



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

STÉFANI CAROLINE FERRIOLLI

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOPROMOTORA DE
MEMBRANAS NACIONAIS DE PERICÁRDIO BOVINO NO
PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

Araçatuba
2023

STÉFANI CAROLINE FERRIOLLI

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOPROMOTORA DE
MEMBRANAS NACIONAIS DE PERICÁRDIO BOVINO NO
PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – UNESP”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração em Implantodontia.

Orientadora: Profa. Assoc. Ana Paula Farnezi Bassi

**Araçatuba
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F393c Ferriolli, Stéfani Caroline.
Comparação da atividade osteopromotora de membranas nacionais de pericárdio bovino no processo de regeneração óssea guiada / Stéfani Caroline Ferriolli. - Araçatuba, 2023
84 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Ana Paula Farnezi Bassi

1. Regeneração óssea 2. Materiais biocompatíveis
3. Osso e ossos 4. Membranas I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser fundamental em minha vida, meu guia, sempre presente na hora de angústia e alegria. Aos meus pais Simone Ferriolli e Júlio César Ferriolli, com todo amor, admiração e gratidão pelo incansável apoio ao longo de toda minha jornada e por fazerem sempre de tudo para que esse sonho fosse possível. Vocês são (e sempre serão) meus maiores e melhores exemplos. Amo muito vocês, infinitamente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, meu melhor amigo e refúgio nas horas mais difíceis. Quem sonhou comigo cada parte dessa trajetória de uma forma única, confiou em mim para trilhá-lo e me ajudou em cada momento, até mesmo quando nem eu achei que seria capaz. Eu não tenho palavras para agradecer a Sua Misericórdia e Seu Amor para comigo. Mesmo que eu não mereça, sempre está ali me amando, me guiando e me permitindo viver sua infinita misericórdia, todos os dias.

Aos meus pais, a quem dedico todo meu esforço e trajetória até aqui, meus maiores exemplos de determinação. Obrigada por todo amor, paciência, apoio e educação. Por toda a compreensão nos momentos em que estive ausente para tornar esse sonho real. Pelos ensinamentos desde o início de minha vida, construindo a pessoa que sou hoje, espero um dia retribuir tudo que me foi oferecido. Minha mãe, Simone de Paula Ferriolli, por toda insistência e cuidado comigo sempre e por ter confiado em mim. Meu Pai, Júlio César Ferriolli, por todos os conselhos, por sempre incentivar e apoiar cada decisão em minha vida e por todo apoio de vocês nessa jornada. A minha irmã e também pesquisadora Dra. Évelin Ferriolli, minha parceira de profissão, muito obrigada por todo apoio, incentivo, pelo amor a nossa família e por se fazer presente mesmo de longe.

As Minhas amigas; Mirela Caroline Silva, Ana Maira Pereira Baggio, Fernanda Camillo, Beatryce Sanchez, Ana Carolina Ribeiro, Camila Carneiro, por estarem sempre ao meu lado, em especial a Lorena Macedo e minha companheira de casa Isadora Delfraro que sempre me apoiaram e ajudaram nas horas mais difíceis. Ao meu amigo Murilo de Carvalho, por ser como um irmão, sempre disposto a ajudar e a me ouvir. Meu sincero obrigada a todos vocês, por fazerem parte de tudo isso de uma forma mais do que especial, por todo auxílio, carinho e amizade desde o primeiro até o último dia. Nunca irei me esquecer dos momentos compartilhados.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Glauco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem, pela oportunidade de ser discente de uma instituição tão reconhecida e por onde já passaram grandes nomes da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia.

Ao nosso grupo de pesquisa e todos que contribuem para que nossos projetos aconteçam, em especial ao Doutorando Vinícius Ferreira Bizelli, por todos os ensinamentos durante esses anos, desde os processos laboratoriais às cirurgias de implante, sempre com muita calma e maestria, foi uma honra enorme aprender com você. A Edith Umasi Ramos, Izabela Delamura e aos alunos de iniciação científica Bruna S da Costa e Silva, Arthur Viotto, Júlia M. B. da Silva, Natália Izumi e Natália Matos, obrigada por todo carinho e ajuda.

A minha orientadora Professora. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, por ter me acolhido em suas pesquisas e projetos de extensão, por toda atenção e paciência comigo, pelos ensinamentos e carinho durante toda minha caminhada nesta instituição, desde a época da graduação e principalmente por me ajudar a crescer pessoalmente. Com certeza encerro esse ciclo uma pessoa muito melhor graças a senhora.

A todos os professores do departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP), que contribuíram para essa formação. Em especial ao professor Dr. Leonardo Perez Faverani pelo convívio descontraído, pela amizade e por poder aprender com o senhor diariamente. A professora Dra. Daniela Ponzoni por todo conhecimento e experiências compartilhados, carinho e disposição sempre que precisei. Os senhores são exemplos de educadores.

A professora e querida Elcia Maria Varize Silveira por aceitar compor a banca examinadora e ter disponibilizado esse tempo para se fazer presente nesse momento tão importante. A senhora é um exemplo de professora, profissional e pesquisadora.

Aos meus amigos da pós graduação, em especial ao João Matheus Fonseca e Santos, Stefany Barbosa, Paulo Matheus Honda, Izabella Sol, Harrison Lucho,

Monique Gonçalves e Natália Sanches, sempre compartilhando experiências, conhecimentos no ambulatório e no dia a dia acadêmico com certeza contribuíram para que tudo isso fosse mais alegre, compartilhando experiências, conhecimentos e dividindo

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 do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia Paulo, Marco e Renato, por todos ensinamentos, ajuda e conversas sobre todos os assuntos extra faculdade.

Aos animais, in memoriam, que sacrificaram suas vidas em prol da ciência.

A todos que contribuíram de alguma forma com esse título!

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia”

Robert Collier

FERRIOLLI, S. C. **Comparação da atividade osteopromotora de membranas nacionais de pericárdio bovino no processo de regeneração óssea guiada.** 2023. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O êxito de membranas absorvíveis já é descrito na literatura, porém, sua vulnerabilidade à degradação do colágeno e a estabilidade dimensional reduzida ainda são fatores deliberativos em pesquisas científicas [1-2] tornando pertinente a busca por materiais capazes de suprir essas limitações, bem como também cumprir as exigências para adequada reconstrução físico biológica dos defeitos ósseos. Nesse contexto, as membranas colágenas de pericárdio bovino têm como premissa retardar esse prejuízo e aumentar a resistência mecânica [3-4]. O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial osteopromotor das membranas nacionais de pericárdio bovino recentemente inseridas no mercado, em comparação com a membrana de derme suína amplamente utilizada Bio-Gide® (Geistlich Wohlhusen, Suíça) implantando-as em defeitos críticos criados em calvária de ratos. Foram utilizados 96 ratos Albinus Wistar divididos em 4 grupos, n=: grupo (GC-) controle negativo somente com coágulo; grupo (GT1) que recebeu a membrana de pericárdio bovino (Surgitime Collagen® - Bioinnovation); grupo (GT2): membrana de pericárdio bovino (Techgraft - Baumer®); e grupo controle positivo (GT+): membrana de derme porcina (Bio-Gide®). Cada grupo foi dividido em 04 subgrupos, de acordo com os tempos de eutanásia: 7, 15, 30 e 60 dias. Após a eutanásia, as peças foram processadas e os trâmites laboratoriais realizados para avaliação das análises histomorfométrica, perfil inflamatório e microtomográfica. Os resultados quantitativos e qualitativos obtidos demonstram que as membranas de pericárdio bovino tiveram bom comportamento biológico, promoveram neoformação óssea, e auxiliaram no processo de regeneração óssea guiada, apresentando comportamento biológico semelhante a membrana de derme suína e superior ao grupo controle negativo, fazendo das membranas nacionais Surgitime Collagen® e Techgraft uma alternativa pertinente a membrana de derme suína Bio-Gide® amplamente utilizada nos processos de regeneração óssea guiada.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Materiais biocompatíveis. Osso e ossos Membranas I. T.

FERRIOLLI, S. C. **Comparison of osteopromoting activity of bovine pericardium national membranes in the guided bone regeneration process.** 2023. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The success of absorbable membranes is already described in the literature, however, their vulnerability to collagen degradation and reduced dimensional stability are still deliberative factors in scientific research [1,2] making relevant the search for materials capable of meeting these limitations, as well as meeting the requirements for adequate biological physical reconstruction of bone defects. In this context, bovine pericardium collagen membranes have the premise of delaying this injury and increasing mechanical resistance [3,4]. The objective of this work is to evaluate the osteopromoter potential of bovine pericardium reticulated national membranes recently inserted on the market, in comparison with a widely used non-reticulated pig collagen membrane, Bio-Gide® (Geistlich Wohlhusen, Switzerland) implanting them in critical defects created in rat calvary. Ninety-six Albinus Wistar rats were divided into 4 groups, n=6: group (GC-) negative control only with clot; group (GT1) that received bovine pericardium membrane (Surgitime Collagen® - Bioinnovation); group (GT2): bovine pericardium membrane (Techgraft - Baumer®); and positive control group (GT+): porcine dermis membrane (Bio-Gide®). Each group was divided into 04 subgroups, according to euthanasia times: 7, 15, 30 and 60 days. After euthanasia, the parts were processed and laboratory procedures performed to evaluate histomorphometric, inflammatory profile and microtomographic analyses. The quantitative and qualitative results obtained demonstrate that bovine pericardium membranes had good biological behavior, promoted bone neoformation, and assisted in the guided bone regeneration process, presenting behavior similar to the swine dermis membrane and superior to the control group, making the national membranes Surgitime Collagen® and Techgraft a relevant alternative to bio-gide swine dermis membrane® widely used in guided bone regeneration processes.

Keywords: Regeneração óssea. Materiais biocompatíveis. Osso e ossos Membranas I. T.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros quantitativos do tecido ósseo trabecular obtidos pelo CTAn (Bruker microCT, Kontich, Bélgica) adaptados daqueles preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR).	35
Tabela 2 – Análise por micro-CT após 60 dias.	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura1 - Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representada pela linha tracejada vermelha. 26
- Figura 2 - (A) Defeito crítico de 8mm tido como padrão em todos os grupos. Preenchidos com coágulo sanguíneo e recobertos com a membrana referente a cada grupo: (B) GT1: Surgitime Collagen®; (C) GT2: Techgraft®; (D) GC+: BioGide® e (E) GC-: apenas coágulo 27
- Figura 3 - Software ImageJ utilizado para contagem de células e vasos sanguíneos. Grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica em um aumento da objetiva de 100x. 30
- Figura 4 - Software ImageJ utilizado para calibragem da ferramenta régua na magnificação de escolha para ser realizada a histometria e a seguir a contagem da área óssea através da ferramenta polígono. 41
- Figura 5 - Representação do uso do Software NRecon (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), utilizado para a reconstrução 3D das aquisições realizadas no Microtomógrafo. Na imagem as linhas vermelhas delimitam a área a ser reconstruída e a linha verde indica o centro da região de interesse. 32
- Figura 6 - Ilustração do uso do software DataViewer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), para a determinação do VOI. Após delimitado em uma imagem, o VOI é reproduzido igualmente para todas as outras imagens. 33
- Figura 7 - Representação do ROI utilizando o software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Após a delimitação das camadas a serem analisadas, a forma retângula do ROI é escolhida e adaptada para o tamanho da amostra. 34
- Figura 8 - Representação da escala de cinza utilizada (132-45) no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para indicar a diferença entre osso cortical e trabecular. 34
- Figura 9 - Conversão das camadas escolhidas para a escala de cinza no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para o cálculo dos parâmetros tridimensionais em mm. 35
- Figura 10 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos GT1, GT2, GC+ e GC- em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 4x. 37

Figura 11 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 7 dias de reparo ósseo nas ampliações de 4 e 10x, coloração HE. A- Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) e tecido ósseo neoformado (NO) e membrana colabada (círculo azul); B e D: presença de tecido conjuntivo denso (CD) próximo às bordas do defeito ósseo; C: no centro do defeito presença da membrana (M) entremeada de tecido conjuntivo frouxo (CF) e tecido ósseo neoformado (NO).

38

Figura 12 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 15 dias de reparo ósseo nas ampliações de 4 e 10x Coloração HE. A - Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) e tecido ósseo neoformado (NO); B e D: presença de tecido conjuntivo denso (CD) próximo às bordas do defeito ósseo, com ilhas de neoformação óssea (INO); C: no centro do defeito presença da membrana (M), tecido conjuntivo denso, tecido conjuntivo fibroso e tecido ósseo neoformado (NO).

39

Figura 13 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 15 dias de reparo ósseo nas ampliações de 40 e 100x, coloração HE. Maior aumento grupo (GT1) 15 dias (100x). A: Área de coto apresentando neoformação óssea trabecular e abaixo uma matriz óssea lamelar (seta roxa), com trabéculas (seta azul escuro) preenchidas de tecido frouxo (seta azul claro). A.1: tecido fibroso (seta azul clara); B: Centro com presença da membrana, tecido conjuntivo e abaixo, osso lamelar (seta roxa). B.1 vasos sanguíneos (seta vermelha) e infiltrado inflamatório mononuclear (seta amarela).; C: trabéculas de tecido ósseo lamelar (seta roxa), delimitando cavidades preenchidas por medula óssea (seta preta) e tecido fibroso (seta azul clara). C.1: Matriz óssea neoformada (seta azul escuro).

40

Figura 14 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo SC aos 30 dias de reparo ósseo nas ampliações de 4 e 10x, coloração HE. A- Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea total (NO); B e D tecido ósseo maduro (OM) às margens do defeito com presença ainda de tecido conjuntivo denso. C: ao centro defeito, uma camada de osso maduro na superfície, ao meio matriz óssea neoformada trabecular, entremeado por tecido conjuntivo denso e fragmentos da membrana (M).

41

Figura 15 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: Área de coto apresentando maturação óssea (seta roxa), cavidades preenchidas por medula óssea (seta preta); A.1: osteoblasto (seta azul claro), osteócito (seta marrom). B: Centro com presença de neoformação trabecular (seta azul escuro), B.1: vasos sanguíneos (seta vermelha); C: Maturação do tecido ósseo, C.1: mineralização dos osteóides, confinados dentro das lacunas (seta azul claro); osteoblastos (seta verde), Osteócitos (seta marrom).

42

Figura 16 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 10x, coloração HE. A: Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea total (NO); B, C e D: neoformação óssea (NO) em praticamente todo o defeito, maturação do tecido ósseo em alguns pontos (OM) e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD) em lacunas de neoformação (MON).

43

Figura 17 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo 2T1 aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: Área de coto apresentando osso maduro (seta roxa); A.1: osteócito (seta marrom), canal de Havers (seta cinza). B: Centro fechado quase completamente, com maturação do tecido conjuntivo denso. B.1: mineralização dos osteóides em osteócitos (seta azul claro), osteócito (seta marrom), canal de Havers (seta cinza); C: Tecido ósseo maduro (seta roxa) C.1: cavidades preenchidas por medula óssea (seta preta) apresentando vascularização (seta vermelha), Osteócitos (seta marrom).

44

Figura 18 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com presença de tecido conjuntivo frouxo (CF) e ausência de neoformação óssea; B e D: Cotos com início de neoformação óssea (NO) e maturação do tecido conjuntivo apresentando-se ora denso (CD) ora fibroso (CF), C: ao centro vista da membrana colabada e abaixo tecido conjuntivo frouxo.

45

Figura 19 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: estroma fibroso preenchido por tecido conjuntivo frouxo, células mononucleares (seta azul claro), lacunas preenchidas por medula (seta preta), maturação do tecido ósseo (seta azul escuro). B: tecido conjuntivo frouxo pouco organizado (seta branca). C: neoformação óssea em área de coto e maturação do tecido fibroso (seta branca).

46

Figura 20 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 10 e 40x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e membrana colabada; C e D: Margens com início de neoformação óssea e mineralização do tecido; B presença de tecido conjuntivo frouxo, iniciando o processo de formação óssea; B e D: Margens com início de neoformação óssea.

47

Figura 21 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: Neoformação óssea trabecular entremeada por tecido fibroso (seta branca), A.1 vaso sanguíneo (seta vermelha), estroma fibroso nos espaços trabecular (seta azul clara). B: membrana presente e abaixo dela a maturação do tecido conjuntivo. B.1: osteócito (seta verde), osteoclasto (seta amarela), vasos sanguíneos (seta vermelha). C: neoformação óssea em área de coto e maturação do tecido fibroso em tecido ósseo (seta roxa), osteócito (seta verde).

48

Figura 22 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 10 e 40x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e remanescente da membrana; C e D: Margens com osso maduro, ilhas de neoformação e trabéculas preenchidas por medula; B ao centro presença de tecido conjuntivo denso e fechamento do defeito.

49

Figura 23 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: grande quantidade de osso maduro, A.1 osteoblasto depositando matriz óssea (seta salmão), perióstio (seta branca). B: Tecido conjuntivo envolvendo restos da membrana, trabéculas ósseas (seta azul escuro), estroma fibroso (seta azul claro). B.1: vaso sanguíneo (seta vermelha).

50

C: trabéculas de tecido ósseo lamelar, delimitando cavidades preenchidas (seta preta), osteoclasto (seta amarela), osteócito (seta verde).

Figura 24 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo TG2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea por todo defeito (NO); B e D tecido ósseo maduro (OM) às margens do defeito apresentando ainda de tecido conjuntivo denso (CD); C: ao centro neoformação óssea entremeado por tecido conjuntivo denso, presença de periósteo (seta amarela).

51

Figura 25 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: grande quantidade de osso maduro, diminuição das trabéculas, A.1 osteoclasto (seta amarela), tecido conjuntivo fibroso (seta branca). B: Tecido conjuntivo fibroso na base do defeito, entremeado por um tecido conjuntivo fibroso bem organizado (seta branca) B.1: vaso sanguíneo (seta vermelha). C: osteoclasto (seta amarela), osteócito (seta verde).

52

Figura 26 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo (M) e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CF); B e D: início de formação óssea às margens do defeito (NO), tecido conjuntivo denso (CD); C) diferença nos tecidos abaixo da membrana (M), tecido conjuntivo frouxo e neoformação óssea (NO) entremeada por um conjuntivo denso (CD).

53

Figura 27 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: neoformação óssea nos cotos (seta roxa), maturação do tecido de granulação celularizado (seta amarela), espaços preenchidos por medula hematopoiética (seta preta) A.1 tecido celularizado (seta amarela). B: Membrana íntegra (M), tecido celularizado (seta amarela). B.1: tecido celularizado apresentando células e vasos sanguíneos. C trabéculas ósseas neoformadas (seta roxa), B.1 espaços trabeculares preenchidos de tecido conjuntivo frouxo

54

organizado (seta amarela), osteoblastos depositando matriz óssea (seta salmão) e osteócitos (seta verde).

Figura 28 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo (M) e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CF); B e C: Maturação do tecido ósseo as margens do defeito (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso.

55

Figura 29 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A, C: neoformação óssea nos cotos (seta roxa), maturação do tecido ósseo primário, fibras colágenas dispostas em várias direções. A.1 e B.1: células mononucleares (seta amarela) e vasos sanguíneos (seta vermelha) nas fibras colágenas. C.1 transição do osso primário em osso lamelar trabecular (seta roxa), trabéculas ósseas apresentando espaços de medula hematopoiética (seta preta).

56

Figura 30 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 40x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro e restos da membrana; B e D: Maturação do tecido ósseo às margens do defeito (MON), diminuição das trabéculas e presença ainda de tecido conjuntivo denso. C: presença de remanescentes da membrana envolta por tecido conjuntivo fibroso organizado (CF) e osso neoformado. Acima, presença de perióstio (seta amarela).

57

Figura 31 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A.1 e B1: confluência de pontes ou traves de tecido ósseo preenchidos por células mesenquimais, osteoprogenitoras e vasos sanguíneos (seta preta). B: transição do tecido primário em secundário, com as fibras colágenas mais organizadas (seta azul). C: fase de maturação do tecido primário. (seta azul) células mesenquimatosas se transformando em grupos de osteoblastos (seta marrom).

58

Figura 32 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 60 dias de reparo ósseo nas ampliações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B e D: Maturação do tecido ósseo nas margens do defeito apresentando ilhas de neoformação (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso. C: defeito fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro, com restos da membrana de colágeno porcino ao centro e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CD).

59

Figura 33 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 60 dias de reparo ósseo nas ampliações de 40 e 100x, coloração HE. A: grande quantidade de tecido ósseo lamelar nos cotos (seta roxa). A.1 e B1: confluência de pontes ou travessias de tecido ósseo recém-formadas no centro da ossificação, mantendo espaços entre si preenchidos células e vasos sanguíneos (seta preta). B: centro apresentando osso maturado nas extremidades, com fechamento quase total do defeito e ao meio, a transição do tecido primário em tecido secundário. fibras colágenas organizadas (seta azul). C: fase de maturação do tecido primário. (seta azul), grupos de osteoblastos sintetizando uma matriz ainda não mineralizada (seta marrom).

60

Figura 34 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 7 dias de reparo ósseo nas ampliações de 4x coloração HE. – A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). Defeito preenchido por tecido de granulação (TG). Início de neoformação óssea próximo aos cotos (NO).

61

Figura 35 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 15 dias de reparo ósseo nas ampliações de 4 e 40x coloração HE. A – visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B, D: Cotos apresentando neoformação óssea e presença de tecido conjuntivo denso; C: Defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo na superfície e denso na parte mais profunda, com início de maturação ao centro.

62

Figura 36 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 30 dias de reparo ósseo nas ampliações de 4 e 40x coloração HE. A – Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B, D: Cotos apresentando neoformação óssea com espaços preenchidos por células

63

mesenquimais, células osteoprogenitoras e vasos sanguíneos (seta preta); C: Defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo e denso.

Figura 37 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 60 dias de reparo ósseo nas ampliações de 4 e 40x coloração HE. A – Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B, D: Cotos apresentando neoformação óssea (seta azul) entremeado por tecido conjuntivo fibroso (seta amarela); C: Ausência de tecido ósseo neoformado e presença de tecido conjuntivo fibroso (seta amarela).

64

Figura 38 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter-grupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos) no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas significantes inter grupos para o período de 15 dias, o * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias.

65

Figura 39 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise da quantidade de vasos sanguíneos no período de 7 e 15 dias, sem diferença estatística significativa para nenhum dos períodos e grupos avaliados.

66

Figura 40 - Gráfico de comparativo intergrupos das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (GC+, GT2, GT1 e GC-) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. (a) minúsculo representa a diferença estatística entre os grupos (GC+) e (GT2) no período de 30 dias; (A) maiúsculo representa a diferença entre os grupos (GC+) e (GT2) no período de 60 dias e (*) representa que houve diferença estatística entre os grupos (GC+), (GT2) e (GT1) para o grupo coágulo em todos os períodos.

67

Figura 41 - Gráfico de comparativo intragrupos das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (GC+, GT2, GT1 e GC-) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. Letras minúsculas representam diferença estatística intragrupo para os períodos de 15 a 30 dias; letras maiúsculas representam diferença estatística intragrupo entre os períodos 15 a 30 e 30 a 60; (*) representa diferença estatística para os períodos 7,15 e 30 dias em relação ao período de 60 dias.

