



PRPPG

Pró-reitoria
de Pesquisa e
Pós-graduação

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

RENATO MARTINS

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A MEMBRANA DE
LÁTEX E A MEMBRANA DE
POLITETRAFLUORETILENO (PTFE) NA
REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS**

BAURU
2008



RENATO MARTINS

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A MEMBRANA DE
LÁTEX E A MEMBRANA DE
POLITETRAFLUORETILENO (PTFE) NA
REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Oral, Área de concentração: Biologia Oral, sob orientação da Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita e co-orientação do Prof. Dr. Sérgio A. Catanzaro Guimarães

**BAURU
2008**

Martins, Renato

M3867e

Estudo comparativo entre a membrana de látex e a membrana de politetraflouretileno (PTFE) na regeneração de defeitos ósseos / Renato Martins -- 2008.

88f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio A. Catanzaro Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Regeneração óssea guiada. 2. Latéx. 3. Politetraflouretileno. I. Kinoshita, Angela Mitie Otta. II. Guimarães, Sérgio A. Catanzaro. III. Título.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À minha orientadora Professora Doutora **Ângela Kinoshita**, não só pela orientação deste trabalho, mas pelo constante apoio e pela confiança em mim depositada, assim como pelo carinho e amizade dedicados.*

*Ao Coordenador do Curso de Pós Graduação em Biologia Oral da USC, Professor Doutor **Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães**, pela seriedade de seu trabalho, pelo exemplo de pesquisador e professor, pelo carinho e amizade, e pela oportunidade de convívio e enriquecimento do meu saber.*

Com toda admiração e respeito.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade do Sagrado Coração** pelo conhecimento e experiência transmitidos;

À Professora Doutora **Silvana Pasetto**, pelo auxílio na análise histológica;

Ao Professor Doutor **Carlos F. O. Graeff** (FC-UNESP) e **Rondinelli D. Herculano** (FFCLRP-USP) pelo apoio neste trabalho e por disponibilizar as membranas de látex;

Ao Prof. Dr. **Marcello Carbonari** da empresa **BIONNOVATION BIOMEDICAL S/A** pela doação das membranas de Politetrafluoretileno e demais materiais utilizados neste trabalho;

Ao Professor Doutor **Orivaldo Tavano** pela importante colaboração neste trabalho, por toda paciência e disponibilidade em ajudar na análise dos resultados.

Ao Departamento de Física e Matemática da FFCLRP-USP pelo fornecimento dos animais e ao Prof. Dr. **Oswaldo Baffa** por disponibilizar o laboratório de Ressonância Magnética para realizar parte deste trabalho;

Ao responsável pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração, **Sérgio Henrique Pereira Moura**, pelo apoio e eficiência no trato com os animais durante a realização deste trabalho;

*À **Maira Cristina Rondina e Wilson Aparecido Orsini**, técnicos de laboratório da USC, pelo profissionalismo e colaboração com este trabalho;*

*Aos amigos **Leandro Holgado, Lee Chen Tzu, Tatiana Peixoto Telles de Souza, Leonardo Marques e Cibele Ereno** pela amizade e colaboração com este trabalho.*

*À todos os **colegas e funcionários do curso de Pós-graduação em Biologia Oral da USC**, pela convivência e amizade durante todo o curso;*

Aos companheiros do Curso de Mestrado pelos momentos compartilhados;

Enfim a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho consiste de um estudo comparativo do desempenho da membrana de látex natural, derivada de *Hevea brasiliensis*, e da membrana de Politetrafluoretileno – PTFE quando utilizadas como membranas oclusivas em procedimento de Regeneração Óssea Guiada. O látex é um material biocompatível, com alta resistência mecânica e que pode acelerar a angiogênese. Apresenta como outras vantagens, elasticidade, capacidade de induzir a neoformação de tecidos e o baixo custo. Testes iniciais realizados *in vivo* demonstraram que o látex é um ótimo candidato para este tipo de aplicação. Porém, para avaliarmos suas vantagens e desvantagens quando usadas como membrana oclusiva, um estudo comparativo faz-se necessário. Com isso, neste trabalho, utilizamos o modelo de craniotomia em coelhos para avaliar a regeneração óssea resultante do uso desta membrana, frente ao uso da membrana de PTFE e do grupo controle, sem uso de membranas. A escolha da membrana de PTFE deve-se ao fato deste material ter sua eficácia já comprovada, ser comercializada, e ser usada para tal propósito há algum tempo em procedimentos clínico-cirúrgicos, sendo considerada como “Padrão Ouro” ou “Gold Standart” na comparação com outros materiais usados para os mesmos fins. Neste trabalho as membranas foram implantadas na calvária de coelhos, como barreira mecânica em defeitos ósseos cirúrgicos de tamanho crítico (2cm x 1cm). A neoformação óssea foi analisada 15, 30 e 60 dias após a cirurgia e foi feita por estudos radiográficos, histológicos e por ressonância do spin eletrônico (RSE), sendo a última técnica utilizada para o estudo complementar da mineralização óssea. Os resultados histológicos revelaram que a fração de osso maduro presente no grupo tratado com membrana de látex foi superior ao grupo controle nos períodos de 15 e 60 dias ($P < 0,05$) e ao grupo tratado com PTFE em todos os períodos ($P < 0,05$). Os resultados obtidos por RSE também demonstram grau de mineralização maior no grupo tratado com Látex em relação aos demais grupos.

Palavras Chaves: Regeneração Óssea Guiada, Látex, Politetrafluoretileno, PTFE

ABSTRACT

This work is a comparative study of the performance of the Natural Latex membrane, derivative of *Hevea brasiliensis*, and the Polytetrafluorethylene membrane - PTFE as occlusive membranes in Bone Guided Regeneration procedure. The latex is a biocompatible material, with high mechanical resistance and can accelerate the angiogenesis and tissue neoformation. It presents other advantages such as elasticity and the low cost. Initial tests *in vivo* demonstrated that the Latex membrane is an excellent candidate for Bone Guided Regeneration. However, to evaluate its advantages and disadvantages as an occlusive membrane, a comparative study is necessary. So, in this work, we use the model of craniotomy in rabbits to evaluate the bone regeneration obtained by the use of this membrane in comparison with the use of the PTFE membrane and the control group (without membranes). The choice of the PTFE rely on the fact that its effectiveness had already been proven, to be commercialized and has been used for a long time for this purpose. PTFE is considered as "Gold Standard" for comparisons with other new materials. In this work the membranes were implanted in the rabbit calvaria in surgical critical size (2cm x 1cm) bone defects. The bone neoformation was analyzed 15, 30 and 60 days post-surgery and was made through radiographic, histological and electron spin resonance analyses (ESR). The last technique was used for complementary study of the bone mineralization. The histological results showed that the fraction of mature bone in the group treated with Latex membrane was higher than the ones of control group at 15 and 60 days post-surgery ($P < 0.05$) and to the ones of group treated with PTFE in all periods of study ($P < 0.05$). ESR results also demonstrate higher mineralization degree in the Latex's group in comparison with the others groups.

Keywords: Bone Guided Regeneration, Latex, Politetrafluorethylene, PTFE

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Distribuição dos coelhos nos grupos de acordo com os períodos a serem analisados	40
Tabela 2:	Intensidade média dos pixels de acordo com os períodos, relativos ao grupo A (Látex)	51
Tabela 3:	Intensidade média dos pixels de acordo com os períodos, relativos ao grupo B (PTFE)	51
Tabela 4:	Intensidade média dos pixels de acordo com os períodos, relativos ao grupo C (controle)	51
Tabela 5:	Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo A (Látex), período de 15 dias	53
Tabela 6:	Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo B (PTFE), período de 15 dias.....	54
Tabela 7:	Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo C (controle), período de 15 dias.....	55
Tabela 8:	Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo A (Látex), período de 30 dias.....	57
Tabela 9:	Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo B (PTFE), período de 30 dias.....	58
Tabela 10:	Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo C (controle), período de 30 dias.....	59
Tabela 11:	Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo A (Látex), período de 60 dias	60

Tabela 12:	Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo B (PTFE), período de 60 dias.....	61
Tabela 13:	Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo C (controle), período de 60 dias.....	62
Tabela 14:	Análise Histométrica comparativa entre os grupos de acordo com os períodos de estudo	62
Tabela 15:	Resultados obtidos por Ressonância do Spin Eletrônico relativo ao período de 60 dias de todos os grupos de estudo	71

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Estrutura molecular da borracha (a), formas das cadeias (b).....	29
Figura 2	- Assepsia da área a ser submetida ao procedimento cirúrgico com PVPI.....	41
Figura 3	- Incisão mucoperiosteal linear de 4cm de comprimento com lâmina bisturi15	41
Figura 4	- Osteotomia com broca trefina de 1cm de diâmetro.....	41
Figura 5	- Regularização da borda do defeito com ponta diamantada no aparelho de UltraSom.....	42
Figura 6	- Colocação da membrana PTFE em contato com Duramater e marcação das bordas com Guta Percha	42
Figura 7	- Sutura com fio de seda 4.0.....	42
Figura 8	- Placa de imagem do Sistema Digora	44
Figura 9	- Escaner de leitura ótica (laser) - Sistema Digora de Imagem	44
Figura 10	- Reprodução da tela do computador utilizando a ferramenta <i>Density Measurements</i> . Dados numéricos (a); seleção da área na imagem radiográfica digital (b); Histograma (c); e Perfil da densidade (d).....	45
Figura 11	- Espectrômetro Varian-E4 pertencente ao Departamento de Física e Matemática – USP – Ribeirão Preto	46
Figura 12	- Fotografia da metade da peça óssea contendo o defeito 60 dias após a cirurgia, ilustrando a membrana de látex recobrimdo a região do defeito ósseo	49
Figura 13	- Fotografias das peças 15 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Látex) e (B) Grupo B (PTFE)	49
Figura 14	- Fotografias das peças 30 dias após a cirurgia (A) Grupo B (PTFE) e (B) Grupo C (controle)	49
Figura 15	- Fotografias das peças 60 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Latex), (B) Grupo B (PTFE) e (C) Grupo C (controle)	49

Figura 16 - radiografia digital 15 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Látex), (B) Grupo B (PTFE) e (C) Grupo C (Controle)	50
Figura 17 - radiografia digital 30 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Látex), (B) Grupo B (PTFE) e (C) Grupo C (Controle)	50
Figura 18 - radiografia digital 60 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Látex), (B) Grupo B (PTFE) e (C) Grupo C (Controle)	50
Figura 19 - Média e Desvio padrão da intensidade média dos pixels de acordo com os grupos e períodos. Os valores médios entre os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.....	52
Figura 20 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo A (Látex), período de 15 dias	53
Figura 21 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original 2,0X. Grupo B (PTFE), período de 15 dias	54
Figura 22 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo C – CONTROLE	55
Figura 23 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo experimental A – LÁTEX, período de 30dias.....	56
Figura 24 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo experimental B – PTFE, período de 30dias.....	57
Figura 25 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo controle – C, período de 30 dias	58
Figura 26 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento 2,6X. Grupo experimental – A – LÁTEX, período de 60 dias.....	60
Figura 27 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento 2,0X. Grupo B (PTFE), período de 60 dias.....	61
Figura 28 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo C (controle), período de 60 dias	62

Figura 29 - Valores médio e desvio Padrão da Fração do volume de Osso Maduro, Osso Imaturo e Tecido Fibrovascular relativos ao Grupo A (Látex) de acordo com os períodos de estudo.....	63
Figura 30 - Valores médio e desvio Padrão da Fração do volume de Osso Maduro, Osso Imaturo e Tecido Fibrovascular relativos ao Grupo A (Látex) de acordo com os períodos de estudo.....	64
Figura 31 - Valores médio e desvio Padrão da Fração do volume de Osso Maduro, Osso Imaturo e Tecido Fibrovascular relativos ao Grupo C (controle) de acordo com os períodos de estudo.....	65
Figura 32 - Análise comparativa entre os grupos da variação (média e desvio padrão) da fração de osso maduro no decorrer dos períodos. * Médias significativamente diferentes ($p<0.05$) na comparação com o Grupo Controle e ** ($p<0.05$) na comparação entre os grupos A e B. Análise por ANOVA e Teste Tukey para comparação entre as médias	66
Figura 33 - Análise comparativa entre os grupos da variação (média e desvio padrão) da fração de Osso Imaturo no decorrer dos períodos. * Médias significativamente diferentes ($p<0.05$) na comparação com o Grupo Controle e ** ($p<0.05$) na comparação entre os grupos A e B. Análise por ANOVA e Teste Tukey para comparação entre as médias	67
Figura 34 - Análise comparativa entre os grupos da variação (média e desvio padrão) da fração do Tecido Fibrovascular no decorrer dos períodos. * Médias significativamente diferentes ($p<0.05$) na comparação com o Grupo Controle e ** ($p<0.05$) na comparação entre os grupos A e B. Análise por ANOVA e Teste Tukey para comparação entre as médias	68
Figura 35 - Espectros de RSE de amostra de osso da região Nativa e da região da lesão, 30 dias após a cirurgia. Amostra do grupo B (PTFE)	69
Figura 36 - Espectros de RSE de amostras ósseas coletadas 60 dias após a cirurgia referente ao grupo C (controle). As amostras coletadas da borda da lesão apresentam ($28,7\pm 2,3$)% da amplitude em relação à região nativa	70

