



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

CIRO BORGES DUAILIBE DE DEUS

**Processo de neoformação óssea das membranas
colágenas Bio-Gide® e Ossix Plus® em defeitos críticos de
calvárias: uma análise histomorfométrica e
microtomográfica**

**ARAÇATUBA – SP
2022**

CIRO BORGES DUAILIBE DE DEUS

**Processo de neoformação óssea das membranas
colágenas Bio-Gide® e Ossix Plus® em defeitos críticos de
calvárias: uma análise histomorfométrica e
microtomográfica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de "Doutor em Odontologia" (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial).

Orientador: Prof. Ass. Idelmo Rangel Garcia Junior
Coorientadora: Prof^{fa}. Ass. Roberta Okamoto

**ARAÇATUBA – SP
2022**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D486p Deus, Ciro Borges Duailibe de.
Processo de neoformação óssea das membranas colágenas Bio-Gide® e Ossix Plus® em defeitos críticos de calvárias: uma análise histomorfométrica e microtomográfica / Ciro Borges Duailibe de Deus. -- Araçatuba, 2022
39 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Junior
Coorientadora: Profs. Roberta Okamoto

1. Membrana de colágeno 2. Regeneração óssea guiada 3. Defeito calvário de rato I.T.

Black D5
CDD 617.601

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes em minha vida: **à minha família**. Que mesmo morando há milhares de quilômetros de distância se faziam presentes a todo momento durante este período de formação.

Ao meu pai, **Ivalber Mendes de Deus**, meu melhor amigo e primeiro orientador. Que nunca mediu esforços para a minha educação e crescimento. Obrigado pelo carinho, dedicação e preocupação sempre constante. Te desejo muita saúde para compartilharmos muitos momentos como este. Te amo, pai!

À minha mãe, **Maria Jeanne Borges Duailibe de Deus**, pelo amor sem medida e por sempre saber a melhor maneira de confortar nos momentos de angústia. Porto seguro de toda família e luz que sempre iluminará minha vida. Te amo, mãe!

E às minhas irmãs, **Lorena, Lívia e Lara**, minhas melhores amigas, por sempre estarem ao meu lado e me apoiar nos momentos de incertezas. Amo muito vocês!

À minha namorada, **Mariana Freire**, por aparecer em minha vida no momento certo e por ser minha companheira. Obrigado por me incentivar e apoiar em todas as situações. Te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus** por tornar possível esse momento.

Ao **Professor Clóvis Marzola** (*in memorian), pelos ensinamentos em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial. Foi um ícone e fez uma linda história na CTBMF, um verdadeiro exemplo de dedicação à nossa classe. A especialidade deve muito ao seu esforço. Foi um prazer conviver com o senhor, ter sido seu aluno e amigo. Sou um admirador da sua história. Muito obrigado por tudo!

Ao meu orientador, **Professor Idelmo Rangel Garcia Junior**, por ter me aceitado como seu orientado. Um mestre de características ímpares que o fazem o líder que nosso departamento da FOA-UNESP necessita. Sou imensamente grato pelos seus ensinamentos. Muito obrigado por tudo!

À minha coorientadora, **Professora Roberta Okamoto**, por sua disposição em ensinar e ajudar a qualquer momento de necessidade. Só tenho a agradecer por todas as conversas e conselhos durante esses anos. Muito obrigado por todo amparo!

À **Professora Ana Paula Farnezi Bassi**, uma pessoa pequena somente no tamanho, mas de enorme capacidade de ensino e coração.

Ao **Professor Francisley Avila Souza**, agradeço pelo convívio descontraído e por poder aprender com você. É muito bom poder discutir alguns casos clínicos com senhor. Estando sempre com alguma piada ou alguma história antiga engraçada para alegrar nossos dias.

Ao **Professor Osvaldo Magro Filho**, obrigado pela oportunidade de aprender um pouco mais sobre a arte da cirurgia ortognática.

Às **Professoras Daniela Ponzoni e Alessandra Marcondes Aranega**, pelo conhecimento compartilhado com todos do departamento.

Ao **Professor André Luis da Silva Fabris**, pela amizade, humildade e simplicidade.

Ao **Professor Cláudio Maldonado Pastori**, um exemplo de cirurgião e pessoa. Sou muito grato pelo que aprendi com você.

Ao **Professor Paulo Domingos Ribeiro Junior**, por ter sido seu aluno e orientado durante o curso de especialização em Implantodontia na APCD/Bauru. Obrigado pelas explicações, planejamentos, pelo auxílio para confecção do meu trabalho de conclusão de curso de especialização.

Ao grande cirurgião de cabeça e pescoço **Dr. Edgard Mello**, foi muito prazeroso poder entrar em campo ao seu lado e vê-lo operar, um exímio cirurgião. Obrigado pelos momentos de descontração durante a residência, pelas conversas e pelos churrascos.

Ao **Professor Erik Neiva Ribeiro Carvalho Reis**, um grande amigo que a vida me deu. Conte sempre comigo!

Ao **Professor Pedro Henrique da Silva Gomes Ferreira**, só tenho a agradecer pela parceria desde a residência em Bauru.

Ao **Professor Jefferson Moura Vieira**, um amigo com o coração de ouro. Acredito que não haja pessoa mais prestativa e disposta a ajudar o próximo. Sou muito feliz por tê-lo como amigo.

Ao **Professor Luis Fernando Alcalde**, grande Bagé. Só tenho a agradecer pelos puxões de orelha quando meu R3 e pelas saídas sempre rendendo histórias homéricas.

Ao **Professor Paulo Zupelari**, por ter amparado a mim e ao Jefferson, possibilitando o nosso aprendizado teórico e prático necessário para finalização da residência, nos deixando operar os seus pacientes, de um serviço recém conquistado no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Pederneiras/SP.

Aos mais que amigos, **João Victor Abdala, Frederico Nanso, Felipe Alves, Diomildo Andrade, Arthur Andrade, Marcus Macedo, Carlos Eduardo Rios, Almeida Neto, Glalbert Cutrim, Nataniel Souza e Maurício Neto**.

Aos amigos da graduação e pós-graduação, muito obrigado pelos conhecimentos compartilhados e pelo bom convívio.

Aos amigos que embarcaram na pós-graduação juntos comigo: **André Hergesel de Oliva, Fábio Roberto de Souza Batista e Gabriel Mulinari** e aos pós-graduandos de outras áreas.

À **Michele, Fran e Day**, agradeço a intermediação com o professor Idelmo e por sempre ter conseguido facilitar de alguma forma minha vida durante a pós-graduação.

Aos funcionários e amigos do laboratório do prédio 5, os secretários **Renato de Oliveira e Fausto Canuto**, agradeço por todo apoio e ao **Marco Ianner e Paulo Gratão**, sou muito grato por vocês terem me ensinado sobre os processamentos laboratoriais.

Ao **João Correa, Camilo Venâncio e Arnaldo**, por cuidarem tão bem dos animais dos experimentos, ajudando durante todo o processo, desde a organização do biotério, cirurgias e eutanásia.

A todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Santa Casa de Misericórdia de Birigui, UNIMED – Araçatuba, NEC e DEFI. Aos pacientes por confiarem suas vidas aos nossos cuidados.

Aos **docentes, funcionários, estagiários e pós-graduandos** do Departamento de Ciências Básicas, Diagnóstico e Cirurgia.

À todas as **pessoas envolvidas** durante o meu ingresso e período de pós-graduação na Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP.

Aos **pacientes** por confiarem suas vidas aos nossos cuidados.

Agradeço à **vida dos animais** utilizados durante os experimentos, o que tornou possível a elaboração deste trabalho e permitiu o meu aprendizado.

CAPES

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pela oportunidade de ser discente de uma instituição tão reconhecida e por onde já passaram grandes nomes da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Professor Glauco Issamu Miyahara**, e ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Professor Wirley Gonçalves Assunção**, pela forma como dirigem nossa Pós-Graduação.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação, **Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto**, **Cristiane Regina Lui Matos** e **Lilian Sayuri Mada**, agradeço pela paciência, pelos avisos e e-mails. Vocês são peças fundamentais desta engrenagem. Muito obrigado!

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** pela prontidão em nos atender.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

Deus CBD. Processo de neoformação óssea das membranas colágenas Bio-Gide® e Ossix Plus® em defeitos críticos de calvárias: uma análise histomorfométrica e microtomográfica [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2022.