68

Figura 42 - Gráficos de análise dos parâmetros (BV), (BV/TV), (Po.tot), (Tb.th), (Tb.Sp), Tb.N) dos grupos (GC+), (GT2), (GT1) e (GC-) após microtomografia computadorizada (micro-CT) no período de 60 dias.

LISTA DE SIGLAS

AON	Área de osso neoformado
ANOVA	Análise de variância
BV	Volume ósseo
BV-TV	Porcentagem de volume ósseo
CD	Tecido conjuntivo denso
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
GC+	Grupo coágulo positivo
GC-	Grupo coágulo negativo
GT1	Grupo teste 1
GT2	Grupo teste 2
HE	Hematoxilina e Eosina
INO	Ilhas de neoformação óssea
JPEG	Joint Photographics Experts Group (formato do arquivo)
LTDA	Sociedade de responsabilidade limitada
M	Membrana
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
MON	Matriz óssea neoformada
NO	Osso neoformado
PVPI	Iodopovidona
ROG	Regeneração óssea guiada
ROI	Região de interesse
TC	Tecido conjuntivo frouxo
TCF	Tecido conjuntivo fibroso
UNESP	Universidade estadual Paulista

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Procedimento cirúrgico	25
3.2 Eutanásia e coleta do material	28
3.3 Análise dos resultados	28
4 RESULTADOS	36
4.1 Análise Histológica	36
<i>Análise Histológica qualitativa</i>	36
4.2 Análise Histométrica	64
<i>Análise de perfil inflamatório – Células e Vasos sanguíneos</i>	64
<i>Análise da área de osso neoformado (AON)</i>	66
4.3 Análise Microtomográfica	69
<i>Microtomografia computadorizada (MicroCT)</i>	69
5 DISCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

O mecanismo biológico da regeneração óssea guiada, baseia-se no conceito da osteopromoção, isto é, o uso de meios físicos que promovem o selamento de um local anatômico, prevenindo que outros tecidos, principalmente o tecido conjuntivo invadam a região uma vez que sua formação é mais rápida que a do tecido ósseo, interferindo diretamente na osteogênese [1-4]. Com isso, há a criação e manutenção de um espaço onde células osteogênicas derivadas do osso hospedeiro possam ocupar, se proliferar e subseqüentemente, melhorar a regeneração óssea, além de auxiliar no seu direcionamento [5,6].

Os meios físicos mais utilizados para promover este selamento regional são as membranas biológicas, cujo os objetivos são a criação e manutenção volumétrica desse espaço, bem como de uma geometria adequada [7-9]. A membrana deve, portanto, suportar seu peso e resistir à pressão dos tecidos adjacentes além de forças externas. Deve ter rigidez suficiente (memória), para criar e manter um espaço favorável, e adaptar-se ao contorno ósseo, permitindo que retorne à sua forma. Portanto, quanto melhor a adaptação da membrana, mais completa será a regeneração [4,10].

As membranas absorvíveis oriundas de colágeno são comumente utilizadas devido a boas propriedades e biocompatibilidades integrativas, serem semipermeáveis, o que facilita a transferência dos elementos nutritivos, tendo como principal vantagem a não necessidade de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção, além de apresentarem menos complicações na linha de incisão, em casos de deiscência de suturas [11-13].

Nesse contexto, cabe ressaltar que as membranas colágenas possuem em sua composição moléculas compostas por aminoácidos (glicinas, prolinas, hidroxiprolinas e hidroxilisinas), que definem as características de pouca extensibilidade, alta resistência, fibroorientação, controle da adição e liberação de substâncias, baixa antigenicidade e estimulação da coagulação sanguínea [14,15]. Podem ter origem bovina, suína ou equina; constituídas por colágeno tipo I, tipo III ou ambos; provenientes das regiões de pericárdio, derme, tendão, ou fáscia temporal de animais [16,17].

Estas podem ser de única ou dupla camada, compostas por ligações colágenas reticuladas (cross-linked) ou não reticuladas (não cross-linked) que necessitam de adaptação subepitelial e estabilidade [17]. Apesar de seus bons resultados no processo de ROG, ainda possuem como maior desvantagem, uma estabilidade dimensional reduzida, e como tentativa de melhorar esta propriedade, algumas empresas estão investindo em membranas com ligações cruzadas (cross-linked), como as provenientes de pericárdio bovino [18,19].

O pericárdio bovino é um material homogêneo, bioinerte e osteopromotor, que não precisa ser removido devido sua biorreabsorção, provoca reação inflamatória leve e por tempo limitado, promovendo a formação de uma fina cápsula conjuntiva e algumas áreas de calcificação. Utilizado com sucesso há cerca de três décadas em diversas áreas da medicina, principalmente na cardiologia, devido à alta resistência e fácil aquisição, com o objetivo de regeneração tecidual [20].

Baseado nas características promissoras do pericárdio bovino, novas membranas reabsorvíveis a base desse material como a Techgraft® (Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo) e a Surgitime Coclagen® (Bioinnovation Produtos Biomédicos Ltda, Bauru, São Paulo) compostas majoritariamente de colágeno tipo I foram recentemente desenvolvidas com o intuito de promover desempenho maior ou semelhante ao de membranas pré existentes oriundas de outras fontes colagenosas como a líder de mercado Bio-Gide® (Geistlich), uma das matrizes mais utilizadas e documentadas, derivada de derme suína e não reticulada [15,21], na atividade osteopromotora da ROG.

Sabendo-se que ainda há poucos trabalhos sobre esses novos materiais e entendendo a importância dos trabalhos pré-clínicos para que biomateriais possam ser validados, este projeto foi então elaborado para ser mais uma fonte de análise importante para fomentar o possível uso dessas membranas nos processos de regeneração óssea guiada.

2 OBJETIVO

Esse trabalho tem por objetivo avaliar a regeneração óssea guiada promovida por dois tipos de membranas reabsorvíveis derivadas de pericárdio bovino Techgraft® (Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo) e Surgitime Collagen® (Bioinnovation Produtos Biomédicos Ltda, Bauru, São Paulo) em comparação com a membrana de derme suína (Bio-Gide® - Geistlich Wohlhusen, Suíça) em defeitos críticos em calotas de ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Previamente à aquisição e acomodação dos animais, bem como antes da execução de qualquer intervenção, o presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo nº0402-2022), seguindo as diretrizes nacionais para o cuidado e uso de animais segundo o ARRIVE Guidelines (Pesquisa com Animais: Relato de Experimentos in Vivo) [22].

Os 96 animais (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 350g, foram recebidos e ambientados no biotério da disciplina de Diagnóstico e Cirurgia FOA/UNESP. Foram mantidos sob as seguintes condições durante todo o período experimental: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de 22 ± 25 °C, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas (5 animais por gaiola), onde tiveram ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum. Os animais se apresentaram saudáveis e em condições de sofrerem os procedimentos operatórios.

Divisão dos grupos e membranas utilizadas

Para este estudo, foram selecionadas 2 diferentes marcas nacionais de membranas de colágeno bovino e 1 marca importada de colágeno porcino, disponíveis no mercado, consideradas de ampla utilização na prática clínica de cirurgias maxilofaciais. Os animais foram divididos em quatro grupos dentro de cada material, de maneira randomizada, pelo método do sorteio manual, referente aos períodos de eutanásia de 07, 15, 30 e 60 dias. Cada grupo contendo 06 animais ($n = 6$), levando a um total de 96 ($N=96$), sendo 24 peças por material. Em cada calota foi confeccionado um defeito ósseo, tido como crítico, de 08 mm de diâmetro interno com uma broca trefina (Sistema Neodent, Brasil), todos preenchidos apenas com coágulo sanguíneo, e revestidos conforme os grupos: Grupo teste 1 (GT1) que recebeu a membrana Surgitime collagen®; ($n=24$); Grupo teste 2 (GT2) que recebeu a membrana

Techgraft® (n=24); Grupo controle positivo (GT⁺) que recebeu a membrana Biogide® (n=24) e Grupo controle negativo (GC⁻) preenchido apenas com coágulo (n=24). Utilizando-se as respectivas membranas:

GT1 - Surgitime Collagen® (Bionnovation Produtos Biomédicos Ltda, Bauru, São Paulo), implantável e reabsorvível, projetada com a finalidade de servir como barreira em procedimentos de regeneração e/ou reconstrução óssea. Consiste de uma matriz acelular, não citotóxica e não pirogênica de pericárdio bovino composta majoritariamente por colágeno tipo I, com sua estrutura porosa, de aproximadamente 0,5-1,0mm de espessura permitindo vascularização, proliferação e maturação celular e sua reabsorção ocorre entre 60 e 90 dias, o que é suficiente para propiciar a neoformação óssea.

GT2 - Techgraft® (Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo) é uma membrana biológica reabsorvível, acelular de pericárdio bovino, composta principalmente de colágeno tipo I de alta flexibilidade e resistência, possuindo espessura de 150-250mm e com tempo de reabsorção de 4 a 6 meses compatível com o reparo ósseo. Após sua implantação, degrada-se lentamente por ação enzimática e é substituída pelo próprio tecido conjuntivo.

GC⁺- Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) é uma membrana colágena natural proveniente da derme suína, líder para regeneração de tecido oral, de fácil adaptação, biocompatível e elevada hidrofília. É uma membrana bicamada; uma camada compacta e lisa é coberta por um filme particularmente denso, projetado para evitar a invasão de tecidos moles em um defeito ósseo protegido pela membrana, atuando também como guia para a formação adequada de osso, tecido mole e o desenvolvimento de vasos sanguíneos.

3.1 Procedimento cirúrgico

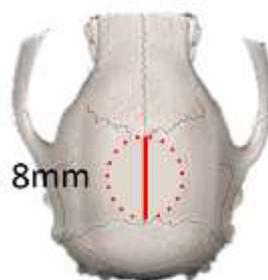
Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 70mg/Kg e 5mg/Kg,

respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Foi realizada a tricotomia manual 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.

Logo após a tricotomia e a antissepsia dos animais, foi realizada uma incisão linear no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 (dois) cm, com lâmina n° 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi n 3 (Hu-Friedy, Alemanha), com o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha). Em seguida com auxílio de broca trefina de 8mm 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), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8 mm de diâmetro na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter, seguindo o protocolo [4,23-26].

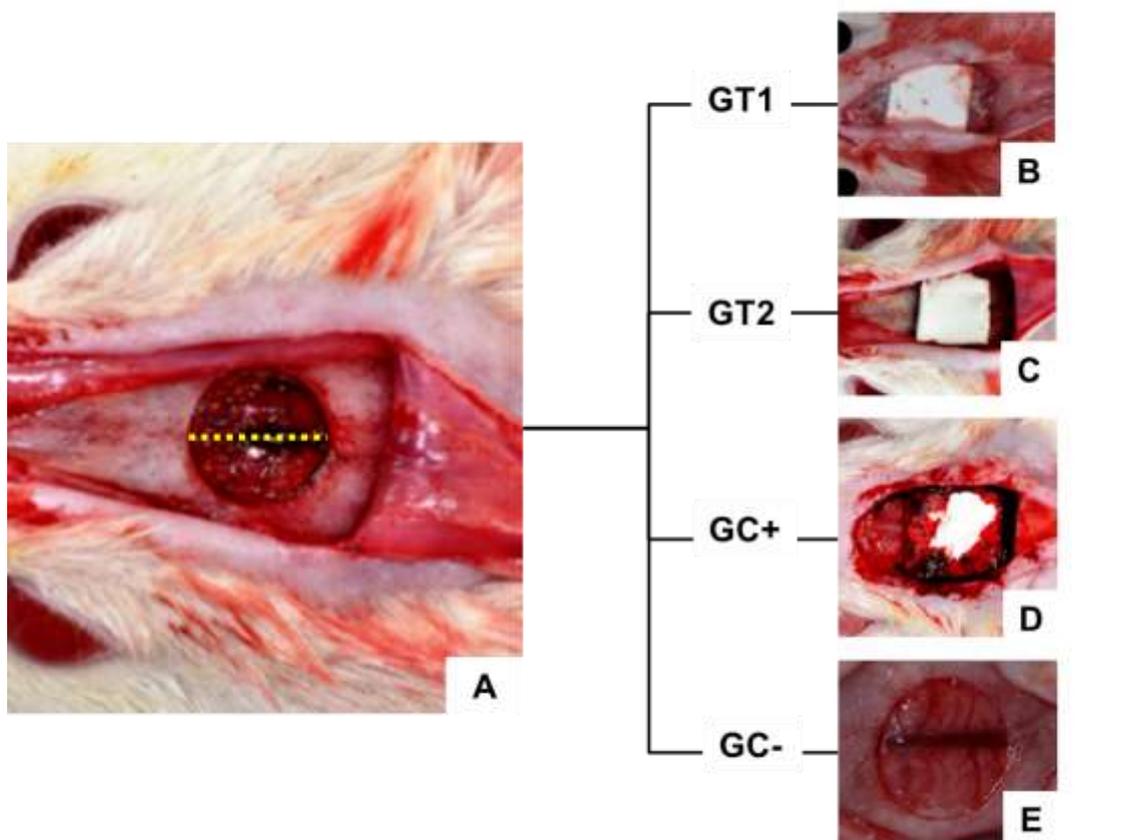
Figura 1 – Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representada pela linha tracejada vermelha.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

De acordo com o tratamento proposto os defeitos foram preenchidos somente com coágulo sanguíneo e recobertos com a membrana referente a cada grupo (Figura 2). Em seguida, com o procedimento finalizado, os tecidos moles dos animais 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 [23-28].

Figura 2 – (A) Defeito crítico de 8mm tido como padrão em todos os grupos. Preenchidos com coágulo sanguíneo e recobertos com a membrana referente a cada grupo: (B) GT1: Surgitime Collagen®; (C) GT2: Techgraft®; (D) GC+: BioGide® e (E) GC-: apenas coágulo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

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

3.2 Eutanásia e coleta do material

Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias pós operatórios por meio de sobredosagem anestésica sob via intramuscular de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (5 mg/Kg), nos dias pré-estabelecidos anteriormente. Todas as amostras coletadas após a eutanásia dos animais foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas para fixação tecidual. Em seguida, foram lavadas em água e descalcificadas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% por 5 semanas. As amostras foram lavadas por 12 horas e desidratadas em diferentes concentrações de álcool (70% e 100%), seguidas de diafanização em xilol e incluídas em parafina. Finalmente, as amostras foram cortadas em micrótomo com 6 µm entre cada fatia. As lâminas histológicas foram montadas e coradas com hematoxilina e eosina [24-28].

Para realização da análise de MicroCT, as peças referentes a eutanásia de 60 dias, foram fixadas em formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, mantidas em álcool 70% para realização das microtomografias e posteriormente processadas da mesma maneira que as peças dos períodos referentes a eutanásias anteriores, para a coloração de HE [4,25,26].

3.3 Análise dos resultados

Análise Histomorfométrica

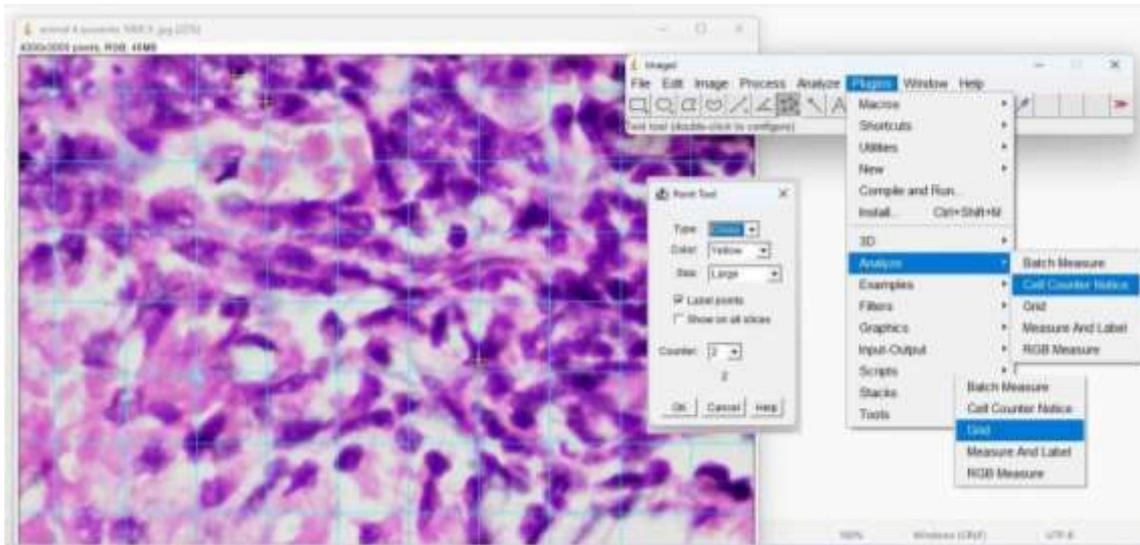
Após a obtenção das lâminas, estas foram avaliadas histologicamente quanto a capacidade de neoformação óssea, presença de infiltrado inflamatório, formação de tecido conjuntivo, absorção e/ou manutenção dos materiais estudados. As amostras foram codificadas de maneira que somente a orientadora sabia a quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises.

A partir dos cortes semiseriados em cada período de eutanásia 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). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e foram projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas). Para análise histológica qualitativa e descritiva foi realizada fotomicrografias nos aumentos de 4x, 10x, 100x. A reconstrução panorâmica das secções histológicas foi realizada no aumento de 4x para a representação das imagens e localização da área analisada e os outros aumentos para confirmar os achados histológicos.

O perfil inflamatório das membranas foi realizado a partir da quantificação de células inflamatórias (linfócitos) e vasos sanguíneos. Para isso, foram realizadas fotomicrografias em um aumento de 100x, das quais 3 imagens eram realizadas por secção histológica: a primeira, ao centro do defeito; a segunda, à direita; e a terceira, à esquerda; sendo que 3 secções histológicas por animal foram escolhidas das amostras obtidas nos tempos experimentais de 7 e 15 dias para os grupos SG = Surgitime Collagen®, TG = Techgraft®, BG = Bio-Gide® e GC = Coágulo, totalizando 144 imagens. Após a obtenção das imagens, no software Image J, uma grade contendo 130 pontos foi inserida em cada imagem, e cada célula com característica linfocitária (mononucleares) que tocasse o ponto era contada; para os vasos sanguíneos, o conjunto de pontos inseridos dentro do mesmo vaso era quantificado (Figura 3).

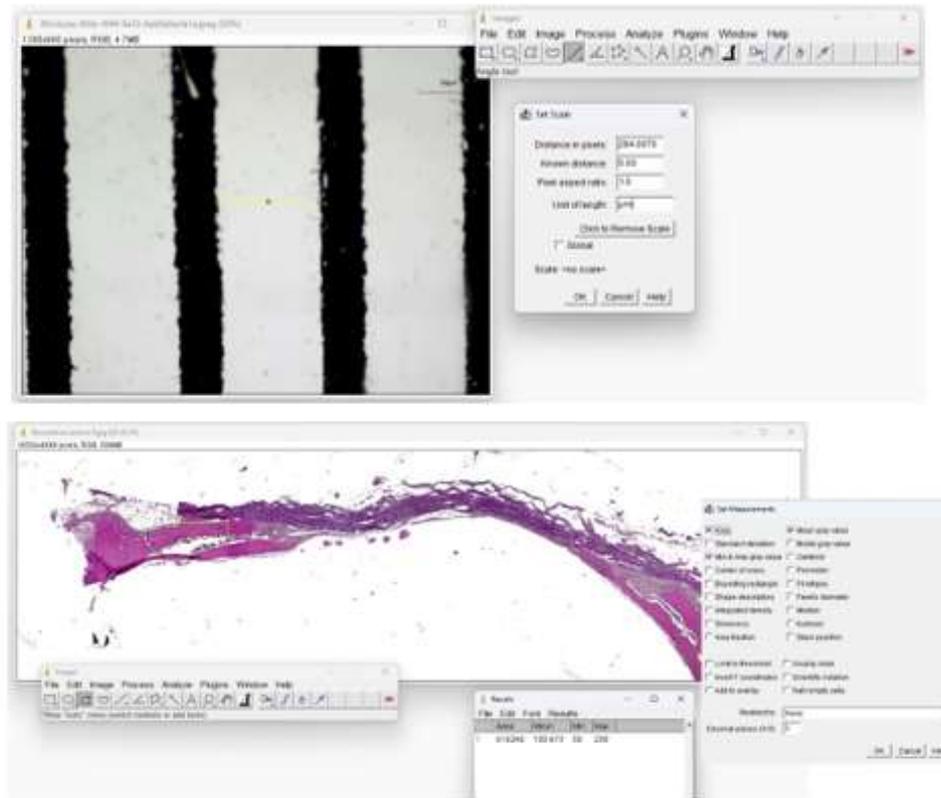
Figura 3 - Software ImageJ utilizado para contagem de células e vasos sanguíneos. Grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica em um aumento da objetiva de 100x.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A quantidade de osso neoformado foi quantificada a partir da reconstrução panorâmica das secções histológicas em um aumento de 4x. Com o software ImageJ, a ferramenta régua foi utilizada para a calibragem de acordo com a magnificação escolhida para a histometria. A distância conhecida, calibrada em 1 e a unidade de medida em micrômetros (μm) (Figura 9). Após a calibragem da régua, a ferramenta polígono é utilizada e habilitada para contagem da área após a imagem ser aberta no software. Com a imagem aberta, a ferramenta do polígono é executada, delimitando a área a ser contada, os resultados são salvos e somados ao final do processo, representando a quantidade de neoformação óssea (Figura 4). Fotomicrografias foram realizadas próximas ao coto ósseo e no centro do defeito em um aumento de 40x. Para isso, no software ImageJ, utilizando a ferramenta Polígono, a área de osso neoformado foi dimensionada para todos os grupos em todos os períodos experimentais.

Figura 4 - Software ImageJ utilizado para calibragem da ferramenta régua na magnificação de escolha para ser realizada a histometria e a seguir a contagem da área óssea através da ferramenta polígono

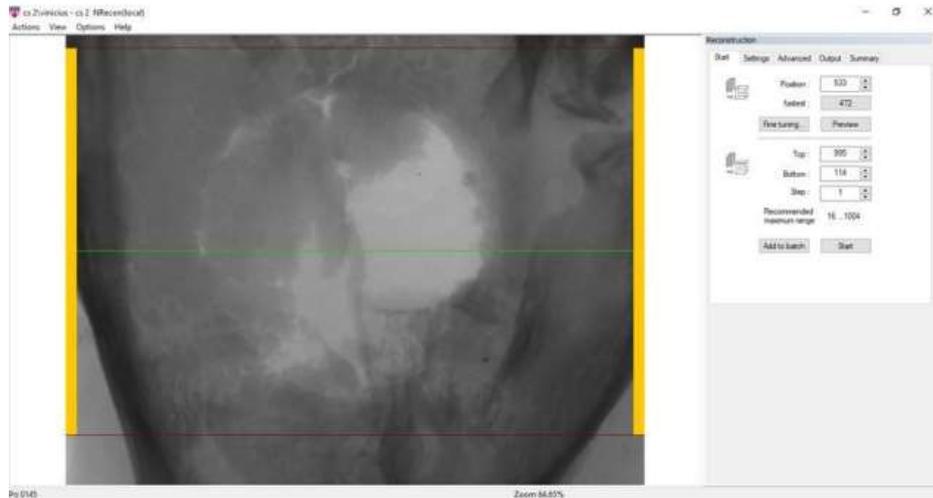


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Micro Tomografia Computadorizada

Após a fixação das calvárias em formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, os espécimes obtidos no período de eutanásia de 60 dias, foram mantidos em álcool 70%, e submetidos à avaliação em micro-tomógrafo computadorizado Skyscan 1174 (Bruker, Kontich, Belgium). Os parâmetros utilizados foram: tamanho do pixel 11,87 μm , 50 kVp, filtro de 0,5mm de alumínio, rotação 0.6° e rotação do arco de 180°.