- Figura 37** - Espectros de RSE de amostras ósseas coletadas 60 dias após a cirurgia, referente ao grupo A (Látex). As amostras coletadas da borda da lesão apresentam $(67,7 \pm 10,5)\%$ da amplitude em relação à região nativa e a região central, 18,6%70
- Figura 38** - Espectros de RSE de amostras ósseas coletadas 60 dias após a cirurgia, referente ao grupo B (PTFE). As amostras coletadas da borda da lesão apresentam $(67,7 \pm 10,5)\%$ da amplitude em relação à região nativa e a região central, 18,6%71
- Figura 39** - Razão entre as intensidades dos espectros de RSE referentes à região de neoformação (borda e centro) e osso nativo relativo ao período de 60 dias, dos grupos A (Látex) e C (controle)72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP	Proteína Morfogenética óssea
Gy	Gray
HE	Hematoxilina e Eosina
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Kg	Kilograma
kGy	Kilo Gray
kVp	kilo Volt
mA	miliampere
mAs	miliampere por Segundo
ml	mililitro
mm	milímetro
PTFE e	Membrana de Politetrafluoretileno expandido
PTFE d	Membrana de Politetrafluoretileno densa
PVPI	polivinilpirrolidona – iodo
Radiação UV	Radiação Ultra-Violeta
Radiação γ	Radiação gama
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RSE	Ressonância do Spin Eletrônico
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
USC	Universidade do Sagrado Coração
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	TECIDO ÓSSEO: FORMAÇÃO E REGENERAÇÃO.....	23
2.2	REPARAÇÃO ÓSSEA	26
2.3	LÁTEX NATURAL.....	28
2.4	POLITETRAFLUORETILENO (PTFE).....	31
2.5	RESSONÂNCIA DO SPIN ELETRÔNICO NO ESTUDO DE TECIDOS CALCIFICADOS	33
3	OBJETIVO.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1	LOCAL E GRUPO DE ESTUDO.....	38
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
4.3	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	39
4.3.1	ANESTESIA E ASSEPSIA.....	39
4.3.2	TÉCNICA CIRÚRGICA	39
4.4	PREPARO DAS PEÇAS E FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	43
4.4.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA	43
4.4.2	ANÁLISE DAS PEÇAS POR IMAGENS RADIOGRÁFICAS	43
4.4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	45
4.4.4	ANÁLISE POR RESSONÂNCIA DO SPIN ELETRÔNICO	46
5	RESULTADOS	48
5.1	ASPECTO CLÍNICO	48
5.2	ANÁLISE MACROSCÓPICA	48
5.2.1	GRUPOS A(LÁTEX) E B(PTFE	48

5.2.2	GRUPO CONTROLE.....	48
5.3	ANÁLISE RADIOLÓGICA.....	50
5.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA.....	52
5.4.1	PERÍODO DE 15 DIAS.....	53
5.4.2	PERÍODO DE 30 DIAS.....	56
5.4.3	PERÍODO DE 60 DIAS.....	59
5.5	ANÁLISE HISTOMÉTRICA COMPARATIVA.....	62
5.6	ANÁLISE POR RESSONÂNCIA DO SPIN ELETRÔNICO.....	69
5.6.1	PERÍODOS DE 15 E 30 DIAS.....	69
5.6.2	PERÍODO DE 60 DIAS.....	69
6	DISCUSSÃO.....	74
7	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	81
	ANEXO.....	88

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O reparo de defeitos ósseos é um desafio para diversas áreas da medicina e da odontologia, principalmente nas especialidades de cirurgia buco-maxilo-facial, periodontia, prótese e implantodontia. O reparo de defeitos cirúrgicos experimentais é um bom modelo para o estudo da regeneração do osso e possui grande semelhança com o reparo primário ou direto de fraturas. Neste trabalho o defeito avaliado foi a craniotomia em coelhos, região essa menos sujeita a fatores mecânicos e a obstruções do aporte sanguíneo. Este modelo tem sido utilizado em muitos experimentos clássicos que analisam a influência de medidas cirúrgicas e farmacológicas para melhorar a regeneração óssea (SCHENK 1994). Segundo Schimitz e Hollinger (1986), um defeito ósseo experimental deve ser tão grande que não ocorra reparo espontâneo, pois só nesta situação o potencial osteogênico do implante, enxerto ou medicamento pode ser considerado real. Instituiu-se o conceito de defeito ósseo de tamanho crítico para minimizar diferenças relacionadas à idade, espécie e o sítio anatômico em animais experimentais, padronizando-se os defeitos para possibilitar a comparação dos resultados dos vários estudos (SWEENEY *et al.* 1995), além de se poder considerar sem erro o potencial osteogênico do material em teste. O defeito intra-ósseo de tamanho crítico seria aquele de menor tamanho que não pode ser reparado espontaneamente, durante toda a vida do animal (SCHIMITZ E HOLLINGER, 1986). No entanto, como a maioria dos estudos possui duração limitada, em pesquisas experimentais deve-se considerar como defeito de tamanho crítico aquele que não sofre reparo no período de duração do estudo (GOSAIN *et al.* 2000). Tamanhos de defeitos críticos são bem caracterizados na região craniomandibulofacial, em várias espécies animais (GOSAIN *et al.* , 2000; Kaban e Glowacki, 1981; Schimitz e Hollinger 1986).

A inorganização do tecido frouxo apresenta-se como o obstáculo principal para o sucesso do reparo ósseo e também da neoformação óssea, pois seu crescimento no local lesado pode perturbar ou impedir totalmente a osteogênese. Experimentos *in vitro* demonstraram que algumas substâncias, produzidas por fibroblastos, são inibidoras da diferenciação de células ósseas e da osteogênese (OGISO *et al.*, 1991). Na tentativa de resolver este problema, numerosas técnicas

estão sendo desenvolvidas como o uso de enxertos, implantes e a regeneração óssea guiada, que por mais de uma década tem sido preconizada como um método efetivo para estimular a regeneração óssea (DUPOIRIEUX *et al*, 2001).

O conceito de utilizar barreiras físicas ao redor de tecidos lesados com o intuito de evitar a interferência de células provenientes de outros tecidos circunjacentes não é recente nas áreas médicas. Segundo esta teoria, se somente células oriundas do tecido a ser regenerado repovoarem o local, a regeneração torna-se mais previsível. Portanto, as técnicas cirúrgicas de barreiras/membranas têm o propósito da repopulação celular seletiva, para se guiar a proliferação de diferentes tecidos durante a cicatrização após a terapia.

Este conceito logo foi extrapolado para o campo da regeneração do tecido ósseo. Melcher e Dreyer, em 1962, colocaram em evidência a importância da preservação do coágulo sangüíneo para regeneração de defeitos ósseos.

No entanto esses conceitos só foram introduzidos na Odontologia a partir do início da década de 1980, quando Nyman *et al*. aplicaram a técnica de regeneração tecidual guiada (RTG) em Periodontia, em um modelo animal

O princípio da regeneração tecidual guiada (GTR – Guided Tissue Regeneration) foi desenvolvido para a regeneração dos tecidos periodontais perdidos resultantes de doença periodontal inflamatória. O estudo segundo Dahlin e colaboradores (DAHLIN *et al.* , 1994) documentou a possibilidade da exclusão de células não desejáveis no repovoamento da área da ferida por meio de barreiras de membrana, e favorecendo a proliferação de células teciduais definidas para a obtenção da cicatrização da ferida com um tipo de tecido desejável.

Normalmente, 0,7% do esqueleto é reabsorvido e substituído por novo osso a cada dia, fazendo com que sejam necessários 142 dias para a renovação completa do esqueleto humano.

Murray e Roschlau (1957) demonstraram que quando uma cavidade com uma fonte de osteoblastos e um suprimento sanguíneo foi isolados dos tecidos moles adjacentes, a cavidade pode ser preenchida com osso; entretanto, se o espaço não fosse protegido, pode ser preenchido com tecido conjuntivo fibroso. Este autor removeu um fragmento do osso íliaco de cães e recobriu o defeito com material plástico, rígido o suficiente para manter um espaço entre o tecido ósseo e a face interna do material. Após dez semanas verificaram crescimento de tecido ósseo com as características histológicas próprias deste tecido.

De acordo com Catanzaro *et al* (2002) a técnica de regeneração óssea guiada demonstrou sucesso em vários modelos experimentais e clínicos. O uso de uma membrana como barreira para prevenir invasão de células indesejáveis no defeito ósseo durante a reparação, permitindo a repopulação desta área por células específicas.

As membranas são materiais que servem para proteger o coágulo sanguíneo e prevenir as células do tecido mole (epitélio e conjuntivo) de migrarem para o interior do defeito ósseo. As propriedades ideais para as membranas são 1) biocompatibilidade, 2) manutenção do espaço, 3) oclusividade celular, 4) boas propriedades de manuseio e 5) capacidade de absorção (CARRANZA *et al* 2004).

Por ser o látex natural, um material biocompatível, com alta resistência mecânica e apresentar outras vantagens como elasticidade, capacidade de induzir a neoformação de tecidos e o baixo custo do material, ele representa um excelente material a ser estudado para este tipo de aplicação. Com isto, este estudo consiste na avaliação da eficiência da membrana de látex frente ao uso da membrana de PTFE e de um grupo controle, sem uso de membranas, no procedimento de regeneração óssea guiada. Para tanto, foi adotado o modelo de craniotomia animal, de tamanho crítico e a avaliação foi realizada por métodos histológicos, radiológicos e por ressonância do spin eletrônico.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo: Formação e Regeneração

Os ossos crescem, são remodelados e se mantêm ativos durante toda vida do organismo. Quando lesados são capazes de reparação, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade (SCHENK, 1994; KATCHBURIAN, ARANA, 1999). O osso retorna completamente à sua estrutura e função originais depois de lesado, sem deixar cicatriz (MANN, PAYNE, 1989; SCHENK, 1994; SZACHOWICZ, 1995; HOLLINGER, WONG, 1996). O processo de reparação óssea ocorre da mesma forma que o crescimento e desenvolvimento ósseo, onde uma lesão inicial desencadeia uma seqüência contínua de eventos celulares, terminando com a completa remodelação sem deixar cicatriz, similarmente à ossificação intramembranosa ou endocondral (BOSTROM, CAMACHO, 1998; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

A neoformação óssea em defeitos cirúrgicos envolve dois princípios básicos: osteocondução e osteoindução (SCHENK, 1994; KATCHBURIAN, ARANA, 1999; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

A osteoindução pode ser obtida por dois processos: um mediado por células e outro mediado por fatores de crescimento específicos. No primeiro, células osteogênicas da medula óssea induzem neoformação óssea. Já no segundo processo, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são fatores de crescimento, têm propriedade de estimular células mesênquimais indiferenciadas e sua migração, reagregação e diferenciação em condroblastos e ou osteoblastos, com subsequente deposição de matriz óssea (FRIEDENSTEIN, 1976).

Na osteocondução, a neoformação óssea pode ser auxiliada por materiais com estrutura especializada, que preenchem o defeito ósseo e atuam como arcabouço de sustentação para a penetração de células osteoprogenitoras. O material implantado serve como ancoragem para o crescimento de capilares, tecido perivascular e células indiferenciadas osteoprogenitoras originadas no leito ósseo

cirúrgico, e também impedem que tecidos não osteogênicos invadam o local a ser reparado (SCHENK, 1994; KATCHBURIAN, ARANA, 1999).

