8mm. C - Remoção da cortical óssea



Fonte: Do autor.

3.4 Análise Histológica

Após a obtenção das laminas estas foram avaliadas histologicamente quanto a capacidade de neoformação óssea, presença de infiltrado inflamatório, formação de tecido conjuntivo, absorção e/ou manutenção dos materiais estudados.

3.5 Análise Histométrica

Após as lâminas serem coradas com corante de hematoxilina e eosina (Merck & Co. Inc.) as mensurações da área de osso neoformado 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 com um software analisador de imagens digitalizadas ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

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.

3.6 Análise Imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram avaliadas através da atribuição de escores por análise semi quantitativa. Os escores variaram de nulo (0), leve (+), moderado (++) e intenso (+++) e foram avaliados a partir das imagens capturadas do centro do defeito realizado na calvária de todos os animais que fazem parte do experimento, para os biomarcadores osteocalcina e osteopontina. Para a aquisição das imagens, foi utilizado o Fotomicroscópio (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) conectado a um micro-computador.

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos através da análise histométrica foram, inicialmente, submetidos ao teste de homogeneidade para avaliar a distribuição dos dados na curva de normalidade (ANOVA dois fatores). Confirmando a normalidade da distribuição, foi aplicado o teste de Tukey para comparação das medias. O nível de significância adotado foi $p < 0.05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação histológica

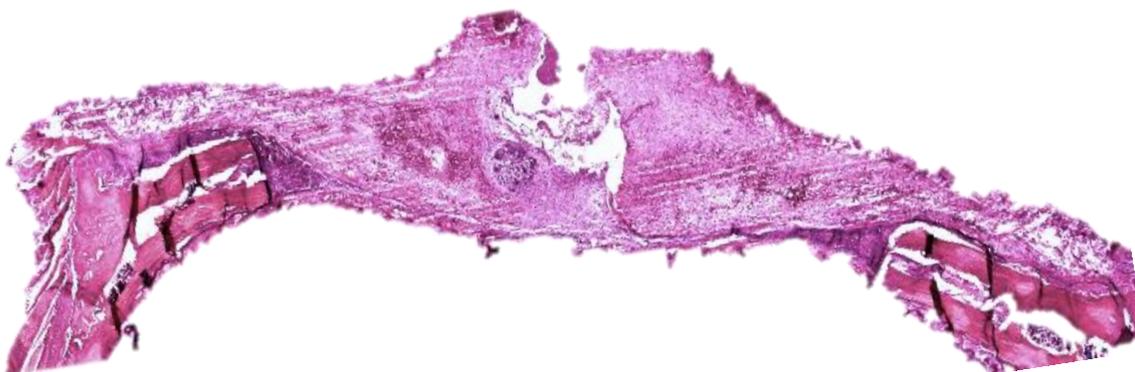
Os resultados foram avaliados por meio de microscópio óptico com padronização da leitura das lâminas do grupo controle, grupo do chá verde e no grupo colágeno porcino.

4.1.1 Grupo coágulo (GC)

7 Dias

A citoarquitetura óssea do corte histológico aos 7 dias mostrou hipervascularização na região do defeito ósseo e já com a presença de atividade fibroblástica (Fig. 3)

Figura 3 – GC. 7 dias. HE. Imagem panorâmica (125x)



Fonte: Do autor.

15 Dias

Aos 15 dias, a fotomicrografia do grupo controle exibe a borda do defeito ósseo indo em direção ao centro da ferida, notou-se neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, ricamente celularizado por osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. A neoformação óssea somente foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central. As lâminas analisadas revelaram abundante tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação

vascular, fibroblasto e pouca matriz extracelular preenchendo a região central da ferida (Fig. 4).

Figura 4 – GC. 15 dias. Imagem panorâmica (125x)

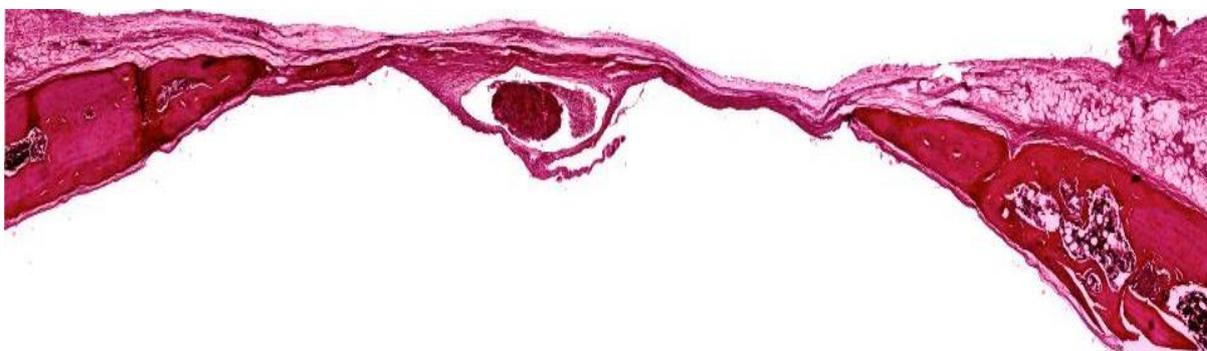


Fonte: Do autor.

30 Dias

No período de 30 dias o grupo coágulo apresentou área óssea neoformada mais próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes apresenta-se preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado (Fig. 5).