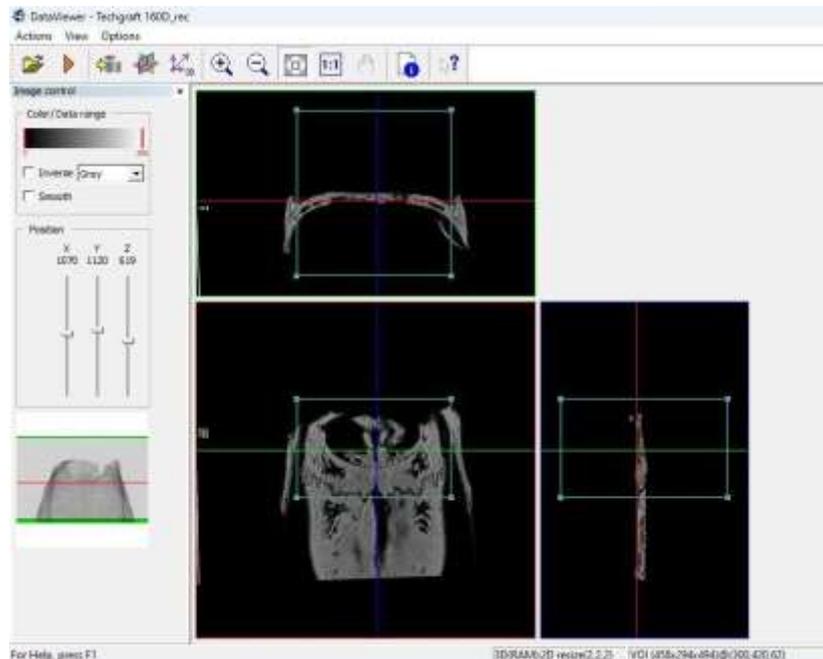
Figura 5 - Representação do uso do Software NRecon (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), utilizado para a reconstrução 3D das aquisições realizadas no Microtomógrafo. Na imagem as linhas vermelhas delimitam a área a ser reconstruída e a linha verde indica o centro da região de interesse.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Após a digitalização, as imagens obtidas foram importadas para o NRecon Reconstruction Software (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para a reconstrução tridimensional (3D) das calvárias na escala de cinza, na qual as linhas vermelhas delimitam a área a ser reconstruída e a linha verde o centro da região de interesse (Figura 5). Após a obtenção das imagens em 3D, o Software DataViewer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) foi utilizado para a determinação do volume de interesse (VOI), que foi padronizado para todas as imagens, sendo que todos foram salvos em uma visão transaxial (Figura 6).

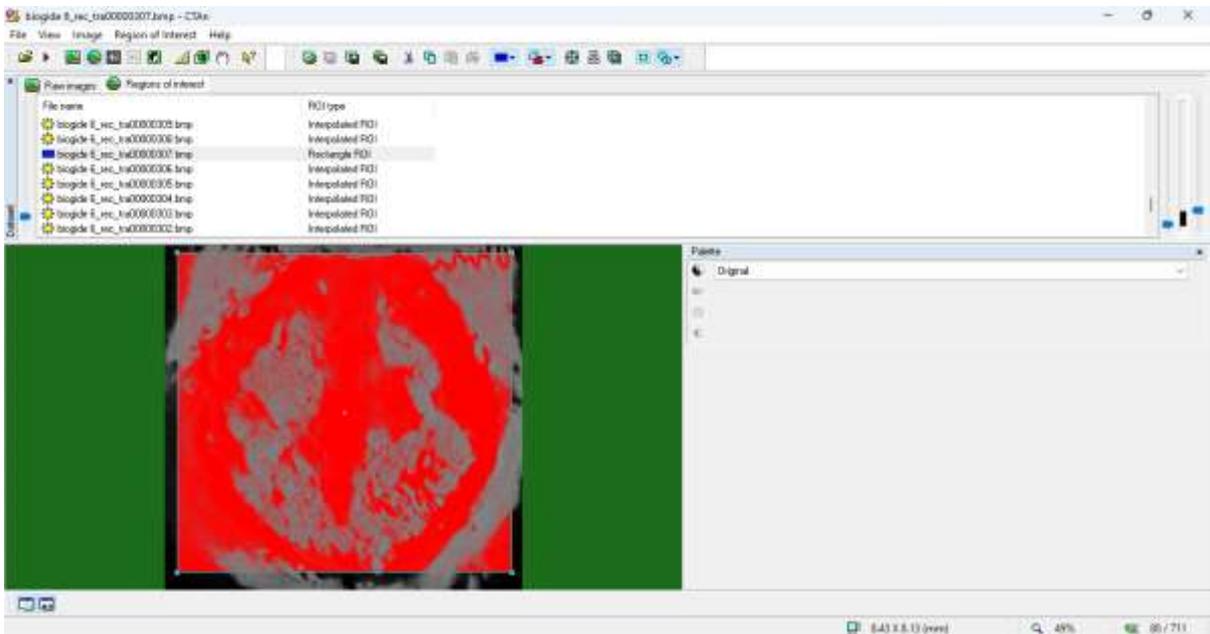
Figura 6 - Ilustração do uso do software DataViewer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), para a determinação do VOI. Após delimitado em uma imagem, o VOI é reproduzido igualmente para todas as outras imagens.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

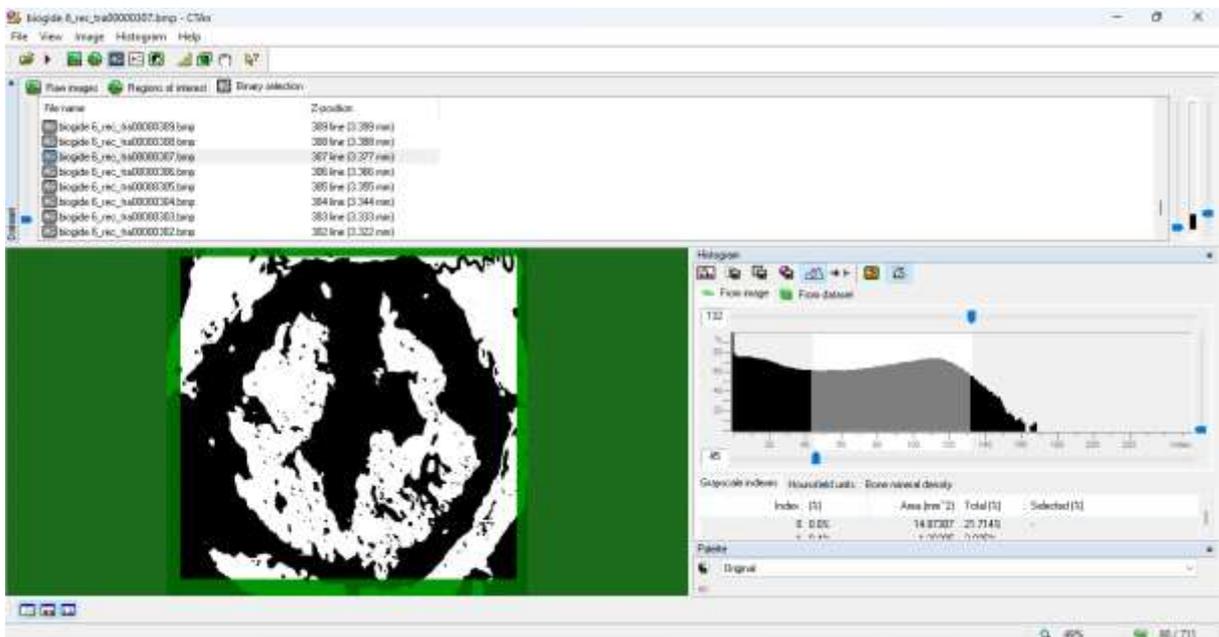
Os cortes obtidos foram importados para o Software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Nas imagens obtidas, foram avaliados parâmetros morfométricos como volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.th), número de trabéculas ósseas (Tb.N), separação do trabeculado (Tb.Sp) e porcentagem da porosidade óssea total (Po.tot) (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Para a determinação da região de interesse (ROI) foi utilizada a ferramenta Round devido a morfologia arredondada dos defeitos, sendo essa também padronizada para todas as reconstruções (8,43 X 8,13) (Figura 7). Logo após, foi utilizado um limite da escala de cinza de 132 a 45 em um intervalo de 80 camadas (Figura 8). As imagens foram então convertidas para a escala de cinza para o cálculo dos parâmetros tridimensionais em milímetros (mm), realizado pelo próprio software (Figura 9).

Figura 7 - Representação do ROI utilizando o software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Após a delimitação das camadas a serem analisadas, a forma retângula do ROI é escolhida e adaptada para o tamanho da amostra.



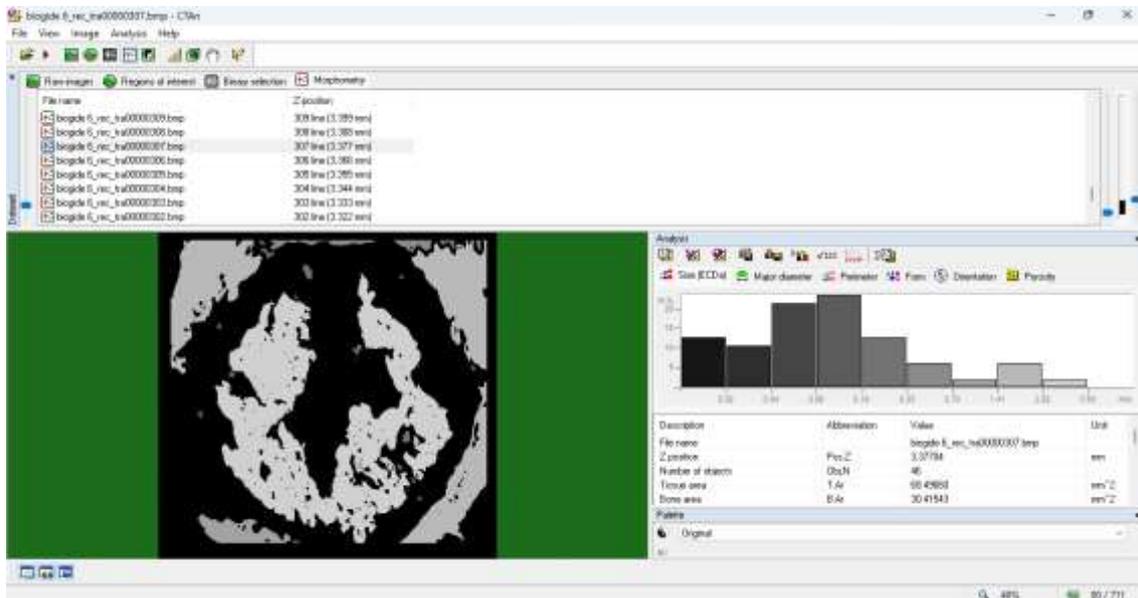
Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 8 - Representação da escala de cinza utilizada (132-45) no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para indicar a diferença entre osso cortical e trabecular.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 9 - Conversão das camadas escolhidas para a escala de cinza no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para o cálculo dos parâmetros tridimensionais em mm.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Tabela 1 - Parâmetros quantitativos do tecido ósseo trabecular obtidos pelo CTAn (Bruker microCT, Kontich, Bélgica) adaptados daqueles preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR).

Abreviação	Nomenclatura	Descrição do parâmetro	Unidade
BV	Volume ósseo	Volume da ROI segmentado como osso	mm ³
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo	Porcentagem do volume ósseo da ROI segmentada como osso	%
Tb.N	Número de trabéculas ósseas	Média do número de trabéculas por unidade de comprimento	1/mm
Tb.Th	Espessura trabecular	Média da espessura das trabéculas durante avaliação tridimensional	mm
Tb.Sp	Separação trabecular	Média da distância entre as trabéculas durante avaliação tridimensional	mm
Po.Tot	Porosidade total	Volume de espaço vazio existente	%

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Os dados obtidos foram transferidos para uma planilha do Excel para posterior análise estatística.

Análise estatística dos resultados

Os dados coletados a partir da análise histométrica foram tabulados e posteriormente testados no software SigmaPlot 12.0 (Exact Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, EUA), com nível de significância de 5%. Inicialmente, aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, que observou homogeneidade dos dados em função da curva de normalidade ($p > 0,05$). Em seguida, aplicou-se a ANOVA dois fatores - two-way (grupos experimentais e períodos de análise). Para ambas as interações, observou-se alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$), na qual foi aplicado o pós-teste de Tukey.

4 RESULTADOS

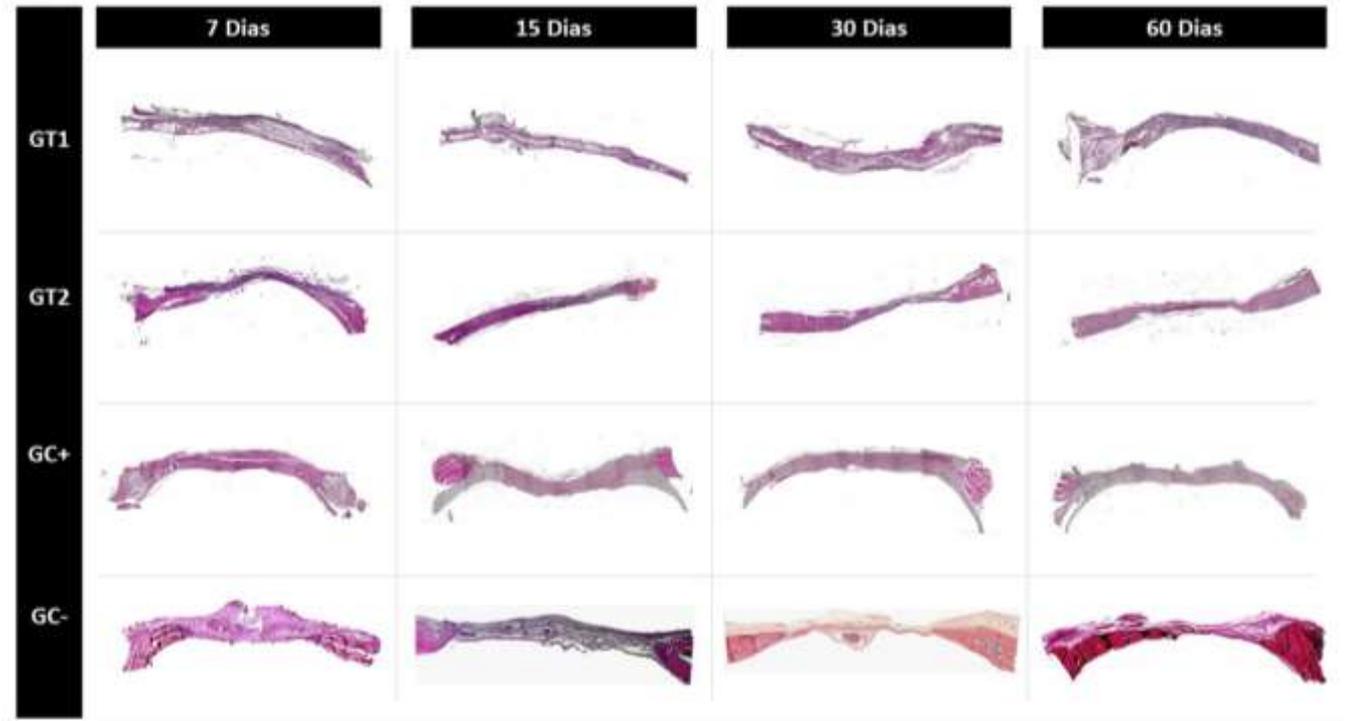
Todos os animais foram incluídos nos resultados, tendo em vista que não ocorreram complicações trans e pós-operatórias.

4.1 Análise Histológica

Análise Histológica qualitativa

Para descrição histológica, foram feitas reconstruções panorâmicas, a partir das fotomicrografias realizadas em um aumento de 4x, com a confirmação das estruturas encontradas nos maiores aumentos.

Figura 10 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos GT1, GT2, GC+ e GC- em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 4x.

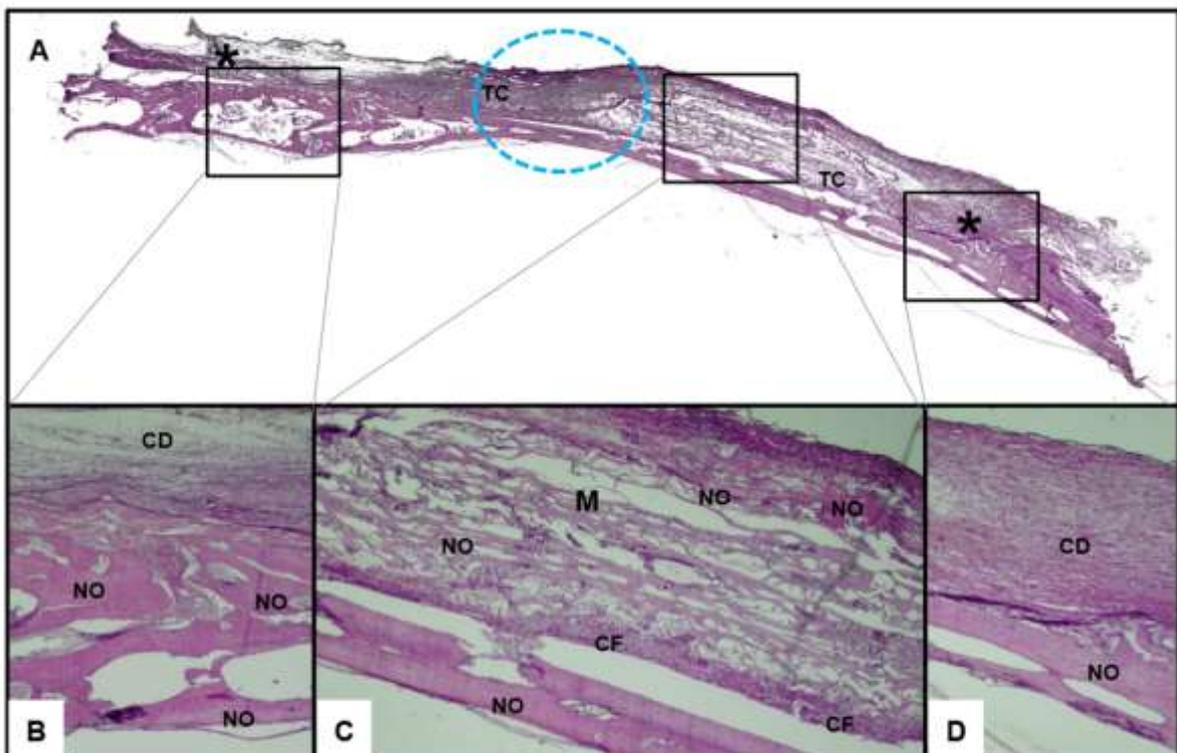


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

GT1 (Surgitime Collagen®)

7 dias: Pode-se observar na reconstrução panorâmica em um aumento de 4X, a presença da membrana íntegra, com leve colabamento (circulado em azul) e presença de tecido conjuntivo abaixo. Áreas de coto apresentando remodelação, afinando-se para o centro, característica do colabamento de membranas. Tecido conjuntivo denso e organizado em região periférica e em região central frouxo e pouco organizado. Presença de infiltrado inflamatório mononuclear no centro do defeito. característico do processo inflamatório e bem baixo já é possível notar um filete trabecular por toda extensão do defeito (Figura 11).

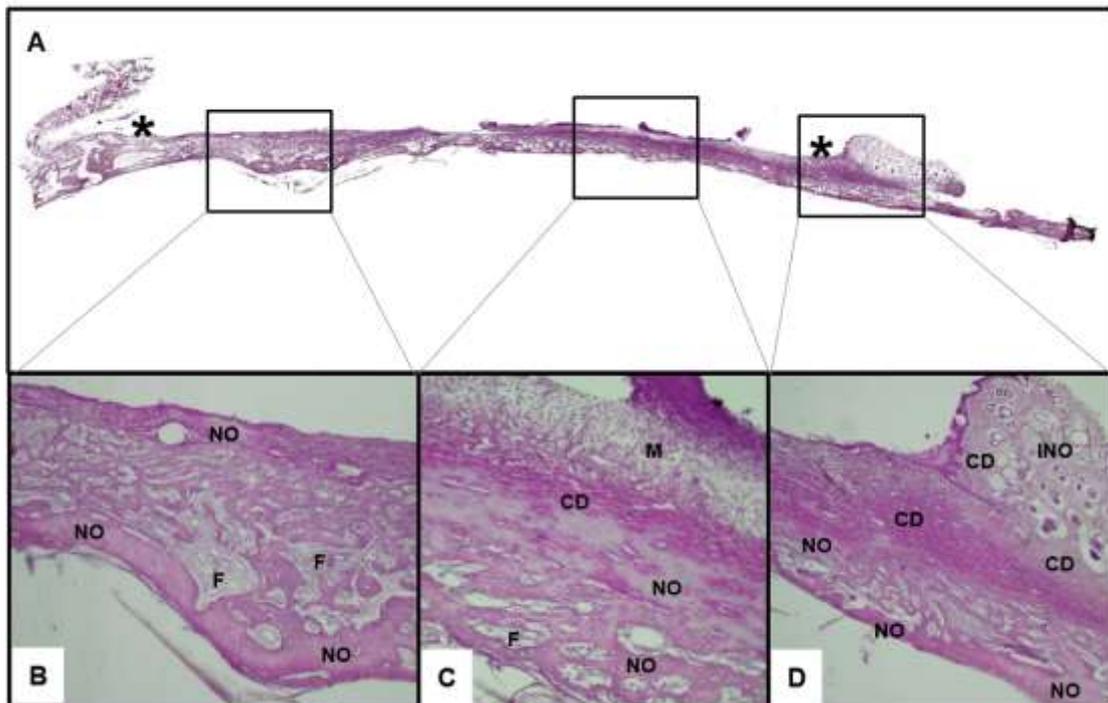
Figura 11 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A- Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) e tecido ósseo neoformado (NO); B e D: presença de tecido conjuntivo denso (CD) próximo às bordas do defeito ósseo; C: no centro do defeito presença da membrana (M) entremeada de tecido conjuntivo frouxo (CF) e tecido ósseo neoformado (NO).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

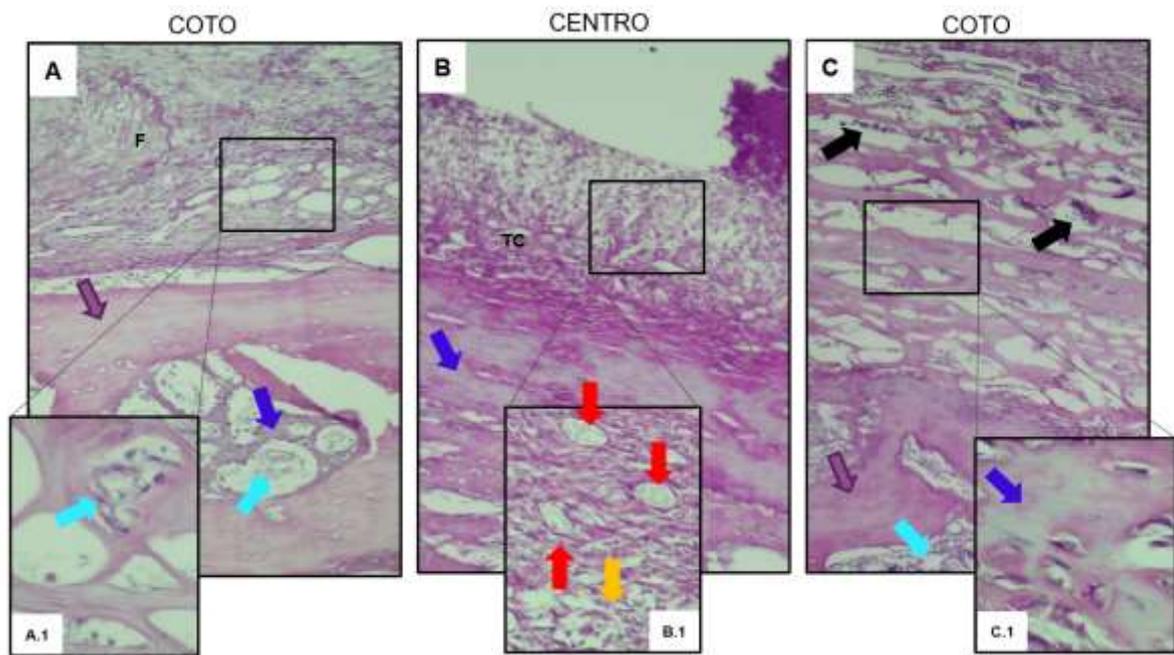
15 dias: Presença ainda da membrana, com sinais de reabsorção, embora haja colabamento, observou-se a morfologia clássica da neoformação óssea do coto para o centro, com trabéculas ósseas preenchidas por tecido fibroso, e áreas de início de neoformação óssea (figura 12 B, C, D). A proporção entre trabéculas e estroma é altamente variável, com áreas constituídas apenas por tecido fibroso, nesse período. Cotos apresentando maior remodelação óssea e ilhas de neoformação (Figura 12 B, D).