Pensava-se no esqueleto apenas como uma estrutura de suporte e como um material inerte e estático, no entanto o tecido ósseo tem a habilidade para adaptar sua massa e morfologia às demandas funcionais e mobilizar estoques de minerais rapidamente conforme a necessidade metabólica, demonstrando ser na realidade um material "inteligente" e um exemplo dinâmico da adaptação funcional dos sistemas biológicos. O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, serve de suporte para as partes mole e protege órgãos vitais. Aloja e protege a medula óssea, formadora de células do sangue. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. O osso é um tipo de tecido conjuntivo especializado, formado por matriz óssea, células e membranas conjuntivas. A matriz óssea é composta de uma porção inorgânica, formada por íons fosfato, cálcio, magnésio, potássio, sódio, citratos e bicarbonato; e de porção orgânica, formada por fibras colágenas (95%) e por pequena quantidade de substância fundamental amorfa (LEGERS, 2002). Sistemicamente, é controlado por fatores hormonais e localmente por forças mecânicas. Ao lado de seu excelente comportamento mecânico, o osso exibe um potencial inigualável de se regenerar (Alberts *et al.*, 2004). Entretanto, devido a sua estrutura calcificada rígida, o osso tem requisitos específicos que devem ser respeitados para a sua regeneração. A estrutura calcificada do osso tem perfusão limitada, por isso, a nova formação óssea é criticamente dependente da estabilidade de um coágulo sanguíneo adequado, por uma nova vascularização, enquanto mantém uma fixação rígida ou a estabilização para a formação óssea (CARRANZA *et al.* 2004).

A reconstrução de grandes deficiências esqueléticas representa um problema para a medicina e odontologia. Quando o defeito ósseo apresenta dimensões consideradas críticas, torna-se incapaz de regeneração pela formação de tecido ósseo, devido a invasão de tecido conjuntivo na área (SCHIMITZ *et al.*, 1990). O tamanho do defeito para ser considerado crítico depende: do potencial de osteogênese individual; da ordem filogenética; da idade (SCHIMITZ, HOLLINGER, 1986); da localização anatômica; e do revestimento intacto do periósteo (HJORTING-HANSEN, ANDREASEN, 1971). Em calvária de coelhos, o tamanho do

defeito considerado crítico é de 1,5 cm de diâmetro (FRAME, 1980; SCHIMITZ, HOLLINGER, 1986).

Os procedimentos de regeneração óssea guiada são uma alternativa para contornar este problema (DAHLIN, ALBERIUS, LINDE, 1991; LINDE *et al.*, 1993; DAHLIN *et al.*, 1994; BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1995; LUNDGREN, LUNDEGREN, TAYLOR, 1998). A técnica consiste em prevenir a invasão de células indesejáveis, como os fibroblastos, no defeito ósseo durante o processo de reparo, permitindo a repopulação desta área por células específicas para a neoformação óssea (NYMAN, 1991). O uso de membranas oclusivas é eficaz na regeneração óssea guiada quando utilizadas como barreiras à proliferação de células do tecido epitelial e conjuntivo para o interior do defeito ósseo, provendo um tempo adicional para as células osteogênicas, de migração mais lenta, repovoarem a área do defeito, desencadeando com eficiência a neoformação óssea (DAHLIN *et al.*, 1988; DAHLIN, ALBERIUS, LINDE, 1991; LINDE *et al.*, 1993).

Murray, Holden, Roschlau, (1957) demonstraram que quando uma cavidade com uma fonte de osteoblastos e um suprimento sanguíneo foi isolada dos tecidos moles adjacentes, a cavidade é rapidamente preenchida com osso; entretanto, se o espaço não é protegido, pode ser preenchido com tecido conjuntivo fibroso.

As membranas são materiais que se prestam para proteger o coágulo sanguíneo e prevenir que células dos tecidos conjuntivo e epitelial migrem para o interior do defeito ósseo.

Segundo Sakata *et al.*, 2004, o processo de regeneração óssea envolve o crescimento de células do tipo cartilaginosa, que são formadas na superfície externa do ferimento, geralmente durante os primeiros dias de o ferimento ter ocorrido. Entre a terceira e quarta semana, a lacuna entre as células tipo cartilaginosa do novo osso é invadida por tecido embrionário, o qual forma uma ponte de tecido conjuntivo. Entre a sexta e oitava semana, ocorre a calcificação, onde o sistema vascular penetra na fibrocartilagem, absorvendo-a, enquanto a área é preenchida por fibras ósseas. Finalmente, entre dois meses a dois anos, a nova fibra óssea formada é gradualmente trocada por osso rígido e, eventualmente, osso normal.

No tecido ósseo há quatro tipos de células: os osteoblastos, que estão relacionados com a formação da matriz orgânica óssea; os osteócitos que ficam presos nessa matriz após a mineralização da mesma; os osteoclastos, envolvidos com a reabsorção óssea e a célula forradora óssea, semelhante ao osteócito, que consiste em osteoblastos que não ficaram embebidos no novo tecido ósseo formado, mas aderem à superfície externa do osso quando a formação esta em repouso. Tais células tornam-se quiescentes e achatadas na superfície óssea, mas permanecem em continuidade com a matriz óssea mineralizada. Mantêm comunicação com osteócitos e com cada outra através de junções tipo "gap" conservando seus receptores para hormônios como da paratireóide e estrógenos. Como os osteócitos, essas células desempenham papel na transferência de minerais para o interior e fora do osso, além da sensação da tensão mecânica, por receber e transmitir sinais elétricos recebidos pelo osso, iniciando a remodelação óssea. Para que a regeneração óssea ocorra é necessário a presença de células específicas, que são os osteoblastos e os osteoclastos.

2.2 Reparação Óssea

A injúria óssea induz uma resposta inflamatória, que resulta em ativação do sistema complemento e danos aos vasos sanguíneos (lacerações) com extravasamento de células e moléculas sinalizadoras. A degradação proteolítica da matriz extracelular oferece os fatores quimiotáticos para os monócitos e os macrófagos. Os macrófagos ativados liberam o FGF que estimula as células endoteliais a expressar o ativador do plasminogênio e a procologenase.

Após a destruição do tecido, a membrana celular libera tromboxano-A₂ e prostaglandina-2 alfa, vasoconstritores potentes. O sangue extravasado forma um coágulo, composto de colágeno, plaquetas, trombina e fibronectina que liberam citocinas e fatores de crescimento que iniciam a resposta inflamatória. Ocorre um hematoma, estabelecendo um plugue hemostático, que previne a depleção do volume de sangue, sendo que as plaquetas que o integram têm uma função dual: a de controle da hemostasia e a de liberar fatores como PDGF, TGF- β , e o FGF. O coágulo de fibrina serve como um arcabouço ou andaime para a chegada de

neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais, além de concentrar citocinas e fatores de crescimento. O aparecimento de neutrófilos (PMN), linfócitos, monócitos e macrófagos são motivados por fatores de crescimento, entre eles IL-1, TNF-alfa, TGF- β e fator de plaqueta-4 (PF-4), liberados pelos grânulos alfa das plaquetas.

O local da ferida é caracterizado por diminuição na tensão de O₂ e do pH, criando as condições necessárias para as atividades operacionais dos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos. Os PMN removem microorganismos e debris, enquanto os macrófagos eliminam partículas maiores, podendo se transformar em células gigantes multinucleadas para construir uma barreira aos invasores. Os macrófagos sintetizam no local fatores de crescimento com o intuito de fortalecer a atividade celular, recrutando células, provocando mitogênese e quimiotaxia ao longo da cascata de reparação.

Em 3 a 5 dias forma-se um tecido de granulação que consiste de novos vasos sanguíneos, colágeno (tipo I ligado com osso, tipo II ligado com cartilagem, tipos III e V ligados com tecido de granulação, tipos IV e VI com matriz endotelial e tipo X com cartilagem hipertrófica) e células (fibroblastos e macrófagos). Existe a hipótese que a ligação seletiva de fatores de crescimento ao colágeno pode localizar, proteger e posicionar esses fatores (TGF- β , FGF, PDGF e BMP) para aperfeiçoar as interações célula-fatores. Este substrato colágeno, como uma matriz provisória, permite a chegada de MSC (células estromais multipotentes) e células osteoprogenitoras do periósteo e endósteo mediante a sinalização de TGF- β , BMP e sua ancoragem no colágeno do tecido de granulação para a diferenciação em fenótipos específicos como condroblastos e osteoblastos.

Após a diferenciação de células e a maturação da matriz celular, por várias semanas, forma-se um calo ósseo composto de elementos vasculares, produtos estromais, cartilagem e células. A cartilagem é substituída por osso entrelaçado bastante celular e com espículas ósseas ainda desorganizadas. O papel fundamental desse calo é estabilizar os fragmentos, assim se eles são móveis ocorrerá a predominância de cartilagem, enquanto estáveis o osso regenera restabelecendo sua forma e função. Desse modo quando se faz a redução de uma fratura com um dispositivo fixo, a fase intermediária de cartilagem é poupada e a

reparação do tecido de granulação se forma através do caminho intramembranoso ao invés da cascata endocondral. Embora ainda não bem esclarecido, as BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 e BMP-7 estão envolvidas com a angiogênese e diferenciação celular durante a reparação da fratura.

Durante 6 a 8 semanas após a injúria, várias células e fatores de crescimento (TGF- β , FGF, PDGF, BMP e fator de crescimento endotelial vascular – VEGF) constituem o repertório de ingredientes que assegura a reparação da fratura, reconstituindo o tecido injuriado com inúmeras células especializadas, os osteoblastos e osteoclastos, recrutadas e atuando em combinação com fatores de crescimento. No local da ferida, fragmentos de fibronectina e produtos da degradação da matriz extracelular serão as iscas para os monócitos que se converterão em osteoclastos. Além disso, os macrófagos no local expressam FGF e VEGF para a angiogênese e renovação vascular que permite o livre trânsito de osteoblastos, para que a regeneração tecidual ocorra como uma combinação de fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e substrato da matriz que interagem para dirigir o maquinário celular responsável por sintetizar novo osso.

2.3 Látex Natural

O látex da seringueira *Hevea brasiliensis* forma um sistema coloidal polifásico e polidisperso. Depois de centrifugado, o látex pode ser representado como sendo formado por três componentes fundamentais (Bernardes *et al*, 2000).

1. Fase borracha - hidrocarboneto isoprênico (37%). Apresenta coloração branca e é formada quase exclusivamente de borracha.

2. Soro (48%). Fração intermediária em forma de líquido é o meio dispersivo do sistema coloidal látex e contém proteínas e sais dissolvidos em água.

3. Fração de fundo (depósito) (15%). Apresenta coloração amarela e é constituída de componentes não borracha: os lutóides (proteínas, fosfolipídios e sais minerais) e as partículas Frey-Wyssling (constituídas de carotenóides e lipídios conferindo, por isso, à borracha, a coloração amarelada). A Figura 1 mostra a estrutura molecular da borracha e as formas das cadeias

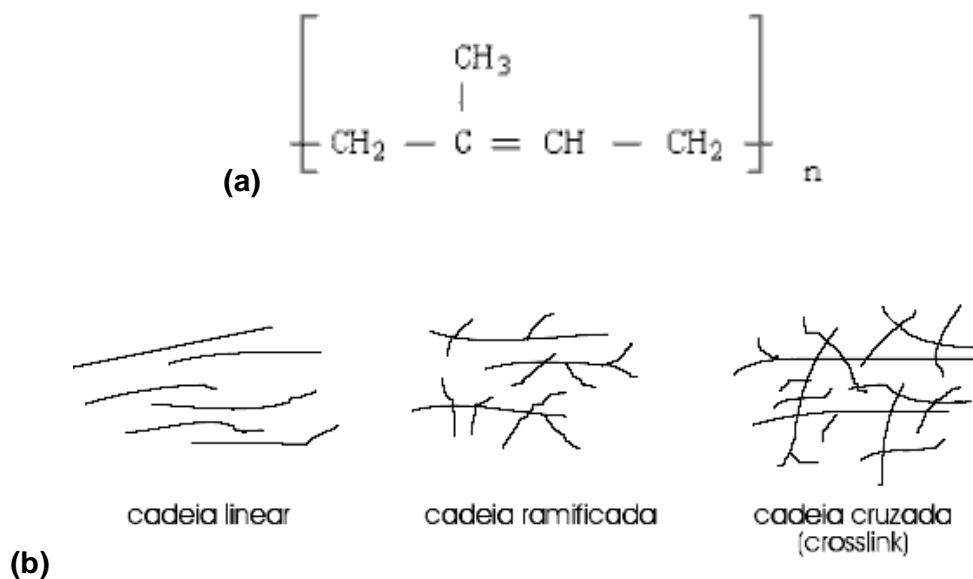


Figura 1: Estrutura molecular da borracha (a), formas das cadeias (b)

O processo de separação destas partes se dá através da ação de uma força centrífuga elevada (40.000 rpm).

