

Universidade de Ribeirão Preto  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

ALINE FERREIRA BORGES

ASSOCIAÇÃO ENTRE ENXERTO ÓSSEO BOVINO E DIFERENTES  
MEMBRANAS COLÁGENAS ABSORVÍVEIS NA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA GUIADA (ROG). ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA,  
HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA EM CALVÁRIA DE RATOS

RIBEIRÃO PRETO  
2020

Aline Ferreira Borges

ASSOCIAÇÃO ENTRE ENXERTO ÓSSEO BOVINO E DIFERENTES  
MEMBRANAS COLÁGENAS ABSORVÍVEIS NA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA GUIADA (ROG). ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA,  
HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA EM CALVÁRIA DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Marcia Marcaccini

Ribeirão Preto  
2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP  
- Universidade de Ribeirão Preto -

B732a Borges, Aline Ferreira, 1991 -  
Associação entre enxerto ósseo bovino e diferentes membranas  
colágenas absorvíveis na regeneração óssea guiada (ROG). Análise  
microtomográfica, histológica e histomorfométrica em calvária de  
ratos / Aline Ferreira Borges. - - Ribeirão Preto, 2020.  
61 f.: il. color.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Marcia Marcaccini.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Odontologia, área de concentração: Implantodontia.  
Ribeirão Preto, 2020.

1. Implante. 2. Membranas não absorvíveis. 3. Membranas  
absorvíveis. 4. Membranas colágenas. 5. Regeneração óssea  
guiada. I. Título.

CDD 617.692

**ALINE FERREIRA BORGES**

**“ASSOCIAÇÃO ENTRE ENXERTO ÓSSEO BOVINO E DIFERENTES MEMBRANAS COLÁGENAS ABSORVÍVEIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA (ROG). ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA EM CALVÁRIA DE RATOS”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção de título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Marcia Marcaccini

Área de concentração: Implantodontia

Data de defesa: 30 de julho de 2020

Resultado:           Aprovada          

**BANCA EXAMINADORA**



**Profa. Dra. Andrea Marcia Marcaccini**

Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) – Presidente



**Profa. Dra. Izabela Cristina Mauricio Moris Rivera**

Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP)



**Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares**

Professora Adjunta da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Dedico este trabalho aos grandes responsáveis pelo meu desenvolvimento pessoal, acadêmico e profissional, sobretudo minha família, orientadora, professores e colaboradores.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** que me permite conhecer, amar, trabalhar e viver a Odontologia de forma humanizada, coerente e com excelência.

À Universidade de Ribeirão Preto UNAERP, na pessoa da **Magnífica Reitora Profa. Elmara Lúcia de Oliveira Bonini**.

À coordenadora do curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, pelo cuidado e responsabilidade com o meu desenvolvimento.

À minha orientadora de mestrado **Dra. Andrea Marcia Marcaccini**, por quem tenho muita admiração, respeito e gratidão pelo acolhimento, pelas oportunidades de desenvolvimento, pelo modelo e, sobretudo, por ter assumido a responsabilidade de me orientar, viabilizando a realização de um grande sonho.

Aos **docentes da Pós-graduação**, pelo “padrão ouro” e pela honra de ter sido vossa aluna. De modo especial à **Profa. Dra. Erica Alves Gomes**, **Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni** e **Profa. Dra. Larissa Moreira S. de Castro Raucchi**, pelo direcionamento e oportunidades de crescimento.

À **profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo FMRP-USP, por disponibilizar o laboratório e realizar as análises histológicas e histomorfométricas deste trabalho.

Aos vários parceiros do meio acadêmico, científico e profissional, pelo compartilhamento de projetos, atividades e reflexões, especialmente: **Adriele Fracarolli Baltazar**, **Antônio Secco Martorano**, **Bárbara Furtado Masalskas**, **Elisabeth Helena Brazão**, **Evandro Luís Tronco**, **Fernanda Mara Saltareli**, **Iara Turati de Sousa**, **Juliano da Silva Silveira**, **Keila Naiara Andrade Vale**, **Leticia Cristina da Freiria Moretti**, **Mariana Guerrera de Almeida**, **Rodrigo Paes Villa Real** e **Sthephanie Francoi Poole**.

Agradeço também àqueles que marcaram e influenciaram positivamente a minha trajetória acadêmica até o momento:

À **minha família**, meu bem mais precioso. Aos **meus pais Conceição de Fátima Ferreira Borges e Remi Borges**, exemplos de vida, incentivadores e

apoiadores deste objetivo. Ao **meu irmão Vinícius Ferreira Borges**, interlocutor da pós graduação de forma encantadora e com perspectivas de um futuro bom. Ao **meu noivo Virgílio Antônio Rocha de Miranda**, meu grande amor e companheiro, responsável por ressignificar o valor de uma conquista individual em um relacionamento. À **minha filha Elisa Ferreira Miranda**, minha grata surpresa e fortaleza na conclusão deste ciclo. Aos meus, tios e primos, pela convivência saudável e harmoniosa.

Aos amigos de sempre (e para sempre): **Gabriela Dutra Cardoso Borges, Leticia Gonçalves Campos de Freitas Borges, Marilia Gaspar Souza Lima e Mayara Drummond**, pela história repleta de momentos marcantes; **Ana Carolina Cavalcante Araújo e Mayra Alves Pontes**, pela afinidade e reciprocidade; **Beatriz Braga Morelli, Lucas Lemes Queiroz, Lyvia Rocha Xavier e Ramon Queiroz Gonzaga**, pela parceria em etapas importantes da vida.

Ao **Prof. Dr. Denildo Magalhães**, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Uberlândia FO-UFU, por guiar meus primeiros passos no universo científico e pelas inúmeras oportunidades de desenvolvimento.

À **Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares**, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Uberlândia FO-UFU, pelo comportamento inspirador de respeito à ciência (e ao cientista) e pelos esforços em levar esse conhecimento ao público geral.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo FORP-USP, pela responsabilidade em minha formação e aprimoramento como periodontista clínica baseada em evidências.

À doutoranda **Ana Flávia Simões Barbosa**, pela importante consultoria na utilização do equipamento de micro-CT.

Aos alunos de graduação **Michele Portela da Luz, Karen Christine Ramos Godoy e Renan Ribeiro Mingorance**, que solicitamente participaram dos procedimentos cirúrgicos deste trabalho.

Ao doutorando **Geraldo Monteiro Ribeiro**, pela ajuda na realização da técnica cirúrgica validada em seu mestrado e utilizada em minha pesquisa e empréstimo do micromotor cirúrgico.

À técnica responsável pelo biotério da UNAERP **Carla Renata Ribeiro**

**Kitanishi**, por toda a assistência e cuidados com a parte experimental da minha pesquisa.

À **Deisy Mara da Silva**, técnica especialista em histopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo FMRP-USP, que realizou os procedimentos histológicos laboratoriais deste trabalho.

Por fim, reservo agradecimentos mais do que sinceros (e ainda assim insuficientes) aos envolvidos diretamente no meu processo de mestre.

Às empresas **Bionnovation Biomedical** e **Crítéria Biomateriais**, que forneceram sem qualquer custo o enxerto ósseo bovino e as membranas, necessários para os procedimentos cirúrgicos.

À **FINEP**, pelo apoio para aquisição, por meio da Chamada Pública MCT/FINEP/AT (Processo 1575/10), do Microtomógrafo de alta resolução SkyScan 1176 utilizado neste estudo.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado.



“Faça porque se você não fizer o resto será silêncio.”

Leandro Karnal

## RESUMO

A regeneração óssea guiada (ROG) é uma terapia complementar que proporciona a manutenção das características tridimensionais do alvéolo para a colocação imediata ou tardia de implantes dentários. A ROG consiste no uso de membranas oclusivas, associadas ou não a substitutos ósseos. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação de enxerto ósseo bovino a diferentes membranas absorvíveis na ROG por meio das análises por microtomografia computadorizada (micro-CT), histologia descritiva e histomorfometria em defeitos de calvária de ratos. Para isso, 50 ratos divididos em 5 grupos ( $n=10$ ), foram submetidos a um procedimento cirúrgico para confecção de defeito ósseo de 5mm de diâmetro em calvária. Após a confecção do defeito, o enxerto ósseo bovino particulado foi adaptado e membranas foram posicionadas, de acordo com o grupo experimental que pertenciam: TF (teflon PTFE), COB (colágeno ósseo bovino, Lumina Coat Double Time), CPB (pericárdio bovino, Techgraft), CPS (pericárdio suíno, Jason) e CDS (colágeno da derme suína, Bio-Gide). Trinta dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram eutanasiados e suas calvárias submetidas a análises por micro-CT, histologia descritiva e histomorfometria para coleta de dados qualitativos e quantitativos. Nos resultados qualitativos da análise por micro-CT foi identificado preenchimento ósseo parcial em todos os grupos. Os testes estatísticos de ANOVA à um critério e o teste complementar de Tukey quantificaram o maior valor de volume ósseo, superfície óssea, número de trabéculas e espaçamento trabecular para o grupo CDS sem diferença estatística com grupo CPB ( $p>0,05$ ). O grupo que demonstrou os menores resultados foi o grupo TF ( $p<0,05$ ). Na análise histológica descritiva todos os grupos apresentaram o mesmo padrão de resposta inflamatória, homogeneidade na absorção de partículas de enxerto ósseo bovino, neoformação óssea e presença de tecido conjuntivo vascularizado. No entanto, o grupo TF apresentou tecido epitelial recobrendo a área previamente ocupada pela membrana, e os grupos de membranas colágenas de origem bovina, COB e CPB, apresentaram remanescente de membrana absorvível quando comparados aos grupos de membranas colágenas de origem suína, CPS e CDS. A análise histomorfométrica identificou menor formação de tecido mineralizado no grupo TF em relação aos demais grupos testados ( $p<0,05$ ). Diante da metodologia empregada e dos resultados obtidos, conclui-se que houve eficiência na associação entre enxerto ósseo bovino e as membranas colágenas na ROG dos defeitos ósseos em todos os grupos. O grupo teflon (TF) se mostrou histologicamente biocompatível, porém as membranas absorvíveis colágenas (COB, CPB, CPS e CDS) promoveram maior neoformação óssea. Dentre os grupos de membranas absorvíveis, se destacaram a membrana absorvível de colágeno de derme suína (CDS), seguida pela membrana colágena nacional de pericárdio bovino (CPB), indicando sua utilização.

Palavras-chave: Implante. Membranas não absorvíveis. Membranas absorvíveis. Membranas colágenas. Regeneração óssea guiada.

## ABSTRACT

Guided bone regeneration (GBR) is a complementary therapy that provides the maintenance of the three-dimensional characteristics of the alveolus for immediate or late placement of dental implants. GBR consists of the use of occlusive membranes, associated or not with bone substitutes. The aim of this study was to evaluate the association of bovine bone graft with different absorbable membranes in GBR through computerized microtomography (micro-CT), descriptive histology and histomorphometry in rat calvaria defects. For this, 50 rats divided into 5 groups (n=10) were submitted to a surgical procedure to make a bone defect of 5 mm in diameter in calvaria. After the defect was made, the particulate bovine bone graft was adapted and membranes were positioned according to the experimental group that belonged to: TF (teflon PTFE), COB (bovine bone collagen, Lumina Coat Double Time), CPB (bovine pericardium, Techgraft), CPS (porcine pericardium, Jason) and CDS (collagen of the porcine dermis, Bio-Gide). After the defect was made, the particulate bovine bone graft was adapted and thirty days after the surgical procedure, the animals were euthanized and their calvarias were submitted to micro-CT analysis, descriptive histology and histomorphometry to collect qualitative and quantitative data. In the qualitative results of the micro-CT analysis, partial bone filling was identified in all groups and the statistical tests of one-way ANOVA and Tukey's complementary test quantified the highest value of bone volume, bone surface, number of trabeculae and trabecular spacing for the CDS group without statistical difference with CPB group ( $p>0.05$ ). The group that demonstrated the lowest results was the TF group ( $p<0.05$ ). In the descriptive histological analysis, all groups presented the same pattern of inflammatory response, homogeneity in the absorption of bovine bone graft particles, bone neoformation and presence of vascularized connective tissue. However, the TF group presented epithelial tissue covering the area previously occupied by the membrane, and the groups of bovine collagen membranes, COB and CPB, presented absorbable membrane remnant when compared to the groups of collagen membranes of porcine origin, CPS and CDS. Histomorphometric analysis identified lower mineralized tissue formation in the TF group compared to the other groups tested ( $p<0.05$ ). In view of the methodology employed and the results obtained, it was concluded that there was efficiency in the association between bovine bone graft and collagen membranes in ROG of bone defects in all groups. The teflon group (TF) was histologically biocompatible, but collagen absorbable membranes (COB, CPB, CPS and CDS) promoted greater bone neoformation. Among the groups of absorbable membranes, the absorbable membrane of collagen of porcine dermis (CDS) stood out, followed by the national collagen membrane of bovine pericardium (CPB), indicating its use.

Keywords: Implant. Non-absorbable membranes. Absorbable membranes. Collagen membranes. Guided bone regeneration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Fluxograma do delineamento experimental.....	23
<b>Figura 2 (A)</b> – Tricotomia na região fronto-parietal de cada rato para remoção do pelo. .....	24
<b>Figura 2 (B)</b> – Incisão em forma de U no tegumento para acesso à área óssea. ...	24
<b>Figura 3 (A)</b> – Sindesmotomia para acesso ao osso.....	25
<b>Figura 3 (B)</b> – Confeção de defeito ósseo de 5 mm utilizando trefina e micromotor sob irrigação constante. ....	25
<b>Figura 3 (C)</b> – Detalhe do defeito ósseo obtido. ....	25
<b>Figura 4 (A)</b> – Defeito ósseo confeccionado.....	25
<b>Figura 4 (B)</b> – Dispositivo dosador com o enxerto ósseo bovino. ....	25
<b>Figura 4 (C)</b> – Biomaterial depositado, preenchendo todo o defeito. ....	25
<b>Figura 5 (A)</b> – Posicionamento da membrana de teflon sobre o enxerto ósseo bovino. .....	26
<b>Figura 5 (B)</b> – Posicionamento da membrana de colágeno suíno em dupla camada sobre o enxerto ósseo bovino. ....	26
<b>Figura 6 (A)</b> – Ilustração do software DataViewer com calvária desalinhada em relação às suturas coronal e sagital. ....	28
<b>Figura 6 (B)</b> – Ilustração do software DataViewer com calvária alinhada em relação às suturas coronal e sagital ....	28
<b>Figura 7 (A)</b> – Representação esquemática do volume de interesse no interior do defeito ósseo, com as dimensões definidas (em vermelho) .....	29
<b>Figura 7 (B)</b> – Região de interesse (ROI) posicionada no programa CTAn. .....	29
<b>Figura 8 (A)</b> – Processador de tecidos .....	31
<b>Figura 8 (B)</b> – Placa aquecida .....	31
<b>Figura 8 (C)</b> – Dispensador de parafina .....	31
<b>Figura 8 (D)</b> – Placa refrigeradora .....	31
<b>Figura 9</b> – Análise dos diferentes grupos avaliados por microtomografia computadorizada (micro-CT) após 30 dias (n=10). ....	35
<b>Figura 10</b> – Fotomicrografias representativas da deposição de tecido neoformado nos defeitos de calvária após 30 dias de cicatrização. Da esquerda para a direita, imagem	

