



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CAMPUS SOBRAL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**LANA KARINE ARAÚJO**

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS COMERCIAIS  
PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRANIANOS DE RATOS**

**SOBRAL**

**2022**

LANA KARINE ARAÚJO

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS COMERCIAIS  
PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRANIANOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Análise Integrativa de Sistemas Biológicos.

Orientador: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva.

SOBRAL

2022

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

---

- A69a Araújo, Lana Karine.  
Análise da eficiência de membranas poliméricas comerciais para regeneração óssea em defeitos cranianos de ratos / Lana Karine Araújo. – 2022.  
53 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva.
1. Regeneração tecidual guiada. 2. Materiais Biocompatíveis. 3. Implantes absorvíveis. 4. Colágeno. I.  
Título.

CDD 660.6

---

LANA KARINE ARAÚJO

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS COMERCIAIS  
PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRANIANOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Análise Integrativa de Sistemas Biológicos.

Orientador: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva.

Aprovada em: 16 / 08 / 2022.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Marcelo Miranda de Melo (Membro interno)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Anderson de Oliveira Paulo (Membro externo)  
Centro Universitário Instituto de Educação Superior de Brasília

Dedico esta conquista ao meu pai, José Erimar (*in memoriam*) e minha mãe Marta Maria.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico:  
é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais  
que impressionam como e fossem um conto de fadas.”

Marie Skłodowska-Curie

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar-me saúde e perseverança para eu aproveitar este momento de aprendizado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio ao mestrado.

Ao Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva, pela orientação presente e fundamental para a minha formação acadêmica.

Aos colegas de Iniciação Científica do Grupo de Estudo em Morfologia Yasmin, Mirrael, Abrahão, Carol e Andresa pelo espírito de equipe e sua prestimosa dedicação nos experimentos.

Aos Prof. Anderson Paulo e Marcelo Melo, que gentilmente aceitaram compor a banca avaliadora e compartilhar seus importantes conhecimentos para aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao meu colega Fábio Souza, por todas as colaborações diretas e indiretas para esta pesquisa.

Ao Prof. Jacques Maciel, pelo ombro amigo e dicas preciosas nas técnicas de pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará, pela formação humana e profissional concedida.

A todos os cidadãos brasileiros que contribuíram por meio de seus impostos para que esta pesquisa se tornasse possível.

## RESUMO

A regeneração óssea desafia as áreas médica e odontológica, sendo limitada em defeitos extensos, o que motiva a busca por membranas de barreira, dispositivos biocompatíveis e reabsorvíveis destinados a inibir a invaginação de tecido mole e favorecer a osteogênese. O mercado consumidor possui membranas osteopromotoras validadas para uso clínico, porém a comparação do desempenho dessas opções terapêuticas é pouco conhecida. O objetivo deste trabalho foi analisar a eficiência de diferentes membranas poliméricas comerciais aplicadas à regeneração óssea guiada usando o modelo experimental de defeito de tamanho crítico em ratos. Um defeito ósseo de 8mm foi criado na calvária de cada um dos 60 ratos Wistar machos adultos deste estudo. Os animais receberam um dos seis tratamentos a seguir: membrana colágena bovina LuminaCoat™ (G1), membrana de PTFE Surgitime™ (G2), membrana de osso cortical bovino GenDerm™ (G3), membrana de PLGA Pratix™ (G4), membrana de pericárdio bovino Techgraft™ (G5) ou coágulo sanguíneo (C-). Os animais foram eutanizados em 1 ou 3 meses após cirurgia, para análise histológica e histomorfométrica da presença percentual de osso neoformado, tecido conjuntivo e biomaterial. Para cada parâmetro, ANOVA com pós-teste de Tukey foi aplicada na análise das médias entre grupos e controle em cada tempo experimental e o teste t de Student pareado foi usado na análise das médias do mesmo grupo entre os dois diferentes tempos experimentais, considerando  $p < 0,05$ . Houve quantidade variável de osso neoformado adjacente às bordas dos defeitos ósseos, superior às ilhotas de osso em sua região mais central, com aumento progressivo da osteogênese centrípeta entre 1 e 3 meses para todos os grupos e C-. O tecido conjuntivo foi mais abundante no C- frente aos grupos, evoluindo de uma matriz extracelular frouxa em 1 mês para um modelo mais fibroso em 3 meses. Foi possível observar a presença de material em até 3 meses em todos os grupos exceto no C-, não havendo degradação perceptível para G2 e G4 enquanto G1 e G3 apresentaram degradação evidente do material entre 1 e 3 meses. As médias de osso novo em 1 mês foram maiores para G2 frente a G1, G4 e G3 bem como para G5 e C- frente a G3, em 3 meses não houve diferenças entre os grupos e entre 1 e 3 meses para G4, que teve maior ganho ósseo. As médias de tecido conjuntivo em 1 mês foram maiores para C- frente a G3, G5, G2 e G1, em 3 meses para G4 e G5 frente a G1 e G2 bem como para C- frente a G2 e entre 1 e 3 meses para C-, que teve expressiva diminuição de tecido conjuntivo. As médias de biomaterial em 1 mês foram maiores para G1 frente a G4, em 3 meses para G2 frente a G4 e G3 bem como para G5 frente a G3 e entre 1 e 3 meses para G1, G3 e G5, que tiveram expressiva diminuição de biomaterial. Considerando os resultados alcançados ao longo dos 3 meses do experimento e os requerimentos individuais para eleição de uma membrana regenerativa ideal, a ordem decrescente de eficiência quanto a capacidade osteopromotora seria:  $G2 > G4 > G5 > G1 > G3$ . Quanto a menor tendência à conjuntivização, a ordem decrescente de eficiência seria:  $G2 > G1 > G5 > G3 > G4$ . Por fim, quanto a presença de biodegradação, da modalidade mais acelerada até à de não reabsorção, a ordem decrescente de eficiência seria:  $G3 > G4 > G1 > G5 > G2$ . A dificuldade em atender ao conjunto de especificidades para a escolha de uma membrana regenerativa ideal suscita discussões mais aprofundadas sobre os fatores intrínsecos de cada biomaterial, como composição, origem e espessura, moduladores diferenciais de seu desempenho na regeneração óssea guiada.

**Palavras-chave:** Regeneração tecidual guiada. Materiais Biocompatíveis. Implantes absorvíveis. Colágeno.



## ABSTRACT

Bone regeneration challenges the medical and dental fields, being limited in extensive defects, which motivates the search for barrier membranes, biocompatible and resorbable devices designed to inhibit soft tissue invagination and favor osteogenesis. The consumer market has osteopromotive membranes validated for clinical use, but the comparison of the performance of these therapeutic options is little known. The objective of this work was to analyze the efficiency of different commercial polymeric membranes applied to guided bone regeneration using the experimental model of critical size defect in rats. An 8mm bone defect was created in the calvaria of each of the 60 adult male Wistar rats in this study. Animals received one of the following six treatments: LuminaCoat™ bovine collagen membrane (G1), Surgitime™ PTFE membrane (G2), GenDerm™ bovine cortical bone membrane (G3), Pratix™ PLGA membrane (G4), Techgraft™ bovine pericardium membrane (G5) or blood clot (C-). The animals were euthanized at 1 or 3 months after surgery, for histological and histomorphometric analysis of the percentage presence of newly formed bone, connective tissue and biomaterial. For each parameter, ANOVA with Tukey's post-test was applied in the analysis of the means between groups and control at each experimental time and the paired Student's t test was used in the analysis of the means of the same group between the two different experimental times, considering  $p < 0.05$ . There was a variable amount of newly formed bone adjacent to the edges of the bone defects, superior to the islets of bone in its most central region, with a progressive increase in centripetal osteogenesis between 1 and 3 months for all groups and C-. The connective tissue was more abundant in the C- front of the groups, evolving from a loose extracellular matrix in 1 month to a more fibrous model in 3 months. It was possible to observe the presence of material in up to 3 months in all groups except for C-, with no noticeable degradation for G2 and G4, while G1 and G3 showed evident degradation of the material between 1 and 3 months. New bone means at 1 month were higher for G2 compared to G1, G4 and G3 as well as for G5 and C- compared to G3, at 3 months there were no differences between the groups and between 1 and 3 months for G4, which had greater bone gain. Means of connective tissue at 1 month were higher for C- against G3, G5, G2 and G1, at 3 months for G4 and G5 against G1 and G2 as well as for C- against G2 and between 1 and 3 months for C-, which had a significant decrease in connective tissue. The biomaterial means at 1 month were higher for G1 compared to G4, in 3 months for G2 compared to G4 and G3 as well as for G5 compared to G3 and between 1 and 3 months for G1, G3 and G5, which had a significant decrease in biomaterial. Considering the results achieved over the 3 months of the experiment and the individual requirements for choosing an ideal regenerative membrane, the decreasing order of efficiency in terms of osteopromotive capacity would be:  $G2 > G4 > G5 > G1 > G3$ . As for the lower tendency to connective tissue formation, the decreasing order of efficiency would be:  $G2 > G1 > G5 > G3 > G4$ . Finally, regarding the presence of biodegradation, from the most accelerated modality to the non-resorption modality, the decreasing order of efficiency would be:  $G3 > G4 > G1 > G5 > G2$ . The difficulty in meeting the set of specificities for choosing an ideal regenerative membrane raises further discussions about the intrinsic factors of each biomaterial, such as composition, origin and thickness, differential modulators of its performance in guided bone regeneration.

**Key words:** Guided tissue regeneration. Biocompatible Materials. Absorbable Implants. Collagen.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Análise histológica de membranas comerciais poliméricas em defeito ósseo de tamanho crítico em calvária de rato após 1 e 3 meses de cirurgia.....29
- Figura 2** – Histomorfometria de osso novo em defeitos críticos de ratos .....30
- Figura 3** – Histomorfometria de tecido conjuntivo em defeitos críticos de ratos.....31
- Figura 4** – Histomorfometria de biomaterial em defeitos críticos de ratos.....32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>e.g</b>	<i>Exempli gratia</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>HA</b>	Hidroxiapatita
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PLGA</b>	Ácido poli(lático-co-ácido glicólico)
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno
<b>3R -ARRIVE</b>	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
<b>ROG</b>	Regeneração óssea guiada
<b>SP</b>	São Paulo
<b>TCP</b>	Fosfato tricálcico
<b>UFC</b>	Universidade federal do Ceará
<b>(v/v)</b>	Volume-volume

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
™	Marca registrada
®	Marca registrada
<b>mm</b>	Milímetros
<b>µm</b>	Micrômetros
<b>Kg</b>	Quilogramas
<b>mg</b>	Miligramas
<b>n</b>	Número
<b>β</b>	Beta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Tecido ósseo.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Tratamento de perdas ósseas.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Biomateriais.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Colágeno.....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>4. MANUSCRITO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DA CEUA-UFC SOBRAL.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO B – REVISTA PARA ENCAMINHAMENTO DO MANUSCRITO.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO C – REGIMENTO DO PPGB PARA A DEFESA DE DISSERTAÇÃO.....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Patologias como traumatismos, neoplasias, osteoporose, defeitos congênitos, entre outras, estão comumente associadas à perdas ósseas severas, podendo gerar incapacidade funcional, promovendo grande impacto na qualidade de vida dos pacientes (VENKATESAN *et al.*, 2015). Assim, o reparo de defeitos ósseos é um dos grandes desafios da medicina regenerativa e da odontologia, em especial na área de cirurgia e traumatologia bucomaxilo facial (CASTRO-SILVA; ZAMBUZZI; GRANJEIRO, 2009).

Dependendo do tamanho da injúria e do defeito gerado, o tecido ósseo é capaz de regenerar-se espontaneamente, no entanto, tratando-se de grandes defeitos é necessária intervenção cirúrgica e utilização de substitutos ósseos, como forma de evitar uma possível degeneração tecidual adicional, reduzir complicações e facilitar o reparo (CROCKETT *et al.*, 2011). Estes substitutos ósseos ou biomateriais são capazes de mimetizar as propriedades naturais do tecido lesado e podem ser enxertados de forma isolada ou associados a outros materiais (TANG *et al.*, 2016).

Biomateriais podem ser definidos como substâncias capazes de interagir com os sistemas biológicos e promover o reparo de tecidos injuriados, substituí-los ou auxiliar em sua função natural sem apresentar riscos ao hospedeiro (TANG *et al.*, 2016).

Alguns fatores estão associados à escolha de um biomaterial para uso como enxerto ósseo, dentre eles, estão a viabilidade dos tecidos, o tamanho e o volume do defeito a ser reparado, as propriedades biomecânicas do material e sua origem (SINHORET; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

As possibilidades de tratamentos clínicos atuais para reparação e regeneração do tecido ósseo, incluindo enxertos e membranas, possuem vantagens e desvantagens específicas e apresentam sucesso limitado (TAL, 2012).

Desta forma, tem-se buscado desenvolver novos dispositivos implicados com a Regeneração Óssea Guiada (ROG), tornando ascendente, nos últimos anos, os investimentos e pesquisas na área de biomateriais capazes de promover ou auxiliar o reparo de estruturas ósseas injuriadas (BITTENCOURT *et al.*, 2014).

Grande parte das membranas osteopromotoras é constituída pela biomolécula de colágeno, componente primário da matriz extracelular do tecido conjuntivo, que apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade e grande disponibilidade. (TAL, 2012; MELO, 2017).