O látex pode ser considerado um composto perecível devido à composição do soro que contém carboidratos, proteínas, sais minerais e microorganismos, sendo que ele se coagula espontaneamente de 8 a 10 horas após a colheita, separando a borracha em forma de coágulo.

O látex natural no primeiro instante que se escoa da seringueira é levemente alcalino. Por efeito de reações químicas e, sobretudo bioquímicas, vai se acidificando rapidamente, em contato com o ar.

O conteúdo da borracha seca é variável, notando-se que as primeiras sangrias, em árvores virgens ou em árvores após um repouso prolongado, produzem menor quantidade, porém em maior concentração de borracha. Na medida em que as sangrias se sucedem, a quantidade aumenta e o conteúdo de borracha decresce, até um certo limite. O conteúdo de borracha seca também decresce após períodos chuvosos ou em seguida aplicação de estimulantes.

Após a polimerização, o látex transforma-se em um filme com várias características desejáveis para uso em procedimento de regeneração óssea guiada, como a elasticidade e alta resistência mecânica. Além da biocompatibilidade, sabe-se também que o látex natural é capaz de acelerar a angiogênese (ALVES *et al.*, 2003) e esta propriedade pode também estar relacionado aos processos de osteogênese.

Vários trabalhos experimentais relatam o uso do filme de látex em forma de membrana ou de biomembrana, como citam alguns destes. O trabalho pioneiro foi de Mrue, em 1996, que usou látex natural como prótese de um segmento do esôfago cervical de cães. O látex não foi incorporado aos tecidos do hospedeiro e foi eliminado após dez dias de pós-operatório nas fezes do animal. No lugar formou-se um “neo-esôfago”, indicando as propriedades regenerativas deste material. Posteriormente, Sader *et al.* (2000), estudaram o comportamento da membrana de látex natural como substituto parcial do pericárdio de cães. Foram avaliados três grupos: grupo A, onde o retalho do pericárdio foi removido e reimplantado imediatamente; grupo B, em que o retalho foi removido e substituído por outro de látex natural, com 0,3mm de espessura; grupo C, no qual o retalho de látex tinha 0,7mm de espessura. Em 50% dos animais do grupo B e C houve completa regeneração do pericárdio. Nos cães do grupo A foi observado um quadro de regeneração irregular do pericárdio. Os resultados mostraram que a membrana de látex foi satisfatória para a substituição parcial do pericárdio de cães.

As propriedades relativas à angiogênese foram testada por ALVES (2003) através do uso da membrana cório-alantóide de embriões de galinha. Foi possível observar a indução de angiogênese no tecido onde a membrana de látex manteve contato durante o experimento. A cicatrização conjuntival e a neoangiogênese foi relatada por PINHO *et al.* (2003) que utilizaram modelo animal (olhos de coelhos) para reconstrução conjuntival. Após análises histológicas, observaram que a recuperação foi satisfatória em 60% dos olhos com biomembrana de látex enquanto que, nos olhos do grupo sem membrana, ela foi satisfatória em apenas 20%. O número médio de vasos por campo óptico na ferida cirúrgica dos olhos com biomembrana foi o dobro desse mesmo número nos olhos com esclera nua (grupo controle).

Mais recentemente, Balabanian *et al.* (2006), avaliaram a biocompatibilidade do látex natural. Grânulos de látex foram implantados em cavidades ósseas alveolares depois de extração dental em ratos. Os animais foram sacrificados 7, 21 e 42 dias após os procedimentos. Os dados quantitativos confirmaram a aceleração da neoformação óssea e a diminuição da presença de tecido conjuntivo ao redor do implante. Foi demonstrado que o material apresentou biocompatibilidade, progressiva integração com o osso alveolar, simultaneamente aceleração da neoformação óssea e mostrou importante atuação no processo de cicatrização.

Ereno (2007) avaliou o uso da biomembrana de látex como membrana oclusiva em regeneração óssea guiada. O modelo utilizado foi de craniotomia em coelhos, onde defeitos críticos foram criados cirurgicamente e tratados com a membrana de látex. Os resultados das avaliações histológica, histométrica, radiológica e por ressonância do spin eletrônica mostraram a eficiência desta membrana em relação ao grupo controle, não tratado. Também foi observada a biocompatibilidade deste material devido a ausência de reação inflamatória do tipo corpo estranho, frente ao implante deste material.

2.4 Politetrafluoretileno (PTFE)

Descoberto acidentalmente por Roy J. Plunkett para a empresa DuPont, em 1938 e apresentado para fins comerciais, em 1946, o PTFE é um polímero similar ao polietileno, onde os átomos de hidrogênio estão substituídos por flúor. A fórmula química do monômero, o tetrafluoretileno, é $CF_2=CF_2$, e o polímero $-(CF_2-CF_2)_n-$. (wikipedia, acesso em 30 agosto 2008)

A membrana de PTFE utilizada neste trabalho é referida como membrana de politetrafluoretileno densa e fabricada pela MUPOR Ltda, uma subsidiária da Corporação POREX, sob condições legais e vendida no Brasil pela empresa Bionnovation Biomedical S/A.

A membrana de PTFE apresenta-se como um polímero poroso, formando uma rede intrincada de células abertas e poros multidirecionais, que conferem a

esse tipo de material uma combinação única de capacidade filtrante e força estrutural.

O PTFE tem uma compatibilidade química surpreendente, é extremamente hidrofóbico e suporta muito bem o uso contínuo a 248°C, sendo o material mais resistente a calor de todos os materiais do fabricante.

A molécula fluorcarbono, politetrafluoretileno (base química componente do PTFE), não pode ser quebrada quimicamente em condições fisiológicas. Além disso, a segurança do PTFE foi estabelecida por extensos testes de biocompatibilidade, longa história de segurança e uso efetivo em próteses vasculares e de tecidos moles (HARDWICK *et al.*, 1996).

A principal virtude deste material é que ele é uma substância praticamente inerte, não reage com outras substâncias químicas exceto em situações muito especiais. Isto se deve basicamente a proteção dos átomos de flúor sobre a cadeia carbônica. Esta carência de reatividade permite que sua toxicidade seja praticamente nula sendo, também, o material com o mais baixo coeficiente de atrito conhecido. Outra qualidade característica é sua impermeabilidade mantendo, portanto, suas qualidades em ambientes úmidos. Por estas características especiais, além da baixa aderência e aceitabilidade ótima pelo corpo humano, ele é usado em diversos tipos de prótese. Segundo Garg, 2004 algumas membranas derivadas deste material teriam uma vantagem no sentido de permitirem sua exposição na cavidade oral, por exemplo, sem o risco de comprometer o processo de regeneração óssea.

Inicialmente o uso do material de PTFE para a osteopromoção foi bem ilustrado em um relato publicado em 1988 por Dahlin *et al.*, que levantaram um retalho mucoperiostal e produziram um defeito ósseo bilateral na mandíbula de 30 ratos adultos. Em um dos lados o defeito foi coberto com a membrana de e-PTFE (Gore-tex®), enquanto do outro o defeito foi apenas coberto com o retalho mucoperiostal. Os resultados obtidos pela análise macroscópica e histomorfométrica mostraram que a barreira mecânica de crescimento celular de tecido conjuntivo fibroso no interior do defeito ósseo resultou em reparo ósseo completo no local testado, considerando que o defeito no lado controle foi

preenchido por tecido conjuntivo fibroso, com pouco desenvolvimento de osso neoformado nas margens do defeito. Foi demonstrado claramente a grande importância desse obstáculo mecânico contra a proliferação de tecido conjuntivo frouxo, durante a cicatrização óssea.

Strietzel *et al.* (2005) constataram também a eficiência da membrana de PTFE, quando compararam em seu trabalho, o tratamento de defeitos ósseos realizados em mandíbulas de porco, com outros tipos de barreiras.

Barber *et al.* (2007) analisaram os resultados entre diferentes materiais utilizados como barreira, demonstrando vantagem da membrana de PTFE – densa naquelas situações em que não poderia ser protegidas ou totalmente cobertas pelo retalho, mostrando menor incidência na colonização de bactérias, devido às próprias características superficiais do material.

2.5 Ressonância do Spin Eletrônico no Estudo de Tecidos Calcificados

A dosimetria por RSE é uma técnica especialmente utilizada em casos de acidente com radiações ionizantes, pois permite a utilização de partes do corpo (dentes e ossos) como dosímetros. A idéia de se utilizar ossos e dentes como indicador da dose em acidentes foi apresentada por Mascarenhas (1973), no *American Physical Society Meeting*. O autor observou um sinal de RSE intenso em ossos de vítimas da Bomba-A. Nesta ocasião, propôs-se a avaliação de doses recebida pelas vítimas de Hiroshima através do esmalte dental, a fim de proporcionar um tratamento médico adequado e estudar os efeitos biológicos produzidos pela radiação. Caracelli (1986) determinou as propriedades dosimétricas dos ossos e mais recentemente estas propriedades foram aplicadas para avaliar a dose liberada por $^{135}\text{Sm-EDTMP}$ e $^{89}\text{SrCl}_2$, que são compostos utilizados em Radioterapia Sistêmica para tratamento paliativo da dor provocada por metástases ósseas (KINOSHITA, 2001).

Dalpino (2006) utilizou a espectroscopia por RSE para o estudo da dinâmica da regeneração óssea. Neste trabalho, a regeneração óssea guiada por membrana de poliuretano e de politetrafluoretileno foi avaliada em defeito cirúrgicos

experimentais na calvária de coelhos, utilizando-se as técnicas convencionalmente empregadas (histológicas e radiográficas), bem como a RSE. Este último estudo trouxe informações complementares relativas ao grau de mineralização óssea obtida durante o processo de reparo.

OBJETIVOS

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é avaliar a regeneração óssea guiada de defeitos críticos criados nos ossos do crânio em coelhos, frente ao uso das membranas de látex natural, comparativamente a membrana de PTFE (politetrafluoretileno) e com o grupo controle. Para esta avaliação, métodos histológicos, radiológicos e por ressonância do spin eletrônico foram empregados.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local e Grupo de Estudo

Foram utilizados 27 coelhos brancos adultos da raça *New Zealand*, com peso médio de 3 kg, idade entre três e quatro meses, mantidos, durante todo o período experimental, em boas condições ambientais, de alimentação, temperatura, higiene e iluminação e em cativeiros individuais. Os coelhos foram obtidos do Biotério Geral da USP de Ribeirão Preto.

Estes animais foram divididos em três grupos (A, B e C) com nove coelhos em cada. A análise de neoformação óssea foi realizada nos períodos de 15, 30 e 60 dias.

As membranas de PTFE foram adquiridas da empresa Bionnovation Biomedical S/A, Bauru – SP e as membranas de látex foram fornecidas pela USP de Ribeirão Preto.

Os procedimentos cirúrgicos ocorreram no Biotério da Universidade do Sagrado Coração, na cidade de Bauru, São Paulo, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade (Protocolo 14/07)

4.2 Delineamento Experimental

Os 27 animais foram divididos em 3 grupos (A, B e C), com 9 coelhos em cada. O grupo A recebeu a membrana de látex natural, o grupo B, a membrana de PTFE, e o grupo C (grupo controle), não recebeu membrana.

Em todos os animais foi feito cirurgicamente um defeito ósseo crítico de tamanho 2cm x 1cm no crânio.

Os animais foram observados em períodos de 15, 30, 60 dias. Decorridos estes períodos seis animais do grupo experimental (A e B) e três do grupo controle(C) foram eutanasiados.

