



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

ARIEL VALENTE BEZERRA

**MODELO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA COM O USO DE MEMBRANA
DE PERICÁRDIO BOVINO: ANÁLISE TOMOGRÁFICA E HISTOLÓGICA EM
CALVÁRIA DE COELHO**

FORTALEZA

2022

ARIEL VALENTE BEZERRA

MODELO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA COM O USO DE MEMBRANA
DE PERICÁRDIO BOVINO: ANÁLISE TOMOGRÁFICA E HISTOLÓGICA EM
CALVÁRIA DE COELHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Regeneração óssea.

Orientador: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B469m Bezerra, Ariel Valente.
Modelo de regeneração óssea guiada com o uso de membrana de pericárdio bovino: análise tomográfica e histológica em calvária de coelho / Ariel Valente Bezerra. – 2022.
73 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

1. Regeneração óssea. 2. Membrana de pericárdio. 3. Calota craniana. 4. Colágeno. 5. Enxerto ósseo. I. Título.

CDD 611

ARIEL VALENTE BEZERRA

MODELO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA COM O USO DE MEMBRANA
DE PERICÁRDIO BOVINO: ANÁLISE TOMOGRÁFICA E HISTOLÓGICA EM
CALVÁRIA DE COELHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Regeneração óssea.

Aprovada em: 25/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata de Carvalho Leitão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Andrea Silvia Walter de Aguiar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Fátima Regina Nunes Sousa
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof. Dr. Abrahão Carvalho Gomes de Souza Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Manoel de Jesus Rodrigues Mello
Unichristus

A Deus, principalmente, por ter agraciado-me com saúde e sabedoria para enfrentar as dificuldades da vida diariamente; por sempre me fortalecer com esperança e perseverança nos objetivos mais difíceis; por nunca deixar nada me faltar nesta vida.

Aos meus pais, Ana Silvia e José Fernando, por terem me guiado nos bons caminhos e por todos os ensinamentos de dignidade, responsabilidade, humildade e respeito ao próximo.

AGRADECIMENTOS

À minha professora e orientadora Renata Ferreira de Carvalho Leitão, sempre dedicada e solícita em ajudar, pelos valiosos ensinamentos e direcionamentos essenciais para esse trabalho e por ter depositado sua confiança em mim, quando me aceitou como aluno e orientando ainda no mestrado e continuou no meu doutorado.

Ao professor Dr. Lúcio Mitsu Kurita, por ter acreditado na primeira pesquisa do grupo com coelhos e ter dado todo o apoio possível na Clínica de Radiologia da Odontologia da UFC.

Ao meu colega e amigo Gildênio Estevam Freire, por ter me ajudado nas cirurgias e tomografias de todos os animais, sendo indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha colega Lara Alves Oliveira, por ter me passado todos os seus ensinamentos sobre o software utilizado na pesquisa, sempre com muita disponibilidade e paciência.

Ao meu colega Dr. Helson Freitas da Silveira, por ter me apoiado com os seus conhecimentos em veterinária e me passado o treinamento devido para a anestesia dos animais.

Ao meu colega Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva, por ter nos ajudado com toda a sua experiência e expertise nos conhecimentos de estatística.

À minha amiga Dra. Conceição da Silva Martins (Josyane), por todo o apoio, carinho e ajuda com a histologia utilizada nesta pesquisa.

À empresa Labcor, na pessoa do senhor Rodrigo, que acreditou na proposta da pesquisa e doou todas as membranas necessárias para realizar os experimentos.

A todos os professores que ministraram disciplinas no Departamento de Morfologia da UFC e passaram o máximo de conhecimentos com excelentes aulas.

Ao Dr. Abraão Carvalho Gomes de Souza Carvalho, à Dra. Fátima Regina Nunes Sousa e ao Dr. Manoel De Jesus Rodrigues Mello que, prontamente, aceitaram o convite para compor esta banca e adicionar conhecimentos a este trabalho.

À Dra. Andrea Silva Walter de Aguiar por ter me orientado, ao final da residência, a iniciar o Mestrado em Ciências Morfofuncionais na UFC e por ter prestado toda a ajuda necessária quando solicitado.

Aos estudantes de iniciação científica, Stephany e Yves, que me ajudaram em vários momentos em que necessitei, não importando o dia da semana.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia da UFC, que, mesmo de forma indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

“No meio de toda dificuldade existe sempre uma oportunidade.” (Albert Einstein).

RESUMO

Contexto: O manejo de defeitos ósseos constitui boa parte da vivência clínica do cirurgião dentista. A regeneração óssea guiada é uma modalidade terapêutica cujo objetivo é promover o aumento ósseo através do uso de barreiras constituídas de diversos materiais. A capacidade de se obter o aumento do rebordo alveolar tem expandido as possibilidades de tratamento em diversas áreas da odontologia. A perda de volume do osso alveolar após a extração dentária é um processo irreversível que afeta a função e a estética do indivíduo. Objetivo: Estabelecer e padronizar um modelo experimental de regeneração óssea guiada em coelhos para a avaliação de biomateriais para enxertia óssea. Metodologia: Foram criados quatro defeitos ósseos padronizados nas calotas cranianas de 18 coelhos, preenchidos com osso autógeno, biomaterial de colágeno, colágeno + estrôncio, e um defeito vazio utilizado como controle negativo, de forma que possibilitassem a avaliação individual. Os defeitos foram igualmente recobertos com uma membrana de pericárdio bovino com processamento L-Hydro. Para melhorar a precisão das tomografias de controle, foi desenvolvido um dispositivo que estabilizasse o posicionamento do coelho durante o exame. As análises volumétricas ósseas foram realizadas através de tomografias computadorizadas nos períodos de 30, 60 e 90 dias e analisadas no software ITK-SNAP ® seguindo a padronização proposta neste estudo. A análise histológica do material foi feita com 90 dias pós-operatório. Resultados: O posicionamento padronizado dos animais foi crucial para a obtenção de medidas uniformes e comparáveis entre os animais. A análise volumétrica do osso neoformado mostrou que ocorreu a redução do volume dos defeitos ósseos em todos os defeitos. Ademais, na comparação com o defeito vazio, observou-se redução significativa em todos os defeitos preenchidos, indicando maior formação óssea nos defeitos preenchidos. Não foram observadas diferenças significativas na neoformação óssea entre os defeitos preenchidos com colágeno ou com colágeno + estrôncio em nenhum tempo avaliado. A análise histológica não detectou nenhum indício de processo inflamatório crônico, tampouco número acentuado de osteoclastos. A membrana de pericárdio bovino estava posicionada entre o osso neoformado e a pele adjacente em todas as análises, comprovando sua eficácia como barreira. Conclusão: O modelo experimental e as técnicas utilizadas para a avaliação do reparo se mostraram adequadas e com potencial de reprodução. A membrana de pericárdio bovino se apresentou como uma

boa opção de barreira para a regeneração óssea guiada, especialmente em defeitos ósseos mais extensos.

Palavras-chave: regeneração óssea; pericárdio; crânio; colágeno; transplante ósseo.

ABSTRACT

Background: The management of bone defects constitutes a good part of the dental surgeon's clinical experience. Guided bone regeneration is a therapeutic modality that aims to promote bone augmentation through the use of barriers that are composed of various materials. The ability to obtain alveolar ridge augmentation has expanded the treatment possibilities in several areas of dentistry. The loss of alveolar bone volume after tooth extraction is an irreversible process that affects both function and aesthetics. **Objective:** To establish and standardize an experimental model of guided bone regeneration in rabbits for the evaluation of biomaterials for bone grafting. **Methodology:** Four standardized bone defects were created in the skulls of 18 rabbits and filled with autogenous bone, collagen biomaterial, strontium-added collagen, and an empty defect used as a negative control, so as to enable individual assessment. The defects were also covered with a bovine pericardial membrane with L-Hydro processing. To improve the accuracy of the control scans, a device was developed to stabilize the positioning of the rabbit during the examination. Bone volumetric analyses were performed using CT scans at 30, 60 and 90 days and analyzed with ITK-SNAP® software following the standardization proposed in this study. Histological analysis of the material was performed at 90 days postoperatively. **Results:** The standardized positioning of the animals was crucial to obtain uniform and comparable measurements between the animals. The volumetric analysis of the newly formed bone showed that there was a reduction in the volume of the bone defects in all defects. Furthermore, in comparison with the empty defect, a significant reduction was observed in all filled defects, indicating greater bone formation in the filled defects. No significant differences in bone formation were observed between defects filled with collagen or collagen + strontium at any time. Histological analysis did not detect any evidence of a chronic inflammatory process, nor an accentuated number of osteoclasts. The bovine pericardial membrane was positioned between the neoformed bone and the adjacent skin in all analyses, proving its efficacy as a barrier. **Conclusion:** The experimental model and the techniques used to evaluate the repair proved to be adequate and with potential for reproduction. The bovine pericardium membrane presented itself as a good barrier option for guided bone regeneration, especially in more extensive bone defects.

Keywords: bone regeneration; pericardium; skull; collagen; bone transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática do princípio da regeneração óssea guiada	22
Figura 2 – Uma ilustração esquemática das cascatas celulares e moleculares durante a regeneração óssea guiada	25
Figura 3 – Corte histológico de valva cardíaca tratada pelo processo de L-Hydro corado com hematoxilina-eosina	30
Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura mostrando a confluência e adesão de células endoteliais na superfície da valva tratada com L-Hydro	30
Figura 5 – Incisão sagital total e descolamento periosteal em coelho	36
Figura 6 – Osteotomias realizadas com broca trefina e enxertos posicionados	37
Figura 7 – – Posicionamento da membrana de pericárdio bovino como barreira	38
Figura 8 -- Dispositivo de posicionamento e estabilização dos animais	37
Figura 9 – Posicionamento pré exame tomográfico	40
Figura 10 – Seleção da ferramenta “snake” do software ITK-SNAP®	41
Figura 11 – Delimitação da segmentação do defeito ósseo	42
Figura 12 – Inversão de cores após modificar o “Thresholding mode”	42
Figura 13 – Marcações realizadas com a ferramenta “Add Bubble at Cursor”	43
Figura 14 – Preenchimento do defeito de forma semiautomática	43
Figura 15 – Fim da segmentação semiautomática e visualização do modelo 3D	44
Figura 16 – Tabela gerada pelo software com o valor do volume em mm ³	44
Figura 17 – Seleção de outra cor com a utilização da ferramenta “Active label”	45
Figura 18 – Marcações realizadas em outro defeito com a cor verde	45
Figura 19 – Tabela gerada pelo software com o valor do volume em mm ³ e volumetria separada por cor	46
Figura 20 – Segmentação realizada em quatro defeitos com diferentes matérias em cada um	46
Figura 21 – Tabela com o valor dos volumes em mm ³ respectivo a cada cor	47

Figura 22 – Suporte desenhado em 3D finalizado para a impressão	49
Figura 23 – Inspeção do processo de cicatrização	50
Figura 24 – Reconstrução em 3D dos defeitos ósseos	51
Figura 25 – Cortes histológicos com coloração de hematoxilina-eosina e pricosirius red com luz polarizada	55
Figura 26 – Cortes histológicos com coloração de hematoxilina-eosina no aumento de 100X (A) e 400X (B)	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise volumétrica da redução dos defeitos ósseos	53
Gráfico 2 – Análise percentual quantitativo de formação óssea entre os dias 30 e 90	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da inspeção de cicatrização	50
Tabela 2 – Análise volumétrica dos defeitos ósseos	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Três dimensões
ANOVA 1-way	Análise de Variância de uma classificação
ANOVA 2-way	Análise de Variância de dupla classificação
Asn	Asparagina
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMP2	Proteína morfogenética óssea tipo 2
CaRs	Receptores sensíveis ao cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	CONCEA
DC	Defeitos críticos
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine (Comunicação de Imagens Digitais em Medicina)
Driller	Contra-ângulo 20:1
EDTA	EDTA (ácido etileno diaminotetracético)
GA	Glutaraldeído
GA-fixadas	Fixadas com glutaraldeído
Gln	Glutamina
Harte	Trefina de 8 mm
HE	Lâminas coradas em HE
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kV	quilovolt
Labcor	Empresa fabricante do pericárdio bovino
L-Hydro	Processamento da membrana de pericárdio bovino
LOCEM	Laboratório de Telecomunicações e Engenharia e Ciência dos Materiais
mA	mili amper
mg/kg	Miligrama/quilograma
mm ³	Milímetros cúbicos
MPB	Membranas de pericárdio bovino
NEMPI	Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem

NIfTI	Formato de dados denominado Neuroimaging Informatics Technology Initiative
NSK	Marca de motores elétricos para cirurgia
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PRP	Plasma rico em plaquetas
PTFE	Politetrafluoretileno
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa-Beta
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-Beta
ROG	Regeneração óssea guiada
rpm	Rotações por minuto
RTG	Regeneração tecidual guiada
SPSS v20.0	Statistical Package for the Social Science. Software para análises estatísticas
U/Kg	Unidade/quilograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Regeneração óssea guiada	18
1.2	Tecido ósseo	19
1.3	Biomateriais para reparo ósseo	21
1.4	Membrana de pericárdio bovino	28
1.5	Modelo de calota craniana	31
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	METODOLOGIA	35
4.1	Amostras	35
4.2	Defeito ósseo em calota craniana	35
4.3	Desenvolvimento de um dispositivo para padronizar o posicionamento dos coelhos durante as tomografias	38
4.4	Parâmetros avaliados	39
4.4.1	<i>Inspeção visual da cicatrização</i>	39
4.4.2	<i>Avaliação da formação óssea por tomografia</i>	40
4.4.3	<i>Padronização da metodologia para a análise volumétrica do osso neoformado</i>	41
4.4.4	<i>Análise histológica</i>	47
4.4.5	<i>Análises estatísticas</i>	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Desenvolvimento de um dispositivo para padronizar o posicionamento dos coelhos durante as tomografias	49
5.2	Inspeção visual da cicatrização	50
5.3	Avaliação da formação óssea por tomografia	50
5.4	Análise histológica	53
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	73
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Regeneração óssea guiada

Regeneração tecidual guiada (RTG) e regeneração óssea guiada (ROG), iniciada posteriormente como ramificação da RTG, são os termos usados no contexto da regeneração de aparelho periodontal perdido ou osso alveolar insuficiente, uma solução clínica comum para defeitos localizados de tecidos rígidos. A ROG tem sido bem documentada como um método de sucesso para reconstruir defeitos ósseos maxilares e mandibulares através da utilização de membranas que atuarão na formação óssea (PATUKALE *et al.*, 2021).

A ROG foi introduzida como uma modalidade terapêutica que objetiva promover o aumento ósseo através do uso de barreiras. Dessa forma, membranas são utilizadas para proteger fisicamente a área do defeito ósseo contra a invasão de tecidos moles circundantes altamente proliferantes (CASTRO E SILVA *et al.*, 2021). Essa abordagem permite, portanto, a regeneração do tecido ósseo a partir do povoamento do defeito por células osteoprogenitoras durante a cicatrização.

Diversos materiais biodegradáveis e não-biodegradáveis têm sido utilizados na confecção das membranas. Independentemente do material, as barreiras devem apresentar necessariamente os seguintes pré-requisitos: biocompatibilidade, semipermeabilidade, capacidade de integrar-se com os tecidos do hospedeiro, manuseio clínico satisfatório e capacidade de manutenção do arcabouço. A primeira geração de membrana como barreira foi constituída pela membrana de politetrafluoretileno (PTFE). Essa barreira era não reabsorvível, portanto, necessitava de um segundo momento cirúrgico para a sua remoção (LIU; KERNS, 2014). A segunda geração de membrana de barreira surgiu com materiais reabsorvíveis e passou a ser utilizada de forma mais ampla e com várias aplicações clínicas (BOTTINO *et al.*, 2012).

Uma grande variedade de membranas de barreira fabricadas com materiais não reabsorvíveis e reabsorvíveis têm sido utilizadas com evidências de sucesso clínico no tratamento de insuficiências ósseas, no entanto, ainda são necessárias buscas de materiais mais eficazes e com melhores custos (FERRONI *et al.*, 2019; PATUKALE *et al.*, 2021).

A possibilidade de se obter aumento do rebordo alveolar por diferentes procedimentos cirúrgicos tem expandido as possibilidades de tratamento com implantes dentários. Entre todos os métodos descritos para esse fim, a ROG é uma das técnicas mais bem documentadas. Para isso, o enxerto ósseo autógeno tem sido o mais utilizado para suportar o colapso das membranas. Todavia, as desvantagens do enxerto autógeno são bem conhecidas, entre elas, a morbidade pós-operatória e o limite de enxerto disponível, o que leva a busca por outras alternativas (LIMA, 2018).

A regeneração dos defeitos é obtida através da utilização de barreiras oclusivas, como membranas biocompatíveis, com a finalidade de impedir a migração do tecido conjuntivo e epitelial para o local cirúrgico, permitindo dessa forma a neoformação óssea. Associado às barreiras, estratégias atuais de engenharia de tecidos incluem um arcabouço de biomaterial no interior do defeito ósseo, contendo estímulos bioquímicos, células-tronco ou uma combinação desses tratamentos, visando acelerar a regeneração do tecido ósseo (DANTAS *et al.*, 2011; SHENG *et al.*, 2019).

1.2 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, multifuncional e ativo, que apresenta estruturas dinâmicas através dos processos de formação, renovação e remodelação (FERRONI *et al.*, 2019; PATUKALE *et al.*, 2021).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode se apresentar como compacto na região mais periférica dos ossos, denominada cortical, e esponjoso ou trabecular, com rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea. As superfícies ósseas internas e externas são revestidas, respectivamente, pelo endóstio e perióstio (XU *et al.*, 2019).

O perióstio constitui membrana de grande importância para a integridade dos ossos. Por sua vez, microscopicamente, pode ser classificado em primário (imaturo), que se apresenta com disposição irregular, não organizada das fibras colágenas e menor quantidade de cristais de hidroxiapatita; e secundário (maduro, haversiano ou lamelar), com fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno dos canais de Havers, formando osso compacto ou esponjoso (MACKIE, 2003).

O tecido ósseo tem algumas funções básicas como suporte, proteção e locomoção e está sob o controle de fatores sistêmicos, como os hormônios, e fatores

locais, como os fatores de crescimento e citocinas. Portanto, os sistemas imunes e esquelético encontram-se intimamente relacionados; a esta área interdisciplinar de estudos deu-se o nome de Osteoimunologia. A homeostase do sistema esquelético está na dependência de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos, células de formação óssea, e osteoclastos, células de reabsorção óssea. Este balanço é firmemente controlado por alguns sistemas regulatórios, como o sistema imune. Se este balanço se inclinar a favor dos osteoclastos, ocorrerá reabsorções patológicas, como nas periodontites, artrites reumatóides e osteoporose (TAKAYANAGI, 2005).

