



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

GUILHERME ANDRÉ DEL’ ARCO RAMIRES

**Avaliação do reparo ósseo comparando tamanhos
diferentes de defeitos críticos. Análise histológica,
histométrica e imunohistoquímica.**

Araçatuba – SP

2016

GUILHERME ANDRÉ DEL' ARCO RAMIRES

**Avaliação do reparo ósseo
comparando tamanhos diferentes de
defeitos crítico. Análise histológica,
histométrica e imuno-histoquímica.**

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 Graduado
em Odontologia.

Orientador: Prof. Assist. Dra. Ana Paula Farnezi
Bassi

Araçatuba – SP

2016

A Mariah Campos Ramires, minha filha que está apenas com 5 meses de idade, após seu nascimento mudou minha vida e em mim fez nascer um sentimento inexplicável, que parece ser coisa de outro mundo, hoje posso dizer o que antes não entendia quando me diziam que a sensação de ser pai não tem comparação. Ela foi a motivação que me faltava para correr atrás de coisas que há muito já havia deixado de lado e mesmo na dificuldade da situação, por ainda estar terminando a faculdade e começar agora a vida profissional, sempre que olho para seu rostinho todo risonho vejo o quanto tudo está valendo a pena.

A minha família que mesmo com todas as dificuldades vividas, sempre me apoiaram em todas as decisões tomadas, sempre me deram suporte quando precisei. A eles eu só posso oferecer minha gratidão por tudo que sempre fizeram por mim, mesmo nos momentos de mais dificuldade. MUITO OBRIGADO! AMO TODOS VOCÊS!

A Marília Campos Martins, minha namorada e companheira de todas as horas, agradeço muito por todo apoio que me deu quando não pude recorrer a minha família, pela ajuda que me deu em superar muitos obstáculos nessa caminhada até aqui, ou seja, por ser meu braço e perna direita desde que a conheci. E agradeço principalmente por ter me dado o maior presente que um homem pode receber, que é o da paternidade. MUITO OBRIGADO! TE AMO!

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais essa conquista em minha vida.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, por toda infraestrutura do campus e todo conhecimento fornecido pelos docentes, em resumo pela experiência única que é aprender com tantos nomes de peso tanto dentro como fora do país, numa universidade de ponta com equipamentos de última geração.

À Profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi por ter me acolhido em suas pesquisas e projetos de extensão, por todo apoio e orientação. Por todo ensinamento passado, os puxões de orelha nas horas necessárias, imagino que não seja fácil lidar com estagiários de graduação. Por ter sido flexível quando precisei pois muitas vezes não compareci esse ano pois estive cuidando da minha filhinha.

À Carulina, que me indicou para estagiar na cirurgia, na época fazia mestrado na implantodontia, e me ajudou muito em todo desenvolvimento nas pesquisas realizadas.

Aos professores que compõem a banca examinadora, por terem disponibilizado esse tempo para estarem presentes na apresentação.

A Tamires por toda força durante o tempo de estágio, tanto nas pesquisas quanto em projeto de extensão.

A família e amigos, por todo apoio.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

RESUMO

Atualmente, há controvérsia na literatura sobre qual é a dimensão e localização mais adequada de um defeito de calvária a ser considerado como crítico. Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar por meio de avaliação histométrica, histológica e imunohistoquímica o tamanho ideal de defeitos ósseos para cavidades críticas comparando defeitos de 5 e 8mm em calvária de ratos. E ainda avaliou se esses defeitos considerados críticos sofrem influência no reparo quando associado à uma membrana de colágeno porcino. Foi avaliado os defeitos de 5 e 8mm nos períodos de 7, 30 e 60 dias em ratos, com e sem regeneração óssea guiada (**Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland**). Como resultado tivemos na análise histométrica reparação parcial em todos os grupos com maior porcentagem de neoformação óssea nos tratados com biomaterial. Concluímos que tanto os defeitos de 5mm quanto 8mm podem ser considerados críticos pelo fato de não repararem espontaneamente sem intervenção clínica, e a escolha de qual dimensão apropriada dependera do material a ser estudado. Ainda que a membrana de colágeno porcino auxilia no reparo do defeito ósseo, porém não é o suficiente para reparar toda a extensão do defeito ósseo em ambas as dimensões.

Palavras chave: Biomateriais, Defeito Critico, Membrana, Regeneração Óssea

ABSTRACT

Currently, there is controversy in the literature about the most appropriate size and location of a calvarial defect to be considered as critical. Therefore, the aim of this study was analyze through histometric, histologic and immunohistochemistry the ideal size bone defects for critical cavities comparing 5 and 8mm defects in skulls of mice. And yet assessed whether these critics said defects are influenced in the repair when associated with one porcine collagen membrane. It evaluated 5 and 8mm defects on periods 7, 30 and 60 days in rats with and without guided bone regeneration (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland). As a histometric result we noted partial repair analysis in all the groups with the highest percentage of new bone formation in the treated biomaterial. We conclude that both 5mm and 8mm defects can be considered critical because it does not repair spontaneously without medical intervention, and the choice of which appropriate size will depend on the material being studied, and although the porcine collagen membrane helps in the repair of the bone defect, but it is not enough to fix the entire length of the bone defect in both dimensions.

Keywords: Bone Repair, Membrane, Bone regeneration, Biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	Membrana de colágeno porcino	15
Figura 02 –	Corte longitudinal do centro da calvária representado pela linha tracejada em azul. Defeito ósseo de 5mm de diâmetro criado nos dois lados da calvária.	16
Figura 03 –	A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Trefina de 8mm. C. Remoção da cortical da região de calvária. D. Defeitos ósseos de 5mm em região de calvaria. E. Sobreposição de Membrana Bio-Gide em defeito de 5mm em região de calvaria de rato. F. Trefina 5mm.	17
Figura 04 –	Grupo Coagulo 7 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.	20
Figura 05 –	Grupo Coagulo. 7 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.	20
Figura 06 –	Grupo Controle. 30 dias. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Neoformação óssea próximo aos cotos em direção ao centro do defeito.	21
Figura 07 –	Grupo Coagulo. 30 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Neoformação óssea próximo aos cotos em direção ao centro do defeito e neoformação óssea no centro do defeito (setas pretas).	21
Figura 08 –	Grupo Coagulo(GC). Coto direito. 30 dias 8mm. 40X de aumento. Discreta neoformação indicada pela seta.	22
Figura 09 –	Grupo Coagulo (GC). Centro do defeito. 30 dias. 8mm. 40x de aumento. Ausência de crescimento ósseo. Formação de tecido conjuntivo fibroso (T.C).	22
Figura 10 –	Grupo Controle (GC). Coto esquerdo. 30 dias. 8mm 40X de aumento. Discreta neoformação indicada pela seta.	22
Figura 11 –	Grupo Coagulo(GC). Coto direito. 30 dias 5 mm. 40X de aumento. Discreta neoformação indicada pela seta.	22
Figura 12 –	Grupo Coagulo (GC). Centro do defeito. 30 dias. 5mm. 40x de aumento. Formação de tecido conjuntivo fibroso indicada pelo asterisco e neoformação óssea indicada pela seta.	22

Figura 13 –	Grupo Coagulo (GC). Coto esquerdo. 30 dias. 5mm 40X de aumento. Discreta neoformação indicada pela seta.	22
Figura 14 –	Grupo Coagulo. 60 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Tecido ósseo neoformado próximo aos cotos. Área central preenchido por tecido conjuntivo.	23
Figura 15 –	Grupo Coagulo. 60 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Tecido ósseo neoformado próximo aos cotos. Área central preenchido por tecido conjuntivo.	23
Figura 16 –	Grupo BG. 7 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.	24
Figura 17 –	Grupo BG. 7 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.	24
Figura 18 –	Grupo BG. 30 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.	25
Figura 19 –	Grupo BG. 30 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.	25
Figura 19A–	Grupo BG. Coto esquerdo. 30 dias. 8mm. 12.5X de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) seta azul.	26
Figura 19B–	Grupo BG. Coto direito. 30 dias. 8mm. 12.5X de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso.	26
Figura 19C–	Grupo BG. Centro do defeito. 30 dias. 8mm. 12.5x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), membrana remanescente (seta azul).	26
Figura 20 –	Grupo BG. Centro do defeito. 30 dias. 5mm. 12.5x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), membrana remanescente (seta azul).	26