Figura 5 – GC. 30 dias. HE. Imagem panorâmica (125x)

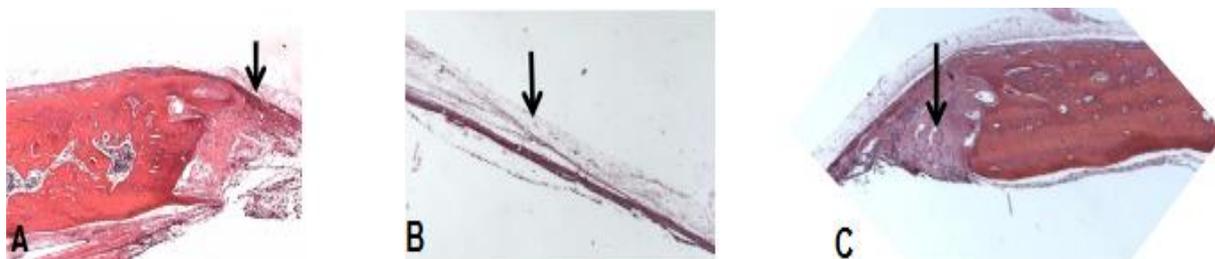


Fonte: Do autor.

Foi possível observar, em maior aumento, indicados pela seta, a área de osteotomia com os cotos ósseos esquerdo (Figura 6A) e direito (Figura

6C) com discreta neoformação óssea em suas margens, e o centro do defeito crítico preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Figura 6B).

Figura 6 – GC. 30 dias. HE. Aumento de 400x. A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito



Fonte: Do autor

60 Dias

Aos 60 dias, a fotomicrografia panorâmica do grupo coágulo denota preenchimento do defeito com tecido conjuntivo imaturo e presença de infiltrado inflamatório, sem sinais de neoformação óssea, comprovando ser um defeito crítico (Fig. 7).

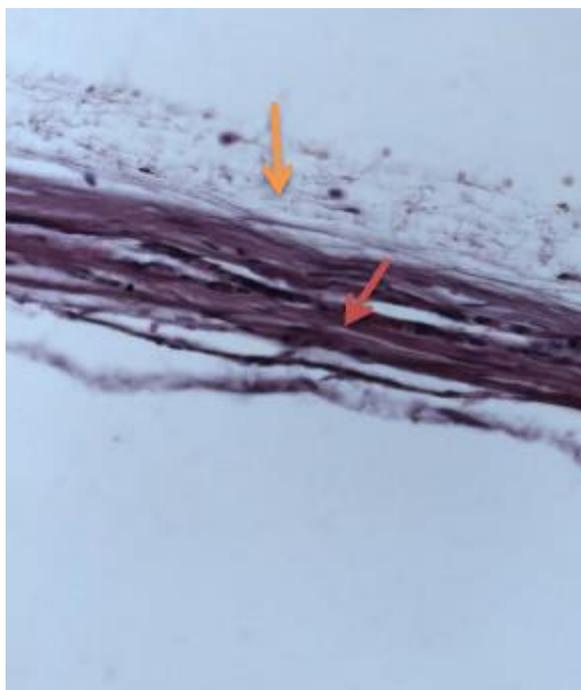
Figura 7 – GC. 60 dias. HE. Imagem panorâmica (125x)



Fonte: Do autor

No centro do defeito há ausência de tecido ósseo neoformado (TON) e presença de tecido conjuntivo (TC) e neutrófilos polimorfonucleares (Figura 8).

Figura 8 - GC. 60 dias. HE. Aumento de 400x. Centro do defeito crítico. Ausência de TON. TC (seta amarela). Neutrófilos (seta vermelha)



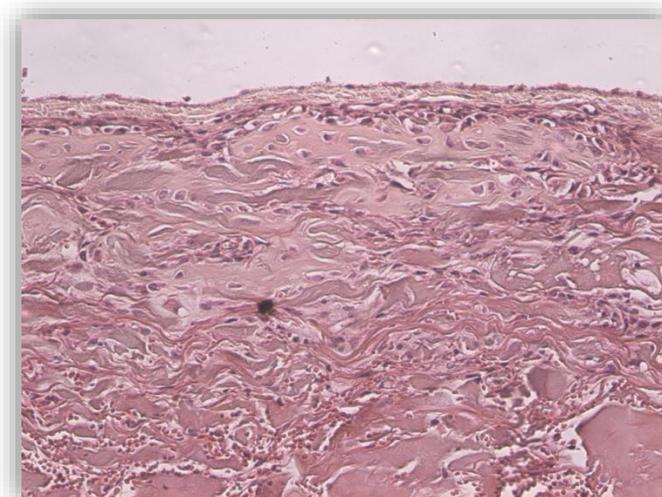
Fonte: Do autor.

4.1.2 Grupo colágeno porcino (CP)

7 Dias

Nota-se todo defeito preenchido por um tecido conjuntivo jovem, sem infiltrado inflamatório (Fig. 9).

Figura 9 – CP. 7 dias. HE. Aumento de 250x

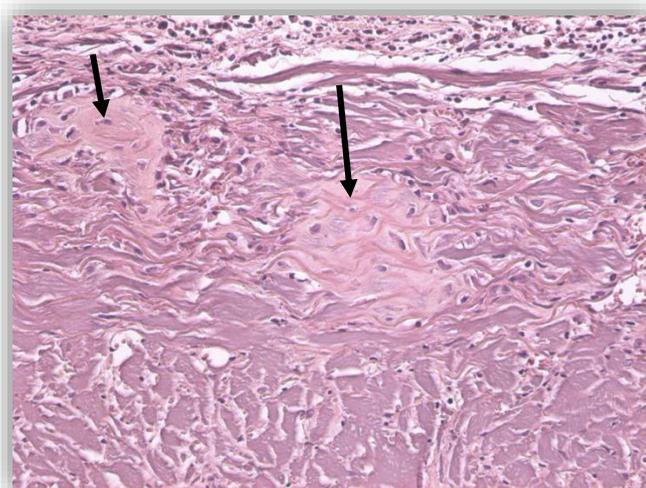


Fonte: Do autor.

15 Dias

Nesse tempo operatório verifica-se a presença de um tecido com menor vascularização, áreas de tecido ósseo neoformado a partir do coto. Verifica-se também a presença de pontos de tecido osteóide no centro do defeito (Fig. 10).