Geralmente, sobre a superfície do tecido ósseo deposita-se uma camada de matriz denominada osteóide, que se caracteriza por uma matriz não mineralizada, contendo grande quantidade de fibras colágenas tipo I, produzidas pelos osteoblastos. Assim, ao microscópio de luz, o osteóide apresenta aspecto amorfo e eosinofílico. Além de ser encontrado em situações fisiológicas, ele também é encontrado nos tumores formadores de tecido ósseo. O tecido ósseo tem dois componentes básicos: células e matriz orgânica, sobre as quais se depositam os componentes inorgânicos (DALAPRIA, 2020).

O osso apresenta processo contínuo de renovação e remodelação, consequência da ação dos osteoblastos e osteoclasto. Dessa forma, a remodelação ocorre por meio da deposição continuada de matriz óssea pelos osteoblastos e da reabsorção pelos osteoclastos. A deposição e a reabsorção devem estar em equilíbrio para que a homeostasia do tecido não seja comprometida. O comprometimento nesse equilíbrio resulta no desenvolvimento de anormalidades ósseas, como a osteoporose (XU *et al.*, 2019).

A remodelação óssea depende de diversos fatores, tais como idade, vascularização, estrutura óssea, entre outros (ZAKARIA, 2021), e é regulada por vários sistemas, como o fator de necrose tumoral e os receptores kappa B (RANK/RANKL/OPG), que desempenha um papel-chave na sinalização da osteoclastogênese. O RANK é uma proteína transmembrana, membro da família dos receptores do TNF, expresso principalmente por macrófagos, células pré-osteoclásticas, linfócitos T e B, células dendríticas e fibroblastos (WITTKOWSKE *et al.* 2016). A expressão de RANKL pode ocorrer em diversas células: osteoblastos e seus precursores, linfócitos T e B e megacariócitos. A ligação do RANKL ao RANK, na superfície dos osteoclastos, produz efeitos biológicos como fusão, ativação,

diferenciação e sobrevivência destes clastos. A osteoprotegerina (OPG), por sua vez, atua como um competidor de alta afinidade pela ligação com RANK e, dessa forma, previne a ligação do RANKL com o RANK, atuando como um inibidor efetivo da osteoclastogênese, resultando na inibição da reabsorção óssea e, como consequência, no aumento da área, resistência e densidade óssea (CAETANO-LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2007; SIMONET *et al.*, 1997; TROUVIN; GOËB, 2010).

1.3 Biomateriais para reparo ósseo

Segundo a Sociedade Europeia de Biomateriais, os biomateriais são descritos como: “Qualquer substância, excluindo fármacos ou combinação de substâncias sintética ou natural, que pode ser usada em qualquer período, como tratamento total ou parcial, aumento ou reposição de qualquer tecido, ou órgão ou função do corpo”. A Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa têm contribuído de forma relevante para o desenvolvimento de materiais que promovem o reparo e a regeneração das estruturas teciduais perdidas, com maior previsibilidade, de maneira rápida e menos invasiva em relação às técnicas usadas previamente (CARVALHO; BASSI; PEREIRA, 2004). Na odontologia, especificamente nas áreas da periodontia, implantodontia e cirurgia bucomaxilofacial são as que mais utilizam biomateriais para regeneração óssea guiada.

Nesse caso, o biomaterial ideal deve ser capaz de induzir o processo de regeneração ou remodelação para substituir, reparar, manter ou melhorar a função biológica do tecido envolvido. Esses materiais são desenvolvidos a partir de polímeros sintéticos ou naturais e podem ser combinados com componentes minerais ou não (DEUEL, 1997). Dependendo do objetivo específico, um biomaterial pode exercer a função de inibição ou estimulação de células teciduais. Esses fatores são controlados pela morfologia macro e microscópica do material, umedecimento, mobilidade, composição química e propriedades físico-químicas (HUNT; MCLAUGHIN; FLANAGAN, 1997; KOTWAL; SCHMIDT, 2001; LANGER; VACANTI, 1993; WIESMANN *et al.*, 2001).

Idealmente, os biomateriais indicados para procedimentos de reconstrução óssea devem ter pelo menos uma das três características para exercer a função regenerativa: osteogênese, osteoindução e osteocondução. Os osteogênicos são capazes de estimular a formação de osso diretamente a partir de osteoblastos. Os

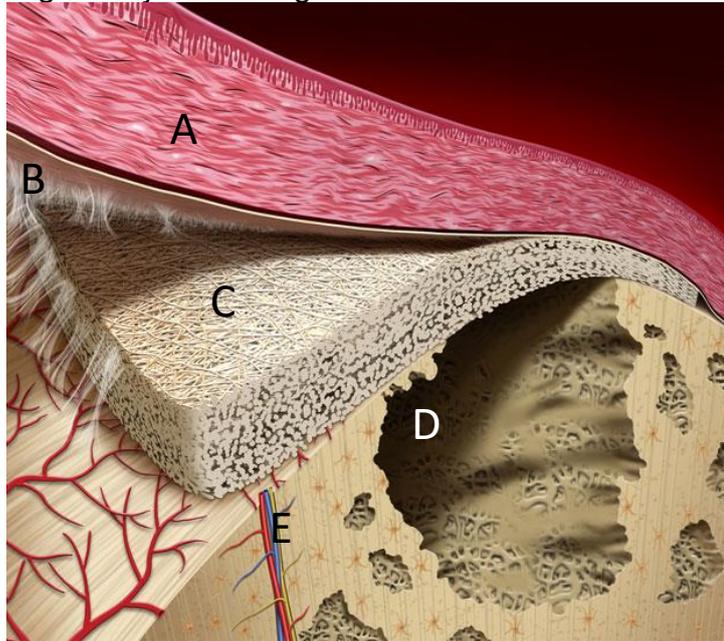
osteoindutores são aqueles capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando a formação óssea no local ou estimulando a formação de osso em um sítio heterotópico. Os materiais osteocondutores permitem a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (GARG, 2004; KRICHELDORF, 2009).

Os enxertos ósseos estão, inúmeras vezes, associados às técnicas de ROG, especialmente quando se almeja um bom aumento de volume ósseo e nos casos de risco de colapso das membranas, resultando na diminuição de espaço a ser regenerado. Os diferentes tipos podem ser classificados em autógenos, alógenos, xenógenos, aloplásticos e mistos, apresentando características distintas quanto à promoção óssea, quantidade disponível e tempo de substituição por novo tecido (LIMA, 2018).

Nas inúmeras ocasiões em que ocorre a perda óssea, a utilização de arcabouços ósseos biodegradáveis está muito bem indicada e é de grande importância, pois os biomateriais utilizados nesses casos servem como suportes temporários ou definitivos que estimulam a regeneração óssea, podendo sofrer reabsorção e substituição gradual. Um fator muito importante para que não ocorra a exacerbação do processo inflamatório e não interfira no processo de cicatrização é a biocompatibilidade, pois permite o funcionamento dos processos biológicos do tecido em reparação (LASCHKE *et al.*, 2006).

O princípio fundamental da regeneração óssea guiada é a utilização de membrana de recobrimento para evitar que os tecidos não osteogênicos interfiram no processo de cicatrização óssea (Figura 1).

Figura 1 – Ilustração esquemática do princípio da regeneração óssea guiada



Fonte: Adaptado de Elgali *et al.* (2017).

Legenda: A letra A representa o tecido conjuntivo que recobre todo o complexo da ROG. A letra B representa o periósteo do tecido ósseo remanescente. A letra C ilustra a membrana de colágeno recobrindo o defeito ósseo. A letra D define o defeito ósseo vazio e a letra E representa o tecido ósseo.

Uma série de membranas estão disponíveis para a utilização experimental e clínica, polímeros sintéticos, polímeros naturais, metais e compostos inorgânicos. Esses biomateriais possuem propriedades que podem ser passíveis de modificações. Para a ROG, as membranas podem ser reabsorvíveis ou não reabsorvíveis e necessitam ter propriedades como biocompatibilidade, oclusão celular, integração com os tecidos do hospedeiro, capacidade de gerenciamento clínico, capacidade de criação de espaço e propriedades físicas e mecânicas adequadas. Atualmente, essas membranas são utilizadas em conjunto com biomateriais de preenchimento ósseo e a sua escolha depende muito do tamanho e do tipo de defeito ósseo existente (ELGALI *et al.*, 2017).

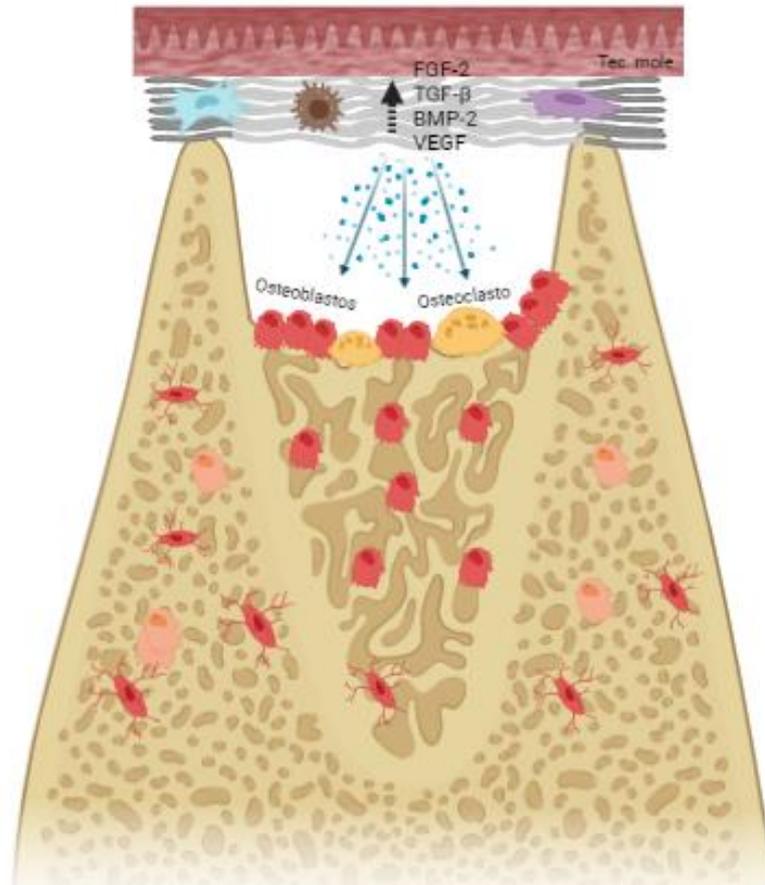
As membranas mais utilizadas atualmente para os procedimentos de ROG são as de colágeno, consideradas como polímeros naturais. Esse tipo de biomaterial possui várias características importantes que o fazem ser bastante indicado na ROG, em virtude do colágeno ser o principal componente dos tecidos conjuntivos e ter papéis importantes em relação ao suporte estrutural, além de ser um componente importante na comunicação célula-matriz. As membranas possuem a desvantagem

de não ter rigidez. Sua indicação deve estar atrelada a procedimentos de reconstrução de defeitos ósseos alveolares, como deiscência óssea e fenestração, que não requerem fixação e estabilidade extras. Alguns estudos sugerem que a membrana de colágeno auxilia e melhora a cicatrização de feridas e regeneração óssea (ELGALI *et al.*, 2017).

As membranas de colágenos podem ser derivadas de diferentes fontes teciduais (tendão, intestino delgado, derme e outros) e animais (bovina e suína) e sua degradação vai depender da sua origem (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). A degradação do colágeno acontece de forma bem mais rápida do que o processo de cicatrização óssea. Por isso, a fim de retardar a sua biodegradação, esses biomateriais podem passar por diferentes processos físico-químicos de reticulação, (JORGE-HERRERO *et al.*, 1999; ROTHAMEL *et al.*, 2005;) tais como, radiação ultravioleta e tratamento químico com glutaraldeído ou genipina. Embora o tratamento de reticulação química seja favorável para a melhoria das características físicas do biomaterial, alguns estudos relatam a presença de resíduos químicos que induzem o processo inflamatório local. Dessa forma, os processos de descélularização, esterilização e método de reticulação interferem diretamente na previsibilidade de membrana, independentemente de sua origem (SAM; PILLAI, 2014; SPEER *et al.*, 1980; TAL *et al.*, 2012).

As membranas de colágeno apresentam propriedades bioativas que favorecem a regeneração óssea e cicatrização do defeito a partir do recrutamento e ativação de células hospedeiras locais, como ilustra a figura 2 (ELGALI *et al.*, 2017).

Figura 2 – Uma ilustração esquemática das cascatas celulares e moleculares durante a regeneração óssea guiada



Fonte: autoria própria (2022)

Legenda: O defeito ósseo é coberto com membrana de colágeno suíno. As cascatas celulares e moleculares incluem: migração de diferentes células (por exemplo, monócitos/macrófagos) do tecido circundante para a membrana. As células que migraram para a membrana expressam e secretam fatores essenciais para a formação óssea.

O colágeno, além de ser um constituinte estrutural dos tecidos vivos, apresentando, portanto, baixíssima antigenicidade, é um biopolímero de fácil obtenção através da hidrólise de tecidos animais (LEE; SINGLA; LEE, 2001). A hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias do tropocolágeno distribui as cargas iônicas negativas, melhorando as propriedades dielétricas e conferindo às moléculas maior carga negativa em pH fisiológico, sem gerar grandes mudanças estruturais em sua cadeia polimérica (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; GÓES *et al.*, 2002). Estas características conferem ao colágeno aniônico a capacidade de polarizar-se e

gerar mínimos fluxos de carga elétrica ao longo de sua estrutura quando submetidas a mínimas deformações estruturais, melhorando uma propriedade física conhecida por piezoelectricidade (CHAUDRY *et al.*, 1997). A biocompatibilidade e a capacidade de induzir a neoformação óssea do colágeno aniônico já foram documentadas em estudos *in vitro* e *in vivo*, além da sua capacidade de biodegradação natural sem provocar reações inflamatórias além da resolução natural de um ferimento (BUCHAIM *et al.*, 2007; MIGUEL *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2004).

As diversas vantagens dos biomateriais nas reabilitações ortopédicas e maxilofaciais têm demandado, consideravelmente, o desenvolvimento e o aperfeiçoamento desses biomateriais. Os biomateriais para enxertia óssea podem ser definidos como todo material de origem humana, animal, vegetal ou sintético, destinado à implantação no homem com a perspectiva de uma reconstituição do capital ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda de substância óssea de origem traumática ou ortopédica (GUTIERRES *et al.*, 2006; MAINARD, 2001).

Relatos de procedimentos de enxertia óssea já existem há bastante tempo. Na civilização antiga, em esqueletos de povos egípcios e astecas, foram encontrados indícios de enxertos ósseos bem sucedidos (HERNIGOU, 2014). A primeira descrição científica de um procedimento de enxertia foi realizada por Jacob Van Meekeren em 1668. Esse procedimento bem-sucedido se tratou de um xenoenxerto de calota craniana de um cão para o crânio de um humano (OLDER, 1992). Em 1863, Wiliam MacEwen realizou o primeiro enxerto alógeno humano, documentado em 1879 (HERNIGOU, 2015). Em 1919, os enxertos ósseos já se firmavam como um procedimento bem conhecido, com relatos de 1.600 cirurgias de enxertia bem sucedidas (MEEDER; EGGERS, 1994).

Reforçando o que foi mencionado anteriormente, um biomaterial para enxertia óssea deve ter, idealmente, todas as propriedades fisiológicas do osso autógeno. O biomaterial deve ser, portanto, biocompatível, bioabsorvível, osteocondutor e osteoindutor. Ele deve apresentar ainda estrutura semelhante ao osso, ser de fácil manuseio, seguro e financeiramente viável (SCHMIDT, 2021).

Os enxertos podem ser classificados, segundo a sua origem, em autógeno, alógeno, xenógeno e aloplástico. Os enxertos autógenos utilizados na odontologia são removidos do próprio indivíduo, de diversas áreas, como ramo mandibular, mento, crista ilíaca, dentre outras. Eles possuem a vantagem de, durante o processo de

reparo, atuar como um material osteogênico por ter células viáveis, osteoindutor por liberar e promover a migração celular e angiogênese, além da diferenciação de células osteogênicas em osteoblastos e osteocondutor por servir como sítio para que novas células iniciem o processo de produção de matriz óssea. Apesar de apresentar, de forma exclusiva, a propriedade de osteoindução, apresenta a grande desvantagem da necessidade de ter uma área doadora aumentando a morbidade do procedimento. Os enxertos alógenos, por sua vez, são originados de um outro indivíduo da mesma espécie. No caso dos enxertos ósseos, são processados e armazenados em banco de ossos. Esses materiais atuam como osteocondutores, pois atuam como arcabouço para a produção e deposição de nova matriz a partir de células migratórias e diferenciadas no local. Alguns desafios dos aloenxertos são que o histórico médico do doador deve ser livre de infecções, cânceres e outros problemas para a segurança do receptor. Os enxertos xenógenos têm a origem de outras espécies, como a bovina, a suína e a equina. Esses materiais também passam por processos de desproteíntização para a remoção de todos os componentes orgânicos e, dessa forma, neutralizar a reação imune e a transmissão de patógenos. A matriz mineral vai atuar como andaime para o crescimento ósseo nativo e podem ser utilizadas em combinação com outros tipos de enxerto e fatores de crescimento. Os enxertos aloplásticos não tem origem animal, são totalmente sintéticos e fabricados a partir de fontes não orgânicas. Biovidros, sulfato de cálcio e fosfato de cálcio são exemplos de cerâmicas e materiais aloplásticos utilizados como enxertos. Esses materiais são basicamente osteocondutores, pois o tecido osteóide é produzido diretamente na superfície cerâmica pelo osso nativo e posteriormente sofre remodelação. O tempo de reabsorção desse material está diretamente ligado ao tamanho de suas partículas (CHAVDA; LEVIN, 2018), podendo, dessa forma, ser controlado.

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) são exemplos de osteoindutores, pois estimulam o recrutamento e a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos a partir da ligação com receptores celular e ativação de genes essenciais para o processo de osteogênese (ZHU *et al.*, 2022). Atualmente, existem dois osteoindutores para uso aprovados pela Federal Drug Administration (FDA), as BMP recombinantes 2 e 7 (GILLMAN; JAYASURIYA, 2021).

O ranelato de estrôncio tem sido utilizado em mulheres desde o início do ano 2000, aproximadamente, pós-menopausa para tratar ou prevenir a osteoporose (MEUNIER *et al.*, 2004; QUERIDO; ROSSI; FARINA, 2016). Diferente de outros

fármacos utilizados na clínica, o ranelato de estrôncio tem duplo papel na remodelação óssea, estimulando a formação óssea e inibindo a sua reabsorção (NARDONE; D'ASTA; BRANDI, 2014).

