



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

**Campus de Araçatuba**

**MARINA RUIZ GAMITO**

**Avaliação histomorfométrica da membrana absorvível de colágeno para regeneração óssea guiada em defeitos ósseos críticos de calvárias de ratos.**

**Araçatuba**

**2018**

**MARINA RUIZ GAMITO**

**Avaliação histomorfométrica da membrana absorvível de colágeno para regeneração óssea guiada instaladas em defeitos ósseos críticos de calvárias de ratos.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof. Assoc. Ana Paula Farnezi Bassi

Co-orientador: Prof. Assoc. Leonardo Perez Faverani

**Araçatuba**

**2018**

*Dedico este trabalho à meus pais: Antonia e Donizete, que sempre deram o melhor de si para que tivéssemos todo o conforto, amor e suporte. Obrigada pela educação que me deram. Minhas irmãs, Fabiana e Fernanda as quais partilharam das melhores memórias da minha infância e juventude. À meu marido Angelo e nosso filho, Benicio que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me fazendo feliz. Eu amo todos vocês*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da vida. À Ele por me conceder sabedoria, coragem e força nessa jornada. Por toda a luz e determinação na escolha da direção correta a tomar e por dar-me tantas boas oportunidades. Agradeço a Ele todas as vitórias e conquistas alcançadas. Nada foi sorte e sim foi Sua presença.

À toda minha família, em especial ao meu pai **Donizete** e minha mãe **Antonia**, os quais foram minha primeira base de educação. Pelo apoio constante em todas as etapas de minha vida. Agradeço à vocês pai e mãe pelas tantas noites de sono tardio, pelo cuidado com meu filho, pelo apoio afetivo e material em todo esse processo. A vocês não tenho e nunca teria palavras o suficiente para agradecer tudo que fizeram e fazem por mim, por nossa família. E à **Fernanda** e **Fabiana**, minhas irmãs, por todo amor, carinho e verdadeira amizade. Que privilegio e presente tê-las. Amo vocês.

À **Benicio Gamito Andreoli**, meu filho amado, que apesar de seus dois anos de idade, muito compreendeu minha ausência. Por ser meu maior motivador, se muitas vezes pensei em não continuar foi ele e sua alegria ao ver minha chegada que me deram forças para enfrentar e continuar essa caminhada. É a razão da minha vida e fez tudo valer à pena.

À **Angelo Fernandes Andreoli**, meu marido, com amor, admiração, e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio. Tornou-me uma pessoa melhor e mais dedicada. Agradeço por ser um exemplo de pai, amigo e companheiro. Amo você.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, nas pessoas do seu Diretor Prof. Tít. Wilson Roberto Poi e Vice-Diretor Prof. Tít. João Eduardo Gomes Filho.

À **todos os professores do curso**, pela importância na minha trajetória acadêmica, pelos esforços em nos transmitir seus conhecimentos de forma singular à cada aluno. Principalmente a minha professora orientadora **Ana Paula Farnezi Bassi** pela paciência, compreensão e confiança. Ajudou-me nas dificuldades e tornou possível a conclusão deste trabalho.

Aos **meus colegas**, por tornar o caminho mais fácil e mais agradável. Juntos conseguimos passar por todas as dificuldades.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, minha eterna gratidão.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

GAMITO MR. **Avaliação histomorfométrica da membrana absorvível de colágeno para regeneração óssea guiadas em defeitos ósseos críticos de calvárias de ratos.** 2018. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

## **RESUMO**

Este estudo objetivou avaliar a eficácia da membrana porcina no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos por meio da análise histológica o potencial de auxiliar na neoformação óssea. Foram utilizados 36 ratos para análise histológica de defeitos críticos em calvária de ratos nos períodos de 7, 30 e 60 dias divididos em dois grupos experimentais: G1: Coágulo, G2: Membrana Porcina. Foi possível observar na análise histológica que a membrana de colágeno tem um bom comportamento biológico com o tecido visto que não foram verificadas reação de corpo estranho em nenhum espécime e nem reações inflamatórias, também foi possível verificar que a mesma permitiu que a ROG acontecesse tanto aos 30 quanto aos 60 dias, sendo que em alguns espécimes foi verificado o fechamento completo do defeito crítico. Concluiu-se que a membrana colágena porcina apresentou aspectos de biocompatibilidade com potencial para auxiliar nos processos de ROG.

**Palavras Chave:** Reparo. Membranas. Colágeno.

**GAMITO MR. Histomorphometric evaluation of collagen absorbable membrane for guided bone regeneration in critical bone defects of rat calvaria.** 2018. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

## **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the efficacy of the porcine membrane in the process of repairing critical bone defects in rat calvaria. The efficacy was evaluated by means of histological analysis of the potential of assisting in bone neoformation. Thirty-six rats were used for histological analysis of critical defects in calvaria of rats at 7, 30 and 60 days divided into two experimental groups: G1: Clot, G2: Porcine Membrane. It was possible to observe in the histological analysis that the collagen membrane has a good biological behavior with the tissue since no foreign body reaction was observed in any specimen nor inflammatory reactions. It was also possible to verify that it allowed ROG to happen both for 30 and 60 days, and for some specimens the complete closure of the critical defect was verified. It was concluded that the porcine collagen membrane showed great biocompatibility aspects with potential to assist in ROG processes.

**Keywords:** Bone. Reparation. Membrane. Collagen.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> A. Membrana de colágeno porcino.....	19
<b>Figura 2:</b> a. Acesso cirúrgico a calvária. b. Trefina de 8mm. c. Remoção da cortical da região de calvária .....	21
<b>Figura 3:</b> G1. 7 dias. HE. Imagem panorâmica (125X).....	23
<b>Figura 4:</b> G1. 30 dias. HE. Imagem panorâmica (125X).....	24
<b>Figura 5:</b> G1. 30 dias. HE. Aumento de 40X. A. Coto esquerdo. B. Centro do defeitocrítico. C. Coto direito .....	24
<b>Figura 6:</b> G1. 60 dias. HE. Imagem panorâmica (125X).....	25
<b>Figura 7:</b> GC. 60 dias. HE. Aumento de 400x. Coto direito. TON (seta preta). TC (seta amarela). Linha de osteotomia (LO) (seta verde). Osteócitos (seta azul) .....	25
<b>Figura 8:</b> GC. 60 dias. HE. Aumento de 400x. Centro do defeito crítico.AusênciadeTON. TC (seta amarela). Neutrófilos (seta vermelha).....	26
<b>Figura 9:</b> GBG. 7 dias. HE. Imagem panorâmica (125X).....	26
<b>Figura 10:</b> GBG. 7 dias. HE. Aumento de 12.5X. A. Células Gigantes (seta preta). B. Centro do defeito crítico .....	27
<b>Figura 11:</b> GBG. 30 dias. HE. Imagem panorâmica (125X).....	27
<b>Figura 12:</b> GBG. 30 dias. HE. Aumento de 12.5X.Coto (seta preta), TC (seta amarela), membrana remanescente (seta azul). a. Coto direito. b. Coto esquerdo. c. Centro do defeito crítico .....	28
<b>Figura 13:</b> G2. 30 dias. HE. Aumento de 400X. A. Coto esquerdo. TON (seta preta). TON nos espaços da membrana (seta verde). Membrana remanescente (seta azul). Membrana remanescente integrada ao TON (seta vermelha). TC (seta amarela). B. Coto direito. TON (seta preta). Membrana remanescente (seta azul).TC (seta amarela). Membrana remanescente integrada a TON (seta verde). Osteócitos (seta vermelha) .....	29
<b>Figura 14:</b> G2. 60 dias. HE. Imagem panorâmica.....	29
<b>Figura 15:</b> G2. 60 dias. HE. Aumento de 40X. TON (seta preta), TC (seta amarela). Tecido osteóide (seta azul). A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito .....	30