Figura 21 –	Grupo BG. Coto direito. 30 dias. 5mm. 12.5X de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta) do coto, presença de tecido conjuntivo fibroso (TC) (seta amarela).	26
Figura 22 –	Figura 22 – 60 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Neoformação óssea dos cotos em direção a porção central. Área central preenchido por tecido conjuntivo.	27
Figura 23 –	60 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Neoformação óssea dos cotos em direção a porção central. Remanecente de membrana ao redor do osso neoformado (seta amarela).	27
Figura 24 –	Área óssea neoformada (média) comparando os Grupos Coagulo (GC) 5mm e 8mm nos períodos de 7, 30 e 60 dias.	28
Figura 25 –	Área óssea neoformada (média) comparando os grupos Coagulo (GC) e Bio-Gide (GBG) com diferentes tamanhos de defeitos e períodos de 7, 30 e 60 dias.	29
Figura 26 –	Grupo BG - 7dias - 8mm – Região de coto esquerdo de defeito crítico e marcação de proteína VEGF moderada (seta preta).	30
Figura 27 –	Grupo BG - 7dias - 5mm – Região de coto esquerdo de defeito crítico e marcação de proteína VEGF moderada (seta preta).	30
Figura 28 –	Grupo BG - 30dias - 8mm - Região de coto esquerdo de defeito crítico e marcação de proteína VEGF moderada (seta preta).	30
Figura 29 –	Grupo BG - 30dias - 5mm - Região de coto esquerdo de defeito crítico e marcação de proteína VEGF moderada (seta preta).	30

LISTA DE ABREVIATURAS

FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GC	Grupo Coágulo
GBG	Grupo Bio-Gide
BG	Bio-Gide
HE	Hematoxilina e Eosina
g	Gramas
mm	Milímetros
ml	Mililitros
Kg	Quilogramas
cm	Centímetros
°C	Graus Celcius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PROPOSIÇÃO	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Amostras	14
3.2	Cirurgia Experimental	15
3.3	Processamento das Peças	17
3.4	Análise Histológica	17
3.5	Análise Histométrica e Estatística	18
3.6	Análise Imunohistoquímica	19
4	RESULTADOS	20
4.1	Análise Histológica (morfologia)	20
4.1.1	<i>Grupo Coágulo (GC) 5 E 8mm- Sem membrana</i>	20
4.1.2	<i>Grupo de (Bio-Gide® (Geistlich Wolhusen, Switzerland) (BG) 5 E 8mm – Com membrana</i>	24
4.2	Análise Histométrica e Estatística	28
4.2.1	Análise dos Defeitos	28
4.2.2	Análise do Biomaterial	29
4.3	Imuno-histoquímica	30
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÃO	34
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

Por muito tempo as pessoas procuraram a melhor forma de substituir os elementos dentários e, em 1984, Bränemark, conseguiu a comprovação da osseointegração por meio dos implantes de titânio, que apresentavam melhores propriedades físicas e biológicas. Desde então foram desenvolvidos implantes ósseointegráveis (Bränemark *et al.*, 1977).

Porém muitos pacientes não possuem quantidade óssea suficiente para instalação dos implantes osseointegráveis em posição adequada, o que compromete o aspecto estético e funcional da reabilitação protética. A partir disso vários estudos se iniciaram em busca da melhor maneira de substituição óssea. Basicamente, um substituto ósseo deve ter propriedades osteoindutoras, osteocondutoras e osteogênicas. O padrão ouro para regeneração óssea ainda são os enxertos autógenos, porém, apresentam efeitos adversos como maior morbidade, quantidade insuficiente, entre outros. Entre as várias tentativas de um biomaterial osteoindutor e osteocondutor como o osso autógeno, surgiu a regeneração óssea guiada, que permite o crescimento do tecido ósseo seletivo em um espaço mantidos por barreiras de tecido, ou seja, membranas absorvíveis ou não absorvíveis (34, 13).

Assim, diferentes biomateriais e técnicas cirúrgicas têm sido sugeridas para regenerar os defeitos e conseqüentemente modelos experimentais pré-clínicos têm sido amplamente utilizados para investigar suas aplicabilidades. Os defeitos críticos em calotas cranianas de ratos são considerados o modelo experimental mais utilizado na literatura para avaliação de reparo ósseo. O termo "Defeito Crítico" foi primeiramente definido como "o menor tamanho de uma ferida intra-óssea que não cicatrize espontaneamente durante a vida do animal em particular" (7). No entanto, pelo fato de a maioria dos estudos pré-clínicos terem um limite de tempo para avaliação, o termo foi redefinido como "o defeito de tamanho crítico em animais refere-se ao tamanho de um defeito que não irá curar ao longo da duração do estudo". (8, 9)

É importante a definição do defeito crítico para o sucesso dos estudos com biomateriais que auxiliam na neoformação óssea, como os que proporcionam a regeneração óssea guiada, ou seja, as barreiras teciduais, também chamadas de membranas. Estas servem como suporte do crescimento celular por possuir uma estrutura que permite crescimento, proliferação, migração e diferenciação de tecidos

específicos para uma futura implantação (10). As membranas podem ser ou não biodegradáveis e possuir propriedades hidrofílicas, químicas, físicas e mecânicas necessárias para permitir o crescimento celular (11).

O Geistlich Bio-Gide® é uma membrana não reticulada de colágeno que é extremamente semelhante membranas humanas de colágeno (33). Vasculariza-se homogeneamente durante o processo de cicatrização (12, 13, 14) e levando a uma boa integração da membrana com o tecido adjacente. Composta por duas camadas, previne invaginação de tecido mole para interior do defeito, e guia para regeneração óssea (36); Apresenta dupla função - Excelente cicatrização: alta biocompatibilidade e menor deiscência se comparado a membranas reticuladas (37); Regeneração óssea incólume: inicia-se com um coágulo de sangue e em algumas semanas é convertido em tecido osteóide (41).

Durante a fase inicial de cicatrização, a membrana garante formação óssea eficiente, estabiliza a região aumentada, previne migração de partículas e auxilia formação do coágulo. Pode-se obter assim, mais osso e em qualidade superior (42, 41), conduzindo maior sobrevida do implante (13, 38, 39, 40)

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho é avaliar a formação óssea em dois tamanhos de defeitos ósseos: 5 e 8mm, com uso de membrana Geistlich Bio-Gide® associado ao coágulo sanguíneo, comparando com defeitos da mesma dimensão apenas preenchido com coágulo como o processo de reparo ocorre.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa esse projeto foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da FOA sob o número FOA 0966-2015.

3.1. Amostras

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram utilizados um total de 45 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em três grupos (n=15 por grupo, os quais o grupo 5mm foram divididos aleatoriamente em 2 grupos equitativos), e submetidos à eutanásia em três momentos do experimento, aos 7, 30 e 60 dias após a cirurgia. Estes 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, os grupo coágulo e Bio-Gide, foram divididos em 4 grupos , como discriminado a seguir:

- Grupo Coágulo (GC) – 5mm n= 15 (pareado com GBG – 5mm): Foram realizados dois defeitos em 1 único animal sendo que o lado direito foi preenchido com coágulo sanguíneo e 5 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise;
- Grupo Coágulo(GC) – 8mm n= 15: O defeito ósseo de 8mm foi preenchido com coágulo sanguíneo sendo 5 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise;
- Grupo Bio-Gide (GBG) (Bio-Gide[®], Geistlich Wolhusen, Switzerland) – 5mm n= 15 (pareado com GC – 5mm): Foram realizados dois defeitos em 1 único animal sendo que o lado esquerdo foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino, 5 ratos foram submetidos à eutanásia em cada período para a análise;
- Grupo Bio-Gide (GBG) (Bio-Gide[®], Geistlich Wolhusen, Switzerland) – 8mm n= 15: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino sendo 5 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise.



Figura 01. Membrana de colágeno porcino

3.2. Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. 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 linear 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) (Figura 3.A). Em seguida com auxílio de brocas trefinas de 5 e 8mm (Figura 3.B e 3.F) de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foram confeccionado os defeitos cirúrgicos de 5 e 8mm de diâmetro, sendo que foram realizados dois defeitos na calvaria do mesmo animal quando utilizado a trefina de 5mm (Figura 2) e na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital quando usado trefina de 8mm, mantendo-se a

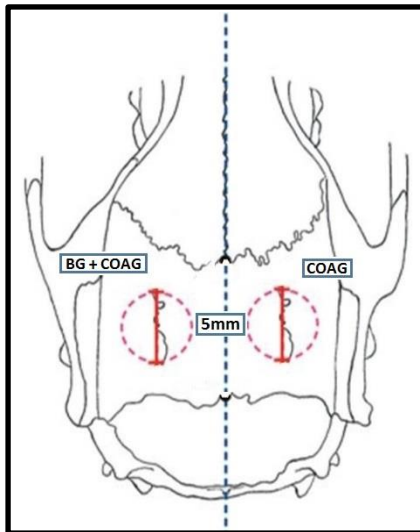


Figura 02. Corte longitudinal do centro da calvária representado pela linha tracejada em azul. Defeito ósseo de 5mm de diâmetro criado nos dois lados da calvária.

integridade da dura-máter (Figura 3.C e 3.D). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre um dos defeitos no grupo de 5mm colocado uma membrana de colágeno porcino (Grupo Bio-Gide® – n=30) (Figura 3.E).