Além de desempenhar um papel importante na melhoria da força óssea, a presença do estrôncio na matriz óssea promove formação do tecido ósseo e diminuição da reabsorção da matriz mineralizada, com a participação de mecanismos relacionados aos receptores sensíveis ao cálcio (CaR) presentes em osteoblasto e osteoclastos, um importante receptor acoplado à proteína G ativado por cátions divalentes, como o cálcio e o estrôncio. O CaR é expresso em todos os tecidos relacionados à manutenção da homeostase do cálcio (paratireoide, células C tireoidianas, rins e ossos) (SAIDAK; MARIE, 2012).

Mesmo diante de tantos processos de evolução e testes de vários biomateriais para enxertia óssea, o enxerto ósseo autólogo continua sendo o padrão ouro para o tratamento de defeitos ósseos. No entanto, as comorbidades relacionadas à área doadora motivam a comunidade científica e a indústria a investigarem novos materiais para a enxertia óssea (SCHMIDT, 2021).

1.4 Membrana de pericárdio bovino

As membranas biológicas vêm sendo pesquisadas com o objetivo de avaliar sua eficiência e ausência de efeitos indesejáveis, como rejeição e resposta inflamatória exacerbada na reparação de alterações anatômicas congênitas ou adquiridas. Dentre as membranas biológicas utilizadas, o pericárdio bovino é utilizado devido a algumas características desejáveis, como baixo custo e um nível insignificante de complicações (MARQUES *et al*, 2015).

O pericárdio bovino é uma das fontes que, há três décadas, é utilizado na confecção de biomateriais (FERRONI *et al.*, 2019). As membranas de pericárdio bovino (MPB) são, atualmente, empregadas nos mais variados procedimentos cirúrgicos cardiovasculares em cardiopatias congênitas e adquiridas, como ampliações dos vasos da base, cavidades atriais e ventriculares, fechamento de comunicações intracavitárias em nível atrial ou ventricular, reforço de suturas, plastias valvares e arteriais, dentre outros (SHENG *et al.*, 2019).

O pericárdio bovino é utilizado com sucesso em reconstruções vasculares nos casos de infecções penetrantes da aorta, pois possui uma certa resistência aos

processos infecciosos. Dessa forma, ele está disponível para ser utilizado em grandes correções vasculares (SHENNIB; BARIBAULT; HEUSER, 2021).

A BPM é descrita como um material que apresenta alta resistência, custo baixo e que é associado ainda à aderência e proliferação de células do tecido adjacente e mesenquimais (FERRONI *et al.*, 2019; PIZZICANNELLA *et al.*, 2019).

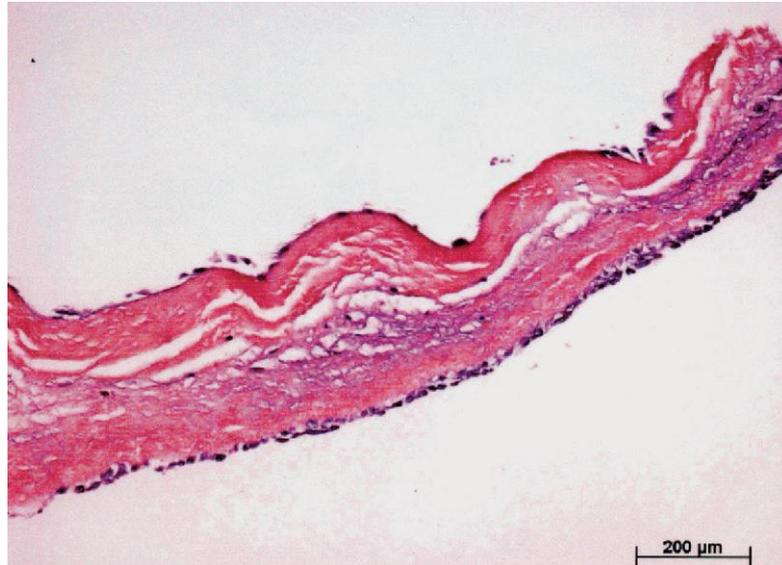
Esse biomaterial apresenta um maior grau de reticulação, o que resulta em lenta degradação, podendo ser uma vantagem para o reparo de defeitos ósseos críticos (PIZZICANNELLA *et al.*, 2019). De fato, estudos demonstraram que a descelularização dos tecidos utilizados como biomateriais, bem como a sua fixação com glutaraldeído (GA), são essenciais para reduzir o potencial de antigenicidade e sua durabilidade, características associadas à capacidade de recelularização do biomaterial por células hospedeiras (BENGTSSON; RADEGRAN; HAEGERSTRAND, 1993; ELKINS *et al.*, 2001; SODIAN *et al.*, 2000; ZAVAZAVA *et al.*, 1995).

Um estudo com próteses valvulares suínas, realizado por Nina e colaboradores em 2005, comparou os biomateriais preservados com GA com os não preservados com GA. A calcificação foi mais evidente nas valvas GA-fixadas, causando redução da mobilidade dos folhetos e, conseqüentemente, aumento da pressão média da artéria pulmonar e da pressão de oclusão da artéria pulmonar, promovendo a trombogenicidade. Já a prótese não tratada com GA se mostrou mais resistente à trombose, à calcificação, à inflamação e ao desgaste mecânico. A prótese não fixada com GA foi tratada pelo processo L-Hydro (Labcor/Filogênese, Belo Horizonte, MG, Brasil) (NINA *et al.*, 2005).

O processo de síntese da membrana de pericárdio bovino L-Hydro consiste em três fases distintas: extração de substâncias, adição de substâncias e esterilização. Na primeira fase, ocorre a extração leve de substâncias antigênicas. Esse processo é combinado com o mascaramento de antígenos que não foram totalmente removidos utilizando o polietilenoglicol, sob oxidação química controlada e condições físicas específicas que protegem estruturas extracelulares, como colágeno e elastina. Na segunda fase, ocorre a adição e incorporação de duas substâncias, uma antiinflamatória não esteroideal com semelhança à aspirina e um agente antitrombótico semelhante à heparina. Na terceira fase, o tecido é esterilizado com peróxido de hidrogênio (NINA *et al.*, 2005). Esses procedimentos permitem que células endoteliais povoem a camada de colágeno externa do biomaterial e ainda induzem a incorporação de fibroblastos no seu interior. Essas células, por sua vez, continuam a

secretar matriz extracelular no interior da membrana, conforme ilustram as figuras 3 e 4 (NINA *et al.*, 2005).

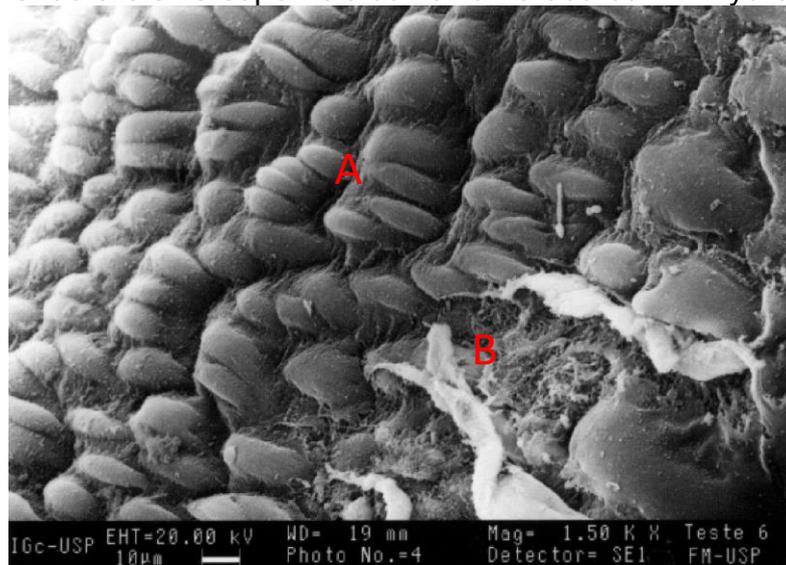
Figura 3 – Corte histológico de valva cardíaca tratada pelo processo de L-Hydro corado com hematoxilina-eosina



Fonte: Nina *et al.* (2005).

Legenda: Pode se verificar a presença de células endoteliais na superfície e a incorporação de fibroblastos no interior do material.

Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura mostrando a confluência e adesão de células endoteliais na superfície da valva tratada com L-Hydro



Fonte: Nina *et al.* (2005).

Legenda: A letra A mostra a presença e confluência de células endoteliais aderidas na superfície da valva e a B evidencia a superfície valvar.

1.5 Modelo de calota craniana

Modelos animais são particularmente úteis para estudar a cicatrização óssea em um ambiente controlado. Defeitos ósseos criados em calvárias têm sido usados em diversos estudos para avaliação de regeneração óssea guiada, principalmente pelos seguintes motivos: a estrutura óssea da calvária permite o estabelecimento de um defeito uniforme, reprodutível e padronizado, facilmente avaliado por análise radiográfica e histológica; a localização anatômica reflete um tamanho adequado para acesso cirúrgico e manuseio intraoperatório; a dura-máter e a pele sobreposta formam um suporte adequado para os materiais implantados, sem necessidade de fixação interna ou externa; e o modelo tem sido amplamente utilizado e estudado, permitindo uma comparação precisa das substâncias enxertadas. Esse modelo foi estabelecido em uma ampla gama de espécies animais, incluindo camundongos, ratos, coelhos, cães e ovelhas (STAVROPOULOS *et al.*, 2015; XU, *et al.*, 2019; ZAKARIA, 2021).

Esses defeitos são considerados críticos, uma vez que não se regeneram espontaneamente durante a vida do animal. Os tamanhos dos defeitos críticos (DC) variam conforme as espécies utilizadas no experimento (STAVROPOULOS *et al.*, 2015).

O tamanho do defeito ósseo é o fator primordial para se alcançar a fibrose tecidual e não a cicatrização óssea. Esse defeito vai ser considerado crítico segundo o seu diâmetro, variável dependendo da espécie selecionada, sendo de 8 mm para ratos, 15 mm para coelhos e 20 mm para cães (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Vale ressaltar que mesmo defeitos menores que essas medidas podem ser considerados defeitos críticos, desde que o período de tempo avaliado seja inferior ao período necessário para a completa regeneração óssea. Em outras palavras, o ajuste do tamanho do defeito em função do tempo de cicatrização pode ser uma estratégia interessante para viabilizar a realização de mais de um defeito ósseo em cada animal, o que reduz o número de animais, além de possibilitar a avaliação da resposta individual do animal a diferentes biomateriais (STAVROPOULOS *et al.*, 2015).

A utilização de coelhos tem como vantagem permitir a confecção de quatro defeitos críticos por animal, ajustando a dimensão do defeito ao tempo de avaliação. Ademais, a neoformação óssea em coelho, ao contrário de rato e camundongo, pode ser acompanhada por tomografias computadorizadas por se tratar de um animal de maior porte, possibilitando a redução do número de animais utilizados. No entanto, a

realização de tomografia em coelhos é um desafio, considerando a necessidade do posicionamento adequado do animal no tomógrafo e a padronização da tomada tomográfica entre os animais a fim de evitar qualquer viés nos resultados obtidos. Ademais, a literatura carece de protocolos para a quantificação do osso neoformado nessa espécie (ARONI *et al.*, 2020).

O presente estudo, portanto, buscou estabelecer e padronizar o modelo de calota craniana em coelhos, incluindo o desenvolvimento de um dispositivo para o posicionamento dos animais e a determinação da metodologia para a quantificação volumétrica do osso neoformado. Para validar o modelo, avaliou-se o efeito de um arcabouço tridimensional de colágeno aniônico associado ao estrôncio na regeneração óssea, comparando ao enxerto autólogo, padrão ouro já consolidado na literatura. Ademais, avaliou-se o potencial de uma membrana obtida a partir de pericárdio bovino, desenvolvida e já utilizada em cirurgias cardiovasculares como barreira em regeneração óssea guiada.

Esse estudo parte de uma continuação de resultados promissores obtidos em pesquisas anteriores do grupo com a utilização de membrana de colágeno polianiônico *in vivo* (VASCONCELOS, 2014) e estudos *in vitro* com o ranelato de estrôncio (BEZERRA, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

O presente estudo contribui substancialmente com a geração de conhecimento científico de qualidade em um tema de relevância para a Saúde Pública do nosso país, considerando que cerca de 14 milhões de brasileiros não têm nenhum dente. Esses são dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2020. A relação entre perda dentária e perda óssea está bem estabelecida na literatura. Estudos pré-clínicos e clínicos demonstram que a perda de volume do rebordo alveolar (osso de ancoragem dos dentes) após a extração é um processo irreversível que envolve tanto a redução óssea horizontal quanto a vertical, afetando o indivíduo esteticamente e funcionalmente (ARAÚJO; LINDHE, 2009). A busca por biomateriais que auxiliem na condução e neoformação óssea no processo de reparo, visando a recuperação do volume ósseo perdido e, conseqüentemente, à reabilitação com implantes osseointegrados, restabelecendo a função mastigatória e a autoestima, é crucial.

Vários arcabouços estão disponíveis comercialmente, no entanto, o alto custo limita o acesso a esses produtos por parte da maioria da população brasileira. O presente trabalho, ao padronizar um modelo experimental de reparo ósseo, contribui para a viabilização de pesquisas em busca de biomateriais inovadores e de menor custo para o reparo ósseo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Criar e padronizar um modelo experimental de regeneração óssea guiada em coelhos para a avaliação de biomateriais para enxertia óssea.

3.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver um dispositivo para padronizar o posicionamento dos coelhos durante as tomografias para a investigação da neoformação óssea;
2. Padronizar a metodologia para a análise volumétrica do osso neoformado em coelhos através de tomografia computadorizada.
3. Caracterizar e avaliar a resposta biológica e regenerativa de um arcabouço tridimensional em forma de esponja, elaborado de colágeno aniônico obtido a partir da serosa de intestino bovino associado ao estrôncio na regeneração óssea;
4. Investigar o potencial de uma membrana de pericárdio bovino como uma barreira oclusiva para evitar a invasão de células não osteogênicas na área dos defeitos ósseos.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras

Foram utilizados 18 coelhos brancos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso entre 2,9 e 3,5 kg e idade entre seis e sete meses.

Os animais foram mantidos no coelhário do Departamento de Zootecnia da UFC, alojados em gaiolas de arame galvanizado com zinco, medindo 50 cm de altura x 50 cm de largura x 50 cm de comprimento, mantido apenas um único animal por unidade. Os animais foram alimentados com o mesmo tipo de ração comercial balanceada para coelhos. Eles receberam água e ração “ad libitum”. Os animais permaneceram em ambiente arejado e temperatura ambiente de 28°C com iluminação adequada aos ciclos de dia e noite.

Os procedimentos cirúrgicos e o protocolo de tratamento foram conduzidos conforme o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, de acordo com o protocolo de número 101/17 (Anexo A).

4.2 Defeito ósseo em calota craniana

Os animais foram submetidos à anestesia geral, utilizando 25 mg/kg de quetamina (Cetamin®) e 5 mg/kg de xilazina (Xilazin®) intramuscular. Antes de iniciar o procedimento cirúrgico, foi utilizado uma dose profilática de penicilina G (Pro-Pen-G®) na dosagem de 75.000 U/Kg. Também foi administrado o anti-inflamatório não esteroide (AINE) Cetoprofeno (Kenovet®) de 24/24 horas durante três dias na dosagem de 3 mg/kg. Todas as medicações foram aplicadas por via intramuscular (BRASIL, 2013).

Após a anestesia, os coelhos foram acomodados em posição ventral. A região fronto-parietal foi tricotomizada e realizada a antissepsia com iodo-povidine. Realizou-se infiltração local com 01 ml de lidocaína 2% com adrenalina 1:100.000. Após a anestesia e tricotomia da região fronto-parietal, foi realizada incisão sagital de aproximadamente 20 mm sobre a sutura interparietal, no plano sagital entre o osso frontal e o occipital, com lâmina de bisturi número 15, seguida de deslocamento e rebatimento dos tecidos, utilizando um descolador de molt contendo epiderme e periósteo até a exposição dos ossos parietais (Figura 5).

Figura 5 – Incisão sagital total e descolamento periosteal em coelho



Fonte: Autoria própria.

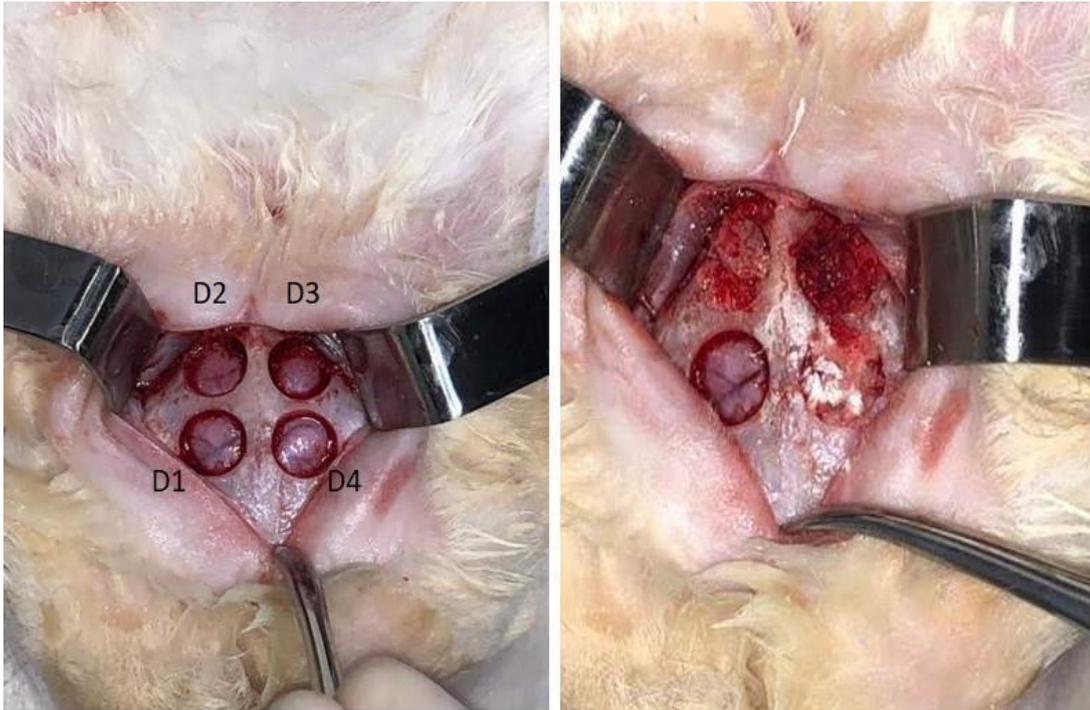
Legenda: Incisão sagital total e deslocamento periosteal. Visualização da sutura sagital (A) e coronal (B).

Com o auxílio de uma broca trefina de 8 mm (Harte) de diâmetro para baixa rotação (800 rpm), um motor Surgic-XT-Plus® (NSK) e um contra-ângulo 20:1 (Driller) foram realizados quatro defeitos parietais bilaterais, sendo dois defeitos em cada lado da calota craniana, em espessura total, sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9%. Os segmentos ósseos foram então delicadamente removidos com cureta de Lucas, mantendo-se a integridade da dura-matér e encéfalo (Figura 6). Foi utilizado um aspirador com coletor de osso para que o aspirado de osso triturado a partir das osteotomias com a broca trefina fosse utilizado para o preenchimento de “gaps” no defeito ósseo preenchido com autógeno.