**Figura 16:** G2. 60 dias. HE. Aumento de 400X. TON (seta preta). TC (seta amarela). Tecido osteóide (seta azul). Osteócito (seta verde). A. Coto esquerdo. B. Coto direito. C. Centro do defeito crítico .....30

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Características das principais membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis .....16

**Tabela 2:** Área de TON em função dos grupos experimentais aos 7, 30 e 60 dias ..31

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Média da área de tecido ósseo neoformado distribuído em função dos tempos dos grupos experimentais.....	31
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ROG = regeneração óssea guiada

GC = grupo coágulo

GBG = grupo Bio-Gide®

PVPI = polivinilpirrolidona iodo

HE = hematoxilina e eosina

TON = tecido ósseo neoformado

TC = tecido conjuntivo

LO = linha de osteotomia

AON = área de osso neoformado

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 PROPOSIÇÃO .....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1 Membrana Porcina (Bio-Gide®, Geistlich).....	19
3.2 Amostras .....	19
3.3 Cirurgia experimental .....	20
3.4 Etapa laboratorial .....	21
3.5 Análise histológica.....	22
3.6 Análise histomorfométrica .....	22
3.7 Análise estatística.....	22
4 RESULTADOS .....	23
4.1 Avaliação histológica .....	23
4.1.1 Grupo 1: Coágulo .....	23
4.1.2 Grupo 2: Membrana Porcina.....	26
4.2 Avaliação histométrica.....	31
5 DISCUSSÃO .....	32
6 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

## 1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea guiada (ROG) é um procedimento cirúrgico de uso frequente quando há falta de osso horizontal ou vertical que possa causar problemas clínicos na reabilitação oral<sup>1</sup>. A ROG baseia-se no uso de uma membrana biocompatível fazendo o papel de barreira física e servindo para isolar células de interesse regenerativo e impedir a penetração de células impróprias ao reparo, gerando assim, espaço favorável para a regeneração óssea<sup>2,3</sup>. Acontece que ao longo do processo de reparação, os tecidos epiteliais e conjuntivos migram rapidamente para a ferida, o que torna a regeneração óssea mais dificultosa<sup>4</sup>.

As membranas utilizadas na ROG podem ser de dois tipos: não-reabsorvíveis e reabsorvíveis. As principais características que essas membranas devem apresentar para se tornarem candidatas a uso nessa terapia são: reabsorção, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e possuírem adequada estabilidade, ou seja, capacidade de manter um espaço adequado durante o processo de reparo ósseo<sup>5-7</sup>.

Atualmente, os dois tipos de materiais têm sido avaliados tanto em estudo com animais como na prática clínica. Para algumas membranas reabsorvíveis, reações inflamatórias têm sido observadas em tecidos adjacentes estas<sup>8</sup>. Enquanto a desvantagem do uso de membranas não reabsorvíveis reside no fato de necessidade de uma segunda cirurgia para sua remoção<sup>9</sup>. A tabela 1 apresenta as principais membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis disponíveis e suas características.

**Tabela 1: Características das principais membranas reabsorvíveis e não absorvíveis**

<b>Reabsorvíveis</b>	<b>Não reabsorvíveis</b>
Colágeno de origem bovina e suína Osso bovino Ácido polilático e poliglático	EPTF-e (Politetrafluoretileno expandido) Filtros de milipore
Menor morbidade; Técnica simples e apenas uma intervenção cirúrgica; Menor riscos de complicações; Tempo de reabsorção de diferentes marcas comerciais	Maior morbidade; Técnica avançada e a membrana deve ser removida; Maior risco de complicações; Barreira presente até o momento da remoção da membrana

Fonte: J Clin Dent Res. 2016 Oct-Dec;13(4):120-5

Alguns estudos mostraram que as membranas absorvíveis têm um menor risco de exposição na cavidade bucal<sup>10</sup>. Essa possível exposição resulta numa complicação na terapia de ROG, pois a exposição provê um ambiente favorável à aderência e multiplicação bacteriana, e se torna uma rota de entrada de patógenos para dentro do tecido periodontal. Quando porções se tornam expostas no período pós-operatório, estas se degradam precocemente, o que compromete a função de barreira<sup>11</sup>.

As membranas a base de colágeno são biocompatíveis, hemostáticas, além de promoverem quimiotaxia para fibroblastos e osteoblastos. São semi permeáveis o que permite a transferência de nutrientes entre a membrana e o tecido afetado<sup>12-17</sup>. Também produzem considerável reparação de defeitos intraósseos<sup>18</sup>, associados a vários tipos de enxertos ósseos e, podem melhorar a eficácia desses enxertos aumentando a capacidade de estimular o reparo dos tecidos periodontais<sup>19-21</sup>.

Por essas razões, as membranas de colágeno têm sido muito utilizadas em cirurgias bucomaxilofaciais e destacadas como “gold standard” no processo de cicatrização óssea. Em comparação a membranas não reabsorvíveis apresentam inúmeras vantagens como: estabilização da ferida permite vascularização precoce do local afetado, atraem fibroblastos através da quimiotaxia e são semipermeáveis, o que facilita a transferência dos elementos nutritivos. Devido à propriedade hidrofílica das membranas de colágeno, facilitam a técnica cirúrgica e sua

estabilização sobre o enxerto, além de não necessitar de cirurgia para sua remoção por serem completamente absorvidas pelo organismo<sup>22</sup>.

Entre as membranas de colágeno derivada de suínos e não reticulada, a que se destaca no mercado é a Bio-Gide<sup>®</sup> (*Geistlich Wolhusen*, Suíça). São constituídas de puro colágeno tipo I e tipo III). São comercializadas com certificado veterinário de rigorosa purificação (para prevenir respostas antigênicas do paciente), sendo feita por radiação gama. A membrana de colágeno Bio-Gide<sup>®</sup> é constituída de uma camada porosa, que deve ser posicionada próxima ao osso, para permitir a invasão de osteoblastos e de uma camada lisa que previne a invasão de tecido fibroso para o interior do defeito ósseo, devendo ficar próxima ao retalho. A membrana é completamente reabsorvida pelo organismo entre 16 a 24 semanas, de acordo com estudos realizados em ratos <sup>23</sup>.