do defeito no software CTVol, imagens do software CTVox com vista sagital e transversal para cada grupo experimental. ....	36
<b>Figura 11</b> – Fotomicrografias representando os defeitos ósseos de calvária, com presença de tecido conjuntivo, enxerto ósseo bovino (EB) e formação de novo osso (NO) após 30 dias de cicatrização. O símbolo * representa o remanescente da membrana. Coloração: H.E. aumento de 20x. ....	38
<b>Figura 12</b> – Gráficos da análise da porcentagem de tecido mineralizado e de tecido conjuntivo no defeito em calvária dos diferentes grupos avaliados por histomorfometria após 30 dias (n=10).....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros quantitativos do tecido ósseo trabecular obtidos pelo CTAn (Bruker microCT, Kontich, Bélgica) adaptados daqueles preconizados pela <i>American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR)</i> .....	30
<b>Tabela 2</b> – Análise por microtomografia computadorizada (micro-CT) após 30 dias (n=10). Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão .....	34
<b>Tabela 3</b> – Análise da porcentagem de tecido mineralizado e de tecido conjuntivo no defeito em calvária dos diferentes grupos avaliados por histomorfometria após 30 dias (n=10) .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Análise tridimensional
ANOVA	Análise de variância
BS	Superfície óssea ( <i>Bone Surface</i> )
BV	Volume ósseo ( <i>Bone volume</i> )
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo ( <i>Bone volume fraction</i> )
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
COB	Grupo Colágeno Ósseo Bovino
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CDS	Grupo Colágeno Derme Suína
EB	Enxerto ósseo bovino
EDTA	Ácido etileno-diaminotetracético
FINEP	Financiadora de Inovação e Pesquisa
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FORP-USP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FO-UFU	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia
H.E.	Hematoxilina e Eosina
JPEG	Joint Photographic Experts Group
L-PRF	Fibrina rica em plaquetas e leucócitos
micro-CT	Microtomografia computadorizada
NO	Novo osso
CPB	Grupo Colágeno Pericárdio Bovino
CPS	Grupo Colágeno Pericárdio Suíno
PTFE	Politetrafluoretileno
ROG	Regeneração óssea guiada
RTG	Regeneração tecidual guiada
Tb.N	Número de trabéculas ( <i>Trabecular number</i> )
Tb.Sp	Separação trabecular ( <i>Trabecular separation</i> )
Tb.Th	Espaçamento trabecular ( <i>Trabecular thickness</i> )
TC	Tecido conjuntivo
TF	Grupo Teflon

UNAERP Universidade de Ribeirão Preto

VOI Volume de Interesse



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	21
2.1	OBJETIVO GERAL .....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
3.1	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	22
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	22
3.3	PROCEDIMENTO CIRURGICO.....	23
3.4	EUTANASIA DOS ANIMAIS .....	27
3.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	27
3.5.1	Análise por microtomografia computadorizada (micro-CT) .....	27
3.5.2	Processamento histológico dos espécimes.....	30
3.5.3	Análise histológica descritiva .....	31
3.5.4	Análise histomorfométrica .....	31
3.5.5	Análise estatística .....	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	33
4.1	Análise por microtomografia computadorizada (micro-CT) .....	33
4.2	Análise histológica descritiva .....	37
4.3	Análise histomorfométrica .....	39
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	50

### REFERÊNCIAS

### ANEXOS

ANEXO A – Ofício do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) após aprovação

## 1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários foram apresentados à classe odontológica em 1982, na Conferência de Toronto sobre Osseointegração em Odontologia Clínica, como substitutos da porção radicular de dentes perdidos. Este evento revolucionou a Odontologia e ampliou as possibilidades reabilitadoras conciliando as exigências funcionais e estéticas do paciente com previsibilidade (ADELL, 1981; LEKHOLM; ADELL, 1989; BUSER; SENNERBY; DE BRUYN, 2017; JEMT). Desde então, a busca por tratamento reabilitador implantar se tornou realidade nos consultórios odontológicos (GUILLAUME, 2016).

Os implantes de 1982 eram de titânio grau II, osseointegráveis e rosqueavam-se aos defeitos ósseos em baixa rotação e irrigação abundante (SENER et al., 2009). Com o decorrer do tempo, este biomaterial foi modificado e novos modelos compostos por diferentes ligas de materiais e com diversos tratamentos de superfície foram apresentados, melhorando o potencial de osseointegração (JEMAT et al., 2015); novas técnicas cirúrgicas e de localização tridimensional foram propostas prevendo as necessidades da reabilitação protética (TESTORI et al., 2018); e novos biomateriais enxertivos de origens alógena, xenógena ou aloplástica foram desenvolvidos considerando as necessidades do fenótipo periimplantar e a morbidade do paciente (ARAÚJO et al., 2015; ELGALI et al., 2017a; MEYER, 2019).

O procedimento cirúrgico reabilitador com implantes é realizado para a substituição imediata ou tardia de elemento(s) dentário(s) extraídos (BUSER et al., 2017). Após a extração dentária há perda indesejada do periodonto de suporte (sustentação e proteção) da área operada. Essa perda pode ser observada radiográfica e clinicamente (ARAÚJO et al., 2015), por meio da diminuição das dimensões ósseas verticais e horizontais e modificação da qualidade e quantidade dos tecidos moles (TAN et al., 2012). As regiões de dentes posteriores extraídos sofrem maiores danos estruturais quando comparadas às regiões de dentes anteriores (ARAÚJO et al., 2015). No entanto, a exigência estética anterior torna a reabilitação oral desta região um desafio mais árduo (CHEN; BUSER, 2014).

Diante deste contexto, para modificar as características indesejadas do reparo fisiológico que são incompatíveis com as exigências reabilitadoras do paciente, são propostas técnicas cirúrgicas complementares às técnicas convencionais (TESTORI

et al., 2018; GALINDO-MORENO et al., 2019). A regeneração óssea guiada (ROG) é uma destas técnicas, pois visa modificar a quantidade e a qualidade dos tecidos com o uso de biomateriais (BUSER et al., 2017; GALINDO-MORENO et al., 2019).

A ROG é um procedimento cirúrgico previsível que consiste em adaptar uma membrana, biomaterial oclusivo, a um arcabouço ósseo danificado, para promover a regeneração das estruturas remanescentes (DONOS, 2010). A membrana pode ou não estar associada a outros biomateriais, como os substitutos ósseos e/ou enxertos autógenos (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

A função das membranas é excluir mecanicamente do defeito ósseo as células não osteogênicas dos tecidos moles e permitir que células da parede óssea alveolar promovam a neoformação óssea organizada, à partir da rede celular do coágulo sanguíneo (AYUB et al., 2011; CABALLÉ-SERRANO et al., 2018). Suas características gerais são: biocompatibilidade, semipermeabilidade, integração com tecidos, maleabilidade clínica e capacidade de manutenção de espaço (ELGALI et al., 2017b). No entanto, podem ter diferentes origens, proveniências de diferentes sítios, elaboração com material não absorvível ou absorvível e distintas características de superfície (DONOS, 2010). Estas particularidades determinam as respostas biológicas dos tecidos que as envolvem na ROG (ELGALI et al., 2017b).

As membranas de politetrafluoretileno (teflon PTFE) são exemplares não absorvíveis de biomaterial oclusivo indicados para procedimentos de ROG (LIU; KERNS, 2014), procedimentos de regeneração tecidual guiada (RTG), aumentos ósseos verticais, horizontais e interproximais, fenestrações ósseas, deiscências ósseas, preservação alveolar, levantamento do seio maxilar, uso concomitante a instalação de implantes e tratamento de doenças periimplantares ( SOLDATOS et al., 2017; NAUNG; SHEHATA; VAN SICKELS, 2019). Estas membranas tem origem sintética, são compostas por um polímero inerte e estável no sistema biológico, o que as torna não absorvíveis (FONTANA et al., 2015). Sua adaptação é subepitelial, exige estabilidade e remoção em um segundo procedimento cirúrgico (JUNG et al., 2013). Estas barreiras foram consideradas por anos o biomaterial oclusivo padrão ouro para a ROG. Porém, a necessidade inerente de um segundo procedimento cirúrgico contribui com o aumento do tempo de tratamento e morbidade do paciente, o que oportunizou o desenvolvimento de exemplares de membranas com características absorvíveis (DONOS, 2010; RONDA et al., 2014).

Dentre as membranas absorvíveis existentes, as que se destacam são as membranas provenientes do colágeno. O colágeno é considerado o componente proteico estrutural mais abundante do reino animal. Sua molécula é composta 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 (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). As membranas colágenas podem ser de origem bovina, suína, equina ou humana; constituídas por colágeno tipo I, tipo III ou ambos; provenientes das regiões de pericárdio, derme, tendão, dura-máter e fáscia temporal de animais (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). São membranas de única ou dupla camada, compostas por ligações colágenas reticuladas (*cross-linked*) ou ligações colágenas não reticuladas (não *cross-linked*) que necessitam de adaptação subepitelial e estabilidade (LEE; GRODZINSKY; SPECTOR, 2001). As membranas colágenas são indicadas para os procedimentos de ROG, RTG, aumentos ósseos verticais, horizontais e interproximais, defeitos periodontais, fenestrações ósseas, deiscências ósseas, lesões de bifurcação (grau I e II), preservação alveolar, levantamento de seio maxilar, uso concomitante a instalação de implantes e tratamentos periimplantares (BEHRING et al., 2008; BUNYARATAVEJ; WANG, 2001; SILVA et al., 2014).

Independente da característica de absorção das membranas, a associação deste biomaterial oclusivo à substitutos ósseos modula o potencial regenerativo dos defeitos ósseos em áreas reabilitadas (NAUNG; SHEHATA; VAN SICKELS, 2019). Os substitutos ósseos são biomateriais classificados como osteogênicos, osteoindutores ou osteocondutores conforme a atuação com as células ósseas do leito receptor. São classificados também como autógenos, alógenos, xenógenos ou aloplásticos conforme a origem do biomaterial, como desmineralizados ou mineralizados conforme a sua composição e também como absorvíveis ou não absorvíveis conforme a capacidade de absorção do organismo receptor (JACOBS, 2017; SHEIKH et al., 2017a; CUOZZO et al., 2020). São biomateriais indicados para ROG, RTG, aumentos ósseos verticais, horizontais e interproximais, defeitos periodontais, fenestrações ósseas, deiscências ósseas, lesões de bifurcação (grau I e II), preservação alveolar, levantamento de seio maxilar, uso concomitante a instalação de implantes e tratamentos periimplantares (ELGALI et al., 2017a; SHEIKH et al., 2017a). A escolha

do substitutos ósseos para procedimentos regenerativos é amparada por suas indicações e pelas perspectivas de disponibilidade do biomaterial, menor tempo de tratamento e menor morbidade do paciente (ARTAS et al., 2018).

Grande parte dos substitutos ósseos disponíveis no mercado odontológico são de característica osteocondutora, de origem xenógena provenientes de espécies animais (bovinos, suínos e equinos) e vegetais (algas), ou aloplásticos provenientes de sintetizações laboratoriais (JACOBS, 2017; ARTAS et al., 2018), absorvíveis e mineralizados. Ou seja, são biomateriais com habilidade de servir de ambiente para proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos e osteoclastos, atuando como arcabouço passivo que, aos poucos, vão sendo absorvidos e substituídos no processo de reparo ósseo. A sua disponibilidade é ilimitada e proporciona menor morbidade para o paciente em relação aos enxertos autógenos (ARTAS et al., 2018; JACOBS, 2017).

Considerando a busca frequente por tratamento reabilitador implantar nos consultórios odontológicos, a indicação pertinente da técnica de ROG e as características dos biomateriais disponíveis nacionalmente para este procedimento, o presente estudo se justifica pela necessidade de avaliar a associação de diferentes membranas, com propostas regenerativas semelhantes, mas composição e características de superfície distintas, à substituto ósseo xenógeno. Com isso, espera-se observar diferentes respostas biológicas relacionadas ao padrão de neoformação óssea, integração tecidual e respostas inflamatórias na associação destes biomateriais.

Para testar as hipóteses supracitadas foi delineado um estudo em animais comparando 5 grupos de membranas comercializadas no Brasil associadas a um substituto ósseo xenógeno particulado nacional. Os desfechos deste estudo poderão contribuir com a criticidade do cirurgião dentista ao oferecer um tratamento reabilitador implantar condizente com as necessidades biológicas, sociais, econômicas e culturais do seu paciente.

## **2 PROPOSIÇÃO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre enxerto ósseo bovino a diferentes membranas colágenas e a uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) na regeneração óssea guiada (ROG) em defeitos críticos de calvária de ratos após o período de 30 dias.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar quantitativamente os parâmetros de volume ósseo, percentual de volume ósseo, superfície óssea, número de trabéculas ósseas, espessura trabecular e separação trabecular no preenchimento de defeitos em calvária de ratos com enxerto ósseo bovino associado a diferentes membranas no procedimento de ROG por meio da microtomografia computadorizada (micro-CT);

Analisar qualitativamente a resposta tecidual, o infiltrado inflamatório e o reparo formado na calvária de ratos após o procedimento de ROG por meio de histologia descritiva;

Analisar quantitativamente o padrão de formação do tecido mineralizado composto por enxerto ósseo bovino e osso neoformado e do tecido conjuntivo nos defeitos ósseos em calvária de ratos no procedimento de ROG por meio da histomorfometria.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, sob o número de protocolo 03/2019 (ANEXO A).