Os quatro defeitos ósseos foram padronizados, de forma que os dois defeitos do lado direito do animal foram utilizados como grupos-controle: o defeito anterior direito foi considerado o controle negativo (defeito vazio) e o posterior direito, o controle positivo (defeito autógeno), proveniente da calota craniana de cada animal, posicionado imediatamente após a coleta. Os defeitos ósseos de 8 mm realizados são classificados como não críticos de acordo com a espécie utilizada na pesquisa. Os outros dois defeitos do lado esquerdo foram preenchidos com esponja de colágeno (posterior esquerdo) e esponja de colágeno + estrôncio (anterior esquerdo), respectivamente, desenvolvido em colaboração com o Laboratório de

Telecomunicações e Engenharia e Ciência dos Materiais (LOCEM), pertencente ao Departamento de Física da UFC. Realizado as devidas enxertias, todos os defeitos foram recobertos com uma única membrana de pericárdio bovino, Vivendi® - LABCOR (Figura 7).

Figura 6 – Osteotomias realizadas com broca trefina e enxertos posicionados



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Defeitos ósseos realizados com broca trefina de oito milímetros de diâmetro (esquerda). Defeitos ósseos após as enxertias (direita). D1: defeito vazio (controle negativo); D2: defeito autógeno (controle positivo); D3: defeito colágeno; D4: defeito colágeno + estrôncio.

Figura 7 – Posicionamento da membrana de pericárdio bovino como barreira



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Defeitos ósseos enxertados recobertos com membrana de pericárdio bovino (esquerda). Membrana Vivendi® - LABCOR antes da utilização (direita).

Não foram utilizados meios de fixação para os enxertos ósseos, já que estes apresentam estabilidade nas cavidades ósseas e são protegidos e mantidos em posição pela reposição dos tecidos moles. O retalho foi suturado através de ponto contínuo com fio reabsorvível de ácido poliglicólico 4-0 (Vycril®).

4.3 Desenvolvimento de um dispositivo para padronizar o posicionamento dos coelhos durante as tomografias

A utilização de um tomógrafo odontológico para a mensuração da formação óssea gerou a necessidade de construção de um suporte para os animais durante o exame, uma vez que o posicionamento padronizado dos animais é crucial para a obtenção de medidas uniformes e comparáveis entre os animais. Ademais, o dispositivo permite a imobilização do animal, impedindo sua movimentação durante a realização do exame, além de reduzir o desconforto dos animais, o índice de erros e a necessidade de novas varreduras.

O dispositivo foi planejado e construído respeitando o tamanho e o peso dos animais, a altura do tomógrafo utilizado e o seu raio de giro. Utilizou-se o ferro como

o material principal para a base e a coluna, fabricada com possibilidade de ajustes de altura pensando em pesquisas futuras, utilizando diferentes aparelhos e espécies animais. A base foi construída sobre quatro rodas de silicone com o objetivo de facilitar o transporte e o posicionamento do dispositivo durante o exame.

O suporte de apoio para os animais foi construído em acrílico e madeira para não gerar artefatos nas imagens tomográficas, como mostra a figura abaixo (figura 8). Esse suporte foi fixado na base de metal com parafusos, seguindo uma inclinação de 15° em relação à haste de metal. A inclinação foi planejada para a adaptação exata do tomógrafo utilizado de forma a evitar a colisão com o tomógrafo durante o giro da máquina.

Figura 8 – Dispositivo de posicionamento e estabilização dos animais.



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Suporte confeccionado em ferro e acrílico personalizado para a pesquisa com o objetivo de apoiar e estabilizar os coelhos durante a realização das tomografias computadorizadas.

4.4 Parâmetros avaliados

4.4.1 Inspeção visual da cicatrização

Os animais foram acompanhados diariamente por sete dias após a cirurgia para a obtenção de dados clínicos, como deiscência de sutura, infecção, edema exacerbado e hematoma.

O crescimento de pelos foi avaliado no sétimo, 15º e 30º dia pós-operatório como um dos parâmetros relacionados à ausência de inflamação. A inspeção da cicatrização se estendeu até 60 dias, mantendo-se a frequência de três vezes por semana após a primeira semana pós-cirurgia, com o objetivo de diagnosticar uma possível infecção tardia.

4.4.2 Avaliação da formação óssea por tomografia

Nos períodos de 30, 60 e 90 dias, os animais foram submetidos aos exames tomográficos sob anestesia geral.

As tomografias computadorizadas foram obtidas no tomógrafo KODAK 9000 (Extraoral Imaging System) seguindo o protocolo de 68 kV, 6.3 mA, 10.8 segundos e cortes de 0,5 milímetros. Os arquivos foram salvos no formato DICOM.

Após anestesiados com 25 mg/kg de Ketamina e 5 mg/kg de Xylazina intramuscular, os coelhos foram posicionados no suporte de acrílico e estabilizados com dois velcros na região torácica (Figura 9).

Figura 9 – Posicionamento pré exame tomográfico



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Vista lateral do animal posicionado e estabilizado (esquerda). Vista frontal do animal posicionado e estabilizado.

4.4.3 Padronização da metodologia para a análise volumétrica do osso neoformado

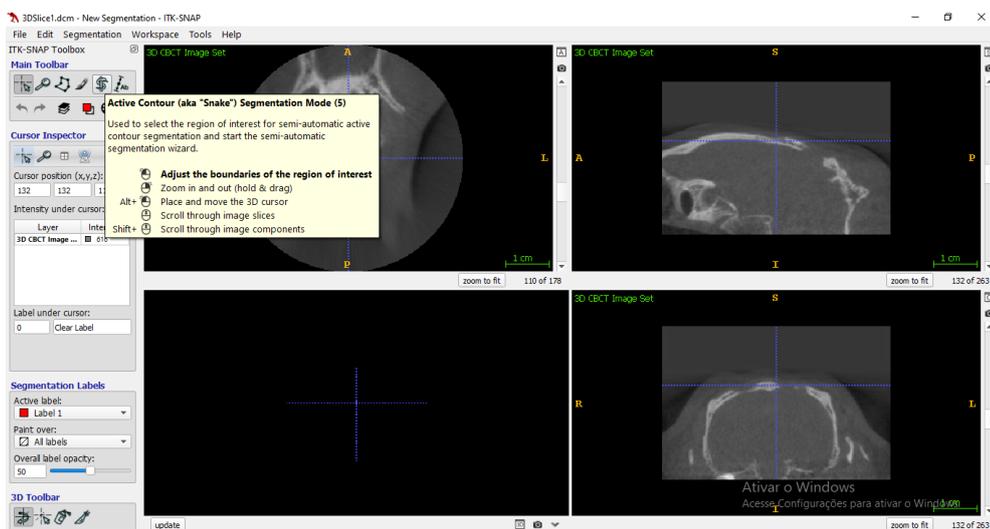
As análises volumétricas quantitativas foram realizadas utilizando o software ITK-SNAP ® a partir da adaptação do estudo em humanos de RITTO *et al.* (2019), que utilizou o software ITK-SNAP ® (versão 3.0) para avaliar o volume e a consolidação óssea no uso L-PRF na melhora da cicatrização de terceiros molares.

Todas as tomografias obtidas foram importadas para o software ITK-SNAP ® (versão 3.8.0), disponível gratuitamente, no formato DICOM. Neste estudo, foi realizado a técnica de segmentação semiautomática para diminuir a possibilidade de viés.

A técnica de análise volumétrica foi realizada seguindo o seguinte protocolo, padronizado no presente estudo:

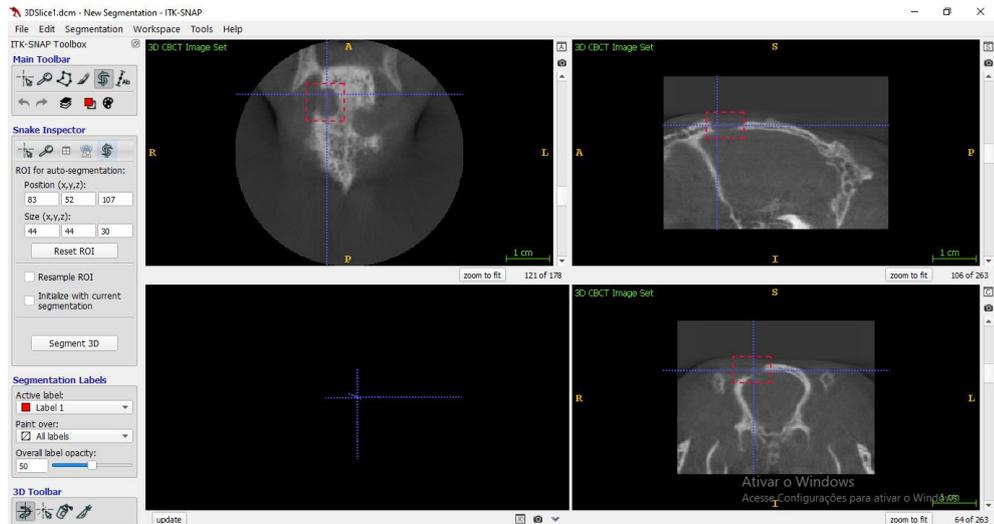
1- Ao visualizar o defeito ósseo no corte axial, foi selecionado a ferramenta “snake”, para delimitar o corte nos três planos (Figura 10). A delimitação foi realizada de acordo o tamanho do defeito visualizado nos três planos (axial, coronal e sagital) usando como parâmetro a estrutura óssea adjacente (Figura 11).

Figura 10 – Seleção da ferramenta “snake” do software ITK-SNAP ®



Fonte: Autoria própria.

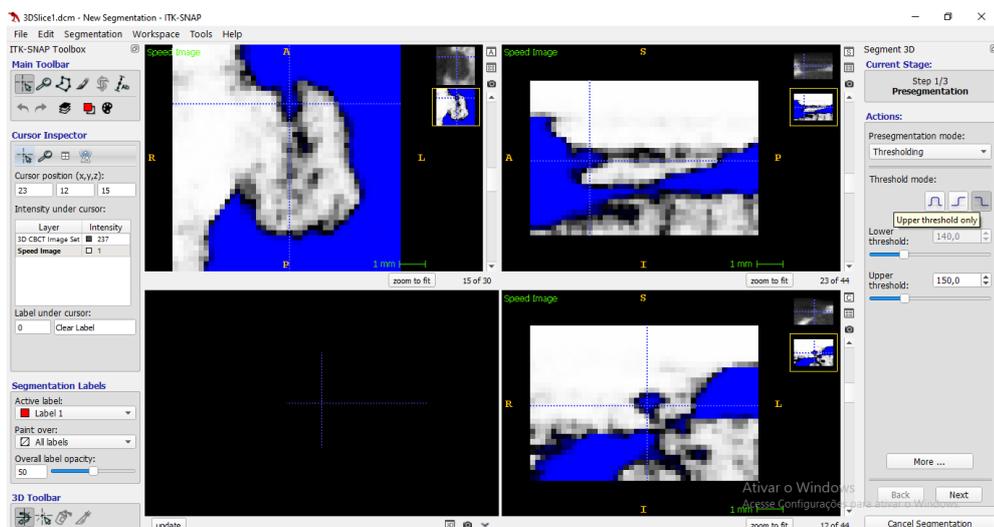
Figura 11 – Delimitação da segmentação do defeito ósseo



Fonte: Autoria própria.

2- Após a delimitação do defeito, foi realizado a segmentação com a ferramenta “*Segment 3D*”; a imagem é ampliada e pode-se visualizar apenas ao defeito. Em seguida, as cores de contraste dispostas pelo software foram invertidas, pois existe um padrão de preenchimento das estruturas que possuem cor na escala de cinza, enquanto a cor azul refere-se à área vazia. A ferramenta “Thresholding mode: upper thresholding only” foi selecionada para a adequação da quantidade de contraste, sendo selecionado padrão de 150,0 (Figura 12).

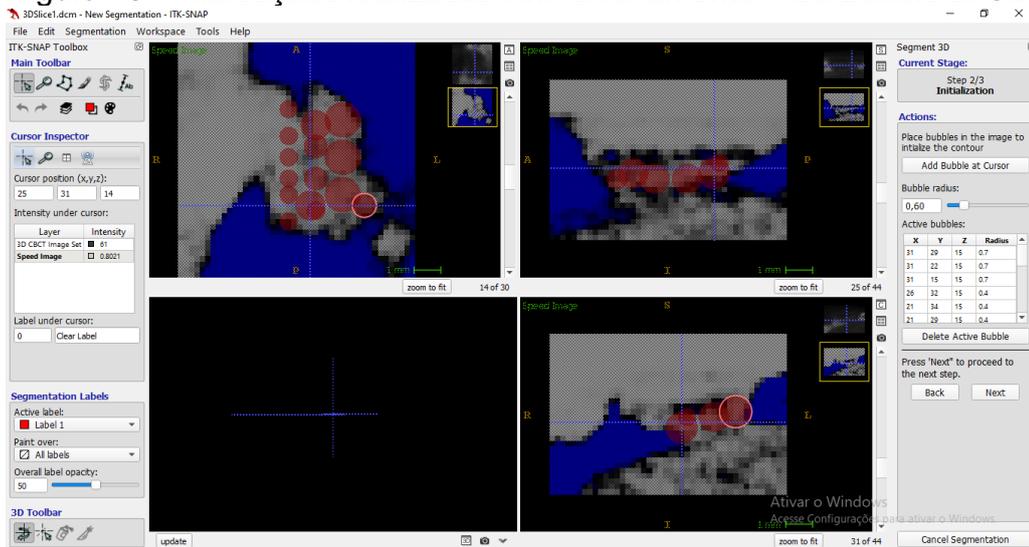
Figura 12 – Inversão de cores após modificar o “Thresholding mode”



Fonte: Autoria própria.

3- Em seguida, seguindo o fluxo da análise, o comando “Next” foi selecionado para permitir as delimitações da extensão do defeito em todos os planos com a ferramenta “Add Bubble at Cursor”, que permite definir os locais que serão preenchidos com os “balões” em vermelho (Figura 13)

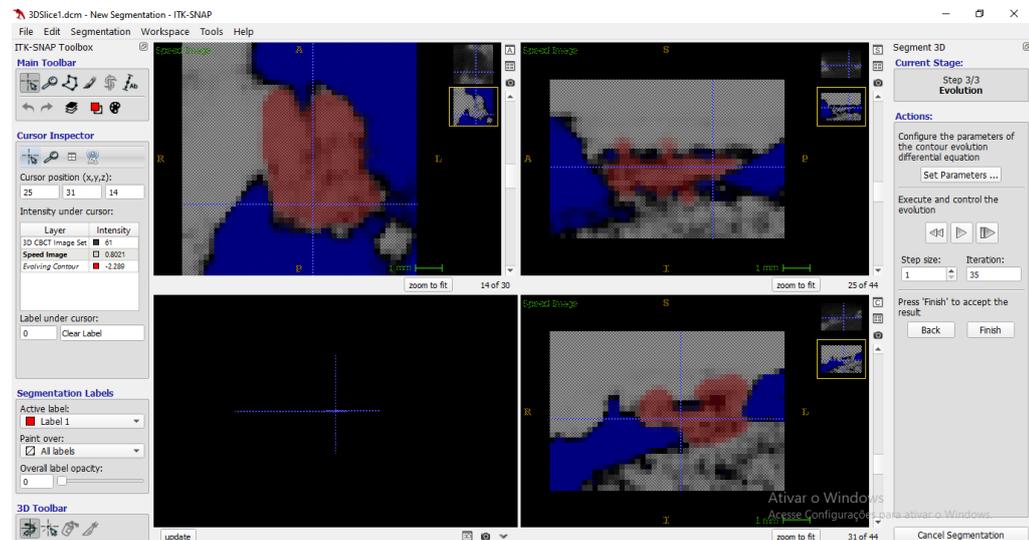
Figura 13 – Marcações realizadas com a ferramenta “Add Bubble at Cursor”



Fonte: Autoria própria.

4- Após todas as marcações, selecionou-se novamente o “Next”, seguido do “run/pause”. Nesse ponto, o programa adiciona pontos de referências que se unem gradualmente, preenchendo todo o defeito. Para eventual pausa, deve-se selecionar novamente o “run/pause” (Figura 14).

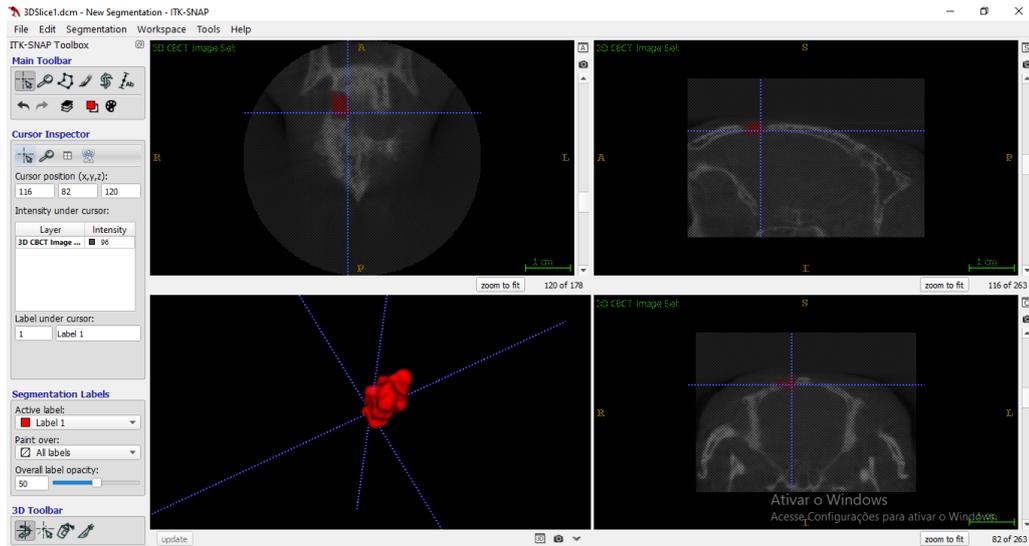
Figura 14 – Preenchimento do defeito de forma semiautomática



Fonte: Autoria própria.