Figura 10 – CP. 15 dias. HE. Aumento de 250x. Presença de TON (setas)

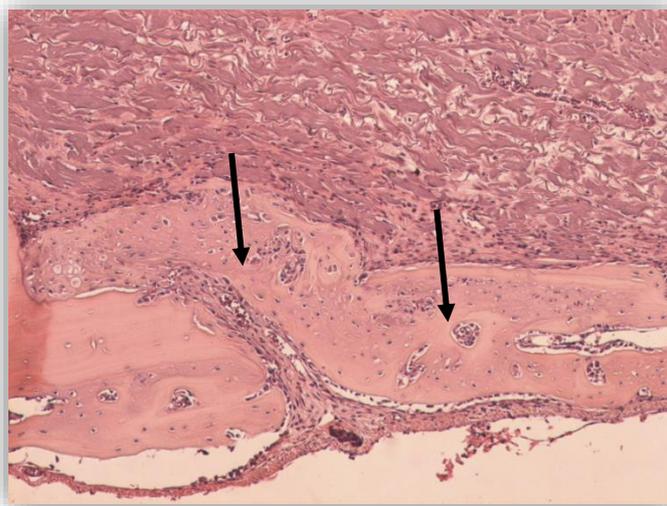


Fonte: Do autor.

30 Dias

No tempo operatório de 30 dias nota-se uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado e presença de tecido conjuntivo organizado (Fig. 11).

Figura 11 – CP. 30 dias. HE. Aumento de 250x. TON (setas)



Fonte: Do autor.

60 dias

Aos 60 dias de reparo, a membrana colágena Bio-Guide denota aspecto de fechamento completo do defeito sem presença de remanescente da membrana (Fig. 16A).

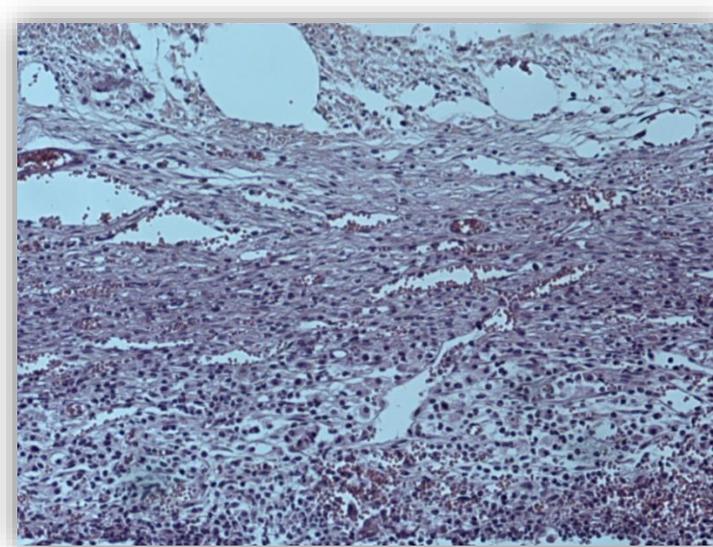
Na observação das lâminas em um aumento de 250x nota-se a presença de neoformação óssea a partir dos cotos ósseos e no centro do defeito, podendo ser observado células ósseas viáveis e sem a presença de remanescente da membrana. (Fig. 16A).

4.1.3 Grupo chá verde (CV)

7 dias

No grupo chá verde foi possível observar aos 7 dias somente a presença de um tecido conjuntivo ricamente vascularizado. Na região central do defeito nota-se a presença de um intenso infiltrado inflamatório (Fig. 12).

Figura 12 – CV. 7 dias. HE. Aumento de 250x

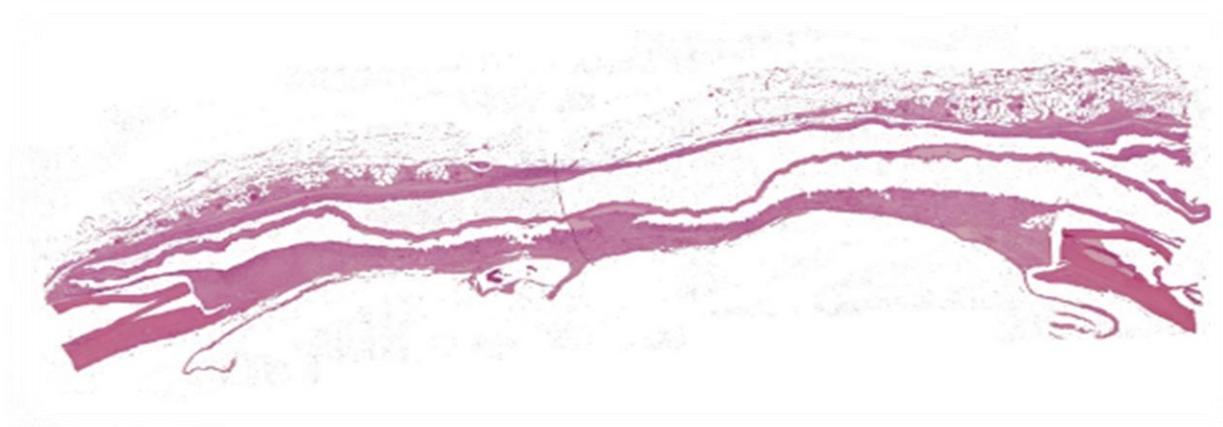


Fonte: Do autor.