As características hidrofílicas e de maleabilidade a tornam fácil de ser adaptada sobre o enxerto e, quando colocada em dupla camada, ocorre uma melhor estabilização do enxerto, dispensando assim a utilização de tachinhas ou parafusos para fixação. Além disso, quando expostas não causam infecção local porque os tecidos moles geralmente cicatrizam por segunda intenção<sup>24</sup>.

As membranas podem servir também como suporte do crescimento celular por possuir uma estrutura que mimetiza a matriz extracelular, permitindo assim crescimento, proliferação, migração e diferenciação de tecidos específicos para uma futura implantação<sup>25</sup>. A matriz extracelular é composta de uma interligação de fibras proteicas (colágeno e elastina), proteoglicanos e depósitos de minerais no caso do tecido ósseo.

## **2 PROPOSIÇÃO**

A proposta deste estudo foi avaliar por meio de análise histométrica e histológica o potencial da membrana porcina (Bio-Gide<sup>®</sup>) em auxiliar a neoformação óssea no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

#### 3.1 Membrana Porcina (Bio-Gide®, Geistlich)

A Membrana porcina fornecida pela empresa Geistlich, Bio-Gide®, é uma membrana não reticulada de colágeno porcino. Está disponível nos tamanhos: 25 x 25 mm, 30 x 40 mm (Figura 1).

**Figura 1: A. Membrana de colágeno porcino**



Fonte: O autor

#### 3.2 Amostras

Foram utilizados um total de 36 ratos (*rattusnovergicusalbinus*, Wistar), machos, adultos (3 - 4 meses), com peso entre 200g a 300g, os quais foram divididos em dois grupos (n=18 por grupo). Os animais foram submetidos à eutanásia em três períodos diferentes do experimento, aos 7, 30 e 60 dias após a cirurgia. Os animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brasil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum* no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP. Sendo assim, para cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico na calvária (8 mm), como discriminado a seguir:

- Grupo 1: Coágulo (controle negativo) – n= 18: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 30 e 60 dias após a cirurgia).
- Grupo 2: Colágeno porcino (Bio-Gide®) (controle positivo) – n= 18: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 30 e 60 dias após a cirurgia).

### **3.3 Cirurgia experimental**

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório por doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Foi realizada a tricotomia na região da calvária, antissepsia com PolivinilPirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, RiodeineDegermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10% Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Foi realizada incisão triangular no sentido occipitofrontal de aproximadamente 2 (dois) cm, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tóquio, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha) (Figura 2a). Em seguida, com auxílio de broca trefina de 8 mm de diâmetro (3i Implantinnovations, Inc., Palm Beach Gardens, E.U.A) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8mm de diâmetro, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 2b e 2c). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram

preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino (GBG – n=18), ou sem recobrimento (GC – n=18).

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

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água ad libitum.

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

**Figura 2:**a. Acesso cirúrgico a calvária. b. Trefina de 8mm. c. Remoção da cortical da região de calvária



Fonte: Do autor.

### 3.4 Etapa laboratorial

As calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e, receberam cortes de 6  $\mu$ m de espessura e então montadas em lâminas. As lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE). Para análise histológica foram avaliadas 3 lâminas por animal onde todo o defeito foi analisado. Previamente a realização da análise

histológica, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conheceu as quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconheceu o respectivo grupo da secção.

### **3.5 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.

### **3.6 Análise histomorfométrica**

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck &Co., Inc.) foram analisadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmara de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá). 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.

### **3.7 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  $p < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação histológica

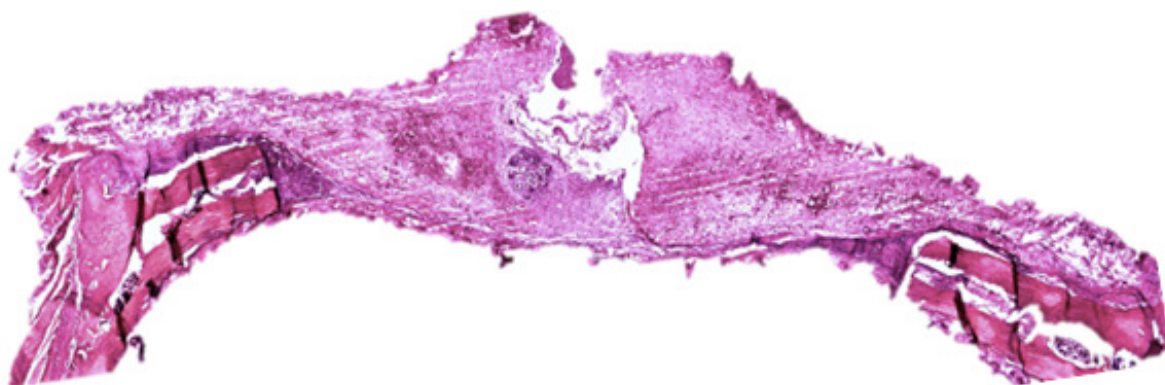
Os resultados foram avaliados por meio de microscópio óptico com padronização da leitura das lâminas do GC e GBG.

#### 4.1.1 – Grupo 1: Coágulo

##### 7 dias

A citoarquitetura das secções microscópicas aos 7 dias para os defeitos sem membrana mostrou hipervascularização no tecido ósseo neoformado (TON) e presença de atividade fibroblástica. Verificou-se na borda do defeito ósseo, em direção ao centro da ferida, neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, ricamente celularizado por osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. A neoformação óssea somente foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central, com abundância de tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblasto e pouca matriz extracelular preenchendo a região central da ferida (Figura 3).

**Figura 3: G1. 7 dias. HE. Imagem panorâmica (125X)**

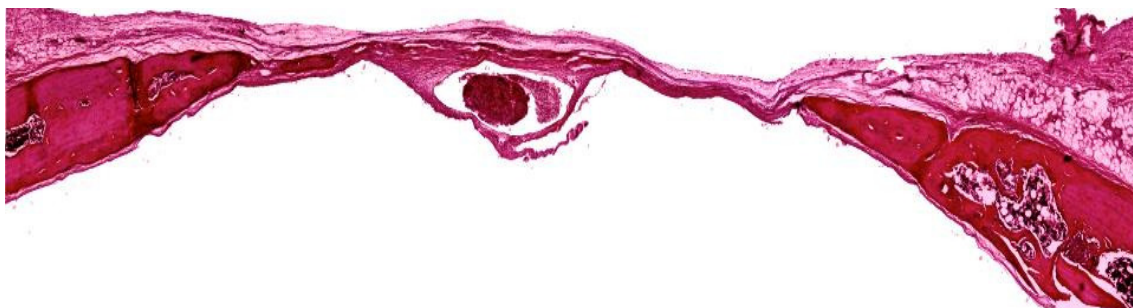


Fonte: Do autor.

### 30 dias

No período de 30 dias (Figura 4), o GC apresentou uma área óssea neoformada maior próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes estava preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado.