Diante disto, o presente estudo objetiva analisar a performance de diferentes membranas comerciais em modelo experimental *in vivo* de defeito de tamanho crítico em calvária de ratos, avaliando sua osteopromoção, formação conjuntiva e biodegradabilidade.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, apresenta remodelação contínua em resposta a estímulos mecânicos, bem como possui capacidade única de autorreparo após dano tecidual (TORTORA; DERRICKSON, 2017). Apresenta uma camada mais externa, ou cortical, com morfologia densa e sólida e outra mais interna ou esponjosa, constituída por uma rede trabecular (BILEZIKIAN et al., 2002; CLARKE, 2008; STEVENS *et al.*, 2008). O revestimento destas camadas externa e interna é feito por membranas conjuntivas, denominadas periósteo e endósteo respectivamente, responsáveis por irrigar e inervar o tecido ósseo, são compostas por células osteogênicas, além de vasos sanguíneos e nervos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

É constituído por diferentes tipos celulares e por uma abundante matriz extracelular mineralizada, o que garante consistência endurecida e resistência ao tecido (ROSS; PAWLINA, 2016). A matriz óssea é constituída por componentes orgânicos (35%), dos quais o mais abundante é o colágeno tipo I (SALO, 2002) e por componentes inorgânicos (65%), dos quais se destacam os cristais de hidroxiapatita (CROCKETT *et al.*, 2011). As porções orgânica e inorgânica da matriz estão relacionadas a características como, elasticidade, flexibilidade e grau de rigidez do tecido formado (TORTORA; DERRICKSON, 2017).

Quanto às células constituintes do processo de formação e remodelação óssea é importante citar: as células osteoprogenitoras, células mesenquimais indiferenciadas, comumente presentes no periósteo; os osteoblastos, responsáveis pela síntese e deposição de colágeno e excreção de proteínas como osteocalcina e fosfatase alcalina, estando estas células diretamente relacionadas ao processo de formação e aposição óssea; os osteócitos, que são



células ósseas maduras, aprisionadas na matriz e que passam por diferentes graus de maturação até entrarem em homeostasia; e os osteoblastos, que são responsáveis pela reabsorção da matriz óssea, através da liberação de enzimas lisossômicas que degradam a porção mineral da matriz. (ROSS; PAWLINA, 2016).

Todo este processo conjunto de reabsorção e aposição óssea, denominado remodelação, faz parte do desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo, bem como pode ser observado no reparo, em condições de patologia ou trauma deste tecido. (CROCKETT *et al.*, 2011; DENG; LIU, 2005).

Em caso de lesão, o osso pode reparar-se por meio de dois processos: a cicatrização óssea direta ou indireta. A cicatrização óssea direta ocorre por exemplo, quando há a possibilidade de a fratura óssea ser reduzida e estabilizada cirurgicamente através de sistemas de placas e parafusos utilizados na fixação interna rígida. Neste processo, o tecido ósseo sofre uma consolidação e remodelação interna. Já a cicatrização óssea indireta, ocorre por exemplo, quando há perda substancial de tecido, ou quando não há a possibilidade de intervenção cirúrgica ou redução estabilização da fratura. (ROSS; PAWLINA, 2016).

Após a injúria ao tecido uma série de eventos bioquímicos se inicia, objetivando a homeostasia tecidual, dividindo-se em 3 principais estágios, sendo estes: inflamação, reparo ou cicatrização e remodelação. Inicia-se com a migração de células inflamatórias para o local da lesão, posteriormente, há a migração e diferenciação de células mesenquimais, bem como a proliferação de fibroblastos e neovascularização. Ocorre em seguida, a substituição do coágulo sanguíneo por um tecido de granulação frouxo e bastante celularizado, que aos poucos irá se tornar mais denso e formar o calo fibrocartilaginoso. As células mesenquimais, já diferenciadas em osteoblastos, iniciam a deposição de material osteóide na camada externa, o que constitui a ossificação intramembranosa. Gradualmente o calo fibrocartilaginoso original é substituído por um calo duro, apresentando maior rigidez e posteriormente o tecido esponjoso é substituído por

tecido ósseo, como na ossificação endocondral. A remodelação, possibilita a gradual reabsorção do calo duro pelos osteoclastos, enquanto há a maturação do tecido ósseo neoformado (ROSS; PAWLINA, 2016; KNESER *et al.*, 2006).

## 2.2 Tratamento de perdas ósseas

Apesar da capacidade de remodelação e autorreparo do tecido ósseo, esta pode estar limitada ao tratar-se de grandes defeitos, o que pode ser ocasionado por diversas patologias e ou trauma. (TANG *et al.*, 2016). Diante disto, a bioengenharia tecidual e a medicina regenerativa muito discute quanto às possíveis terapêuticas, o que inclui diversos tipos de biomateriais, enxertos ósseos e membranas. Os quais, devem ser indicados com base nas propriedades biológicas necessárias, composição química, densidade e tamanho do defeito, objetivando facilitar o processo natural de diferenciação e reparo tecidual (DIMITRIOU *et al.*, 2012; BILEZIKIAN *et al.*, 2002; CLARKE, 2008; PRAKASAM *et al.*, 2015).

Os enxertos ósseos são comumente classificados quanto a sua origem, dividindo-se em: Autógeno (originado do próprio indivíduo); Alógeno (originado de indivíduos de mesma espécie); Xenógeno (originado de espécies diferentes); e Aloplástico (originado de forma sintética). O osso autógeno, apesar de apresentar desvantagens relacionadas à morbidade e à disponibilidade, é considerado padrão ouro, devido à sua capacidade única de reunir as seguintes características: osteogênese, osteocondução, osteoindução e biocompatibilidade. Tais características e conceitos são fundamentais aos materiais utilizados em regeneração óssea, bem como, serão analisadas neste estudo. (CALORI *et al.*, 2011).

Define-se como biocompatibilidade a característica de um material, sendo este ativo ou inerte, não gerar toxicidade, reação imune ou resposta inflamatória, ao interagir com um sistema biológico. (RATNER *et al.*, 2012; AHADIAN *et al.*, 2017). Deste modo, tal característica está

relacionada a segurança que um material apresenta ao estar em contato com um determinado tecido biológico por tempo específico (NAYAK *et al.*, 2018).

A osteoindução caracteriza-se como um processo que induz a mitose de células mesenquimais indiferenciadas, promovendo a formação de células osteoprogenitoras, capazes de gerar um novo tecido ósseo (MARSHAL URIST, 1965). A osteocondução refere-se à capacidade de um material atuar como um arcabouço para a migração, adesão e proliferação de células ósseas circundantes ao local do defeito. (TAL, 2012). Enquanto que a osteopromoção é caracterizada por possibilitar um microambiente favorável ao estabelecimento de coágulo sanguíneo, rede de fibrina, recrutamento, proliferação e diferenciação de células osteogênicas, através do uso de barreiras físicas e biológicas (membranas), as quais irão impedir o povoamento de tipos celulares indesejados (MASQUELET *et al.*, 2010).

Nesta perspectiva, foi desenvolvida a técnica de regeneração óssea guiada (ROG), que consiste na utilização de uma barreira de membrana osteopromotora na região dos defeitos ósseos, que visa impedir o repovoamento do sítio ósseo por células de outros tecidos conjuntivos, ou células epiteliais, haja vista, que estas são as primeiras a migrar para o local do defeito, afetando negativamente o processo de reparo ósseo (MOTA *et al.* 2012).

Na ROG, é também possível realizar a associação entre enxertos ósseos (autógenos, alógenos, xenógenos ou aloplásticos) e membranas (reabsorvível ou não-reabsorvível), em um mesma região de defeito ósseo, possibilitando um efeito sinérgico dos biomateriais, afim de aumentar a neoformação óssea.(DIMITRIOU *et al.*, 2012).

No entanto, estas membranas apresentam algumas limitações em relação às propriedades mecânicas e biológicas, bem como, possuem elevados valores de mercado. Diante deste cenário, têm-se buscado o estudo da eficiência de membranas, que apresentem preços razoáveis e características aprimoradas, como biocompatibilidade, osteoindução e osteocondução, sendo capazes de atuar na interface biomaterial/defeito ósseo e no processo de

regeneração óssea como um todo (MASQUELET *et al.*, 2010; KWON e SEOK, 2018).

### 2.3 Biomateriais

O estudo dos biomateriais versa sobre aspectos físicos e químicos de materiais e dispositivos que objetivam reparo, aumento ou substituição de tecidos através de interação com sistemas biológicos. Espera-se, portanto, que estes materiais apresentem características específicas relacionadas aos tecidos e sistemas biológicos em que irão atuar, para o uso em aplicações biomédicas e reparo do tecido ósseo algumas características se fazem indispensáveis, dentre elas é possível citar, biocompatibilidade, biodegradabilidade, porosidade e bioatividade. (GALLER *et al.*, 2011; GUASTALDI; APARECIDA, 2010; NAYAK *et al.*, 2018).

Dentre as diversas aplicações dos biomateriais, em especial na regeneração óssea, tem-se destacado o desenvolvimento de matrizes e arcabouços, capazes de mimetizar a estrutura e a composição dos tecidos originais, a fim de facilitar de facilitar a interação entre os mecanismos celulares, favorecendo, portanto, o reparo tecidual ósseo (MANDAL *et al.*, 2012; MCNAMARA *et al.*, 2014; MELKE *et al.*, 2016).

Os biomateriais podem ainda ser classificados quanto sua origem e composição, podendo apresentar-se como naturais e sintéticos, e ou como polímeros, metais, cerâmicas e compósitos. (BRONZINO; WONG; PETERSON, 2012).

São denominados compósitos aqueles materiais formados por dois ou mais constituintes, com a finalidade de unir composições e propriedades individuais, gerando um composto com características superiores quando comparados às suas formulações individuais. (SWETHA *et al.*; 2010)

A exemplo disto, tem-se a formulação de compósitos a base de colágeno e hidroxiapatita, que muito tem sido estudado devido a sua similaridade em relação a constituição

natural da matriz óssea (FENG *et al.*; 2017).

## 2.4 Colágeno

O colágeno é um biopolímero natural, presente em diversos tecidos conjuntivos, como por exemplo em peles, ossos, tendões e cartilagem de diversos animais, corresponde a cerca de 30% do total de proteínas presentes nesses tecidos. Possui mais de 20 tipos, sendo o colágeno tipo I o mais abundante na matriz extracelular e o mais utilizado como biomaterial (KUCCHARZ, 1992). A composição estrutural do colágeno tipo I, chamada de tripla hélice, envolve três cadeias polipeptídicas, sendo a glicina, prolina e hidroxiprolina os principais aminoácidos presentes (RUMPLER *et al.*, 2008).

Disposto estruturalmente na forma de fibrilas, sua principal função é promover força e resistência mecânica ao tecido conjuntivo. Além disto, possui um papel fundamental na regulação do reparo tecidual e na adesão celular, apresenta características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, elasticidade, além de possuir alto valor comercial. (CHENG *et al.*, 2009).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi analisar a eficiência de diferentes membranas poliméricas comerciais aplicadas à regeneração óssea guiada usando o modelo experimental de defeito de tamanho crítico em ratos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar qualitativa e quantitativamente a formação de osso novo com uso de diferentes membranas poliméricas no tratamento de defeitos críticos;
- Analisar qualitativa e quantitativamente a formação de tecido conjuntivo com uso de diferentes membranas poliméricas no tratamento de defeitos críticos;
- Analisar qualitativa e quantitativamente a presença de biomaterial implantado das diferentes membranas poliméricas usadas no tratamento de defeitos críticos.

#### 4. MANUSCRITO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

##### TÍTULO:

Análise da eficiência de membranas poliméricas comerciais para regeneração óssea em defeitos cranianos de ratos

##### AUTORES:

Lana Karine Araújo<sup>1</sup>, Mirrael de Sousa Lopes<sup>2</sup>, Marcelo Miranda de Melo<sup>3</sup>, Anderson de Oliveira Paulo<sup>4</sup> e Igor Iuco Castro-Silva<sup>5\*</sup>

1. MSc. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral (CE), Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-2200-8313>

2. DDS. Dental school, Universidade Federal do Ceará, Sobral (CE), Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-8664-9251>

3. PhD. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral (CE), Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-2605-1319>

4. PhD. Curso de Odontologia, Centro Universitário Instituto de Educação Superior de Brasília, Brasília (DF), Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-0494-3845>

5. PhD. Programas de Pós-graduação em Odontologia e Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral (CE), Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-4815-6357>

\*Autor de correspondência:

Igor Iuco Castro-Silva\*

E-mail: igor.iuco@sobral.ufc.br, Tel: 55(88)99837-3015

Laboratório de Biomateriais/Bloco de Laboratório da Pós-graduação, Avenida Comandante

Mauroc elio Rocha Ponte, 100, Jocely Dantas de Andrade Torres, Sobral, Ceara, Brazil CEP 62042-280.