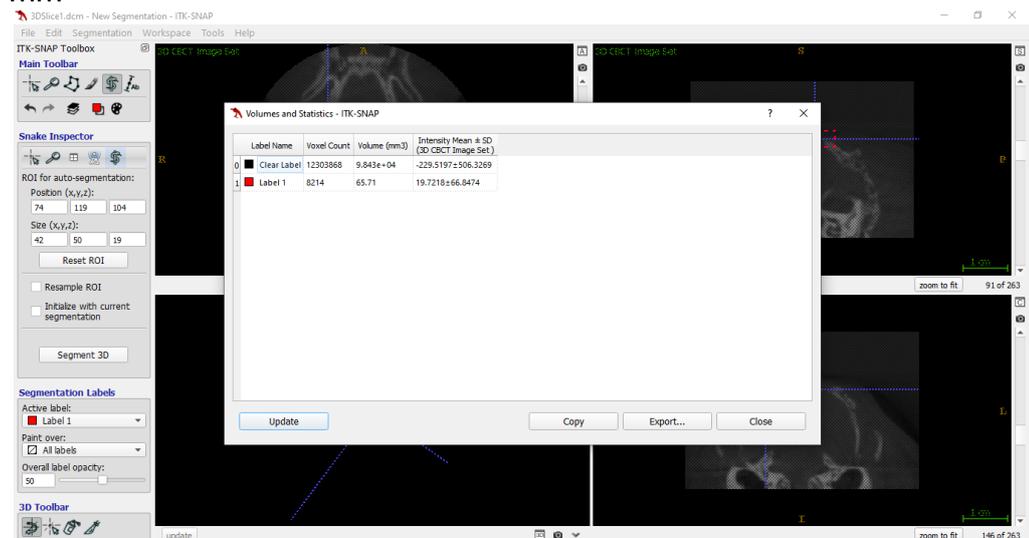
5- Por fim, selecionou-se o “*Finish*” para finalizar a segmentação. Para gerar o modelo 3D que reflete o preenchimento do defeito, selecionou-se o comando “*update*”. Por fim, ao selecionar o comando “*Segmentation >> Volumes and Statistics*”, é gerado uma tabela com os valores de volume em mm^3 (Figuras 15 e 16).

Figura 15 – Fim da segmentação semiautomática e visualização do modelo 3D



Fonte: Autoria própria.

Figura 16 – Tabela gerada pelo software com o valor do volume em mm^3

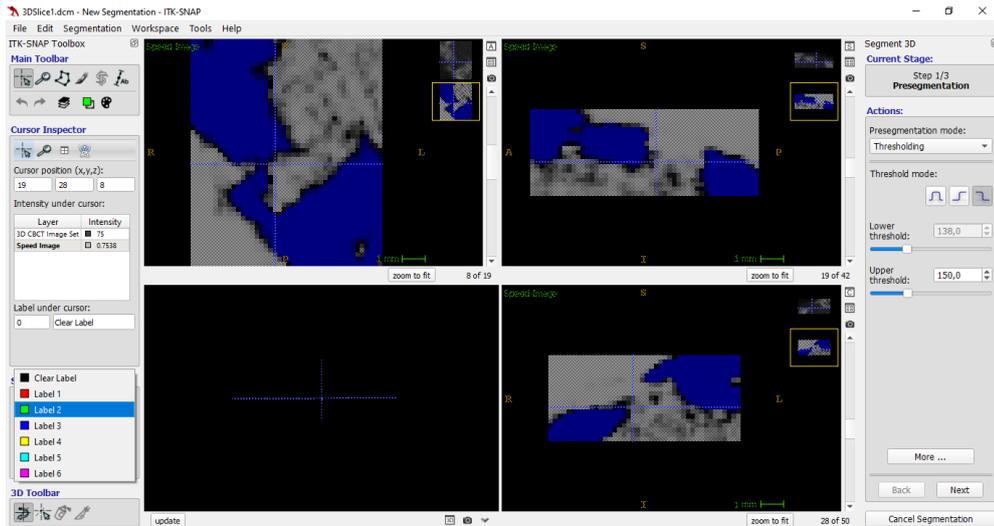


Fonte: Autoria própria.

6- Para análises de mais de um material ou de mais defeitos na mesma tomografia, como ocorreu no presente estudo, foi realizada a seleção de cores

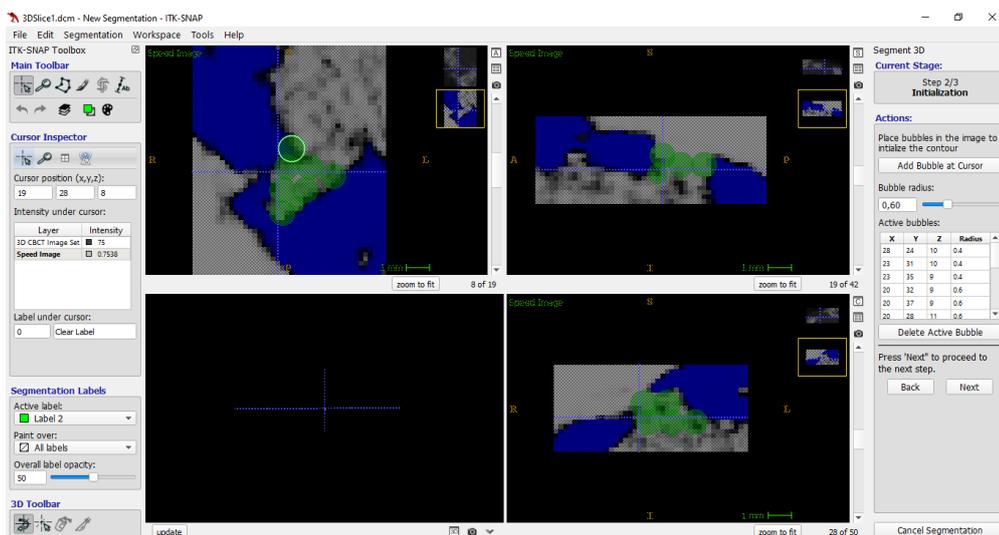
diferentes na segmentação para que os dados volumétricos ficassem separados e a distinção de defeitos/materiais fosse visualizada separadamente. Para isso, após a seleção da ferramenta “*Segment 3D*”, uma cor diferente da anterior foi selecionada a partir do comando “*Active label*” (Figuras 17 e 18).

Figura 17 – Seleção de outra cor com a utilização da ferramenta “*Active label*”



Fonte: Autoria própria.

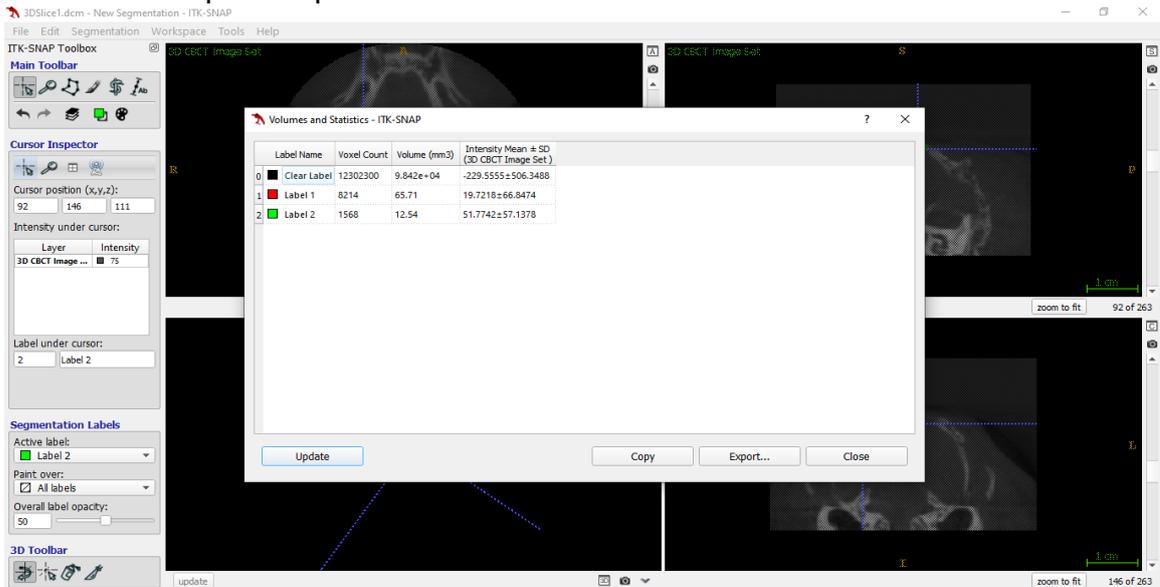
Figura 18 – Marcações realizadas em outro defeito com a cor verde



Fonte: Autoria própria.

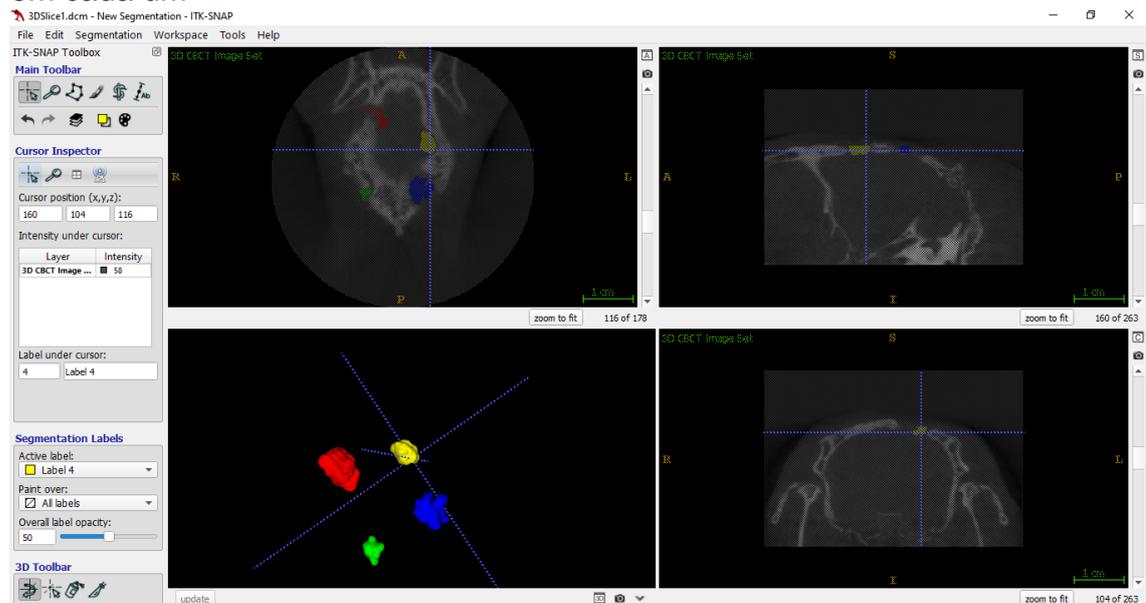
7- Ao gerar a tabela volumétrica, volumes distintos correspondentes com cada cor foram visualizados (Figura 18). O software dispõe de seis cores diferentes para a segmentação, o que permite a análise de até seis defeitos/materiais diferentes na mesma tomografia (Figuras 19, 20 e 21).

Figura 19 – Tabela gerada pelo software com o valor do volume em mm^3 e volumetria separada por cor



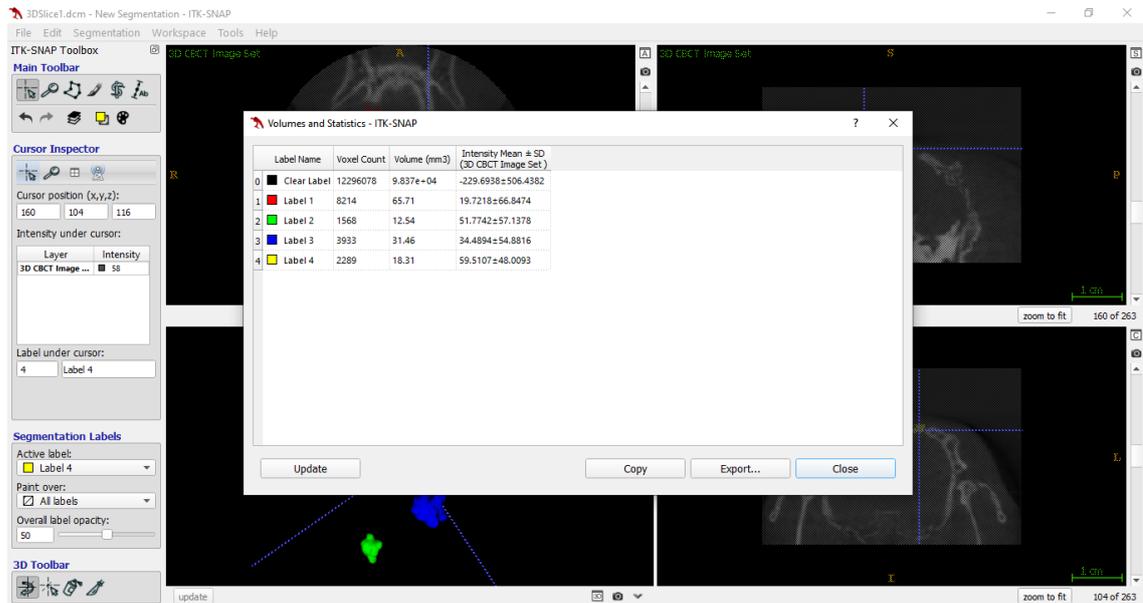
Fonte: Autoria própria.

Figura 20 – Segmentação realizada em quatro defeitos com diferentes matérias em cada um



Fonte: Autoria própria.

Figura 21 – Tabela com o valor dos volumes em mm³ respectivo a cada cor



Fonte: Autoria própria.

4.4.4 Análise histológica

O processamento histológico para a confecção de lâminas histológicas foi realizado no Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI), na Faculdade de Medicina da UFC.

Após a eutanásia dos animais, 90 dias após o procedimento cirúrgico, a calota craniana foi removida juntamente com o tecido mole de cobertura, e iniciado o processo de fixação. Essa etapa foi realizada com a imersão dos espécimes em formol tamponado a 10% por uma semana e, após esse período, foram lavados com água corrente por 24 horas.

Concluído a lavagem, iniciou-se o período de descalcificação do tecido com EDTA (ácido etileno diaminotetracético) a 10% com pH 7,2 por 4 semanas. A área correspondente a cada defeito ósseo foi dividida em duas metades, com o auxílio de uma navalha de micrótomo, a partir da região correspondente ao maior diâmetro do defeito.

Após a descalcificação, foram realizados os banhos de álcool e xilol, e as oito metades dos defeitos foram incluídos em parafina, em blocos diferentes, e em uma determinada posição, de forma que os primeiros cortes histológicos (espessura de 4µm) correspondessem à área central do defeito ósseo. Dessa forma, foram obtidos cortes semi-seriados de 6µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina e

pricosirius red para a observação da relação da membrana de pericárdio com os tecidos subjacentes em microscópio óptico.

4.4.5 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em forma de média e erro padrão da média, submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados por meio dos testes ANOVA 1-way ou -2-way seguidos dos pós-testes de Bonferroni (dados paramétricos). Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no SPSS v20.0 para Windows.ffc.

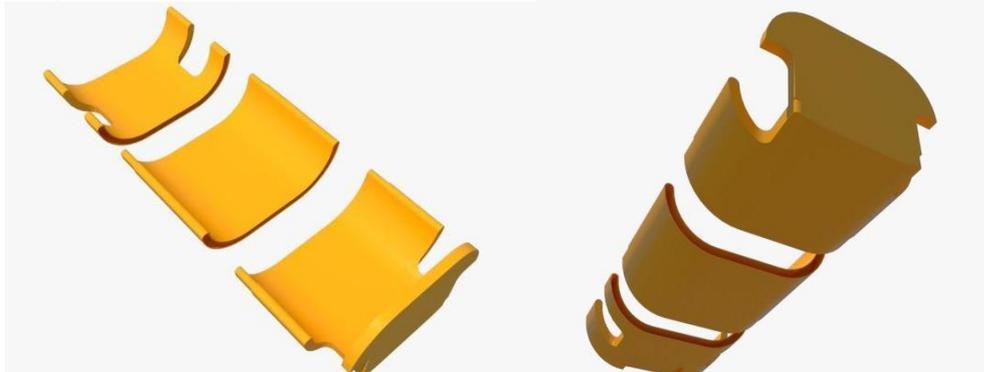
5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento de um dispositivo para padronizar o posicionamento dos coelhos durante as tomografias

O dispositivo de suporte e estabilização, desenvolvido para padronizar o posicionamento dos coelhos durante as tomografias, foi eficaz para o posicionamento padronizado dos animais, permitindo a obtenção de medidas uniformes e comparáveis entre os animais. Ademais, o dispositivo permitiu a imobilização do coelho, impedindo sua movimentação durante a realização do exame, além de reduzir o desconforto dos animais, o índice de erros e a necessidade de novas varreduras.

O dispositivo permitiu a realização das três tomografias por animal, totalizando 54 exames tomográficos ao final de 90 dias. Durante o período de aquisição das imagens não foram observadas interferências na operacionalidade do tomógrafo nem interferência na qualidade das imagens. O dispositivo permitiu excelente adaptação do animal, bem como a sua estabilidade durante o exame tomográfico; o que resultou na boa qualidade das imagens.

Figura 22 – Suporte desenhado em 3D finalizado para a impressão



Fonte: Autoria própria (2022).

5.2 Inspeção visual da cicatrização

Apesar das suturas terem sido realizadas com fios reabsorvíveis, não foram observadas nenhuma deiscência de sutura em nenhum dos sete dias avaliados. A cicatrização evoluiu sem sinais de infecção ou outras complicações. O edema, secundário ao trauma cirúrgico, foi observado até o terceiro dia pós-cirurgia,

apresentando redução gradual com o decorrer do tempo. Não foi observado, em nenhum animal, edema exacerbado, tampouco hematoma ou sinal de infecção aguda (Tabela 1). No entanto, 3 animais morreram 7, 15 e 60 dias após o procedimento cirúrgico, sem ter apresentado sinais prévios de debilidade ou sofrimento. A cirurgia e o pós-operatório imediato ocorreram com normalidade para esses animais, sem ter sido detectada uma causa que justifique o óbito.

A observação da área cirúrgica, que se estendeu até os 90 dias, não detectou nenhum sinal de infecção crônica. O estado geral dos animais não indicava sinais indicativos de dor ou desconforto, como falta de apetite, isolamento ou ranger de dentes.

O crescimento de pelos foi acompanhado a partir do sétimo dia pós-operatório onde apresentou crescimento parcial em apenas 15 dias e crescimento total de toda a região operada em 30 dias, conforme ilustra a Figura 23.