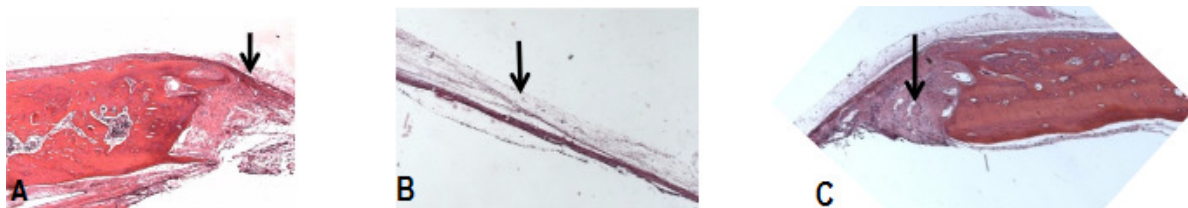
**Figura 4: G1. 30 dias. HE. Imagem panorâmica (125X)**



Fonte: Do autor.

Foi possível observar, em maior aumento, indicados pela seta, a área de osteotomia com os cotos ósseos esquerdos (Figura 5a) e direito (Figura 5c) com discreta neoformação óssea em suas margens, e o centro do defeito crítico preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Figura 5b).

**Figura 5: G1. 30 dias. HE. Aumento de 40X. A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito**



Fonte: Do autor.

### 60 dias

No período de 60 dias (Figura 6) observou-se maior aproximação dos cotos, porém, o defeito ósseo permanece sem reparo e a área central apresenta-se preenchida por tecido conjuntivo fibroso.

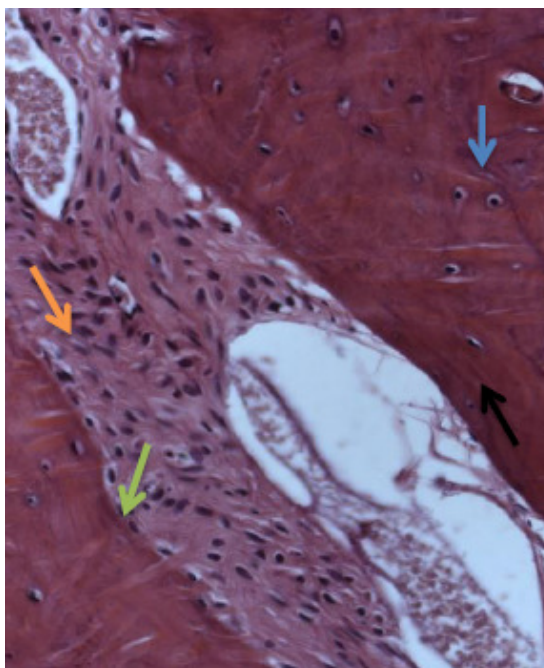
**Figura 6: G1. 60 dias. HE. Imagem panorâmica (125X)**



Fonte: Do autor.

No aumento de 400x observa-se TON, presença de tecido conjuntivo (TC), linha de osteotomia (LO) e osteócitos nos cotos esquerdo e direito (Figura 7).

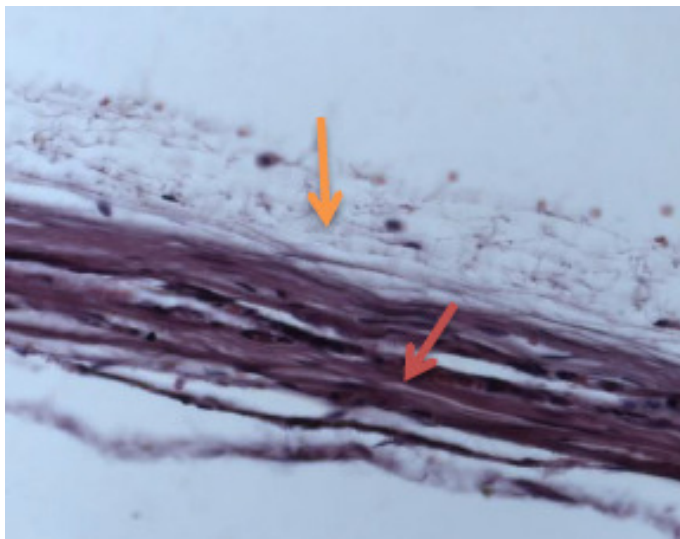
**Figura 7: GC. 60 dias. HE. Aumento de 400x. Coto direito. TON (seta preta). TC (seta amarela). Linha de osteotomia (LO) (seta verde). Osteócitos (seta azul)**



Fonte: Do autor.

No centro do defeito há ausência de TON e presença de 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)**



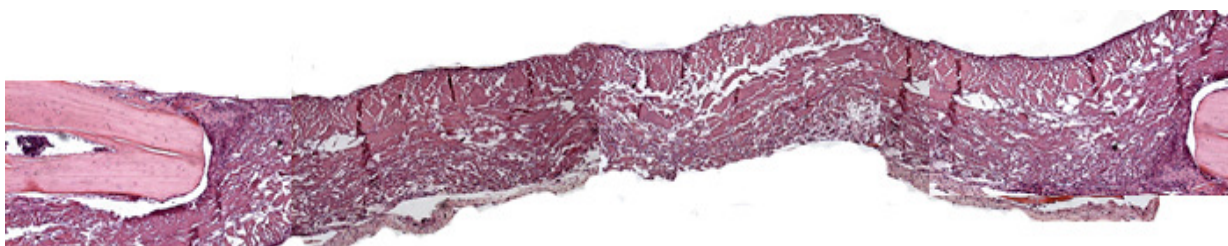
Fonte: Do autor.

#### **4.1.2 Grupo 2: Membrana Porcina**

##### **7 dias**

Nota-se a presença da membrana de colágeno porcino em todo defeito preenchido por um tecido altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório, com início de neoformação óssea próximo aos cotos (Figura 9).

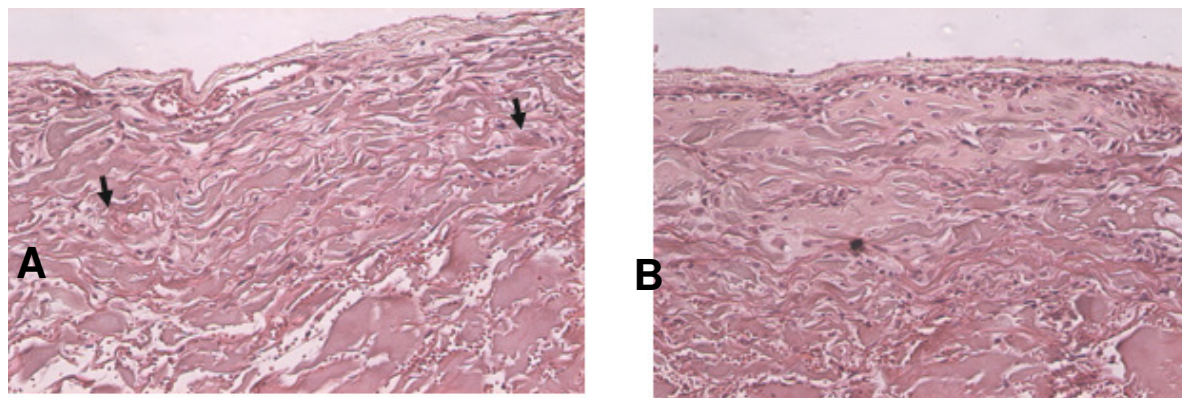
**Figura 9: GBG. 7 dias. HE. Imagem panorâmica (125X)**



Fonte: Do autor.