15 dias

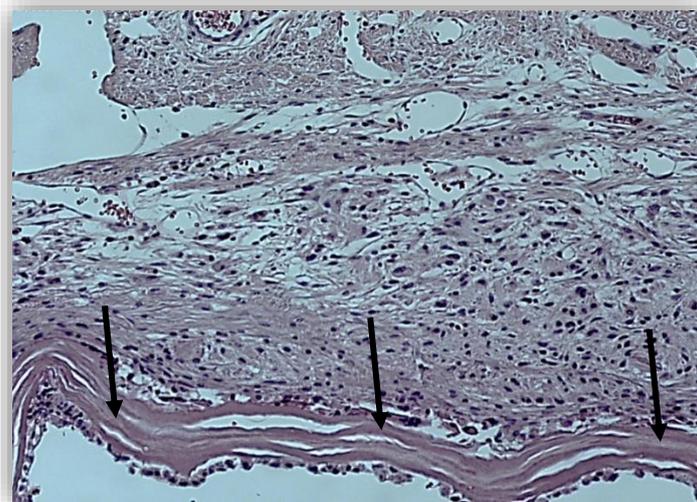
Nesse período é possível verificar que ocorreu neoformação óssea próxima aos cotos (Fig. 13) com uma pequena diminuição do infiltrado inflamatório. (Fig. 14). É possível notar também a presença da membrana.

Figura 13 – CV. 15 dias. HE. Imagem panorâmica (125x)



Fonte: Do autor.

Figura 14 – CV. 15 dias. HE. Aumento de 250x. Membrana de chá verde (setas)

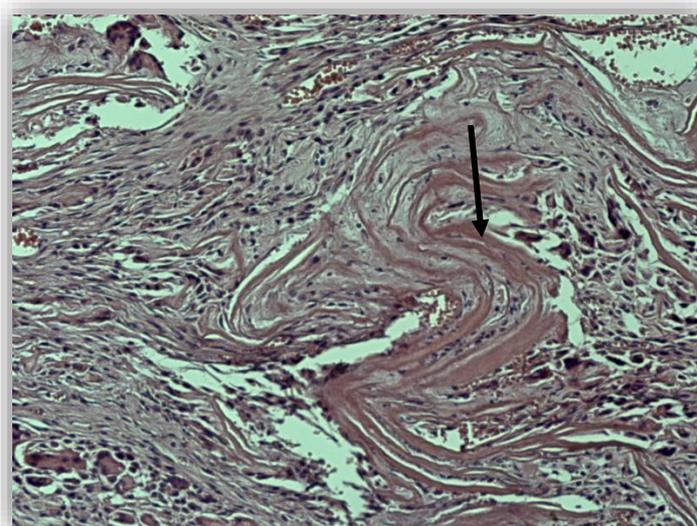


Fonte: Do autor.

30 dias

Observa-se uma redução significativa do infiltrado inflamatório e um tecido conjuntivo bem organizado, que envolve a membrana (Fig. 15).

Figura 15 – CV. 30 dias. HE. Aumento de 250x. Membrana de chá verde (seta)

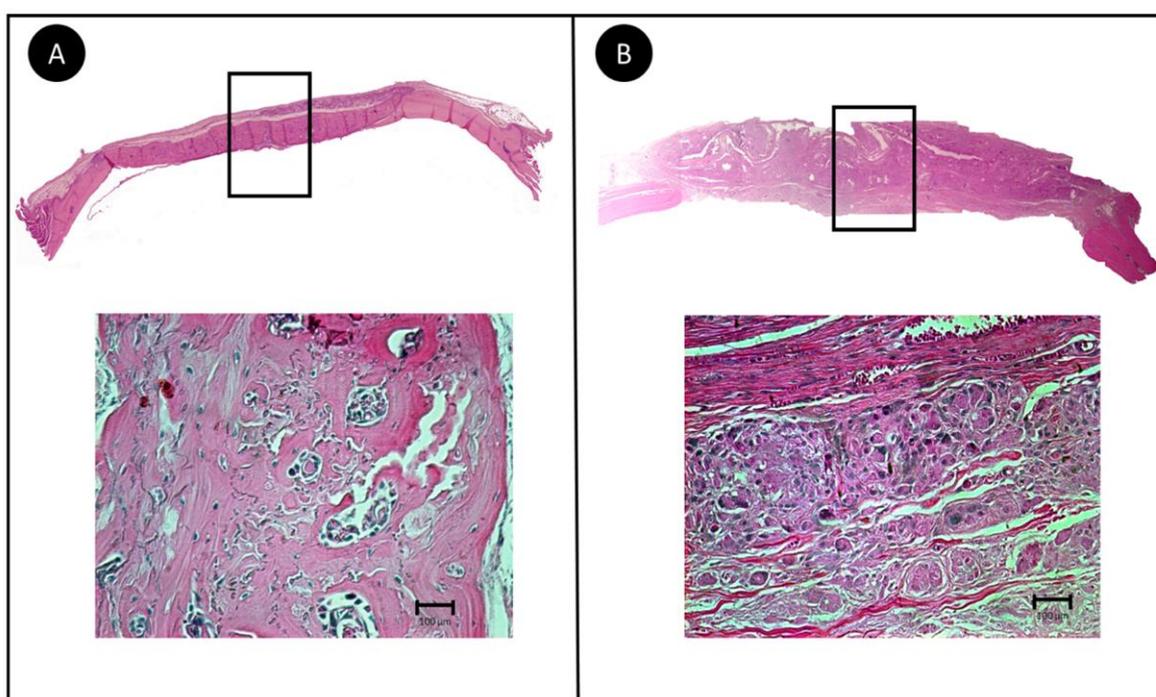


Fonte: Do autor.

60 dias

Aos 60 dias, é possível notar que ainda não há o fechamento do defeito com tecido ósseo (Fig. 16B). Ao analisar a fotomicrografia em maior aumento (250x), nota-se que o grupo do chá verde apresenta tecido conjuntivo maduro, com presença de fibras colágenas e permanência de infiltrado inflamatório com discretas áreas de tecido osteóide (Fig. 16B).