4.3 Procedimentos Cirúrgicos

4.3.1 Anestesia e Assepsia

Para realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia geral com administração da medicação pré-anestésica de relaxante intramuscular (Diazepan), a uma dose de 0,1 ml/kg de peso corpóreo, seguido pela administração intramuscular do anestésico geral (Ketamina), a uma dose de 0,25 ml/kg.

Após este procedimento foram realizados os procedimentos de tricotomia na região do osso frontal, de assepsia com PVPI (polivinilpiridona) tópico e de infiltração, para fins hemostáticos, com anestésico local cloridrato de prilocaína a 3% e felipressina 0,03U.I. na região que a ser incisada (Figura 2).

4.3.2 Técnica Cirúrgica

A área a ser operada foi isolada com campos cirúrgicos estéreis. Foi realizada uma incisão mucoperiostal linear, de aproximadamente 4cm, lateralmente ao plano sagital mediano do osso parietal com lâmina de bisturi número quinze (figura 3). Em seguida, procedeu-se a dissecação cuidadosa com destaca-periosteio para expor a superfície óssea e seqüencialmente a divulsão muscular plano a plano do retalho com espátula. O defeito ósseo foi criado na calvária do coelho, com uma broca trefina de 10 mm de diâmetro, acionada por um micromotor cirúrgico de baixa rotação e abundante irrigação com solução salina (figura 4). O defeito ósseo tem a forma elíptica na dimensão de 2 cm x 1 cm. Todo osso cortical e esponjoso foi removido, expondo a membrana meníngea. As bordas dos defeitos foram regularizadas com osteótomo, auxiliado pelo uso de pontas diamantadas CVD (CLOROVALE DIAMANTES INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA), acopladas em aparelho de ultra-som portátil, que além da finalidade de regularizar as bordas do defeito também serviu para estimular o preenchimento do defeito com o coágulo sanguíneo (figura 5). O defeito ósseo criado recebeu ao seu redor a uma distância uniforme de 1mm, medidos com auxílio de um aro pré-fabricado de metal que guiou a marcação no osso com broca tronco-cônica picotada número 699 com os mesmos

cuidados da criação do defeito ósseo. A seguir, procedeu-se o preenchimento da canaleta formada com guta percha de baixa fusão, que durante o processamento das peças anatômicas, atuaram como referência para a quantificação do processo de reparo (figura 6).

Os animais dos grupos A e B receberam duas membranas de látex e PTFE, respectivamente, uma no assoalho, recobrando a meninge, e outra na superfície do defeito (figura 7). Os animais do grupo C (controle) tiveram seus defeitos ósseos apenas preenchidos por coágulo sanguíneo. O procedimento de sutura foi realizado logo a seguir, inicialmente no perióstio e, posteriormente, da pele com fio seda 4.0 reabsorvível (figura 8).

Após os procedimentos cirúrgicos, como profilaxia a infecções, foi administrado Ampicilina sódica numa dose única de 1ml/kg por via intramuscular.

Após os períodos de preservação, os animais foram sacrificados com superdosagem de anestésico geral Ketalar (4 ml).

A Tabela 1 a seguir mostra a divisão do grupo de coelhos.

Tabela1. Distribuição dos coelhos nos grupos de acordo com os períodos a serem analisados.

Período	15 dias	30 dias	60 dias	Total de coelhos
Grupo A (Látex)	3	3	3	09
Grupo B (PTFE)	3	3	3	09
Grupo C (Controle)	3	3	3	09
Total	9	9	9	27

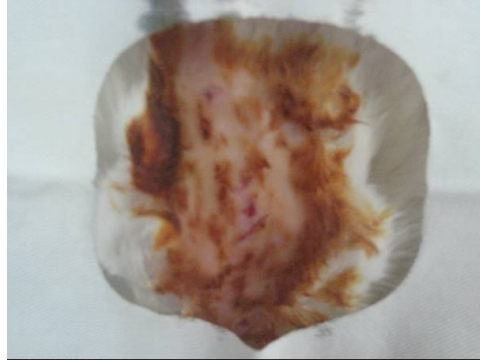


Figura 2 – Assepsia da área a ser submetida ao procedimento cirúrgico com PVPI



Figura 3: Incisão mucoperiosteal linear de 4cm de comprimento com lâmina bisturi 15

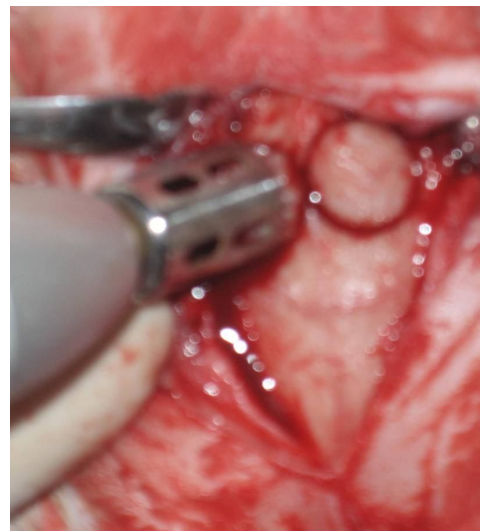


Figura 4: Osteotomia com broca trefina de 1cm de diâmetro



Figura 5: Regularização da borda do defeito com ponta diamantada no aparelho de Ultra Som

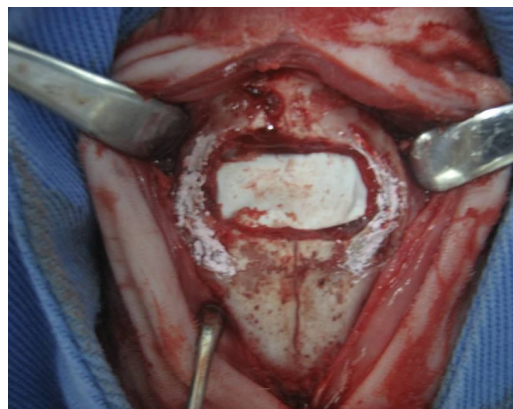


Figura 6: Colocação da membrande PTFE em contato com Duramater e marcação das bordas com Guta Percha

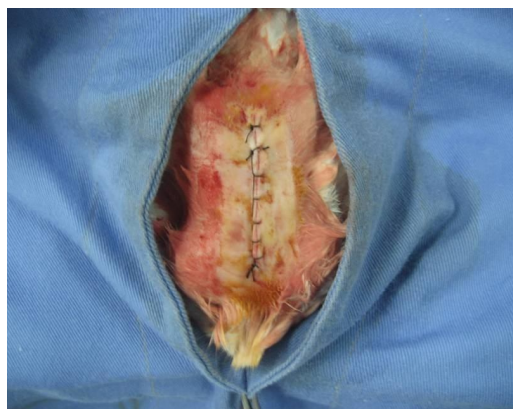


Figura 7: Sutura com fio de seda 4.0

4.4 Preparo das Peças e Forma de Análise dos Resultados

A coleta das peças foi realizada com um disco diamantado com auxílio de micromotor cirúrgico. Subseqüentemente as peças foram fixadas em formol a 10%, para que posteriormente fossem feitas as análises macroscópicas, microscópicas e radiográficas. Logo após a análise radiográfica, cada peça foi subdivida em duas partes, uma delas foi utilizada para análise histológica e a outra para análise por Ressonância do Spin Eletrônico.

4.4.1 Análise macroscópica

Os espécimes foram analisados macroscopicamente na suas dimensões, coloração e fotografados em lente de aproximação.

4.4.2 Análise das peças por imagens radiográficas

Inicialmente as peças foram absorvidas por um lenço de papel, para a retirada da umidade. O posicionamento das mesmas foi horizontal e paralelamente ao longo do eixo da placa de imagem, específica do sistema Digora, colocadas sobre uma superfície plana, cobertas por uma peça de isopor.

Para as radiografias, utilizou-se um aparelho de raios-X odontológico, regulado para 70kVp e 8mA, com filtragem total equivalente a 2mm de alumínio. Posicionou-se o cilindro localizador de modo que o feixe central incide perpendicularmente ao plano do filme, com distância foco/filme de 40cm e a exposição de (2mAs) previamente selecionado.

A placa de imagem (Figura 8) sensibilizada foi posicionada no leitor óptico do Sistema Digora (Figura 9) para posterior captura da imagem latente contida na porção ativa da placa, através de varredura a laser. Foram observadas as diferenças de radiopacidades, relevos e tons da cor cinza nas imagens.

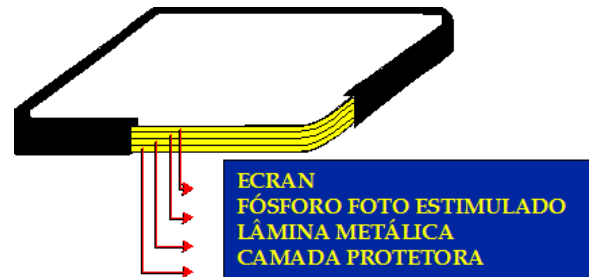


Figura 8 - Placa de imagem do Sistema Digora (ERENO, 2007)



Figura 9 - Escaner de leitura ótica (laser) - Sistema Digora de Imagem (ERENO, 2007)

Utilizando o dispositivo **Density Measurements** foi possível selecionar, através de segmentos de retas, a área do defeito ósseo para ser analisado (Figura 10a). Neste estudo foi padronizado o uso de 4 segmentos de reta (Figura 10b), numa área de aproximadamente 170 à 185 pixels. Após a seleção da área do defeito ósseo, o sistema Digora informa a intensidade do pixel mais claro, intensidade do pixel mais escuro, o tamanho da área selecionada em pixels, a média dos pixels nessa área selecionada e o desvio padrão (figura 10a). Este sistema apresenta o histograma da área selecionada (figura 10c), que permite analisar o nível de cinza da imagem numa ampla escala, que vai de zero (radiolúcido) a 255 (radiopaco). Há também, o perfil da densidade (figura 10d), onde é possível visualizar os segmentos de retas. A disposição dessas retas informa se o processo de reparação óssea está sendo uniforme (linhas semelhantes, sem variação entre picos e vales) ou, se, por exemplo, há radiopacidade maior ou menor em uma determinada localização, através da inclinação para baixo ou para cima de algumas ou de todas essas retas, respectivamente.

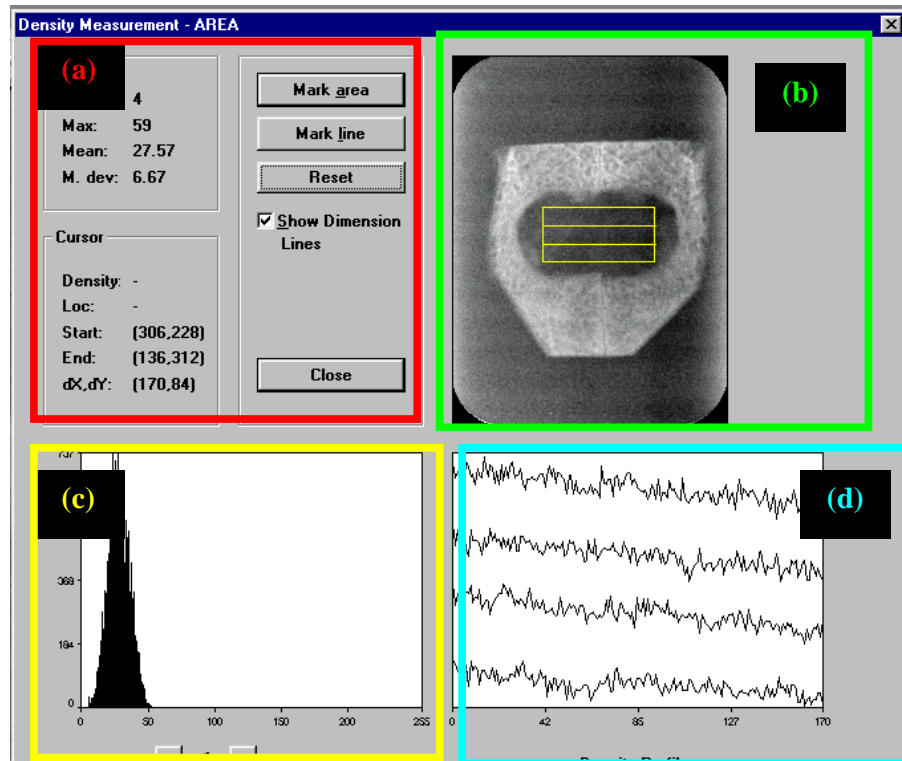


Figura 10 - Reprodução da tela do computador utilizando a ferramenta *Density Measurements*. Dados numéricos (a); seleção da área na imagem radiográfica digital (b); Histograma (c); e Perfil da densidade (d). (ERENO, 2007)

4.4.3 Análise Microscópica

Inicialmente as peças foram fixadas em formol a 10% por 92 horas, seguida de descalcificação pelo método Morse (solução aquosa de ácido fórmico/citrato de sódio) e incluídas em parafina. Os cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal com seis micrômetros de espessura e corados pelos métodos da hematoxilina/eosina e Tricômico Masson.