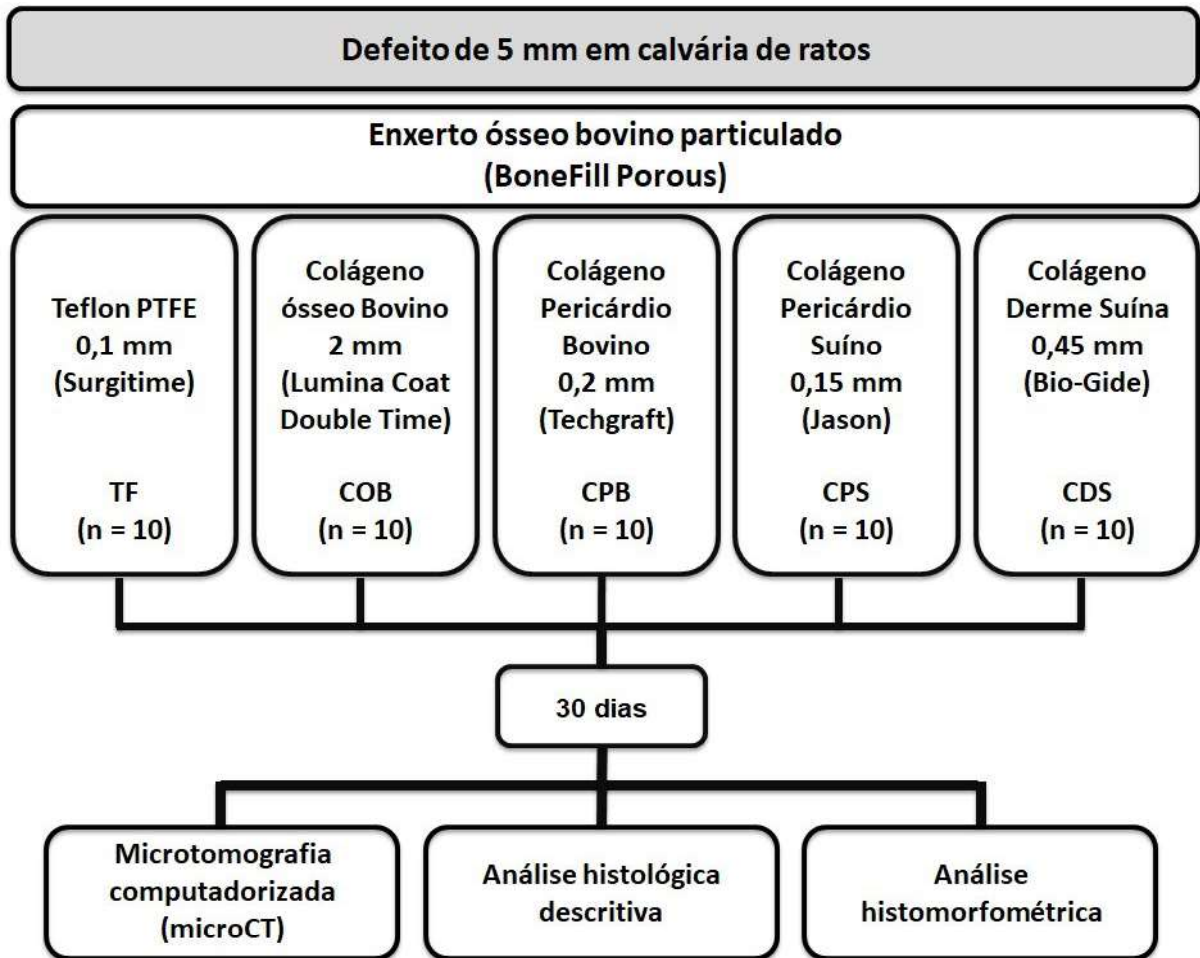
#### 3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 50 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) jovens adultos machos, com peso aproximado de 250g. Os animais foram mantidos em gaiolas de poliuretano em ambiente com controle de luz (ciclo de 12 horas alternadas de claro/escuro) e temperatura (22° C), alimentados com ração granulada para ratos (Nuvilab, Quimtia S. A., Colombo, PR, Brasil) e hidratados com água à vontade durante todo o período de experimentação no Biotério da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

#### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O fator em estudo deste trabalho foi o tipo de membrana para regeneração óssea guiada em cinco níveis (teflon PTFE, colágeno ósseo bovino, colágeno de pericárdio bovino, colágeno de pericárdio suíno e colágeno de derme suína) de defeitos críticos em calvaria de ratos preenchida com enxerto ósseo bovino particulado. A amostra foi composta por 50 ratos divididos em 5 grupos (n=10). Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para confecção de defeitos ósseos em calvária de 5 mm de diâmetro, receberam enxerto ósseo bovino como biomaterial de preenchimento do defeito e, posteriormente, foram adaptadas as membranas de acordo com o grupo experimental, seguindo o delineamento experimental proposto (Figura 1). As variáveis de resposta foram qualitativas e quantitativas, avaliadas por meio das análises por micro-CT, histologia descritiva e histomorfometria.

Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental.



Fonte: Autora.

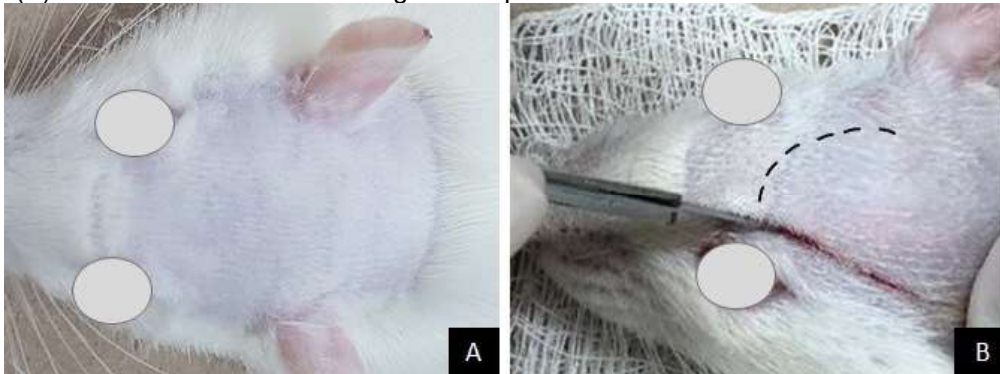
### 3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Previamente ao ato cirúrgico os ratos tiveram a massa corpórea aferida em balança de precisão (SF-400, Filizola, São Paulo, SP, Brasil) para estabelecer a dosagem anestésica a ser administrada. Em sequência foi aplicada injeção intramuscular de mistura do anestésico Cloridrato de Ketamina (Dopalen, Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) associado ao relaxante muscular e sedativo de uso animal Cloridrato de Xilazina (Anasedan, Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil), na dosagem de 0,1 ml para cada 100 g de massa corporal. Após atingir os efeitos anestésicos, os animais foram identificados e submetidos ao



procedimento de tricotomia na área cirúrgica a ser acessada. A tricotomia foi realizada com máquina de cortar cabelo (Cryogen, Oster, lâmina 40, EUA) na região fronto-parietal da cabeça do rato, raspando o pelo e sem causar injúrias ao animal (Figura 2A). Na área raspada, foi realizada a desinfecção com solução de gluconato de clorexidina 0,5% (Vic Pharma Indústria e Comércio Ltda., Taquaritinga, SP, Brasil) embebido em gaze estéril, para início do ato cirúrgico.

Figura 2. (A) Tricotomia na região fronto-parietal de cada rato para remoção do pelo. (B) Incisão em forma de U no tegumento para acesso à área óssea.



Fonte: Autora.

Com o auxílio de lâmina #15 (Huaian Angel Medical Instruments Co., Ltd., Huai'na, Jiangsu Province, China), montada em cabo de bisturi #3, foi realizada incisão em U na região do tegumento de revestimento do crânio para acessar o tecido ósseo da calvária de cada rato (Figura 2B), conforme descrito por Bosco et al. (2016).

Sequencialmente, o tegumento incisado foi descolado da superfície óssea (Figura 3A), removendo o perióstio e expondo o tecido ósseo para confecção do defeito. A área cirúrgica foi determinada pelos limites da sutura sagital do animal e com uma broca trefina de 5 mm de diâmetro (Alpha Instrumentos Cirúrgicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), acoplada ao motor para implante (NeoSurg Pro, Neodent, Curitiba, PR, Brasil), em velocidade de 500 rpm, sob irrigação constante de solução fisiológica 0,9% (JP Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, SP, Brasil) foi confeccionado o defeito (Figura 3B). Foi realizada uma única perfuração nos ossos parietais, transpassando toda a espessura da díploe (BOSCO et al., 2016), expondo a dura-máter no fundo das lesões (Figura 3C) e evitando qualquer injúria.

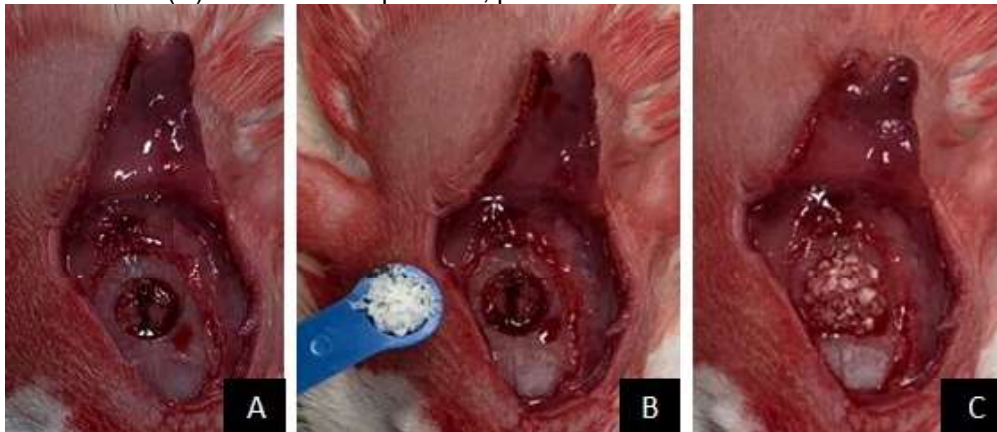
Figura 3. (A) Sindesmotomia para acesso ao osso. (B) Confeção de defeito ósseo de 5 mm utilizando trefina e micromotor sob irrigação constante. (C) Detalhe do defeito ósseo obtido.



Fonte: Autora.

Sobre o defeito foi depositado enxerto ósseo de origem bovina, com granulação média (Bonefill Porous granulação média, Bionnovation Biomedical, Bauru, SP, Brasil) em proporção estabelecida por uma colher dosadora de aproximadamente 0,032 g. Este biomaterial foi depositado e adaptado pelo mesmo cirurgião no defeito crítico de cada animal (Figura 4).

Figura 4. (A) Defeito ósseo confeccionado. (B) Dispositivo dosador com o enxerto ósseo bovino. (C) Biomaterial depositado, preenchendo todo o defeito.



Fonte: Autora.

A seguir, os animais foram aleatoriamente distribuídos de acordo com os grupos experimentais, conforme demonstrado no fluxograma do delineamento experimental.

Os animais foram divididos em 5 grupos de acordo com as membranas utilizadas (n=10): TF – membrana de teflon PTFE 0,1 mm (Surgitime PTFE, Bionnovation Biomedical, Bauru, SP, Brasil); COB – membrana de colágeno ósseo bovino 2 mm (Lumina Coat Double Time, Criteria Biomateriais, São Carlos, SP, Brasil); CPB – membrana colágena de pericárdio bovino 0,2 mm (Techgraft, Baumer, Mogi

Mirim, SP, Brasil); CPS – membrana colágena de pericárdio suíno 0,15 mm (Straumann Jason membrane, Institut Straumann AG, Alemanha); CDS – membrana colágena de derme suína 0,45mm (Bio-Gide, Geistlich Pharma AG, Zurique, Suíça). Sobre o enxerto ósseo foi adaptada a membrana, cortada com auxílio de instrumentos esterilizados (tesoura reta, pinça clínica e régua) no tamanho de 1 cm<sup>2</sup> de área retangular (Figura 5).

Após a estabilização dos dois biomateriais, o retalho do tegumento foi recolocado em posição e suturado com fio de sutura monofilamentado de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) com pontos interrompidos.

Figura 5. Posicionamento das membranas de teflon (A) e de colágeno suíno em dupla camada (B) sobre o enxerto ósseo bovino. A membrana de colágeno recebeu hidratação com solução fisiológica após sua colocação, para facilitar sua adaptação à área cirúrgica.



Fonte: Autora.

Concluído o ato cirúrgico, em cada animal ainda sob estado de sedação, a dose de 0,1 ml de antibiótico intramuscular (Terramicina, Cloridato de Oxitetraciclina, Zoetis, Guarulhos, SP, Brasil) foi administrada. Sequencialmente foi observada a recuperação dos ratos diante da sedação.

A analgesia pós-operatória dos animais foi associada a hidratação e realizada com a adição de 30 gotas de dipirona sódica 500 mg em 500 mL de água por 48 horas.

Os animais foram acompanhados e avaliados durante o período de 30 dias, em regime alimentar, hídrico e térmico controlado. Clinicamente, os ratos não apresentaram qualquer reação inflamatória ou infecciosa em todo o período

experimental.

### 3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

No 30º dia após a cirurgia, os animais foram eutanasiados após sobredosagem anestésica por meio de injeção intramuscular de mistura do anestésico Cloridrato de Ketamina (Dopalen, Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) associado ao relaxante muscular e sedativo de uso animal Cloridrato de Xilazina (Anasedan, Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) e, posteriormente, foi realizada a decaptação.

Na calota polar do animal foi realizada a dissecação dos tecidos e uma amostra da região parietal foi removida e imersa em solução tamponada de formalina 10%, pH 7.2, por 48 horas. Posteriormente, a amostra foi armazenada em álcool 70% até o momento da realização das análises.

As amostras das calvárias dos ratos foram inicialmente submetidas à análise por micro-CT e, posteriormente, ao processamento laboratorial para análises histológica descritiva e histomorfométrica.

### 3.5 ANÁLISE DOS DADOS

#### 3.5.1 Análise por microtomografia computadorizada (micro-CT)

As amostras foram escaneadas utilizando o microtomógrafo SkyScan modelo 1176 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) do Laboratório de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto.

No escaneamento, grupos de 10 amostras foram posicionados em um suporte de isopor tubular meia lua, para modelo SkyScan 1176 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica), e estabilizados com gazes úmidas. Este conjunto foi levado à cama de fibra de carbono no interior do microtomógrafo e, em seguida, deu-se início ao escaneamento nos parâmetros de 90 kV, 278 mA, resolução isotrópica de 9 µm, 180º de rotação em torno do eixo vertical com passo de rotação de 0,5º, quantidade total de 1 quadro (*frames*), utilizando filtro de cobre de 1,0 mm de espessura. As projeções

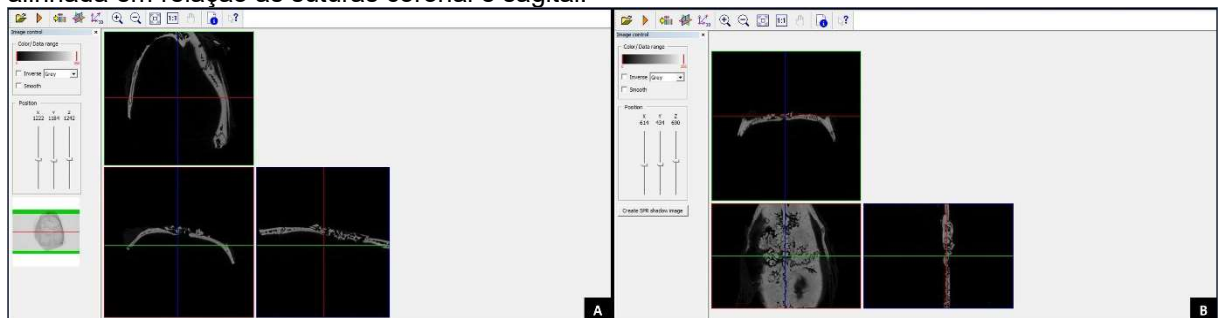
bidimensionais das imagens geradas foram arquivadas no formato *Tagged Image File* (TIFF).

Ao término do escaneamento, as amostras das calvárias dos ratos foram novamente imersas em álcool 70% até que pudessem ser submetidas ao processamento histológico.

A etapa seguinte consistiu na reconstrução das secções axiais a partir das imagens das projeções angulares, por meio do algoritmo de reconstrução de feixe cônico de Feldkamp modificado, usando o programa NRecon v.1.6.6.0 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica). Sendo assim, foi aplicada uma redução de artefatos em forma de anel (*Ring Artifact*) no valor de 7 (escala de 0-20), de endurecimento de feixe (*Beam Hardening*) no percentual de 30% (escala de 0 a 100%), de suavização (*Smoothing*) no valor de 3 (escala de 0 a 10) e com o histograma de contraste variando de 0,003 (valor mínimo) a 0,15 (valor máximo). As secções axiais reconstruídas foram salvas em formato *Bitmap* (BMP).

Antes da análise morfológica tridimensional quali-quantitativa das calvárias, as imagens reconstruídas de cada espécime foram carregadas no programa DataViewer (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) e posteriormente alinhadas em relação aos planos tridimensionais (coronal, sagital e axial) de forma que as suturas coronal e sagital ficassem paralelas ao longo eixo ântero-posterior e alinhamento látero-lateral (nos sentidos direito-esquerdo), possibilitando a visualização superior do defeito ósseo (Figura 6). Após isso, o conjunto de dados alinhados da secção axial de cada espécime foi salvo em um novo diretório.