RESUMO

Objetivo: comparar a neoformação óssea em defeitos críticos confeccionados em calvárias de ratos utilizando duas apresentações de membranas de colágeno porcino, Bio-Gide® e Ossix Plus® para o recobrimento da loja cirúrgica criada. **Material e Método:** trinta e dois ratos machos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar) foram divididos entre os grupos BG (membrana de colágeno porcino Bio-Gide®, n=16) e OS (membrana de colágeno porcino Ossix Plus®, n=16). Foram realizados defeitos críticos de 8mm de diâmetro nas calvárias dos animais e estes foram recobertos com as membranas colágenas BG ou OS. Aos 15, 30 e 60 dias os animais foram sacrificados por sobredose anestésica e as amostras coletadas foram submetidas à análise histomorfométrica (t=15, n=8; t=30, n=8 e t=60, n=8) e microtomográfica (t=60, n=8). A análise histomorfométrica foi realizada de forma qualitativa e quantitativa. Os dados histométricos quantitativos e os da análise microtomográfica foram submetidos à estatística ($p<0,05$). **Resultados:** a análise histomorfométrica não apontou diferença no desempenho entre as membranas BG e OS nos períodos de 15, 30 e 60 dias ($p>0,05$). Para os dados qualitativos e quantitativos, aos 60 dias pós-operatórios, foram encontradas quantidades consideráveis da membrana OS quando comparada a BG, bem como no parâmetro macroscópico. A análise microtomográfica evidenciou médias superiores para BV, BV/TV, Tb.Th e i.S ($p<0,05$) para o grupo OS. **Conclusão:** a membrana Ossix Plus® apresentou qualidade superior de neoformação óssea, além de permanecer a longo prazo na região dos defeitos críticos produzidos.

Palavras-chave: Membrana de colágeno; Regeneração óssea guiada; Defeito calvária de rato.

Deus CBD. Bone neoformation process of Bio-Gide® and Ossix Plus® collagen membranes in critical calvaria defects: a histomorphometric and microtomographic analysis [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2022.

ABSTRACT

Objective: to compare bone neoformation in critical defects made in rat calvaria using two presentations of porcine collagen membranes, Bio-Gide® and Ossix Plus® for covering the surgical pocket created. Material and Method: thirty-two male rats (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar) were divided between BG (Bio-Gide® porcine collagen membrane, n=16) and OS (Ossix Plus® porcine collagen membrane, n= 16). Critical defects of 8 mm in diameter were made in the animals' calvaria and they were covered with BG or OS collagen membranes. At 15, 30 and 60 days the animals were sacrificed by anesthetic overdose and the samples collected were submitted to histomorphometric (t=15, n=8; t=30, n=8 and t=60, n=8) and microtomographic (t=60, n=8) analysis. The histomorphometric analysis was performed qualitatively. Quantitative histometric and microtomographic data were submitted to statistics ($p<0,05$). Results: the histomorphometric analysis showed no difference in performance between the BG and OS membranes in the periods of 15, 30 and 60 days ($p>0.05$). For qualitative and quantitative data, at 60 days postoperatively, considerable amounts of OS membrane were found when compared to BG, as well as in the macroscopic parameter. The microtomographic analysis showed higher means for BV, BV/TV, Tb.Th and i.S ($p<0.05$) for the OS group. Conclusion: the Ossix Plus® membrane showed superior bone neoformation quality, in addition to remaining long-term in the region of the critical defects produced.

Keywords: Collagen membrane; Guided bone regeneration; Rat calvarial defect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fase inicial do procedimento cirúrgico	19
Figura 2 -	Fase final do procedimento cirúrgico	19
Figura 3 -	Representação esquemática das referências anatômicas para confecção do defeito crítico	20
Figura 4 -	Representação esquemática do corte longitudinal das calvárias	22
Figura 5 -	Representação esquemática dos cortes de 5 μ m produzidos pelo micrótomo	22
Figura 6 -	Imagens representativas histológicas	26
Figura 7 -	Histometria dos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios	27
Figura 8 -	Reconstrução tridimensional das amostras	28
Figura 9 -	Parâmetros da análise microtomográfica	29

LISTA DE SIGLAS

Al	Alumínio
BG	Bio-Gide®
BV	Volume ósseo
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
Ca ²⁺	Cálcio
CSV	<i>Comma-separated values</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
i.S	Superfície de intersecção
OS	Ossix Plus®
P	Fósforo
PTFE	Politetrafluoroetileno
ROG	Regeneração óssea guiada
ROI	Região de interesse
RTG	Regeneração tecidual guiada
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação de trabéculas
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
VOI	Volume de interesse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAL E MÉTODO	16
2.1 Membranas colágenas	16
2.1.1 Bio-Gide®	16
2.1.2 Ossix Plus®	16
2.2 Animais	16
2.3 Procedimento cirúrgico	17
2.3.1 Confeção do defeito crítico em calvária	18
2.3.2 Inserção das membranas de colágeno porcino	20
2.3.3 Finalização do procedimento cirúrgico	20
2.4 Análise macroscópica	21
2.5 Eutanásia	21
2.6 Armazenamento das peças	21
2.7 Análise histomorfométrica	22
2.8 Análise microtomográfica	23
2.9 Análise estatística	24
3 RESULTADOS	25
3.1 Análise histomorfométrica	25
3.1.1 Análise qualitativa	25
3.1.1.1 Bio-Gide® (BG)	25
3.1.1.2 Ossix Plus® (OS)	25
3.1.2 Análise quantitativa	26
3.2 Análise macroscópica	27
3.3 Análise microtomográfica	28
4 DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXOS	38

1 INTRODUÇÃO

O reparo inicial de uma área cirúrgica envolve uma série de eventos biológicos que ocorrem no processo de regeneração óssea, desde a proliferação celular, angiogênese e agregação plaquetária para formação da rede de fibrinas que compõe o coágulo sanguíneo [1,2]. Entretanto, no campo da cirurgia maxilofacial, essa regeneração pode ser limitada mediante a defeitos ósseos, estabelecendo-se a necessidade de métodos coadjuvantes para o alcance de resultados previsíveis de tratamentos reabilitadores [3-5].

A partir de substitutos ósseos, a regeneração óssea guiada (ROG) e a regeneração tecidual guiada (RTG) são métodos que preenchem áreas de defeitos que, por sua vez, são envoltas por membranas biológicas que atuam como barreira física, isolando células de linhagem fibroblástica e osteoblástica, promovendo ganho e qualidade tecidual para a neoformação óssea [6-10].

A primeira geração de membranas não absorvíveis, como as de politetrafluoroetileno (PTFE), demonstram biocompatibilidade adequada, no entanto, a necessidade uma segunda abordagem cirúrgica e a alta taxa de exposição tornam seu uso inviável [11-13]. As membranas absorvíveis são oriundas de polímeros sintéticos (copolímeros de ácido polilático e ácido poliglicólico) ou naturais (colágeno bovino ou suíno) e promovem melhor regeneração tecidual e óssea do que as não absorvíveis devido a melhores propriedades e compatibilidades integrativas. [12-14].

As membranas colágenas têm grande emprego na prática clínica de ROG e RTG e são biodegradáveis [9,10,15-18]. Essas membranas são facilmente manipuladas, possuem propriedades biocompatíveis, viabilizam a quimiotaxia de células mesenquimais indiferenciadas através de uma porosidade favorável, proporcionam adequada estabilização do coágulo sanguíneo, contribuindo com o reparo tecidual e protegem o espaço do leito cirúrgico [14,15,17,19,20].

Dado que essas matrizes colagenosas são extensivamente aplicadas na prática de cirurgias orais para regeneração tecidual, tanto de tecidos moles, quanto de tecidos duros, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a neoformação óssea, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, de duas diferentes membranas de colágeno de origem suína (Bio-Gide® - Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça e Ossix Plus® - Datum Dental, Lod, Israel), a partir do reparo de defeitos críticos em calotas cranianas

de ratos machos adultos, através das análises histomorfométrica e de microtomografia computadorizada.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Membranas colágenas

Para este estudo, foram selecionadas duas diferentes marcas de membranas de colágeno porcino disponíveis no mercado, consideradas de ampla utilização na prática clínica de cirurgias maxilofaciais.

2.1.1 Bio-Gide®

Para proteção do defeito crítico confeccionado, a membrana de colágeno Bio-Gide® foi milimetricamente adaptada em dimensões de 10x10mm.

2.1.2 Ossix Plus®

Para proteção do defeito crítico confeccionado, a membrana de colágeno Ossix Plus® foi milimetricamente adaptada em dimensões de 10x10mm.

2.2 Animais

Após a submissão e posterior aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP (Nº 0402-2022) (Anexo A), trinta e dois ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com peso corporal médio de 300 gramas e idade aproximada de 6 meses, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, foram alocados aleatoriamente. O tamanho da amostra foi calculado por meio do software SigmaPlot 12.0 (gráficos exatos e análise de dados, Sant Jose, CA, EUA).