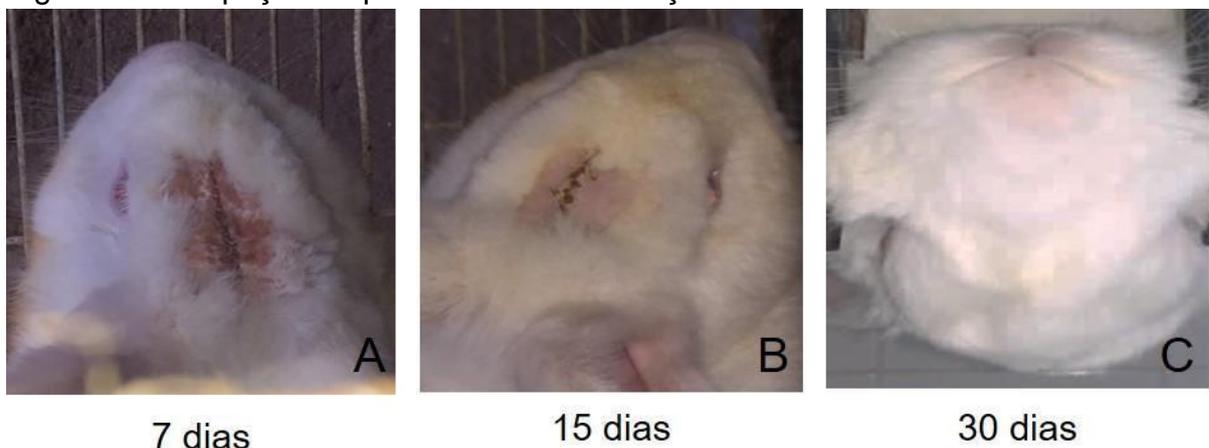
Tabela 1 – Análises de parâmetros pós-operatórios durante inspeção

Variante	Tempo						
	24 horas	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Deiscência de sutura	0	0	0	-	-	-	-
Edema exacerbado	0	0	0	-	-	-	-
Hematoma	0	0	-	-	-	-	-
Infecção	-	0	0	0	0	0	0
Crescimento de pelos	-	-	0	Parcial	total	total	total

Fonte: Autoria própria.

Legenda: Nenhuma deiscência de sutura e infecção foi encontrada em nenhum animal e os pelos cresceram totalmente ao final de 30 dias de avaliação, um dos indicadores de ausência de incompatibilidade dos biomateriais. Não houve nenhum processo de hematoma e edema exacerbado.

Figura 23 – Inspeção do processo de cicatrização



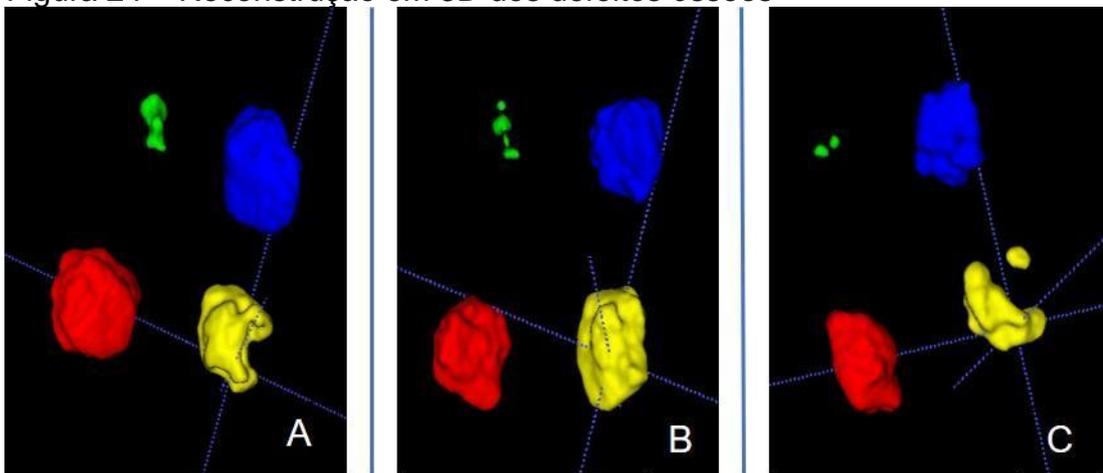
Fonte: Autoria própria.

5.3 Avaliação da formação óssea por tomografia

A análise volumétrica do osso neoformado foi avaliada seguindo o protocolo padronizado no presente estudo, a partir de dados gerados no software ITK-SNAP® com a possibilidade de gerar imagem 3D da área não regenerada, o que possibilita a impressão 3D, viabilizando a adaptação do protocolo para outras pesquisas clínicas ou experimentais.

Como esperado, podemos observar de forma qualitativa em 3D que ocorreu a redução do volume dos defeitos ósseos em todos os defeitos quando comparado entre os tempos de 30, 60 e 90 dias (Figura 24).

Figura 24 – Reconstrução em 3D dos defeitos ósseos



Fonte: Autoria própria.

Legenda Imagem tridimensional da área não regenerada com tecido ósseo. Vermelho: defeito vazio; Verde: osso autógeno; Azul: material com colágeno; Amarelo: material com colágeno e estrôncio. A: 30 dias. B: 60 dias. C: 90 dias.

A tabela 2 apresenta a análise volumétrica dos defeitos ósseos. Três dos 4 defeitos avaliados: defeito vazio (sem nenhum preenchimento), defeito preenchido com osso autógeno (padrão ouro) e o preenchido com colágeno apresentaram redução significativa e gradual de suas dimensões nos períodos de 30, 60 e 90 dias (Tabela 2). O defeito preenchido com colágeno + estrôncio, no entanto, apresentou diminuição volumétrica significativa entre os tempos 30 e 60 dias, indicando formação óssea nesse período. O mesmo resultado não foi observado na análise de 90 dias. Portanto, não foram observadas diferenças no volume do defeito preenchido com colágeno + estrôncio entre as análises realizadas nos dias 60 e 90.

Na comparação com o defeito vazio, observou-se a redução significativa do volume do defeito ósseo em todos os defeitos preenchidos, seja com osso autógeno, com colágeno ou com colágeno + estrôncio em todos os períodos avaliados, o que indica maior formação óssea nos defeitos preenchidos.

O defeito preenchido com osso autógeno apresentou os melhores resultados, com redução volumétrica significativa quando comparado aos demais grupos em todos os períodos avaliados, o que indica maior neoformação óssea.

Não foram observadas diferenças significativas na neoformação óssea entre os defeitos preenchidos com colágeno ou com colágeno + estrôncio em nenhum tempo avaliado.

Tabela 2 – Análise volumétrica dos defeitos ósseos

Grupo	Tempo (dias)			<i>p-Valor</i> ^a	<i>p-Valor</i> ^b
	30d	60d	90d		
Vazio	109.01±6.42 ^{Aa}	78.47±5.75 ^{Ab}	59.06±5.65 ^{Ac}	<0,001	<0,001
Osso autógeno	32.49±4.16 ^{Ba}	19.40±2.30 ^{Bb}	10.49±1.74 ^{Bc}	<0,001	
Colágeno	78.15±6.55 ^{Ca}	51.45±5.46 ^{Cb}	38.83±4.50 ^{Cc}	<0,001	
Colágeno + estrôncio	71.45±5.86 ^{Ca}	48.67±5.10 ^{Cb}	39.65±5.10 ^{Cb}	<0,001	
<i>p-Valor</i> ^a	<0,001	<0,001	<0,001		

^aANOVA-1-way para pedidas repetidas/Bonferroni; ^bANOVA-2-way para pedidas repetidas/Bonferroni;

Dados expressos em forma de média ± EPM; Letras minúsculas diferentes = diferença entre períodos;

Letras maiúsculas diferentes = diferença entre grupos.

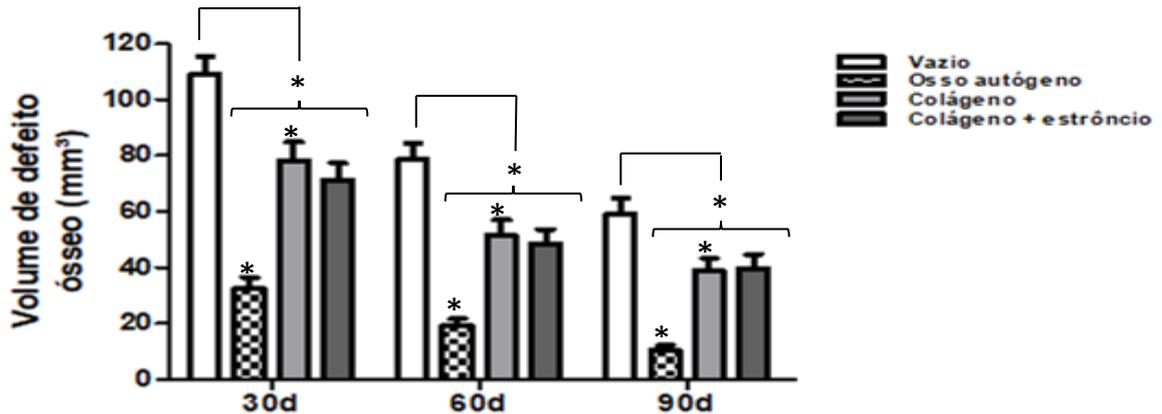
Fonte: Autoria própria.

O gráfico 1 ilustra a redução do volume do defeito ósseo relacionando o volume com o tempo de análise. Em relação ao controle vazio nos tempos de 30, 60 e 90 dias, todos os defeitos apresentaram diferença significativa.

Avaliando os defeitos de forma individual e entre os tempos de coletas, pode-se perceber que apenas o colágeno + estrôncio não apresentou diferença no tempo de 90 dias.

Os defeitos colágeno e colágeno + estrôncio não apresentaram diferença significativa entre si em nenhum dos períodos.

Gráfico 1 – Análise volumétrica da redução dos defeitos ósseos

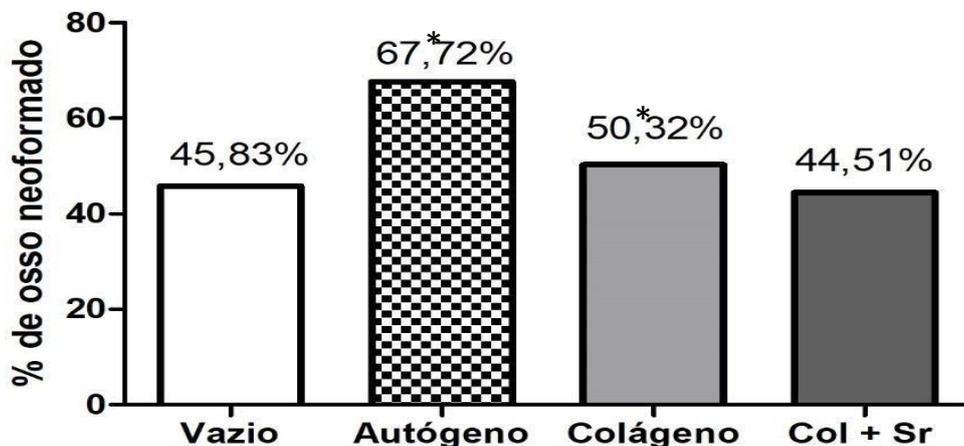


Fonte: Autoria própria.

Legenda: Todos os defeitos obtiveram redução significativa quando comparado ao controle negativo. O defeito autógeno apresentou diferença entre todos os defeitos e períodos. Os defeitos colágeno e colágeno + estrôncio não apresentaram diferença entre si, porém apresentaram em relação ao controle e autógeno. Os dados foram expressos em forma de média e erro padrão da média, submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados por meio dos testes ANOVA 1-way ou 2-way seguidos do pós teste de Bonferroni (dados paramétricos). Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no SPSS v20.0 para Windows.

Analisando agora o percentual de formação óssea entre os dias 30 e 90, observamos que o defeito preenchido com osso autógeno apresentou o maior percentual de formação óssea, 67,72%. O defeito colágeno + estrôncio apresentou a menor formação óssea nesse período, 44,51%, enquanto o defeito vazio e o preenchido com colágeno mostraram 45,83 e 50,32 percentuais de formação óssea, respectivamente (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Análise percentual quantitativo de formação óssea entre os dias 30 e 90



Fonte: Autoria própria.

Legenda: O defeito autógeno apresentou o maior percentual de formação óssea, enquanto o colágeno + estrôncio apresentou a menor taxa de formação no tempo de 90 dias.

5.4 Análise histológica

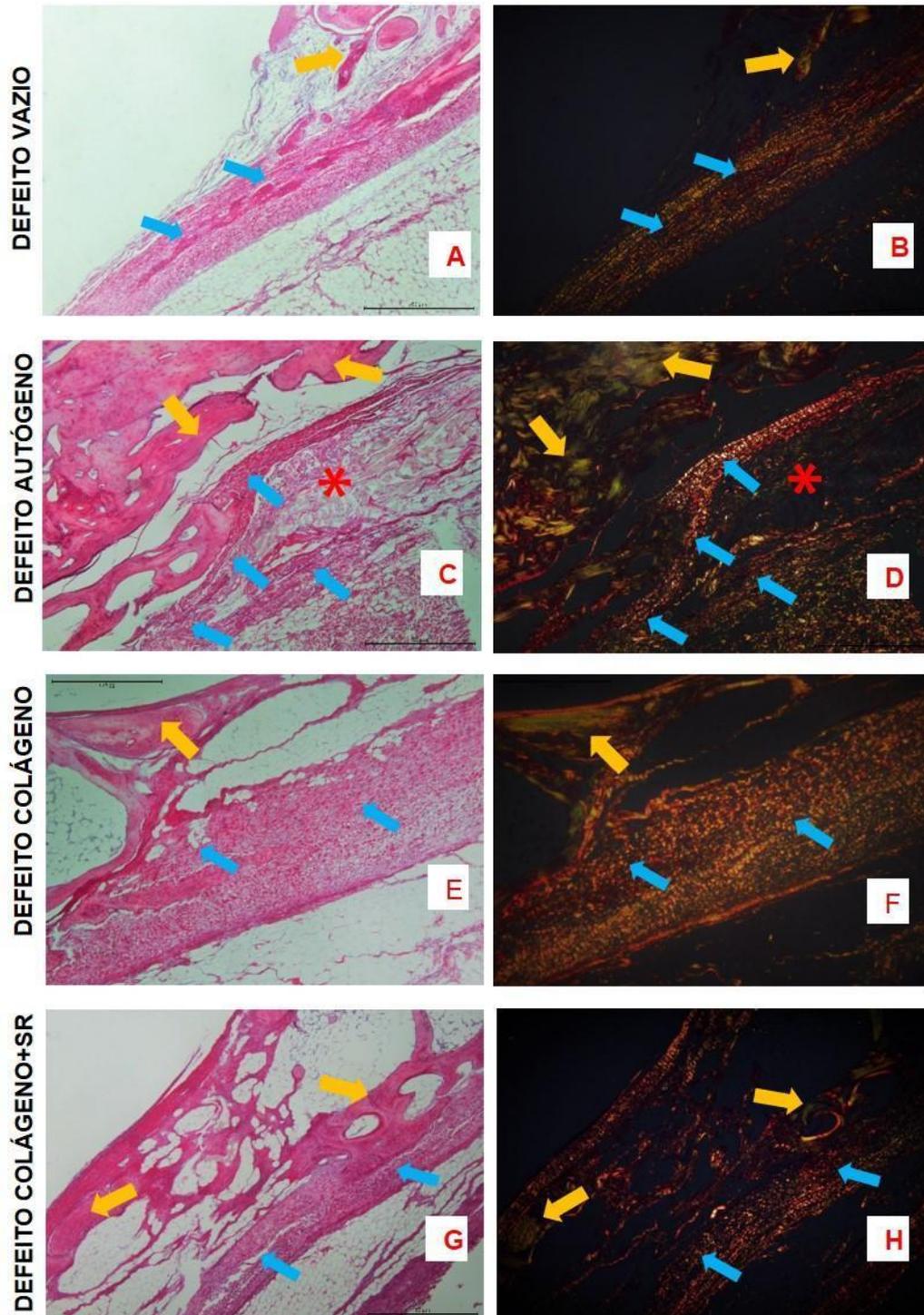
A análise histológica, realizada em lâminas coradas em HE e picrosirius red, não detectou nenhum indício de processo inflamatório crônico, como a presença de edema, hemorragia e/ou infiltrado inflamatório. Ademais, não foi observado um número acentuado de osteoclastos.

Em todas as análises, a membrana de pericárdio bovino estava presente, posicionada entre o osso neoformado no interior do defeito e a pele adjacente, conforme ilustra as setas azuis da Figura 25. Dessa forma, a membrana de pericárdio bovino cumpriu seu papel de barreira, mantendo totalmente separado o tecido conjuntivo do tecido ósseo em formação.

Nas lâminas coradas em HE (Figuras 25A, 25C, 25E, 25G), a membrana pode ser visualizada (seta azul) sobrepondo a margem do defeito ósseo. Observa-se ainda o osso neoformado (seta amarela) e o defeito ósseo remanescente.

Nas lâminas coradas com “picrosirius red” (Figuras 25B, 25D, 25F, 25H), pode-se visualizar a membrana nas setas azuis e o tecido osteóide nas setas amarelas correspondendo à marcação do colágeno tipo I presente na matriz óssea recém-formada.

Figura 25 – Cortes histológicos com coloração de hematoxilina-eosina e “pricosirius red” com luz polarizada

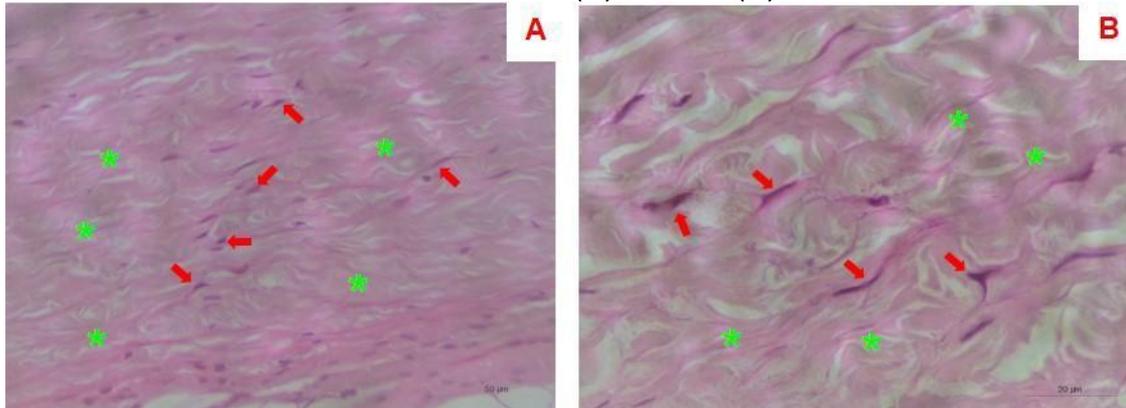


Fonte: Autoria própria.

Legenda: As letras A, C, E e G representam os defeitos controle (vazio), autógeno, colágeno e colágeno + estrôncio respectivamente na coloração de hematoxilina-eosina. As letras B, D, F e H representam os defeitos controle (vazio), autógeno, colágeno e colágeno + estrôncio respectivamente na coloração de pricosirius red com luz polarizada. As duas colunas correspondem apenas ao tempo de 90 dias. As setas azuis indicam a localização da membrana de pericárdio bovino. As setas amarelas indicam a presença de tecido ósseo neoformado. O asterisco vermelho presente no grupo autógeno mostra a presença de colágeno matriz de colágeno imaturo no interior da membrana produzido pelos fibroblastos recém alojados.