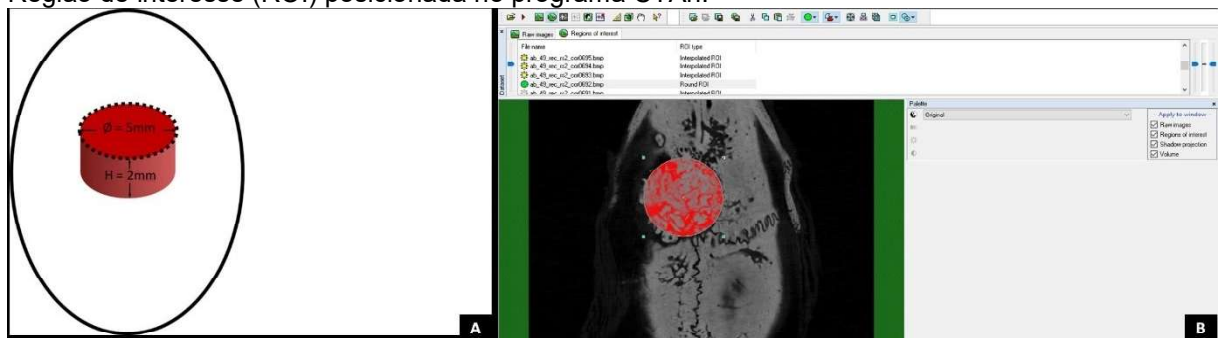
**Figura 6.** Alinhamento das amostras após escaneamento no programa DataViewer (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica). (A) Calvária desalinhada em relação as suturas coronal e sagital. (B) Cálvaria alinhada em relação as suturas coronal e sagital.



Fonte: Autora.

A partir das imagens alinhadas, realizou-se o processamento e análise das imagens com auxílio do programa CTAn v.1.18.8.0+ (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica). Com esta finalidade foi determinado uma região de interesse (ROI) e um volume de interesse (VOI). As dimensões do ROI corresponderam as dimensões do defeito ósseo crítico realizado em calvária de ratos com 5 mm de diâmetro. Conseqüentemente as dimensões do VOI foram estabelecidas como um cilindro de 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura correspondente a espessura do tecido ósseo da calvária (ARONI et al., 2019; AUERSVALD et al., 2017; ENGLER-PINTO et al., 2019a) (Figura 7A).

Figura 7. Sequência de processamento e análise das imagens. (A) Representação esquemática do volume de interesse no interior do defeito ósseo, com as dimensões definidas (em vermelho). (B) Região de interesse (ROI) posicionada no programa CTAn.



Fonte: Autora.

Em seguida, por meio da ferramenta *Custom Processing*, uma sequência de operações matemáticas (*task list*) foi aplicada no VOI a fim de realizar o processo de binarização dos tons de cinza do tecido ósseo neoformado e obter os dados morfométricos tridimensionais de volume ( $\text{mm}^3$ ), de porcentagem de volume ósseo, de superfície óssea ( $\text{mm}^2$ ), número de trabéculas ósseas ( $1/\text{mm}$ ), espessura trabecular (mm), separação trabecular (mm) (Tabela 1). Além disso, também foram gerados os modelos tridimensionais deste VOI do defeito ósseo para posterior avaliação qualitativa no programa CTVol (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica).



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 <sup>3</sup>
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo	Porcentagem do volume ósseo da ROI segmentada como osso	%
BS	Superfície óssea	Superfície da ROI segmentada como osso	mm <sup>2</sup>
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 a avaliação tridimensional	mm

Ainda para a análise qualitativa, as imagens reconstruídas da calvária como um todo foram carregadas e avaliadas no programa CTVox (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) com auxílio de recursos de contraste, cor e luz. Os dados obtidos foram transferidos para uma planilha do Excel para posterior análise estatística.

### 3.5.2 Processamento histológico dos espécimes

Após os procedimentos de aquisição de todas as imagens microtomográficas, os espécimes foram acondicionados por 24 horas em água para hidratação, lavados abundantemente em água corrente e descalcificados em solução tamponada de ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) a 10%, com trocas da solução a cada 48 horas durante 20 dias.

Após a descalcificação, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e submetidas às fases de processamento histológico de rotina: desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 70%, 80%, 95%, 100%, 100%, 100%, 100%); diafanização em xilol; embebição em parafina; aquecimento em estufa a 60° C; resfriamento em placa refrigeradora e incluídos em blocos (Figura 8).

Figura 8. Sequência de processamento histológico para inclusão em parafina dos espécimes. (A) Processador de tecidos. (B) Placa aquecida. (C) Dispensador de parafina. (D) Placa refrigeradora.



Fonte: Autora.

Os blocos contendo as calvárias foram cortados semi-seriados com 5  $\mu\text{m}$  de espessura e a partir de então corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.), no sentido ântero-posterior da calvária. As lâminas histológicas obtidas foram fotografadas empregando-se ocular integradora com 100 pontos (Integrating eyepiece II, Zeiss, Oberkochen, West Germany), em aumento de 40x e as imagens obtidas por microscopia de luz foram utilizadas para análises histológica descritiva e histomorfométrica quantitativa.

### 3.5.3 Análise histológica descritiva

A análise histológica descritiva foi realizada em cada uma das amostras, em lâminas coradas pelo método hematoxilina e eosina (H.E.). O objetivo foi descrever os padrões teciduais encontrados na interface osso-biomaterial-defeito. Foram avaliadas células do tecido ósseo neoformado, biomaterial, presença ou ausência de membrana remanescente, vasos sanguíneos e sinais de processo inflamatório, em uma análise cega, realizada por um único avaliador treinado.

### 3.5.4 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada em cada um dos espécimes. A área delimitada pelas margens do defeito foi determinada por meio de retículo quadriculado (Olympus, Tokyo) em pixels para mensurar quantitativamente o volume de tecido



mineralizado, que correspondia ao osso neoformado e/ou biomaterial remanescente. Foi considerado tecido conjuntivo todo o tecido mole presente na área. Os resultados obtidos foram transformados em percentual dentro da área total do defeito (considerada 100%), armazenados em planilhas do Excel e posteriormente analisados estatisticamente.

### 3.5.5 Análise estatística

Os dados quantitativos gerados pelas metodologias empregadas (micro-CT e histomorfometria) foram submetidos à análise estatística. Primeiramente os dados foram processados para a análise de normalidade, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir dos resultados com dados normais e homogêneos ( $p > 0,05$ ) foi realizado o teste de análise de variância a um critério (ANOVA um fator), cujo fator de variação foi as membranas. Resultados com dados com diferença estatística foram sujeitos ao teste complementar, Teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Prism 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA), com significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise por microtomografia computadorizada (micro-CT)

Para a análise estatística da avaliação por micro-CT, foi aplicado o teste ANOVA a um critério para cada parâmetro dos dados obtidos. Observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros **BV** (volume ósseo em  $\text{mm}^3$ ), **BV/TV** (porcentagem de volume ósseo em %), **BS** (superfície óssea em  $\text{mm}^2$ ) e **Tb.N** (número de trabéculas, 1/mm) e **Tb.Sp** (separação de trabéculas, em mm). O parâmetro **Tb.Th** (espessura trabecular) não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

Após os resultados da análise estatística entre grupos por ANOVA a um critério, os dados que apresentavam diferença estatística foram submetidos ao teste complementar de Tukey, para observar as diferenças intra-grupos. Este teste estatístico permitiu revelar que para os parâmetros **BV**, **BV/TV**, **BS** e **Tb.N**, o grupo TF apresentou os menores valores, seguido do grupo CPB. Entretanto, o grupo CDS demonstrou os maiores valores para estas mesmas análises (Figura 9). Por outro lado, o grupo CDS demonstrou menor valor de **Tb.Sp** e o grupo TF apresentou o maior valor deste mesmo parâmetro (Figura 9).

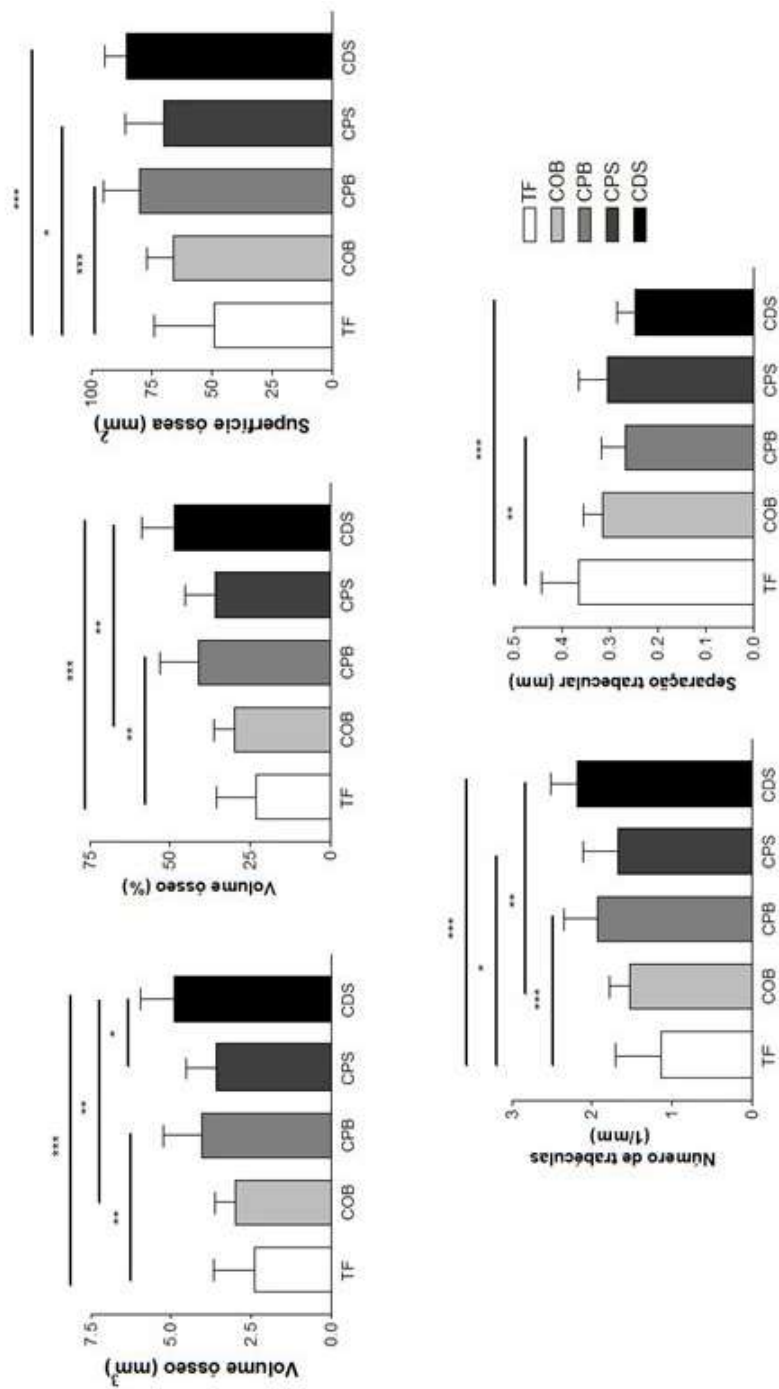
A imagens tridimensionais, obtidas por reconstrução, evidenciaram diferenças no padrão de formação óssea na região dos defeitos entre os grupos experimentais no período de 30 dias, compatíveis com os resultados obtidos quantitativamente. Enquanto TF apresentava neoformação óssea discreta localizada majoritariamente na periferia do defeito e trabeculado ósseo espaçado (Figura 10), os grupos COB, CPB, CPS e CDS apresentaram diferentes proporções de arranjo ósseo complexo com formação óssea periférica e centrípeta e denso trabeculado ósseo, que possibilitou o recobrimento parcial da área do defeito ao final dos 30 dias do período experimental (Figura 10).

Tabela 2. Análise por micro-CT (n=10) após 30 dias (média ± desvio padrão).

	<b>BV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>BV/TV (%)</b>	<b>BS (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Tb.N (1/mm)</b>	<b>Tb.Th (mm)</b>	<b>Tb.Sp (mm)</b>
<b>TF</b>	2,37 ± 1,27a	23,31 ± 12,29a	48,76 ± 25,30a	1,13 ± 0,57ab	0,20 ± 0,03	0,36 ± 0,07a
<b>COB</b>	2,99 ± 0,63ab	29,91 ± 6,29ab	66,06 ± 10,92ab	1,53 ± 0,26ab	0,19 ± 0,02	0,31 ± 0,04ab
<b>CPB</b>	4,05 ± 1,20bc	40,94 ± 12,28bc	79,77 ± 14,99b	1,97 ± 0,43bc	0,21 ± 0,02	0,26 ± 0,05b
<b>CPS</b>	3,58 ± 0,94ab	35,97 ± 9,46abc	69,99 ± 16,03b	1,68 ± 0,43bc	0,21 ± 0,02	0,30 ± 0,06ab
<b>CDS</b>	4,91 ± 1,04c	48,52 ± 10,23c	85,23 ± 8,96b	2,19 ± 0,33c	0,22 ± 0,02	0,25 ± 0,04b
<b>ANOVA</b>	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p=0,001</b>	<b>p&lt;0,001</b>	<b>NS</b>	<b>p=0,002</b>

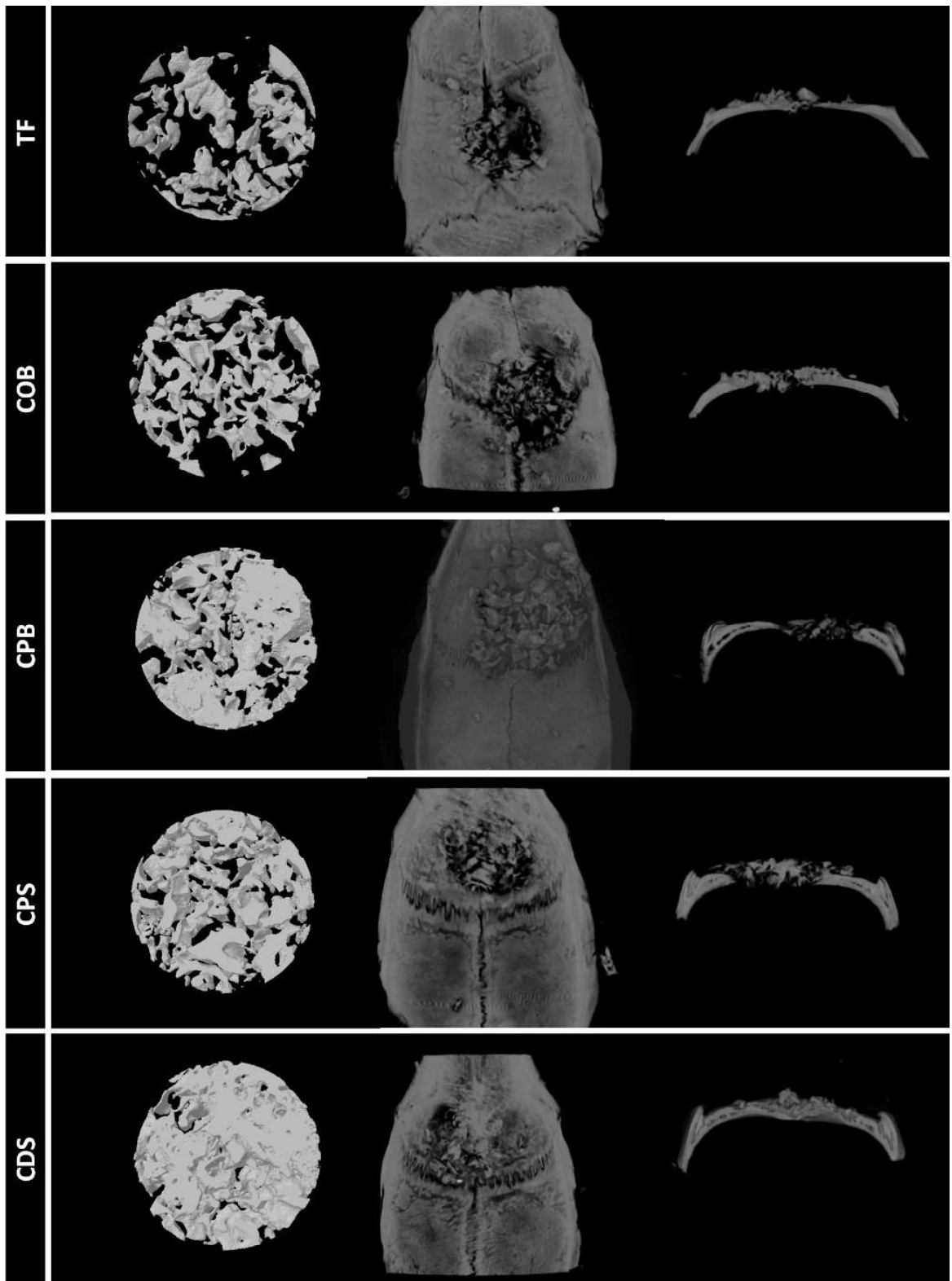
Análise por ANOVA um fator e posterior teste complementar de Tukey, nível de significância = 5%. Parâmetros analisados: BV: volume ósseo; BV/TV: porcentagem de volume ósseo; BS: superfície óssea; Tb.N: número de trabéculas; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.Sp: separação trabecular. Letras minúsculas representam diferença estatística entre as colunas.