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.

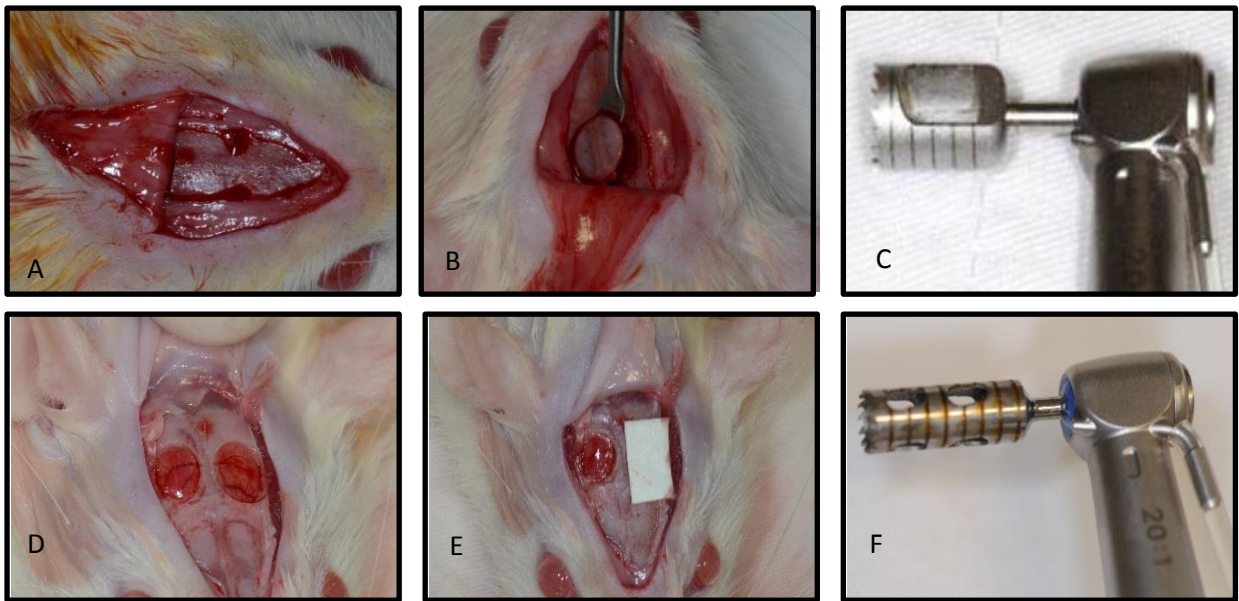


Figura 03. A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Remoção da cortical da região de calvária. C. Trefina de 8mm. D. Defeitos ósseos de 5mm em região de calvaria. E. Sobreposição de Membrana Bio-Gide em defeito de 5mm em região de calvaria de rato. F. Trefina 5mm.

3.3. Processamento das Peças

As calvárias dos ratos serão 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 serão reduzidas de forma em que permanecerão no corte apenas os dois defeitos realizados anteriormente. As peças obtidas serão incluídas em parafina separadamente e receberão cortes de 6 μ m de espessura e serão montadas em lâminas. As lâminas serão separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

3.4. Análise Histológica

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

3.5. Análise Histométrica e Estatística

Mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (Leica R DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (Leica R DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland). Essas imagens foram armazenadas como figuras (JPEG), e foram analisadas no programa Image J (NIH, Bethesda, ML, USA). Foi avaliada a área total do defeito ósseo e área de neoformação óssea. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos de pixels, para valores percentuais para permitir a aplicação do teste estatístico.

A análise estatística foi realizada utilizando o software Sigma Plot 12.0 (San Jose, CA, EUA), seguindo um padrão de trabalhos prévios (18, 25, 26). A análise compara 2 defeitos com dimensões diferentes em 3 períodos (7, 30 e 60 dias) e grupo coágulo com grupo de biomaterial com as mesmas dimensões. Foi realizada utilizando análise de variância a dois critérios, após ter se realizado teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e teste de igualdade de variância. A análise específica do grupo BiO-Gide (7, 30 e 60 dias) foi realizada utilizando análise de variância após ter se realizado teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e teste de igualdade de variância. Análises dos períodos de tempo foram realizadas utilizando o teste t pareado e empregou-se o teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Para todas as análises, o teste Tukey foi utilizado como pós-teste. Adotou-se um nível de significância de $p < 0,05$.

3.6. Análise Imunohistoquímica

Foi realizada a inibição da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, a recuperação antigênica com tampão citrato a 60°C por 20 minutos, e o bloqueio das reações inespecíficas com leite desnatado e albumina bovina durante as incubações dos anticorpos. Foram utilizados o anticorpo primário contra VEGF (fator de crescimento vascular endotelial). Ao término das reações foi realizada a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Harris. Foram realizados controles negativos (pela omissão dos anticorpos primários) para evitar a análise de falsos positivos.

A análise será realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) e a intensidade das imunomarcações será determinada semiquantitativamente, com escores de 1 a 4, sendo 1 para ausência de imunomarcação e 4 para marcação intensa.

4. RESULTADOS

4.1. Análise Histológica (morfologia)

Os resultados foram avaliados por meio de microscópio óptico com padronização da leitura das lâminas do grupo controle, e grupo Bio-Gide (Bio-Gide® Geistlich Wolhusen, Switzerland).

4.1.1. GRUPO COAGULO (GC) 5 E 8mm- Sem membrana

7 dias: A citoarquitetura das secções microscópicas aos 7 dias para os defeitos a presença de membranas mostrou hipervascularização no osso neoformado e já com a presença de atividade fibroblástica (Figura 04 – 5mm; Figura 05 – 8mm).

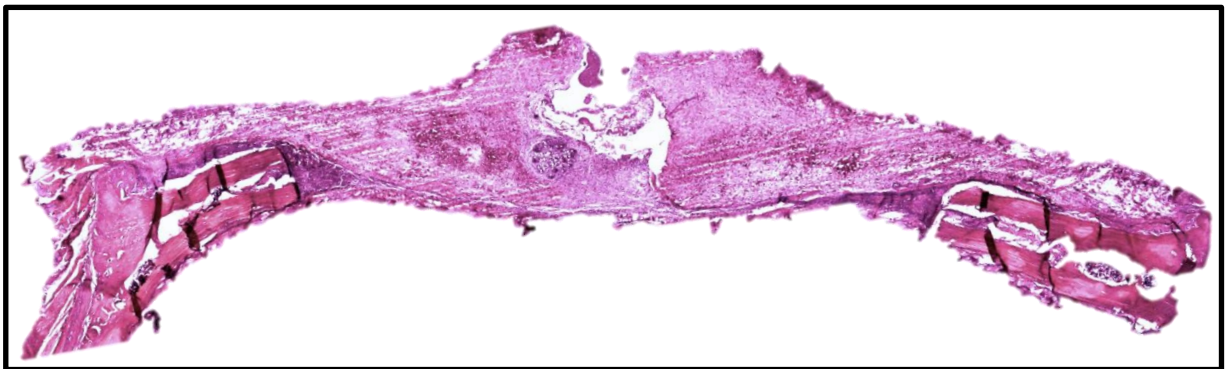


Figura 04. Grupo Coagulo 7 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.



Figura 05. Grupo Coagulo. 7 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.

30 dias: No período de 30 dias do defeito de 8mm (Figura 06), o Grupo coágulo apresentava uma área óssea neoformada maior próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes estava preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado.



Figura 06. Grupo Coágulo. 30 dias. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Neoformação óssea próximo aos cotos em direção ao centro do defeito.

No período de 30 dias do defeito de 5mm (Figura 07), o Grupo Coagulo também apresentava uma área óssea neoformada maior próximo aos cotos do defeito, porém, O espaço entre estes estava preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado e pode ser observado pequenas ilhas de osso neoformado (Figura 07).