Os animais foram divididos em 2 grupos (n=16), discriminados a partir do uso das diferentes membranas colagenosas:

- **Grupo I (n=16): Grupo Controle Positivo – Bio-Gide® (BG)**

Defeito ósseo crítico preenchido com membrana de colágeno porcino Bio-Gide® (Bio-Gide®; Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça).

- **Grupo II (n=16): Grupo Experimental – Ossix Plus® (OS)**

Defeito ósseo crítico preenchido com membrana de colágeno porcino Ossix Plus® (Ossix Plus®; Datum Dental, Lod, Israel).

Os Animais foram divididos e mantidos em gaiolas identificadas de acordo com a designação dos grupos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Estes foram alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brasil) contendo 1,4% Ca²⁺ e 0,8% P, e dispostos à água *ad libitum*. Para estabilidade do ambiente ideal, a temperatura de 22±2°C e ciclo de luz controlado por temporizador analógico (12 horas de luz e 12 horas de escuridão) foram instituídos. A cada dois dias, as gaiolas eram limpas e os animais avaliados [21,22].

2.3 Procedimento cirúrgico

O sorteio para eleição aleatória dos animais para a cirurgia foi realizado forma randomizada, a partir de um envelope com dois papeis com as siglas dos grupos (BG ou OS).

Foi adotado um rígido protocolo de manutenção da cadeia asséptica, incluindo a esterilização dos instrumentais utilizados, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de luvas e aventais cirúrgicos estéreis, seguindo uma sistematizada sequência de abordagem para cada animal a ser operado. Para continuidade de padronização, um único operador realizou os procedimentos cirúrgicos. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no centro cirúrgico experimental do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP [10,21,22].

Os animais (n=32) foram submetidos ao jejum pré-operatório de 12 horas e posteriormente sedados, por via intramuscular, com a administração de cloridrato de Cetamina (Francotar — Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) a 50 mg/kg, associada à Xilazina (Rompum — Bayer AS — Health Animal, São Paulo, Brasil) na dosagem de 5mg/kg. Após a anestesia, foi realizada a tricotomia da região nasal e craniana dos ratos, seguida de antisepsia com polivinilpirrolidona iodo tópico (10% PVPI, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto) (Figura 1A e 1B) [10,21,22].

2.3.1 Confeção do defeito crítico em calvária

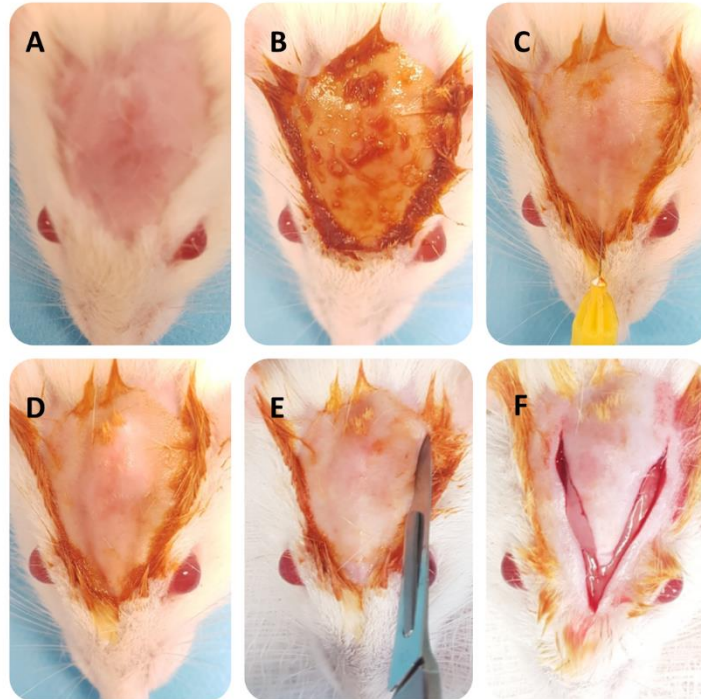
Foi realizada a infiltração subperiosteal, com anestésico local lidocaína 2% e vasoconstrictor epinefrina 1:100.000 (Alphacaine DFL Indústria e Comércio SA, Jacarepaguá, RJ, Brasil), da área de interesse delimitada. Na sequência, a demarcação do acesso em formato de triângulo isósceles, de base invertida, foi demarcada e mantida íntegra (Figura 1C-1E) [10,21,22].

Uma incisão envolvendo pele, músculo e periósteo, de aproximadamente 2cm, partindo da região occipital (entre as orelhas) com direcionamento de vértice para o osso frontal (entre os olhos), foi confeccionada nos lados direito e esquerdo para formação das arestas do triângulo (Figura 1F, Figura 2G) [10,21,22].

Após a incisão, foi realizado o descolamento total dos tecidos, com o auxílio de descolador de Molt (Quinelato Schobell Industrial Ltda, Rio Claro, SP, Brasil) para exposição da região de interesse. Em seguida, com uma trefina de diâmetro interno de 7mm e externo de 8mm (3i Implant Innovations, Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA), sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio a 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), um defeito crítico de 8mm de diâmetro foi confeccionado na região central do crânio, tendo como limite posterior, a sutura lambdoide, como limites laterais, as regiões temporais, e como limite anterior, a sutura coronal, sendo a sutura sagital um referencial para a centralização do defeito (Figura 2H-2J e Figura 3) [10,21,22].

A dura-máter e o seio sagital superior foram mantidos intactos durante o aprofundamento da trefina até o destacamento da calota craniana. De acordo com a literatura, esse defeito ósseo é considerado crítico porque durante o restante da vida do animal, o espaço criado com a trefina não tem capacidade de completa obliteração óssea [10,11,21-23].

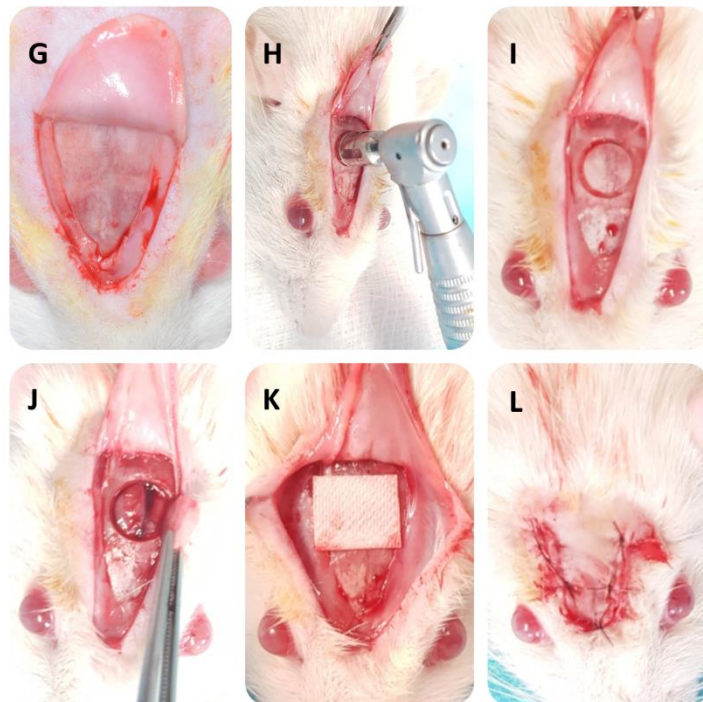
Figura 1 – Fase inicial do procedimento cirúrgico



Em **A**. Tricotomia da região da calvária; **B**. Antissepsia; **C**. Infiltração anestésica; **D**. Área preparada para incisão; **E**. Incisão e **F**. Incisão final em formato de triângulo isósceles de base invertida.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

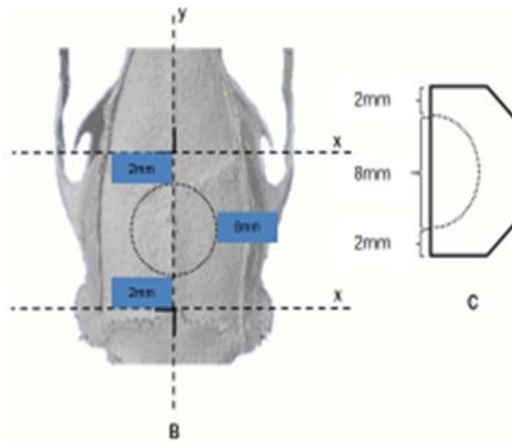
Figura 2 – Fase final do procedimento cirúrgico



Em **G**. Exposição do leito cirúrgico; **H**. Osteotomia com trefina; **I**. Após osteotomia; **J**. Remoção da calvária; **K**. Acomodação da membrana e **L**. Sutura final.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 3 – Representação esquemática das referências anatômicas para confecção do defeito crítico



Defeito ósseo centralizado de acordo com a sutura sagital, com limites anterior, lateral e posterior definidos pela sutura coronal, região temporal e sutura lambdoide, respectivamente.