Figura 9. Análise dos diferentes grupos avaliados por microtomografia computadorizada (micro-CT) após 30 dias (n=10). Análise estatística Teste Tukey: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001



Fonte: Autora.

Figura 10. Fotomicrografias representativas da deposição de tecido neoformado nos defeitos de calvária após 30 dias de cicatrização. Da esquerda para a direita, imagem do defeito no software CTVol, imagens do software CTVOx com vista sagital e transversal para cada grupo experimental.



Fonte: Autora.

## 4.2 Análise histológica descritiva

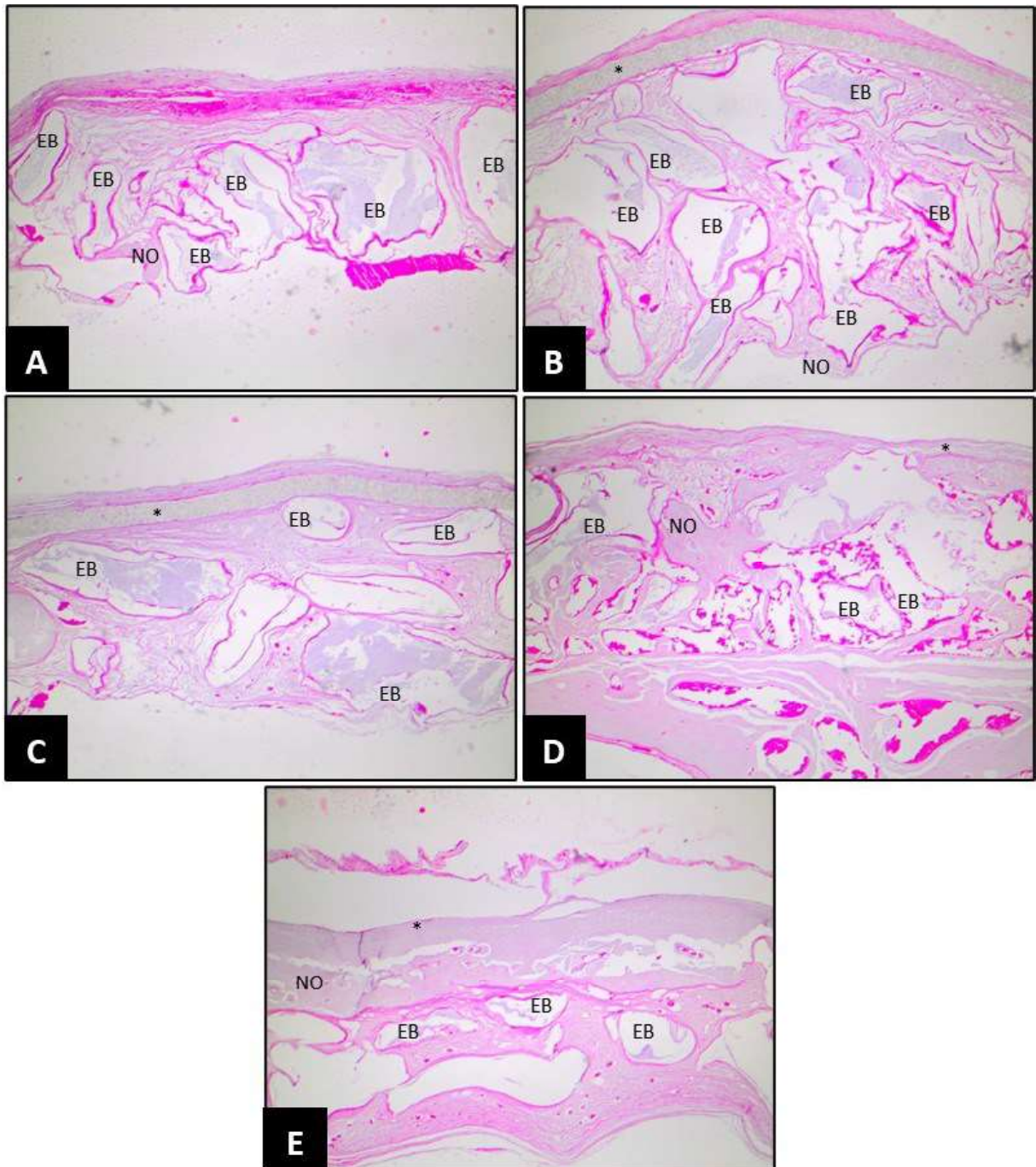
Na análise histológica das lâminas coradas em H.E. o grupo TF, representado por membrana sintética não absorvível, apresentou tecido epitelial ao redor da área anteriormente ocupada pela membrana de teflon PTFE (figura 11A) e os grupos COB, CPB, CPS e CDS, representados por membranas colágenas, apresentaram remanescente de membrana absorvível (Figuras 11B, 11C, 11D e 11E respectivamente). Os grupos COB e CPB representados por membranas colágenas de origem bovina apresentaram remanescente espesso de membrana absorvível destacado com um asterisco (Figuras 11B e 11C) e os grupos CPS e CDS representados por membranas colágenas de origem suína apresentaram remanescentes de membrana absorvível dispersos no tecido epitelial neoformado, dificultando a diferenciação das duas estruturas (Figuras 11D e 11E).

Todos os grupos apresentaram processo de reparo com o mesmo padrão de resposta inflamatória ao redor das membranas e do enxerto ósseo particulado. Não foram observados osteoclastos e neutrófilos polimorfonucleares compatíveis com processo inflamatório-infeccioso (Figura 11).

Outra característica comum a todos os grupos foi o padrão homogêneo de absorção das partículas do enxerto ósseo bovino particulado. Os remanescentes do enxerto estão distribuídos entre as fotomicrografias com a sigla EB (Figura 11). Também houve neoformação óssea descrita pela sigla NO para todos os grupos experimentais (Figura 11). A distribuição da neoformação óssea estava presente em posições diferentes ao redor do biomaterial ou partindo da periferia em direção ao centro do defeito ósseo a depender do grupo experimental (Figura 11).

Todos os grupos apresentaram tecido conjuntivo vascularizado. Os vasos sanguíneos estavam dispersos no defeito ósseo e entre os remanescentes das membranas e enxerto ósseo particulado (Figura 11).

Figura 11. Fotomicrografias representando os defeitos ósseos de calvária, com presença de tecido conjuntivo, enxerto ósseo bovino (EB) e formação de novo osso (NO) após 30 dias de cicatrização. O símbolo \* representa o remanescente da membrana. Coloração: H.E., aumento de 20x.



Fonte: Autora.

### 4.3 Análise histomorfométrica

Para a análise estatística da avaliação histomorfométrica, foi aplicado o teste ANOVA a um critério para cada parâmetro dos dados obtidos. Foi observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros analisados (Tabela 3).

Tabela 3. Análise da porcentagem de tecido mineralizado e de tecido conjuntivo no defeito em calvária dos diferentes grupos avaliados por histomorfometria após 30 dias (n=10).

	<b>Tecido mineralizado (%)</b>	<b>Tecido Conjuntivo (%)</b>
<b>TF</b>	46,86 ± 11,23a	53,14 ± 11,23a
<b>COB</b>	63,48 ± 12,14b	36,52 ± 12,14b
<b>CPB</b>	61,77 ± 8,81b	38,23 ± 8,81b
<b>COS</b>	56,82 ± 12,10ab	43,18 ± 12,10ab
<b>CDS</b>	64,66 ± 10,36b	35,34 ± 10,36b
<b>ANOVA</b>	<b>p=0,0045</b>	<b>p=0,0045</b>

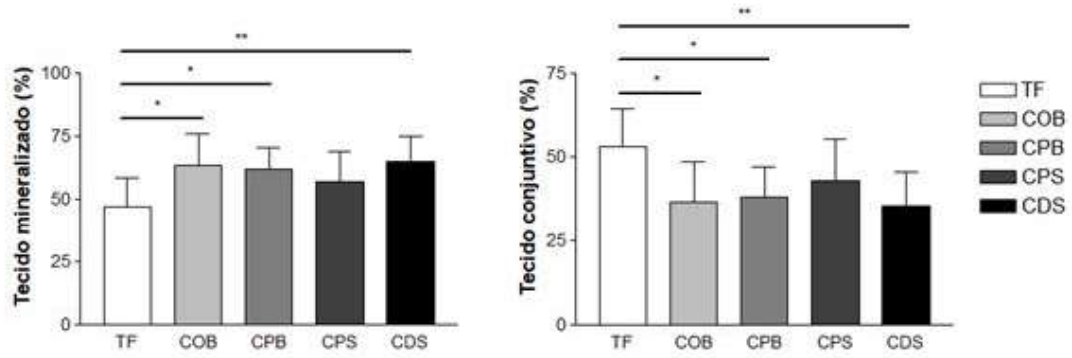
Análise por ANOVA um fator e posterior teste complementar de Tukey, nível de significância = 5%. Letras minúsculas representam diferença estatística entre as colunas.

Em sequência os dados foram submetidos à segunda análise utilizando o teste de Tukey intra-grupos. O grupo TF apresentou o menor percentual de tecido mineralizado e no grupo CDS houve maior percentual deste mesmo parâmetro, seguido pelos grupos COB, CPB e CPS, respectivamente (Figura 12).

Os parâmetros avaliados de tecido mineralizado e tecido conjuntivo são complementares, pois juntos representam o tamanho total do defeito ósseo. Portanto, o teste de Tukey intra-grupos apresenta o maior percentual de tecido conjuntivo no grupo TF e o menor percentual deste mesmo parâmetro no grupo CDS, seguido pelos grupos COB, CPB e CPS, respectivamente (Figura 12).



Figura 12. Gráficos da análise da porcentagem de tecido mineralizado e de tecido conjuntivo no defeito em calvária dos diferentes grupos avaliados por histomorfometria após 30 dias (n=10). Teste Tukey: \* p<0,05, \*\* p<0,01.



Fonte: Autora.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o efeito da manutenção do enxerto ósseo depositado no defeito ósseo crítico e o potencial regenerativo e reparador de membranas no procedimento de ROG em calvária de ratos. O modelo experimental *in vivo* abordado foi a criação de defeito ósseo crítico único em calvária de ratos. Um delineamento amparado por consentimentos éticos, econômicos e de fácil reprodutibilidade que inspira o senso investigativo para estudos em humanos (NAGATA et al., 2009; ORTOLAN et al., 2014; STAVROPOULOS et al., 2015; VAJGEL et al., 2014). As vantagens deste modelo experimental são a ausência de movimentação fisiológica do crânio, a pequena quantidade de osso esponjoso, a permissibilidade na padronização da dimensão do defeito ósseo, o adequado acesso cirúrgico e o consentimento da técnica com a implantação de biomateriais amparados pela estrutura da dura-máter e do tegumento da ferida cirúrgica (GOMES; FERNANDES, 2011).

A perda óssea na região maxilofacial é um problema clínico desafiador, especialmente no caso de defeitos ósseos amplos, quando sua capacidade regenerativa fisiológica é excedida (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; DURÃO et al., 2014). Esta situação é comumente observada em função de trauma, infecção, ressecção tumoral, doenças periodontais, doenças perimplantares, remodelação óssea após perda dentária e defeitos ósseos congênitos (PELAEZ et al., 2014). Visando simular estas situações, a literatura preconiza que o método empregado deve satisfazer alguns critérios: o tamanho do defeito não deve ser menor que o tamanho crítico de cada espécie, a metodologia empregada não deve ser muito onerosa, a técnica cirúrgica deve ser simples, reprodutível e de baixa morbidade, o sítio de implantação deve conter osso compacto e esponjoso, conferir estabilidade ao biomaterial empregado e impossibilidade de fratura (KOCHI et al., 2009). Todas essas características foram consideradas para o delineamento deste estudo. O defeito crítico único de 5 mm foi realizado de forma centralizada a sutura sagital da calvária dos ratos evitando a cicatrização óssea primária da ferida e se adequando aos objetivos propostos (ENGLER-PINTO et al., 2019b; VAJGEL et al., 2014) .

As análises empregadas foram microtomográficas, histológicas e histomorfométricas. Elas expressaram dados qualitativos e quantitativos complementares entre si. A histologia descritiva e a histomorfometria apresentaram resultados bidimensionais (PARK et al., 2019), enquanto a análise microtomográfica apresentou dados tridimensionais da microestrutura óssea em resposta aos biomateriais empregados no estudo (GAUTHIER et al., 2005; LAN et al., 2013). Estas diferenças e complementariedades favoreceram um entendimento amplo do que ocorreu no defeito ósseo após o período cicatricial (BOUXSEIN et al., 2010; DOH et al., 2016; HUH et al., 2017).