Figura 12 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x Coloração HE. A - Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) e tecido ósseo neoformado (NO); B e D: presença de tecido conjuntivo denso (CD) próximo às bordas do defeito ósseo, com ilhas de neoformação óssea (INO); C: no centro do defeito presença da membrana (M), tecido conjuntivo denso, tecido conjuntivo fibroso e tecido ósseo neoformado (NO).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

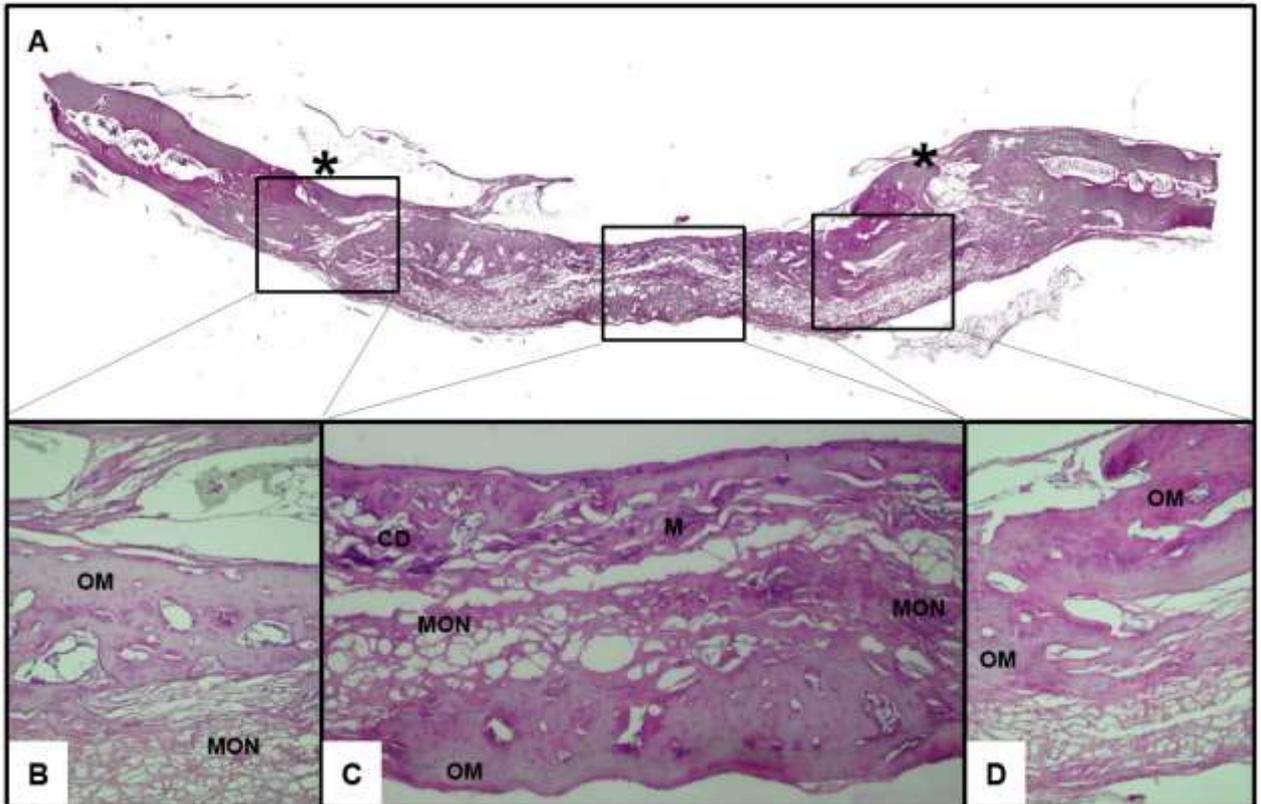
Figura 13 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. Maior aumento grupo (GT1) 15 dias (100x). A: Área de coto apresentando neoformação óssea trabecular e abaixo uma matriz óssea lamelar, com trabéculas (seta azul escuro) preenchidas de tecido fibroso frouxo (seta azul claro). A.1: tecido fibroso (seta azul clara); B: Centro com presença da membrana, tecido conjuntivo e abaixo, osso lamelar (seta roxa). B.1 vasos sanguíneos (seta vermelha) e infiltrado inflamatório mononuclear (seta amarela); C: trabéculas de tecido ósseo lamelar (seta roxa), delimitando cavidades preenchidas por medula óssea (seta preta) e tecido fibroso (seta azul clara). C.1: Matriz óssea neoformada (seta azul escuro).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

30 dias: Visível formação óssea por todo defeito ósseo, entremeado por vestígios da membrana, ainda apresentando grande quantidade de trabéculas ósseas, entretanto com pouca presença de tecido conjuntivo fibroso no seu interior. Em área de cotos observa-se um tecido ósseo mineralizado, ao centro um tecido ósseo trabecular, ambos com diminuição significativa de infiltrado inflamatório, comparado aos períodos anteriores, sem fechamento completo do defeito. (Figura 14).

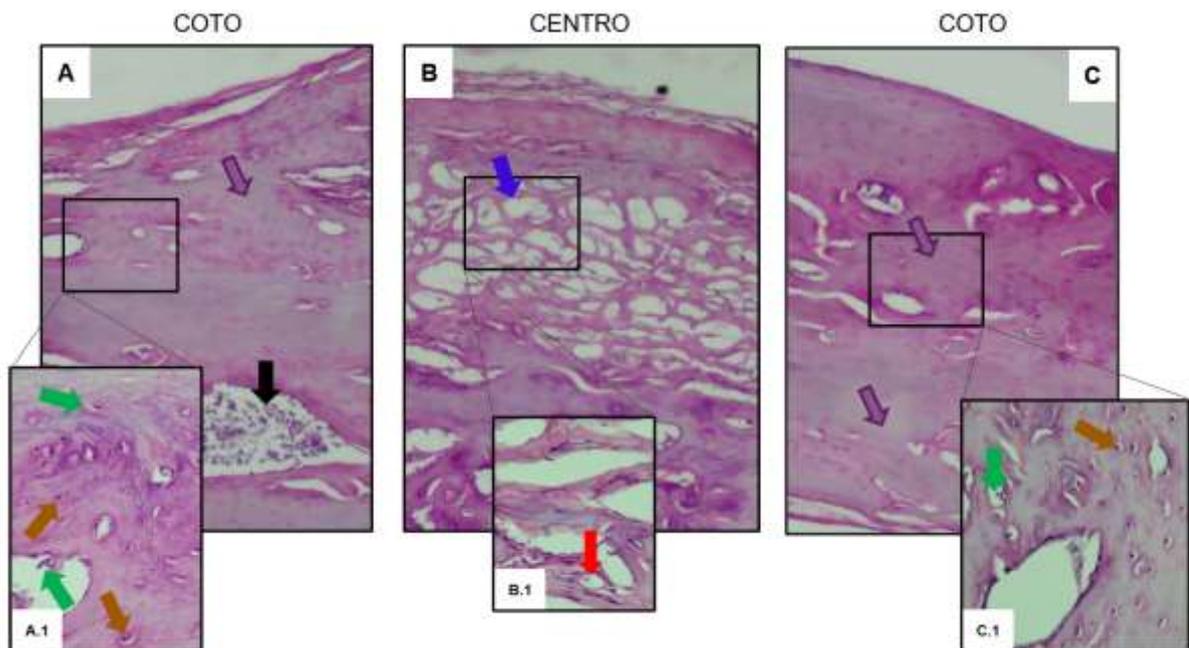
Figura 14 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A- Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea total (NO); B e D tecido ósseo maduro (OM) às margens do defeito com presença ainda de tecido conjuntivo denso. C: ao centro defeito, uma camada de osso maduro na superfície, ao meio matriz óssea neoformada trabecular, entremeado por tecido conjuntivo denso e fragmentos da membrana (M).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Em maior aumento, foi possível visualizar etapas da formação dos osteócitos (Figura 15 C.1) Maturação dos osteoblastos (seta verde), mineralização dos osteóides, incorporaram-se às trabéculas formando os osteócitos (seta marrom).

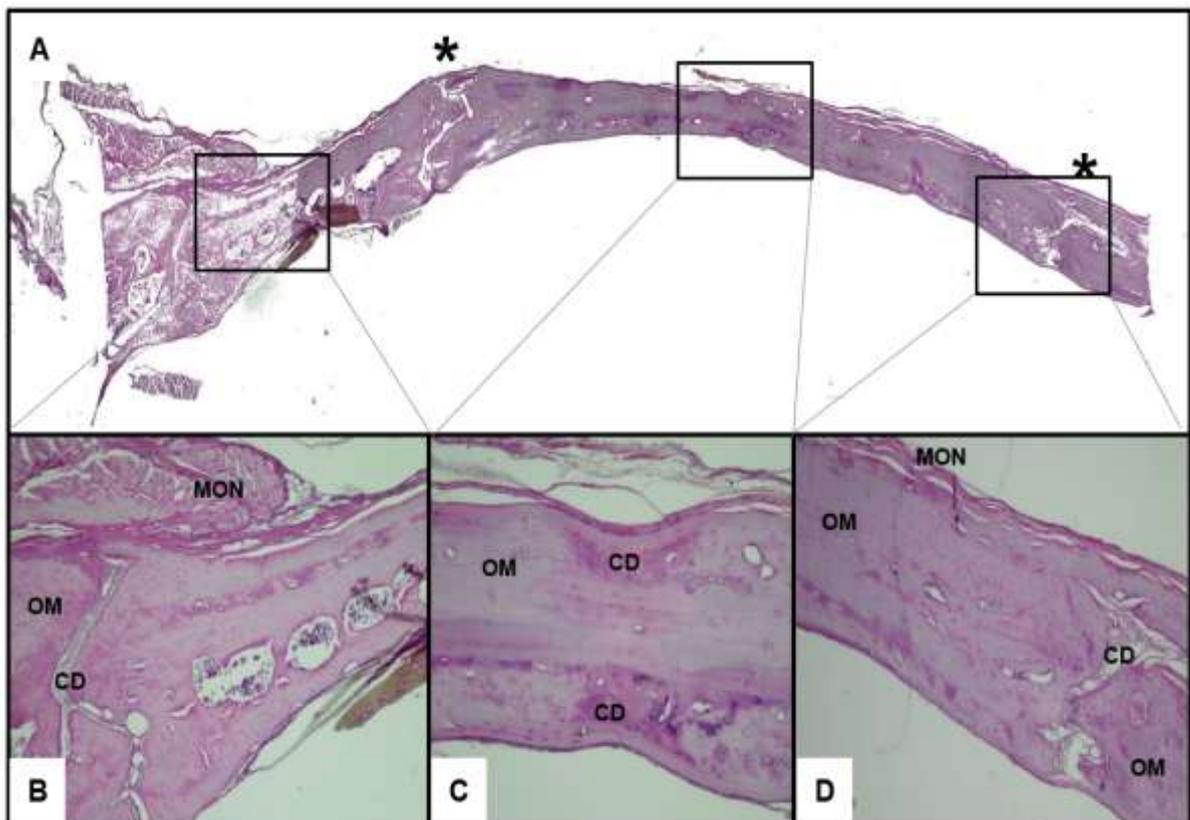
Figura 15 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo TG1 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: Área de coto apresentando maturação óssea (seta roxa), cavidades preenchidas por medula óssea (seta preta); A.1: osteoblasto (seta azul claro), osteócito (seta marrom). B: Centro com presença de neoformação trabecular (seta azul escuro), B.1: vasos sanguíneos (seta vermelha); C: Maturação do tecido ósseo, C.1: mineralização dos osteóides, confinados dentro das lacunas (seta azul claro); osteoblastos (seta verde), Osteócitos (seta marrom).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

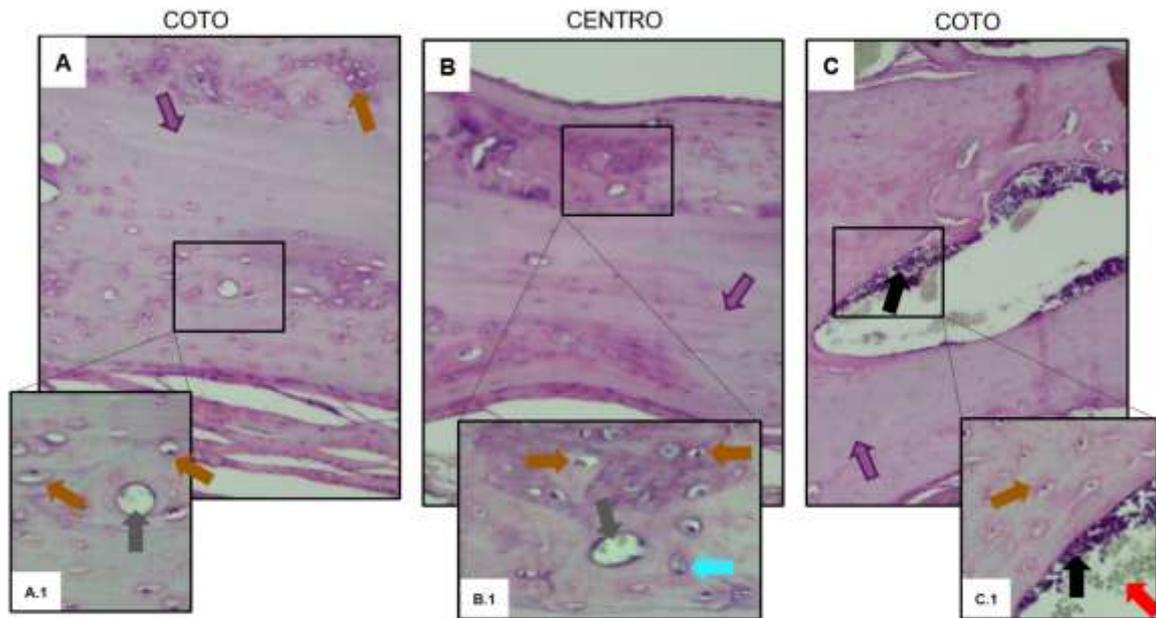
60 dias: Foi observado mínimo remanescentes da membrana de pericárdio bovino, o defeito apresentou neoformação óssea por toda extensão, com todo defeito ósseo fechado, apresentando mineralização do tecido ósseo em alguns pontos (OM) e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD) entre as ilhas de neoformação óssea (MON). (Figura 16)

Figura 16 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo TG1 aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 10x, coloração HE. A: Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea total (NO); B, C e D: neoformação óssea (NO) em praticamente todo o defeito, maturação do tecido ósseo em alguns pontos (OM) e presença ainda de tecido conjuntivo denso (CD) em lacunas de neoformação (MON).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 17 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT1 aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: Área de coto apresentando osso maduro (seta roxa); A.1: osteócito (seta marrom), canal de Havers (seta cinza). B: Centro fechado quase completamente, com maturação do tecido conjuntivo denso. B.1: mineralização dos osteóides em osteócitos (seta azul claro), osteócito (seta marrom), canal de Havers (seta cinza); C: Tecido ósseo maduro (seta roxa) C.1: cavidades preenchidas por medula óssea (seta preta) apresentando vascularização (seta vermelha), Osteócitos (seta marrom).

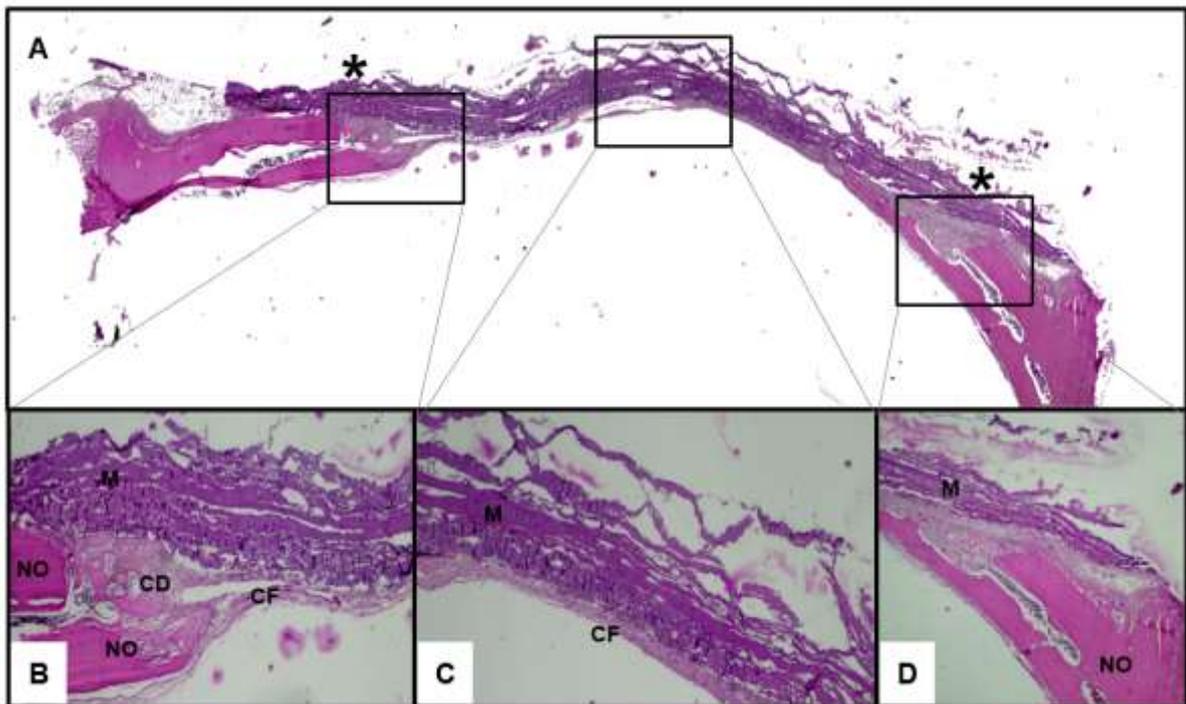


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

GT2 (Techgraft)

7 dias: Pode-se observar na reconstrução panorâmica em um aumento de 4X, a presença da membrana íntegra colabada, adaptada sobre os cotos e presença de tecido conjuntivo frouxo pouco organizado no centro, abaixo da membrana, estendendo-se até os cotos, onde ela repousa. Neoformação óssea em área de cotos, afinando-se para o centro, sem sinais de osso neoformado ao centro, característica do colabamento. Presença de infiltrado inflamatório mononuclear e vasos sanguíneos. (Figura 18).

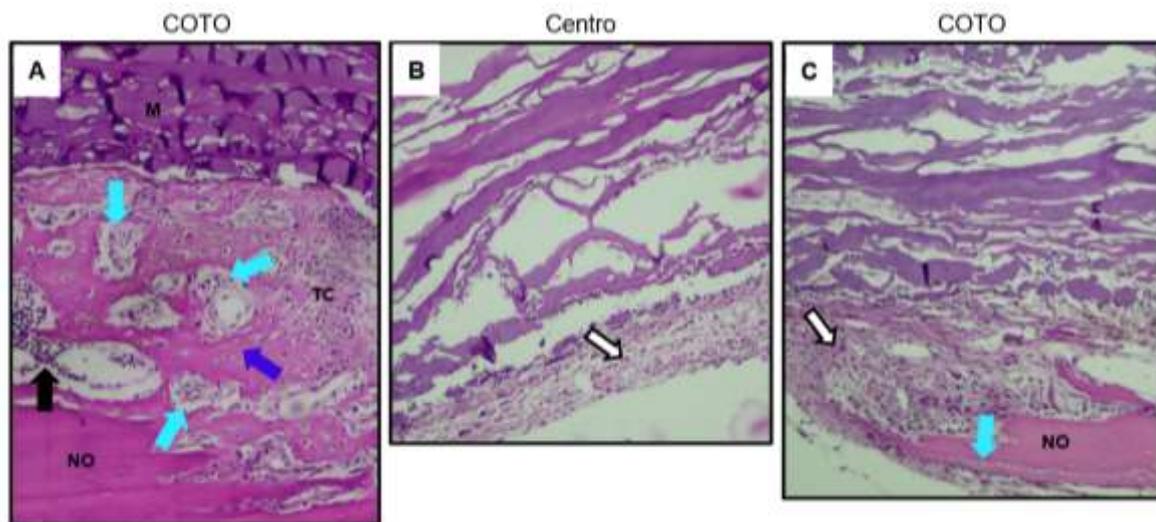
Figura 18 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com presença de tecido conjuntivo frouxo (CF) e ausência de neoformação óssea; B e D: Cotos com início de neoformação óssea (NO) e maturação do tecido conjuntivo apresentando-se ora denso (CD) ora fibroso (CF), C: ao centro vista da membrana colabada e abaixo tecido conjuntivo frouxo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Em maior aumento observa-se em área de cotos grande quantidade de tecido fibroso nos cotos, com a matriz óssea apresentando-se mais trabecular e seus espaços ocupados ora por estroma fibroso preenchido por tecido conjuntivo frouxo, formado por células mononucleares frouxamente dispostas, ora por lacunas preenchidas por medula (seta preta), característica da maturação desse tecido ósseo (Figura 19 A e C). Ao centro, presença da membrana colabada e abaixo, tecido conjuntivo frouxo pouco organizado com moderado infiltrado inflamatório (Figura 19 B).