Os cortes microscópicos foram analisados e descritos em todas as suas peculiaridades. Foram selecionados e fotografados, os dados mais relevantes, no próprio microscópio para a competente comprovação.

4.4.4 Análise por Ressonância do Spin Eletrônico

As amostras de ossos neoformados de cada grupo (A, B e C) e referentes a cada fase (15-30-60 dias) foram lavadas em água destilada e álcool etílico. Frações referentes à borda do defeito, centro do defeito e osso pré-existente foram destacadas, de cada amostra e suas massas foram medidas através de uma balança analítica. A seguir, foram secas em dessecador por um período de 15 dias e moídas manualmente, através de um gral de ágata a fim de se produzir um pó com partículas de diâmetro de cerca de 1mm. Após esse processo, todas as amostras foram irradiadas com a dose de 3kGy de radiação γ de uma fonte de Cobalto-60. As irradiações foram realizadas no IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – SP. Os espectros de cada amostra foram registrados, através do espectrômetro Varian E-4, do Departamento de Física e Matemática USP-RP (FIGURA 11). Os parâmetros de aquisição do espectro foram: Campo Central 3380G, Varredura 100G, Tempo de Varredura 1 minuto, Modulação 2G, Potência de microondas 20mW.

Após o registro dos espectros de RSE, a amplitude do sinal referente ao radical CO_2^- (gerado na hidroxiapatita) foi determinada para a região neoformada e comparada em relação ao osso normal. Os espectros de RSE foram analisados através do software Microcal Origin. A razão entre essas amplitudes foi utilizada como indicador do grau de mineralização da amostra.



Figura 11 - Espectrômetro Varian-E4 - Departamento de Física e Matemática – USP – Ribeirão Preto.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Aspecto Clínico

Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sem imobilização e mantiveram suas funções vitais. Não houve infecções pós-operatórias e evidências de inflamação tipo corpo estranho. Durante o pós-operatório foi observada excelente recuperação dos coelhos.

5.2 Análise Macroscópica

5.2.1 Grupos A e B

As membranas utilizadas como barreira biológica se mantiveram íntegras e estáveis durante todo o período do estudo. A figura 12 ilustra a membrana de látex recobrindo a região do defeito de metade da amostra referente ao período de 60 dias. No período de 15 dias, não se observava muito claramente osso formado (figura 13 A e B), mostrando apenas em relação ao grupo B – PTFE, haver um maior preenchimento com um tecido de consistência maleável revestindo as paredes do defeito. Após 30 dias, observa-se um tecido de consistência maleável na área do defeito (figura 14 A e B). No período de 60 dias nota-se a presença de tecido endurecido entre as membranas (figura 15 A, B, C).

5.2.2 Grupo controle

As peças coletadas do grupo controle, em todos os períodos estudados, apresentaram um tecido cicatricial recobrindo o defeito. Nos períodos 15 e 30 dias notou-se que o tecido que cobre o defeito é mole, bem fino e muito frágil, enquanto que, no período de 60 dias, o tecido é mais espesso, mas não rígido como tecido ósseo.



Figura 12 : Fotografia da metade da peça óssea contendo o defeito 60 dias após a cirurgia, ilustrando a membrana de látex recobrendo a região do defeito ósseo.



Figura 13: Fotografias das peças 15 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Látex) e (B) Grupo B (PTFE)

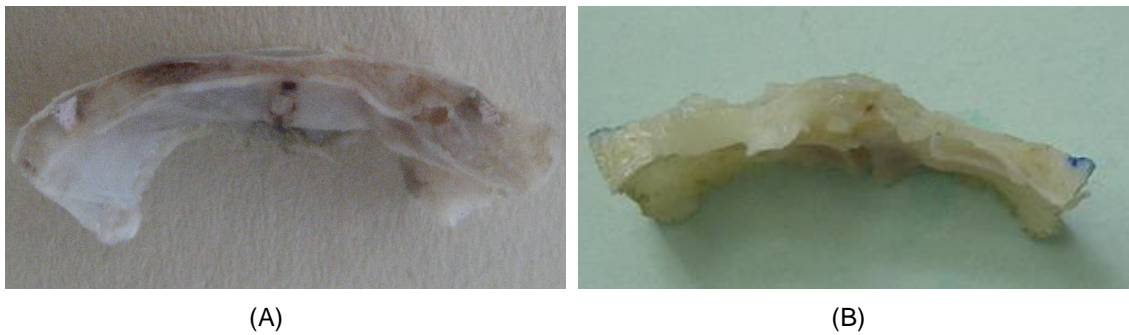


Figura 14: Fotografias das peças 30 dias após a cirurgia (A) Grupo B (PTFE) e (B) Grupo C (controle)

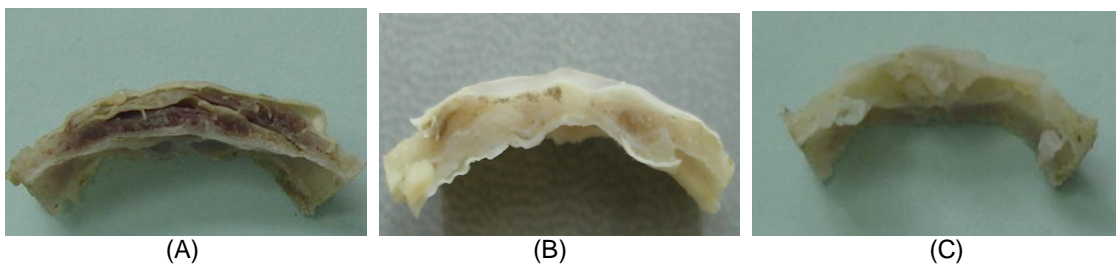


Figura 15: Fotografias das peças 60 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Latex), (B) Grupo B (PTFE) e (C) Grupo C (controle).

5.3 Análise Radiológica

As figuras 16, 17 e 18 mostram as radiografias digitais das peças coletadas 15, 30 e 60 dias após a cirurgia.

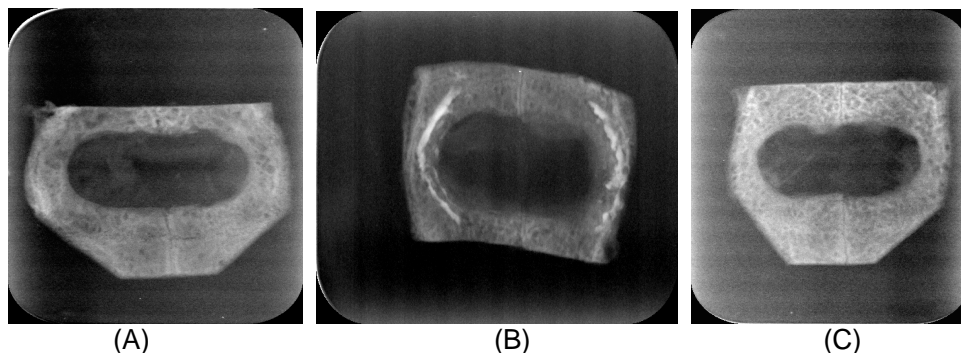


Figura 16 – radiografia digital 15 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Látex), (B) Grupo B (PTFE) e (C) Grupo C (Controle)

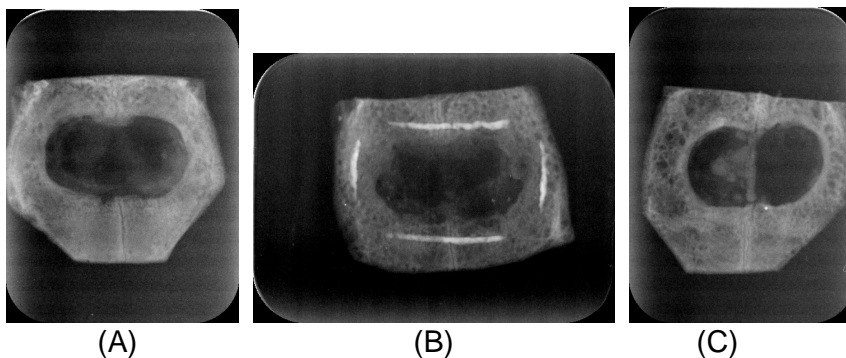


Figura 17 – radiografia digital 30 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Látex), (B) Grupo B (PTFE) e (C) Grupo C (Controle)

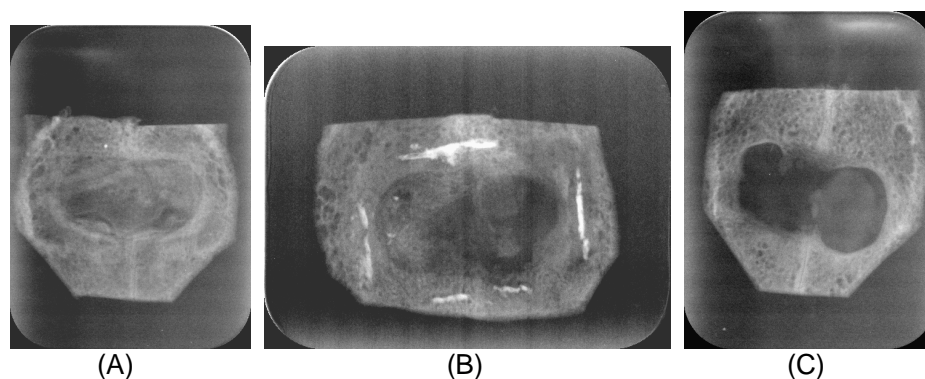


Figura 18 – radiografia digital 60 dias após a cirurgia (A) Grupo A (Látex), (B) Grupo B (PTFE) e (C) Grupo C (Controle)

As tabelas 2, 3 e 4 mostram os valores das intensidades médias dos pixels, na região do defeito, relativos aos grupos A (Látex), B (PTFE) e C (controle), de acordo com os períodos.

Tabela 2: Intensidade média dos pixels de acordo com os períodos, relativos ao grupo A (Látex)

Animal	15 dias	30 dias	60 dias
1	30,6	37,6	58,1
2	30,6	28,5	58,1
3	28,4	31,2	27,9
Média	29,9	32,4	48,0
Desvio Padrão	1,3	4,7	17,4

Tabela 3: Intensidade média dos pixels de acordo com os períodos, relativos ao grupo B (PTFE)

Animal	15 dias	30 dias	60 dias
1	41,2	42,8	36,1
2	38,7	50,5	39,9
3	29,8	36,9	33,1
Média	36,6	43,4	36,4
Desvio Padrão	6,0	6,8	3,4

Tabela 4: Intensidade média dos pixels de acordo com os períodos, relativos ao grupo C (controle)

Animal	15 dias	30 dias	60 dias
1	33,7	36,3	31,8
2	29,4	42,6	48,5
3	32,0	36,4	46,8
Média	31,7	38,4	42,4
Desvio Padrão	2,2	3,6	9,2

A figura 19 a seguir mostra a análise comparativa entre os grupos

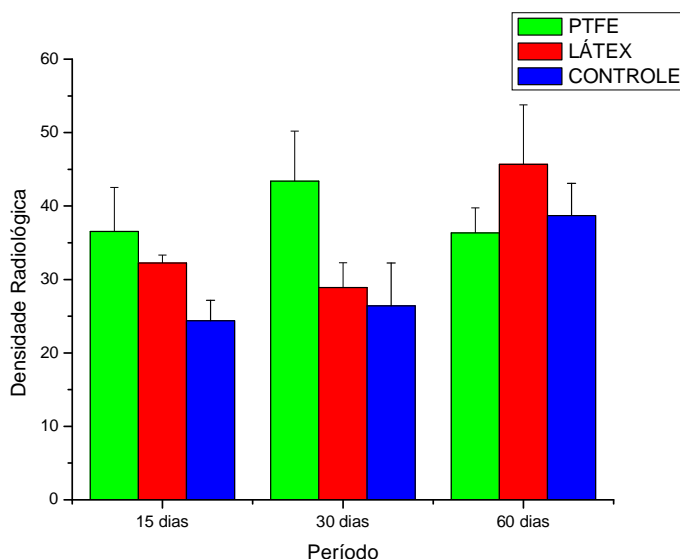


Figura 19 : Média e Desvio padrão da intensidade média dos pixels de acordo com os grupos e períodos. Os valores médios entre os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

5.4 Análise Histológica e Histométrica

A coloração por Tricrômico de Masson, mostra com riqueza de detalhes a neoformação óssea, por meio desta, pode-se estabelecer que o tecido ósseo apresenta-se mais diferenciado (maduro/mineralizado), quanto mais avermelhado estiver, mais indiferenciado (imaturo), quanto mais azul se apresentar.