Histologicamente foram observados células de tecido epitelial, tecido conjuntivo, tecido ósseo e remanescentes dos biomateriais membrana e enxerto ósseo bovino particulado interagindo em condições de saúde diante de um procedimento regenerativo. Foi identificado que a neoformação óssea na ROG ocorreu a partir das margens do defeito e no centro das membranas utilizadas devido a rede vascularizada formada pelo coágulo sanguíneo (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). Esta rede vascularizada permeou a migração, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, a angiogênese, a aposição de matriz orgânica e a subsequente mineralização para formação do novo tecido ósseo (BEHRING et al., 2008). Histomorfometricamente foram determinadas as proporções de tecido mineralizado e tecido conjuntivo presentes na região que o defeito ósseo crítico foi criado e microtomograficamente foram avaliados os parâmetros de volume ósseo, superfície óssea, espessura trabecular, número de trabéculas e espaço trabecular. O volume ósseo representa a quantidade de osso neoformado na região do defeito, a superfície óssea demonstra a área superficial do tecido mineralizado (FONSECA; BRANDI, 2010; VERNA et al., 2002), o número, a espessura e a separação das trabéculas fornecem dados sobre o diâmetro dos espaços medulares interpostos na matriz óssea e consolidam a existência de processo de neoformação óssea (SOARES et al., 2019). A técnica de micro-CT não permitiu diferenciar as partículas do enxerto ósseo das novas células osteoprogenitoras e da matriz osteóide (LOHMANN et al., 2017a).

Sendo assim, a associação dos dados bidimensionais e tridimensionais possibilitaram a obtenção de resultados complementares e amplos em relação aos tecidos mineralizados (tecido ósseo neoformado e o enxerto utilizado) e não

mineralizados (tecidos moles adjacentes). Os grupos representados pelas membranas colágenas (COB, CPB, CPS e CDS) foram mais eficientes na ROG apresentando interação em condições de saúde dos tecidos e maiores valores de volume ósseo, superfície óssea, número de trabéculas e menor separação trabecular ao final de 30 dias.

A estrutura e a composição das membranas determinam a sua conformação espacial, suas reações teciduais e seu tempo de degradação. Nas fases do processo regenerativo é importante que a membrana seja um arcabouço, não colapse sobre o defeito ósseo, se adapte à anatomia pré-existente na área e se degrade na mesma velocidade que novas células ósseas repovoam a região do defeito (ELGALI et al., 2017b), ou seja, clinicamente em humanos, é necessário que a integridade da membrana possa ser mantida num espaço de tempo de 3 a 4 semanas para que os ideais regenerativos sejam conquistados após o procedimento cirúrgico regenerativo (SHEIKH et al., 2017b), de forma que o epitélio da margem da ferida não interfira no processo de neoformação óssea que está ocorrendo sob a membrana.

Para estimular a regeneração óssea em situações clínicas complexas, algumas estratégias têm sido propostas, entre elas, a associação de biomateriais. Neste estudo, especulou-se que a associação de substituto ósseo particulado a membranas colágenas nacionais poderia constituir em alternativa promissora para a regeneração de defeitos ósseos críticos, pois as características físicas e estruturais destes biomateriais são complementares (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012). A característica osteocondutora do enxerto ósseo particulado associada a semipermeabilidade, integração tecidual, fácil manuseio clínico e capacidade de manutenção de espaço das membranas otimizam a ROG (YAMADA; EGUSA, 2018). O enxerto ósseo particulado xenógeno empregado neste estudo foi utilizado em estudos regenerativos prévios para avaliar o preenchimento de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos, tornando este material uma escolha pertinente para analisar a diferença do potencial regenerativo das membranas empregadas (ARTAS et al., 2018; ENGLER-PINTO et al., 2019a; FABRIS et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2015; SCALIZE et al., 2016).

Considerando a possibilidade de associar as membranas a um outro biomaterial que pudesse acomodá-las e estabilizá-las no defeito, elegeu-se o substituto ósseo particulado de origem bovina. Sabe-se que a escolha deste

biomaterial enxertivo favorece a formação óssea (ARTAS et al., 2018). O enxerto ósseo bovino particulado tem propriedades osteocondutoras que o tornam útil como preenchedor do defeito ósseo, pois permite a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos e osteoclastos atuando como arcabouço passivo, que aos poucos vai sendo absorvido e substituído no defeito ósseo conforme observado em outros estudos (FILHO et al., 2009; ARTAS et al., 2018). Este enxerto é composto por grânulos hidrofílicos de 0,60 a 1,50mm com forte ação de capilaridade, que em contato com o sangue proveniente da ferida cirúrgica comporta-se como uma pasta habilitada a preencher pequenos defeitos ósseos (LOHMANN et al., 2017b; PELAEZ et al., 2014; TESTORI et al., 2018). Trata-se de um biomaterial nacional de origem xenógena, que apresenta vantagens para aplicação clínica por ser acessível, de baixo custo e fácil manipulação (CARBONARI, [s.d.]).

Há consenso na superioridade do enxerto ósseo particulado bovino em relação a enxertos ósseos particulados de outras origens para procedimentos regenerativos (STUMBRAS et al., 2019; LAI et al., 2020). A quantidade de enxerto ósseo utilizada neste estudo foi padronizada, para evitar viés metodológico e garantir que as membranas fossem os únicos elementos diferenciais das análises. A disponibilidade e a fabricação nacional são características que flexibilizam o acesso do paciente ao biomaterial devido a diminuição de custos. Na literatura encontram-se estudos demonstrando os benefícios do uso das membranas colágenas internacionais associadas a substitutos ósseos particulados (OH et al., 2003; SANZ et al., 2019; SHEIKH et al., 2017c). Contudo, até o momento, este é o primeiro trabalho da literatura a comparar as respostas biológicas da associação de substituto ósseo às principais membranas nacionais no procedimento de ROG neste modelo experimental.

Foram avaliadas as respostas biológicas de um grupo no qual a membrana não absorvível de teflon PTFE (grupo controle) foi comparada a quatro grupos de membranas absorvíveis colágenas (grupos experimentais). As membranas absorvíveis colágenas eram de origem bovina ou suína; provenientes de tecido ósseo, pericárdio ou derme, de única ou dupla camada e sem ligações reticulares. Estas membranas foram incluídas no estudo devido a sua incidência na literatura, a distribuição e disponibilidade no mercado nacional (BOTTINO, 2015; ELGALI et al., 2017a; MEYER, 2019). Nas análises quantitativas e qualitativas por meio de micro-

CT, histologia descritiva e histomorfometria foram observados que os grupos representados pelas membranas absorvíveis colágenas (COB, CPB, CPS e CDS) promoveram maior neoformação óssea quando comparados ao grupo da membrana não absorvível de teflon (TF).

Clinicamente, a ROG é considerada bem-sucedida quando a membrana promove a oclusão celular e a manutenção do espaço até completar o período cicatricial necessário para que as células progenitoras repovoem o defeito (BUSER et al., 1999; SCHENK et al., 1997). A origem das membranas colágenas influencia diretamente o tempo de absorção do biomaterial pelo receptor, sendo as membranas de origem suína absorvidas rapidamente quando comparadas a membranas bovinas (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001; MEYER, 2019).

A proveniência do colágeno modifica a resistência da membrana, sendo que o colágeno proveniente do pericárdio é mais resistente quando comparado ao colágeno da derme e do osso respectivamente (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001; MEYER, 2019). O número de camadas é responsável pela espessura e permeabilidade do biomaterial, sendo a dupla camada mais espessa e permeável comparada a membranas de camada única (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001; MEYER, 2019). A ausência de ligações cruzadas reticulares é responsável pela boa vascularização, boa integração tecidual e menor resposta inflamatória da ferida cirúrgica (ROTHAMEL et al., 2005).

A fim de aumentar a estabilidade das membranas de colágeno e retardar sua degradação, diferentes abordagens estão sendo propostas na literatura. A modificação das propriedades da superfície do biomaterial, o tamanho das partículas que as constitui, a porosidade e a liberação de íons estão sendo desenvolvidos, visando a fabricação de uma membrana de colágeno ideal para ROG (CALCIOLARI et al., 2018; CHU et al., 2017; KHORSAND et al., 2019). Essa justificativa poderia explicar as diferentes respostas biológicas encontradas no padrão de neoformação óssea apresentados pelos diferentes grupos experimentais contendo membranas de colágeno neste estudo. Apesar da diversidade entre a origem e padrão das membranas utilizadas, foram encontradas características de homogeneidade entre todos os grupos, em relação à formação de discreto infiltrado inflamatório, mesmo padrão de absorção de partículas de enxerto ósseo particulado e neoformação óssea.

Estes achados histológicos descritivos garantem a previsibilidade e diminuída reação inflamatória quando qualquer das membranas usadas neste estudo sejam usadas clinicamente com o objetivo de buscar a ROG em defeitos ósseos.

O resultado histológico descritivo encontrado no grupo representado pela membrana de colágeno de derme suína (CDS) está de acordo com a literatura disponível quando esta foi comparada a outras membranas em estudos anteriores. Estes achados demonstraram que a membrana colágena de derme suína apresentou um moderado infiltrado inflamatório, colonização por células inflamatórias e células fibroblásticas em sua superfície (GHANAATI, 2012; OWENS; YUKNA, 2001; SILVA et al., 2017), biodegradação significativa e atuou como compartimento bioativo no processo regenerativo no período avaliado (TURRI et al., 2016; ELGALI et al., 2017).

As membranas colágenas de origem suína (CDS e CPS) apresentaram biodegradação significativa e diante deste processo agiram como compartimentos bioativos em vez de barreiras passivas na ROG. Tais características encontradas se devem a achados de pesquisas anteriores, onde foi observado que estes grupos de membranas se envolvem no processo de atração celular para a área da ferida cirúrgica, secretando sinais de regeneração e remodelação óssea, e promovendo a expressão de fatores quimiotáticos, modulando assim o processo osteogênico global (TURRI et al., 2016; ELGALI et al., 2017).

Já os grupos representados pelas membranas colágenas de origem bovina (COB e CPB) demonstraram biodegradação moderada apresentando remanescente espesso de membrana absorvível quando comparados aos grupos representados pelas membranas colágenas de origem suína (CPS e CDS). A biodegradação destas membranas de colágeno está relacionada à sua dinâmica entre os tecidos, assim como o processo de degradação enzimática e metabolismo diante dos tecidos subjacentes (CALCIOLARI et al., 2018).

No período cicatricial de 30 dias analisado neste estudo, os grupos CDS e CPS já haviam sofrido o processo de biodegradação significativo, o que corrobora os achados de outros autores (CALCIOLARI et al., 2018; KOZLOVSKY et al., 2009; ROTHAMEL et al., 2005; SCHWARZ et al., 2006; SILVA et al., 2017). Este período experimental de 30 dias foi determinado por ser suficiente para observar a manutenção do enxerto ósseo sob a membrana e o início de processos de reparo e

remodelação óssea nos diferentes grupos, tornando-o um período de tempo ideal para a hipótese apresentada neste estudo (DE OLIVEIRA et al., 2017).

Em revisão recente de trabalhos sobre o uso clínico de membranas colágenas, concluiu-se que estas membranas apresentam uma ótima relação benefício-risco, desde que suas contraindicações, que incluem exposição oral, uso em sítios infectados e uso seletivo em pacientes diabéticos, com osteoporose, distúrbios metabólicos e tabagistas, sejam respeitadas (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001; CHU et al., 2017; SHEIKH et al., 2017c).

Nas análises histomorfométrica e microtomográfica deste estudo experimental, o grupo representado pela membrana de derme suína (CDS) demonstrou os melhores resultados, o que evidencia sua eficácia nos procedimentos de regeneração dos defeitos ósseos. A membrana de derme suína é considerada cientificamente o substituto membranoso absorvível “padrão ouro” a ser utilizado nos procedimentos de ROG (MERLI et al., 2018).

Histomorfometricamente e microtomograficamente as proporções de tecido mineralizado e tecido conjuntivo e os parâmetros volume ósseo, superfície óssea, número de trabéculas e separação de trabéculas apresentados pelo grupo representado pela membrana colágena de derme suína (CDS) não apresentaram diferença estatística para os mesmos padrões do grupo representado pela membrana colágena nacional de pericárdio bovino (CPB). A semelhança dos dados estatísticos dos grupos associada aos dados histológicos faz da membrana nacional uma alternativa pertinente a membrana “padrão ouro” 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.

O grupo representado pela membrana de teflon (TF) apresentou os menores resultados deste estudo em relação à formação de novo osso. A característica não absorvível da membrana que o representa faz com que a sua indicação dependa da natureza do defeito e da escolha do material de preenchimento ósseo. Membranas de teflon são delicadas, de manuseio clínico específico pois seu contato com fluidos não interfere na sua consistência e adaptação a defeitos ósseos (SVERZUT et al., 2008; VAN LEEUWEN et al., 2012). São membranas indicadas para aumentos ósseos verticais associados a enxertos particulados cuja estabilização pode ou não estar



associada a micro parafusos fixadores que evitam a exposição e contaminação do biomaterial na cavidade oral pela exposição do biomaterial à cavidade oral, favorecendo a formação de biofilme bacteriano e infecções oportunistas que prejudicam a neoformação óssea (NAUNG; SHEHATA; VAN SICKELS, 2019). Portanto, uma hipótese para explicação dos menores resultados do grupo TF se dá pela profundidade rasa do defeito ósseo criado em calvária, em torno de 2 mm de espessura e a não fixação da membrana sobre o defeito ósseo preenchido com enxerto particulado, o que pode ter consentido com um tensionamento tecidual e/ou deslocamento da membrana na ferida cirúrgica.

No período cicatricial experimental de 30 dias, não houve a necessidade de segunda intervenção cirúrgica para a remoção das membranas não absorvíveis do grupo TF. Embora o período experimental seja considerado longo para este tipo de membrana, na análise histológica foram encontradas características de biocompatibilidade semelhantes as membranas absorvíveis testadas. É importante ressaltar que nenhum grupo teve membranas expostas ao meio bucal. Sendo assim, apesar do grupo TF apresentar baixos padrões de neoformação óssea observados microscopicamente e microtomograficamente, estes resultados amparam as indicações de uso das membranas não absorvíveis na literatura e determinam o sucesso da terapia regenerativa (MERTENS et al., 2019). Desta maneira, de acordo com os achados deste estudo, a membrana de teflon continua sendo uma alternativa viável em casos de reconstruções múltiplas ou de áreas extensas que necessitem de membrana associada aos biomateriais (RAKHMATIA et al., 2013).

Uma das limitações deste estudo, devido a metodologia empregada, é a impossibilidade de avaliar as consequências da ROG na arquitetura tridimensional do alvéolo. Nas reabilitações orais quando implantes osseointegráveis são instalados em defeitos ósseos de fenótipo gengival fino, há uma probabilidade seis vezes maior de progressão da perda óssea ao redor dos implantes ao longo do tempo (LINKEVICIUS et al., 2009). A espessura inicial de tecido mole influencia a estabilidade dos tecidos adjacentes a ele e ao redor dos implantes. Sendo assim, enxertos de tecido conjuntivo subepitelial associado a substitutos mucosos e a membranas de colágeno podem ser uma alternativa para a correção destes danos (ROCHA et al., 2012). O aspecto tridimensional do rebordo deve ser considerado, pois deve haver espessura gengival, quantidade e qualidade ósseas suficientes para a colocação do implante em

condições ideais para a reabilitação com boa previsibilidade estética e funcional (JANUÁRIO et al., 2011; CHIAPASCO; CASENTINI, 2018).

Os substitutos mucosos são biomateriais xenógenos desenvolvidos com a indicação de modificação de fenótipo gengival (PUZIO et al., 2020). São biomateriais de origem suína, desenvolvidos à partir de matriz colágena tipo I e tipo III, sem ligações reticulares, com resultados promissores em estudos *in vitro* e *in vivo* e com taxa considerável de sucesso (PAPI; POMPA, 2018; RAMALINGAM et al., 2016; SCHMITT et al., 2019). Porém, novos estudos serão necessários no futuro para comparar as matrizes de colágeno e as membranas de colágeno analisadas neste estudo no intuito de observar a remodelação dos tecidos moles sobre estes biomateriais. Partindo do princípio que uma das matrizes colágenas indicadas clinicamente possui a mesma origem da membrana colágena representada pelo grupo CDS. O que difere a esta matriz da membrana é a espessura do biomaterial (GHANAATI, 2012), sendo a matriz mais espessa que a membrana. Portanto, seria razoável considerar que as membranas de colágeno também poderiam, hipoteticamente, modificar o fenótipo gengival em defeitos ósseos.