Ainda foi possível observar a presença de fibroblastos ativos alojados no interior da membrana, bem como a presença de fibras colágenas imaturas em seu interior. Esse achado indica a baixa citotoxicidade e alta compatibilidade da membrana pelo processamento L-Hydro (figura 26).

Figura 26 – Cortes histológicos com coloração de hematoxilina-eosina no aumento de 100X (A) e 400X (B)



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Observa-se a presença de fibroblastos ativos alojados no interior da membrana (setas vermelhas) e a produção de colágeno imaturo (asterisco verde).

6 DISCUSSÃO

As deficiências ósseas maxilofaciais podem ser decorrentes do envelhecimento, dos traumas, das patologias ou das cirurgias invasivas. Devido às dificuldades para encontrar um material com características tidas como ideais, as reconstruções dessas deficiências ainda têm sido um desafio nas cirurgias craniofaciais. Embora o osso autógeno seja considerado “padrão ouro” para regeneração óssea, é frequentemente relacionado à morbidade da área doadora, dor pós-operatória, aumento de risco de infecção do sítio doador, sensibilidade, hemorragia e lesão nervosa (WONGSUPA, *et al.*, 2017).

Devido às limitações da utilização dos enxertos autógenos, surgiu a necessidade de estudar e pesquisar novos materiais. Por conta dessa demanda, as pesquisas e o desenvolvimento de biomateriais para o reparo de defeitos ósseos maxilofaciais têm mostrado um progresso considerável (TAN *et al.*, 2021). Os diversos estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* em diferentes espécies de animais, são fundamentais para alcançar a aplicação clínica desses biomateriais, objetivo maior dessas pesquisas, visando a eliminação dos procedimentos de remoção de osso autógeno para reconstrução (DA SILVA MORAIS; OLIVEIRA; REIS, 2018). É de extrema importância, portanto, que os estudos em animais atendam a todos os requisitos de segurança e se aproxime ao máximo das aplicações em humanos.

A utilização de coelhos para modelo de defeitos ósseos em calota craniana, ao contrário de ratos, permite que se realize até quatro defeitos ósseos em cada animal, o que representa uma grande vantagem, pois possibilita a redução do número de animais necessários para um estudo. Isso corroborou para a utilização do coelho em várias pesquisas que buscam soluções terapêuticas para restauração de defeitos ósseos (STOKOVIC *et al.*, 2021). Em nosso estudo, foi decidido trabalhar com quatro defeitos ósseos não críticos de oito milímetros por animal, uma vez que o tempo final de avaliação da formação óssea foi estipulado em 90 dias, tempo insuficiente para o completo fechamento espontâneo dos defeitos. De fato, nem os defeitos preenchidos com osso autógeno se apresentaram completamente cicatrizados em 90 dias. Vale ressaltar que o defeito ósseo de 15 milímetros é considerado crítico para coelhos por não apresentar cura espontânea durante a vida do animal.

A presente pesquisa estabeleceu um protocolo viável para a ROG, com a padronização das avaliações tomográficas e volumétricas do osso neoformado e

utilizando um número reduzido de animais. A avaliação tomográfica do osso, ao contrário da morfometria utilizada em vários estudos, além de ser mais precisa, permite o acompanhamento da formação óssea, nos diferentes tempos avaliados, avaliando a resposta individual de cada animal, sem a necessidade de sacrificar grupos de animais em diferentes intervalos de tempo para a avaliação do osso neoformado. Portanto, permite a redução do número de animais, o que vem sendo recomendado pelos comitês de ética no uso de animais, além do menor custo para o desenvolvimento do estudo. Vale ressaltar que todos os defeitos ósseos foram criados por um único operador, com ampla experiência por já realizar procedimentos semelhantes em sua prática clínica. Provavelmente por esse motivo, nenhum óbito foi registrado imediatamente após o procedimento cirúrgico.

A fim de validar o modelo experimental, investigamos o comportamento de dois biomateriais desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (VASCONCELOS, 2014; VERÍSSIMO *et al.*, 2010): colágeno aniônico mineralizado e colágeno aniônico mineralizado associado ao estrôncio. A seleção desses biomateriais baseou-se nos nossos estudos *in vitro* que sinalizaram para um efeito positivo do ranelato de estrôncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos murino, com aumento da expressão de proteína morfogenética óssea (BMP) e fosfatase alcalina nessas células (BEZERRA, 2017). Os outros dois defeitos foram utilizados como controle, sendo um deles preenchido com osso autógeno, padrão ouro em enxertia óssea, e o outro permanecendo vazio, sem nenhum preenchimento. Os quatro defeitos foram recobertos com uma membrana biológica acelular de colágeno extraído a partir do pericárdio bovino, já comercializada e utilizada em cirurgias vascular, cardíaca e torácica.

Conseguimos estabelecer, passo a passo, um modelo que reproduz, o mais próximo possível, os procedimentos clínicos de ROG em humanos, o que reduz o distanciamento entre o laboratório e a aplicação prática na clínica, nos permitindo vislumbrar a aplicação dos nossos resultados em humanos em um futuro próximo.

Em humanos, não é raro nos depararmos com defeitos ósseos críticos. Keating, Simpson e Robinson (2005) definiram os defeitos ósseos críticos como aqueles que não cicatrizam espontaneamente, apesar da estabilização cirúrgica. Portanto, necessitam de uma intervenção cirúrgica adicional de reconstrução óssea por enxertos, seja com osso autógeno, xenógeno ou alógeno (BALDWIN *et al.*, 2019).

Independentemente da técnica utilizada, as avaliações pertinentes à cicatrização óssea são acompanhadas com exames imaginológicos e avaliações clínicas periódicas. O exame de imagem ideal para o acompanhamento da reparação óssea é a tomografia computadorizada *cone beam*. Esse exame permite avaliar com acurácia e reproduzir os resultados obtidos da mineralização de tecidos com uma baixa intensidade de radiação e ainda permite a reconstrução em 3D (OHAYON *et al.*, 2019).

Dessa forma, reforçando o nosso intuito de seguir protocolos mais próximos aos utilizados na prática clínica, a neoformação óssea foi avaliada na presente pesquisa a partir da análise volumétrica obtida por tomografia computadorizada. Esse exame foi fundamental para comparar os resultados entre os grupos e também individualmente (formação óssea em cada animal) nos diversos tempos de avaliação e nos permitiu quantificar com exatidão a redução do volume dos defeitos ósseos, ou em outras palavras, a formação óssea no interior dos defeitos. É válido ressaltar que tanto o tomógrafo, KODAK 9000, como o software, ITK-SNAP®, utilizados na pesquisa são ferramentas desenvolvidas para o uso em humanos, portanto, nos aproxima ainda mais desta realidade.

O ITK-SNAP® é um software criado para se trabalhar principalmente com tomografia computadorizada e ressonância magnética a partir dos formatos DICOM, NIfTI e Mayo Analyze. É um recurso que permite ao usuário delinear de forma manual ou automática estruturas anatômicas e realizar a sua segmentação. Com essas ferramentas é possível mensurar áreas e volumes de interesse (YUSHKEVICH *et al.*, 2006). Utilizamos esse software para mensurar os volumes dos defeitos ósseos de todos os grupos nos tempos de 30, 60 e 90 dias e obtivemos imagens precisas em 3D de todos os defeitos, bem como os valores numéricos. Essas duas perspectivas analisadas em conjunto favoreceu um melhor entendimento do processo de neoformação óssea, conseqüentemente, a redução volumétrica dos defeitos.

As avaliações clínicas periódicas foram programadas com o intuito de avaliar e controlar parâmetros inflamatórios como dor, rubor, calor e edema e possíveis complicações pós-operatórias como hematoma, infecção e deiscência de sutura (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Essas análises sugerem que os materiais utilizados no estudo são biocompatíveis, uma vez que não foram observadas complicações pós cirúrgicas como deiscência de sutura, edema extenso e demora no crescimento dos pelos. Ademais, não foi encontrado infiltrado inflamatório crônico nos

tecidos adjacentes ao local da regeneração óssea guiada, após 90 dias, tempo em que se avaliou histologicamente os tecidos circunjacentes. De fato, não se esperava encontrar infiltrado inflamatório na análise histológica, considerando que os parâmetros clínicos não sugeriam complicações na cicatrização.

A preparação da membrana de pericárdio bovino pode incluir processamentos com glutaraldeído ou, mais utilizado recentemente, com L-Hydro. A descelularização promovida pelo glutaraldeído favorece a antigenicidade e a trombogenicidade devido a sua citotoxicidade, o que pode induzir o processo de calcificação do biomaterial, característica indesejada nas especialidades que são utilizadas atualmente. Já o processamento L-Hydro, por não ser citotóxico, favorece a adesão de células endoteliais em sua superfície e permite que fibroblastos migrem, alojem-se em seu interior e iniciem a produção de matriz de colágeno (NINA *et al.*, 2005). Essas características também foram observadas em nosso estudo, reforçando a biocompatibilidade da membrana. A membrana, de fato, não interferiu com o processo de neoformação óssea, observada em todos os grupos, incluindo o defeito vazio. Ademais, foi observado a presença de vários fibroblastos e matriz de colágeno no interior da membrana. Isso mostra resultados semelhantes já encontrados na literatura, porém, com outra indicação de utilização (ELGALI *et al.*, 2017). Esses fibroblastos, provavelmente, foram diferenciados a partir de células mesenquimais presentes no periósteo. Nossos resultados sugerem que a membrana avaliada apresenta propriedades bioativas que favorecem o reparo ósseo a partir do recrutamento e ativação de células hospedeiras locais, como afirma o estudo de Elgali *et al.* (2017), considerando a sua taxa de formação óssea de 45,83% no defeito vazio.

Alio, Rodriguez e Martinez (2013) também relataram bons resultados ao utilizarem a membrana, associada ao plasma rico em plaquetas (PRP), para o tratamento cirúrgico de úlceras perfurantes em córnea. Não observaram nenhum caso de infecção e/ou inflamação associado à técnica e a combinação de membrana com o PRP se mostrou eficaz na cicatrização total das lesões ulceradas.

As análises histológicas nos permitiram observar ainda que as membranas estavam presentes, intactas, mesmo após 90 dias, o que sugere a sua aplicação na cicatrização de defeitos ósseos extensos.

Bornert *et al.* (2021) pesquisaram a degradação de duas das membranas comerciais mais utilizadas atualmente, Bio-Gide® e Jason®, em ROG em mandíbula de suínos. Ambas as membranas são de origem suína, sendo a segunda obtida a

partir de pericárdio suíno. As duas membranas apresentaram comportamentos semelhantes quanto a degradação, permanecendo intactas até as 12 semanas, iniciando o processo de degradação após esse período. A membrana utilizada em nossa pesquisa (Vivendi®) possui alta reticulação e, portanto, não sofre degradação.

Na literatura já está bem estabelecido que a presença da membrana funciona como uma barreira, impedindo o repovoamento do sítio ósseo por células de outros tecidos conjuntivos e propiciando o desenvolvimento e a atuação de células osteoprogenitoras e fatores de crescimento, garantindo um ambiente biológico ideal para a regeneração e neoformação óssea. De fato, observamos formação óssea em todos os defeitos, incluindo o defeito que não recebeu nenhum preenchimento. Como era esperado, a maior taxa de formação óssea foi observada nos defeitos preenchidos com osso autógeno, padrão ouro para os procedimentos de enxerto ósseo. Vale ressaltar que o defeito dois foi completamente preenchido com osso autógeno e que parte do enxerto foi reabsorvido. Esse achado está de acordo com os relatos da literatura mostrando resultados de reabsorção pós enxertia que chegam até 42%. Esse grau de reabsorção depende de fatores como a técnica utilizada e área doadora principalmente (BARONE N *et al.*, 2017; TONETTI, HÄMMERLE, 2008). De fato, a reabsorção do osso enxertado é crucial para a neoformação de novo osso, que vai substituir o osso enxertado, conforme os princípios da enxertia óssea.

No presente estudo, avaliamos ainda o colágeno aniônico de origem bovina. Os enxertos ósseos xenógenos mais utilizados nas ROG da área maxilofacial são de origem bovina e possuem uma matriz mineralizada. Essa matriz tem a função de osteocondução, pois permite que células diferenciadas e indiferenciadas habitem a sua estrutura e iniciem o processo de neoformação óssea (GUTIERRES *et al.*, 2006). Também permitem que ocorra a neovascularização de todo o enxerto. Optamos pelo colágeno aniônico por apresentar melhores resultados quando comparado ao colágeno hidrolisado de forma convencional e ao colágeno natural (BUCHAIM *et al.*, 2007; MIGUEL *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2004). Estudos preliminares do nosso grupo (VASCONCELOS, 2014; VERÍSSIMO *et al.*, 2010) demonstraram que esponjas mineralizadas de colágeno polianiônico utilizadas em defeitos ósseos têm grande potencial para a sua aplicação na ROG.

Utilizamos a mesma matriz de colágeno aniônico mineralizada fragmentada em um dos defeitos e outra matriz de colágeno aniônico mineralizada contendo íons estrôncio. O colágeno mineralizado como enxerto xenógeno induziu o processo de

neoformação óssea, pois diminuiu o volume do defeito ósseo e seu percentual de formação óssea foi maior quando comparado ao grupo vazio. Provavelmente, o colágeno também serviu como osteocondutor no processo de neoformação óssea, incorporando matriz óssea neoformada por células ósseas residentes. Observamos que o enxerto xenógeno de colágeno utilizado no presente trabalho resultou em maior formação óssea em relação ao enxerto vazio, mas a quantidade de osso neoformado foi inferior quando comparada ao defeito preenchido com osso autógeno, como esperado.

Surpreendentemente, não encontramos diferenças estatísticas na quantidade de osso neoformado entre os defeitos preenchidos com colágeno e os preenchidos com colágeno associado ao estrôncio. Mais estudos são necessários para compreender os nossos achados. Especulamos que a concentração de íons estrôncio utilizados na preparação do biomaterial pode ter interferido na migração e ativação de células osteogênicas, cruciais para o processo de cicatrização óssea.

Em nosso estudo *in vitro*, o ranelato de estrôncio aumentou significativamente a proliferação e ativação de osteoblastos murinos, promovendo aumento dos níveis de mineralização, secreção de fosfatase alcalina e BMP2, marcadores importantes da ativação e diferenciação celular dessas células (BEZERRA, 2017). Outros estudos corroboram com os nossos ao demonstrar que o estrôncio atua na proliferação de pré-osteoblastos, no aumento da atividade osteoblástica e na maior mineralização da matriz óssea (CANALIS *et al.*, 1996; CHOUDHARY *et al.*, 2007; BRENNAN *et al.*, 2009). Além disso, tem sido relatado que o ranelato de estrôncio inibe a apoptose de osteoblastos e induz a diferenciação final de osteoblastos em osteócitos (ATKINS *et al.*, 2009; CIANFEROTTI; D'ASTA; BRANDI, 2013). Baseado em todos esses trabalhos, portanto, esperávamos maior formação óssea nos defeitos preenchidos com colágeno+estrôncio em relação ao colágeno isolado.

O comportamento da cicatrização óssea nos dois defeitos controles, preenchidos pelo osso autógeno e sem preenchimento, observado no presente estudo sugere que o modelo experimental utilizado é adequado para pesquisas que visam o desenvolvimento e avaliação de biomateriais para enxerto ósseo. Ademais, a metodologia para a avaliação da quantidade óssea neoformada mostrou-se adequada e reprodutível.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que o modelo experimental de calota craniana em coelhos, com a criação de 4 defeitos semi-críticos, é um modelo reprodutível e adequado para estudos de regeneração óssea guiada.

A metodologia utilizada e padronizada para a mensuração dos espaços vazios nos defeitos ósseos através de tomografia cone beam no decorrer do tempo é reprodutível e eficaz.

As membranas de pericárdio bovino utilizadas apresentam potencial para o uso em regeneração óssea guiada por ter se mostrado biocompatível e não ter apresentado reabsorção após 90 dias de implantação.

REFERÊNCIAS

ALIO, J. L.; RODRIGUEZ, A. E.; MARTINEZ, L. M. Bovine pericardium membrane (tutopatch) combined with solid platelet-rich plasma for the management of perforated corneal ulcers. **Cornea**, Philadelphia, v. 32, n. 5, p. 619-624, May 2013. DOI 10.1097/ICO.0b013e31825a6d9a. PMID 22929158.

ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: an experimental study in the dog. **Clin. Oral Implants Res.**, Medford, v. 20, n. 6, p. 545-549, June 2009.

ARONI, Mauricio Andrés Tinajero *et al.* Reparo ósseo induzido por diferentes substitutos de enxerto ósseo em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos. **Braz. J. Implantol. Health Sci.**, Macapá, v. 2, n. 9, p. 28-44, 2020.

ATKINS, G. J. *et al.* Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. **Osteoporis International**, [São Francisco], v. 20, n. 4, p. 653-64, apr. 2009.

BALDWIN, P.; LI, D. J.; AUSTON, D. A.; MIR, H. S.; YOON, R. S.; KOVAL, K. J. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: Clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. **J. Orthop. Trauma.**, United States, v. 33, n. 4, p. 203-213, Apr. 2019. DOI 10.1097/BOT.0000000000001420. PMID 30633080.

BARONE, A. *et al.* Early volumetric changes after vertical augmentation of the atrophic posterior mandible with interpositional block graft versus onlay bone graft: A retrospective radiological study. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, [s. l.], v. 45, n. 9, p. 1438–1447, 2017.

BENGTSSON, L.; RADEGRAN, K.; HAEGERSTRAND, A. In vitro endothelialization of commercially available heart valve bioprostheses with cultured adult human cells. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, United Kingdom, v. 7, n. 8, p. 393-398, 1993. DOI 10.1016/1010-7940(93)90001-r. PMID 8398184.

BEZERRA, A. V. **Efeito do ranelato de estrôncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos murinos in vitro.** 2017. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

BORNERT, F. *et al.* Comparative barrier membrane degradation over time: Pericardium versus dermal membranes. **Clinical and Experimental Dental Research**, Medford, v. 7, n. 5, p. 711-718, 2021.

BOTTINO, M. C.; THOMAS, V.; SCHMIDT, G.; VOHRA, Y. K.; CHU, T. M.; KOWOLIK, M. J.; JANOWSKI, G. M. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration: a materials perspective. **Dent.**

Mater., Netherlands, v. 28, n. 7, p. 703-721, July 2012. DOI 10.1016/j.dental.2012.04.022. PMID 22592164.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ed. 222, p. 5, 21 out. 2016. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22073702/do1-2016-11-21-resolucao-normativa-n-33-de-18-de-novembro-de-2016-22073453. Acesso em: 13 set. 2022.

BRENNAN, T. C. *et al.* Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **British Journal Pharmacology**, [Oxford], v. 157, n. 7, p. 1291-300, aug. 2009.