Figura 16 – Comparação CP e CV aos 60 dias. HE. Imagem panorâmica e aumento de 250x. A – CP 60 dias. B – CV 60 dias



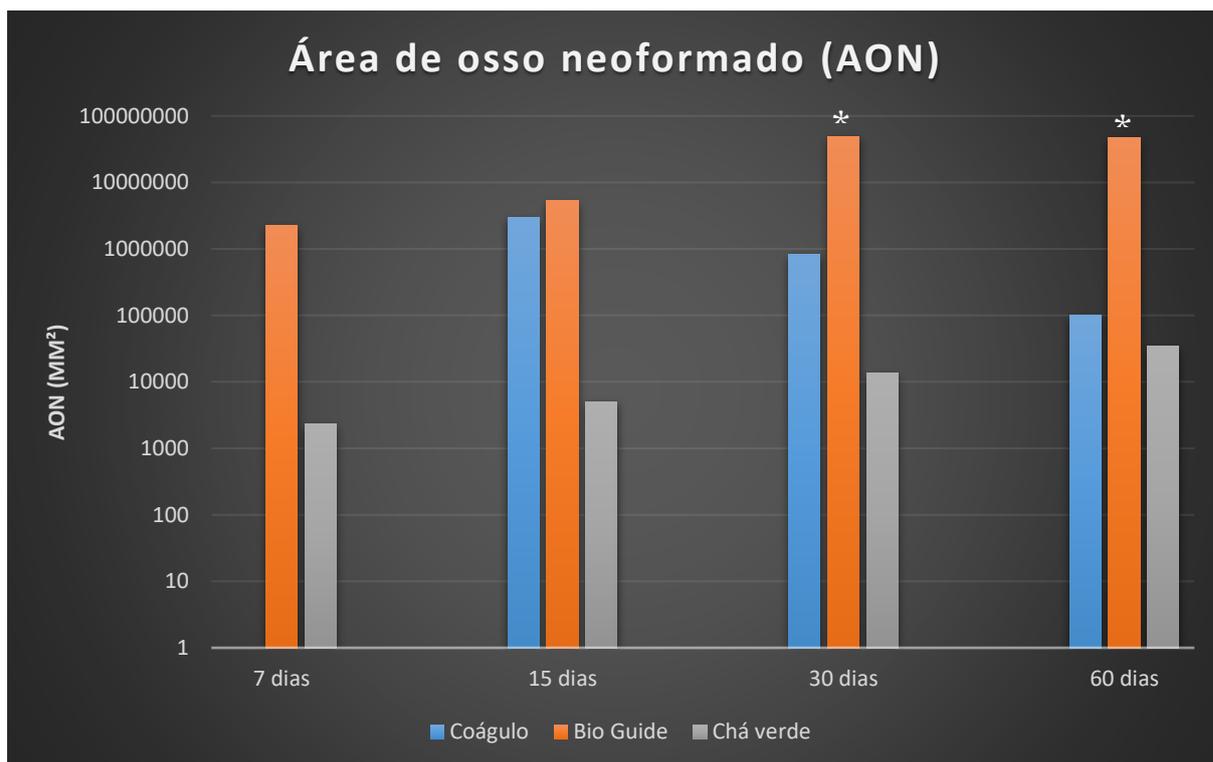
Fonte: Do autor.

4.2 Análise Histométrica

Os resultados referentes à membrana utilizada evidenciaram que, tanto aos 7 dias quanto aos 15 dias de reparo ósseo houve similaridade nos valores da área de neoformação óssea na comparação entre os grupos (Gráfico 1). Já quando analisamos os 30 dias de reparo ósseo, é possível observar que o grupo que recebeu a membrana Bio-Gide® foi o que apresentou maior discrepância em relação aos outros dois grupos ($P < 0,05$). É possível observar maior área de neoformação óssea no grupo Chá verde em relação ao grupo coágulo, no entanto sem apresentar diferença

estatística ($P < 0,05$) (Gráfico 1). Em relação aos períodos analisados, observou-se que apenas no grupo colágeno porcino houve melhor reparo ósseo aos 30 dias quando comparados aos demais períodos (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Valores mensurados da área de neoformação óssea entre os grupos e períodos analisados.



Fonte: Do autor.

4.3 Análise Imunoistoquímica

4.3.1 Grupo colágeno porcino (CP)

A fotomicrografia do reparo ósseo aos 15 dias de evidencia marcação moderada (++) para a proteína osteocalcina, principalmente em região de matriz extracelular. 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 (Quadro 1, Fig. 17).

A fotomicrografias do reparo ósseo aos 15 dias denota marcação moderada (++) para a proteína osteopontina. Já aos 30 dias, observa-se marcação leve (+) para o biomarcador. Aos 60 dias, é possível observar a