Presença de células gigantes indicando a fagocitose da membrana (Figura 10a). Início de neoformação óssea no centro do defeito (Figura 10b).

**Figura 10: GBG. 7 dias. HE. Aumento de 12.5X. A. Células Gigantes (seta preta). B. Centro do defeito crítico**

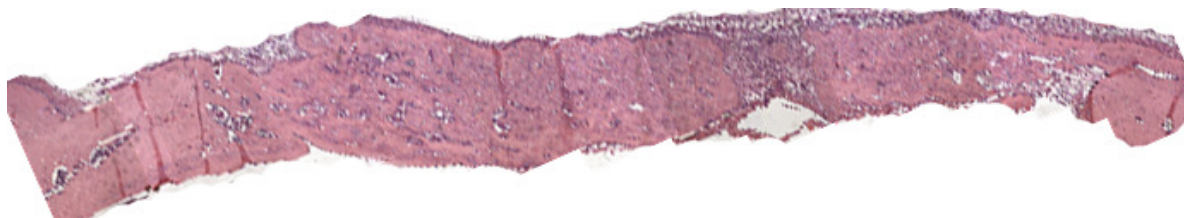


Fonte: Do autor.

### **30 dias**

O centro do defeito apresenta-se preenchido por TON e TC fibroso organizado, com neoformação óssea a partir dos cotos em direção a porção central. Nota-se grande quantidade de TON entremeado por fragmentos da membrana de colágeno porcino (Figura 11).

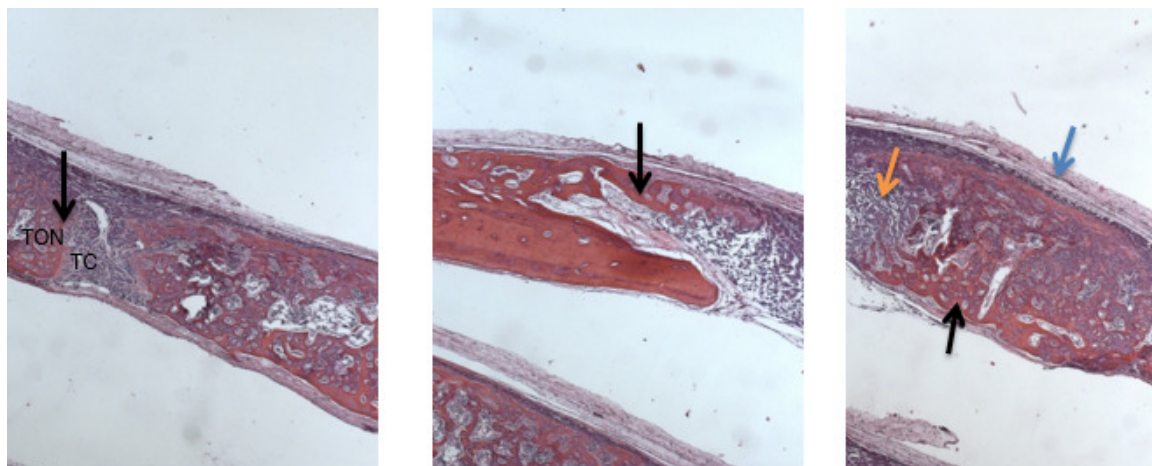
**Figura 11: GBG. 30 dias. HE. Imagem panorâmica (125X)**



Fonte: Do autor.

Na observação das lâminas em um aumento de 12.5 vezes nota-se a presença de neoformação óssea a partir dos cotos ósseos (Figuras 12a e b) e no centro do defeito (Figura 12c), com a imagem mostrando remanescente da membrana entre a área de TON e TC organizado.

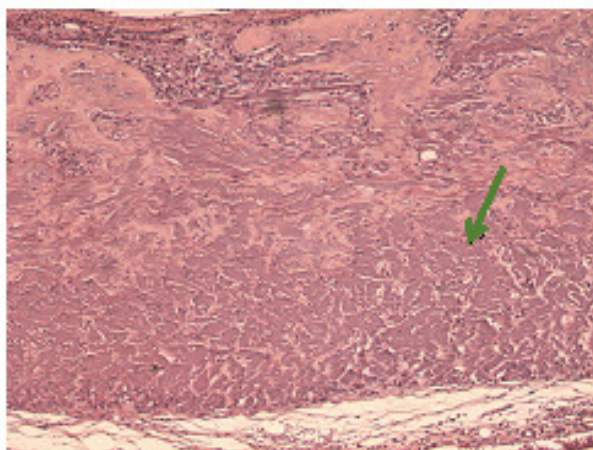
**Figura 12: GBG. 30 dias. HE. Aumento de 12.5X. Coto (seta preta), TC (seta amarela), membrana remanescente (seta azul). a. Coto direito. b. Coto esquerdo. c. Centro do defeito crítico**



Fonte: Do autor.

Em um aumento de 25 vezes observa-se mais nitidamente o TON envolvendo a membrana remanescente (Figura13).

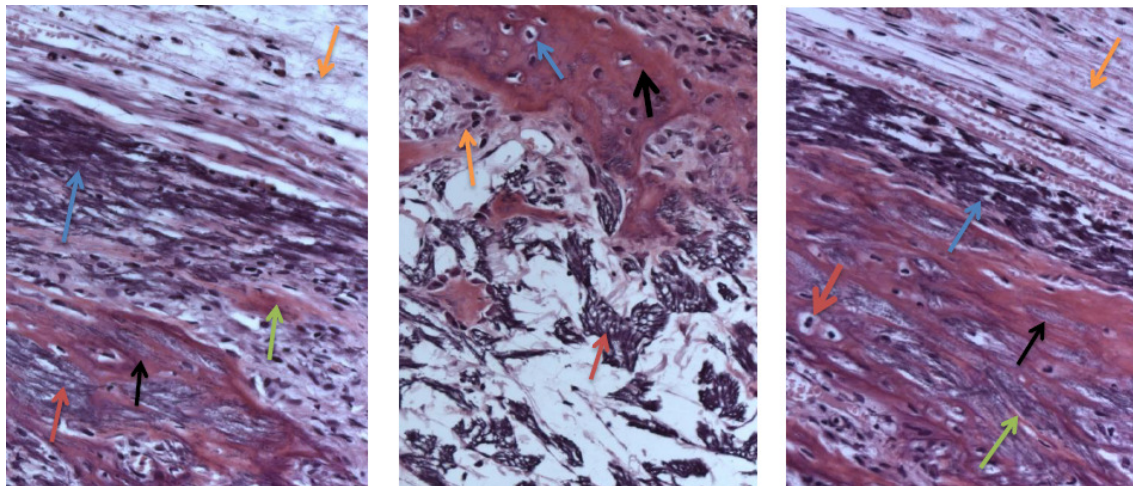
**Figura 13: G2. 30 dias. HE. Aumento de 25X. Membrana remanescente (seta verde). Centro do defeito crítico**



Fonte: Do autor.