Fonte: Cortesia da Prof^a Ana Paula Farnezi Bassi (2022).

2.3.2 Inserção das membranas de colágeno porcino

Os defeitos críticos cirúrgicos confeccionados em cada animal foi devidamente preenchido com sangue (sangramento espontâneo do leito) e recoberto com uma das membranas (Bio-Gide® ou Ossix Plus®). Ambas as apresentações de membranas colágenas foram medidas com régua estéril e recortadas para padronização quadrangular de dimensões 10x10mm, medida suficiente para ser aplicada na superfície óssea e recobrir todo o diâmetro (8mm) do defeito crítico produzido. Foram mantidas margens de 2mm de excesso das membranas, nas quatro direções próximas ao osso nativo [10,21,22] (Figura 2K).

2.3.3 Finalização do procedimento cirúrgico

Após a inserção das membranas colágenas, a hemostasia local de cada cirurgia foi averiguada. Para a síntese dos tecidos moles, foi realizada a reaproximação e estabilização das camadas profundas, através de suturas interrompidas simples, com fio de poliglactina 910 4-0 (Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), e para o plano externo, foram realizadas suturas

interrompidas, com fio monofilamentar de nylon 5-0 (Mononylon Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, SP, Brasil) [10,21,22] (Figura 2L).

No pós-operatório imediato, cada animal recebeu uma dose única intramuscular de 0,2mL de penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil). Após o procedimento cirúrgico e até o momento da eutanásia, os cuidados com a limpeza das gaiolas e avaliação dos animais foram mantidos [10,21,22].

2.4 Análise macroscópica

Para a seleção das peças e padronização do estudo, após a coleta das calvárias, aos 60 dias pós-operatórios, foi realizada uma análise macroscópica das amostras destinadas à análise microtomográfica (n=8), com a finalidade de identificar a ausência ou presença da membrana nos defeitos críticos.

2.5 Eutanásia

Aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, os animais (n=32) foram sacrificados por sobredose anestésica (100 mg/kg, Tiopental Cristália Ltda.; Itapira, SP, Brasil). As calvárias foram coletadas e a região das calotas cranianas foram reduzidas [10,21,22].

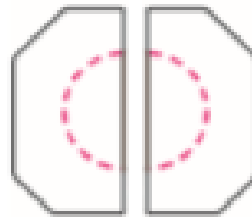
2.6 Armazenamento das peças

As amostras foram fixadas em formol a 10% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas. Para realização da análise histomorfométrica, as peças (n=24) passaram pelo processo de descalcificação em EDTA 20% por 6 semanas e, para análise microtomográfica (n=8), as amostras foram armazenadas em álcool 70% até o dia da avaliação [10,21,22].

2.7 Análise histomorfométrica

Após o processamento de descalcificação por EDTA 20%, as calvárias de cada grupo (n=12), nos respectivos períodos (BG 15 dias, n=4; BG 30 dias, n=4; BG 60 dias, n=4; OS 15 dias, n=4; OS 30 dias, n=4; e OS 60 dias, n=4), foram longitudinalmente seccionadas ao meio, separando-se o defeito ósseo produzido (Figura 4). Posteriormente, estas foram desidratadas numa sequência crescente de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A partir dos blocos obtidos, foram confeccionados cortes de 5µm pelo micrótomo (Leica Biosystems – RM2125 RTS, Heerbrugg, Suíça) (Figura 5). Na sequência, os cortes foram inseridos em lâminas histológicas e o conjunto (corte + lâmina) foi corado com hematoxilina, por 8 minutos, e eosina 1%, por 20 segundos [22-24].

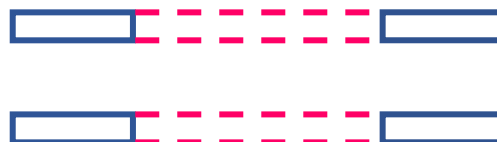
Figura 4 – Representação esquemática do corte longitudinal das calvárias



Separação da calvária em duas partes iguais, respeitando os limites do defeito ósseo, para a inclusão no mesmo bloco de parafina.

Fonte: Cortesia da Profª Ana Paula Farnezi Bassi (2022).

Figura 5 – Representação esquemática dos cortes de 5µm produzidos pelo micrótomo



Corte representativo realizado a partir dos blocos de parafina obtidos para inserção em lâmina histológica.

Fonte: Cortesia da Profª Ana Paula Farnezi Bassi (2022).

Após a coloração, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, St. Gallen, Suíça), com ampliação de 20x, para captura de imagens da região central dos defeitos críticos, tomando como referência os segmentos ósseos remanescentes; as imagens foram armazenadas em formato TIFF.

As imagens foram transportadas ao software ImageJ (Image Processing and Analysis Software, Bathesda, MD, EUA), onde foi realizada a mensuração da área óssea neoformada para as diferentes membranas colágenas utilizadas nos defeitos críticos produzidos. Com a ferramenta “*grid*”, foi criada uma grade de 567 pontos, correspondendo a 100% da imagem e, a partir do número de pontos marcados, foi obtido um resultado percentual através da regra de três simples. Foram mensuradas a área percentual dos parâmetros de tecido ósseo, tecido conjuntivo, membrana colágena e outros (vasos sanguíneos e espaços em branco) [22-24].

Os dados coletados foram analisados de forma qualitativa e os valores quantitativos foram submetidos à estatística, com significância de $p < 0,05$.

2.8 Análise microtomográfica

Através do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica, 2003), as peças de cada grupo (BG, $n=4$ e OS, $n=4$) foram escaneadas por meio de cortes de $6\mu\text{m}$ de espessura, utilizando-se filtro de Al 0,5, passo de rotação de 0.6mm, resolução de 2016×2016 pixels, com energia da fonte de radiação programada a 70kV e corrente de 142uA, totalizando o tempo de 48 minutos de escaneamento por amostra. As imagens obtidas pelas projeções dos raios-X foram armazenadas em formato TIFF e posteriormente reconstruídas, determinando-se a área de interesse, pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), configurado com *smoothing* de 5, *ring artifacts correction* de 7, *beam hardening correction* a 30%, faixa de imagem dinâmica mínima de 0.0028 e máxima de 0.11, viabilizando imagens ideais para a análise proposta [11,22].

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), as imagens foram reconstruídas para adequação e posicionamento padrão das amostras nos eixos X, Y e Z (coronal X-Z, sagital Z-Y e transaxial X-Y). Na sequência, estas foram alinhadas em relação ao plano sagital mediano de cada calota craniana. A partir do novo dataset

adquirido, as imagens foram analisadas e a região de interesse (ROI) foi definida (formato circular de 7,99mm) [11,22].

Através do software CT Analyser (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0), as imagens foram acessadas para a avaliação do volume ósseo neoformado. Após a análise de todas as amostras e identificação dos slices com evidência clara de formação óssea, foi determinada a aplicação de 30 slices por peça, posicionados no sentido superoinferior; com o ROI (7,99mm) ao centro do defeito crítico (8mm) em cada uma das 30 camadas; cada slice foi definido para 0,022mm de espessura pelo próprio software. Para qualidade e nitidez das imagens no histograma de análise, por meio da ferramenta de interpolarização adaptativa, na aba de seleção binária, foi determinado o valor máximo (57%) e mínimo (16%) de indexação da escala de cinza para aquisição do volume de interesse (VOI), de formato sólido geométrico cilíndrico, padronizado a 32,99mm³. Desta forma, a pré-visualização da morfometria do volume ósseo da região de interesse foi disponibilizada para análise em formato CSV, para planilha no software OpenOffice.org 1.1 [11,22].

Com finalidade didática e ilustrativa, a reconstrução e manipulação das amostras em três dimensões foi realizada no software CTvox (SkyScan, Versão 2.7). Para caracterização da microarquitetura óssea, a partir dos VOIs de cada grupo obtidos, uma média de valores foi utilizada para os parâmetros de volume ósseo (BV, em mm³), porcentagem de volume ósseo (BV/TV, em %), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th, em mm), separação de trabéculas (Tb.Sp, em mm), número de trabéculas (Tb.N, em 1/mm) e superfície de intersecção (i.S, em mm²) [11,22,25].

Os dados foram coletados e submetidos à análise estatística, com nível de significância para $p < 0,05$.