## RESUMO

**Purpose:** Bone regeneration challenges the medical and dental fields, being limited in extensive defects, which motivates the search for barrier membranes, biocompatible and resorbable devices designed to inhibit soft tissue invagination and favor osteogenesis. The consumer market has osteopromotive membranes validated for clinical use, but the comparison of the performance of these therapeutic options is little known. The objective of this work was to analyze the efficiency of different commercial polymeric membranes applied to guided bone regeneration using the experimental model of critical size defect in rats. **Methods:** An 8mm bone defect was created in the calvaria of each of the 60 adult male Wistar rats in this study. Animals received one of the following six treatments: LuminaCoat<sup>TM</sup> bovine collagen membrane (G1), Surgitime<sup>TM</sup> PTFE membrane (G2), GenDerm<sup>TM</sup> bovine cortical bone membrane (G3), PratiX<sup>TM</sup> PLGA membrane (G4), Techgraft<sup>TM</sup> bovine pericardium membrane (G5) or blood clot (C-). The animals were euthanized at 1 or 3 months after surgery, for histological and histomorphometric analysis of the percentage presence of newly formed bone, connective tissue and biomaterial. For each parameter, ANOVA with Tukey's post-test was applied in the analysis of the means between groups and control at each experimental time and the paired Student's t test was used in the analysis of the means of the same group between the two different experimental times, considering  $p < 0.05$ . **Results:** There was a variable amount of newly formed bone adjacent to the edges of the bone defects, superior to the islets of bone in its most central region, with a progressive increase in centripetal osteogenesis between 1 and 3 months for all groups and C-. The connective tissue was more abundant in the C- front of the groups, evolving from a loose extracellular matrix in 1 month to a more fibrous model in 3 months. It was possible to observe the presence of material in up to 3 months in all groups except for C-, with no noticeable degradation for G2 and G4, while G1 and G3 showed evident degradation of the material between 1 and 3 months. New bone means at 1 month were higher for G2 compared to G1, G4 and G3 as well as for G5 and C- compared to G3, at 3 months there were no differences between the groups and between 1 and 3 months for G4, which had greater bone gain. Means of connective tissue at 1 month were higher for C- against G3, G5, G2 and G1, at 3 months for G4 and G5 against G1 and G2 as well as for C- against G2 and between 1 and 3 months for C-, which had a significant decrease in connective tissue. The biomaterial means at 1 month were higher for G1 compared to G4, in 3 months for G2 compared to G4 and G3 as well as for G5 compared to G3 and between 1 and 3 months for G1, G3 and G5, which had a significant decrease in biomaterial. **Conclusion:** Considering the results achieved over the 3 months of the experiment and the individual requirements for choosing an ideal regenerative membrane, the decreasing order of efficiency in terms of osteopromotive capacity would be:  $G2 > G4 > G5 > G1 > G3$ . As for the lower tendency to connective tissue formation, the decreasing order of efficiency would be:  $G2 > G1 > G5 > G3 > G4$ . Finally, regarding the presence of biodegradation, from the most accelerated modality to the non-resorption modality, the decreasing order of efficiency would be:  $G3 > G4 > G1 > G5 > G2$ . The difficulty in meeting the set of specificities for choosing an ideal regenerative membrane raises further discussions about the intrinsic factors of each biomaterial, such as composition, origin and thickness, differential modulators of its performance in guided bone regeneration.

**Key words:** Materials testing; Biocompatible Materials; Bone Regeneration; Guided tissue regeneration.



## Introdução

Perdas ósseas severas, comumente ocasionadas por fraturas e ou patologias, apresentam-se como um importante problema de saúde, visto que podem gerar alterações funcionais ou estéticas, afetando a qualidade de vida dos pacientes acometidos.<sup>1</sup> Apesar de novas tecnologias, o seu tratamento clínico em implantodontia, periodontia e cirurgia bucomaxilofacial continua sendo um desafio.<sup>2</sup>

A regeneração óssea ocorre de forma limitada em defeitos de grandes dimensões, sendo necessária a utilização de biomateriais osteopromotores capazes de potencializar este reparo.<sup>3</sup> A regeneração óssea guiada (ROG) em Odontologia consiste na utilização de barreiras de membranas associadas a enxertos na região do defeito ósseo, adjacente a dentes, alvéolos pós-exodontia ou implantes, a fim de impedir a invasão por tecido mole e criando um ambiente biologicamente favorável à osteogênese e maturação óssea.<sup>4,5</sup>

As características consideradas ideais para as membranas osteopromotoras incluem: biocompatibilidade, oclusividade celular, estabilidade dimensional e boa adaptação.<sup>5,6</sup> A estrutura de algumas membranas não reabsorvíveis, contendo microporos interconectados (e.g., politetrafluoretileno [PTFE] denso com poros  $<3\mu\text{m}$ ) pode favorecer a difusão de fatores nutricionais e oxigênio sem prejudicar a estabilidade mecânica do biomaterial, enquanto porosidade maiores (e.g., malhas de titânio com poros  $>8\mu\text{m}$ ) já não limitam a passagem de microorganismos ou de tecido conjuntivo circunjacente.<sup>7,8</sup> Para membranas reabsorvíveis, a composição biomimética da membrana pode influenciar positivamente no processo de reparo ósseo.<sup>9,10</sup> Uma constituição análoga à matriz extracelular conjuntiva por meio de seus biopolímeros de colágeno poderia ser uma proposta atraente sob a perspectiva da biocompatibilidade e integração progressiva ao leito ósseo receptor.<sup>10,11,12</sup> Outro fator relevante é a espessura das membranas, que pode influenciar sua estabilidade dimensional, a adaptação sobre o defeito ósseo e controlar a permeabilidade para troca de fluidos e gases, com maiores

espessuras atrasando sua total degradação<sup>13</sup>. Há grande variação de espessuras em membranas poliméricas para uso clínico, em geral de 0,1 a 1 mm para atingir uma desejável eficácia osteopromotora.<sup>14</sup>

Membranas reabsorvíveis apresentam vantagens sobre as não reabsorvíveis, como a ausência de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção e o menor risco de infecção quando expostas em meio bucal.<sup>15,16</sup> Entretanto, a biodegradação precisa ocorrer de forma gradual para que seja possível a formação e maturação do tecido ósseo e quanto maior for o defeito, mais lenta deverá ser esta degradação.<sup>16,17</sup> O tempo de degradação tem sido intrinsecamente implicado com a constituição de cada biomaterial, com membranas poliméricas apresentando a faixa de 4 semanas até 6 meses de degradação, onde a explicação para tal discrepância residiria no uso de técnicas de reticulação da matriz fibrilar ou sua associação a apatita.<sup>18,19</sup>

Há uma diversa gama de barreiras de membranas de ROG, sendo as poliméricas as mais estudadas e comercializadas na área biomédica.<sup>15,20,21</sup> As membranas de origem sintética congregam o PTFE, um polímero resistente à degradação, bioinerte, quimicamente estável, poroso e flexível, bem como o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), um polímero bioabsorvível, com degradação controlada.<sup>22,23,24</sup> A origem natural destaca membranas biopoliméricas colágenas, com excelente biocompatibilidade e variável biodegradabilidade.<sup>15,25</sup> A grande disponibilidade orgânica de colágeno permite sua extração de várias fontes xenógenas, a exemplo de tendão, cortical óssea ou pericárdio bovino<sup>22,26,27</sup> ou da submucosa suína.<sup>28,29</sup> Diferenças na composição e organização das matrizes fibrosas acelulares derivadas dos diferentes tipos de tecido conjuntivo podem diferenciar as membranas osteopromotoras entre si quanto a sua morfologia e seu tempo de degradação.<sup>30,31</sup>

Apesar de haver múltiplas opções clínicas validadas de membranas de ROG no mercado odontológico, não existe um material ideal ou padrão ouro, permanecendo como lacuna de conhecimento a eficiência osteopromotora das mesmas<sup>32</sup>. Portanto, este estudo propôs

comparar a performance de diferentes membranas comerciais em modelo experimental *in vivo* de defeito de tamanho crítico em calvária de ratos, avaliando sua osteopromoção, formação conjuntiva e biodegradabilidade.

## **Métodos**

### ***Aspectos éticos***

Este estudo adotou os princípios internacionais de Substituição, Redução e Refinamento em Pesquisa Animal: Relato de Experimentos In vivo (guia 3R-ARRIVE). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará, Sobral, Brasil, sob o número de protocolo n. 06/2020.

### ***Amostras comerciais de membranas de ROG***

Cinco produtos comerciais aprovados para uso clínico odontológico no Brasil foram selecionados: G1/membrana reabsorvível de colágeno tipo I bovino Lumina Coat<sup>®</sup> (Criteria, dimensões: 30 x 20 x 1 mm, Lote LC035/20, registro ANVISA: 80522420002, SP, Brasil), G2/membrana não reabsorvível de PTFE Surgitime<sup>®</sup> (Bionnovation, dimensões: 30 x 20 x 0,25 mm, Lote 069922, registro ANVISA: 10392710009, SP, Brasil), G3/membrana reabsorvível de osso cortical bovino desmineralizado GenDerm<sup>®</sup> (Baumer, dimensões: 20 x 20 x 0,15-0,20 mm, Lote 4336456/004345315, registro ANVISA: 10345500069, SP, Brasil), G4/membrana reabsorvível sintética de PLGA Pratix<sup>®</sup> (Baumer, dimensões: 40 x 30 x 0,15-0,20 mm, Lote 004344590, registro ANVISA: 10345500133, SP, Brasil) ou G5/membrana reabsorvível de pericárdio acelular bovino Techgraft<sup>®</sup> (Baumer, dimensões: 20 x 20 x 0,15-0,25 mm, Lote: 004351444, registro ANVISA: 10345500141, SP, Brasil). Todas as membranas de ROG tiveram suas dimensões comerciais adaptadas às amostras individuais quadrangulares de 10

mm<sup>2</sup>, necessárias para a fase in vivo. Após customização, os materiais foram manipulados assepticamente até o procedimento de implantação.

### ***Implante em defeito de tamanho crítico de rato***

Sessenta animais foram distribuídos de acordo com as diferentes condições experimentais (6 grupos, 2 tempos, 5 animais cada). Os animais tiveram anestesia intramuscular com solução de quetamina 10% (Dopalen<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Brasil) na dose de 100mg/kg e xilazina 2% (Anasedan<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Brasil) na dose de 10 mg/kg. Em seguida, houve tricotomia da parte superior da cabeça e antissepsia com clorexidina 0,5% aquosa. Foi feita uma incisão semilunar seguida de retalho mucoperiosteal, rebatido com elevador de periósto de Molt, expondo o osso cortical na região frontoparietal. Em cada animal foi criado um defeito de tamanho crítico único circular, com 8 mm de diâmetro, usando uma broca cirúrgica trefina (Sistema de Implantes Nacionais, Brasil) acoplada a um contra-ângulo com redução de rotação 20:1 (Dentscler, Brasil) e um micromotor cirúrgico (VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda., Brasil) sob condições de irrigação com solução salina 0,9% fria e estéril durante o procedimento. O fragmento osteotomizado foi gentilmente removido com auxílio de um cinzel Oxsenbein #1. Os grupos teste tiveram o defeito ósseo preenchido por um dos materiais (G1, G2, G3, G4 ou G5). Como controle negativo (C-), foi usado o coágulo sanguíneo. As regiões operadas tiveram suturas simples com fio mononylon 4.0. Foi aplicada medicação subcutânea anti-inflamatória/analgésica Meloxicam (2 mg/kg, Ourofino, Brasil) a cada 12 h por 2 dias. Em 1 e 3 meses após as cirurgias, os animais foram eutanizados por uma overdose de solução anestésica e foi realizada necrópsia excisional imediata da área compatível com cada cirurgia.

### ***Histotécnica, análise histológica e histomorfométrica***

As amostras foram fixadas em solução de formol 10% tamponado (v/v), pH 7,0, por 48h. Após a fixação, todas as necrópsias foram descalcificadas com solução ácida descalcificadora rápida (Allkimia, Brasil) por 4 dias, lavadas em água corrente por 1 h, clivadas com navalha no centro do defeito ósseo, desidratadas em banhos crescentes de 70% a 100% de etanol, diafanizadas em banhos de xilol, impregnadas e incluídas em parafina, evidenciando a região central do defeito ósseo. As amostras emblocadas foram microtomizadas em seções de 4 $\mu$ m e coradas em Hematoxilina-Eosina (HE).

Os fenômenos biológicos foram analisados nas perspectivas qualitativa e quantitativa. De cinco a sete imagens de cada amostra foram capturadas em campos adjacentes, não sobrepostos através da câmera fotográfica Cybershot DSC-W300 Super Steady Shoot (Sony, Japão) acoplada com o microscópio óptico FWL-1000 (Feldman Wild Leitz, Brasil) usando lente objetiva de 10x e zoom digital de 4x, perfazendo uma magnificação final de 40x. Para análise qualitativa, as lâminas de cada grupo teste e controle foram selecionadas e morfologicamente descritas para representar os eventos observados. Os seguintes critérios biológicos foram avaliados na extensão de borda a borda do defeito ósseo, cobrindo seu diâmetro por inteiro: osso neoformado, tecido conjuntivo e biomaterial implantado.

A análise quantitativa histomorfométrica foi realizada por meio do programa ImageJ versão 1.52a (National Institutes of Health, EUA), calibrado em micrômetros/pixel. Os critérios biológicos mencionados anteriormente foram contados usando uma grade de 130 pontos sobreposta em cada fotomicrografia e a partir do número absoluto de pontos obtidos, a densidade de volume percentual (%i) de cada parâmetro foi determinada de acordo com a Eq. (1):

$$\%i = \left(\frac{p_i}{P}\right) 100\% \quad (1)$$

Onde  $p_i$  representa o número de pontos do parâmetro e  $P$  o número total de pontos.