No aumento de 400 vezes observa-se nos cotos esquerdo e direito e no centro do defeito TON, TON nos espaços da membrana, membrana remanescente, tecido osteóide, osteócitos e TC (Figura 14).

**Figura 14: G2. 30 dias. HE. Aumento de 400X. A. Coto esquerdo. TON (seta preta). TON nos espaços da membrana (seta verde). Membrana remanescente (seta azul). Membrana remanescente integrada ao TON (seta vermelha). TC (seta amarela). B. Coto direito. TON (seta preta). Membrana remanescente (seta azul).TC (seta amarela). Membrana remanescente integrada a TON (seta verde). Osteócitos (seta vermelha)**

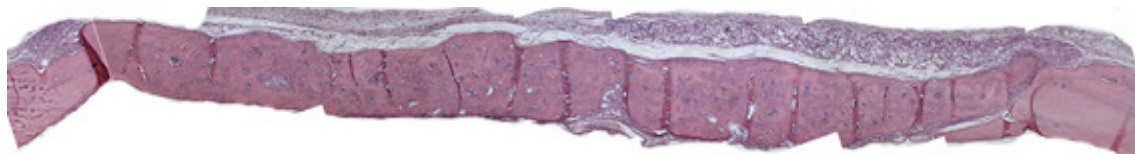


Fonte: Do autor.

## 60 dias

Aos 60 dias as imagens obtidas da neoformação óssea nos cotos e centro do defeito eram muito semelhantes aos dos animais sacrificados com 30 dias, mas com tecido ósseo neoformado preenchendo praticamente toda a cavidade (Figura 15).

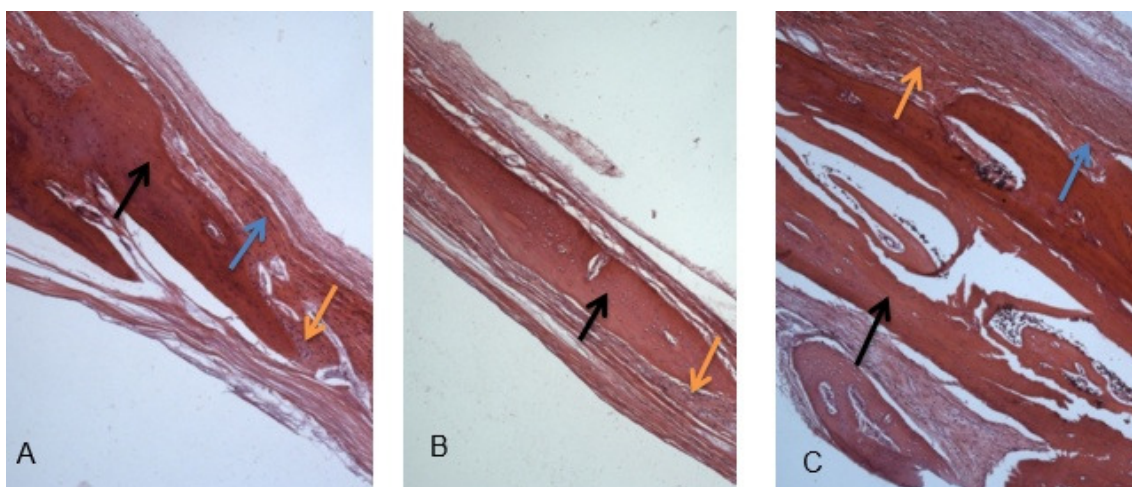
**Figura 15:G2. 60 dias. HE. Imagem panorâmica (125X)**



Fonte: Do autor.

No aumento de 40 vezes observou-se em ambos os cotos (Figura 16a e 16b) e no centro do defeito (Figura 16c) TON, presença de TC e tecido osteóide. Além disso, o coto direito apresentou membrana remanescente (Figura 16b).

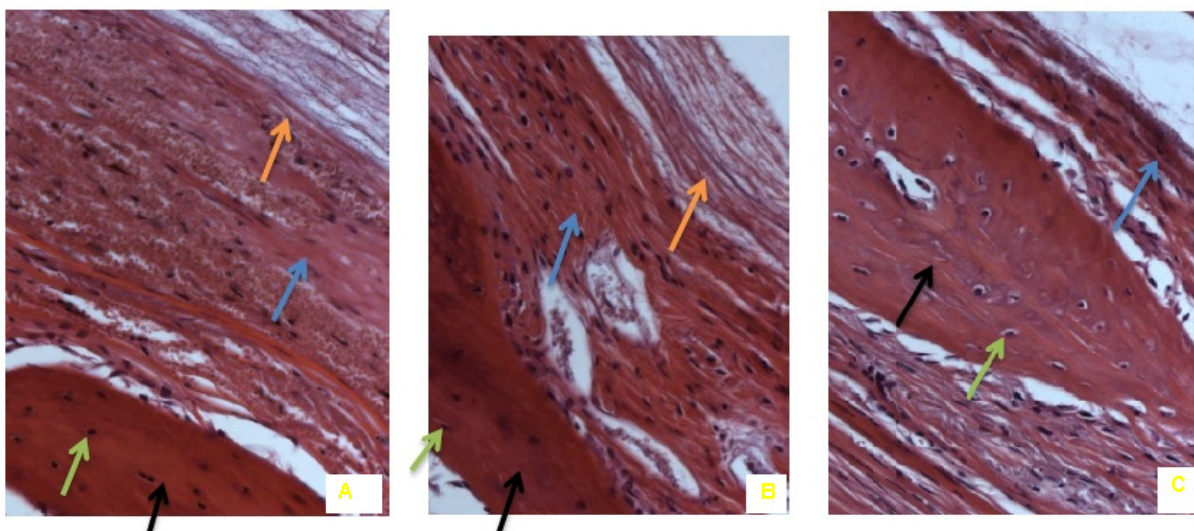
**Figura 16: G2. 60 dias. HE. Aumento de 40X. TON (seta preta), TC (seta amarela). Tecido osteóide (seta azul). A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito**



Fonte: Do autor.

No aumento de 400 vezes é possível observar mais nitidamente TON, presença de tecido osteóide, osteócitos e TC (Figura 17a, b e c).

**Figura 17: G2. 60 dias. HE. Aumento de 400X. TON (seta preta). TC (seta amarela). Tecido osteóide (seta azul). Osteócito (seta verde). A. Coto esquerdo. B. Coto direito. C. Centro do defeito crítico**



Fonte: Do autor.