Estudos clínicos e em animais relacionados a ROG ainda estão em andamento para estabelecer uma membrana ideal e novas terapias para cada desafio clínico (CABALLÉ-SERRANO et al., 2018; SANZ et al., 2019). Toda membrana oferece vantagens e desvantagens. Sendo assim, cabe ao cirurgião dentista selecionar este biomaterial com criticidade considerando as características morfológicas, estruturais e funcionais que o constitui e as particularidades de cada caso clínico (RAKHMATIA et al., 2013). Os resultados obtidos neste estudo reúnem informações pertinentes à realidade clínica nacional e proporciona a escolha de melhores condutas diante da necessidade de realização da ROG na reabilitação implantar, considerando o momento da instalação do implante (imediate, precoce ou tardio), as diferentes condições do rebordo para a seleção apropriada das membranas para ROG.

## 6 CONCLUSÕES

Diante da metodologia empregada e dos resultados obtidos, pode ser concluído que:

1. Houve eficiência na associação entre membranas colágenas e enxerto ósseo bovino no procedimento de regeneração óssea guiada de defeitos ósseos em calvária de ratos em todos os grupos experimentais;
2. As análises por microtomografia computadorizada identificaram preenchimento ósseo parcial em todos os grupos do estudo. Em relação ao volume ósseo neoformado, a superfície óssea, o número de trabéculas e a separação trabecular, os grupos que obtiveram os maiores valores foram aqueles representados pela membrana colágena de derme suína (CDS) e pela membrana colágena nacional de pericárdio bovino (CPB). A espessura trabecular não expressou diferença entre os grupos.
3. Na análise histológica descritiva todos os grupos apresentaram o mesmo padrão de resposta inflamatória, homogeneidade na absorção de partículas do enxerto ósseo bovino, neoformação óssea e presença de tecido conjuntivo vascularizado. O grupo membrana não absorvível de teflon (TF) apresentou tecido epitelial recobrando a área previamente ocupada pela membrana e os grupos de membranas colágenas nacionais de origem bovina (CPB e COB) apresentaram remanescente das membranas absorvíveis no defeito ósseo.
4. A análise histomorfométrica identificou a formação de tecido mineralizado e presença de tecido conjuntivo em todos os grupos do estudo. O grupo membrana não absorvível de teflon (TF) apresentou o menor percentual de tecido mineralizado e o maior percentual de tecido conjuntivo, enquanto o grupo da membrana colágena de derme suína (CDS) apresentou os maiores valores de tecido mineralizado e o menor valor de tecido conjuntivo seguido pelos grupos das membranas nacionais de colágeno ósseo bovino (COB) e pericárdio bovino (CPB).

## REFERÊNCIAS

- ADELL, R. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **International Journal of Oral Surgery**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 387–416, 1981. DOI: 10.1016/S0300-9785(81)80077-4.
- ARAÚJO, Mauricio G.; SILVA, Cléverson O.; MISAWA, Mônica; SUKEKAVA, Flavia. Alveolar socket healing: What can we learn? **Periodontology 2000**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 122–134, 2015. DOI: 10.1111/prd.12082.
- ARONI, Maurício Andrés Tinajero; DE OLIVEIRA, Guilherme José Pimentel Lopes; SPOLIDÓRIO, Luís Carlos; ANDERSEN, Ole Zoffmann; FOSS, Morten; MARCANTONIO, Rosemary Adriana Chiérici; STAVROPOULOS, Andreas. Loading deproteinized bovine bone with strontium enhances bone regeneration in rat calvarial critical size defects. **Clinical Oral Investigations**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 1605–1614, 2019. DOI: 10.1007/s00784-018-2588-6.
- ARTAS, Gokhan; GUL, Mehmet; ACIKAN, Izzet; KIRTAY, Mustafa; BOZOGLAN, Alihan; SIMSEK, Sercan; YAMAN, Ferhan; DUNDAR, Serkan. A comparison of different bone graft materials in peri-implant guided bone regeneration. **Brazilian oral research**, [S. l.], v. 32, p. e59, 2018. DOI: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0059.
- AUERSVALD, Caroline Moreira; SANTOS, Felipe Rychuv; NAKANO, Mayara Mytie; LEONI, Graziela Bianchi; DE SOUSA NETO, Manoel Damião; SCARIOT, Rafaela; GIOVANINI, Allan Fernando; DELIBERADOR, Tatiana Miranda. The local administration of parathyroid hormone encourages the healing of bone defects in the rat calvaria: Micro-computed tomography, histological and histomorphometric evaluation. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v. 79, p. 14–19, 2017. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.02.016>.
- AYUB, Lauro Garrastazu; JÚNIOR, Arthur Belém Novaes; GRISI, Márcio Fernando de Moraes; JÚNIOR, Mário Taba; PALIOTO, Daniela Bazan; SOUZA, Sérgio Luís Scombatti De. Regeneração Óssea Guiada E Suas Aplicações Terapeuticas. **Braz J Periodontol**, [S. l.], v. 21, n. 04, p. 24–31, 2011.
- BEHRING, Jan; JUNKER, Rüdiger; WALBOOMERS, X. Frank; CHESSNUT, Betsy; JANSEN, John A. Toward guided tissue and bone regeneration: Morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. **Odontology**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 1–11, 2008. DOI: 10.1007/s10266-008-0087-y.
- BERTL, Kristina; HEIMEL, Patrick; RÖKL-RIEGLER, Michaela; HIRTLER, Lena; ULM, Christian; ZECHNER, Werner. MicroCT-based evaluation of the trabecular bone quality of different implant anchorage sites for masticatory rehabilitation of the maxilla. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 961–968, 2015. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.04.008.
- BOSCO, Alvaro Francisco; FALEIROS, Paula Lazilha; CARMONA, Luana Rodrigues; GARCIA, Valdir Gouveia; THEODORO, Letícia Helena; DE ARAUJO, Nathália

Januario; NAGATA, Maria José Hitomi; DE ALMEIDA, Juliano Milanezi. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 163, p. 303–310, 2016. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.040. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.040>.

BOTTINO, Marco C. Membranes for Periodontal Regeneration – A Materials Perspective. [S. l.], v. 17, p. 90–100, 2015. DOI: 10.1159/000381699.

BUNYARATAVEJ, Pintippa; WANG, Hom-Lay. Collagen Membranes: A Review. **Journal of Periodontology**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 215–229, 2001. DOI: 10.1902/jop.2001.72.2.215.

BURG, Karen J. L.; PORTER, Scott; KELLAM, James F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, [S. l.], v. 21, n. 23, p. 2347–2359, 2000. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00102-2.

BUSER, Daniel; CHAPPUIS, Vivianne; BELSER, Urs C.; CHEN, Stephen. Implant placement post extraction in esthetic single tooth sites: when immediate, when early, when late? **Periodontology 2000**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 84–102, 2017. DOI: 10.1111/prd.12170.

BUSER, Daniel; DULA, Karl; HESS, Daniel; HIRT, Hans Peter; BELSER, Urs C. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. **Periodontology 2000**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 151–163, 1999. DOI: 10.1111/j.1600-0757.1999.tb00153.x.

BUSER, Daniel; SENNERBY, Lars; DE BRUYN, Hugo. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. **Periodontology 2000**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 7–21, 2017. DOI: 10.1111/prd.12185.

CABALLÉ-SERRANO, Jordi; MUNAR-FRAU, Antonio; ORTIZ-PUIGPELAT, Octavi; SOTO-PENALOZA, David; PEÑARROCHA, Miguel; HERNÁNDEZ-ALFARO, Federico. On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. e477–e483, 2018. DOI: 10.4317/jced.54767.

CALCIOLARI, E.; RAVANETTI, F.; STRANGE, A.; MARDAS, N.; BOZEC, L.; CACCHIOLI, A.; KOSTOMITSOPOULOS, N.; DONOS, N. Degradation pattern of a porcine collagen membrane in an in vivo model of guided bone regeneration. **Journal of Periodontal Research**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 430–439, 2018. DOI: 10.1111/jre.12530.

CARBONARI, Marcelo. Caracterização físico-química e biológica de enxerto ósseo bovino, Bonafi II, em bioensaios – Parte 1 Introdução e Revisão da Literatura. [S. l.], v. 6, n. 6, p. 99–106, [s.d.].

CHEN, Stephen; BUSER, Daniel. Esthetic Outcomes Following Immediate and Early Implant Placement in the Anterior Maxilla—A Systematic Review. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, [S. l.], v. 29, n. Supplement, p. 186–215, 2014. DOI: 10.11607/jomi.2014suppl.g3.3.

CHU, Chenyu; DENG, Jia; SUN, Xianchang; QU, Yili; MAN, Yi. Collagen Membrane and Immune Response in Guided Bone Regeneration: Recent Progress and Perspectives. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 421–435, 2017. DOI: 10.1089/ten.teb.2016.0463.

CUOZZO, Renan C.; SARTORETTO, Suelen C.; RESENDE, Rodrigo F. B.; ALVES, Adriana Terezinha N. N.; MAVROPOULOS, Elena; PRADO DA SILVA, Marcelo H.; CALASANS-MAIA, Mônica D. Biological evaluation of zinc-containing calcium alginate-hydroxyapatite composite microspheres for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [S. l.], v. 108, n. 6, p. 2610–2620, 2020. DOI: 10.1002/jbm.b.34593.

DE OLIVEIRA, Lana Sarita de Souza; DE ARAÚJO, Aurigena Antunes; DE ARAÚJO JÚNIOR, Raimundo Fernandes; BARBOZA, Carlos Augusto Galvão; BORGES, Boniek Castillo Dutra; DA SILVA, José Sandro Pereira. Low-level laser therapy (780 nm) combined with collagen sponge scaffold promotes repair of rat cranial critical-size defects and increases TGF- $\beta$ , FGF-2, OPG/RANK and osteocalcin expression. **International Journal of Experimental Pathology**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 75–85, 2017. DOI: 10.1111/iep.12226.

DINOPOULOS, Haralambos; DIMITRIOU, Rozalia; GIANNOUDIS, Peter V. Bone graft substitutes: What are the options? **Surgeon**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 230–239, 2012. DOI: 10.1016/j.surge.2012.04.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surge.2012.04.001>.

DONOS, N. Guided Bone Regeneration : biological principle and therapeutic applications. [S. l.], p. 567–576, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x.

DURÃO, S. F.; GOMES, P. S.; COLAÇO, B. J.; SILVA, J. C.; FONSECA, H. M.; DUARTE, J. R.; FELINO, A. C.; FERNANDES, M. H. The biomaterial-mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat. **Osteoporosis International**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 1535–1545, 2014. DOI: 10.1007/s00198-014-2656-y.

ELGALI, Ibrahim; OMAR, Omar; DAHLIN, Christer; THOMSEN, Peter. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **European Journal of Oral Sciences**, [S. l.], v. 125, n. 5, p. 315–337, 2017. b. DOI: 10.1111/eos.12364.

ENGLER-PINTO, Ana; SIÉSSERE, Selma; CALEFI, Ana; OLIVEIRA, Luiz; ERVOLINO, Edilson; DE SOUZA, Sérgio; FURLANETO, Flávia; MESSORA, Michel Reis. Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. **Clinical Oral Implants Research**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 962–976, 2019. a. DOI: 10.1111/clr.13503.

FABRIS, André Luis da Silva; FAVERANI, Leonardo Perez; GOMES-FERREIRA, Pedro Henrique Silva; POLO, Tárík Ocon Braga; SANTIAGO-JÚNIOR, Joel Ferreira; OKAMOTO, Roberta. Bone repair access of boneceramic™ in 5-mm defects: Study on rat calvaria. **Journal of Applied Oral Science**, [S. l.], v. 26, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1590/1678-7757-2016-0531.

FONSECA, João Eurico; BRANDI, Maria Luisa. Mechanism of action of strontium ranelate: What are the facts? **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 17–18, 2010.

FONTANA, Filippo; GROSSI, Giovanni; FIMANO, Maurizio; MAIORANA, Carlo. Osseointegrated Implants in Vertical Ridge Augmentation with a Nonresorbable Membrane: A Retrospective Study of 75 Implants with 1 to 6 Years of Follow-up. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 29–39, 2015. DOI: 10.11607/prd.2136.

GALINDO-MORENO, Pablo et al. The 2nd Baltic Osseointegration Academy and Lithuanian University of Health Sciences Consensus Conference 2019. Summary and Consensus Statements: Group II - Extraction Socket Preservation Methods and Dental Implant Placement Outcomes within Grafted Socket. **Journal of Oral and Maxillofacial Research**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 1–4, 2019. DOI: 10.5037/jomr.2019.10309.

GAUTHIER, Olivier; MÜLLER, Ralph; VON STECHOW, Dietrich; LAMY, Bernard; WEISS, Pierre; BOULER, Jean Michel; AGUADO, Eric; DACULSI, Guy. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. **Biomaterials**, [S. l.], v. 26, n. 27, p. 5444–5453, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.072.

GHANAATI, Shahram. Non-cross-linked porcine-based collagen I-III membranes do not require high vascularization rates for their integration within the implantation bed: A paradigm shift. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 3061–3072, 2012. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.04.041. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.041>.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: The relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Laboratory Animals**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 14–24, 2011. DOI: 10.1258/la.2010.010085.

GUILLAUME, B. Les implants dentaires : revue. **Morphologie**, [S. l.], v. 100, n. 331, p. 189–198, 2016. DOI: 10.1016/j.morpho.2016.02.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.morpho.2016.02.002>.

JACOBS, J. J. Bone Grafts and Their Substitutes: Understanding The Three Os. **Orthopaedic Proceedings**, [S. l.], v. 99, n. SUPP\_7, p. 55, 2017. DOI: 10.1302/0301-620X.98B1.36350.

JEMAT, A.; GHAZALI, M. J.; RAZALI, M.; OTSUKA, Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/791725.

JEMT, T.; LEKHOLM, U.; ADELL, R. Osseointegrated implants in the treatment of partially edentulous patients: a preliminary study on 876 consecutively placed fixtures. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, United States, v. 4, n. 3, p. 211–217, 1989.

JUNG, Ronald E.; FENNER, Nadine; HÄMMERLE, Christoph H. F.; ZITZMANN, Nicola U. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. **Clinical Oral Implants Research**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1065–1073, 2013. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2012.02522.x.

KHORSAND, Behnoush; ELANGO VAN, Satheesh; HONG, Liu; KORMANN, Michael S. D.; SALEM, Aliasger K. A bioactive collagen membrane that enhances bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [S. l.], v. 107, n. 6, p. 1824–1832, 2019. DOI: 10.1002/jbm.b.34275.

KOCHI, Go; SATO, Shuichi; FUKUYAMA, Tomihisa; MORITA, Chiharu; HONDA, Kazuya; ARAI, Yoshinori; ITO, Koichi. Analysis on the guided bone augmentation in the rat calvarium using a microfocus computerized tomography analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, [S. l.], v. 107, n. 6, p. e42–e48, 2009. DOI: 10.1016/j.tripleo.2009.02.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.02.010>.