Os dados de cada parâmetro foram tabulados em Excel (Microsoft Office, EUA),

expressos graficamente como média±desvio padrão e estatisticamente analisados usando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad, EUA) para comparações de grupos e tempos experimentais. Análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey foi aplicada para analisar a distribuição normal/paramétrica das médias de cada parâmetro entre os cinco grupos experimentais e o controle em cada tempo experimental. Teste t de Student pareado foi aplicado para analisar a distribuição normal/paramétrica das médias de cada parâmetro entre os cinco grupos experimentais e o controle em cada tempo experimental, como amostras dependentes. Foram consideradas diferenças significantes se  $p < 0,05$  (grau de confiança de 95%) .

## **Resultados**

A análise histológica evidenciou que todos os tratamentos e o C- apresentaram variável quantidade de osso neoformado adjacente às bordas dos defeitos ósseos, superior às ilhotas de osso em sua região mais central, com aumento progressivo da osteogênese centrípeta entre 1 e 3 meses. O tecido conjuntivo foi mais abundante no C- frente aos demais grupos, evoluindo de uma matriz extracelular frouxa em 1 mês para mais um modelo mais fibroso em 3 meses. Foi possível observar a presença de material em até 3 meses em todos os grupos exceto no C-, não havendo degradação perceptível para G2 e G4 enquanto G1 e G3 apresentaram degradação evidente do material entre 1 e 3 meses. (Figura 1)

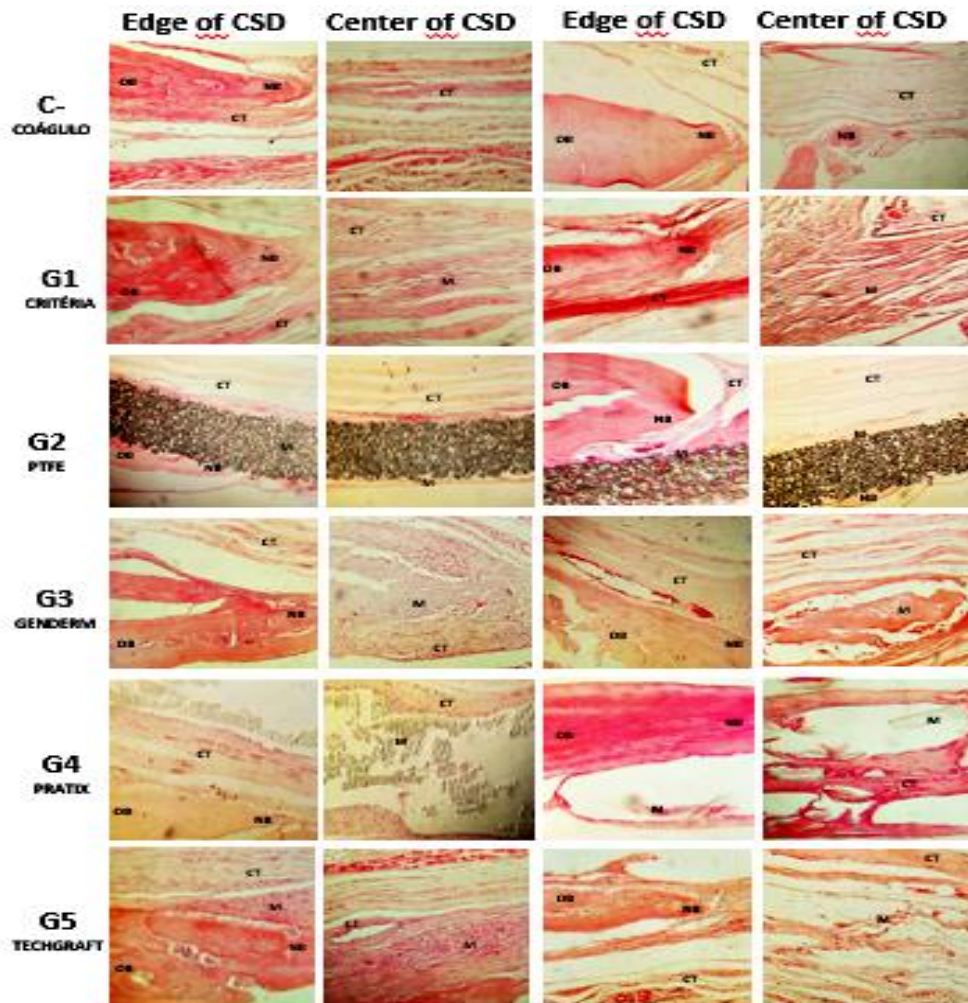


Figura 1 – Análise histológica de membranas comerciais poliméricas em defeito ósseo de tamanho crítico em calvária de rato após 1 e 3 meses de cirurgia. Fonte: própria. CSD=defeito de tamanho crítico. OB=osso antigo. NB=osso novo. CT=tecido conjuntivo. M=material implantado.

A análise histomorfométrica evidenciou diferenças significativas para porcentagem de osso novo em 1 mês entre os grupos, com a média de G2 ( $12,26 \pm 2,83\%$ ) sendo superior às médias de G1 ( $5,64 \pm 4,54\%$ ), G4 ( $3,96 \pm 2,19\%$ ) e G3 ( $1,44 \pm 1,31\%$ ) e as médias de G5 ( $10,38 \pm 3,95\%$ ) e C- ( $9,81 \pm 3,68\%$ ) sendo superiores à média de G3 ( $1,44 \pm 1,31\%$ ) ( $p=0,0001206$ ). Já no período experimental de 3 meses, não houve diferença significativa entre os grupos ( $p=0,074$ ). Na avaliação entre os tempos experimentais, houve diferença significativa para a média de G4, aumentando de  $3,96 \pm 2,19\%$  em 1 mês para  $11,66 \pm 5,94\%$  em 3 meses ( $p=0,0425$ ) (Figura 2).

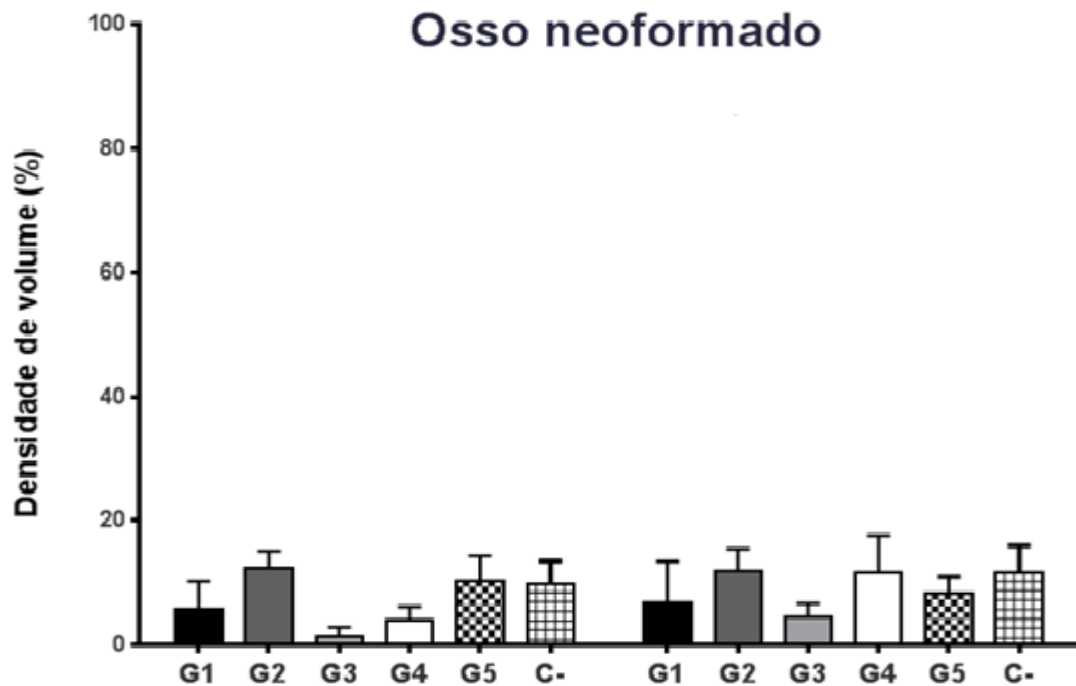


Figura 2: Histomorfometria de osso novo em defeitos críticos de ratos. Fonte: própria.

Houve diferenças significativas para porcentagem de tecido conjuntivo em 1 mês, com a média de C- ( $48,43 \pm 10,54\%$ ) superando as médias de G3 ( $32,51 \pm 6,49\%$ ), G5 ( $30,85 \pm 3,29\%$ ), G2 ( $28,46 \pm 12,71\%$ ) e G1 ( $25,79 \pm 2,87\%$ ) ( $p=0,003306$ ). Em 3 meses, as médias de G4 ( $31,01 \pm 5,96\%$ ) e G5 ( $27,65 \pm 2,27\%$ ) superaram as de G1 ( $20,65 \pm 4,88\%$ ) e G2 ( $18,85 \pm 5,75\%$ ), bem como C- ( $30,74 \pm 9,15\%$ ) foi maior que G2 ( $18,85 \pm 5,75\%$ ) ( $p=0,03496$ ). Na avaliação entre os tempos experimentais, houve diferença significativa para C-, diminuindo de  $48,43 \pm 10,54\%$  em 1 mês para  $30,74 \pm 9,15\%$  em 3 meses ( $p=0,0430$ ) (Figura 3).



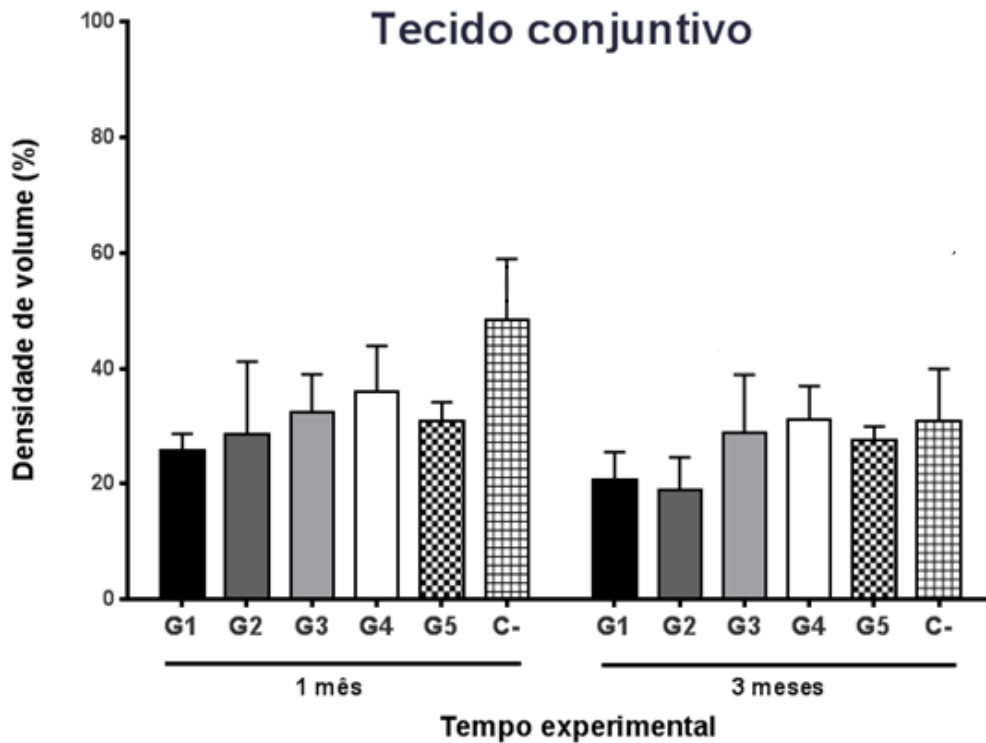


Figura 3: Histomorfometria de tecido conjuntivo em defeitos críticos de ratos. Fonte: própria.

Houve diferenças significativas para porcentagem de biomaterial em 1 mês, com a média de G1 ( $42,09 \pm 4,28\%$ ) superando a média de G4 ( $21,25 \pm 13,84\%$ ) ( $p=0,01582$ ). No período de 3 meses, a média de G2 ( $34,64 \pm 1,42\%$ ) superou as médias de G4 ( $18,80 \pm 12,21\%$ ) e G3 ( $7,70 \pm 6,35\%$ ), enquanto a média de G5 ( $23,57 \pm 2,27\%$ ) foi maior que a média de G3 ( $7,70 \pm 6,35\%$ ) ( $p=0,00114$ ). Na avaliação entre os tempos experimentais, houve diferença significativa entre 1 e 3 meses, para G1 (de  $42,09 \pm 4,28\%$  para  $20,91 \pm 11,88\%$ ,  $p=0,0176$ ), G3 (de  $36,37 \pm 13,01\%$  para  $7,70 \pm 6,35\%$ ,  $p=0,007670$ ) e G5 (de  $30,28 \pm 3,84\%$  para  $23,57 \pm 2,27\%$ ,  $p=0,002072$ ), o que comprova a presença de biodegradação nestes grupos. (Figura 4).