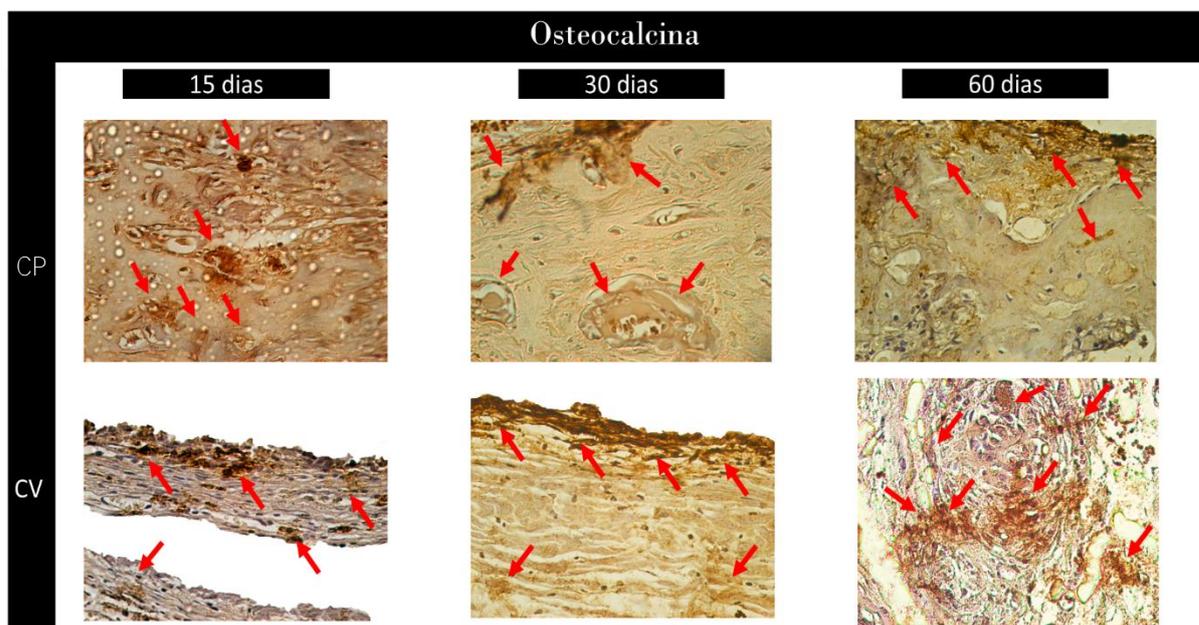
presença moderada (++) deste biomarcador novamente (Quadro 1, Fig. 18).

4.3.2 Grupo do chá verde (CV)

As fotomicrografias obtidas aos 15 e 30 dias de reparo ósseo, evidenciam marcação leve (+) para a proteína osteocalcina. No entanto, aos 60 dias de reparo, é possível notar marcação intensa (+++) para esta proteína em região de cotos ósseos (Quadro 1, Fig. 17).

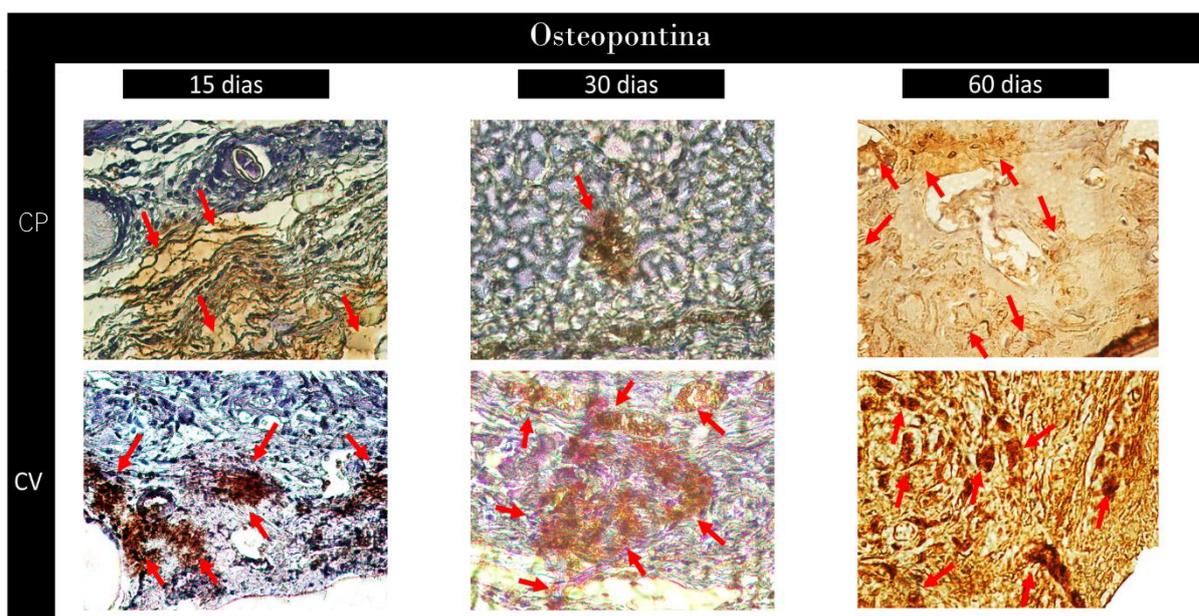
Em relação à proteína osteopontina, observou-se imunomarcacão leve (+) aos 15 dias de reparo, moderada (++) aos 30 dias e intensa (+++) aos 60 dias de reparo (Quadro 1, Fig. 18).

Figura 17 - Grupos CP e CV. Áreas de maior imunomarcacão para osteocalcina (setas vermelhas)



Fonte: Do autor.

Figura 18 – Grupos CP e CV. Áreas de maior imunomarcação para osteopontina (setas vermelhas).



Fonte: Do autor.

Quadro 1 – Scores representativos relacionados   imunomarcação das proteínas osteocalcina (OC) e osteopontina (OP) referente aos grupos colágeno porcino (CP) e chá verde (CV).

GRUPOS	OC	OP
CP 15 dias	++	++
CP 30 dias	+++	+
CP 60 dias	+++	++
CV 15 dias	+	+
CV 30 dias	+	++
CV 60 dias	+++	+++

Fonte: Do autor.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve como proposta avaliar a eficácia da membrana de chá verde (Nanoskin®-Innovatec's, São Carlos SP, Brasil), sintetizada através da celulose bacteriana, no reparo de defeitos ósseos de 8mm criados em calvária de ratos machos adultos. Em relação a capacidade dessa membrana na osteopromoção e permitir neoformação de tecido ósseo, ficou evidente nas fotomicrografias referentes aos maiores períodos do reparo ósseo (30 e 60 dias) que não houve preenchimento do defeito ósseo com osso neoformado. Além da ausência de tecido ósseo e fragmentos da membrana, notou-se a predominância de tecido conjuntivo fibroso em toda a extensão do defeito ósseo, mesmo nos períodos mais tardios. Nos períodos iniciais (7 e 15 dias), as características microscópicas mostraram que especificamente no grupo chá verde, houve um infiltrado inflamatório expressivo, o que atrasou o reparo ósseo em comparação aos grupos que utilizaram a membrana de colágeno (Bio-Gide®).