2.9 Análise estatística

Os testes estatísticos da análise qualitativa histométrica e da análise microtomográfica foram realizados no software GraphPad Prism® 7.04 (La Jolla, CA, USA). Para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos, foram aplicados os testes de normalidade e homoscedasticidade (Shapiro-Wilk). Posteriormente, os dados foram submetidos ao teste One-Way ANOVA, seguidos do pós-teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Análise histomorfométrica

3.1.1 Análise qualitativa

3.1.1.1 Bio-Gide® (BG)

15 DIAS: Foi observada uma grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo na periferia do defeito crítico, permeado por uma pequena quantidade de matriz óssea neoformada, circundada por osteoblastos, em grau inicial de mineralização. Vasos sanguíneos foram identificados e uma pequena quantidade de membrana colágena foi localizada (Figura 6A).

30 DIAS: Na região central do defeito crítico, foi observada uma quantidade superior de matriz óssea em grau avançado de mineralização, permeada por tecido conjuntivo frouxo. Uma pequena quantidade da membrana colágena foi identificada próxima às localidades da matriz óssea (Figura 6B).

60 DIAS: A matriz óssea de tecido organizado e osteócitos em suas lacunas foi notoriamente observada, entremeada por pequena quantidade de tecido conjuntivo denso e partículas de membrana colágena (Figura 6C).

3.1.1.2 Ossix Plus® (OS)

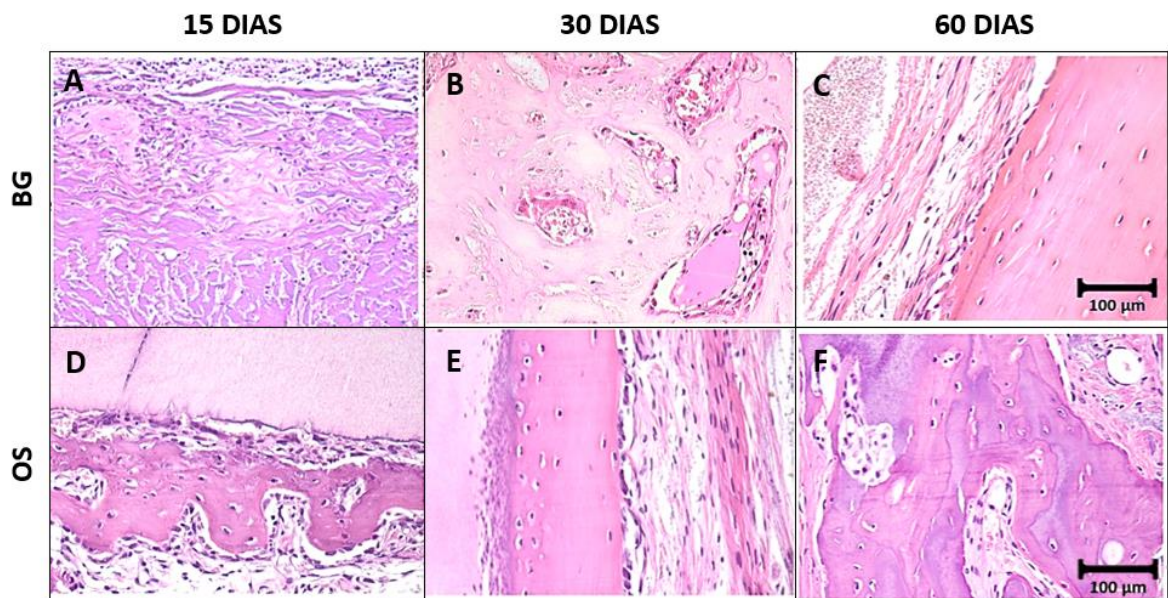
15 DIAS: Na periferia do defeito crítico, foi possível observar uma grande quantidade de membrana colágena, permeada por uma ínfima camada de matriz óssea neoformada, circundada por osteoblastos, em grau inicial de mineralização. No seguimento central do defeito, foi detectada uma quantidade moderada de tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos (Figura 6D).

30 DIAS: Foi observada uma predominância de matriz óssea em grau avançado de maturação permeada por tecido conjuntivo. Foram identificadas quantidades razoáveis de membrana colágena e discreta quantidade de tecido conjuntivo frouxo (Figura 6E).

60 DIAS: Uma grande quantidade de matriz óssea, com presença de tecido organizado e osteócitos em suas lacunas, foi observada na região central do defeito

crítico. Ainda, uma quantidade considerável de membrana colágena foi encontrada, além de tecido conjuntivo frouxo (Figura 6F).

Figura 6 – Imagens representativas histológicas



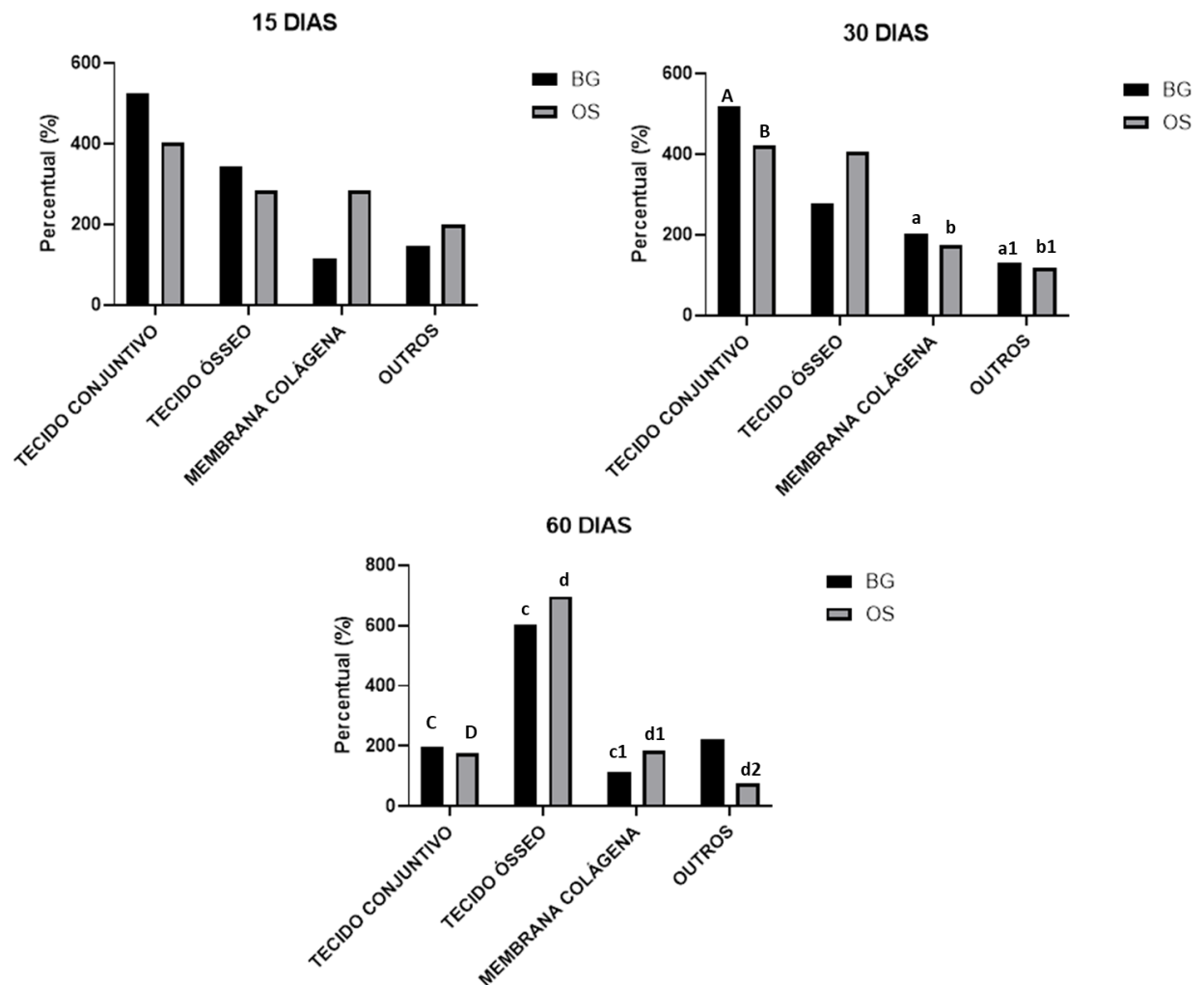
Coloração das lâminas por hematoxilina e eosina em aumento de 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

3.1.2 Análise quantitativa

Em relação aos dados quantitativos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as membranas BG e OS nos diferentes períodos estudados. Aos 30 dias pós-operatórios, houve estatística significativa intragrupos entre os parâmetros de tecido conjuntivo, membrana colágena e outros, tanto para BG (tecido conjuntivo x membrana colágena, com $p=0,0009$; e tecido conjuntivo x outros, com $p=0,0001$), quanto para OS (tecido conjuntivo x membrana colágena, com $p=0,0216$; e tecido conjuntivo x outros, com $p=0,0144$). O mesmo padrão de significância estatística intragrupos foi observado no período de 60 dias, em todos os parâmetros avaliados (membrana BG: tecido conjuntivo x tecido ósseo, com $p=0,0203$; e tecido ósseo x membrana colágena, com $p=0,0001$; membrana OS: tecido conjuntivo x tecido ósseo, com $p=0,0001$; tecido ósseo x membrana colágena, com $p=0,0001$; e tecido ósseo x outros, com $p=0,0001$) (Figura 7).