KOZLOVSKY, Avital; ABOODI, Guy; MOSES, Ofer; TAL, Haim; ARTZI, Zvi; WEINREB, Miron; NEMCOVSKY, Carlos E. Bio-degradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide®) applied in a double-layer technique in rats. **Clinical Oral Implants Research**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 1116–1123, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2009.01740.x.

LAN, Shenghui; LUO, Shiming; HUH, Beom Kang; CHANDRA, Abhishek; ALTMAN, Allison R.; QIN, Ling; LIU, X. Sherry. 3D image registration is critical to ensure accurate detection of longitudinal changes in trabecular bone density, microstructure, and stiffness measurements in rat tibiae by in vivo microcomputed tomography ( $\mu$ CT). **Bone**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 83–90, 2013. DOI: 10.1016/j.bone.2013.05.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.05.014>.

LEE, C. R.; GRODZINSKY, A. J.; SPECTOR, M. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. **Biomaterials**, [S. l.], v. 22, n. 23, p. 3145–3154, 2001. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00067-9.

LINKEVICIUS, Tomas; APSE, Peteris; GRYBAUSKAS, Simonas; PUISYS, Algirdas. The influence of soft tissue thickness on crestal bone changes around implants: a 1-year prospective controlled clinical trial. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 712–9, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885413>.

LIU, Jie; KERNS, David G. Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. **The Open Dentistry Journal**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 56–65, 2014. DOI: 10.2174/1874210601408010056.

LOHMANN, P. et al. Bone regeneration induced by a 3D architected hydrogel in a rat critical-size calvarial defect. **Biomaterials**, [S. l.], v. 113, p. 158–169, 2017. b. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.039>.



MERLI, Mauro; MOSCATELLI, Marco; MARIOTTI, Giorgia; PAGLIARO, Umberto; RAFFAELLI, Eugenia; NIERI, Michele. Comparing membranes and bone substitutes in a one-stage procedure for horizontal bone augmentation. Three-year post-loading results of a double-blind randomised controlled trial. **European Journal of Oral Implantology**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 441–452, 2018.

MERTENS, Christian; BRAUN, Sebastian; KRISAM, Johannes; HOFFMANN, Jürgen. The influence of wound closure on graft stability: An in vitro comparison of different bone grafting techniques for the treatment of one-wall horizontal bone defects. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 284–291, 2019. DOI: 10.1111/cid.12728.

MEYER, Michael. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. **BioMedical Engineering Online**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–74, 2019. DOI: 10.1186/s12938-019-0647-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>.

NAGATA, Maria et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects. An immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 339–345, 2009. DOI: 10.1016/j.bone.2009.04.246. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2009.04.246>.

NAUNG, Noel Ye; SHEHATA, Ehab; VAN SICKELS, Joseph E. Resorbable Versus Nonresorbable Membranes: When and Why? **Dental Clinics of North America**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 419–431, 2019. DOI: 10.1016/j.cden.2019.02.008.

OH, Tae Ju; MERAW, Stephen J.; LEE, Eun Ju; GIANNOBILE, William V.; WANG, Hom Lay. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. **Clinical Oral Implants Research**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 80–90, 2003. DOI: 10.1034/j.1600-0501.2003.140111.x.

OLIVEIRA, M. R.; SILVA, A. de C.; FERREIRA, S.; AVELINO, C. C.; GARCIA, I. R.; MARIANO, R. C. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 649–655, 2015. DOI: 10.1016/j.ijom.2014.12.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2014.12.005>.

ORTOLAN, Xana Raquel; FENNER, Bruna Proiss; MEZADRI, Telmo José; TAMES, David Rivero; CORRÊA, Rogério; DE CAMPOS BUZZI, Fátima. Osteogenic potential of a chalcone in a critical-size defect in rat calvaria bone. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 520–524, 2014. DOI: 10.1016/j.jcms.2013.07.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2013.07.020>.

OWENS, Kris W.; YUKNA, Raymond A. Collagen membrane resorption in dogs: A comparative study. **Implant Dentistry**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 49–58, 2001. DOI: 10.1097/00008505-200101000-00016.

PAPI, Piero; POMPA, Giorgio. The Use of a novel porcine derived acellular dermal

matrix (mucoderm) in peri-implant soft tissue augmentation: Preliminary results of a prospective pilot cohort study. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/6406051.

PARK, Kyeong Mee; HU, Kyung Seok; CHOI, Hyunmin; OH, Seo Eun; KIM, Hyeong Il; PARK, Wonse; KIM, Sungtae. Synergistic effect of hyperbaric oxygen therapy with PTH [1–34] on calvarial bone graft in irradiated rat. **Oral Diseases**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 822–830, 2019. DOI: 10.1111/odi.13037.

PELAEZ, Manuel; SUSIN, Cristiano; LEE, Jaebum; FIORINI, Tiago; BISCH, Frederick C.; DIXON, Douglas R.; MCPHERSON, James C.; BUXTON, Amanda N.; WIKESJÖ, Ulf M. E. Effect of rhBMP-2 dose on bone formation/maturation in a rat critical-size calvarial defect model. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 827–836, 2014. DOI: 10.1111/jcpe.12270.

PUZIO, Monika; HADZIK, Jakub; BŁASZCZYSZYN, Artur; GEDRANGE, Tomasz; DOMINIAK, Marzena. Soft tissue augmentation around dental implants with connective tissue graft (CTG) and xenogenic collagen matrix (XCM). 1-year randomized control trail. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, [S. l.], n. Xcm, p. 151484, 2020. DOI: 10.1016/j.aanat.2020.151484. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2020.151484>.

RAKHMATIA, Yunia Dwi; AYUKAWA, Yasunori; FURUHASHI, Akihiro; KOYANO, Kiyoshi. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. **Journal of Prosthodontic Research**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 3–14, 2013. DOI: 10.1016/j.jpor.2012.12.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2012.12.001>.

RAMALINGAM, Sundar; BASUDAN, Amani; BABAY, Nadir; AL-RASHEED, Abdulaziz; NOOH, Nasser; NAGHSHBANDI, Jafar; ALDAHMAH, Abdullah; ATTEYA, Muhammad; AL-HEZAIMI, Khalid. Efficacy of Mucograft vs Conventional Resorbable Collagen Membranes in Guided Bone Regeneration Around Standardized Calvarial Defects in Rats: A Histologic and Biomechanical Assessment. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, [S. l.], v. 36, p. s99–s107, 2016. DOI: 10.11607/prd.2277.

ROCHA, A. L.; SHIRASU, B. K.; HAYACIBARA, R. M.; MAGRO-FILHO, O.; ZANONI, J. N.; ARAÚJO, M. G. Clinical and histological evaluation of subepithelial connective tissue after collagen sponge implantation in the human palate. **Journal of Periodontal Research**, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 758–765, 2012. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2012.01491.x.

RONDA, Marco; REBAUDI, Alberto; TORELLI, Lucio; STACCHI, Claudio. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: A prospective randomized controlled clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 859–866, 2014. DOI: 10.1111/clr.12157.

ROTHAMEL, Daniel; SCHWARZ, Frank; SAGER, Martin; HERTEN, Monika; SCULEAN, Anton; BECKER, Jürgen. Biodegradation of differently crosslinked collagen membranes: An experimental study in the rat. **Clinical Oral Implants Research**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 369–378, 2005. DOI: 10.1111/j.1600-

0501.2005.01108.x.

SANZ, Mariano et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 46, n. S21, p. 82–91, 2019. DOI: 10.1111/jcpe.13123.

SCALIZE, Priscilla Hakime et al. Poly(Vinylidene Fluoride-Trifluorethylene)/barium titanate membrane promotes de novo bone formation and may modulate gene expression in osteoporotic rat model. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [S. l.], v. 27, n. 12, 2016. DOI: 10.1007/s10856-016-5799-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-016-5799-x>.

SCHENK, R. K.; BUSER, D.; HARDWICK, W. R.; DAHLIN, C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 13–29, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8150509>.

SCHMITT, Christian M.; SCHLEGEL, Karl Andreas; GAMMEL, Lisa; MOEST, Tobias. Gingiva thickening with a porcine collagen matrix in a preclinical dog model: Histological outcomes. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 46, n. 12, p. 1273–1281, 2019. DOI: 10.1111/jcpe.13196.

SCHWARZ, Frank; ROTHAMEL, Daniel; HERTEN, Monika; SAGER, Martin; BECKER, Jürgen. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: An immunohistochemical study in the rat. **Clinical Oral Implants Research**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 403–409, 2006. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2005.01225.x.

SENER, Bedrettin Cem; DERGIN, Guhan; GURSOY, Bahar; KELESOGLU, Ergun; SLIH, Imad. Effects of irrigation temperature on heat control in vitro at different drilling depths. **Clinical Oral Implants Research**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 294–298, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2008.01643.x.

SHEIKH, Zeeshan; HAMDAN, Nader; IKEDA, Yuichi; GRYNPAS, Marc; GANSS, Bernhard; GLOGAUER, Michael. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: A review. **Biomaterials Research**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–20, 2017. a. DOI: 10.1186/s40824-017-0095-5.

SHEIKH, Zeeshan; QURESHI, Javairia; ALSHAHRANI, Abdullah M.; NASSAR, Heba; IKEDA, Yuichi; GLOGAUER, Michael; GANSS, Bernhard. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. **Odontology**, [S. l.], v. 105, n. 1, 2017. b. DOI: 10.1007/s10266-016-0267-0.

SILVA, Edson Costa E.; OMONTE, Sheyla Viana; MARTINS, Alessandro Gomides Veiga; DE CASTRO, Hércules Henrique Onibene; GOMES, Hayder Egg; ZENÓBIO, Élton Gonçalves; DE OLIVEIRA, Peterson Antônio Dutra; HORTA, Martinho Campolina Rebello; SOUZA, Paulo Eduardo Alencar. Hyaluronic acid on collagen membranes: An experimental study in rats. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v. 73, p. 214–222, 2017. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.016>.

SILVA, Edson Costa; OLIVEIRA, Leandro Junqueira; EDUARDO, Paulo; SOUZA, Alencar; UNIVERSIDADE, Pontifícia; MINAS, Católica De; PUC, Gerais. Membranas de colágeno em Implantodontia : Revisão de. *[S. l.]*, p. 26–31, 2014.

SOARES, Priscilla Barbosa Ferreira; SOARES, Carlos José; LIMIRIO, Pedro Henrique Justino Oliveira; DE JESUS, Rainde Naiara Rezende; DECHICHI, Paula; SPIN-NETO, Rubens; ZANETTA-BARBOSA, Darcey. Effect of ionizing radiation after-therapy interval on bone: histomorphometric and biomechanical characteristics. **Clinical Oral Investigations**, *[S. l.]*, v. 23, n. 6, p. 2785–2793, 2019. DOI: 10.1007/s00784-018-2724-3.

SOLDATOS, Nikolaos K.; STYLIANOU, Popi; KOIDOU, P.; ANGELOV, Nikola; YUKNA, Raymond; ROMANOS, Georgios E. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. **Quintessence International**, *[S. l.]*, v. 48, n. 2, p. 131–147, 2017. DOI: 10.3290/j.qi.a37133.

STAVROPOULOS, Andreas; SCULEAN, Anton; BOSSHARDT, Dieter D.; BUSER, Daniel; KLINGE, Björn. Pre-clinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: Focus on small-animal models. **Periodontology 2000**, *[S. l.]*, v. 68, n. 1, p. 55–65, 2015. DOI: 10.1111/prd.12065.

SVERZUT, Cassio E.; FARIA, Paulo E. P.; MAGDALENA, Carolina M.; TRIVELLATO, Alexandre E.; MELLO-FILHO, Francisco V.; PACCOLA, Cleber A. J.; GOGOLEWSKI, Sylwester; SALATA, Luiz A. Reconstruction of Mandibular Segmental Defects Using the Guided-Bone Regeneration Technique With Polylactide Membranes and/or Autogenous Bone Graft: A Preliminary Study on the Influence of Membrane Permeability. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, *[S. l.]*, v. 66, n. 4, p. 647–656, 2008. DOI: 10.1016/j.joms.2007.06.664.

TAN, Wah Lay; WONG, Terry L. T.; WONG, May C. M.; LANG, Niklaus P. A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. **Clinical Oral Implants Research**, *[S. l.]*, v. 23, n. SUPPL. 5, p. 1–21, 2012. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2011.02375.x.

TESTORI, Tiziano; WEINSTEIN, Tommaso; SCUTELLÀ, Fabio; WANG, Hom Lay; ZUCHELLI, Giovanni. Implant placement in the esthetic area: criteria for positioning single and multiple implants. **Periodontology 2000**, *[S. l.]*, v. 77, n. 1, p. 176–196, 2018. DOI: 10.1111/prd.12211.

TURRI, Alberto; ELGALI, Ibrahim; VAZIRISANI, Forugh; JOHANSSON, Anna; EMANUELSSON, Lena; DAHLIN, Christer; THOMSEN, Peter; OMAR, Omar. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 84, p. 167–183, 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.034. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.034>.

VAJGEL, André; MARDAS, Nikos; FARIAS, Bruna Carvalho; PETRIE, Aviva; CIMÕES, Renata; DONOS, Nikolaos. A systematic review on the critical size defect

model. **Clinical Oral Implants Research**, [S. l.], v. 25, n. 8, p. 879–893, 2014. DOI: 10.1111/clr.12194.

VAN LEEUWEN, A. C.; VAN KOOTEN, T. G.; GRIJPMA, D. W.; BOS, R. R. M. In vivo behaviour of a biodegradable poly (trimethylene carbonate) barrier membrane: A histological study in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 1951–1959, 2012. DOI: 10.1007/s10856-012-4663-x.

VERNA, Carlalberta; BOSCH, Carles; DALSTRA, Michel; WIKESJÖ, Ulf M. E.; TROMBELLI, Leonardo. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats: A micro-CT scan analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 865–870, 2002. DOI: 10.1034/j.1600-051X.2002.290912.x.

YAMADA, Masahiro; EGUSA, Hiroshi. Current bone substitutes for implant dentistry. **Journal of Prosthodontic Research**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 152–161, 2018. DOI: 10.1016/j.jpor.2017.08.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2017.08.010>.

## ANEXOS

Anexo A – Ofício do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) após aprovação.



**CEUA**  
Comissão de Ética  
no Uso de Animais

Ribeirão Preto, 23 de abril de 2019

Prezado(a) Pesquisador (a) Andrea Marcia Marcaccini

Vimos por meio desta, informar que a proposta intitulada “**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE ENXERTO ÓSSEO E DIFERENTES MEMBRANAS ABSORVÍVEIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA (ROG). ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOMORFOMÉTRICO E ZIMOGRÁFICO NA CALVÁRIA DE RATOS**”, registrada sob o nº 03/2019 e sob a responsabilidade do (a) **pesquisador (a) Andrea Marcia Marcaccini** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrala (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA UNAERP, em reunião realizada em 23/04/2019.

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

*Profª Drª Luciana Rezende Alves Oliveira*

**Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade de Ribeirão Preto**

Finalidade: ( ) Ensino ( X ) Pesquisa
Vigência da Autorização: a partir de 23/04/2019
Espécie / Linhagem / Raça: Wistar/(Rattus norvegicus)
Nº de Animais: 70
Peso / Idade: 180 a 200g
Sexo: masculino
Origem: Biotério da Unaerp