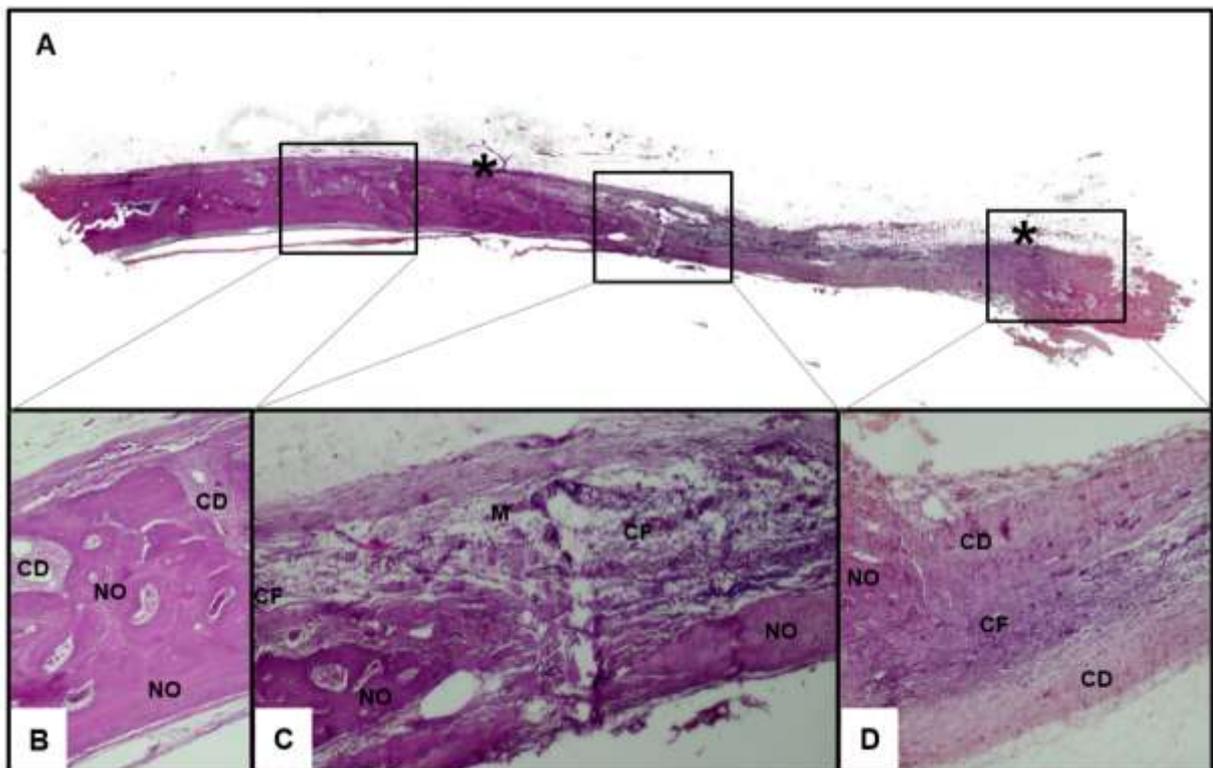
Figura 19 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: estroma fibroso preenchido por tecido conjuntivo frouxo, células mononucleares (seta azul claro), lacunas preenchidas por medula (seta preta), maturação do tecido ósseo (seta azul escuro). B: tecido conjuntivo frouxo pouco organizado (seta branca). C: neoformação óssea em área de coto e maturação do tecido fibroso (seta branca).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

15 dias: Presença da membrana ainda íntegra, circundada por tecido conjuntivo frouxo (CF) ao centro e tecido conjuntivo denso (CD) nas margens. Nos cotos também se observou ilhas de maturação do tecido de granulação para tecido ósseo e grande quantidade de osso neoformado (NO) junto aos cotos, com sugestiva migração para o centro do defeito (Figura 20).

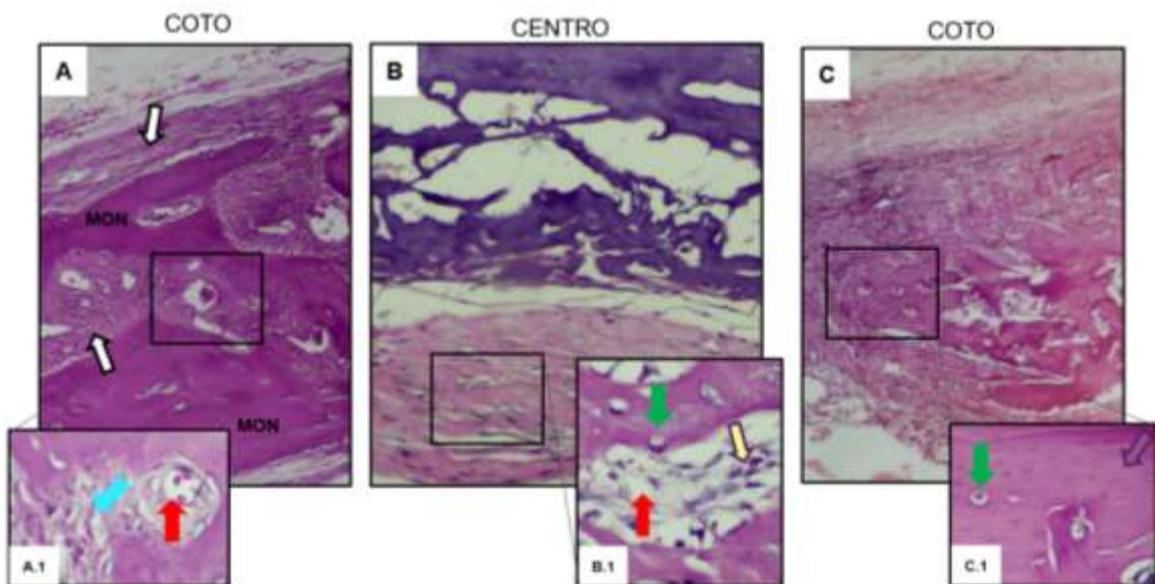
Figura 20 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 10 e 40x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e membrana colabada; C e D: Margens com início de neoformação óssea e mineralização do tecido; B presença de tecido conjuntivo frouxo, iniciando o processo de formação óssea; B e D: Margens com início de neoformação óssea.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Em maior aumento, na região dos cotos observa-se em algumas partes neoformação óssea trabecular entremeada por tecido fibroso e vasos sanguíneos. Em áreas mais próximas da região central, a maturação do tecido fibroso em tecido ósseo. Ao centro observa-se que está acontecendo início da maturação do tecido conjuntivo presente ao redor da membrana. (Figura 21).

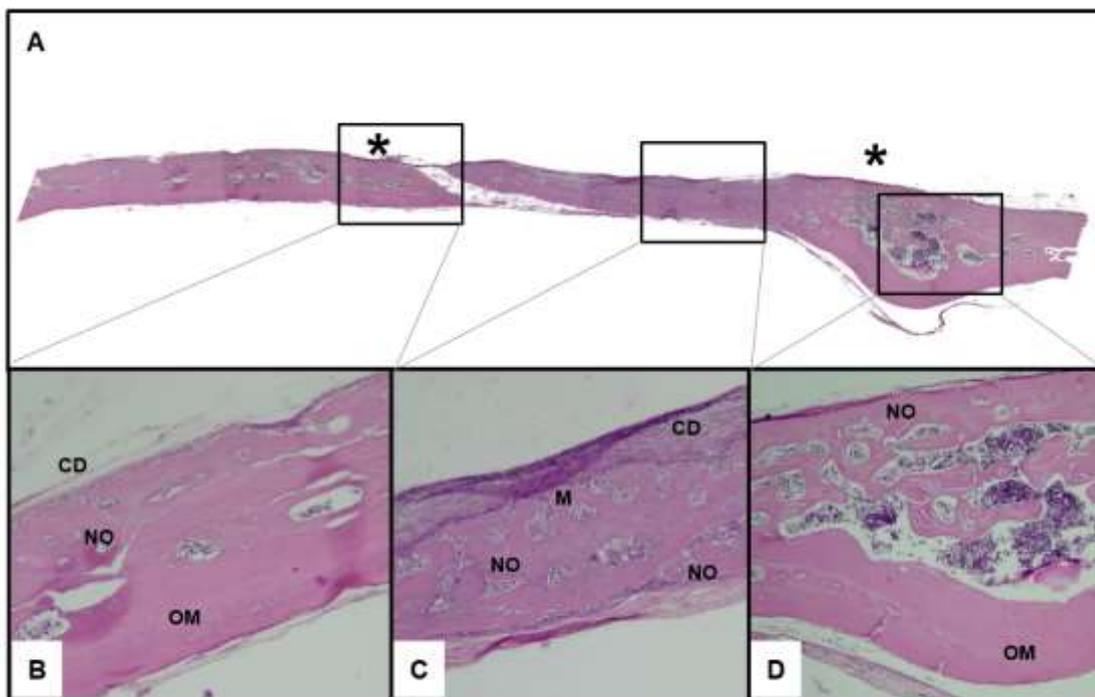
Figura 21 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: Neoformação óssea trabecular entremeada por tecido fibroso (seta branca), A.1 vaso sanguíneo (seta vermelha), estroma fibroso nos espaços trabecular (seta azul clara). B: membrana presente e abaixo dela a maturação do tecido conjuntivo. B.1: osteócito (seta verde), osteoclasto (seta amarela), vasos sanguíneos (seta vermelha). C: neoformação óssea em área de coto e maturação do tecido fibroso em tecido ósseo (seta roxa), osteócito (seta verde).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

30 dias: Não há presença da membrana íntegra, somente fragmentos. Nota-se ao centro, área de neoformação óssea permitindo o fechamento do defeito com o tecido ósseo mais trabecular. Remanescentes da membrana envolvidos por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo denso. Apesar do colapamento observa-se neoformação óssea intensa assim como de tecido conjuntivo denso (Figura 22).

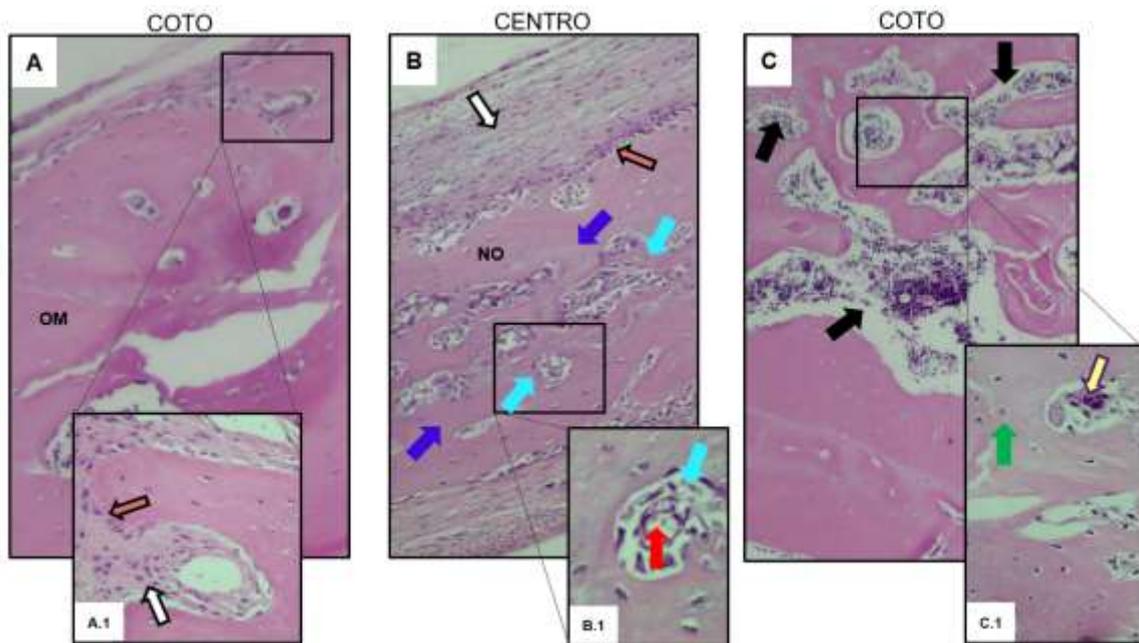
Figura 22 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 10 e 40x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) e remanescente da membrana; C e D: Margens com osso maduro, ilhas de neoformação e trabéculas preenchidas por medula; B ao centro presença de tecido conjuntivo denso e fechamento do defeito.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Em maior aumento observou-se o periosteio, no centro a neoformação óssea com remanescente ainda de tecido conjuntivo fibroso. (Figura 23)

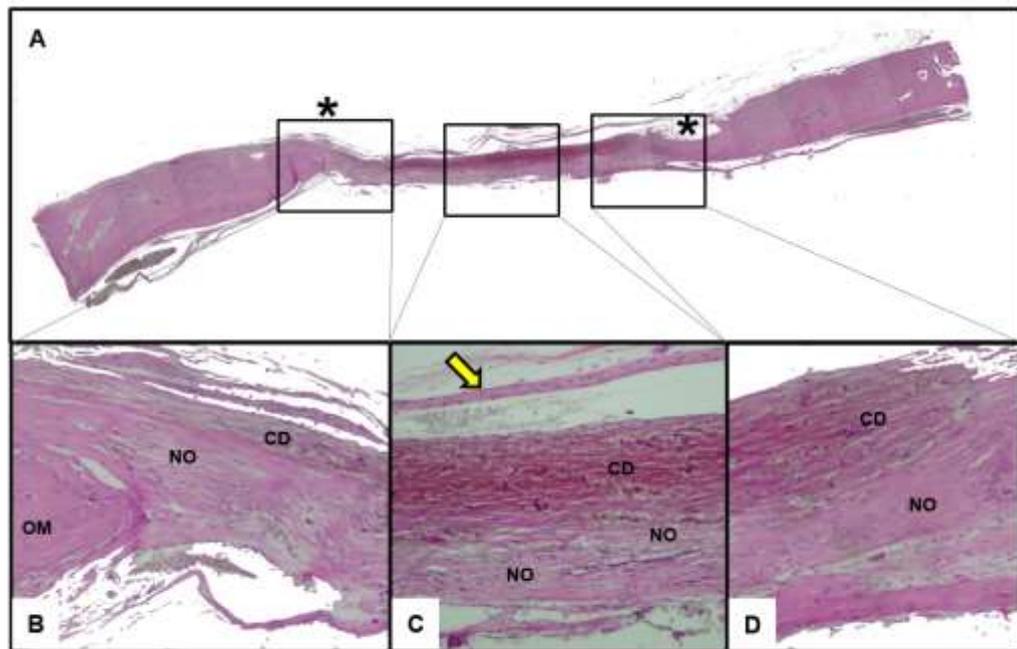
Figura 23 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: grande quantidade de osso maduro, A.1 osteoblasto depositando matriz óssea (seta salmão), periosteio (seta branca). B: Tecido conjuntivo envolvendo restos da membrana, trabéculas ósseas (seta azul escuro), estroma fibroso (seta azul claro). B.1: vaso sanguíneo (seta vermelha). C: trabéculas de tecido ósseo lamelar, delimitando cavidades preenchidas (seta preta), osteoclasto (seta amarela), osteócito (seta verde).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

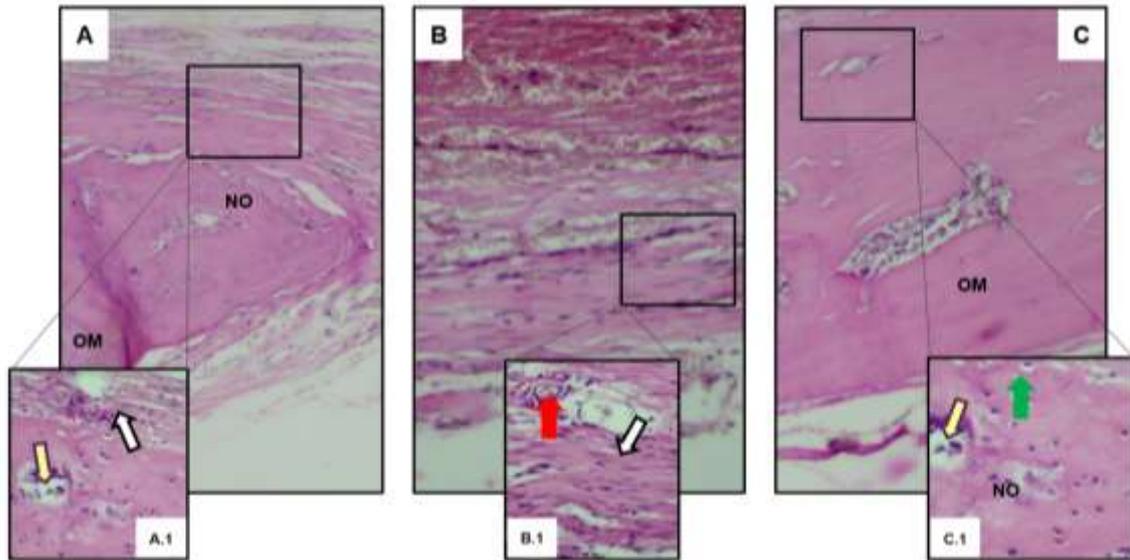
60 dias: Foi observado na maioria dos espécimes, a neoformação óssea por toda extensão, com fechamento de todo defeito ósseo e a presença de áreas de tecido conjuntivo denso no meio desse tecido ósseo neoformado e acima, a presença de periósteo (seta amarela). Não foram observados remanescentes da membrana e devido a grande quantidade de tecido conjuntivo, esse grupo apresentou formação óssea menor que os grupo GT1 e GC+ (Figura 24).

Figura 24 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com neoformação óssea por todo defeito (NO); B e D tecido ósseo maduro (OM) às margens do defeito apresentando ainda de tecido conjuntivo denso (CD); C: ao centro neoformação óssea entremeado por tecido conjuntivo denso, presença de periósteo (seta amarela).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 25 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GT2 aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: grande quantidade de osso maduro, diminuição das trabéculas, A.1 osteoclasto (seta amarela), tecido conjuntivo fibroso (seta branca). B: Tecido conjuntivo fibroso na base do defeito, entremeado por um tecido conjuntivo fibroso bem organizado (seta branca) B.1: vaso sanguíneo (seta vermelha). C: osteoclasto (seta amarela), osteócito (seta verde).

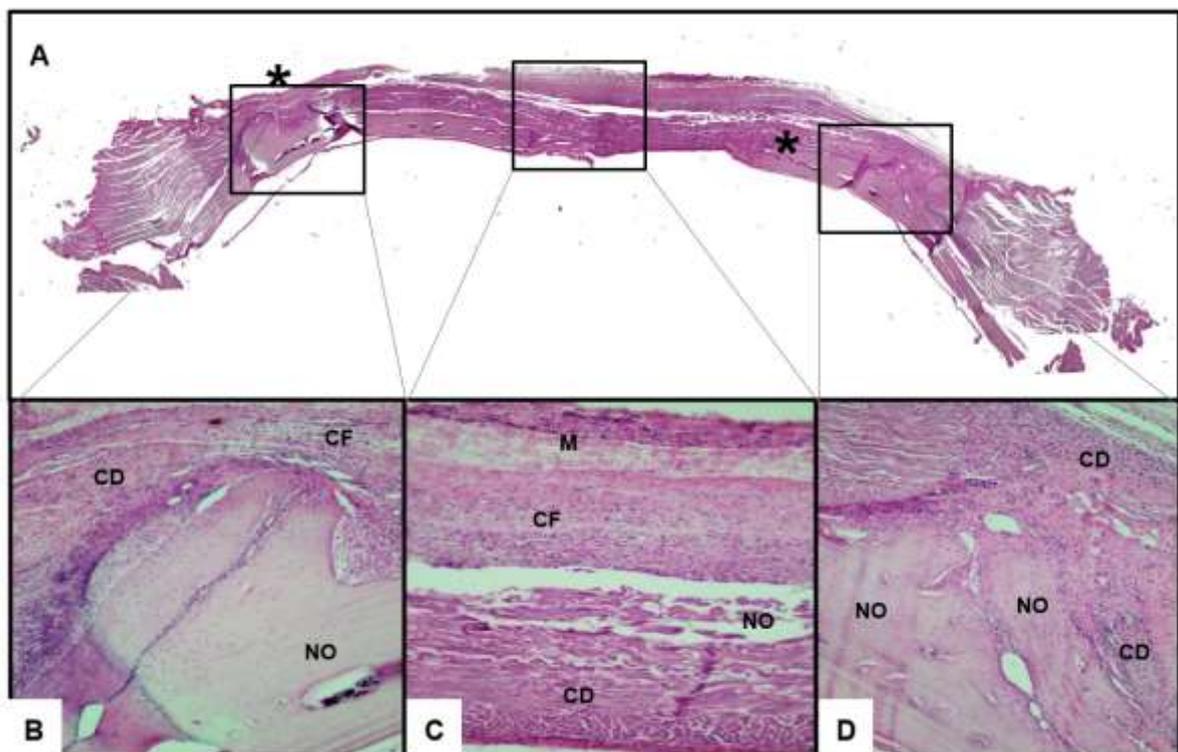


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Grupo GC+ (Bio-Gide® - controle positivo)

7 dias: Pode-se observar na reconstrução panorâmica em um aumento de 4X, a presença íntegra da membrana em toda a extensão do defeito ósseo e um tecido de granulação bem organizado. No centro do defeito, foi possível notar que esse tecido de granulação é altamente vascularizado, com leve infiltrado inflamatório e visto nitidamente a presença da membrana englobando todo o defeito. Próximo aos cotos, nos mesmos aumentos, é possível observar a presença da membrana (M) envolvendo o coto e o tecido conjuntivo justaposto ao coto que apresentou início de formação óssea (NO), e presença de tecido conjuntivo denso (CD) (Figura 26).