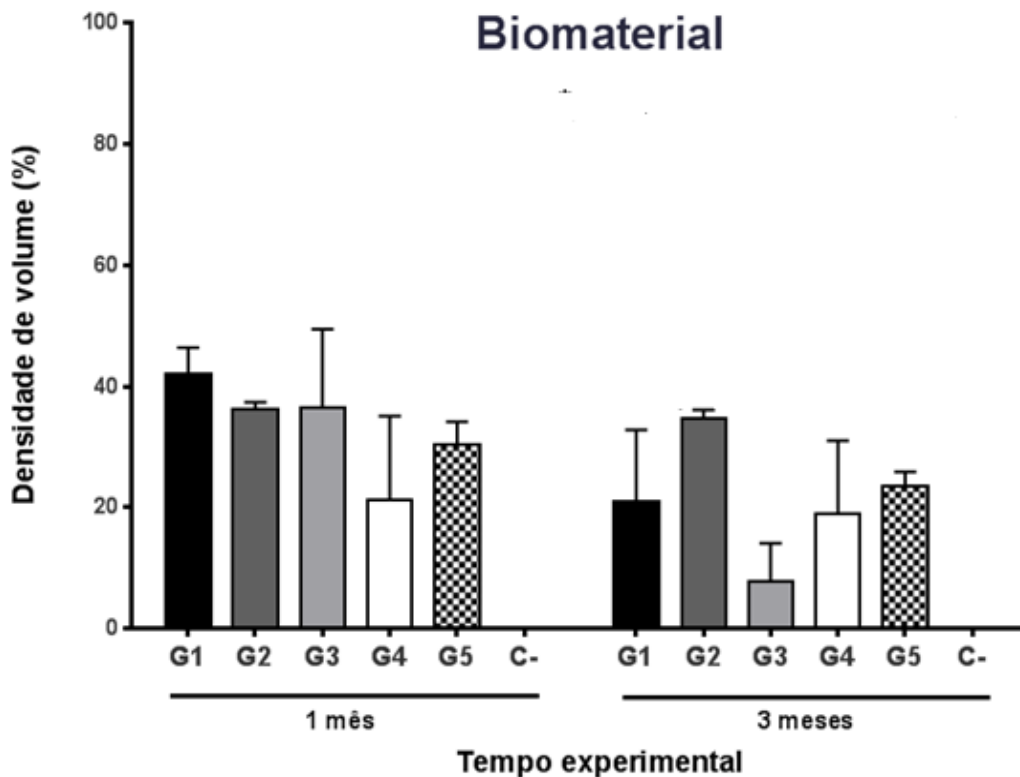


Figura 4: Histomorfometria de biomaterial em defeitos críticos de ratos. Fonte: própria.

## Discussão

A análise histomorfométrica semi-automatizada com contagem manual por pontos em software ao longo da extensão do defeito crítico é usada para estimativa inicial de inflamação e neovascularização entre 7 e 15 dias pós-cirurgia<sup>33,34,35</sup> ou para seu objetivo maior de analisar o percentual de formação e maturidade de osso, secundariamente avaliando tecido conjuntivo e biomaterial residual, entre 1 e 3 meses pós-cirurgia<sup>4,12,36</sup>. Apesar da contagem automatizada em software por área delimitada em pixels convertidos em  $\text{mm}^2$  ser um recurso rápido e usado com grande popularidade nas pesquisas temáticas<sup>19,26,33,34,35,37,38,39,40,41</sup>, a contagem semi-automatizada valoriza o diagnóstico histopatológico, permitindo a distinção óptica de osso novo do osso antigo ou nativo nas bordas do defeito ósseo, da mesma forma que fragmentos do biomaterial colagenoso frente a fibras do tecido conjuntivo, tornando mais preciso o cálculo

destes parâmetros<sup>4,12,36</sup>. Tais evidências científicas tornam esta pesquisa robusta, sem viés e acurada para análise de membranas osteopromotoras para ROG.

Defeitos críticos em calvária de ratos sem o uso de membrana, com apenas preenchimento de coágulo sanguíneo, em geral ocasionam porcentagens pequenas de osso neoformado, variando de 0,4%<sup>40</sup> a 4% em 1 mês<sup>4,12,19</sup> e de 0,9%<sup>40</sup> a 5% em 3 meses<sup>4,12</sup> ou chegando até 20%, caso se considere a média das regiões centrais com até 2%, intermediárias até 8% e periféricas até 40%<sup>36</sup>. Já a quantidade de tecido conjuntivo mantém-se contante entre 1 e 3 meses, com cerca de 23%<sup>4</sup> ou pode alcançar até 40% nos períodos citados<sup>12</sup>.

No modelo experimental de calvária de ratos, membranas para ROG podem, isoladamente, alcançar variados perfis osteopromotores. No período de 1 e 2 meses, a razão de área de osso neoformado comparada ao coágulo pode ser de duas a dez vezes para membrana Bio-Gide<sup>®</sup> (colágenos I e III de derme suína)<sup>26,33,34,35</sup> ou Jason<sup>®</sup> (colágeno III de pericárdio suíno)<sup>35,39</sup>, igual a cinco vezes para GenDermFlex<sup>®</sup> (bovina)<sup>26</sup>, de duas a quatro vezes para Collprotect<sup>®</sup> (colágeno natural de derme suína)<sup>35</sup> ou Super Fixorb<sup>®</sup> (ácido polilático e hidroxiapatita na razão 60:40)<sup>37</sup> e de duas a três vezes para GenDerm<sup>®</sup> (bovina)<sup>26,39</sup> e para policaprolactone com 5% de hidroxiapatita (compósito sintético)<sup>34</sup>. Há casos como da membrana Biomend<sup>®</sup> (colágeno I), com formação de novo osso similar ao coágulo<sup>37</sup>, da membrana de celulose bacteriana, que ficou aquém do coágulo em 1 mês e alcançou até cinco vezes sua área em 2 meses<sup>33</sup> e da membrana de PLGA, que não teve diferenças do coágulo em 2 meses<sup>42</sup>, mostrando que a performance desses dispositivos implantáveis pode variar bastante, conforme tipo e tempo de tratamento.

Membrana de colágeno sozinha após 1 mês de implante em defeito ósseo pode gerar 8% de osso novo e 0,3% de remanescentes e quando associada a enxerto ósseo, chega a 15% de osso novo e 0,03% de remanescentes<sup>19</sup>. A combinação de membrana colágena reabsorvível Cola-D<sup>®</sup> e xenoenertos bovino Bio-Oss<sup>®</sup> (0,25-1mm de granulometria) ou suíno Bone-XP<sup>®</sup>

(0,2-1mm de granulometria) pode gerar de osso novo, 5,83% e 9,08% em 1 mês e 21,68% e 25,22% em 2 meses, respectivamente<sup>41</sup>. Outro estudo com Bio-Oss<sup>®</sup> (0,5-1mm de granulometria) recoberto por BioGide<sup>®</sup> em 1 ou 2 camadas demonstrou que o revestimento simples gerou em 1 e 2 meses, respectivamente, mais osso (22,7% e 37%) do que o duplo (17,3% e 24,5%) ou o enxerto sem membrana (11,5% e 16,8%), apesar da quantidade de material residual ter sido um pouco maior no duplo (30,2% e 25,5%) do que no simples (32,5% e 28,5%) ou com enxerto sem membrana (15,3% e 9,4%)<sup>40</sup>. Em defeitos de tíbia de ratos, a membrana GenDerm<sup>®</sup> isolada pôde favorecer formação de novo osso em 25,3% em 1 mês e 32,2% em 3 meses e quando associada ao enxerto bovino orgânico GenOx<sup>®</sup> elevou a formação óssea para 45,5% e 52,4%, respectivamente<sup>43</sup>.

Sobre a formação de tecido conjuntivo, não houve variação entre as membranas estudadas. Entretanto, a literatura admite algumas distinções microscópicas na fibrogênese, conforme o tipo e tempo de tratamento. Biomateriais não reabsorvíveis metálicos (e.g. titânio) têm fibrogênese mais discreta por serem bioinertes<sup>44</sup>. Os polímeros naturais reabsorvíveis (e.g. colágeno) exibem maior celularidade periférica e interna, de leve a moderada inflamação crônica (linfócitos, macrófagos e células gigantes) e proliferação de fibroblastos, além da produção leve a moderada de matriz conjuntiva nos espaços deixados pelo implante em degradação até 60 dias<sup>22,43,44,45,46,47,48</sup>. Membranas compósitas naturais de colágeno e apatita também exibem fibrogênese similar aos biopolímeros de colágeno<sup>12,47,49</sup>. Já os polímeros sintéticos apresentam formação de tecido conjuntivo dependente do padrão de degradabilidade, numa escala de fibrogênese menor em biomateriais não reabsorvíveis (e.g. PTFE)<sup>7,22,23,44,50</sup> e maior naqueles reabsorvíveis (e.g. PLGA)<sup>7,24,42,44,51,52</sup>. Nenhum dos grupos experimentais apresentou granuloma de corpo estranho (não imunogênico) com cápsula fibrosa, considerada uma resposta indesejada de rejeição ao implante<sup>12,25,44</sup>.

Em relação à biodegradabilidade de membranas em ratos, Lumina-Coat<sup>®</sup> confirmou o

tempo de estabilidade de 4 a 6 semanas indicado pelo seu fabricante<sup>22</sup>, ficando aquém da Lumina-Coat Double Time<sup>®</sup>, estável até 8 semanas<sup>47,53</sup>. PTFE Surgitime<sup>®</sup> converge com a informação do fabricante, sem reabsorção durante o experimento, como esperado para o polímero sintético PTFE<sup>7,22,23,50</sup>. Apesar de GenDerm<sup>®</sup> mostrar-se bem organizada, com alta resistência tênsil e menor deformação frente Lumina-Coat<sup>®</sup> e Surgidry Dental F<sup>®</sup>, trincas internas explicam fragilidade estrutural e maior degradação em subcutâneo, prevista pelo fabricante para até 45 dias<sup>22</sup>. Os fragmentos de GenDerm<sup>®</sup> desaparecem após 30 dias em defeitos tibiais<sup>7,43</sup>, o que a assemelha a outra membrana de cortical óssea desmineralizada, íntegra em subcutâneo aos 15 dias, degradada em 30 dias e ausente em 60 dias<sup>27</sup> e a difere da BioGide<sup>®</sup>, com resíduos em subcutâneo presentes até 63 dias<sup>45</sup> ou suave degradação em defeitos ósseos mandibulares de suínos até 12 semanas e desaparecimento em 27 semanas<sup>29</sup>. O tempo de reabsorção previsto entre 90 e 120 dias pelo fabricante de Pratix<sup>®</sup> torna-se verossímil, pois praticamente não sofreu alteração, conforme o padrão observado em subcutâneo em 2<sup>51</sup> ou 3 meses<sup>52</sup> e já esperado ao PLGA, com alta resistência a tração<sup>54</sup> e mais lenta degradação<sup>7,24</sup>, demonstrada em subcutâneo de 4 a 26 semanas<sup>42</sup>. Techgraft<sup>®</sup> superou membranas de pericárdio bovino em subcutâneo, íntegras em 15 dias e ausentes entre 30 e 60 dias<sup>27,46</sup>. A biodegradação entre 4 a 6 meses sugerida pelo fornecedor de Techgraft<sup>®</sup> converge com o mesmo tempo observado com Jason<sup>®</sup> em subcutâneo<sup>35,39</sup> e em defeitos mandibulares de suínos, levemente degradada até 12 semanas e ausente em 27 semanas<sup>29</sup>.

Estudos pré-clínicos buscam membranas com adequada biocompatibilidade para aplicação à ROG<sup>5,48</sup>. Na visão geral, Bio-Gide<sup>®</sup> e Jason<sup>®</sup> são membranas que apresentam padrão ideal de não irritação, considerando a resposta inflamatória e de reparo<sup>48</sup>. Sobre a dinâmica tecidual envolvida, podem explicar a melhor performance alcançada por Bio-Gide<sup>®</sup> frente às membranas de celulose bacteriana, policaprolactone com 5% de hidroxiapatita, Jason<sup>®</sup> e Collprotect<sup>®</sup> a presença inferior de células inflamatórias e o dobro de vasos sanguíneos nos

primeiros quinze dias após implante<sup>33,34,35</sup>. Bio-Gide<sup>®</sup> também superou o número de vasos sanguíneos da membrana bovina Lyostypt<sup>®</sup> até 21 dias<sup>45</sup>. Este comportamento poderia estar associado ao efeito pró-angiogênico de colágenos I e III, que favoreceria a osteogênese<sup>11,32</sup>.

Sobre o processo de osseodiferenciação, a maior imunoexpressão de osteocalcina e menor de osteopontina entre 1 e 2 meses de implante em calvária poderiam ser interpretados como favoráveis bioindicadores de maior maturação óssea para membrana Bio-Gide<sup>®</sup>, tanto quando comparado a membrana celulósica<sup>33</sup> quanto às colágenas suínas Jason<sup>®</sup> e Collprotect<sup>®35</sup>. Resultados similares foram encontrados ao comparar a membrana suína Bio-Gide<sup>®</sup> com as bovinas GenDerm<sup>®</sup> e GenDermFlex<sup>®</sup>, com maior expressão de osteocalcina com a origem suína e de osteopontina com a bovina em 1 e 2 meses de implante, mostrando uma potencial correlação entre fonte animal e desempenho de membranas de ROG<sup>26,39</sup>.