Em todas as lâminas analisadas, a região do defeito ósseo foi de fácil visualização, assim como as membranas de PTFE no assoalho e no teto do defeito. A membrana de látex foi removida durante o procedimento de preparo pois o látex é solúvel em xilol.

5.4.1 Período de 15 dias

Na análise histológica os grupos avaliados apresentaram processo de reparo por ossificação osteonal direta ou intramembranosa. Observou-se que os defeitos cirúrgicos foram preenchidos por tecido conjuntivo osteogênico.

Grupo A (Látex)

Descrição Histológica:

A fotomicrografia (Figura 20) mostra o defeito ósseo parcialmente preenchimento por tecido fibrovascular, pontos de neoformação óssea (osso imaturo). Nota-se ainda a presença de coágulo sanguíneo.

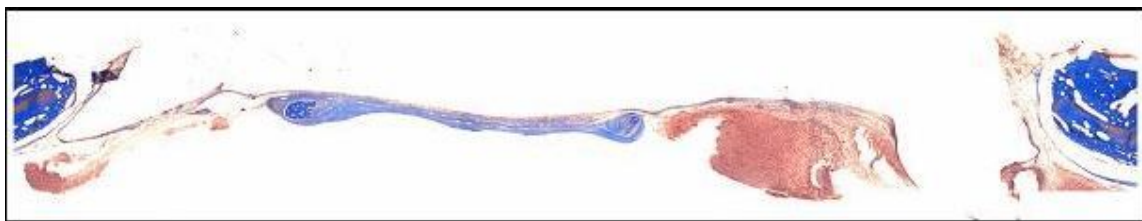


Figura 20: Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo A (Látex), período de 15 dias.

Análise Histométrica:

A tabela 5 a seguir mostra os resultados da histometria referente ao grupo A (Látex) período de 15 dias.

Tabela 5: Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo A (Látex), período de 15 dias.

Animal	Osso Imaturo (%)	Osso Maduro (%)	Tecido Fibrovascular e Medula óssea (%)
1	30,4	35,9	33,7
2	33,1	35,3	31,6
3	32,5	26,5	41,0
Média	32,6 ± 5,3	30,1 ± 6,5	35,4 ± 4,9

Grupo B (PTFE)

Descrição Histológica:

A fotomicrografia mostra alguns pontos de foco hemorrágico; uma fina camada de tecido fibrovascular preenche o assoalho do defeito, com alguns pontos de neoformação óssea e pequenos focos de osso em processo de mineralização. Nesta imagem é possível observar também que há neoformação óssea nas bordas laterais do defeito que tendem a se irradiar para o centro e que num estágio mais avançado, vai preencher toda a área cirúrgica.

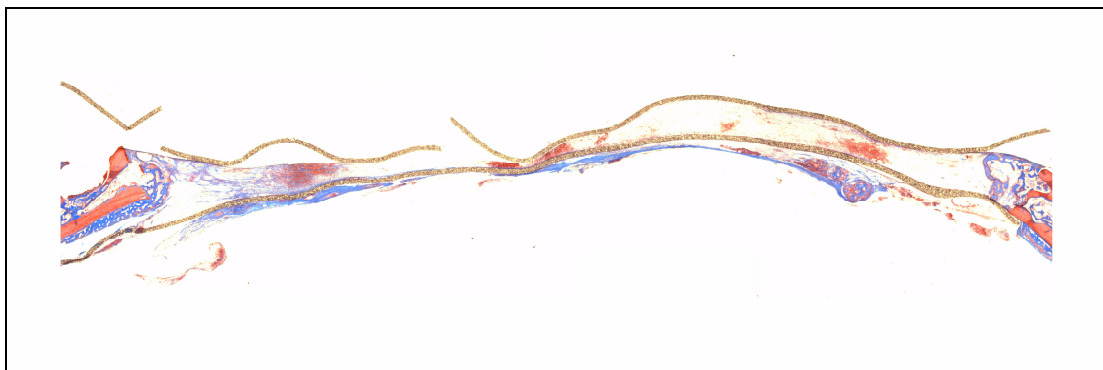


Figura 21: Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original 2,0X. Grupo B (PTFE), período de 15 dias.

Análise Histométrica:

A Tabela 6 a seguir mostra os resultados da histometria referente ao grupo B (PTFE) período de 15 dias.

Tabela 6: Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo B (PTFE), período de 15 dias.

Animal	Osso Imaturo (%)	Osso Maduro (%)	Tecido Fibrovascular e Medula óssea (%)
1	59,3	9,8	30,9
2	49,7	14,3	36,0
3	50,4	10,9	38,7
Média	53,3 ± 5,4	11,7 ± 2,3	35,2 ± 4,0

Grupo C (Controle)

Descrição Histológica:

A fotomicrografia mostra o recobrimento incompleto do defeito que se encontra parcialmente preenchido por tecido fibrovascular com ilhas de osso imaturo. A neoformação óssea inicia-se nas extremidades laterais do defeito e estende-se em direção ao centro.



Figura 22 – Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo C – CONTROLE

Análise Histométrica:

A Tabela 7 a seguir mostra os resultados da histometria referente ao grupo C (Controle) período de 15 dias.

Tabela 7: Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo C (controle), período de 15 dias.

Animal	Osso Imaturo (%)	Osso Maduro (%)	Tecido Fibrovascular e Medula óssea (%)
1	35,1	10,3	54,6
2	40,5	11,3	47,4
3	43,2	9,6	47,2
Média	39,6 ± 4,2	10,4 ± 0,9	49,7 ± 4,1

5.4.2 Período de 30 dias

Em todos os defeitos foi observado processo de reparo por ossificação intramembranosa.

Nos grupos A (Látex) e B (PTFE) notou-se a presença de trabéculas ósseas e tecido ósseo em processo de remodelação mais avançado.

No grupo C (Controle) observou-se predominância de osso imaturo, presença de tecido conjuntivo e focos de hemorragia.

Grupo A (Látex)

Descrição Histológica:

Área do defeito ósseo cirúrgico mostra-se quase todo preenchido por ilhas de trabéculas ósseas imaturas com alguns pontos de tecido ósseo maduro. Algumas áreas mostram aspecto de estrutura medular em início de formação. Ainda há a presença de tecido fibrovascular (tecido conjuntivo osteogênico) .

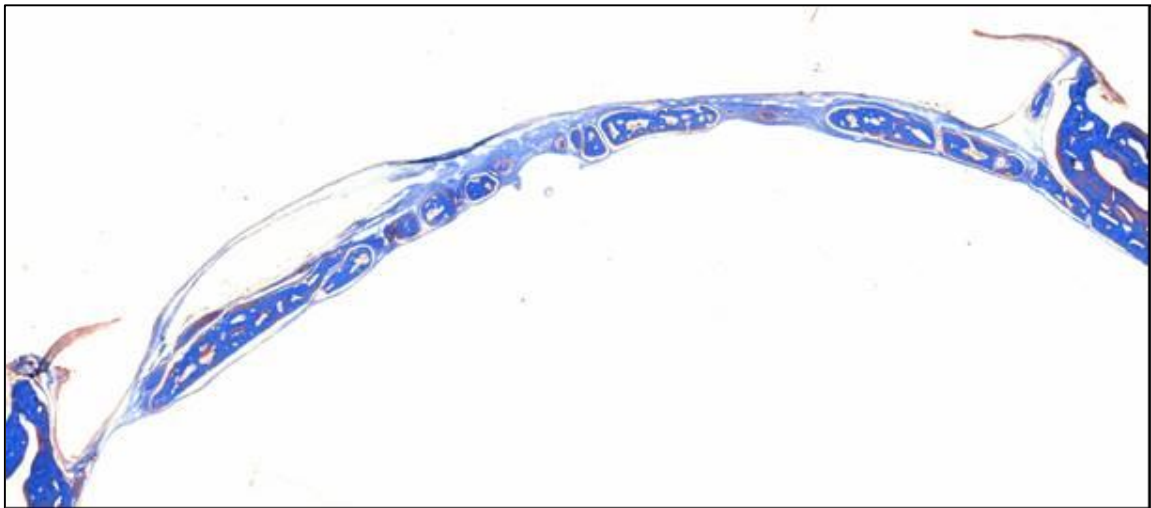


Figura 23 – Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo experimental A – LÁTEX, período de 30dias.

Análise Histométrica:

A Tabela 8 a seguir mostra os resultados da histometria referente ao grupo A (Látex) período de 30 dias.

Tabela 8: Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo A (Látex), período de 30 dias.

Animal	Osso Imaturo (%)	Osso Maduro (%)	Tecido Fibrovascular e Medula óssea (%)
1	34,2	39,7	26.1
2	29,7	40,1	30.2
3	24,0	38,7	35.9
Média	29,3 ± 5,1	39,5 ± 0,7	30,7 ± 4,9

Grupo B (PTFE)

Descrições Histológica:

A fotomicrografia mostra que o defeito encontra-se preenchido por trabéculas ósseas imaturas, com vários pontos de osso maduro, isto é com maior grau de mineralização, demonstrando que o processo de remodelação óssea está acontecendo. Entre as trabéculas nota-se áreas de estrutura com aspecto medular. Na lateral direita, próxima à borda do defeito observa-se uma quantidade considerável de tecido fibrovascular (figura 24).

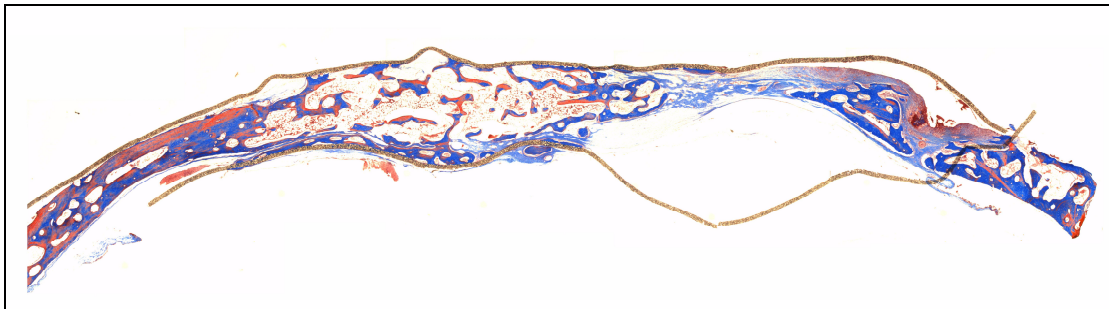


Figura 24 – Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração Tricrômico de Masson.

Figura 24 – Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo experimental B – PTFE, período de 30dias.

Aumento original 2,0X. Grupo B(PTFE), período de 30 dias.

Análise Histométrica:

A Tabela 9 a seguir mostra os resultados da histometria referente ao grupo B (PTFE) período de 30 dias.

Tabela 9: Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo B (PTFE), período de 30 dias.

Animal	Osso Imaturo (%)	Osso Maduro (%)	Tecido Fibrovascular e Medula óssea (%)
1	62,9	27,7	9,4
2	60,4	22,8	16,8
3	68,7	15,3	16,0
Média	64,0 ± 4,3	21,9 ± 6,2	14,1 ± 4,1

Grupo Controle

Descrição Histológica:

No grupo C (controle), observa-se dois focos hemorrágicos em meio a proliferação de tecido conjuntivo osteogênico e não osteogênico. Nas extremidades direita e esquerda, em contato com a borda óssea cirúrgica, nota-se tecido ósseo em processo de remodelação. No centro do defeito, observa-se trabéculas ósseas imaturas, irregulares, delicadas e dispersas (figura 25).