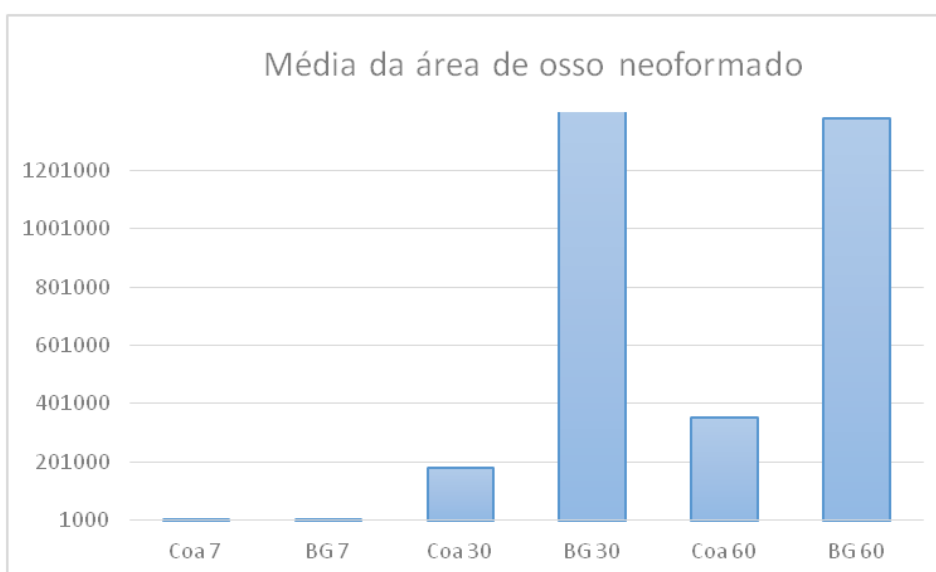
## 4.2 Avaliação histométrica

**Tabela 1: Área de TON em função dos grupos experimentais aos 7, 30 e 60 dias**

	Coa 7	BG 7	Coa 30	BG 30	Coa 60	BG 60
Media da área de tecido ósseo neoformado	2156	2239	180242	1426663	352154	1380370

Fonte: Do autor.

**Gráfico 1: Média da área de tecido ósseo neoformado distribuído em função dos tempos dos grupos experimentais**



Fonte: Do autor.

A partir dos dados histométricos obtidos (Tabela 2) de área de osso neoformado (AON), no primeiro período experimental, houve similaridade entre os grupos analisados ( $p > 0,05$ ). Nos demais períodos (30 e 60 dias), o GBG apresentou os maiores valores de AON ( $p < 0,05$ ). Aos 30 dias, o GBG ( $p < 0,001$ ) e GC ( $p = 0,05$ ) ( $BG > COAG$ ). Aos 60 dias, os maiores valores foram para o GBG e GC foram ( $p < 0,05$ ) ( $BG > COAG$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A necessidade de auxiliar defeitos ósseos no processo de regeneração óssea guiada, vem justamente do anseio do paciente em ser reabilitado por meio de implantes osseointegrados, e para isso uma das condições fundamentais é a presença mínima de altura e espessura óssea. É notório o desenvolvimento de técnicas e materiais nesses últimos 20 anos nos processos de regeneração óssea guiada. Contudo, a grande pergunta é: Esses materiais diante de um defeito crítico conseguem ser efetivos nesses processo? <sup>26, 27</sup>.

Temos por definição de defeito ósseo crítico: o menor tamanho de defeito que não permite a completa cicatrização óssea durante um período determinado, usualmente suficiente para a cicatrização natural. Assim, um dos maiores objetivos da pesquisa com biomateriais é permitir a engenharia tecidual de osso pela cultura de células osteogênicas e de vascularização em armações/arcabouços de compósitos biocompatíveis <sup>28, 29</sup>.

Nesta pesquisa pode-se observar que nas situações onde somente foi deixado o coágulo e de membrana, no período de 7 dias, todos os grupos apresentaram pouquíssima neoformação óssea e somente próximo ao coto. Além disso, o tecido conjuntivo formado apresenta-se bastante desorganizado. Os remanescentes da membrana nos GBG são bem nítidos e extensos, ocupando todo o centro do defeito. Já no período de 30 dias, o resultado encontrado no GC mostra que os animais receberam apenas o coágulo, apresentando uma formação óssea pequena nos cotos e nenhuma neoformação óssea no centro do defeito. Contudo, os animais do GBG apresentaram neoformação óssea nos cotos e na região central do defeito observou-se TON como “ilhas” fusionadas de tecido ósseo e remanescentes da membrana.

No período final de análise aos 60 dias pode-se observar que o GC continuou apresentando os piores resultados, sem neoformação óssea no centro do defeito, apenas preenchimento do defeito com tecido conjuntivo. Em contrapartida os animais que receberam a membrana apresentaram neoformação óssea melhor, com quase o fechamento completo do defeito, havendo somente uma pequena faixa no centro com tecido conjuntivo e remanescentes da membrana.

A membrana colágena não é tóxica para as células e tem várias propriedades desejáveis, tais como biodegradabilidade. Essa característica de pouca toxicidade foi comprovada no presente estudo, uma vez que não houve, nos períodos avaliados, nenhuma característica histológica que pudesse indicar rejeição do material inserido e com processo inflamatório de pouca intensidade<sup>30,31,32, 33</sup>.

Du et al.<sup>34</sup> utilizaram membranas de colágeno como scaffolds. As membranas de colágeno obtidas comercialmente envolviam HA em sua superfície, em seguida eram colocadas sobre o fragmento de osso ao longo da sua superfície. O tamanho dos poros deste material variava de dezenas a centenas de micrometros, e o material se mostrou flexível e absorvível. Os autores observaram também que as células migravam a partir dos fragmentos ósseos na matriz, o que sugeriu que o material é bioativo. Em um de seus estudos, Wagner-Ecker<sup>35</sup> constatou que o colágeno tem capacidade de neoformação óssea. Porém essa propriedade é favorecida quando adicionamos à matriz compósitos como beta-tricálcio-fosfato e hidroxiapatita.

O colágeno apresenta muitas vantagens como biomaterial. Ele pode ser preparado em diferentes formas como membranas, filmes e esferas. No entanto, seu custo de purificação é extremamente alto e, quando isolado, apresenta alguma variabilidade quanto ao tamanho das fibras, impurezas e densidade de ligações cruzadas que estabilizam a estrutura de suas fibrilas<sup>36</sup>.

Kozlovsky et al.<sup>37</sup>, recomendam o uso da membrana em dupla camada, que poderia favorecer a ação de barreira e, talvez, alterar o padrão de reabsorção. Nesse sentido, Kim et al.<sup>38</sup> em estudo em calvária de coelhos, e membrana Bio-Gide® realizaram três grupos experimentais: bloco sem membrana, bloco com uma camada de membrana, e com duas camadas de membrana. Depois de dois, quatro e seis meses de reparo, as amostras estavam preparadas; em cada período, o padrão global de reabsorção da membrana e do enxerto ósseo foi examinado histologicamente, e a forma externa sustentada de osso enxertado foi medida em análise histomorfométrica. Os resultados demonstraram que a membrana de colágeno utilizada pode reduzir a reabsorção óssea do enxerto. Além disso, a técnica de dupla camada usando membranas de colágeno pode melhorar a eficácia da técnica de enxerto de osso em bloco onlay, em termos de reabsorção óssea e em comparação com uma membrana de colágeno de camada única.