Figura 7 – Histometria dos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios



Valores médios percentuais para os diferentes parâmetros nos períodos pós-operatórios analisados. As letras representam diferença estatística com $p < 0,05$. Aos 30 dias: A x a, $p = 0,0009$; A x a1, $p = 0,0001$; A x a2, B x b, $p = 0,0216$; B x b1, $p = 0,0144$. Aos 60 dias: C x c, $p = 0,0203$; c x c1, $p = 0,0001$; D x d, $p = 0,0001$; d x d1, $p = 0,0001$; d1 x d2, $p = 0,0001$.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

3.2 Análise macroscópica

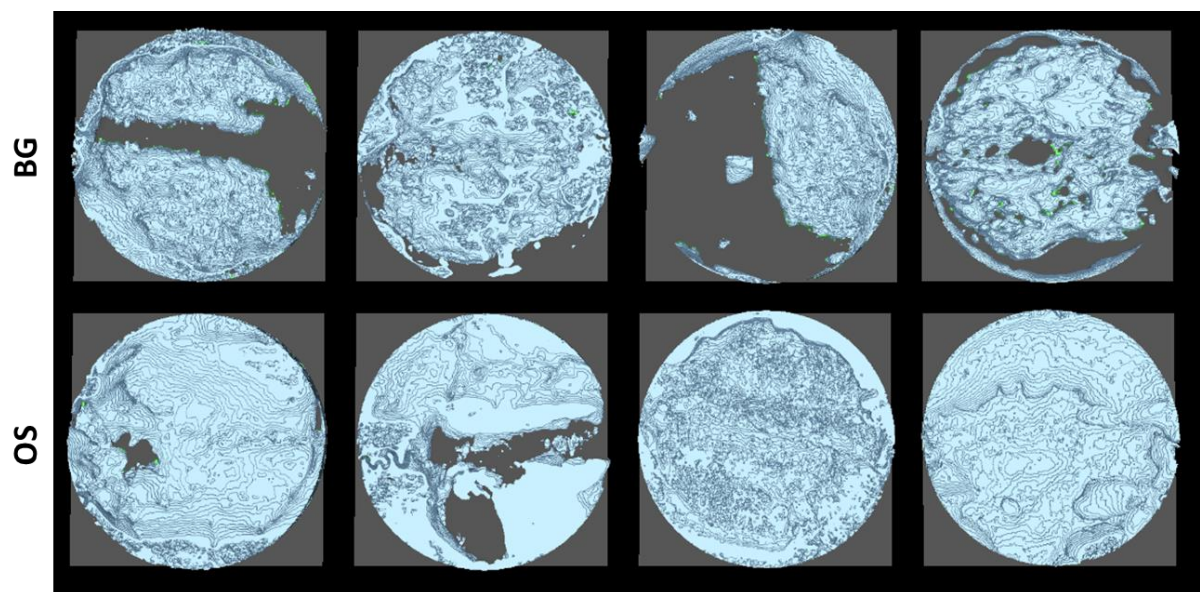
Aos 60 dias pós-operatórios, no momento da eutanásia, tanto para o grupo BG, quanto para o grupo OS, não foram identificadas alterações teciduais inflamatórias. Ainda, foi observado que no grupo BG a membrana foi totalmente reabsorvida, e que no grupo OS, havia remanescentes da membrana posicionados sobre o defeito ósseo.

3.3 Análise microtomográfica

Com finalidade didática, as imagens representativas da análise microtomográfica foram tridimensionalmente reconstruídas (Figura 8).

Referente aos parâmetros de BV (Figura 9A), BV/TV (Figura 9B), Tb/Th (Figura 9C) e i.S (Figura 9F), os valores médios do grupo OS ($p < 0,05$) foram superiores aos do grupo BG ($17,33 \pm 1,74 \text{ mm}^3 \times 8,06 \pm 1,26 \text{ mm}^3$; $45,67\% \times 23,69\%$; $0,214 \text{ mm} \times 0,105 \text{ mm}$ e $29,97 \text{ mm}^2 \times 16,05 \text{ mm}^2$, respectivamente). Em contrapartida, para os parâmetros Tb.Sp (Figura 9D) e Tb.N (Figura 9E), os valores médios absolutos foram superiores para o grupo BG ($p > 0,05$), $0,285 \text{ mm}$ para OS e $0,357 \text{ mm}$ para BG, $2,162 \text{ 1/mm}$ para OS e $2,199 \text{ 1/mm}$ para BG, respectivamente.

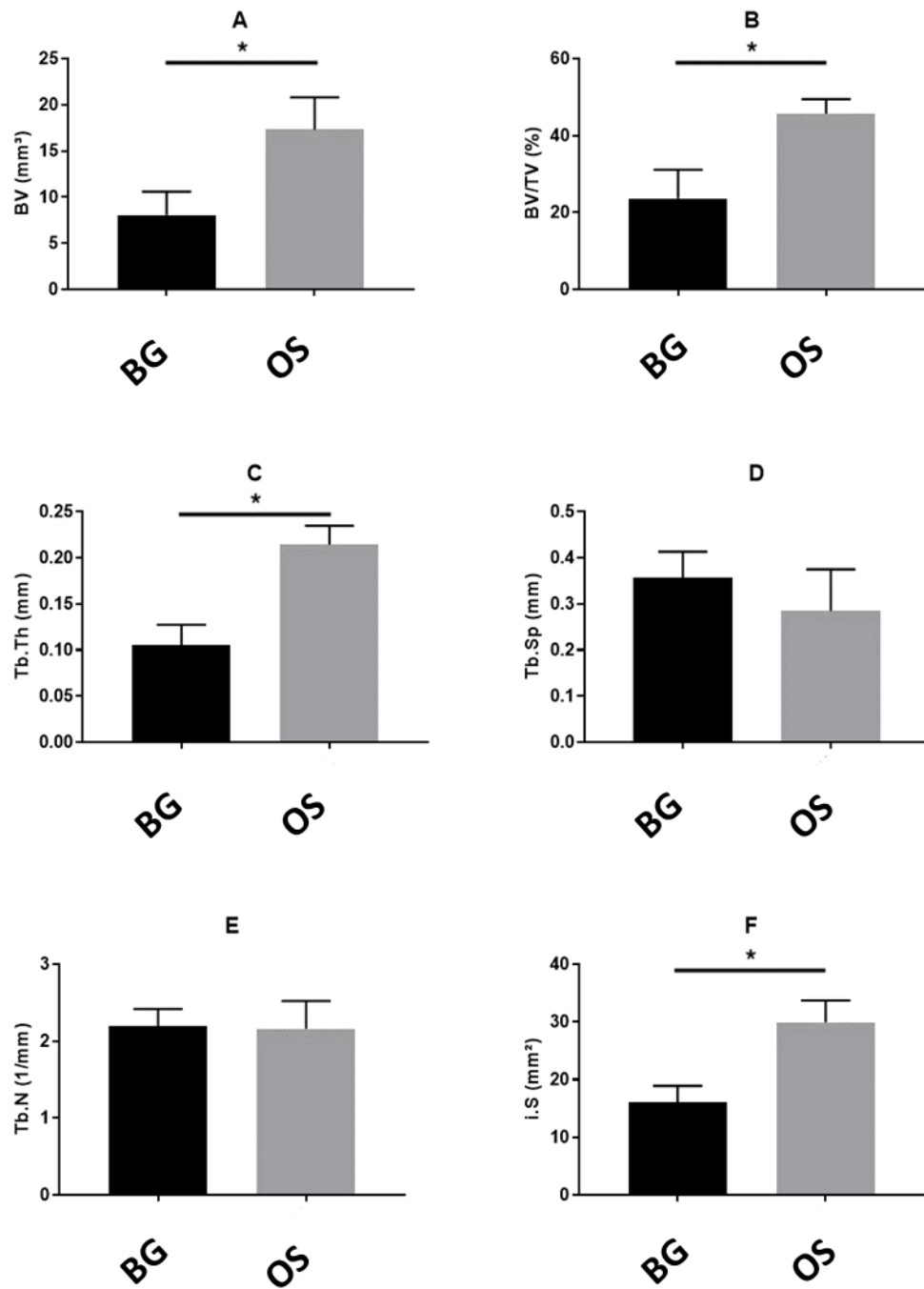
Figura 8 – Reconstrução tridimensional das amostras



Reconstruções tridimensionais da região dos defeitos críticos para BG e OS pelo software CT Analyser.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022).