A porosidade é uma característica muito sensível às membranas de ROG, pois porosidades nanométricas de membrana de colágeno, com poros de 0,004µm, estão associadas à mesma quantidade de osso neoformado que o coágulo sanguíneo<sup>37</sup>. Já uma porosidade maior diminui a capacidade osteopromotora, a exemplo de membrana de titânio sem poros que alcançou maior área de osso neoformado se comparada a ambas membranas anodizadas com poros de 0,4mm e de 1,5mm, na razão 1,6:1, bem como maior imunoexpressão de calceína por até 7 semanas<sup>38</sup>. A membrana PTFE Surgitime<sup>®</sup> apresenta fibras mais interligadas do polímero sintético, conferindo menor permeabilidade e maior resistência mecânica frente a GenDerm<sup>®</sup> e Lumina-Coat<sup>®</sup>, polímeros naturais com distribuição heterogênea de fibras colágenas, o que lhes confere superfícies altamente porosas e com diâmetros variados<sup>39</sup>, justificando os presentes resultados.

Quanto à espessura, a maioria das membranas comerciais testadas se aproxima da faixa de 0,10 a 0,25mm, mais comumente relatada em materiais poliméricos para ROG<sup>7,14,22,25,35,37,42,43,54</sup>. Membranas além dessa faixa incluem Collprotect<sup>®</sup> com espessura de

0,4mm<sup>35</sup>, Lumina-Coat<sup>®</sup> com 1mm<sup>22</sup> ou Lumina-Coat Double Time<sup>®</sup> com 2mm<sup>47,53</sup>. O design de membrana com maior espessura tenta assegurar mecanicamente sua função de barreira tecidual, porém contribui para uma resposta inflamatória mais lenta e persistente, o que pode aumentar o padrão de irritação ao biomaterial<sup>11,12,47,53</sup>. Ao comparar Lumina-Coat<sup>®</sup> e Lumina-Coat Double Time<sup>®</sup>, o tempo de degradação dobra na mesma proporção que sua espessura, porém torna-se mais rígida e menos atrativa à manipulação cirúrgica em pequenos defeitos ósseos intraorais<sup>22,47,53</sup>. Em membranas compósitas de PLGA, HA e  $\beta$ TCP, a espessura de 0,2mm manteve integridade do material até 30 dias, enquanto espessuras de 0,5 e 0,7mm alcançaram 90 dias<sup>52</sup>. Nem sempre essa lógica funciona, pois a membrana Jason<sup>®</sup> tem a metade da espessura e é três vezes menos densa que a BioGide<sup>®</sup>, porém ambas têm tempo de biodegradação similares<sup>29,35</sup>. Para suplantar estas limitações, o reforço microestrutural tem sido mais empregado, com processamentos químicos envolvendo reticulação, no intuito de manter a membrana fina, com boa adaptabilidade ao defeito ósseo e, ao mesmo tempo, coesa por mais tempo para favorecer a osteopromoção<sup>11,12,32</sup>.

A descrição detalhada de um biomaterial é imprescindível e deve evitar cenários com inconformidades técnicas, como observado em estudo com enxertos comerciais no Brasil, onde informações errôneas na bula dos produtos sobre características físico-químicas foram desveladas em um teste independente<sup>55</sup>. Os dados biológicos explicitados quanto a osteogênese, fibrogênese e degradação das membranas regenerativas testadas pode contribuir para a tomada de decisão, o bom planejamento clínico e a previsibilidade de resultados em ROG.

### **Considerações finais**

Todas as membranas comerciais testadas (LuminaCoat<sup>®</sup>/G1, PTFE Surgitime<sup>®</sup>/G2, GenDerm<sup>®</sup>/G3, Pratix<sup>®</sup>/G4 e Techgraft<sup>®</sup>/G5) apresentaram algum grau de formação de novo

osso e variações quanto à conjuntivização e presença de biomaterial.

Considerando os resultados alcançados ao longo dos 3 meses do experimento e os requerimentos individuais para eleição de uma membrana regenerativa ideal, a ordem decrescente de eficiência quanto a capacidade osteopromotora seria: G2 > G4 > G5 > G1 > G3. Quanto a menor tendência à conjuntivização, a ordem decrescente de eficiência seria: G2 > G1 > G5 > G3 > G4. Por fim, quanto a presença de biodegradação, da modalidade mais acelerada até à de não reabsorção, a ordem decrescente de eficiência seria: G3 > G4 > G1 > G5 > G2.

A dificuldade em atender ao conjunto de especificidades para a escolha de uma membrana regenerativa ideal suscita discussões mais aprofundadas sobre os fatores intrínsecos de cada biomaterial, como composição, origem e espessura, moduladores diferenciais de seu desempenho na regeneração óssea guiada.

## Referências

1. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. 2014;45(Suppl 2):3-7. doi: 10.1016/j.injury.2014.04.002.
2. Dasgupta S, Maji K, Nandi SK. Investigating the mechanical, physiochemical and osteogenic properties in gelatin-chitosan-bioactive nanoceramic composite scaffolds for bone tissue regeneration: In vitro and in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;94(1):713-28. doi: 10.1016/j.msec.2018.10.022.
3. Paulo AO, Castro-Silva II, Oliveira DF, Machado MEL, Bonetti-Filho I, Granjeiro JM. Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: an experimental study in rat calvaria. *Braz Dent J*. 2011;22(4):322-8. doi: 10.1590/s0103-64402011000400011.
4. International Organization for Standardization. ISO 22803. Dentistry – Membrane materials for guided tissue regeneration in oral and maxillofacial surgery – Contents of a technical file. ISO:Geneva, 2004, 7p.
5. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. 2017;125(5):315-37. doi: 10.1111/eos.12364.
6. Dimitriou R, Mataliotakis G, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med*. 2012, 10:81. doi: 10.1186/1741-7015-10-81.
7. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19(6):485-502. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0437.



8. Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurström K, Sundin Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol.* 1993;64(Suppl11):1116-28. doi: 10.1902/jop.1993.64.11s.1116.
9. Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobatto L, Bressan E, Nastri L. Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review. *Materials (Basel).* 2020;13(3):e786. doi: 10.3390/ma13030786.
10. Rico-Llanos GA, Borrego-González S, Moncayo-Donoso M, Becerra J, Visser R. Collagen Type I Biomaterials as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel).* 2021;13(4):e599. doi: 10.3390/polym13040599.
11. Souza FFP, Pérez-Guerrero JA, Gomes M, Cavalcante FL, Souza Filho MSM, Castro-Silva II. Development and characterization of poultry collagen-based hybrid hydrogels for bone regeneration. *Acta Cir Bras.* 2022;37(3), e370302. doi: 10.1590/acb370302.
12. Meinig RP. Clinical Use of Resorbable Polymeric Membranes in the Treatment of Bone Defects. *Orthop Clin North Am.* 41:(1), 2010,39-47. doi: 10.1016/j.ocl.2009.07.012.
13. Lee YJ, An SJ, Bae EB, Gwon HJ, Park JS, Jeong SI, Jeon YC, Lee SH, Lim YM, Huh JB. The Effect of Thickness of Resorbable Bacterial Cellulose Membrane on Guided Bone Regeneration. *Materials (Basel).* 2017;10(3):e320. doi: 10.3390/ma10030320.
14. Pilger AD, Schneider LD, Silva GM, Schneider KCC, Smidt R. Membranes and barriers for guided bone regeneration. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2020;19(3),441-8. doi: 10.9771/cmbio.v19i3.36390.
15. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TG, Kowolik MJ, Janowski GM. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—A materials perspective. *Dent mater.* 2012;28(7);703-21. doi: 10.1016/j.dental.2012.04.022.
16. Vallecillo-Rivas M, Toledano-Osorio M, Vallecillo C, Toledano M, Osorio R. The collagen origin influences the degradation kinetics of guided bone regeneration membranes. *Polymers.* 2021;13(17):e3007. doi: 10.3390/polym13173007.
17. Rothamel D, Schwarz F, Herten M, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Impl Res.* 2005;16(3):369-78. doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01108.x.
18. An YZ, Heo YK, Lee JS, Jung U-W, Choi S-H. Dehydrothermally cross-linked collagen membrane with a bone graft improves bone regeneration in a rat calvarial defect model. *Materials (Basel).* 2017;10(8):e927. doi: 10.3390/ma10080927.
19. Araújo LK, Antunes GS, Melo MM, Castro-Silva II. Brazilian dentists' perceptions of using bone grafts: an inland survey. *Acta Odontol Latinoam.* 2020;33(3):165-73. doi: 10.54589/aol.33/3/165.
20. Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomaterials: types, applications, and market. *Quím Nova.* 2015; 38(7):957-71. doi: 10.5935/0100-4042.20150094.
21. Silva MJ, Gonçalves CP, Galvão KM, D'Alpino PHP, Nascimento FD. Synthesis and Characterizations of a Collagen-Rich Biomembrane with Potential for Tissue-Guided Regeneration. *Eur J Dent* 2019; 13(03): 295-302. doi: 10.1055/s-0039-1693751.
22. Ronda M, Rebaudi A, Torelli L, Stacchi C. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(7):859-66. doi: 10.1111/clr.12157.
23. Kim EV, Petronyuk YS, Guseynov NA, Tereshchuk SV, Popov AA, Volkov AV, Gorshenev VN, Olkhov AA, Levin VM, Dymnikov AB, Rodionov VE, Tumanyan GA, Ivashkevich SG, Bonartsev AP, Borozdkin LL. Biocompatibility and Bioresorption of 3D-Printed Polylactide and Polyglycolide Tissue Membranes. *Bull Exp Biol Med.* 2021;170(3):356-59. doi: 10.1007/s10517-021-05066-x.

24. Radenković M, Alkildani S, Stoewe I, Bielenstein J, Sundag B, Bellmann O, Jung O, Najman S, Stojanovic S, Barbeck M. Comparative in vivo analysis of the integration behavior and immune response of collagen-based dental barrier membranes for guided bone regeneration (GBR). *Membranes*. 2021;11(9):e712. doi: 10.3390/membranes11090712.
25. Danieletto-Zanna CF, Bizelli VF, Ramires GADA, Francatti TM, Carvalho PSP, Bassi APF. Osteopromotion capacity of bovine cortical membranes in critical defects of rat calvaria: histological and immunohistochemical analysis. *Int J Biomater*. 2020;2020:e6426702. doi: 10.1155/2020/6426702.
26. Yamatogi RS, Rahal SC, Granjeiro JM, Taga R, Cestari TM, Lima AFM. Microscopic evaluation of biologic membrane association from bovine origin implanted subcutaneously in rats. *Cienc Rural*. 2005;35(4):837-42. doi: 10.1590/S0103-84782005000400014.
27. Romandini M, Fratini A, Americo LM, Panda S, Marchett E. Biomaterials for Periodontal and Peri-Implant Regeneration. *Materials*. 2022; (14):e3319. doi: 10.3390/ma14123319.
28. Bornert F, Herber V, Sandgren R, Witek L, Coelho PG, Pippenger BE, Shahdad S. Comparative barrier membrane degradation over time: Pericardium versus dermal membranes. *Clin Exp Dent Res*. 2021;1-8. doi: 10.1002/cre2.414.
29. Costa NMF, Yassuda DH, Sader MS, Fernandes GVO, Soares GDA, Granjeiro JM. Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm® membrane in rat calvarial defect model. *Mater Sci Eng C*. 2016;61:63-71. doi: 10.1016/j.msec.2015.12.003.
30. Lima CJ, Silva IIC, Bittencourt RC, Takamori ER, Lenharo A, Granjeiro JM. Análise histológica de uma membrana colágena de submucosa intestinal suína. *ImplantNews*. 2010;7(4):515-20.
31. Tumedei M, Mourão CF, D'Agostino S, Dolci M, Di Cosola M, Piattelli A, Lucchese A. Histological and Histomorphometric Effectiveness of the Barrier Membranes for Jawbone Regeneration: An Overview of More Than 30 Years' Experience of Research Results of the Italian Implant Retrieval Center (1988–2020). *Appl Sciences*. 2021; 11(5):2438. doi: 10.3390/app11052438.
32. Bassi APF, Bizelli VF, Brasil LFM, Pereira JC, Al-Sharani HM, Momesso GAC, Faverani LP, Lucas FA. Is the Bacterial Cellulose Membrane Feasible for Osteopromotive Property? *Membranes*. 2020a;10(9):e230. doi: 10.3390/membranes10090230.
33. Bassi APF, Bizelli VF, Francatti TM, Ferreira ACRM, Pereira JC, Al-Sharani HM, Lucas FA, Faverani LP. Bone Regeneration Assessment of Polycaprolactone Membrane on Critical-Size Defects in Rat Calvaria. *Membranes*. 2020b;11(2):e124. doi: 10.3390/membranes11020124.
34. Bizelli VF, Ramos EU, Veras ASC, Teixeira GR, Faverani LP, Bassi APF. Calvaria Critical Size Defects Regeneration Using Collagen Membranes to Assess the Osteopromotive Principle: An Animal Study. *Membranes*. 2022;12(5):e461. doi: 10.3390/membranes12050461.
35. Teixeira LJC, Balthazar MLB, de Deus G, Vidigal Jr. GM, Conz MB. Comparação de dois métodos histomorfométricos de análise na cicatrização de defeitos críticos na calvária de ratos, após tratamento com diferentes grânulos de hidroxiapatita. *ImplantNews* 2015;12(6a-PBA):197-202.
36. Ikumi R, Miyahara T, Akino N, Tachikawa N, Kasugai S. Guided bone regeneration using a hydrophilic membrane made of unsintered hydroxyapatite and poly(L-lactic acid) in a rat bone-defect model. *Dent Mater J*. 2018;37(6):912-18. doi: 10.4012/dmj.2017-385.
37. Jang YS, Moon SH, Nguyen TT, Lee MH, Oh TJ, Han AL, Bae TS. In vivo bone regeneration by differently designed titanium membrane with or without surface treatment: a study in rat calvarial defects. *J Tissue Eng*. 2019;10:2041731419831466. doi: 10.1177/2041731419831466.