As pesquisas na área de biomateriais vêm recebendo cada vez mais investimentos através dos anos e grandes expectativas são depositadas para garantir o perfeito conhecimento das propriedades das membranas para atingir uma desejável ROG dos defeitos ósseo periodontais. Neste estudo, podemos observar que a membrana de colágeno porcino teve um excelente comportamento em defeitos críticos no processo de regeneração óssea guiada.

## **6 CONCLUSÃO**

A membrana de colágeno porcino é um material biocompatível e permitiu a regeneração óssea guiada de defeitos críticos em calvária de ratos.

## REFERÊNCIAS

1. Lekholm U, Adell R, Lindhe J, *et al.* Marginal tissue reactions atosseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. *Int J Oral and MaxillofacSurg* 1986; 15:53-61.
2. Genco RJ, Cohen DW, Goldman HM. *Periodontia contemporânea*. 3ª ed. São Paulo: d. Santos; 1999
3. Seeman, E. Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. *OsteoporosInt*, v. 14 Suppl 3, p. S2-8, 2003.
4. Hillner, B. E. *et al.* American Society of Clinical Oncology 2003 update on the role of bisphosphonates and bone health issues in women with breast cancer. *J Clin Oncol*, v. 21, n. 21, p. 4042-57, Nov 2003. ISSN 0732-183X.
5. Wallace, S. S. *et al.* 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*, v. 25, n. 6, p. 551-9, Dec 2005. ISSN 0198-7569.
6. Hansen, P. J. *et al.* Incidence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) in patients taking bisphosphonates for osteoporosis treatment - a grossly underestimated risk? *Clin Oral Investig*, v. 17, n. 8, p. 1829-37, Nov 2013. ISSN 1436-3771.
7. Sims, N. A. *et al.* Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone*, v. 30, n. 1, p. 18-25, Jan 2002. ISSN 8756-3282.
8. Brunel G, Benqué E, Elharar F, Sansac C, Duffort JF, Barthet P, *et al.* Guided bone regeneration for immediate non-submerged implant placement using bioabsorbable materials in Beagle dogs. *ClinOrallImplants Res*. 1998 Oct;9(5):303-12.
9. Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials*. 1997 Apr;18(7):535-8.
10. Marão HF. *et al.* Guided bone regeneration with demineralized bovine bone matrix on experimental bone defects in dogs. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac*, v. 14, n. 2, p. 86-90, 2011.
11. Matchei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. *Journal of Periodontology*, v.72, n.4, p.512-516, Apr. 2001

12. Hirbe A. C. et al. The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. *Bone*, v. 44, n. 5, p. 908-16, May 2009. ISSN 1873-2763.
13. Perez EA, Weilbaecher K. Aromatase inhibitors and bone loss. *Oncology (Williston Park)*, v. 20, n. 9, p. 1029-39; discussion 1039-40, 1042, 1048, Aug 2006. ISSN 0890-9091.
14. Lefevre J, MCclintock MK. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *BiolReprod*, v. 38, n. 4, p. 780-9, May 1988. ISSN 0006-3363.
15. Bestetti GE. et al. Functional and morphological changes in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis of aged female rats. *BiolReprod*, v. 45, n. 2, p. 221-8, Aug 1991. ISSN 0006-3363.
16. Matt DW. et al. Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in aging rats. *BiolReprod*, v. 34, n. 3, p. 478-87, Apr 1986. ISSN 0006-3363.
17. Faria PE. et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Implants Res*, v. 19, n. 4, p. 393-401, Apr 2008. ISSN 1600-0501.
18. Alvarez O. et al. Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous ulcers: results of a single center randomized study involving 24 patients. *Mater SciEng C Mater Biol Appl*. 2004
19. \_\_\_\_\_. Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: Results of a single center randomized study involving 24 patients. *Wounds*. 16 2004.
20. Kowalska-Ludwicka K. et al. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. *Arch Med Sci*, v. 9, n. 3, p. 527-34, Jun 2013. ISSN 1734-1922.
21. Helenius G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*, v. 76, n. 2, p. 431-8, Feb 2006. ISSN 1549-3296.
22. Böstman OM. Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants. *J Bone Joint Surg Br*, v. 73, p. 679-682, 1991.
23. Schlegel AK. et al. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bioguide). *Biomaterials*, v. 18, p. 535-38, 1997.
24. Buser D. 20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry. 2ht. ed. Chicago: Quintessence, 2010.
25. Góes AM, Oréface, RL, Bretas RSB, Ribeiro Neto WA, Pereira IHL, Ayres E. C. et al. Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of

biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth. *Electrospinning, characterization and cell viability. Polymer Degradation and Stability*, v. 97, p. 2037e2051, 2012.

26. Buser D. 20 anos de regeneração óssea guiada na implantodontia. Quintessence Editora, 2ª edições, São Paulo/SP, 2010, 261p.

27. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: A histologic study in canine mandible. *Int. J. Oral maxillofac Implants*. 1994;9(1):13-29

28. Schimitz, J.; Hollinger, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, Nova York, v.205, p.299-308, apr. 1986.

29. Shimitz, J.P. et. al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat*, v. 138, n. 3, p. 185–192, 1990.

30. Werkmeister JA and Ramshaw JA. Collagenbased biomaterials. *Clin Mater*. 1992;9:137- 138.

31. Friess W. Collagen-biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998;45:113-136

32. Sano A, Hojo T, Maeda M, Fujioka K. Protein release from collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;31:247-266

33. Maeda M, Tani S, Sano A, Fujioka K. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. *J Control Release*. 1999;62:313-324.

34. Du EJ, Cui FZ, Zhu XD, De Groot K. Three-dimensional nanoHAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *Biomed. Mater. Res.*, v. 42, p. 540-548, 1999.

35. Wagner-Ecker M, Voltz P, Egermann M, Richter W. The collagen component of biological bone graft substitutes promotes ectopic bone formation by human mesenchymal stem cells. *ActaBiomater.*, v. 9, p. 7298–7307, 2013.

36. Werkmeister JA, Ramshaw JA. Collagen-based biomaterials. *Clin. Mater.*, v. 9, n. 3-4, p.137-138, 1992.

37. Kozlovsky A, Aboodi G, Moses O, Tal H, Artzi Z, Weinreb M, et al. Biodegradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide) applied in a double-layer technique in rats. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20: 1116-23.

38. Kim SH, Kim DY, Kim KH, Ku Y, Rhyu IC, Lee YM. The efficacy of a double-layer collagen membrane technique for overlaying block grafts in a rabbit calvarium model. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Oct;20(10):1124-32.