BUCHAIM, R. L.; GOISSIS, G.; ANDREO, J. C.; ROQUE, D. D.; ROQUE, J. S.; BUCHAIM, D. V.; RODRIGUES, A. C. Biocompatibility of anionic collagen matrices and its influence on the orientation of cellular growth. **Cienc. Odontol. Bras.**, São José dos Campos, v. 10, n. 3, p. 12-20, 2007.

BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H.-L. Collagen membranes: a review. **J. Periodontol.**, United States, v. 72, p. 215-229, 2001.

CAETANO-LOPES, J.; CANHÃO, H.; FONSECA, J. E. Osteoblasts and bone formation. **Acta Reumatol. Port.**, Lisboa, v. 32, n. 2, p. 103-110, Apr./Jun. 2007. PMID 17572649.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. ABCD. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-672020070001000100>. Acesso em: 21 mar. 2022.

CANALIS, E. *et al.* The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. **Bone**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 517-23, jun. 1996.

CARVALHO, P. S. P. DE; BASSI, A. P. F.; PEREIRA, L. A. V. D. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomater. **ImplantNews**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 255-260, 2004.

CASTRO E SILVA, Igor luco *et al.* Pesquisa odontológica brasileira em regeneração óssea guiada: um estudo bibliométrico de quatro décadas. **Res. Soc. Dev.**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. e25510212504-e25510212504, 2021.

CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M. G.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxamida internos. **Polímeros**, São Carlos, v. 7, n.2, pp. 40-46, 1997.

CHAVDA, S.; LEVIN, L. Human studies of vertical and horizontal alveolar ridge augmentation comparing different types of bone graft materials: A systematic review.

J. Oral Implantol., United States, v. 44, n. 1, p. 74-84, Feb. 2018. DOI 10.1563/aaid-joi-D-17-00053. PMID 29135351.

CHOUDHARY, S. *et al.* Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. **Journal of Bone and Mineral Research**, [Malden], v. 22, n. 7, p. 1002-10, jul. 2007.

CIANFEROTTI, L.; D'ASTA, F.; BRANDI, M. L. A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 127-39, jun. 2013.

DA SILVA MORAIS, A.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Small Animal Models. **Adv. Exp. Med. Biol.**, Switzerland, v. 1059, p. 423-439, 2018. DOI 10.1007/978-3-319-76735-2_19. PMID 29736585.

DALAPRIA, Vanessa. **Estudos do impacto da fotobiomodulação na qualidade óssea de alvéolo dental de ratos Wistar pós exodontia associada ou não à biomaterial scaffold**. 2020. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2020.

DANTAS, Talita Souza *et al.* Materiais de enxerto ósseo e suas aplicações na odontologia. **J. Health Sci.**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 131-135, 2011.

DEUEL, T. F. Growth factors. *In*: LANZA, R. P.; LANGER, R.; CHICK, W. L. (ed.). **Principles of tissue engineering**. London: Academic Press, 1997. p. 129-141.

ELGALI, I.; OMAR, O.; DAHLIN, C.; THOMSEN, P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **Eur. J. Oral Sci.**, Medford, v. 125, n. 5, p. 315-337, Oct. 2017. DOI 10.1111/eos.12364. PMID 28833567. PMCID PMC5601292.

ELKINS, R. C.; GOLDSTEIN, S.; HEWITT, C. W.; WALSH, S. P.; DAWSON, P. E.; OLLERENSHAW, J. D.; BLACK, K. S.; CLARKE, D. R.; O'BRIEN, M. F. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. **Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, New York, v. 13, n. 4, suppl. 1, p. 87-92, Oct. 2001. PMID: 11805955.

FERRONI, Letizia *et al.* Bovine pericardium membrane as new tools for mesenchymal stem cells commitment. **J. Tissue. Eng. Regen. Med.**, Berlin, v. 13, n. 10, p. 1805-1814, 2019.

GARG, A. K. **Bone biology, harvesting and grafting for dental implants: rationale and clinical applications**. Carol Stream: Quintessence, 2004.

GILLMAN, C. E.; JAYASURIYA, A. C. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. **Materials science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, [s. l.], v. 130, n. 112466, p. 112466, 2021.

GÓES, J. C. et al. On the piezoelectricity of anionic collagen films. **The Journal of Physics and Chemistry of Solids**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 465-470, 2002.

GUTIERRES, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S.; CABRAL, A. T.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J. D. Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado actual. **Arq. Med.**, Porto, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.

HERNIGOU, P. Bone transplantation and tissue engineering, part I. Mythology, miracles and fantasy: From Chimera to the Miracle of the Black Leg of Saints Cosmas and Damian and the cock of John Hunter. **Int. Orthop. (SICOT)**, Brussels, v. 38, p. 2631-2638, 2014.

HERNIGOU, P. Bone transplantation and tissue engineering. Part II: Bone graft and osteogenesis in the seventeenth, eighteenth and nineteenth centuries (Duhamel, Haller, Ollier and MacEwen). **Int. Orthop. (SICOT)**, Brussels, v. 39, p. 193-204, 2015.

HUNT, J. A.; MCLAUGHIN, P. J.; FLANAGAN, B. F. Techniques to investigate cellular and molecular interactions in the host response to implanted biomaterials. **Biomaterials**, United States, v. 2, p.1449-1459, 1997.

JORGE-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ, P.; TURNAY, J.; OLMO, N.; CALERO, P.; GARCÍA, R.; FREILE, I.; CASTILLO-OLIVARES, J. L. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. **Biomaterials**, United States, v. 20, n. 6, p. 539-545, Mar. 1999. DOI 10.1016/s0142-9612(98)90205-8. PMID 10213357.

KEATING, J. F.; SIMPSON, A. H.; ROBINSON, C. M. The management of fractures with bone loss. **J. Bone Joint Surg. Br.**, Bethesda, v. 87, n. 2, p. 142-150, Feb. 2005. DOI 10.1302/0301-620x.87b2.15874. PMID 15736731.

KOTWAL, A.; SCHMIDT, C. E. Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. **Biomaterials**, United States, v. 22, p.1055-1064, 2001.

KRICHELDORF, F. Substitutos ósseos: quando utilizá-los? *In*: CARVALHO, P. S. P. (ed.). **Osseointegração 20 anos**: visão contemporânea da implantodontia. São Paulo: Quintessence, 2009. p. 97-122.

LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. DE G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 267-271, 1998.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, Stuttgart, v. 260, n. 5110, p. 920-26, 1993.

LASCHKE, M. W.; HARDER, Y.; AMON, M.; MARTIN, I.; FARHADI, J.; RING, A.; TORIO-PADRON, N.; SCHRAMM, R.; RÜCKER, M.; JUNKER, D.; HÄUFEL, J. M.; CARVALHO, C.; HEBERER, M.; GERMANN, G.; VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. ANGIOGENESIS in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. **Tissue Eng.**, Amsterdam, v. 12, p. 8, p. 2093-20104, Aug. 2006. DOI 10.1089/ten.2006.12.2093. PMID 16968151.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 221, n. 1/2, p. 1-22, 2001.

LIMA, Karine Cassano. Regeneração óssea guiada: é a melhor opção?: relato de caso. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 75, p. 104, 2018.

LIU, J.; KERNS, D. G. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. **Open Dent. J.**, Netherlands, v. 16, n. 8, p. 56-65, May 2014. DOI 10.2174/1874210601408010056. PMID 24894890. PMCID PMC4040931.

MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Amsterdam, v. 35, n. 9, p. 1301-1305, 2003.

MAINARD, D. **Les substituts osseux em 2001**: Monographie editée par GESTO (Association pour L'etude des Greffes et substituts Tissulaires en Orthopédie) sous la direction de Dr. Mainard. Paris: Edition Romillat, 2001.

MARQUES, Danilo Roberto Custódio *et al.* Diferentes aplicações do pericárdio bovino preservado em 98% em cães (relato de 22 casos). **Nosso Clín.**, São Paulo, v. 18, n. 104, p. 12-18, 2015. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-737516>. Acesso em: 13 set. 2022.

MEEDER, P.-J.; EGGERS, C. The history of autogenous bone grafting. **Injury**, United Kingdom, v. 25, suppl. 1, p. SA2-4, 1994.

MEUNIER, P. J. *et al.* The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. **Obstetrical & Gynecological Survey**, London, v. 59, n. 7, p. 526-527, 2004.

MIGUEL, F. B.; BARBOSA JÚNIOR, A. A.; PAULA, F. L.; BARRETO, I. C.; GOISSIS, G.; ROSA, F. P. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **J. Mater. Sci. - Mater. Med.**, Berlin, v. 24, n. 11, p. 2567-2575, 2013.

MOREIRA, P. L.; NA, Y. H.; SANTOS JUNIOR, A. R.; GENARI, S. C. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, Medford, v. 71, n. 2, p. 229-237, 2004.

NARDONE, V.; D'ASTA, F.; BRANDI, M. L. Pharmacological management of osteogenesis. **Clinics**, Sao Paulo, v. 69, n. 6, p. 438-446, 2014.

NINA, V. J.; POMERANTZEFF, P. M.; CASAGRANDE, I. S.; CHEUNG, D. T.; BRANDÃO, C. M.; OLIVEIRA, S. A. Comparative study of the L-hydro process and glutaraldehyde preservation. **Asian Cardiovasc. Thorac. Ann.**, Thousand Oaks, v. 13, n. 3, p. 203-207, Sept. 2005. DOI 10.1177/021849230501300302. PMID 16112988.

OHAYON, L.; TASCHIERI, S.; FRIEDMANN, A. DEL FABBRO, M. Bone Graft Displacement After Maxillary Sinus Floor Augmentation With or Without Covering Barrier Membrane: A Retrospective Computed Tomographic Image Evaluation. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, United States, v. 34, n. 3, p. 681-691, May/June 2019. DOI 10.11607/jomi.6940. PMID 30521657.

OLDER, M. W. J. Introduction: History and early research on bone transplantation. *In*: OLDER, M. W. J. (ed.). **Bone implant grafting**. London: Springer Verlag, 1992. p. 14-18.

PATUKALE, Aditya *et al.* Outcomes of pulmonary valve leaflet augmentation for transannular repair of tetralogy of Fallot. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, Philadelphia, v. 162, n. 5, p. 1313-1320, 2021.

PIZZICANNELLA, Jacopo *et al.* Bovine pericardium membrane, gingival stem cells, and ascorbic acid: A novel team in regenerative medicine. **Eur. J. Histochem. EJH**, Italy, v. 63, n. 3, p. 169-177, 2019.

QUERIDO, W.; ROSSI, A. L.; FARINA, M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. **Micron**, Oxford, v. 80, p. 122-134, 2016.

RITTO, F. G.; PIMENTEL, T.; CANELLAS, J. V. S.; JUNGER, B.; CRUZ, M.; MEDEIROS, P. J. Randomized double-blind clinical trial evaluation of bone healing after third molar surgery with the use of leukocyte - and platelet-rich fibrin. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Amsterdam, v. 48, n. 8, p. 1088-1093, Aug. 2019. DOI 10.1016/j.ijom.2019.01.020. PMID 30910410.

ROTHAMEL, D.; SCHWARZ, F.; SAGER, M.; HERTEN, M.; SCULEAN, A.; BECKER, J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. **Clin. Oral Implants Res.**, Medford, v. 16, n. 3, p. 369-378, Jun. 2005. DOI 10.1111/j.1600-0501.2005.01108.x. PMID 15877758.

SAIDAK, Z.; MARIE, P. J. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. **Pharmacol & Therapeutics**, Oxfordshire, v. 136, n. 2, p. 216–226, 2012.

SAM, G.; PILLAI, B. R. Evolution of barrier membranes in periodontal regeneration: Are the third generation membranes really here? **J. Clin. Diagn. Res.**, Delhi, v. 8, n. 12, p. ZE14-17, Dec. 2014. DOI 10.7860/JCDR/2014/9957.5272. PMID 25654055. PMCID PMC4316361.

SCHMIDT, A. H. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? **Injury**, United Kingdom, v. 52, suppl. 2, p. S18-S22, June 2021. DOI 10.1016/j.injury.2021.01.043. PMID 33563416.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, United States, v. 205, p. 299-308, Apr. 1986. PMID 3084153.

SHENG, Weiyong *et al.* Aortic valve replacement with bovine pericardium in patients with aortic valve regurgitation a single-center experience. **Int. Heart J.**, Japan, v. 60, p. 1344-1349, 2019.

SHENNIB, H.; BARIBAULT, M.; HEUSER, R. Bovine xenograft pericardial patch use for definitive single stage repair of a large esophageal defect: a case report. **J. Cardiothorac. Surg.**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 300, Oct. 2021. DOI 10.1186/s13019-021-01670-0. PMID 34645503. PMCID PMC8515757.

SIMONET, W. S. *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, United States, v. 89, n. 2, p. 309-319, Apr. 1997. DOI 10.1016/s0092-8674(00)80209-3. PMID 9108485.

SODIAN, R.; HOERSTRUP, S. P.; SPERLING, J. S.; DAEBRITZ, S.; MARTIN, D. P.; MORAN, A. M.; KIM, B. S.; SCHOEN, F. J.; VACANTI, J. P.; MAYER, J. E. JR. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. **Circulation**, Dallas, v. 102, n. 19, suppl. 3, p. 122-129, Nov. 2000. DOI 10.1161/01.cir.102.suppl_3.iii-22. PMID 11082357.

SPEER, D. P.; CHVAPIL, M.; ESKELSON, C. D.; ULREICH, J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. **J. Biomed. Mater. Res.**, Medford, v. 14, n. 6, p. 753-764, Nov. 1980. DOI 10.1002/jbm.820140607. PMID 6820019.

STAVROPOULOS, A.; SCULEAN, A.; BOSSHARDT, D. D.; BUSER, D.; KLINGE, B. Pre-clinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models. **Periodontol 2000**, United Kingdom, v. 68, n. 1, p. 55-65, June 2015. DOI 10.1111/prd.12065. PMID 25867979.

STOKOVIC, N.; IVANJKO, N.; MATICIC, D.; LUYTEN, F. P.; VUKICEVIC, S. Bone morphogenetic proteins, carriers, and animal models in the development of novel bone regenerative therapies. **Materials**, Basel, v. 14, n. 13, p. 3513, Jun. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ma14133513>. Acesso em: 12 abr. 2022.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J. Periodontal Res.**, Medford, v. 40, n. 4, p. 287-293, Aug. 2005. DOI 10.1111/j.1600-0765.2005.00814.x. PMID 15966905.

TAL, H.; KOZLOVSKY, A.; NEMCOVSKY, C.; MOSES, O. Bioresorbable collagen membranes for guided bone regeneration. *In*: TAL, H. (ed.). **Bone regeneration**. Croatia: InTech, 2012. p. 111-139.

TAN, B.; TANG, Q.; ZHONG, Y.; WEI, Y.; HE, L.; WU, Y.; WU, J.; LIAO, J. Biomaterial-based strategies for maxillofacial tumour therapy and bone defect regeneration. **Int. J. Oral Sci.**, United Kingdom, v. 13, n. 1, p. 9, Mar. 2021. DOI 10.1038/s41368-021-00113-9. PMID 33727527. PMCID PMC7966790.

TONETTI, M. S.; HÄMMERLE, C. H. European Workshop on Periodontology Group C. Advances in bone augmentation to enable dental implant placement: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. **J. Clin. Periodontol.**, Oxfordshire, v. 35, p. 168-172, 2008.

TROUVIN, A. P.; GOËB, V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. **Clin. Interv. Aging**, United Kingdom, v. 19, n. 5, p. 345-354, Nov. 2010. DOI 10.2147/CIA.S10153. PMID 21228900; PMCID PMC3010170.

VASCONCELOS, S. R. A. **Esponja mineralizada de colágeno aniônico: caracterização Estrutural, biocompatibilidade e resposta regenerativa em Defeitos críticos com impregnação de diferentes concentrações de sinvastatina.** 2014. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

VERÍSSIMO, D. M.; LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; FIGUEIRÓ, S. D.; SOMBRA, A. S. B.; GÓES, J. C.; BRITO, G. A. C. Polyanionic collagen membranes for guided tissue regeneration: Effect of progressive glutaraldehyde cross-linking on biocompatibility and degradation. **Acta Biomater.**, Amsterdam, v. 6, n. 10, p. 4011-4018, 2010.

WIESMANN, H. P.; HARTIG, M.; STRATMANN, U.; MEYER, U.; JOOS, U. Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblastlike cells in vitro. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1538, p. 28-37, 2001.

WITTKOWSKA, C.; REILLY, G. C.; LACROIX, D.; PERRAULT, C. M. *In Vitro* Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, Lausanne, v. 15, n. 4, p. 87, Nov. 2016. DOI 10.3389/fbioe.2016.00087. PMID 27896266; PMCID PMC5108781.

WONGSUPA, N.; NUNTANARANONT, T.; KAMOLMATTAYAKUL, S.; THUAKSUBAN, N. Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem cells/poly(ϵ -caprolactone)-biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, Netherlands, v. 28, n. 5, p. 77, May 2017. DOI 10.1007/s10856-017-5883-x. PMID 28386853.

XU, Huanhuan *et al.* Effect of caffeine on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. **Biomed. Pharmacother.**, Amsterdam, v. 112, p. 108650, 2019.

YUSHKEVICH, P. A.; PIVEN, J.; HAZLETT, H. C.; SMITH, R. G.; HO, S.; GEE, J. C.; GERIG, G. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures:

significantly improved efficiency and reliability. **Neuroimage**, Amsterdam, v. 31, p. 3, p. 1116-1128, Jul. 2006. DOI 10.1016/j.neuroimage.2006.01.015. PMID 16545965.

ZAKARIA, Osama. In situ soft tissue regeneration using periosteal distraction: A preliminary study in the rat calvarial model. **Saudi Dent. J.**, Amsterdam, v. 33, n. 7, 587-594, 2021.

ZAVAZAVA, N.; SIMON, A.; SIEVERS, H. H.; BERNHARD, A.; MÜLLER-RUCHHOLTZ, W. Porcine valves are reendothelialized by human recipient endothelium in vivo. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, Philadelphia, v. 109, n. 4, p. 702-706, Apr. 1995. DOI 10.1016/S0022-5223(95)70351-9. PMID 7715217.

ZHU, L. *et al.* Application of BMP in bone tissue engineering. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, Lausanne, v. 10, p. 1-25, 2022.

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito do gel HPMC com ranelato de estrôncio na cicatrização óssea de defeitos críticos de calota craniana de coelhos”, protocolo 101/17, sob responsabilidade da Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 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 – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 22 de fevereiro de 2018.

Vigência do projeto	01/10/2017 – 01/10/2020
Espécie/Linhagem	Coelho Nova Zelândia
Nº de Animais	30
Peso	3,5 kg
Sexo	Macho
Origem	Coelhário do Departamento de Zootecnia

Alexandre Havt Bindá

Fortaleza, 23 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1668982

RECEBIDO POR: GUILHERME FERREIRA MACIEL DA SILVA 28/06/18
Guilherme Ferreira Maciel da Silva