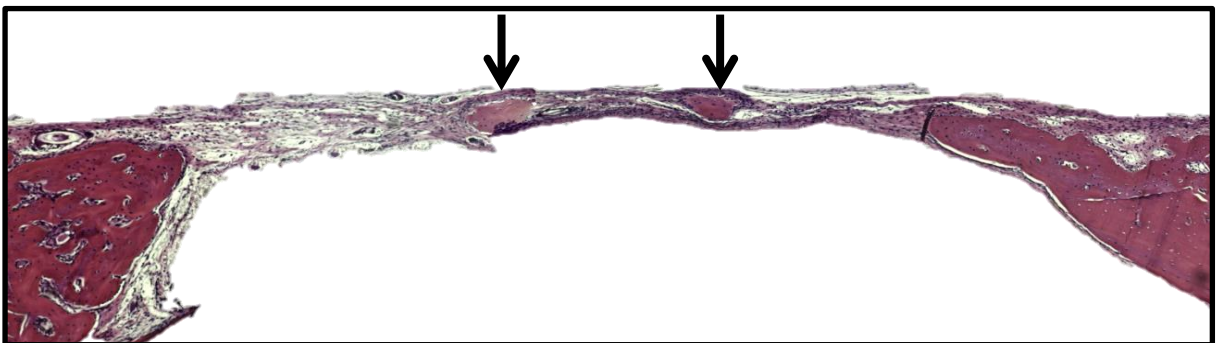


Figura 07. Grupo Coagulo. 30 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Neoformação óssea próximo aos cotos em direção ao centro do defeito e neoformação óssea no centro do defeito (setas pretas).

No grupo Coagulo 30 dias. 8mm. observa-se no aumento de 40x a área de osteotomia com os cotos ósseos esquerdo (Figura 08) e direito (Figura 10) com discreta neoformação óssea em suas margens. Ao centro do defeito crítico, entre os cotos, é possível notar ausência de neoformação óssea com o defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Figura 09).

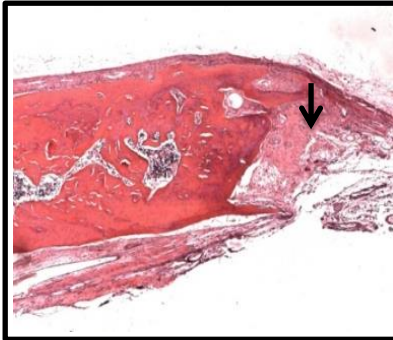


Figura 08. Grupo Coagulo(GC). Coto direito. 30 dias 8mm. 40X de aumento. Discreta neoformação indicada pela seta.



Figura 09. Grupo Coagulo (GC). Centro do defeito. 30 dias. 8mm. 40x de aumento. Ausência de crescimento ósseo. Formação de tecido conjuntivo fibroso (T.C).

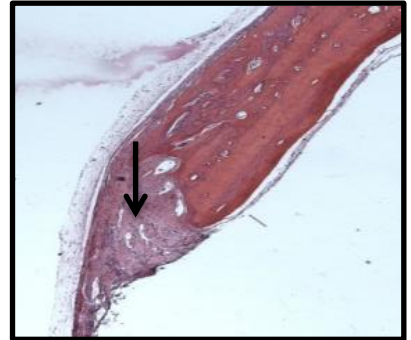


Figura 10. Grupo Coágulo (GC). Coto esquerdo. 30 dias. 8mm 40X de aumento. Discreta neoformação indicada pela seta.

No grupo Coagulo 30 dias. 5mm. observa-se no aumento de 40x a área de osteotomia com os cotos ósseos esquerdo (Figura 11) e direito (Figura 13) com discreta neoformação óssea em suas margens. Ao centro do defeito crítico, entre os cotos, é possível notar presença de neoformação óssea e tecido conjuntivo fibroso (Figura 12).

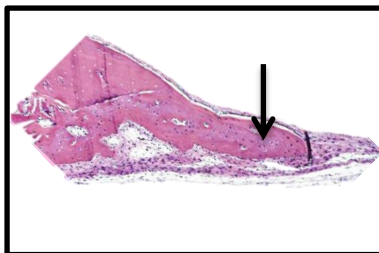


Figura 11. Grupo Coagulo(GC). Coto direito. 30 dias 5 mm. 40X de aumento. Discreta neoformação indicada pela

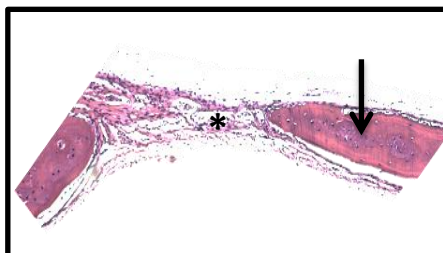


Figura 12. Grupo Coagulo (GC). Centro do defeito. 30 dias. 5mm. 40x de aumento. Formação de tecido conjuntivo fibroso indicada pelo asterisco e neoformação óssea indicada pela seta.

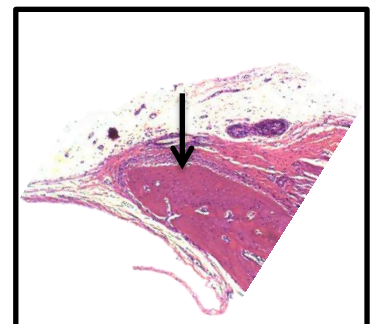


Figura 13. Grupo Coagulo (GC). Coto esquerdo. 30 dias. 5mm 40X de aumento. Discreta neoformação indicada

60 Dias: No período de 60 dias 8mm (Figura 14) e 5mm (Figura 15) do grupo Coagulo observou-se uma maior aproximação dos cotos do defeito, contudo, tendo fechado parcialmente. No espaço que ainda restava foi possível observar um tecido conjuntivo fibroso.



Figura 14. Grupo Coagulo. 60 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Tecido ósseo neoformado próximo aos cotos. Área central preenchido por tecido conjuntivo.

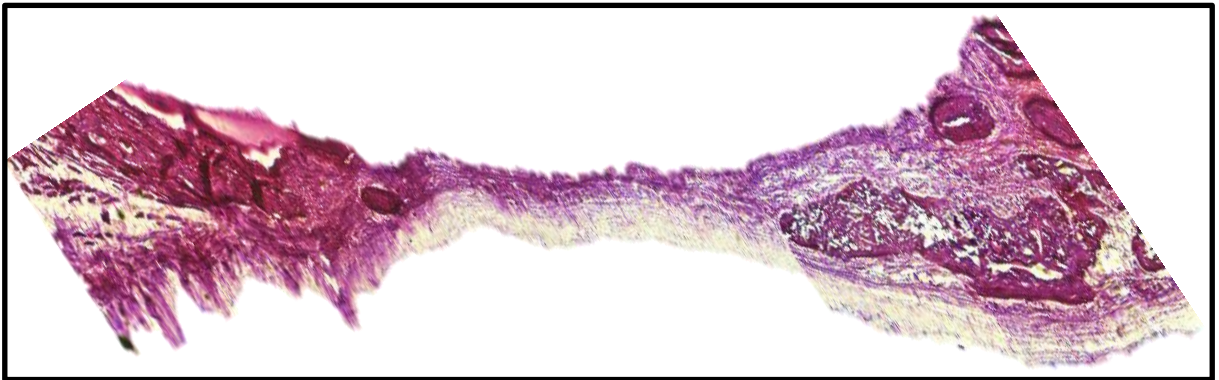


Figura 15. Grupo Coagulo. 60 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Tecido ósseo neoformado próximo aos cotos. Área central preenchido por tecido conjuntivo.

4.1.2. GRUPO Bio-Gide® (Geistlich Wolhusen, Switzerland) (GBG) 5 E 8mm – Com membrana

7 Dias: Nota-se a presença da membrana de colágeno porcino em todo defeito preenchido por um tecido altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório nos grupos Bio-Gide 5mm e 8mm (Figura 16 e 17).

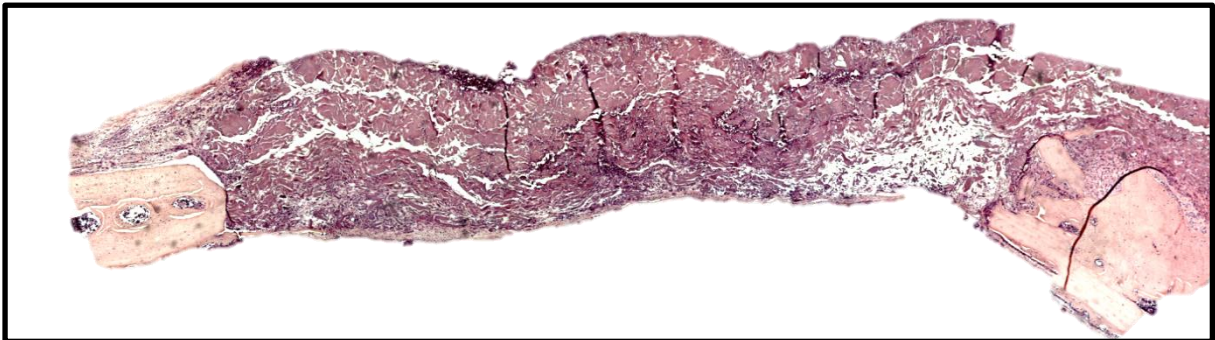


Figura 16. Grupo BG. 7 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.