Figura 9 – Parâmetros da análise microtomográfica



Valores médios e desvio padrão de BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N e i.S. * Indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento da neoformação óssea frente às membranas de colágeno porcino Bio-Gide® (BG) e Ossix Plus® (OS) em defeitos críticos de calvária. Em estudos prévios, a membrana colágena BG demonstrou solidez e eficácia em resultados pré-clínicos, sendo seguramente utilizada como modelo controle comparativo das demais membranas comercialmente disponíveis, pouco exploradas em âmbito científico [10,11,13,16].

Para avaliação da efetividade da membrana colágena Ossix Plus®, foram realizadas análises em períodos iniciais, intermediários e finais da remodelação óssea, a fim de se caracterizar e comparar o grau de maturidade dos tecidos na utilização das duas membranas. De modo geral, tanto a membrana BG, quanto a membrana OS, foram satisfatórias na condução da neoformação óssea dos defeitos críticos de calvária produzidos, contudo, os resultados revelaram alterações consideráveis nos períodos estudados.

Os resultados histomorfométricos não demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre as membranas Bio-Gide® e Ossix Plus® nos períodos avaliados. Porém, com os valores médios absolutos, foi evidenciada a maior presença de tecido ósseo para a membrana BG comparada a membrana OS aos 15 dias pós-operatórios. Esse dado corrobora com Chandra e cols, 2020, que analisaram histologicamente o comportamento da membrana Ossix Plus® em detrimento de uma membrana não reticulada (Pro-Tiss®), acomodadas em perfurações bilaterais em seio maxilar de ratos aos 14 dias pós-operatórios, que relataram uma regeneração óssea significativa ($p < 0,05$) dos defeitos tratados com Pro-Tiss®. Entretanto, no presente estudo, neste mesmo período, a membrana colágena OS exibiu maior valor médio absoluto de integridade do que BG, sugerindo-se um potencial fator osteocondutivo da membrana OS nos períodos iniciais de neoformação óssea, favorecendo a adesão, migração, diferenciação e proliferação osteoblástica, corroborando com achados *in vitro* de Spinell e cols, 2019, que avaliaram o potencial de proliferação celular de células mesenquimais e do ligamento periodontal das membranas Bio-Gide® e Ossix Plus® durante 7 dias, onde a membrana Ossix Plus® apresentou valores expressivamente maiores de absorbância destas células frente à membrana não reticulada Bio-Gide® [11, 26, 27].

Já aos 30 e 60 dias, o padrão do tecido ósseo neoformado permaneceu com valores médios absolutos superiores para OS, bem como os valores da integridade da membrana aos 60 dias pós-operatórios, o que pode ser justificado pela maior resistência desta às enzimas colagenolíticas devido à tecnologia de reticulação “Glymatrix®” patenteada pelo fabricante, uma vez que esses dados também fundamentam a presença de fragmentos macroscópicos de Ossix Plus® na eutanásia de 60 dias, confirmando a função de barreira temporária, com eficiência de até 8 semanas e de resultados satisfatórios [11, 26, 28, 29]. Ainda, a maior presença de membrana colágena aos 60 dias pós-operatórios poderia beneficiar a continuidade do *turnover* ósseo na região do defeito crítico, dado que a membrana OS é constitutivamente passível de ossificação, em detrimento à BG, em que apenas a camada porosa favorece a quimiotaxia celular de proteínas morfogênicas ósseas [11, 30].

No que se refere à análise microtomográfica aos 60 dias pós-operatórios, ambas as membranas desempenharam bons resultados no processo de reparo ósseo do defeito crítico realizado [11]. No entanto, a membrana OS evidenciou valores superiores para os parâmetros de BV, BV/TV, Tb.Th e i.S ($p < 0,05$), comprovando uma melhor atuação sobre o processo de neoformação óssea quando comparada à membrana BG, fundamentando os achados histológicos, histométricos e macroscópicos deste estudo, como também, confirmando uma microarquitetura óssea de qualidade superior para a membrana colágena Ossix Plus®.

Ante aos resultados superiores da membrana BG para Tb.Sp e Tb.N ($p > 0,05$), pode-se inferir que a qualidade óssea ao final do processo de maturação foi compensada pelo maior número de trabéculas encontradas, porém, de qualidade inferior, dado que há um maior espaçamento entre estas. Ainda, há de se correlacionar o menor valor médio absoluto histométrico da membrana BG neste período, uma vez que, com menor grau de indução óssea, menores os índices de remodelação e, consequentemente, menor a qualidade do tecido ósseo neoformado.

Neste estudo, intencionalmente, não foram utilizados biomateriais para o preenchimento do defeito crítico produzido em razão da análise do desempenho isolado das diferentes membranas utilizadas. O êxito de membranas absorvíveis já é descrito na literatura, porém, a vulnerabilidade à degradação do colágeno ainda é um fator deliberativo em pesquisas científicas [11, 26]. Com o objetivo de desenvolver

maior resistência às ações proteolíticas de macrófagos e leucócitos oriundas do processo inflamatório, a reticulação do colágeno tem como premissa retardar esse prejuízo [31]. As membranas de colágeno porcino utilizadas foram a Bio-Gide®, composta por colágenos tipo I e III, sem reticulação ou qualquer aditivo químico, e a Ossix Plus®, fabricada a partir da reticulação do colágeno tipo I modificado por ribose [32]. A literatura sugere que membranas compostas por colágeno não reticulado apresentam resistência deficiente, sendo rapidamente degradadas [33].

O processo de neoformação óssea ao longo dos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios parece ser semelhante para as duas membranas colágenas estudadas. Esse pressuposto pode ser validado mediante aos níveis análogos dos parâmetros de tecido conjuntivo, tecido ósseo e de membrana colágena, como também, através dos dados estatísticos significantes intragrupos expressados. Esse achado parece ser controverso quanto ao eminente potencial de reparação óssea da membrana Ossix Plus®, porém, a partir do comportamento padrão observado, compreende-se que esta dispõe da mesma competência da membrana padrão Bio-Gide®. Ademais, os valores médios absolutos dos parâmetros da análise histométrica ao longo dos períodos, associados aos dados macroscópicos e microtomográficos de 60 dias certificam uma dinâmica singular de ação da membrana porcina avaliada (Ossix Plus®).

Ainda que este estudo tenha limitações quanto ao modelo experimental em animais, ao não preenchimento do defeito crítico com biomateriais e aos parâmetros bi e tridimensionais (análise histométrica x análise microtomográfica) comparados, foi possível verificar a manutenção estrutural das duas membranas ao longo dos 60 dias pós-operatórios, com obliteração do defeito crítico com osso neoformado. Apoiando-se nos resultados obtidos, com a menor suscetibilidade às ações fagocitárias, dados de neoformação óssea superiores e maior índice de estabilidade estrutural no final do processo de remodelação, a membrana Ossix Plus® parece ser um biomaterial de potencial desempenho como barreira estabilizadora para os processos de ROG. No entanto, mais estudos poderiam agregar as informações pré-estabelecidas de comportamento e atividade da membrana Ossix Plus® frente ao processo de neoformação óssea.

5 CONCLUSÃO

O desempenho da membrana OS foi notoriamente superior para a neoformação óssea em defeitos críticos de calvária de ratos. Através dos resultados obtidos pela análise histomorfométrica, a membrana OS demonstrou padrão de neoformação óssea proeminente à membrana controle positivo BG, porém, apenas aos 15 dias, a membrana BG revelou escore quantitativo ósseo discretamente maior ($p>0.05$), sugerindo adaptação inicial ao leito do hospedeiro mais adequada. A membrana OS revelou ainda indícios de menor percentual de degradação ao longo deste processo, como também, de promover melhor qualidade óssea, confirmada pela análise microtomográfica, sendo assim, uma membrana potencial de otimização do processo de regeneração óssea guiada.