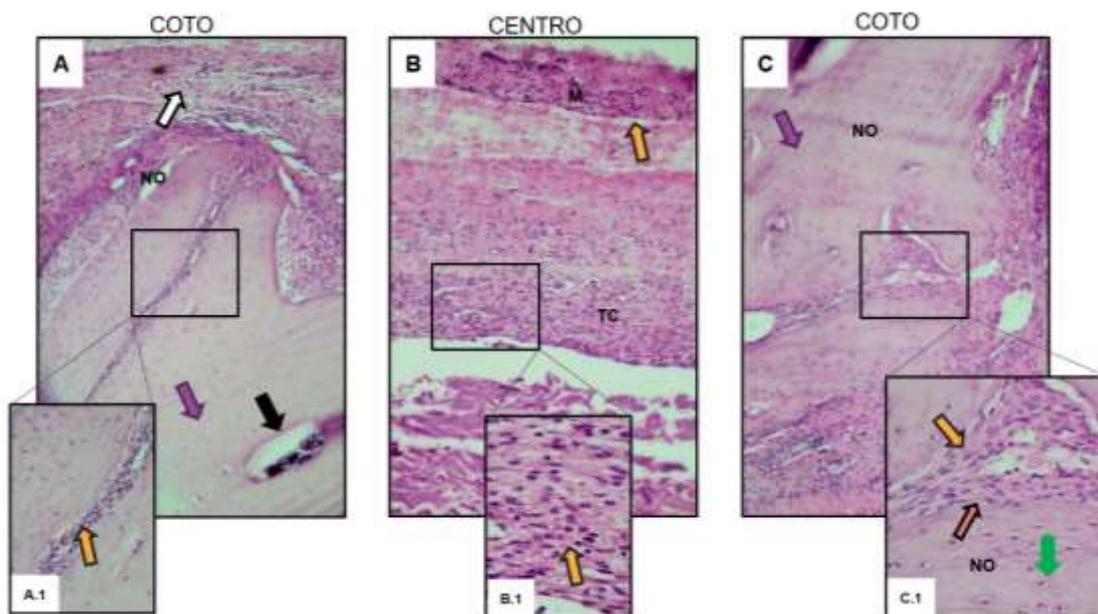
Figura 26 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo (M) e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CF); B e D: início de formação óssea às margens do defeito (NO), tecido conjuntivo denso (CD); C) diferença nos tecidos abaixo da membrana (M), tecido conjuntivo frouxo e neoformação óssea (NO) entremeada por um conjuntivo denso (CD).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Em maior aumento foi possível observar grande quantidade de neoformação óssea nos cotos, com maturação do tecido de granulação ricamente celularizado no interior de seus espaços, apresentando também espaços do tecido ósseo neoformado mesclado por tecido conjuntivo frouxo organizado. No tecido de permeio desses espaços foi possível ver ainda grande deposição de matriz óssea pelos osteoblastos. Ao centro, a membrana íntegra (M), entremeada por tecido celularizado (Figura 27).

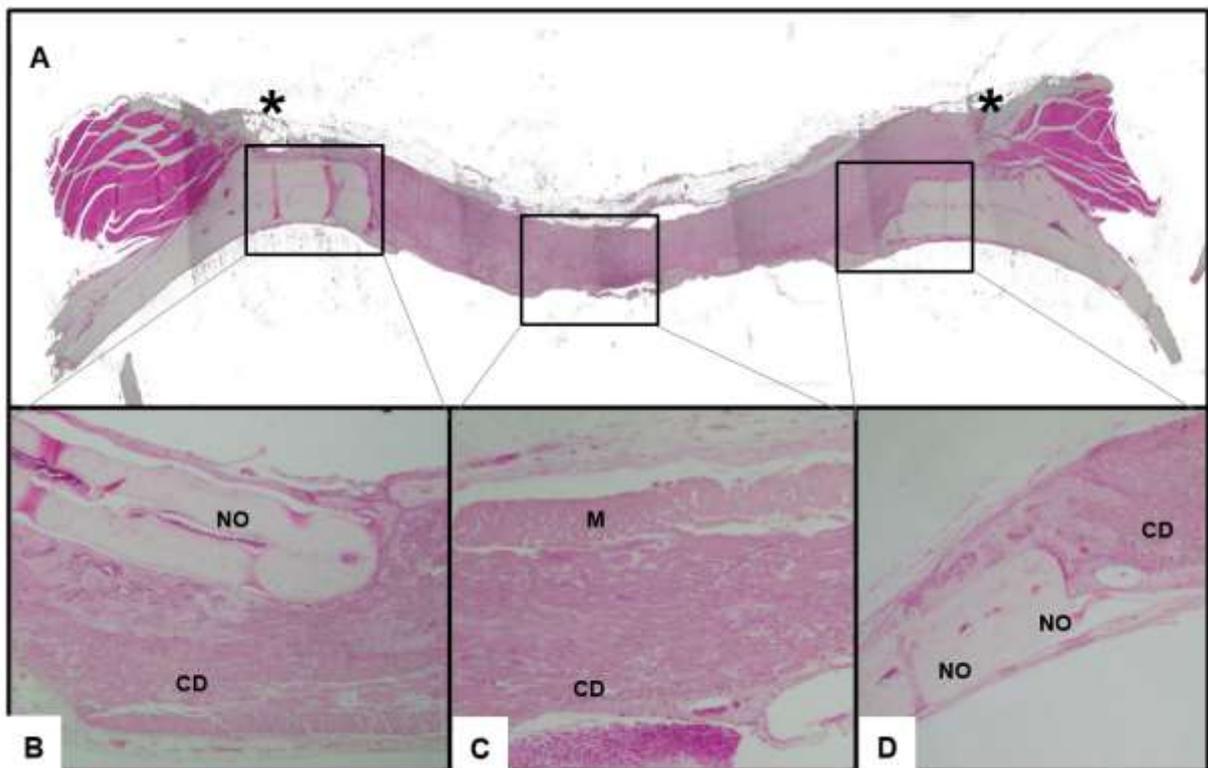
Figura 27 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: neoformação óssea nos cotos (seta roxa), maturação do tecido de granulação celularizado (seta amarela), espaços preenchidos por medula hematopoiética (seta preta) A.1 tecido celularizado (seta amarela). B: Membrana íntegra (M), tecido celularizado (seta amarela). B.1: tecido celularizado apresentando células e vasos sanguíneos. C trabéculas ósseas neoformadas (seta roxa), B.1 espaços trabeculares preenchidos de tecido conjuntivo frouxo organizado (seta amarela), osteoblastos depositando matriz óssea (seta salmão) e osteócitos (seta verde).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

15 dias: Na imagem panorâmica de magnitude 4x, observa-se a presença da membrana íntegra que recobre toda área do defeito ósseo, adaptada sobre os cotos. Presença de tecido conjuntivo ao centro do defeito e tecido conjuntivo maduro com pouco infiltrado inflamatório, ainda bem vascularizado com áreas de tecido ósseo neoformado a partir dos cotos (Figura 28).

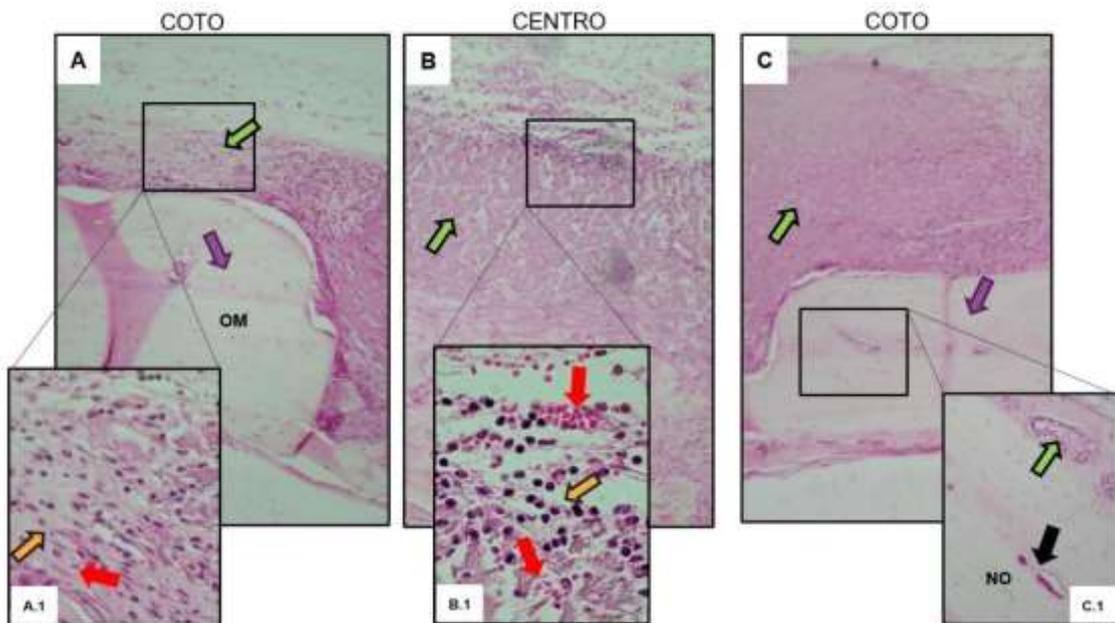
Figura 28 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) com a presença da membrana de colágeno suíno em toda a extensão do defeito ósseo (M) e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CF); B e C: Maturação do tecido ósseo as margens do defeito (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Em maior aumento foi possível ver nos cotos, grande quantidade de neoformação óssea, maturação do tecido ósseo primário, com suas fibras colágenas dispostas em várias direções. No centro, ilhas de neoformação óssea. (Figura 29).

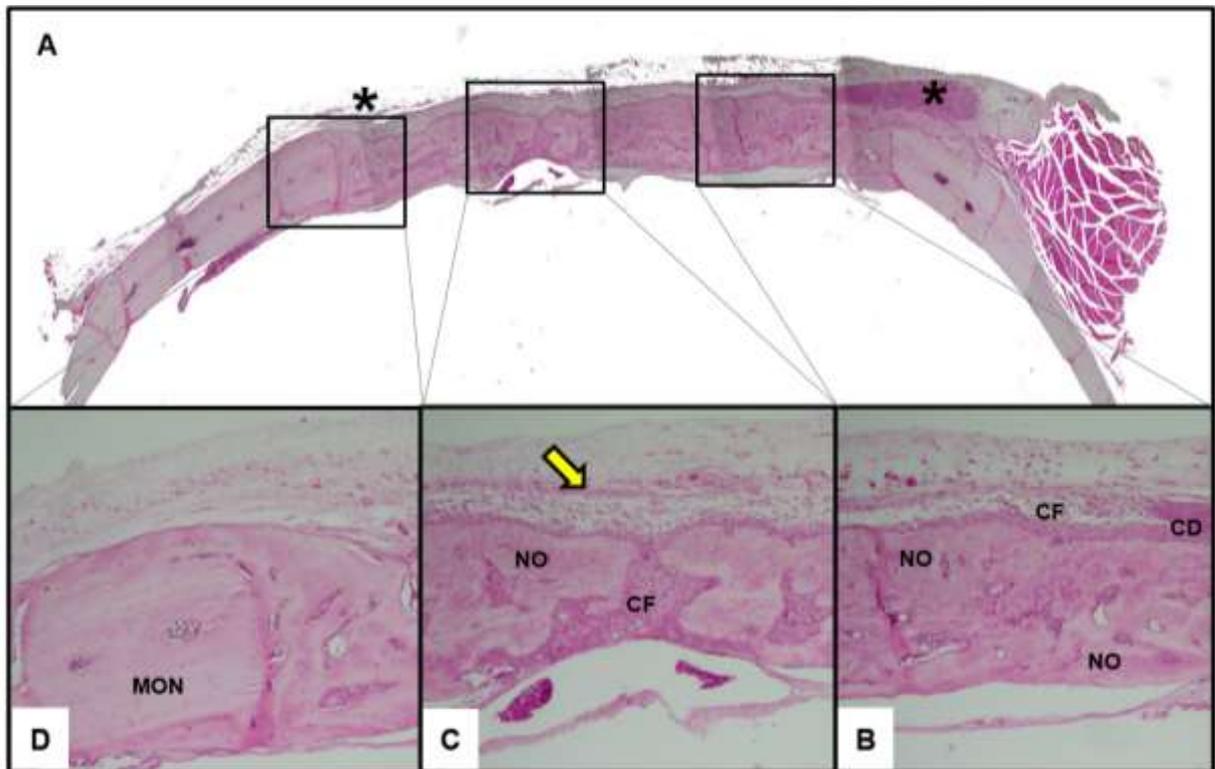
Figura 29 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A, C: neoformação óssea nos cotos (seta roxa), maturação do tecido ósseo primário, fibras colágenas dispostas em várias direções. A.1 e B.1: células mononucleares (seta amarela) e vasos sanguíneos (seta vermelha) nas fibras colágenas. C.1 transição do osso primário em osso lamelar trabecular (seta roxa), trabéculas ósseas apresentando espaços de medula hematopoiética (seta preta)



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

30 Dias: A reconstrução panorâmica demonstra que há uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana e a presença de periósteo acima (seta amarela). No centro do defeito a presença de remanescente da membrana entre a área de tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo organizado sobre a membrana remanescente. Em grande parte dos espécimes verificou-se o fechamento do defeito e alguns ainda com a presença de pequenas áreas de tecido conjuntivo denso. A neoformação óssea a partir dos cotos foi observada em todos os espécimes, confirmando que o reparo acontece no sentido central (Figura 30).

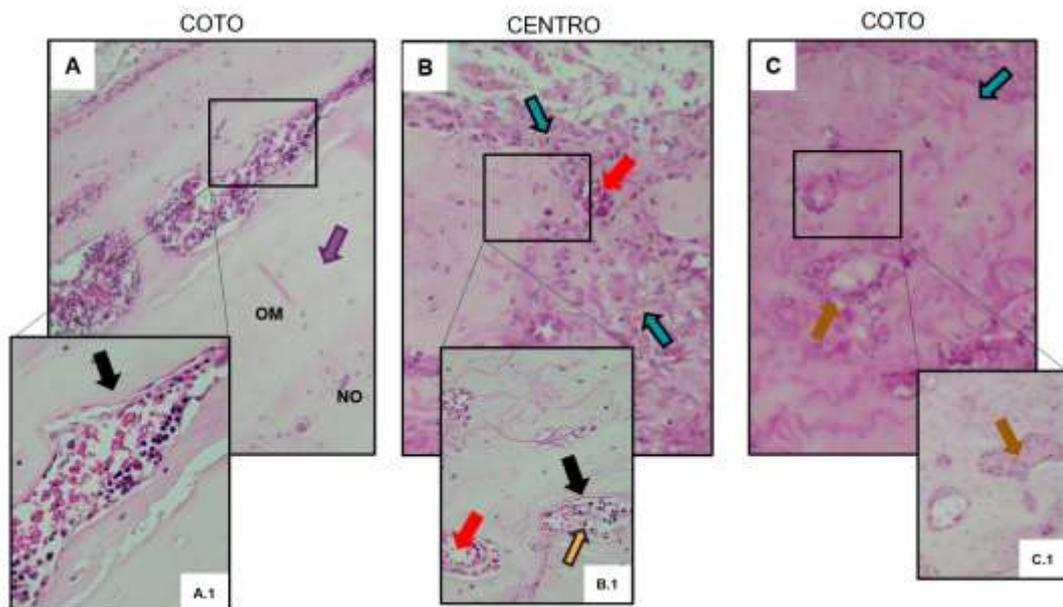
Figura 30 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 40x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*) fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro e restos da membrana; B e D: Maturação do tecido ósseo às margens do defeito (MON), diminuição das trabéculas e presença ainda de tecido conjuntivo denso. C: presença de remanescentes da membrana envolta por tecido conjuntivo fibroso organizado (CF) e osso neoformado. Acima, presença de periósteo (seta amarela).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Em maior aumento, a região dos cotos apresentou grande quantidade de tecido ósseo lamelar e a confluência de pontes ou traves de tecido ósseo recém-formadas no centro da ossificação, mantendo espaços entre si preenchidos por células e vasos sanguíneos e a maturação do tecido primário com células mesenquimatosas se diferenciando e se transformando em grupos de osteoblastos que sintetizam uma matriz ainda não mineralizada. O centro do defeito apresentou osso maduro nas extremidades, com fechamento quase total do defeito e ao meio é possível ver a transição do tecido primário em tecido secundário, com as fibras colágenas mais organizadas (Figura 31).

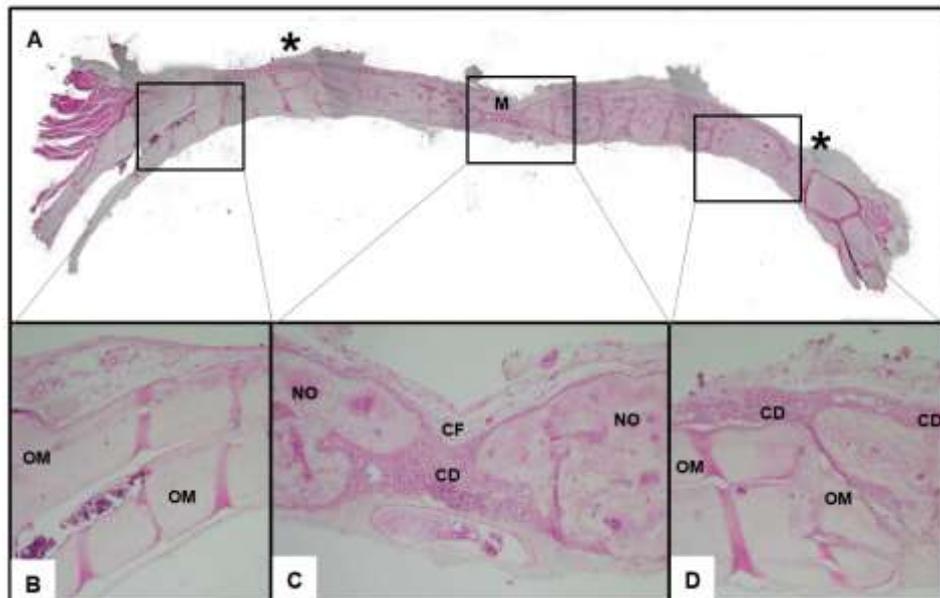
Figura 31 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A.1 e B.1: confluência de pontes ou traves de tecido ósseo preenchidos por células mesenquimais, osteoprogenitoras e vasos sanguíneos (seta preta). B: transição do tecido primário em secundário, com as fibras colágenas mais organizadas (seta azul). C: fase de maturação do tecido primário. (seta azul) células mesenquimatosas se transformando em grupos de osteoblastos (seta marrom).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

60 Dias: A membrana caracteriza-se da mesma maneira quando comparado ao grupo de 30 dias. O tecido ósseo de permeio entre a membrana mostra uma maior organização e mineralização tecidual, com redução das lacunas preenchidas por células e vasos sanguíneos entremeando o osso neoformado, diminuindo a quantidade de trabéculas e tornado esse osso mais denso. Observa-se ainda uma maior quantidade de tecido medular e uma maior organização de tecido ósseo. (Figura 32).

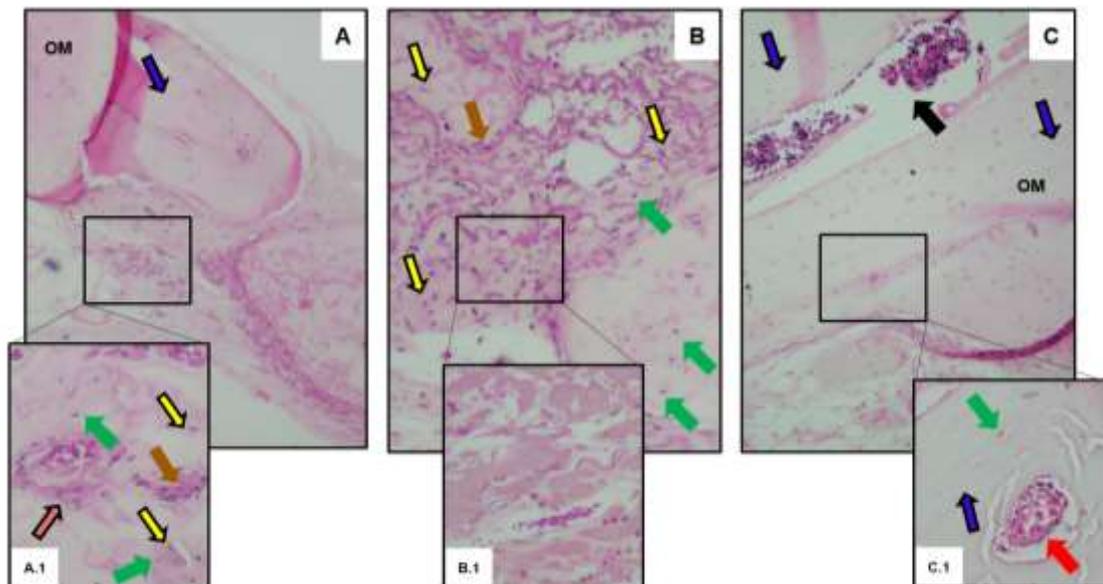
Figura 32 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 10x, coloração HE. A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B e D: Maturação do tecido ósseo as margens do defeito apresentado ilhas de neoformação (NO) e presença ainda de tecido conjuntivo denso. C: defeito fechado quase que completo entremeado de tecido conjuntivo ao centro, com restos da membrana de colágeno porcino ao centro e abaixo um tecido de granulação bem organizado (CD).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Em um maior aumento foi possível observar o processo de ossificação ocorrendo dos cotos até o centro do defeito. Pois nos cotos vemos a presença de osso lamelar maduro, apresentando fibras colágenas organizadas em lamelas planas e ao se aproximar do centro do defeito vemos grupos de osteoblastos. Foi possível observar ainda, a região central apresentando osso maduro nas extremidades, com fechamento quase total do defeito e ao meio é possível ver a transição do tecido primário em tecido secundário, com as fibras colágenas mais organizadas (Figura 33).

Figura 33 - Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC+ aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40 e 100x, coloração HE. A: grande quantidade de tecido ósseo lamelar nos cotos (seta roxa). A.1 e B.1: confluência de pontes ou travess de tecido ósseo recém-formadas no centro da ossificação, mantendo espaços entre si preenchidos células e vasos sanguíneos (seta preta). B: centro apresentando osso maturado nas extremidades, com fechamento quase total do defeito e ao meio, a transição do tecido primário em tecido secundário. fibras colágenas organizadas (seta azul). C: fase de maturação do tecido primário. (seta azul), grupos de osteoblastos sintetizado uma matriz ainda não mineralizada (seta marrom).

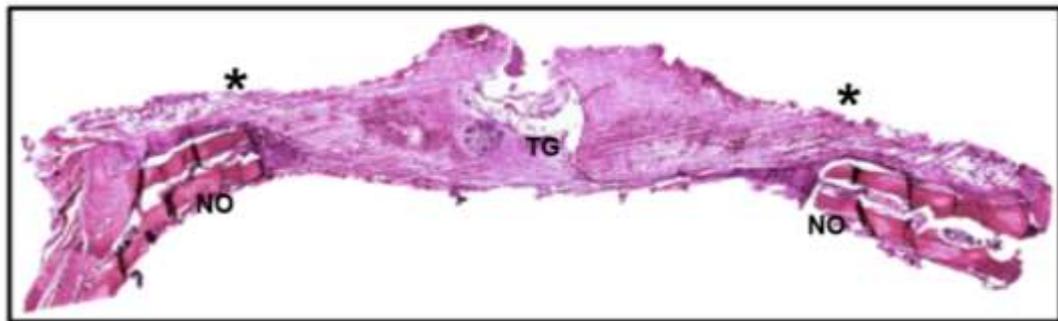


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Grupo GC (Coágulo - controle negativo)

7 dias: Em análise panorâmica, ao centro observa-se o defeito ósseo preenchido por um tecido de granulação e na borda do defeito ósseo, em direção ao centro da ferida, neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído. A neoformação óssea foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central, com abundante tecido de granulação jovem preenchendo a região central da ferida (Figura 34).