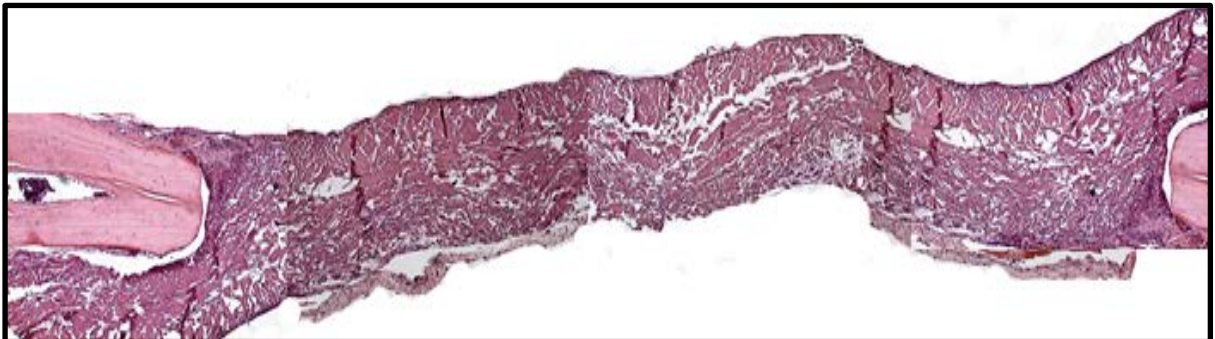


Figura 17. Grupo BG. 7 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.

30 Dias: No tempo operatório de 30 dias em ambos os defeitos nota-se uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide®* - Geistlich Wolhusen, Switzerland) (Figura 18 e 19).

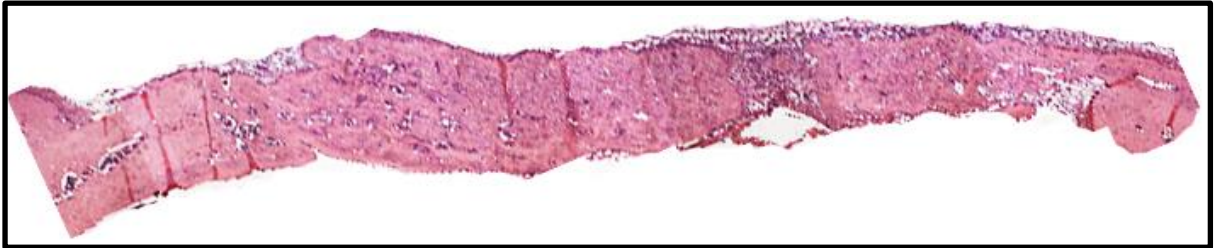


Figura 18. Grupo BG. 30 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.

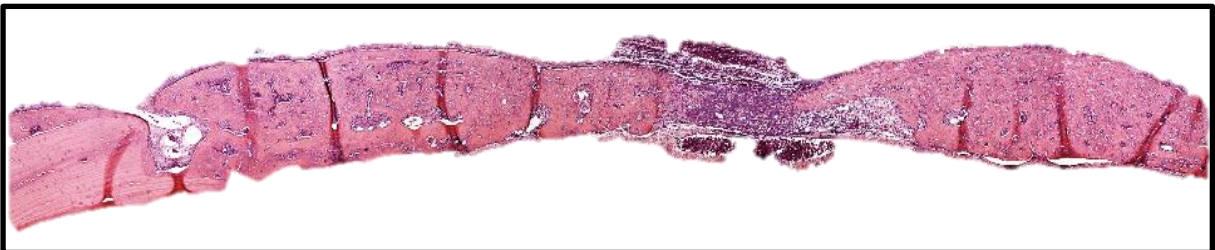


Figura 19. Grupo BG. 30 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Defeito preenchido por tecido conjuntivo. Início de neoformação óssea próximo aos cotos.

Na observação das lâminas em um aumento de 12.5X e 25X nota-se a presença de neoformação óssea a partir dos cotos ósseos e no centro do defeito, com a imagem mostrando remanescente da membrana entre a área de tecido ósseo neoformado e o tecido conjuntivo organizado sobre a membrana remanescente (Figuras 19 A, B e C).

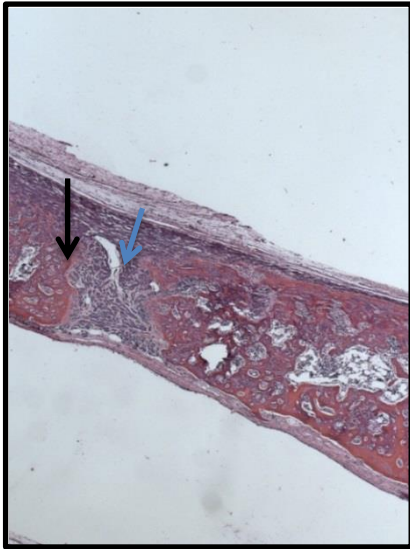


Figura 19.A. Grupo BG. Coto esquerdo. 30 dias. 8mm. 12.5X de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) seta azul.

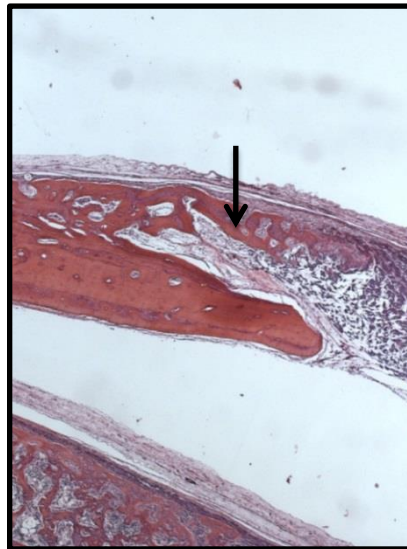


Figura 19.B. Grupo BG. Coto direito. 30 dias. 8mm. 12.5X de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso.

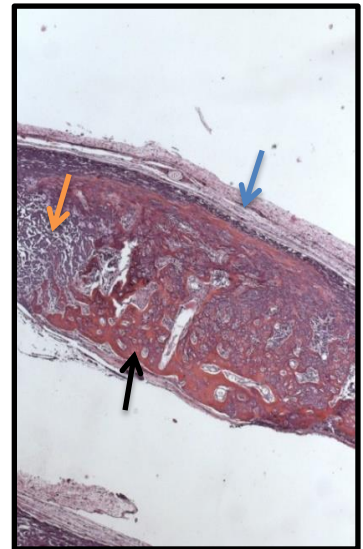


Figura 19.C. Grupo BG. Centro do defeito. 30 dias. 8mm. 12.5x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), membrana

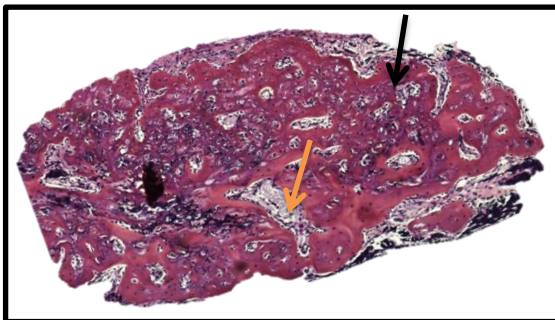


Figura 20. Grupo BG. Centro do defeito. 30 dias. 5mm. 12.5x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta laranja).



Figura 21. Grupo BG. Coto direito. 30 dias. 5mm. 12.5X de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta) do coto, presença de tecido conjuntivo fibroso (TC) (seta laranja), membrana remanescente (seta azul).

60 Dias: O grupo BG 8mm de 60 dias, tem a imagem da neoformação óssea no coto esquerdo, coto direito e centro do defeito semelhantes às dos animais sacrificados com 30 dias, mas com imagem mais nítida de tecido ósseo neoformado preenchendo praticamente toda a cavidade (Figura 22), assim como grupo BG 5mm (Figura 23). Verifica-se também a presença de membrana remanescente (Figura 23).