REFERÊNCIAS

1. Thrivikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dent Clin North Am*. 2017 Oct;61(4):835-56. doi: 10.1016/j.cden.2017.06.003.
2. Depalle B, Qin Z, Shefelbine SJ, Buehler MJ. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015 Dec;52:1-13. doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.07.008.
3. Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996 Apr;54(4):420-33. doi: 10.1016/s0278-2391(96)90113-5.
4. Borie E, Fuentes R, Del Sol M, Oporto G, Engelke W. The influence of FDBA and autogenous bone particles on regeneration of calvaria defects in the rabbit: a pilot study. *Ann Anat*. 2011 Oct 20;193(5):412-7. doi: 10.1016/j.aanat.2011.06.003.
5. Behfarnia P, Khorasani MM, Birang R, Abbas FM. Histological and histomorphometric analysis of animal experimental dehiscence defect treated with three bio absorbable GTR collagen membrane. *Dent Res J*. 2012 Sep;9(5):574-81. doi: 10.4103/1735-3327.104876.
6. Simion M, Misitano U, Gionso L, Salvato A. Treatment of dehiscences and fenestrations around dental implants using resorbable and nonresorbable membranes associated with bone autografts: a comparative clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Mar-Apr;12(2):159-67. PMID: 9109265.
7. Friedmann A, Strietzel FP, Maretzki B, Pitaru S, Bernimoulin JP. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Dec;13(6):587-94. doi: 10.1034/j.1600-0501.2002.130603.x.
8. Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology*. 2008 Jul;96(1):1-11. doi: 10.1007/s10266-008-0087-y.
9. Coïc M, Placet V, Jacquet E, Meyer C. Propriétés mécaniques des membranes de collagène [Mechanical properties of collagen membranes used in guided bone regeneration: a comparative study of three models]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2010 Nov-Dec;111(5-6):286-90. doi: 10.1016/j.stomax.2010.10.006.

10. Farnezi Bassi AP, Bizelli VF, Brasil LFM, Pereira JC, Al-Sharani HM, Momesso GAC, Faverani LP, Lucas FA. Is the bacterial cellulose membrane feasible for osteopromotive property? *Membranes (Basel)*. 2020 Sep 12;10(9):230. doi: 10.3390/membranes10090230. PMID: 32932731; PMCID: PMC7558580.
11. Baek YJ, Kim JH, Song JM, Yoon SY, Kim HS, Shin SH. Chitin-fibroin-hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration: micro-computed tomography evaluation in a rat model. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2016 Mar;38(1):14. doi: 10.1186/s40902-016-0060-6.
12. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. 2017 Oct;125(5):315-37. doi: 10.1111/eos.12364. Epub 2017 Aug 19. PMID: 28833567; PMCID: PMC5601292.
13. Jiménez García J, Berghezan S, Caramês JMM, Dard MM, Marques DNS. Effect of cross-linked vs non-cross-linked collagen membranes on bone: a systematic review. *J Periodontal Res*. 2017 Dec;52(6):955-64. doi: 10.1111/jre.12470.
14. Pilger AD, Schneider LE, Silva GM, Schneider KCC, Smidt R. Membranes and barriers for guided bone regeneration. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2020;19(3):441-8.
15. Piattelli A, Scarano A, Russo P, Matarasso S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. *Biomaterials*. 1996 Apr;17(8):791-6. doi: 10.1016/0142-9612(96)81416-5.
16. Song JM, Shin SH, Kim YD, Lee JY, Baek YJ, Yoon SY, Kim HS. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. *Int J Oral Sci*. 2014 Jun;6(2):87-93. doi: 10.1038/ijos.2014.16.
17. Blatt S, Burkhardt V, Kämmerer PW, Pabst AM, Sagheb K, Heller M, Al-Nawas B, Schiegnitz E. Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis in vitro and in vivo. *Clin Oral Investig*. 2020 Oct;24(10):3425-3436. doi: 10.1007/s00784-020-03213-8.
18. Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobbato L, Bressan E, Nastri L. Selection of collagen membranes for bone regeneration: a literature review. *Materials*. 2020 Feb;13(3):786. doi: 10.3390/ma13030786.
19. Kim YK, Ku JK. Guided bone regeneration. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2020 Oct;46(5):361-6. doi: 10.5125/jkaoms.2020.46.5.361.

20. Maciel J, Momesso GA, Ramalho-Ferreira G, Consolaro RB, Perri de Carvalho PS, Faverani LP, Farnezi Bassi AP. Bone healing evaluation in critical-size defects treated with xenogenous bone plus porcine collagen. *Implant Dent.* 2017 Apr;26(2):296-302. doi: 10.1097/ID.0000000000000572.
21. Luvizuto ER, Tangl S, Dobsak T, Reich K, Gruber R, Sonoda CK, Okamoto R. Effect of recombinant PDGF-BB on bone formation in the presence of β -tricalcium phosphate and bovine bone mineral matrix: a pilot study in rat calvarial defects. *BMC Oral Health.* 2016 May;16(1):52. doi: 10.1186/s12903-016-0210-3.
22. Fabris ALDS, Faverani LP, Gomes-Ferreira PHS, Polo TOB, Santiago-Júnior JF, Okamoto R. Bone repair access of BoneCeramic™ in 5-mm defects: study on rat calvaria. *J Appl Oral Sci.* 2018 Jan ;26:e20160531. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0531.
23. Grossi-Oliveira G, Faverani LP, Mendes BC, Braga Polo TO, Batista Mendes GC, de Lima VN, Ribeiro Júnior PD, Okamoto R, Magro-Filho O. Comparative evaluation of bone repair with four different bone substitutes in critical size defects. *Int J Biomater.* 2020 May;2020:5182845. doi: 10.1155/2020/5182845.
24. Siqueira NB, de; Silva, A.C.E. da; Pereira, R. dos S.; Hochuli-Vieira, E.; Lisboa-Filho, P.N.; Deus, C.B.D. de; Okamoto, R. Different responses of heterogeneous graft presentations in bone reconstructions during sinus lift elevation surgery: an immunolabeling and histomorphometric study performed in rabbits. *Front Oral Maxillofac Med.* 2022;4:1-13. doi: 10.21037/fomm-21-45.
25. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
26. Chandra RV, Sneha K, Reddy AA. Non-cross-linked versus cross-linked collagen membrane in maxillary sinus perforation repair: a comparative histologic study in a rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2020;35(1):91–9. doi: 10.11607/jomi.7600.
27. Spinell T, Saliter J, Hackl B, Unger K, Hickel R, Folwaczny M. In-vitro cytocompatibility and growth factor content of GBR/GTR membranes. *Dent Mater.* 2019 Jul;35(7):963-9. doi: 10.1016/j.dental.2019.03.011.
28. Raz P, Brosh T, Ronen G, Tal H. tensile properties of three selected collagen membranes. *Biomed Res Int.* 2019;2019:5163603. doi: 10.1155/2019/5163603.
29. Borges CD, Faria PEP, Pessôa de Oliveira PGF, Sales de Melo Soares M, Ricoldi MST, Costa MS, Novaes Júnior AB, Tambasco de Oliveira P, Taba Júnior M.

- Influence of collagen membrane on bone quality in titanium mesh reconstructions- Study in rats. *J Periodontol.* 2020 Dec;91(12):1673-81. doi: 10.1002/JPER.19-0399.
30. Sheikh Z, Qureshi J, Alshahrani AM, Nassar H, Ikeda Y, Glogauer M, Ganss B. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. *Odontology.* 2017 Jan;105(1):1-12. doi: 10.1007/s10266-016-0267-0.
 31. Danieleto-Zanna CF, Bizelli VF, Ramires GADA, Francatti TM, Carvalho PSP, Bassi APF. Osteopromotion capacity of bovine cortical membranes in critical defects of rat calvaria: histological and immunohistochemical analysis. *Int J Biomater.* 2020:6426702. doi: 10.1155/2020/642670.
 32. Ottenbacher N, Alkildani S, Korzinskas T, Pissarek J, Ulm C, Jung O, Sundag B, Bellmann O, Stojanovic S, Najman S, Zechner W, Barbeck M. Novel histomorphometrical approach to evaluate the integration pattern and functionality of barrier membranes. *Dent J.* 2021 Oct 25;9(11):127. doi: 10.3390/dj9110127.
 33. Bozkurt A, Apel C, Sellhaus B, van Neerven S, Wessing B, Hilgers RD, Pallua N. Differences in degradation behavior of two non-cross-linked collagen barrier membranes: an in vitro and in vivo study. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Dec;25(12):1403-11. doi: 10.1111/clr.12284.

ANEXOS

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 **"Regeneração óssea de defeito crítico em calvárias de ratos fazendo uso de dois tipos de membranas de colágeno: análise histométrica, microtomográfica, imunoistoquímica e perfil inflamatório"**, Processo FOA nº 0402-2022, 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 30 de Maio de 2022.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 15 de Junho de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 16 de Julho de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Bone regeneration of critical defect in calvaria of mice using two types of membranes collagen: histometric, microtomographic, immunohistochemistry and inflammatory profile"**, Protocol FOA nº 0402-2022, 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 May 30, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 15, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 15, 2023.

Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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