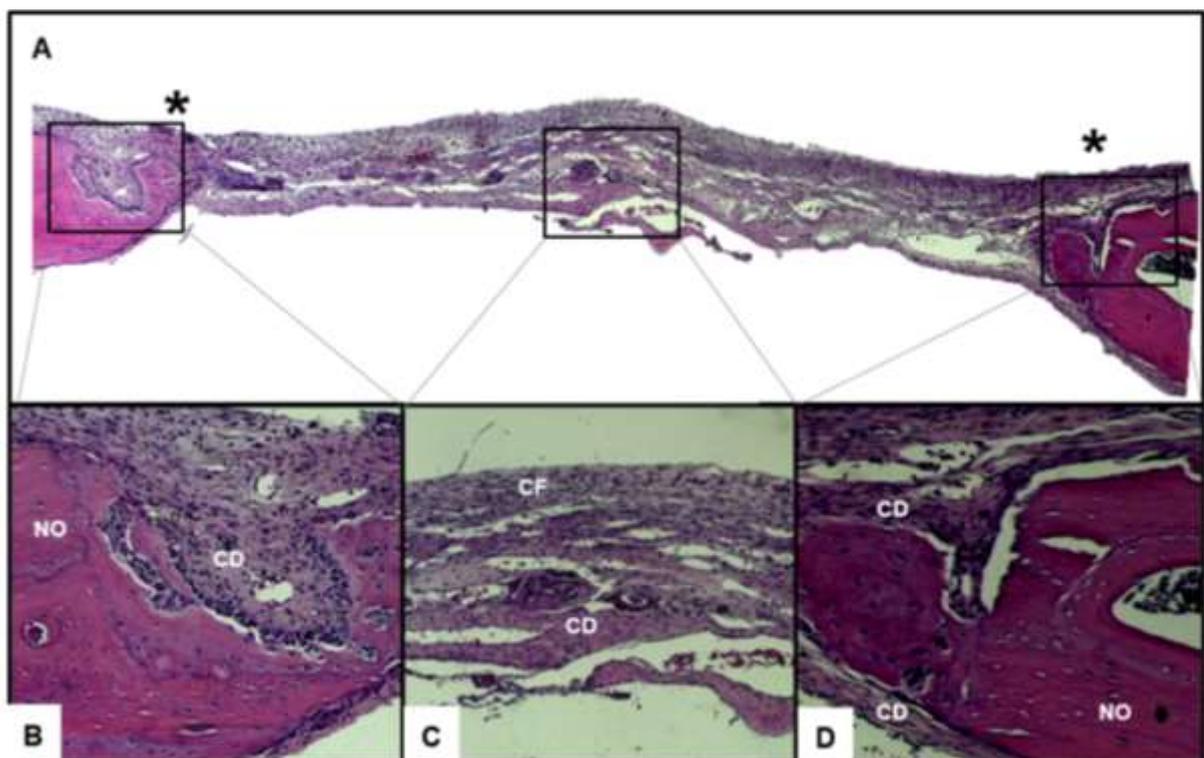
Figura 34 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4x coloração HE. – A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre*). Defeito preenchido por tecido de granulação (TG). Início de neoformação óssea próximo aos cotos (NO).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

15 dias: na imagem panorâmica verifica um tecido conjuntivo frouxo (CF) preenchendo o defeito ósseo e em maior aumento observou-se a partir da borda do defeito ósseo indo em direção ao centro da ferida, uma neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, abundante em osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. Foi observado neoformação óssea unicamente nos cotos do defeito cirúrgico, no centro do defeito crítico ausência de neoformação óssea, com presença de abundante tecido de granulação jovem, preenchendo a região central da ferida (Figura 35)

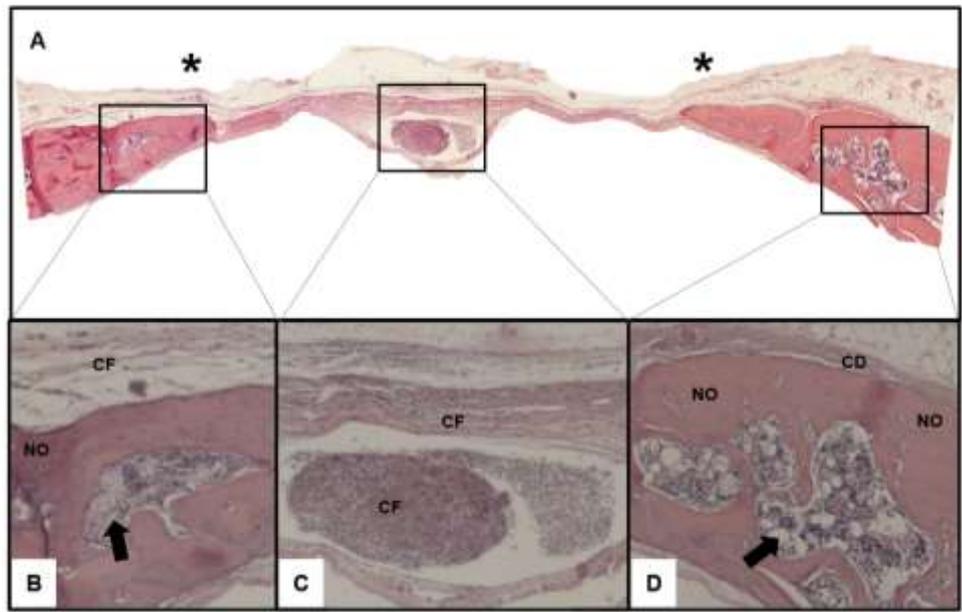
Figura 35 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 40x coloração HE. A – visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B,D: Cotos apresentando neoformação óssea e presença de tecido conjuntivo denso; C: Defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo na superfície e denso na parte mais profunda, com início de maturação ao centro.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

30 dias: Neste período 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. Observa-se as áreas de osteotomia com os cotos ósseos esquerdo e coto direito 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 36).

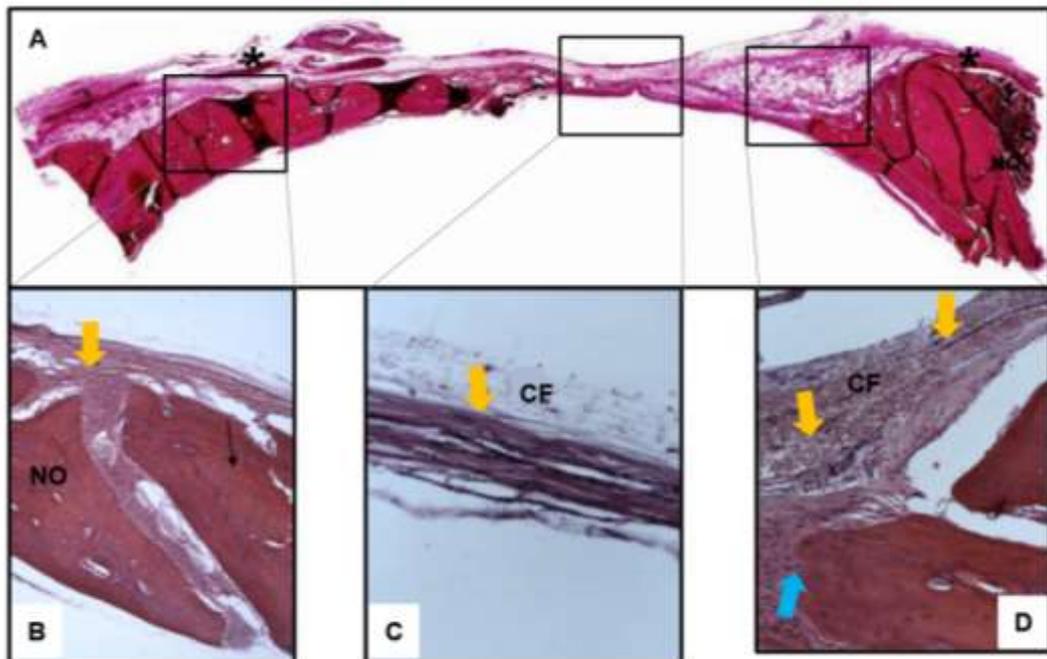
Figura 36 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 40x coloração HE. A – visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B, D: Cotões apresentando neoformação óssea com espaços preenchidos por células mesenquimais, células osteoprogenitoras e vasos sanguíneos (seta preta); C: Defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo e denso.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

60 Dias: Nota-se uma maior aproximação dos cotos do defeito, contudo, sem o fechamento do defeito, sendo o espaço preenchido por um tecido conjuntivo fibroso (CF). Permaneceu o mesmo resultado do período anterior com pouco tecido ósseo neoformado, e presença de grande quantidade de tecido conjuntivo não mineralizado e tecido conjuntivo fibroso (Figura 37).

Figura 37 - Fotomicrografia panorâmica da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC- aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 4 e 40x coloração HE. A – Visão panorâmica do defeito ósseo (entre*); B,D: Cotos apresentando neoformação óssea (seta azul) entremeadado por tecido conjuntivo fibroso (seta amarela); C: Ausência de tecido ósseo neoformado e presença de tecido conjuntivo fibroso (seta amarela).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4.2 Análise Histométrica

Os resultados obtidos foram interpretados de maneira a traçar o perfil inflamatório e avaliar a capacidade osteopromotora de cada membrana testada em comparação com o controle positivo (GC+) e o controle negativo (GC-).

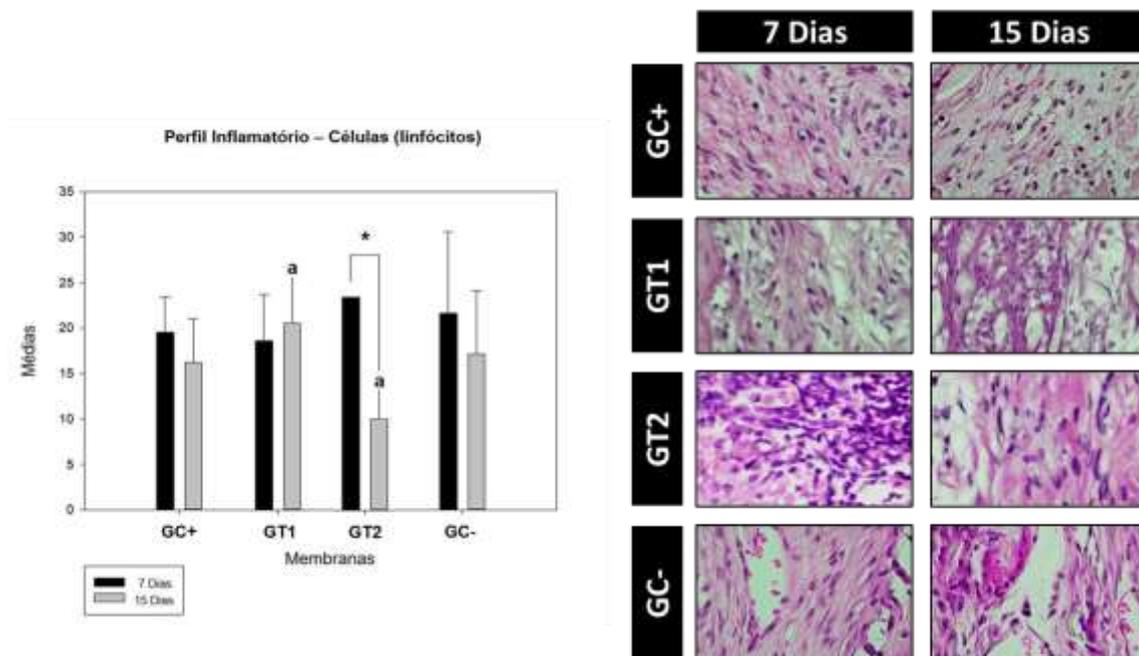
Análise de perfil inflamatório – Células e Vasos sanguíneos

Avaliando comparativamente a relação dos grupos em relação aos tempos de 7 e 15 dias (intra grupos), houve diferença estatisticamente significativa somente no

grupo (GT2) com ($p = 0,001$), e não houve diferença nos grupos (GT1) ($p = 0,610$), (GC+) ($p = 0,388$) e (GC-) ($P=0,243$).

No tempo de 07 dias, avaliando a relação entre os grupos, quanto ao conteúdo celular, o grupo (GT1) apresentou menor quantidade de células, seguido pelo grupo (GC+) e pelo grupo (GC-). O grupo (GT2) atingiu a maior quantidade de linfócitos, porém não houve diferença estatística em nenhum dos grupos avaliados ($p > 0,05$). No momento da mesma avaliação, já no período de 15 dias, notamos diferença no padrão de resposta inflamatória, do grupo (GT1) que atingiu maior número de células, com diferença estatística para o grupo (GT2) que apresentou menor quantidade de células inflamatórias nesse período ($p=0,030$), seguido do grupo (GC+). (Figura 38).

Figura 38 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter-grupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos) no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas significantes inter grupos para o período de 15 dias, o * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias.

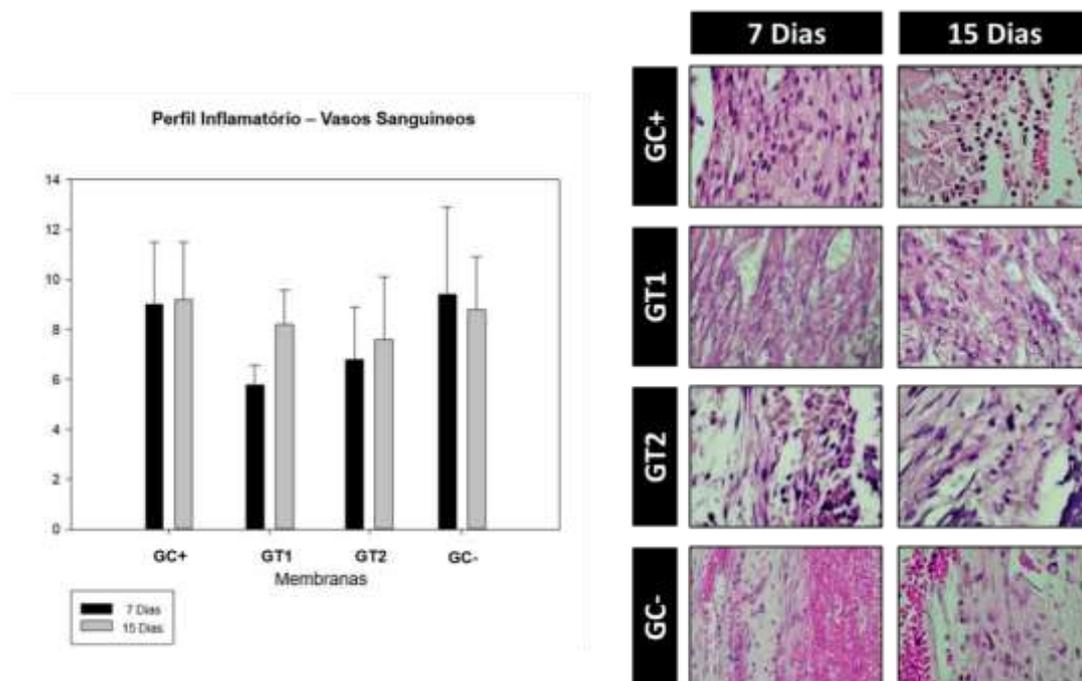


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Na avaliação da quantidade de vasos sanguíneos, não houve diferença estatística da capacidade angiogênica entre os grupos para nenhum dos tempos,

sugerindo um comportamento semelhante entre os grupos ($p < 0,05$), porém aos 7 dias, os grupos (GC+) e (GC-) apresentaram comportamento semelhante de maior neovascularização que os grupos (GT2) e (GT1). Aos 15 dias, houve um aumento da vascularização dos grupos (GT2) e (GT1), apresentando desempenho igual aos grupos (GC+) e (GC-) (Figura 39).

Figura 39 - Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise da quantidade de vasos sanguíneos no período de 7 e 15 dias, sem diferença estatística significativa para nenhum dos períodos e grupos avaliados.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

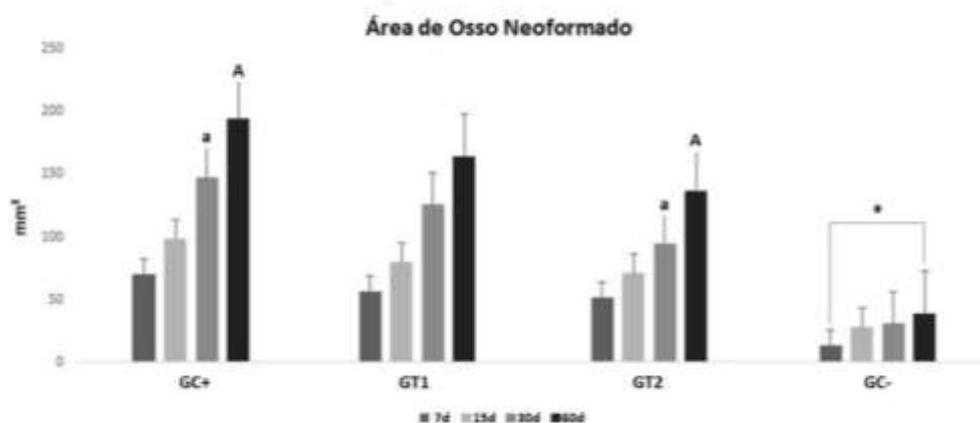
Análise da área de osso neoformado (AON)

Em uma análise comparativa da área de osso neoformado entre os grupos (GT1), (GT2) e (GC+), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 7 e 15 dias, sugerindo que os grupos se comportaram de maneira similar em relação a neoformação óssea. Nos períodos mais tardios do processo de reparo ósseo, o grupo (GT2) apresentou diferença estatisticamente significativa para o grupo (GC+) aos 30 ($p=0,002$) e aos 60 dias ($p<0,001$). O grupo (GT1) teve aumento mais expressivo que o grupo (GT2) na quantidade de osso neoformado porém ainda

menor que o grupo (GC+) e sem apresentar diferença significativa aos 30 e 60 dias para os grupos (GC+) e (GT2). O grupo coágulo apresentou neoformação óssea inferior aos demais grupos, compatível com o desempenho esperado apresentando diferença significativa para os grupos (GT1, (GT2) e (GC+) em todos os períodos (Figura 40, tabela 2).

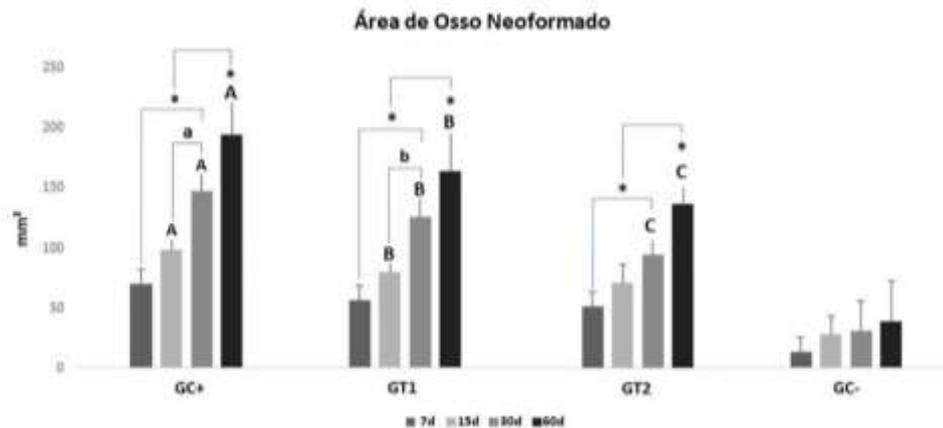
Foi possível observar também que o tempo foi um fator importante para a neoformação óssea dos grupos com membrana. Em uma análise intragrupos, o grupo (GC+) só não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 7 e 15 dias ($p=0,104$), sugerindo uma neoformação óssea progressiva, mais lenta nos períodos iniciais e de maior atividade nos períodos mais tardios de 30 e 60 dias, assim como o grupo (GT1) que também não apresentou diferença apenas entre o período de 7 e 15 dias ($p=0,227$). O grupo (GT2) não apresentou diferença somente entre os tempos de 7 e 15 dias ($p=0,37$) e 15 e 30 ($p=0,223$). O fator tempo não teve influencia nos resultados apresentados pelo GC-, sem diferença estatística em nenhum dos períodos (Figura 41).

Figura 40 - Gráfico de comparativo intergrupos das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (GC+, GT2, GT1 e GC-) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. (a) minúsculo representa a diferença estatística entre os grupos (GC+) e (GT2) no período de 30 dias; (A) maiúsculo representa a diferença entre os grupos (GC+) e (GT2) no período de 60 dias e (*) representa que houve diferença estatística entre os grupos (GC+), (GT2) e (GT1) para o grupo coágulo em todos os períodos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 41 - Gráfico de comparativo intragrupos das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (GC+, GT2, GT1 e GC-) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. Letras minúsculas representam diferença estatística intragrupo para os períodos de 15 a 30 dias; letras maiúsculas representam diferença estatística intragrupo entre os períodos 15 a 30 e 30 a 60; (*) representa diferença estatística para os períodos 7,15 e 30 dias em relação ao período de 60 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Tabela 2 – Comparativo fator grupo períodos 7,15,30 e 60 dias (média)

Comparativo Fator Grupo 7 dias				Comparativo Fator Grupo 15 dias			
Grupos comparativos	Média	p	(p<0,05)	Grupos comparativos	Média	p	(p<0,05)
GC+ vs GC-	5.717.906	<0,001	Sim	GC+ vs GC-	7.073.113	<0,001	Sim
GC+ vs GT2	1.840.871	0,408	Não	GC+ vs GT2	2.759.715	0,118	Não
GC+ vs GT1	1.372.795	0,641	Não	GC+ vs GT1	1.907.694	0,378	Não
GT1+ vs GC-	4.345.111	0,008	Sim	GT1+ vs GC-	5.165.419	0,002	Sim
GT1 vs GT2	468.076	0,977	Não	GT1 vs GT2	852.021	0,88	Não
GT2+ vs GC-	3.877.035	0,019	Sim	GT2+ vs GC-	4.313.398	0,009	Sim

Comparativo Fator Grupo 30 dias				Comparativo Fator Grupo 60 dias			
Grupos comparativos	Média	p	(p<0,05)	Grupos comparativos	Média	p	(p<0,05)
GC+ vs GC-	11.586.665	<0,001	Sim	GC+ vs GC-	15.457.421	<0,001	Sim
GC+ vs GT2	5.242.078	0,002	Sim	GC+ vs GT2	5.765.344	<0,001	Sim
GC+ vs GT1	2.140.598	0,284	Não	GC+ vs GT1	2.968.568	0,085	Não
GT1+ vs GC-	9.446.067	<0,001	Sim	GT1+ vs GC-	12.488.853	<0,001	Sim
GT1 vs GT2	3.101.480	0,069	Não	GT1 vs GT2	2.796.776	0,112	Não
GT2+ vs GC-	6.344.587	<0,001	Sim	GT2+ vs GC-	9.692.077	<0,001	Sim

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4.3 Análise Microtomográfica

Microtomografia computadorizada (MicroCT)

Para a análise estatística da avaliação por micro-CT, foi aplicado o teste ANOVA um fator, para cada parâmetro dos dados obtidos. Observou-se diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) nos parâmetros **Po.tot** (porosidade total em %), **BV/TV** (porcentagem de volume ósseo em %), **BV** (volume ósseo em mm^3) e **Tb.Sp** (separação de trabéculas, em mm). Os parâmetros, **Tb.N** (número de trabéculas, 1/mm), e **Tb.Th** (espessura trabecular em mm) não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 3 e Figura 42). Após os resultados da análise estatística entre grupos por ANOVA um fator, os dados que apresentavam diferença estatística foram submetidos ao pós teste de Tukey e Holm-Sidak para observar as diferenças intragrupos.