38. Ramires GAD, Helena JT, Oliveira JCS, Faverani LP, Bassi APF. Evaluation of Guided Bone Regeneration in Critical Defects Using Bovine and Porcine Collagen Membranes: Histomorphometric and Immunohistochemical Analyses. *Int J Biomater.* 2021;2021:e8828194. doi: 10.1155/2021/8828194.
39. Abou Fadel R, Samarani R, Chakar C. Guided bone regeneration in calvarial critical size bony defect using a double-layer resorbable collagen membrane covering a xenograft: a histological and histomorphometric study in rats. *Oral Maxillofac Surg.* 2018 Jun;22(2):203-13. doi: 10.1007/s10006-018-0694-x.
40. Bae EB, Kim HJ, Ahn JJ, Bae HY, Kim HJ, Huh JB. Comparison of Bone Regeneration between Porcine-Derived and Bovine-Derived Xenografts in Rat Calvarial Defects: A Non-Inferiority Study. *Materials (Basel).* 2019;12(20):3412. doi: 10.3390/ma12203412.
41. Hoornaert A, d'Arros C, Heymann MF, Layrolle P. Biocompatibility, resorption and biofunctionality of a new synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration. *Biomed Mater.* 2016;11(4):e045012. doi: 10.1088/1748-6041/11/4/045012.
42. Bernabé PF, Melo LG, Cintra LT, Gomes-Filho JE, Dezan E Jr, Nagata MJ. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23:384-88. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02166.x.
43. Al-Maawi S, Orłowska A, Sader R, James Kirkpatrick C, Ghanaati S. In vivo cellular reactions to different biomaterials-Physiological and pathological aspects and their consequences. *Semin Immunol.* 2017;29:49-61. doi: 10.1016/j.smim.2017.06.001.
44. Neto AMD, Sartoretto SC, Duarte IM, Resende RFB, Alves ATNN, Mourão CFAB, Calasans-Maia J, Montemezzi P, Tristão GC, Calasans-Maia MD. In Vivo Comparative Evaluation of Biocompatibility and Biodegradation of Bovine and Porcine Collagen Membranes. *Membranes (Basel).* 2020;10(12):e423. doi: 10.3390/membranes10120423.
45. Gasque KCS, Oliveira RC, Ceolin D, Cestari TM, Taga R, Taga EM, Corrêa A, Paiva KB, Takyia M, Granjeiro JM. Evaluation of the biocompatibility of an acellular bovine pericardium membrane and its potential as an osteoblast scaffold. *Cienc Odontol Bras.* 2008;11 (1):58-66.
46. Souza FFP, Cavalcante FL, Castro-Silva II, Silva ALC, Souza Filho MSM. Poultry by-products as source of collagen, nanokeratin and bioapatite for biomedical use. *Rev Ciênc Agron.* 2021;52(4), e20207565. doi: 10.5935/1806-6690.20210049.
47. Lindner C, Alkildani S, Stojanovic S, Najman S, Jung O, Barbeck M. In Vivo Biocompatibility Analysis of a Novel Barrier Membrane Based on Bovine Dermis-Derived Collagen for Guided Bone Regeneration (GBR). *Membranes (Basel).* 2022;12(4):e378. doi: 10.3390/membranes12040378.
48. Sousa EM, Melo EF, Ribeiro HL, Feitosa JAP, Souza-Filho MSM, Melo MM, Castro-Silva II. Biocompatibility and biodegradation analysis of Nile tilapia gelatin and apatite membranes. *Rev Ciênc Agron.* 2022;53:e20218217.
49. Korzinskas T, Jung O, Smeets R, Stojanovic S, Najman S, Glenske K, et al. In vivo analysis of the biocompatibility and macrophage response of a non-resorbable PTFE membrane for guided bone regeneration. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):e2952. doi: 10.3390/ijms19102952.
50. Geremias TC, Sartoretto SC, Batistella MA, Souza AAU, Alves ATNN, Uzeda MJP, Calasans-Maia J, Montemezzi P, Mourão CFAB, Calasans-Maia M. In Vivo Biological Evaluation of Biodegradable Nanofibrous Membranes Incorporated with Antibiofilm Compounds. *Polymers (Basel).* 2021;13(15):e2457. doi: 10.3390/polym13152457.
51. Pereira LC, Mourão CFAB, Alves ATNN, Resende RFB, Uzeda MJPG, Granjeiro JM, Louro RS, Calasans-Maia MD. In Vitro Physico-Chemical Characterization and Standardized In Vivo Evaluation of Biocompatibility of a New Synthetic Membrane for

- Guided Bone Regeneration. *Materials* (Basel). 2019;12(7):e1186. doi: 10.3390/ma12071186.
52. Luz EPCG, Chagas BS, Almeida NT, Borges MF, Andrade FK, Muniz CR, Castro-Silva II, Teixeira EH, Popat K, Rosa MF, Vieira RS. Resorbable bacterial cellulose membranes with strontium release for guided bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;116:e111175. doi: 10.1016/j.msec.2020.111175.
  53. Sousa BGB, Pedrotti G, Sponchiado AP, Cunali RS, Aragonés A, Sarot JR, Zielak JC, Ornaghi BP, Leão MP. Analysis of tensile strength of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) membranes used for guided tissue regeneration. *RSBO*. 2014;11(1):59-65.
  54. Conz MB, Campos CN, Serrão SD, Soares GA, Vidigal Jr GM. Physical and chemical characterizations of 12 biomaterials used as bone grafts in Implantology. *ImplantNews* 2010;7(4):541-6.

## REFERÊNCIAS

ABOU FADEL, R.; SAMARANI, R.; CHAKAR, C. Guided bone regeneration in calvarial critical size bony defect using a double-layer resorbable collagen membrane covering a xenograft: a histological and histomorphometric study in rats. **Oral and Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 22, p. 203-2013, abr. 2018.

AHADIAN, S. et al. Tissue engineering for artificial organs: regenerative medicine, smart diagnostics and personalized medicine. **Boston: John Wiley & Sons**, 2017.

AL-MAAWI, S. et al. In vivo cellular reactions to different biomaterials—Physiological and pathological aspects and their consequences. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 29, n. 1, p. 49-61, jun. 2017.

ALMEIDA, R. S. et al. Regeneration of a critical bone defect after implantation of biphasic calcium phosphate -  $\beta$ -tricalcium phosphate/calcium pyrophosphate - and phosphate bioactive glass. **Cerâmica**, São Paulo, v. 66, p. 378, abr. 2020.

AN, Y. Z. et al. Dehydrothermally cross-linked collagen membrane with a bone graft improves bone regeneration in a rat calvarial defect model. **Materials**, Switzerland, v. 10, n. 8, p. 927, ago. 2017.

ARAÚJO, L.K et al. Brazilian dentists' perceptions of using bone grafts: an inland survey. **Acta Odontologica Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 33, n. 3, p 165-173, dez. 2020.

BAE, E. B. et al. Comparison of Bone Regeneration between Porcine-Derived and Bovine-Derived Xenografts in Rat Calvarial Defects: A Non-Inferiority Study. **Materials**, Switzerland, v. 12 n. 20, p. 3412, out. 2019.

BASSI, A. P. F. et al. Is the Bacterial Cellulose Membrane Feasible for Osteopromotive Property? **Membranes**, Basel. v. 10 n. 9, p. 230, set. 2020.

BASSI, A. P. F. et al. Bone Regeneration Assessment of Polycaprolactone Membrane on Critical-Size Defects in Rat Calvaria. **Membranes**, Basel. v. 11 n. 2, p. 124, set. 2021.

BERNABE, P. F. et al. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. **Clinical Oral Implants Research**, São Paulo. v. 23 n. 3, p. 384-388, set. 2011.

BILEZIKIAN, J. P. et al. **Principles of bone biology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2002.

BITTENCOURT, R. C. et al. Preclinical evaluation of a xenogenic hydroxyapatite/ collagenbased bone substitute material. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 29, n. 1, p.6-13, nov. 2014.

BIZELI, V. F. et al. Calvaria Critical Size Defects Regeneration Using Collagen Membranes to Assess the Osteopromotive Principle: An Animal Study. **Membranes**, Basel. v.12, p. 461, abr, 2022.

BOTTINO, M. C. et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—A materials perspective. **Dental materials**. [s.l.], v. 28, n. 7, p. 703-21, mai, 2012.

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

BRONZINO, J.; WONG, J.; PETERSON, D. Biomaterials: principles and Practices. **CRC Press**, 2012.

CALORI, G. M. et al. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? **Injury**, [s.l.], v. 42, n. 2, p. 56-63, set, 2011.

CASTRO-SILVA, I. I.; ZAMBUZZI, W. F.; GRANJEIRO, J. M. Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. **Innovations Implant Journal**. Biomater Esthet, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 70-75, Set/Dez. 2009.

CHENG, F. et al. Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. **Food chemistry**, [s.l.], v. 113, n. 2, p. 563-567, 2009.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 3, n. 3, p. 131-139, nov, 2008.

CONZ, M. B. et al. Physical and chemical characterizations of 12 biomaterials used as bone grafts in Implantology. **Implant News**, v. 7, n. 7, p. 541-6, 2010.

COSTA, N. M. F. et al. Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm® membrane in rat calvarial defect model. **Materials Science and Engineering C**. v. 61, n. 1, p. 63-71, abr, 2016.

CROCKETT, J. et al. Bone remodelling at a glance. **Journal Cell Science**, v. 124, n. 7, p. 991- 998, 2011.

DANIELETTO- ZANNA, C. F. et al. Osteopromotion capacity of bovine cortical membranes in critical defects of rat calvaria: histological and immunohistochemical analysis. **International Journl of Biomaterials**. São paulo, v. 2020, p. 9, 2020.

DASGUPTA, S.; MAJI, K.; NANDI, S. K. Investigating the mechanical, physiochemical and osteogenic properties in gelatin-chitosan-bioactive nanoceramic composite scaffolds for bone tissue regeneration: In vitro and in vivo. **Materials Science and Engineering C**. v. 94, n. 1, p. 713-28, 2019.

DENG, H.; LIU, Y. Current topics in Bone Biology. London: **World Scientific Publisingh**, 2005.

DIMITRIOU, R. et al. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. **BMC medicine**, v. 10, n. 1, p. 81, 2012.

ELGALI I. et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **European Journal Oral Science**. v. 125, n. 5, p. 315-37, 2017.

FENG, W. et al. A novel composite of collagen-hydroxyapatite/kappa-carrageenan. **Journal of Alloys Compounds**. v. 693, p. 482–489, 2017.

GALLER, K. et al. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. **Advances in dental research**, v. 23, n. 3, p. 333-339, 2011.

GASQUES, K. C. S. et al. Evaluation of the biocompatibility of an acellular bovine pericardium membrane and its potential as an osteoblast scaffold. **Ciencias Odontológicas Brasileiras**. v. 11, n. 1, p. 58-66, 2008.

GEREMIAS, T. C. et al. *In Vivo* Biological Evaluation of Biodegradable Nanofibrous Membranes Incorporated with Antibiofilm Compounds. **Polymers**, Basel. v. 13, n.15, p. 2457, 2021.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**; v. 33, n. 6, p. 1352-8, 2010.

HAK, D. J. et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. **Injury**. v. 4, n. 2, p. 3-7, 2014.

HOONAERT, A. et al. Biocompatibility, resorption and biofunctionality of a new synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration. **Biomedical Materials**, Bistol. v.11, n.4. 2016.

IKUMI, R. et al. Guided bone regeneration using a hydrophilic membrane made of unsintered hydroxyapatite and poly(L-lactic acid) in a rat bone-defect model. **Dental Materials Journal**. v. 37, n. 6, p. 912-18, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION–ISO. ISO 22803. Dentistry – Membrane materials for guided tissue regeneration in oral and maxillofacial surgery – Contents of a technical file. **ISO:Geneva**, 2004.

JANG, Y. S. et al. In vivo bone regeneration by differently designed titanium membrane with or without surface treatment: a study in rat calvarial defects. **Journal of Tissue Engineering**. v. 10, p. 1-9. 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KIM, E. V. et al. Biocompatibility and Bioresorption of 3D-Printed Polylactide and Polyglycolide Tissue Membranes. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v. 170, n. 3, p. 356-59, 2021.

KNESER, U. et al. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 1, p. 7-19, 2006.