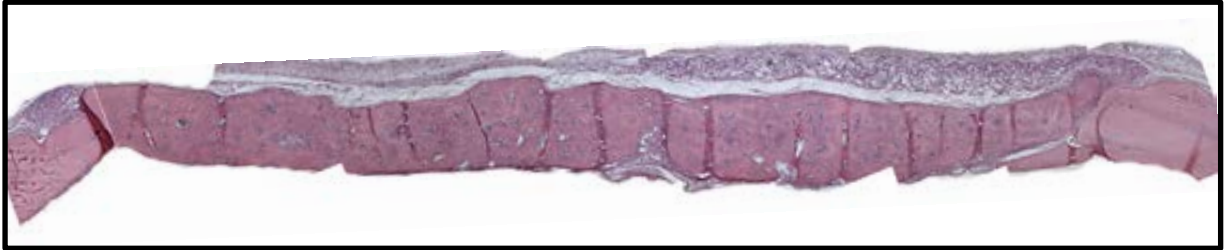


Figura 22. Grupo BG. 60 dias. 8mm. HE – imagem panorâmica. Neoformação óssea dos cotos em direção a porção central. Área central preenchido por tecido conjuntivo.

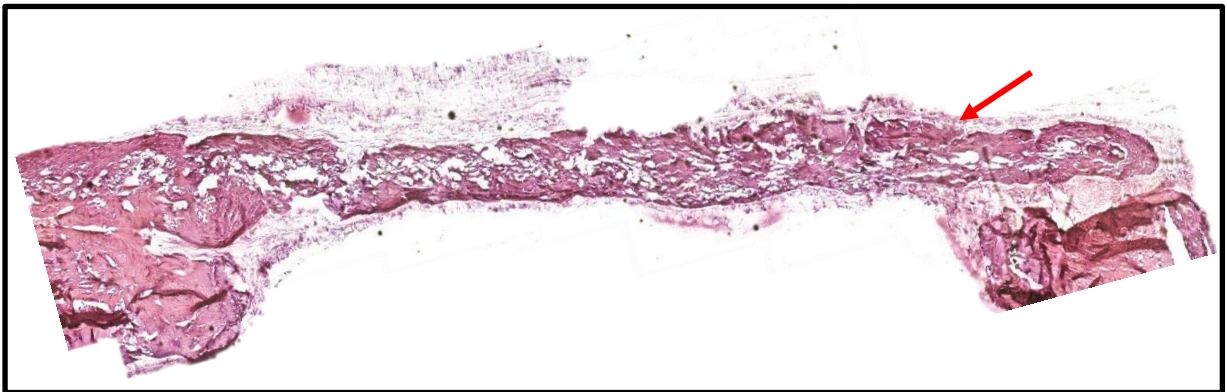


Figura 23. Grupo BG. 60 dias. 5mm. HE – imagem panorâmica. Neoformação óssea dos cotos em direção a porção central. Remanecente de membrana ao redor do osso neoformado (seta vermelha).

4.2. Análise Histométrica e Estatística

4.2.1. Análise dos defeitos

Em uma análise dos diferentes tamanhos de defeitos preenchidos por coágulo sanguíneo observou-se que houve diferença estatística na área de formação do tecido ósseo ($p < 0.001$). Em 7 dias, o pós-teste de Tukey indicou que os grupos de 5mm e 8mm não tiveram diferença estatística ($p = 0,407$). Em 30 dias, o pós-teste de Tukey indicou que o grupo Coágulo 8mm formou mais tecido ósseo quando comparado com o coágulo 5mm ($p < 0.001$), resultados semelhantes foram apresentados pelo grupo Coágulo 8mm vs. Coágulo 5mm ($p < 0.001$) em 60 dias, a maior área de formação óssea foi apresentada pelo grupo Coágulo 8mm, quando comparado com grupo Coágulo 5mm ($p < 0.001$) conforme a figura 24.

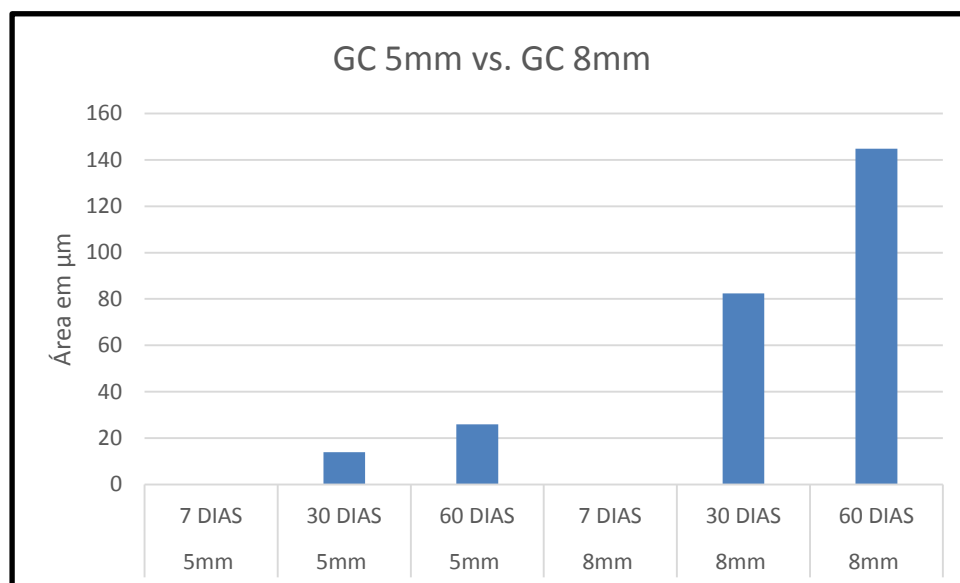


Figura 24 - Área óssea neoformada (média) comparando os Grupos Coágulo (GC) 5mm e 8mm nos períodos de 7, 30 e 60 dias.

Foi ainda mensurado no Software Image J a porcentagem da área óssea neoformada em relação ao tamanho total dos defeitos críticos. Comparando os grupos Coágulo 5mm e 8mm tivemos os seguintes resultados. O período de 7 dias ambos os grupos tiveram 0% de formação óssea. No período de 30 dias o grupo Coágulo 5mm teve 44,4% de área neoformada vs. 49% do grupo Coágulo 8mm. E

por fim, no período de 60 dias o grupo Coágulo 5mm apresentou 58% de área óssea neoformada vs. 65,4% do grupo Coágulo 8mm.

4.2.2. Análise do Biomaterial

Em uma análise dos diferentes tamanhos de defeitos recobertos pelo biomaterial (**Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland**) observou-se que houve diferença estatística na área de formação do tecido ósseo ($p < 0.001$). Em 7 dias, o pós-teste de Tukey indicou que o grupo Bio-Gide 5mm e 8mm não formaram tecido ósseo ($p = 3,777$), resultados semelhantes foram apresentados pelo grupo Coágulo 5 e 8 ($p = 0,026$). Em 30 dias, o pós-teste de Tukey indicou que o grupo Bio-Gide 5mm formou mais tecido ósseo quando comparado com o coágulo 5mm ($p < 0.001$), resultados semelhantes foram apresentados pelo grupo Bio-Gide 8mm vs. Coágulo 8mm ($p < 0.001$) em 60 dias, a maior área de formação óssea foi apresentada pelo grupo Bio-Gide 8mm, quando comparado com grupo Coágulo 8mm ($p < 0.001$) conforme a figura 25.

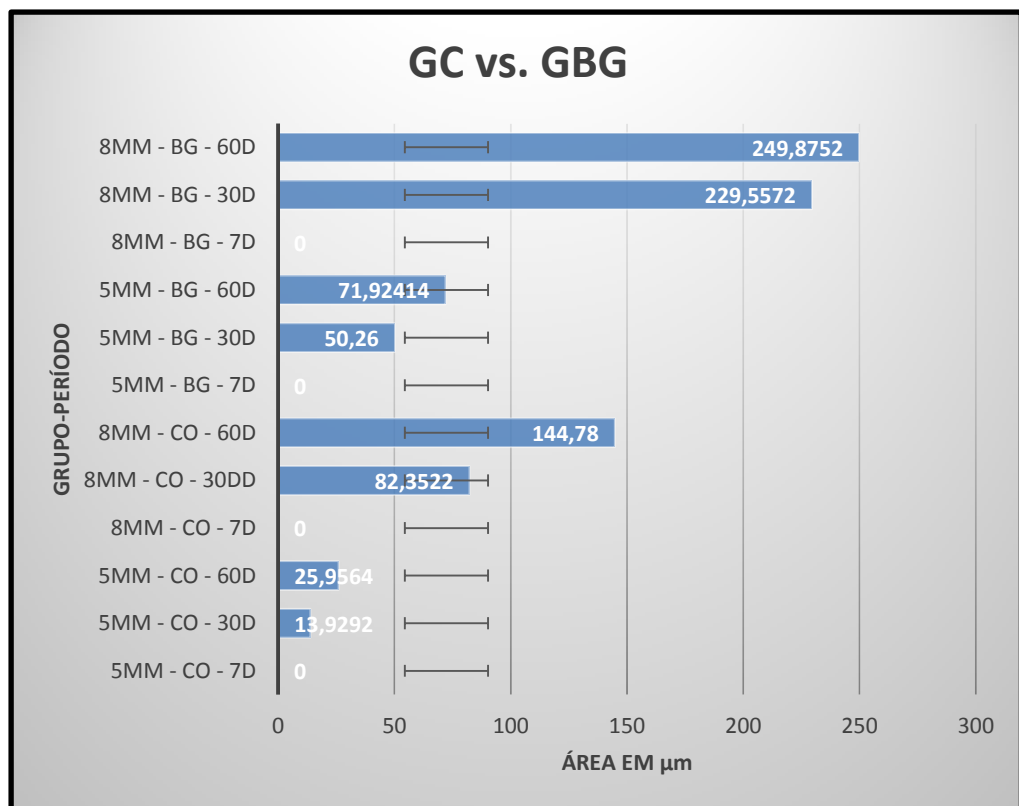


Figura 25. Área óssea neoformada (média) comparando os grupos Coágulo (GC) e Bio-Gide (GBG) com diferentes tamanhos de defeitos e períodos de 7, 30 e 60 dias.