A investigação da biologia do tecido ósseo em função da membrana de chá verde nesta pesquisa, se fundamentou na engenharia tecidual que tem mostrado resultados promissores, principalmente no que diz respeito ao reparo de tecido mole, tais como no reparo de úlceras venosas²⁸, lacerações e abrasões traumáticas, estases venosas, sítio doador de enxertos de pele, lesões por queimaduras de segundo grau, além de úlceras em pés diabéticos²⁹. Apesar de mostrar bom comportamento no reparo de tecidos moles, pouco se sabe sobre o efeito da celulose bacteriana em tecidos duros. Sendo assim, considerou-se avaliar sua eficácia na regeneração óssea guiada, uma vez que se trata de um material totalmente natural e biocompatível³⁰. Alguns trabalhos^{31,32} iniciaram pesquisas nesse sentido obtendo resultados promissores e que diferiu dos resultados encontrados em nossa pesquisa.

Um dos grandes desafios da implantodontia atual é a busca por biomateriais que sejam eficazes nas grandes reconstruções alveolares e que se aproximem ao máximo do tecido autógeno. As membranas utilizadas devem cumprir com a função de servirem como barreiras biológicas de

modo que guiem a regeneração óssea, não devendo apresentar rejeições ao organismo³³⁻³⁶.

As membranas colágenas porcinas são amplamente utilizadas para este fim, sendo a Bio-Gide® a mais utilizada. Vários estudos clínicos^{37,38} e experimentais^{39,40} têm demonstrado a efetividade desta membrana como barreira biológica em defeitos ósseos importantes, seja associado a um biomaterial ou seu uso isolado.

Em relação ao presente estudo, os resultados referentes à análise histométrica evidenciam que a Bio-Gide® foi bastante superior à membrana de chá verde no que diz respeito à quantidade de osso formado ($P < 0,001$) aos 30 dias de reparo ósseo. Além disso, a análise histológica evidencia que, apesar de preencher o defeito ósseo criado, a membrana de chá verde não foi capaz de produzir tecido ósseo maduro, em que é possível observar apenas tecido conjuntivo, com discreta presença da membrana e tecido ósseo.

Em contrapartida, Lee e colaboradores (2015)⁴¹ compararam o uso da membrana de chá verde com o uso de uma membrana colágena (GENOSS, Suwon, Korea) como barreiras biológicas em defeitos de 8mm em calvária de ratos. No entanto, além da membrana, foi utilizado enxerto ósseo xenógeno sob o defeito. Os autores puderam observar que a membrana de chá verde apresentou comportamento bastante similar com a membrana de colágeno, capaz de estimular boa neoformação óssea no defeito criado, podendo ser utilizada como barreira biológica.

Apesar dos autores terem demonstrado bons resultados relacionados à membrana de chá verde, é importante ressaltar que foi utilizado enxerto ósseo xenógeno associado, além de que a membrana colágena não se tratava da Bio-Gide. No entanto, os resultados mostram a necessidade de realizar novos estudos acerca do uso da membrana de chá verde na regeneração óssea guiada (utilização de substitutos ósseos recobertos por membrana), uma vez que o material apresenta propriedades bastante interessantes, além de ser um material fitoterápico. Além disso, a atividade celular reparacional deste grupo em função da imunomarcagem para as

proteínas osteopontina e osteocalcina aos 60 dias, foi intensa, por meio da área de imunomarcção na matriz extracelular. Estas proteínas representam a maturação do tecido ósseo e desta forma, a utilização da membrana de chá verde mostrou atividade celular interessante, o que suscita avaliar o seu comportamento em associação com substitutos ósseos em estudos futuros.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Dentre as limitações deste estudo animal, foi possível concluir que a membrana de chá verde não demonstrou bom comportamento em defeitos críticos em calvária de ratos quando comparada à membrana colágena (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland), que evidenciou ser significativamente superior no que diz respeito à qualidade e quantidade de osso neoformado.

REFERÊNCIAS

1. Bashutski JD, Wang HL. Periodontal and endodontic regeneration. *J Endod* 2009; 35(3): 321-8.
2. Cortell-Ballester I, Figueiredo R, Valmaseda-Castellon E, Gay-Escoda C. Effects of Collagen Resorbable Membrane Placement After the Surgical Extraction of Impacted Lower Third Molars. *J Oral Maxillofac Surg* 2015; 73(8): 1457-64.
3. Kim HS, Kim JT, Jung YJ, Ryu SC, Son HJ, Kim YG. Preparation of a porous chitosan/fibroin-hydroxyapatite composite matrix for tissue engineering. *Macromolecular Research* 2007; 15(1): 65-73.
4. Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, Koyama T, Nagatsuka H, Suzuki K, Ryoike K. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. *Biomaterials* 2002; 23(9): 2027-33.
5. Ignatius AA, Ohnmacht M, Claes LE, Kreidler J, Palm F. A composite polymer/tricalcium phosphate membrane for guided bone regeneration in maxillofacial surgery. *J Biomed Mater Res* 2001; 58(5): 564-9.
6. Rothamel D, Schwarz F, Fienitz T, Smeets R, Dreiseidler T, Ritter L, Happe A, Zoller J. Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012; 27(1): 146-54.
7. Schlegel AK, Mohler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials* 1997; 18(7): 535-8.

8. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wustefeld M, Sager M, Ferrari D, Becker J. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(4):402-15.
9. Wang HL, Modarressi M, Fu JH. Utilizing collagen membranes for guided tissue regeneration-based root coverage. *Periodontol* 2000 2012;59(1):140-57.
10. Locci P, Calvitti M, Belcastro S, Pugliese M, Guerra M, Marinucci L, Staffolani N, Becchetti E. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1997;68(9):857-63.
11. Alpar B, Leyhausen G, Gunay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig* 2000;4(4):219-25.
12. Chen CC, Wang HL, Smith F, Glickman GN, Shyr Y, O'Neal RB. Evaluation of a collagen membrane with and without bone grafts in treating periodontal intrabony defects. *J Periodontol* 1995;66(10):838-47.
13. Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Simion M, Rasperini G, Lynch SE, Nevins M. Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Gide. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18(4):321-31.
14. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials -

biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8 Suppl):106-16.

15. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Nedic M, Vasilic N, Wolinsky LE, Kenney EB. A controlled re-entry study on the effectiveness of bovine porous bone mineral used in combination with a collagen membrane of porcine origin in the treatment of intrabony defects in humans. *J Clin Periodontol* 2000; 27(12):889-96.

16. Siró I, Plackett D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose* 2010; 17(3): 459-494.

17. MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 2007; 445(7130):874-80.

18. Klemm D, Schumann D, Kramer F, Hebler N, Hornung M, Schumauder H, Marsch S. Nanocelluloses as Innovative Polymers in Research and Application. *Polysaccharides II* 2006; 205: 49-96.

19. Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM, Jr. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 2006; 27(2): 145-51.

20. Lima F, Yue Z, Jin Z, Guang Y. Bacterial Cellulose for Skin Repair Materials. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges* 2011; 1: 249-274.

21. Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM, Jr. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* 2007; 8(1): 1-12.

22. Ciechanska D. Multifunctional Bacterial Cellulose/Chitosan Composite Materials for Medical Applications. *FIBRES & TEXTILES in Eastern*. 2004;12(4):69-72.
23. Helenius G, Backdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A* 2006;76(2):431-8.
24. Wan YZ, Hong L, Jian SR, Huang Y, Zhu Y, Wang YL, Jiang HJ. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 2006;66:1852-1832.
25. Xavier Acasigua GA, de Olyveira GM, Manzine Costa LM, Braghirolli DI, Medeiros Fossati AC, Guastaldi AC, Pranke P, Daltro Gde C, Basmaji P. Novel chemically modified bacterial cellulose nanocomposite as potential biomaterial for stem cell therapy applications. *Curr Stem Cell Res Ther* 2014;9(2):117-23.
26. Olyveira GM, Acasigua GA, Costa LM, Scher CR, Xavier Filho L, Pranke PH, Basmaji P. Human dental pulp stem cell behavior using natural nanolith/bacterial cellulose scaffolds for regenerative medicine. *J Biomed Nanotechnol* 2013;9(8):1370-7.
27. Costa LMM, Olyveira GM, Basmaji P, Filho LX. Influence of Symbioses Culture Between Microorganisms/Yeast Strains on Cellulose Synthesis. *International Review of Biophysical Chemistry (IREBIC)* 2012;3(3):48-54.
28. Alvarez O, Patel M, Booker J, Markowits L. Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: Results of a single center randomized study involving 24 patients. Volume 16. *Wounds*; 2004.

29. Kowalska-Ludwicka K, Cala J, Grobelski B, Sygut D, Jesionek-Kupnicka D, Kolodziejczyk M, Bielecki S, Pasieka Z. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. *Arch Med Sci* 2013;9(3):527-34.
30. Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A* 2006;76(2):431-8.
31. de Olyveira GM, dos Santos ML, Daltro PB, Basmaji P, de Cerqueira Daltro G, Guastaldi AC. Bacterial cellulose/chondroitin sulfate for dental materials scaffolds. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 2014;4(2):150-154.
32. de Olyveira GM, dos Santos ML, dos Santos Riccardi C, Costa LMM, Daltro PB, Basmaji P, de Cerqueira Daltro G, Guastaldi AC. Physically Modified Bacterial Cellulose Biocomposites for Guided Tissue Regeneration. *Science of Advanced Materials* 2015;7(8):1657-1664.
33. Blumenthal NM. The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. *J Periodontol* 1988;59(12):830-6.
34. Wang HL, O'Neal RB, Thomas CL, Shyr Y, MacNeil RL. Evaluation of an absorbable collagen membrane in treating Class II furcation defects. *J Periodontol* 1994;65(11):1029-36.
35. Crigger M, Bogle GC, Garrett S, Gantes BG. Repair following treatment of circumferential periodontal defects in dogs with collagen and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. *J Periodontol* 1996;67(4):403-13.

36. Yukna CN, Yukna RA. Multi-center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human Class II furcations. *J Periodontol* 1996;67(7):650-7.
37. Wallace SS, Froum SJ, Cho SC, Elian N, Monteiro D, Kim BS, Tarnow DP. Sinus augmentation utilizing anorganic bovine bone (Bio-Oss) with absorbable and nonabsorbable membranes placed over the lateral window: histomorphometric and clinical analyses. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005;25(6):551-9.
38. von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(4):359-66.
39. Hürzeler MB, Kohal RJ, Naghshbandi J, Mota LF, Conradt J, Hutmacher D, Caffesse RG. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27(4):315-20.
40. Oh TJ, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(1):80-90.
41. Lee SH, Lim YM, Jeong SI, An SJ, Kang SS, Jeong CM, Huh JB. The effect of bacterial cellulose membrane compared with collagen membrane on guided bone regeneration. *J Adv Prosthodont* 2015;7(6):484-95.

ANEXO I



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 "**Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de chá verde e membrana de colágeno porcino. Avaliação histométrica, imunoistoquímica**", Processo FOA nº 2015-00965, 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 14 de Outubro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Novembro de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Dezembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Repair process evaluation in rats skulls defects with green tea membrane and porcine collagen membrane. Histometric evaluation, immunohistochemistry**", Protocol FOA nº 2015-00965, 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 October 14, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 01, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 01, 2016.

Prof. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-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