KORZINSKAS, T. et al. In vivo analysis of the biocompatibility and macrophage response of a non-resorbable PTFE membrane for guided bone regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 19, n. 10, p. 2952, 2018.

KUCHARZ, E. J. Biosynthesis of Collagen. **The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992.

KWON, K. ; SEOK, H. Silk Protein-Based Membrane for Guided Bone Regeneration. **Applied Sciences**. v. 8 n. 8, p. 1214, 2018.

LEE, Y. J. et al. The Effect of Thickness of Resorbable Bacterial Cellulose Membrane on Guided Bone Regeneration. **Materials** (Basel). v. 10 n. 3, p. 320, 2017.

LIMA, C. J. et al. Análise histológica de uma membrana colágena de submucosa intestinal suína. **ImplantNews**. v. 7, n. 4, p. 515-20, 2010.

LINDE, A. et al. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **Journal of Periodontology**. v. 64, n. 11, p. 1116-28, 1993.

LINDNER, C. et al. In Vivo Biocompatibility Analysis of a Novel Barrier Membrane Based on Bovine Dermis-Derived Collagen for Guided Bone Regeneration (GBR). **Membranes** (Basel). v. 12 n. 4, p. 378, 2022.

LOH, Q. L. ; CHOONG, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. **Tissue Engineering Part B Reviews**. v. 19, n. 6, p. 485-502, 2013.

LUZ, E. P. C. G. et al. Resorbable bacterial cellulose membranes with strontium release for guided bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 116, 2020.

MANDAL B. B. et al. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 20, p. 7699-7704, 2012.

MASQUELET, A.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. **Orthopedic Clinics**, v. 41, n. 1, p. 27-37, 2010.

MCNAMARA, S. L. et al. Silk as a bioadhesive sacrificial binder in the fabrication of hydroxyapatite load bearing scaffolds. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p. 6941-6953, 2014.

MELKE, J. et al. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 31, p. 1-16, 2016.

MEINING, R. P. Clinical Use of Resorbable Polymeric Membranes in the Treatment of Bone Defects. **Orthopedic Clinics**, v. 41, n. 1, p. 39-47, 2010.



- Melo, E. F. **Biocompósitos de gelatina de pele e hidroxiapatita de escamas de resíduos do beneficiamento de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2017.
- MOTA J. et al. Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration. **Acta Biomaterials**. v. 8, p. 4173–4180, 2012.
- NAYAK, S. et al. Progress of Regenerative Therapy in Orthopedics. **Current osteoporosis reports**, v. 16, n. 2, p. 169-181, 2018.
- NETO, A. M. D. et al. In Vivo Comparative Evaluation of Biocompatibility and Biodegradation of Bovine and Porcine Collagen Membranes. **Membranes (Basel)**. v. 10, n. 12, p. 423, 2020.
- PAULO, A. et al. Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: an experimental study in rat calvaria. **Brazilian dental journal**, v. 22, n. 4, p. 322-328, 2011.
- PEREIRA, L. C. et al. In Vitro Physico-Chemical Characterization and Standardized In Vivo Evaluation of Biocompatibility of a New Synthetic Membrane for Guided Bone Regeneration. **Materials**, [s.l.], v. 12, n. 7, p. 1-12, abr. 2019.
- PILGER, A. D. et al. Membranes and barriers for guided bone regeneration. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador. v. 19, n. 3, p. 441-8, 2020.
- PIRES, A. L. P.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 957-971, ago. 2015.
- PRAKASAM, M. et al. Fabrication, properties and applications of dense hydroxyapatite: a review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 4, p. 1099-1140, 2015.
- RANDENKOVIC, M. et al. Comparative in vivo analysis of the integration behavior and immune response of collagen-based dental barrier membranes for guided bone regeneration (GBR). **Membranes**. v. 11, n. 9, p. 712, 2021.
- RAMIRES, G. A. D. et al. Evaluation of Guided Bone Regeneration in Critical Defects Using Bovine and Porcine Collagen Membranes: Histomorphometric and Immunohistochemical Analyses. **International Journal of Biomaterials**. 2021.
- RATNER, B. D. et al. Biomaterials science: an introduction to materials in Medicine. 3rd ed., Canada: **Academic Press**, 2012.
- RICO-LLANOS, G. A. et al. Collagen Type I Biomaterials as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Polymers (Basel)**. v. 13, n. 4, p. 599, 2021.
- ROMANDINI, M. et al. Biomaterials for Periodontal and Peri-Implant Regeneration. **Materials**. v. 14, n. 12, p. 3319, 2022.
- RONDA, M et al. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**. v. 25, n. 7, p. 859-66, 2014.

ROSS, M.; e PAWLINA, W. **Histología. Correlación con biología celular y molecular.** Barcelona: Wolters Kluwer, 2016.

ROTHAMEL, D. et al. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. **Clinical Oral Implants Research.** v. 16, n. 3, p. 369-78, 2005.

RUMPLER, M. et al. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. **Interface.** v. 5, n. 27, p. 1173-80, 2008.

SALO, J. **Bone resorbing osteoclasts reveal two basal plasma membrane domains and transcytosis of degraded matrix material.** Tesis, Oulu: University of Oulu, 2002.

SBRICOLI, L. et al. Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review. **Materials,** [s.l.], v. 13, n. 3, p. 786, fev. 2020.

SILVA, M. J. et al. Synthesis and Characterizations of a Collagen-Rich Biomembrane with Potential for Tissue-Guided Regeneration. **Europe Journal Dental** v. 13, n. 3, p. 295-302, 2019.

SINHORET, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas,** v. 67, n. 3, p. 178-186, 2013.

SOUSA, B. G. B. et al. Analysis of tensile strength of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) membranes used for guided tissue regeneration. **Revista Sul Brasileira de Odontologia.** v. 11, n. 1, p. 59-65. 2014.

SOUSA, E. M. et al. Biocompatibility and biodegradation analysis of Nile tilapia gelatin and apatite membranes. **Revista Ciência Agronômica.** 2022.

SOUZA, F. F. P. et al. Development and characterization of poultry collagen-based hybrid hydrogels for bone regeneration. **Acta Cirurgica Brasileira.** v. 37, n.3, 2022.

SOUZA, F. F. P. et al. Poultry by-products as source of collagen, nanokeratin and bioapatite for biomedical use. **Revista Ciência Agronômica** 2021.

STEVENS, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Materials Today,** v. 11, n. 5, p. 18- 25, 2008.

SWETHA, M. et al. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules.** v. 47, p. 1-4, 2010.

TAL, H. **Bone Regeneration.** Croatia: InTech, 2012.

TANG, D. et al. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. **Biomaterials,** v. 83, p. 363-382, 2016.

- TEIXEIRA, L. J. C. et al. .Comparação de dois métodos histomorfométricos de análise na cicatrização de defeitos críticos na calvária de ratos, após tratamento com diferentes grânulos de hidroxapatita. **Implant News**. 2015.
- TORTORA, G.; DERRICKSON, B.; **Principles of Anatomy & Physiology**. New York: Wiley, 2017.
- TUMEDEI, M. et al. Histological and Histomorphometric Effectiveness of the Barrier Membranes for Jawbone Regeneration: An Overview of More Than 30 Years' Experience of Research Results of the Italian Implant Retrieval Center (1988–2020). **Applied Sciences**. v. 11, n. 5, 2021.
- URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, p.893-899, 1965.
- VALLECILLO-RIVAS, M. et al. The collagen origin influences the degradation kinetics of guided bone regeneration membranes. **Polymers**. Basel, v. 13, n.17, 2021.
- VENKATESEN, J. et al. Alginate composites for bone tissue engineering: a review.**International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 269-281, 2015.
- YAMATOGLI, R. S. et al. Microscopic evaluation of biologic membrane association from bovine origin implanted subcutaneously in rats. **Ciência Rural**. v. 35, n. 4, p. 837-42, 2005.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DA CEUA-UFC SOBRAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
 Campus de Sobral – Faculdade de Medicina  
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

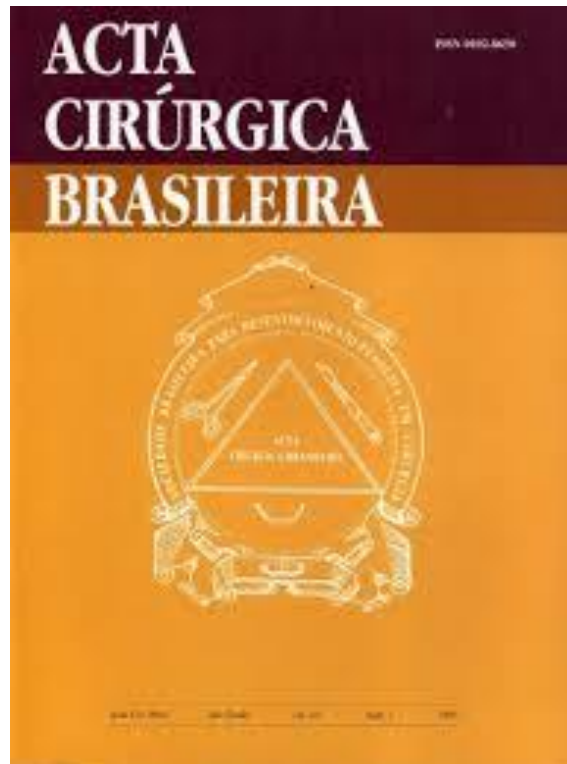
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: “**Análise da eficiência de membranas poliméricas comerciais para regeneração óssea em defeitos cranianos de ratos**”, registrada como **Projeto nº 06/20**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 06/10/2020.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2020 até 01/11/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus albinus</i> / Ratos heterogênicos Wistar
Nº de animais	70 (setenta)
Peso/Idade	180-220 g / 2-3 meses
Sexo	♂ Machos
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 06 de outubro de 2020.

Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
 Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

**ANEXO B – REVISTA PARA ENCAMINHAMENTO DO MANUSCRITO**

**Periodicidade: mensal**

**Instruções aos autores: <https://www.scielo.br/journal/acb/about/>**

**Indicadores bibliométricos:**

**Indexado no Qualis-CAPES (2013-2016) –Biotecnologia: B3**

**Previsão não-oficial do novo Qualis (2017-2020) – Geral: B1**

**Indexado no Pubmed e Scielo**

**Com fator de impacto de citação (JCR 2021=1.388)**

## ANEXO C – REGIMENTO DO PPGB PARA A DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**Art. 42º.** A avaliação do exame de qualificação verificará os seguintes critérios:

- I - Apresentação do tema, revisão ampla, atualizada e crítica da literatura e delimitação do problema;
- II - Argumentação quanto à justificativa denotando a relevância teórica e prática da proposta;
- III - Redação clara e precisa dos objetivos e sua coerência com o problema da pesquisa;
- IV - Coerência metodológica relativamente aos objetivos de pesquisa, e uso apropriado dos materiais e métodos, na organização e na análise de dados;
- V - Uso da linguagem consoante a norma culta da língua e o estilo de redação científica;
- VI - Habilidade de síntese, coerência e coesão lógica do texto (ligação entre capítulos/seções/frases/parágrafos);
- VII - Viabilidade do cronograma do projeto tendo em vista o prazo de conclusão do curso de mestrado (24 meses).

**Art. 55º.** A Comissão Examinadora que julgará a dissertação será constituída de especialistas credenciados com título de doutor ou equivalente, aprovada pelo Colegiado do Programa e designada pelo Coordenador, sendo composta de no mínimo 3 (três) membros, sendo um externo ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Parágrafo único - Poderão participar da Comissão Examinadora professores ativos e aposentados do Programa ou de outros Programas de Pós-Graduação afins, além de profissionais com titulação pertinente.

**Art. 56º.** O trabalho de dissertação deve seguir as normas da ABNT e as Normas Técnicas para Trabalhos Científicos da UFC, apresentando: introdução, referencial teórico, objetivos, metodologia, resultados e conclusão.

§ 1º. O trabalho de dissertação também poderá constar de um artigo em inglês, precedido de introdução, referencial teórico e objetivos em português e de acordo com as normas da ABNT e as Normas Técnicas para Trabalhos Científicos da UFC.

§ 2º. A apresentação oral da defesa de dissertação deverá ser realizada no idioma português e o aluno terá 45 minutos para apresentar seu trabalho em sessão pública.

§ 3º. A avaliação da defesa de dissertação verificará os mesmos critérios constantes no Art. 42º, com exceção do item VII.

**Art. 57º.** A Comissão Examinadora indicará a aprovação ou não da dissertação baseando-se na avaliação do trabalho entregue e na sua apresentação pública, atribuindo ao candidato uma das seguintes menções: aprovado ou reprovado.

§ 1º. Foi considerado aprovado ou reprovado o aluno que receber esta menção pela maioria dos membros da comissão julgadora;

§ 2º. O aluno que recebeu a menção reprovado é cancelado de imediato do programa;

§ 3º. No caso de modificação sugerida na dissertação ou na tese, a ocorrência é registrada na ata de defesa e o aluno deve efetuar a modificação dentro do prazo máximo de 90 (noventa) dias para reapresentação do referido trabalho, através de parecer fundamentado.

§ 4º. Após a aprovação final o aluno entregará à Secretaria do Programa um exemplar da dissertação em meio digital (CD ROM), no formato word e pdf, que deverá estar de acordo com as normas vigentes para apresentação de dissertações.