4.3 Imuno-histoquímica

VEGF: A VEGF é um fator de crescimento presente em osteoblastos bem como em células endoteliais. Foi observada uma marcação positiva importante para este fator de crescimento nos quatro grupos experimentais, especialmente nos grupos: 7 dias Bio-Gide e Coagulo 5mm e 30 dias Bio-Gide 8mm. Para os grupos Bio-Gide 5mm esta proteína foi expressa moderadamente no período de 7 dias e leve no período de 30 dias (Figura 28 e 29). Já no Grupo de Bio-Gide 8mm foi expresso moderado no período de 7 e 30 dias (26 e 27).

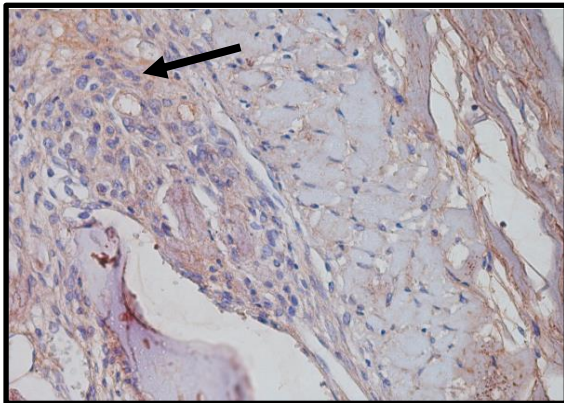


Figura 26. Grupo BG - 7dias - 8mm – Região de coto esquerdo de defeito crítico e marcação de proteína VEGF moderada (seta preta).

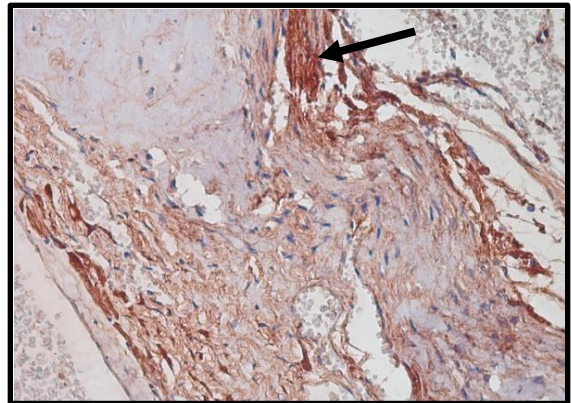


Figura 27. Grupo BG - 30dias - 8mm - Região de coto esquerdo de defeito crítico e marcação de proteína VEGF moderada (seta preta).

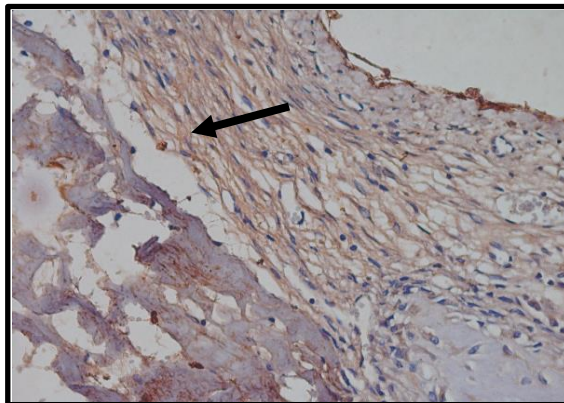


Figura 28. Grupo BG - 7dias - 5mm – Região de coto esquerdo de defeito crítico e marcação de proteína VEGF moderada (seta preta).

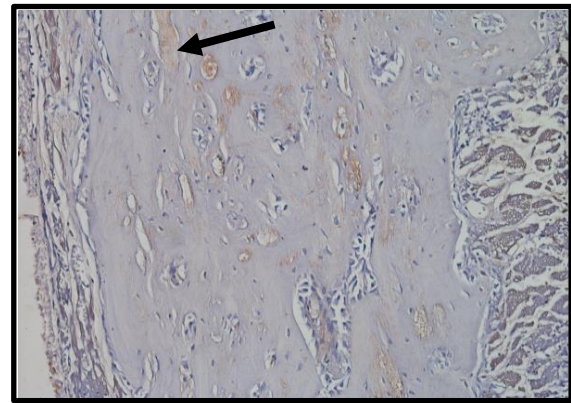


Figura 29. Grupo BG - 30dias - 5mm - Região de coto esquerdo de defeito crítico e marcação de proteína VEGF moderada (seta preta).

5. DISCUSSÃO

O defeito ósseo crítico é definido como o menor tamanho de defeito que não permite a completa cicatrização óssea durante um período determinado, usualmente suficiente para a cicatrização natural. Ele não é capaz de se regenerar sem alguma intervenção clínica. A reparação de um defeito ósseo crítico se inicia nas bordas da ferida óssea, porém não evolui até o centro do defeito, formando um tecido conjuntivo fibroso ao invés de osso. (18)

Embora a calota de ratos seja um dos modelos experimentais mais comumente usados, ainda há controvérsia na literatura sobre o diâmetro ideal do defeito para que seja considerado como crítico. Geralmente são realizados defeitos de 5 e 8mm de diâmetro (19).

Nosso estudo mostrou baixa porcentagem de reparação total de defeitos nos animais com defeitos de 5mm realizados bilateralmente no centro de cada osso parietal, apenas 6,6% teve reparo total da ferida óssea, sendo assim, não há como contestar que se trata de um defeito crítico (20).

Já nos defeitos realizados no centro da calota craniana tivemos 13,3% dos defeitos com reparo total. Este resultado pode ser explicado pela possível influência da sutura sagital média como diz o estudo de Bosch et al. 1996, que sugere que a participação do coágulo vindo da sutura sinusal poderia modificar resposta do reparo ósseo primário. Porém, pela baixa porcentagem dos resultados, pode também ser considerado defeito crítico (21, 22).

Comparando estes dois defeitos de dimensões diferentes, defeitos de 5mm podem apresentar várias vantagens tais como: a possibilidade de uma divisão emparelhado do experimento reduzindo a polarização causado pela variabilidade entre animais diferentes; menor probabilidade de lesão do seio sagital (17) e possibilidade de reduzir o número de animais necessários para a investigação. Por outro lado, quando o material a ser estudado porta baixa viscosidade, tais como géis ou líquidos quando aplicados em defeitos bilaterais, o local de controle pode ser "contaminado", devido à proximidade dos defeitos (23).

O fato de um defeito maior ter tido maior porcentagem de reparo total que o defeito menor podemos explicar também pela influência de fatores externos como localização anatômica do defeito, técnica cirúrgica e operador, danificação ou não da dura-máter durante a preparação do defeito (8, 24).

Em relação ao período de avaliação, a maior proporção de formação óssea total ocorreu na oitava semana em ambos os grupos Coágulos, visto na análise histológica e mensuração percentual da área, porém não houve diferença estatística entre grupo de 4 semanas e 8 semanas ($p = 0,118$), corroborando com diversos estudos que não apresentam diferença entre avaliação de 4 ou 8 semanas (25-27).

Com intuito de comparar neoformação óssea desses defeitos críticos foi realizado no mesmo estudo a confecção de defeito crítico de 5 e 8mm e esses recobertos por membrana de colágeno porcino (*Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, Switzerland*) (BG).