O parâmetro **Po.tot** apresentou diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos ($p \leq 0,001$). O grupo GC- apresentou maior número de porosidade total, seguido dos grupos GT1 e GT2. O grupo GC+ apresentou menor porosidade. O parâmetro **BV/TV** também apresentou diferença significativa entre todos os grupos ($p \leq 0,001$). O grupo GC+ apresentou maior porcentagem de volume ósseo, seguido dos grupos GT1 e GT2. O GC- apresentou menor volume ósseo. No parâmetro **BV** o GC+ apresentou maior volume ósseo com diferença significativa para o grupo GC- ($p=0,007$), seguido do grupo GT1 que também apresentou diferença apenas para o grupo GC- ($p=0,041$) e do grupo GT2 que apresentou diferença apenas para o grupo GC- ($p=0,033$), o GC- apresentou os menores valores. O parâmetro **Tb.Sp** também apresentou diferença significativa entre todos os grupos ($p=0,046$). Os grupos GT2 e GT1 apresentaram médias semelhantes, seguidas do grupo GC- e GC+ que apresentou menor separação de trabéculas (Tabela 3 e Figura 42).

No parâmetro **Tb.N** o GC+ apresentou os maiores valores, seguido dos grupos GT1 e GT2 que apresentaram resultados similares entre si, seguido do GC- que apresentou resultado bem inferior aos demais grupos. Em relação ao **Tb.Th**, os grupos GT2 e GC- obtiveram média semelhante e de maior espessura trabecular que os grupos GC+ e GT1. (Tabela 3).

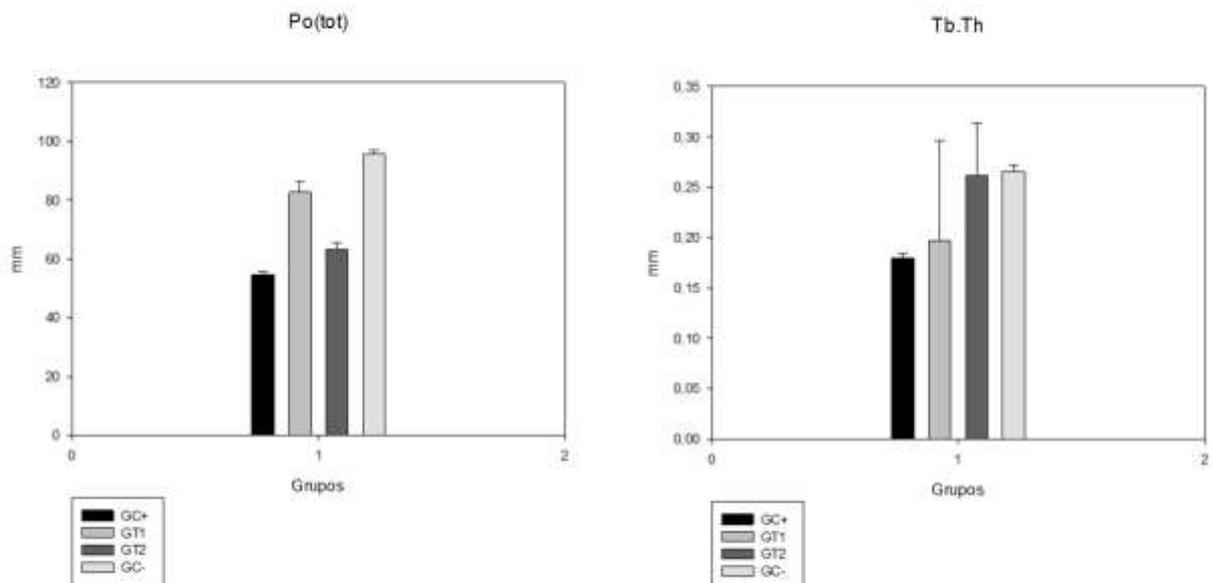
Tabela 3 – Análise por micro-CT após 60 dias

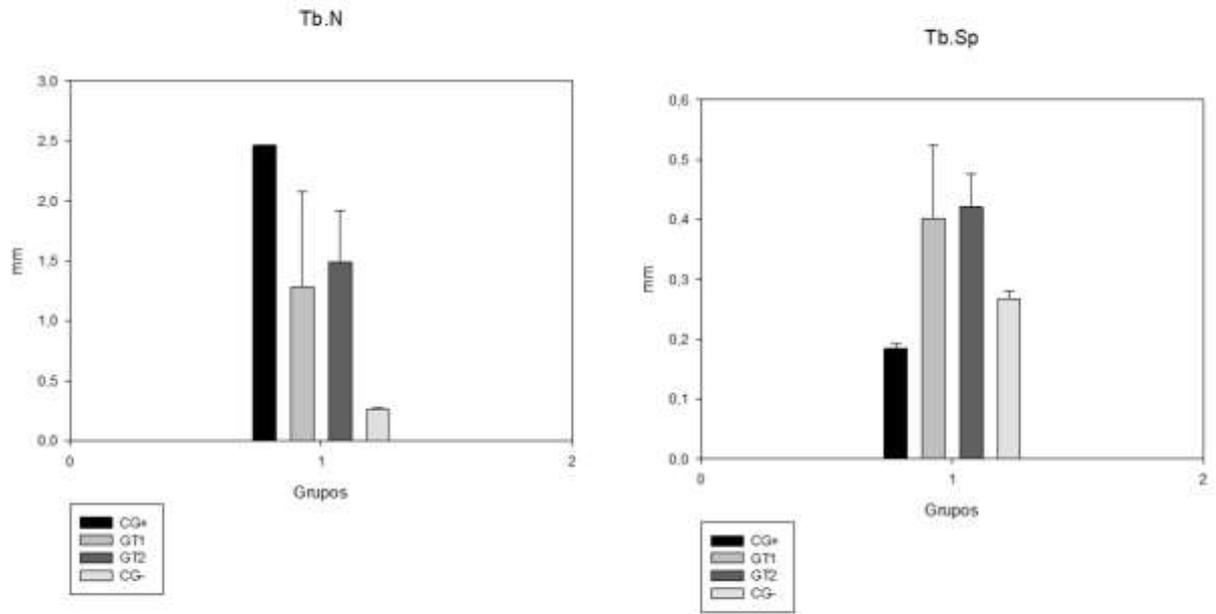
Tabela 3. Análise por micro-CT (n=6) após 60 dias (média).

	BV (mm ³)	BV/TV (%)	Tb.N (1/mm)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)	Po.Tot
GC+	7,486	41,667	2,616	0,181	0,182	54,669
GT1	5,215	17,88	1,324	0,195	0,399	82,584
GT2	4,033	14,967	1,338	0,274	0,457	63,083
GC-	0,398	5,261	0,262	0,266	0,268	95,582
ANOVA	p=<0,001	p=<0,001	p=0,082	p=0,522	p=0,046	p=<0,001

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 42 - Gráficos de análise dos parâmetros (BV), (BV/TV), (Po.tot), (Tb.th), (Tb.Sp), Tb.N) dos grupos (GC+), (GT2), (GT1) e (GC-) após microtomografia computadorizada (micro-CT) no período de 60 dias.





Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

5 DISCUSSÃO

O uso do colágeno na confecção de membranas tornou-se preferência dentro da engenharia de tecidos, sendo elegíveis por suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e afinidade celular [20]. As dificuldades na produção resultando em propriedades mecânicas inferiores, rápida degradação, reação inflamatória exacerbada e pouca neoformação óssea são fatores que poderiam ser considerados desvantagens [31]. Portanto, essas características foram analisadas nas membranas utilizadas no presente estudo [1,2].

Intencionalmente, não foram utilizados biomateriais para o preenchimento do defeito crítico produzido em razão da análise do desempenho isolado das diferentes membranas utilizadas, com o objetivo de avaliar o potencial regenerativo de duas membranas nacionais de pericárdio bovino em comparação com uma membrana de colágeno oriunda da derme porcina líder no mercado nacional e internacional. A realização de um grupo que denominamos de controle negativo, foi feita para que pudéssemos certificar que um processo de reparo em um defeito crítico de 8mm não aconteceria por completo sem a presença de algum biomaterial, o que foi possível comprovar em nossos resultados. [4, 23-25].

A membrana de colágeno porcino utilizada como grupo controle positivo foi a BioGide®, que apresentou desempenho semelhante ao já apresentado em outras publicações [4,24-25,32-33] vindo de encontro aos nossos resultados. As membranas de pericárdio bovino aqui testadas, foram a Surgitime Collagen® e Techgraft®, fabricadas a partir da reticulação do colágeno tipo I modificado por hidrólise dos grupos carboxiamidas por uma solução aquosa de dimetilsulfóxido e equilibrada por uma solução tampão fosfato, para então ser liofilizada e esterilizada [19]. Este processo remove todos os elementos celulares do pericárdio bovino, resultando em uma matriz composta somente por colágeno tipo I e fibras elásticas [34], a fim de melhorar as características mecânicas dessas membranas [35].

Nesse contexto, a análise da reação inflamatória não somente está relacionada à biocompatibilidade da membrana e sua estabilidade ao longo do processo de ROG, como também ao tratamento que o colágeno recebe ao longo de sua fabricação. [19,21]. Dependendo do tipo de tratamento, pode resultar em processos inflamatórios mais intensos, interferindo na qualidade da membrana e nas suas características

biológicas [17,21,29]. Nenhuma das membranas teste apresentou infiltrado inflamatório muito intenso e fora da curva normal esperada, sem sinais de necrose tecidual ou processo inflamatório infeccioso.

Analisando os parâmetros comportamentais, qualitativos e quantitativos, na somatória dos períodos, podemos notar que o grupo (GC+) apresentou reação inflamatória inicial (7 dias) leve, entretanto, essa reação não diminuiu tanto quanto o grupo (GT2), que acabou apresentando resposta inicial alta porém, com diminuição significativa aos 15 dias, resultado sugestivo devido o colapamento das membranas desse grupo (GT2) resultando na manutenção de um espaço reduzido para neoformação óssea e com isso, maior facilidade na organização do coágulo e menor quantidade de células e vasos sanguíneos que os demais grupos, promovendo uma quantidade de neoformação óssea menor e de espessura inferior aos grupos (GC+) e (GT1).

O grupo (GC+) embora tenha apresentado comportamento seletivo para a entrada de células, devido sua dupla camada, permitiu uma vascularização que se manteve desde o início favorável e maior que os demais grupos, refletindo em uma neoformação óssea superior e de maior espessura que os grupos (GT1) e (GT2) no centro do defeito ósseo.

O grupo (GT1) apresentou resposta inflamatória e vascularização levemente crescentes até o período de 15 dias, com maior quantidade de células que os demais grupos, sugerindo que o processo químico de hidrólise para obtenção deste material, acarretou em uma resposta inflamatória mais acentuada que a do grupo (GC+), que não utiliza aditivos químicos para sua obtenção. Apesar de apresentar maior resposta inflamatória, seu crescente aporte sanguíneo, resultou em uma neoformação óssea semelhante ao grupo (GC+), entretanto mais trabecular.

O tempo de hidrolisação de cada membrana, também pode afetar sua formação fibrilar e quanto maior o grupo carboxila, menor capacidade de formar fibrilas e conseqüentemente menor deposição de células em sua matriz [16,17,21], esse é um fator importante quando comparamos as membranas de pericárdio bovino intergrupos, onde foi possível observar mesmo sem diferença estatística, maior proliferação de células e vascularização do grupo (GT1) em comparação com o grupo (GT2). O grupo

(GT1) também apresentou osso neoformado mais trabecular que o grupo (GT2), sugerindo então uma reticulação fibrilar maior do grupo (GT1), que do grupo (GT2).

Outro ponto a ser observado é se este tratamento realizado, para confecção das membranas, interfere na melhora da sua resistência mecânica e na manutenção da sua integridade ao longo do processo de neoformação óssea [4,24,25,]. Nossos resultados demonstraram que as duas membranas estudadas (GT1) e (GT2), apresentaram baixa resistência mecânica, em relação a membrana de derme porcina (GC+), fato esse observado pelo “colapso das membranas de pericárdio bovino em direção ao centro do defeito”, reduzindo assim o espaço a ser regenerado e com isso, aos 30 e 60 dias, uma neoformação óssea mais delgada. Também pode-se verificar que as membranas dos grupos teste mantiveram sua integridade até o 7º dia, depois, já iniciam seu processo de absorção, o que difere do (GT+) que apresentou maior resistência mecânica e sua integridade é observada até os 15º dias.

A análise microtomográfica dos parâmetros separação de trabéculas e espessura trabecular apresentou maior média de valores para o GT2 dentre todos os grupos, com resultados bem semelhantes aos do (GT1) e isso, associado aos achados histológicos, sugere que o (GT2), apesar de apresentar bom desempenho no parâmetro volume ósseo, obteve um osso neoformado mais trabecular, ao final do período de 60 dias, assim como o (GT1), o que resultou na formação de um osso menos denso e poroso, assemelhando-se a um osso tipo III e tipo IV. Diferentemente do (GC+) que por apresentar melhores resultados nos parâmetros de volume e porcentagem de volume ósseo e no comparativo quantidade de trabéculas, separação e espessura trabecular em relação ao seu volume ósseo, resultou na formação de um osso mais denso, maduro e menos poroso, semelhante ao osso tipo II ou tipo I.

O grupo (GC+) apresentou boa resistência mecânica e ausência de colapso. Durante os primeiros 15 dias teve sua integridade bem mantida, mas aos 30 dias sinais pronunciados de degradação, altos níveis de remodelação e uma redução da espessura foram identificados. Características histológicas sugeriram ainda que a formação óssea estava se espalhando dentro da membrana e à incorporação dos feixes de colágeno fragmentados. Embora isso implique uma perda de integridade como uma barreira, assim como ocorreu nos grupos (GT1) e (GT2).

Diante o exposto e visto que membrana de derme suína, considerada cientificamente o substituto membranoso absorvível ``padrão ouro`` a ser utilizado nos procedimentos de ROG [25-26,36] e que apresentou semelhança dos dados estatísticos associada aos dados histológicos aqui analisados, conclui-se que as membranas nacionais de pericárdio bovino podem ser consideradas uma alternativa pertinente a membrana de derme suína utilizada mundialmente para ROG. Este resultado é significativo, pois a fabricação nacional deste biomaterial o torna mais acessível para a prática clínica realizada no Brasil.

6 CONCLUSÃO

Dentro da metodologia empregada foi possível concluir que as membranas nacionais de pericárdio bovino Surgitime Collagen® e Techgraft® estudadas nesta pesquisa promoveram desempenho semelhante a membrana de derme suína, no processo de regeneração óssea guiada em defeitos críticos de calotas de ratos podendo atuar como alternativa a membrana BioGide®.

REFERÊNCIAS

- 1 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;38(1):14. doi: 10.1186/s40902-016-0060-6.
- 2 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.
- 3 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;9(11):127. doi: 10.3390/dj9110127.
- 4 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;2020:6426702. doi: 10.1155/2020/6426702.
- 5 Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988;81(5):672-6. doi: 10.1097/00006534-198805000-00004.
- 6 Hämmerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol 2000.* 2003;33:36-53. doi: 10.1046/j.0906-6713.2003.03304.x.
- 7 Ayub LG, Novaes AB Jr, Grisi MFM, Taba M Jr, Palioto DB, Souza SLS. Regeneração óssea guiada e suas aplicações terapêuticas. *Periodontia.* 2011;(21(4):24-31.
- 8 Caballé-Serrano J, Munar-Frau A, Ortiz-Puigpelat O, Soto-Penalosa D, Peñarrocha M, Hernández-Alfaro F. On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. *J Clin Exp Dent.* 2018;10(5):e477-83. doi: 10.4317/jced.54767.
- 9 Acevedo RA, Trentin MS, Shibli JA, Marcantonio E Jr. Bases clínicas e biológicas da regeneração óssea guiada (ROG) associada a barreiras ou membranas. *Rev Bras Implantodont Prótese Implant.* 2004;11(43):251-7.

- 10 Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 1990;1(1):22-32. doi: 10.1034/j.1600-0501.1990.010104.x.
- 11 Jiménez Garcia 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;52(6):955-64. doi: 10.1111/jre.12470.
- 12 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.
- 13 Buser D. Implant placement with simultaneous guided bone regeneration: selection of biomaterials and surgical principles. In: Buser D, editor. *20 years of guided bone regeneration in implant dentistry.* Chicago: Quintessence Books; 2009. p. 123-52.
- 14 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.
- 15 Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(5):315-37. doi: 10.1111/eos.12364.
- 16 Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol.* 2001;72(2):215-29. doi: 10.1902/jop.2001.72.2.215.
- 17 Wang J, Qu Y, Chen C, Sun J, Pan H, Shao C, Tang R, Gu X. Fabrication of collagen membranes with different intrafibrillar mineralization degree as a potential use for GBR. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;104:109959. doi: 10.1016/j.msec.2019.109959.
- 18 Lee CR, Grodzinsky AJ, Spector M. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials.* 2001;22(23):3145-54. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00067-9.
- 19 Bet MR, Goissis G, Lacerda CA. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. *Biomacromolecules.* 2001;2(4):1074-9. doi: 10.1021/bm0001188

- 20 Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobbato L, Bressan E, Nastri L. Selection of collagen membranes for bone regeneration: a literature review. *Materials*. 2020;13(3):786. doi: 10.3390/ma13030786.
- 21 Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Hertel M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(4):443-9. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.01039.x.
- 22 Du Sert, N.P.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M.T.; Padeiro, M.; Browne, W.J.; Oliveira, A.; Cuthill, I.C.; Dirnagl, U.; Emerson, M.; et al. Relato de pesquisas com animais: Explicação e elaboração das diretrizes ARRIVE 2.0. *PLoS Biol*. 2020, 18, e3000411.
- 23 Vajgel, A.; Mardas, N.; Farias, A.C.; Petrie, A.; Cimões, R.; Dono, N. Uma revisão sistemática sobre o modelo de defeito de tamanho crítico. *Clin. Implante Oral Res*. 2014, 25, 879–893.
- 24 Hassumi, J.S.; Mulinari-Santos, G.; Fabris, A.L.D.S.; Jacó, R.G.M.; Gonçalves, A.; Rossi, A.C.; Freire, A.R.; Faverani, L.P.; Okamoto, R. Cicatrização óssea alveolar em ratos: Micro-TC, análise imuno-histoquímica e molecular. *J. Appl. Oral Sci*. 2018, 26, e20170326.
- 25 Bassi, A.P.F.; Bizelli, V.F.; Francatti, T.M.; De Moraes-Ferrerira, A.C.R.; Pereira, J.C.; AlSharani, H.M.; Lucas, F.A.; Faverani, L.P. Bone Regeneration Assessment of Polycaprolactone Membrane on Critical-Size Defects in Rat Calvaria. *Membranes (Basel)*. Feb 2021, 11, 2, 124.
- 26 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.
- 27 de Freitas Silva, L.; de Carvalho Reis, E.N.R.; Bárbara, T.A.; Bonardi, J.P.; Garcia, I.R.; De Carvalho, P.S.P.; Ponzoni, D. Avaliação do reparo ósseo em defeito de tamanho crítico no calvário de ratos após o implante de fosfato tricálcico beta (β -TCP). *Acta Histochem*. 2017, 119, 624–631.

- 28 Messoria, M.R.; Nagata, M.J.H.; Dornelles, R.C.M.; Bomfim, S.R.M.; Fucini, S.E.; Garcia, V.G.; Bosco, A.F. Cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico tratados com plasma rico em plaquetas: Um estudo histológico e histométrico em calvária de ratos. *J. Res. Periodontal* 2008, p. 43, pp. 217–223.
- 29 Ramalho-Ferreira, G.; Faverani, L.P.; Momesso, G.A.C.; Luvizuto, E.R.; de Oliveira Puttini, I.; Okamoto, R. Efeito de drogas antirreabsortivas na cicatrização óssea alveolar. Estudo histométrico e imuno-histoquímico em ratos ovariectomizados. *Clin. Investigação Oral*. 2017, 21, 1485–1494.
- 30 Ramalho-Ferreira, G.; Faverani, L.P.; Grossi-Oliveira, G.A.; Okamoto, T.; Okamoto, R. Dinâmica óssea alveolar em ratos osteoporóticos tratados com raloxifeno ou alendronato: análise de microscopia confocal. *J. Biomed.* 2015, 20, 38003.
- 31 Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(23):2347-59. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00102-2.
- 32 Ortolani E, Quadrini F, Bellisario D, Santo L, Polimeni A, Santarsiero A. Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. *Ann Ist Super Sanita*. 2015;51(3):229-35. doi: 10.4415/ANN_15_03_11.
- 33 Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials*. 2005;26(31):6158-66. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.023.
- 34 Abou Neel EA, Bozec L, Knowles JC, Syed O, Mudera V, Day R, Hyun JK. Collagen--emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):429-56. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.010.
- 35 Cury DP, Dias FJ, Miglino MA, Watanabe IS. Structural and ultrastructural characteristics of bone-tendon junction of the calcaneal tendon of adult and elderly wistar rats. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153568. doi: 10.1371/journal.pone.0153568.
- 36 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;9(11):127. doi: 10.3390/dj9110127.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



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 DESTE 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

ANEXO B



membranes

an Open Access Journal by MDPI

Editor-in-Chief

Prof. Dr. Spas D. Kolev

Section Editors-in-Chief

Prof. Dr. Shiro Suetsugu
 Prof. Dr. Giulio C. Sarti
 Prof. Dr. Benjamin S. Hsiao
 Prof. Dr. Wojciech Kujawski
 Prof. Dr. Clàudia Fontàs
 Prof. Dr. Philippe Knauth
 Prof. Dr. Efrem Curcio

Message from the Editor-in-Chief

You are cordially invited to contribute a research article or a comprehensive review for consideration and publication in *Membranes* (ISSN 2077-0375). *Membranes* is an international, peer-reviewed open access journal of membrane technology published monthly online by MDPI. Articles contributing to better understanding of transport processes in all types of membranes are also welcome. The scientific community and the general public have unlimited and free access to the content as soon as it is published. We would be pleased to welcome you as one of our authors.

Author Benefits

-  **Open Access** Unlimited and free access for readers
-  **No Copyright Constraints** Retain copyright of your work and free use of your article
-  **2021 Impact Factor: 4.562 (Journal Citation Reports - Clarivate, 2022)**
-  **Rapid Publication** Manuscripts are peer-reviewed and a first decision provided to authors approximately 13.2 days after submission; acceptance to publication is undertaken in 3.3 days (median values for papers published in this journal in the first half of 2022)
-  **No Space Constraints, No Extra Space or Color Charges** No restriction on the length of the papers, number of figures or color
-  **Discounts on Article Processing Charges (APC)** If you belong to an institute that participates with the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP)
-  **High Visibility** Indexed within Scopus, SCIE (Web of Science), Ei Compendex, PubMed, PMC, CAPlus / SciFinder, Inspec, and other databases
-  **Journal Rank** JCR - Q1 (*Polymer Science*) / CiteScore - Q2 (*Chemical Engineering (miscellaneous)*)

Endereço eletrônico: <https://www.mdpi.com/journal/membranes>