A área de tecido ósseo neoformado dos defeitos ósseos recobertos com BG apresentou em todos os períodos analisados maior neoformação óssea em comparação ao grupo coágulo ($p < 0,05$). Isso se justifica pelo fato de que o reparo ósseo é frequentemente prejudicado pela infiltração de células do tecido conjuntivo como por exemplo os fibroblastos. As membranas atuam como barreira fisiológica biocompatível permitindo que as células osteoprogenitoras, de crescimento mais lento, possa, repovoar o defeito ósseo e ainda servem como arcabouço a regeneração óssea guiada (GBG).(28) Portanto, diante os resultados do estudo podemos afirmar que a membrana BG oferece os pré-requisitos necessários para auxiliar o reparo ósseo por ter apresentado biocompatibilidade já que nas imagens histológicas não foram observadas células de caráter inflamatório. E seu tempo de degradação foi o suficiente para alcançar o reparo ósseo já que foi observado remanescente da membrana até o período de 60 dias nos cortes histológicos.

VEGF é um regulador de reparação óssea e desenvolvimento; que estimula a diferenciação de células endoteliais e osteoblastos durante a reparação óssea (29, 30). VEGF também estimula a proliferação de novos vasos para restabelecer o fornecimento de sangue, facilitando assim a cicatrização óssea (31). Corroborando à literatura, foram encontradas nos tecidos conjuntivos células imuno marcadas na periferia dos nossos defeitos. A expressão de VEGF neste estudo foi moderada nos grupos BG tanto de 5 quanto 8mm no período de 7 dias. Já no período de 30 dias foi expresso como leve no grupo BG 5mm e moderado no BG 8mm.

Os resultados deste trabalho, obtidos com as reações de imunohistoquímica, evidenciou que regeneração óssea guiada, testada por meio do biomaterial BG foi favorável ao aspecto de neoformação óssea, porém apenas uma pequena porcentagem teve o defeito total reparado nos dois grupos (BG 5mm = 20% e BG 8mm=33,3), mostrando que o auxílio da membrana como barreira não interfere nos resultados quando unidos com biomateriais de preenchimento (32).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que os defeitos de 5mm e 8mm podem ser considerados críticos. E foi comprovado o auxílio da membrana de colágeno porcino no reparo do defeito ósseo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Engquist B, Nilson H, Astrand P. Single-tooth replacement by osseointegrated Branemark implants. A retrospective study of 82 implants. *Clin Oral Implants Res.* 1995;6(4):238-45.
2. Mijiritsky E, Lorean A, Mazor Z, Levin L. Implant Tooth-Supported Removable Partial Denture with at Least 15-Year Long-Term Follow-Up. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17(5):917-22.
3. Grandi T, Guazzi P, Samarani R, Grandi G. Immediate provisionalisation of single post-extractive implants versus implants placed in healed sites in the anterior maxilla: 1-year results from a multicentre controlled cohort study. *Eur J Oral Implantol.* 2013;6(3):285-95.
4. Scheuber S, Bosshardt D, Bragger U, von Arx T. [Implant therapy following trauma of the anterior teeth - a new method for alveolar ridge preservation after post-traumatic ankylosis and external root resorption]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2013;123(5):417-39.
5. Malo P, Nobre M, Lopes A. Immediate loading of 'All-on-4' maxillary prostheses using trans-sinus tilted implants without sinus bone grafting: a retrospective study reporting the 3-year outcome. *Eur J Oral Implantol.* 2013;6(3):273-83.
6. Zakhary IE, El-Mekkawi HA, Elsalanty ME. Alveolar ridge augmentation for implant fixation: status review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(5 Suppl):S179-89.
7. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986(205):299-308.
8. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(6):1685-92.
9. Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106(2):360-71; discussion 72.
10. Wilson A, Ribeiro Neto IHLP, Eliane Ayres, Ana C C De Paula, Luc Averous, Alfredo M GÃ³es, Rodrigo L OrÃ©ice, Rosario Elida, Suman Bretas. 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.* 2012;97.
11. MS S. *Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications* 2015.
12. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(3):369-78.

13. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Becker J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(4):403-9.
14. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wustefeld M, Sager M, Ferrari D, et al. 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.
15. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994;9(1):13-29.
16. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990;1(1):60-8.
17. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998;9(4):310-6.
18. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012;7(10):1918-29.
19. Zanchetta P, Lagarde N, Uguen A, Marcorelles P. Mixture of hyaluronic acid, chondroitin 6 sulphate and dermatan sulphate used to completely regenerate bone in rat critical size defect model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40(8):783-7.
20. Aybar Odstroil A, Territoriale E, Missana L. An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontol Latinoam.* 2005;18(2):63-7.
21. Rodriguez-Evora M, Delgado A, Reyes R, Hernandez-Daranas A, Soriano I, San Roman J, et al. Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA-betaTCP concentric system in a critical size defect in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2013;49(5):873-84.
22. Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg.* 2008;12(2):73-8.
23. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimoës R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(8):879-93.
24. Greenwald JA, Mehrara BJ, Spector JA, Chin GS, Steinbrech DS, Saadeh PB, et al. Biomolecular mechanisms of calvarial bone induction: immature versus mature dura mater. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(4):1382-92.
25. Kamakura S, Sasaki K, Honda Y, Anada T, Suzuki O. Octacalcium phosphate combined with collagen orthotopically enhances bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;79(2):210-7.

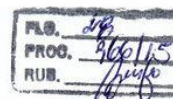
26. Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol*. 2005;32(9):966-72.
27. Furlaneto FA, Nagata MJ, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messori MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(3):311-8.
28. Schlegel AK, Mohler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials*. 1997;18(7):535-8.
29. Jacobsen KA, Al-Aql ZS, Wan C, Fitch JL, Stapleton SN, Mason ZD, et al. Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling. *J Bone Miner Res*. 2008;23(5):596-609.
30. Eriksson C, Nygren H, Ohlson K. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. *Biomaterials*. 2004;25(19):4759-66.
31. Hsiong SX, Mooney DJ. Regeneration of vascularized bone. *Periodontol* 2000. 2006;41:109-22.
32. Parrish LC, Miyamoto T, Fong N, Mattson JS, Cerutis DR. Non-bioabsorbable vs. bioabsorbable membrane: assessment of their clinical efficacy in guided tissue regeneration technique. A systematic review. *J Oral Sci*. 2009;51(3):383-400.
33. Alpar, B., G. Leyhausen, H. Gunay, and W. Geurtsen, 2000, 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*, v. 4, p. 219-25.
34. Faverani, L. P., 2015, *IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS: EVOLUÇÃO E SUCESSO*.
36. Hurzeler, M. B., and J. R. Strub, 1995, Guided bone regeneration around exposed implants: a new bioresorbable device and bioresorbable membrane pins: *Pract Periodontics Aesthet Dent*, v. 7, p. 37-47; quiz 50.
37. Rothamel, D., F. Schwarz, A. Sculean, M. Herten, W. Scherbaum, and J. Becker, 2004, Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells: *Clin Oral Implants Res*, v. 15, p. 443-9.
38. Tal, H., A. Kozlovsky, Z. Artzi, C. E. Nemcovsky, and O. Moses, 2008, Long-term bio-degradation of cross-linked and non-cross-linked collagen barriers in human guided bone regeneration: *Clin Oral Implants Res*, v. 19, p. 295-302.
39. Wallace, S. S., and S. J. Froum, 2003, Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review: *Ann Periodontol*, v. 8, p. 328-43.

40. Wallace, S. S., S. J. Froum, S. C. Cho, N. Elia, D. Monteiro, B. S. Kim, and D. P. Tarnow, 2005, 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, p. 551-9.
41. Kim, M., J. H. Kim, J. Y. Lee, K. Cho, S. S. Kang, G. Kim, M. J. Lee, and S. H. Choi, 2008, Effect of bone mineral with or without collagen membrane in ridge dehiscence defects following premolar extraction: *In Vivo*, v. 22, p. 231-6.
42. Gielkens, P. F., J. Schortinghuis, J. R. de Jong, G. M. Raghoobar, B. Stegenga, and R. R. Bos, 2008, Vivosorb, Bio-Gide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT: *Clin Oral Implants Res*, v. 19, p. 516-21.

ANEXO A – Comitê de Ética



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 reparo ósseo comparando tamanhos diferentes de defeitos crítico utilizando membrana de colágeno BioGuide. Análise histomorfométrica, imunohistoquímico e micro CT"**, Processo FOA nº 00966-2015, 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 09 de Dezembro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Maio de 2016.

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

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Bone healing evaluation comparing different sizes of critical defects with BioGuide collagen membrane. Histomorphometric analysis, immunohistochemistry and micro CT"**, Protocol FOA nº 00966-2015, under the supervision of Ana Paula Farnezi Bassi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 09, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 01, 2016.

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

Profa. Adj. 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