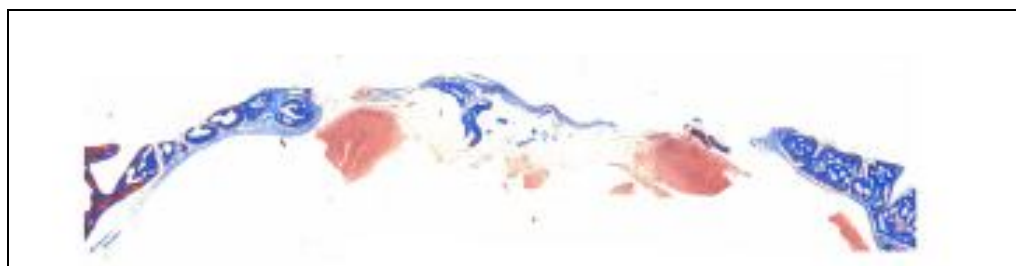


Figura 25 – Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo controle – C, período de 30 dias.

Análise Histométrica:

A Tabela 10 a seguir mostra os resultados da histometria referente ao grupo C (controle) período de 30 dias.

Tabela 10: Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo C (controle), período de 30 dias.

Animal	Osso Imaturo (%)	Osso Maduro (%)	Tecido Fibrovascular e Medula óssea (%)
1	36,0	35,0	29,0
2	34,2	39,7	26,1
3	23,9	27,0	49,1
Média	31,4 ± 6,5	33,9 ± 6,4	34,7 ± 12,5

5.4.3 Período de 60 dias

Em todos os grupos foi observado processo de reparo por ossificação osteonal direta.

Nos grupos A (Látex) e B (PTFE) notou-se processo de remodelação mais avançado, com presença de cavidades medulares irregulares e de diversos tamanhos.

No grupo C (controle) observou-se reparação óssea de maneira irregular, sendo esta mais evidente no centro do defeito. Há predominância de tecido conjuntivo vascular.

Grupo A (Látex)

Descrição Histológica:

Processo de remodelação óssea mais avançado em relação ao período de 30 dias (Figura 23), com predomínio de tecido ósseo maduro, com presença de medula óssea. Ainda há focos de tecido ósseo imaturo. Observa-se que houve regeneração óssea em toda a extensão do defeito (Figura 26).

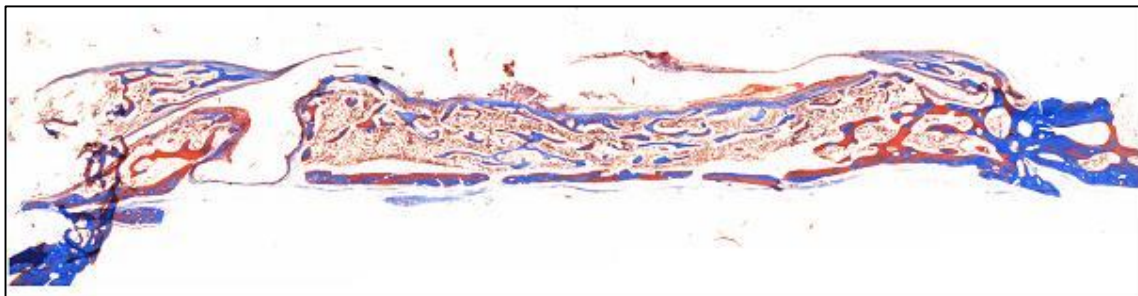


Figura 26 – Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento 2,6X. Grupo experimental – A – LÁTEX, período de 60 dias.

Análise Histométrica:

A tabela 11 a seguir mostra os resultados da histometria referente ao grupo A (Látex) período de 60 dias.

Tabela 11: Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo A (Látex), período de 60 dias.

Animal	Osso Imaturo (%)	Osso Maduro (%)	Tecido Fibrovascular e Medula óssea (%)
1	43,8	42,2	14,0
2	43,7	43,5	12,8
3	40,4	39,8	19,8
Média	42,5 ± 1,9	41,8 ± 1,9	15,5 ± 3,7

Grupo B (PTFE)

Descrição Histológica:

Aos 60 dias, (Figura 27), observa-se presença de pequena quantidade de tecido fibrovascular. O processo de regeneração apresenta-se em estágio avançado, toda a área cirúrgica está preenchida por trabeculado ósseo ainda predominantemente imaturo, mas pela coloração avermelhada observada neste trabeculado, nota-se pontos mais extensos de mineralização (tecido ósseo maduro) e entre as trabéculas há grande quantidade de estrutura medular.

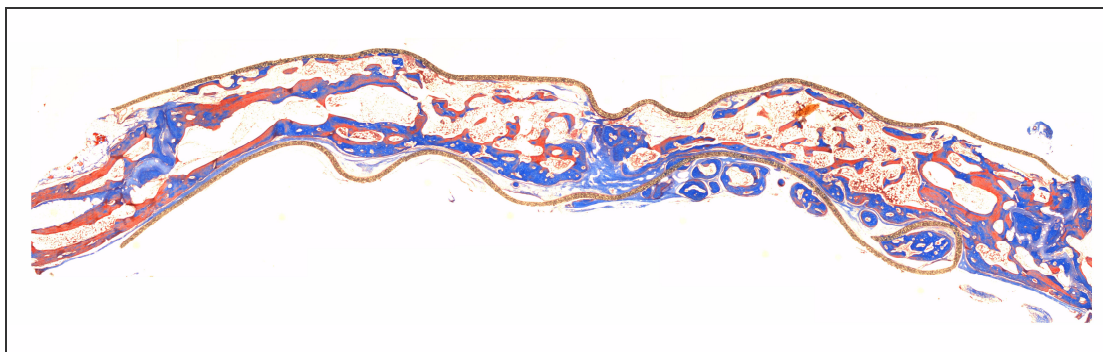


Figura 27 – Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento 2,0X. Grupo B (PTFE), período de 60 dias.

Análise Histométrica:

A Tabela 12 a seguir mostra os resultados da histometria referente ao grupo B (PTFE) período de 60 dias.

Tabela 12: Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo B (PTFE), período de 60 dias.

Animal	Osso Imaturo (%)	Osso Maduro (%)	Tecido Fibrovascular e Medula óssea (%)
1	60,9	29,5	9,6
2	58,1	31,4	10,5
3	60,2	29,6	10,2
Média	59,7 ± 1,4	30,1 ± 1,0	10,1 ± 0,4

Grupo C (controle)

Descrição Histológica:

A fotomicrografia mostra na região do defeito várias ilhas de tecido ósseo neoformado com muitos pontos mais mineralizados, entre as trabéculas ósseas observa-se células de medula óssea. Na região mais central nota-se tecido fibrovascular (Figura 28).

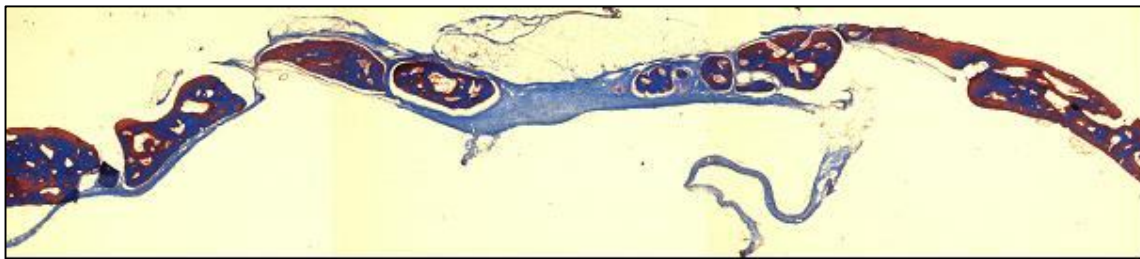


Figura 28 - Corte Histológico do defeito ósseo. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento original 2,6X. Grupo C (controle), período de 60 dias.

Análise Histométrica:

A Tabela 13 a seguir mostra os resultados da histometria referente ao grupo C (controle) período de 60 dias.

Tabela 13: Fração dos volumes de osso maduro, osso imaturo, tecido fibrovascular e medula óssea relativo ao grupo C (controle), período de 60 dias.

Animal	Osso Imaturo (%)	Osso Maduro (%)	Tecido Fibrovascular e Medula óssea (%)
1	28,2	38,0	33,8
2	20,9	37,2	41,9
3	23,9	36,5	39,6
Média	24,3 ± 3,7	37,2 ± 0,8	38,4 ± 4,2

5.5 Análise Histométrica Comparativa

A Tabela 14 ilustra os valores médio e desvio padrão dos resultados da análise histométrica referente aos grupos A, B e C, respectivamente, de acordo com os períodos de estudo.

Tabela 14: Análise Histométrica comparativa entre os grupos de acordo com os períodos de estudo

Período	Osso imaturo (%)			Osso Maduro (%)			Tecido Fibrovascular (%)		
	Látex	PTFE	Controle	Látex	PTFE	Controle	Látex	PTFE	Controle
15	32,6 ± 5,3	53,3 ± 5,4	39,6 ± 4,2	30,1 ± 6,5	11,7 ± 2,3	10,4 ± 0,9	35,4 ± 4,9	35,2 ± 4,0	49,7 ± 4,1
30	29,3 ± 5,1	64,0 ± 4,3	31,4 ± 6,5	39,5 ± 0,7	21,9 ± 6,2	33,9 ± 6,4	30,7 ± 4,9	14,1 ± 4,1	34,7 ± 12,5
60	42,5 ± 1,9	59,7 ± 1,4	24,3 ± 3,7	41,8 ± 1,9	30,1 ± 1,0	37,2 ± 0,8	15,5 ± 3,7	10,1 ± 0,4	38,4 ± 4,2

As Figuras 29, 30 e 31 mostram graficamente os resultados da histometria para cada grupo, Grupo A (Látex), B (PTFE) e C (controle), respectivamente.

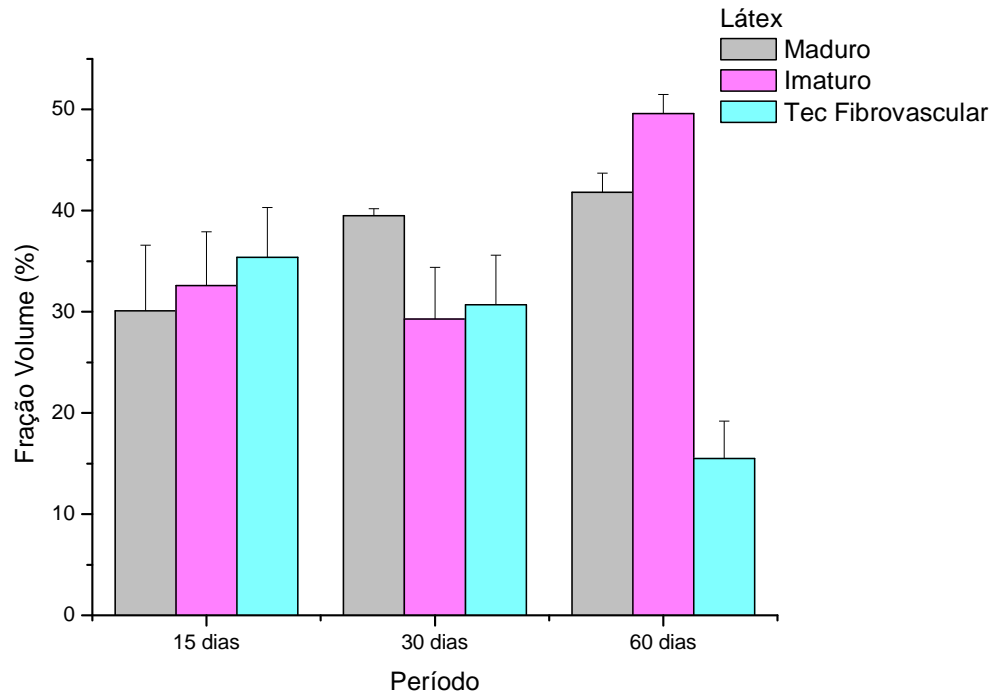


Figura 29: Valores médio e desvio Padrão da Fração do volume de Osso Maduro, Osso Imaturo e Tecido Fibrovascular relativos ao Grupo A (Látex) de acordo com os períodos de estudo.

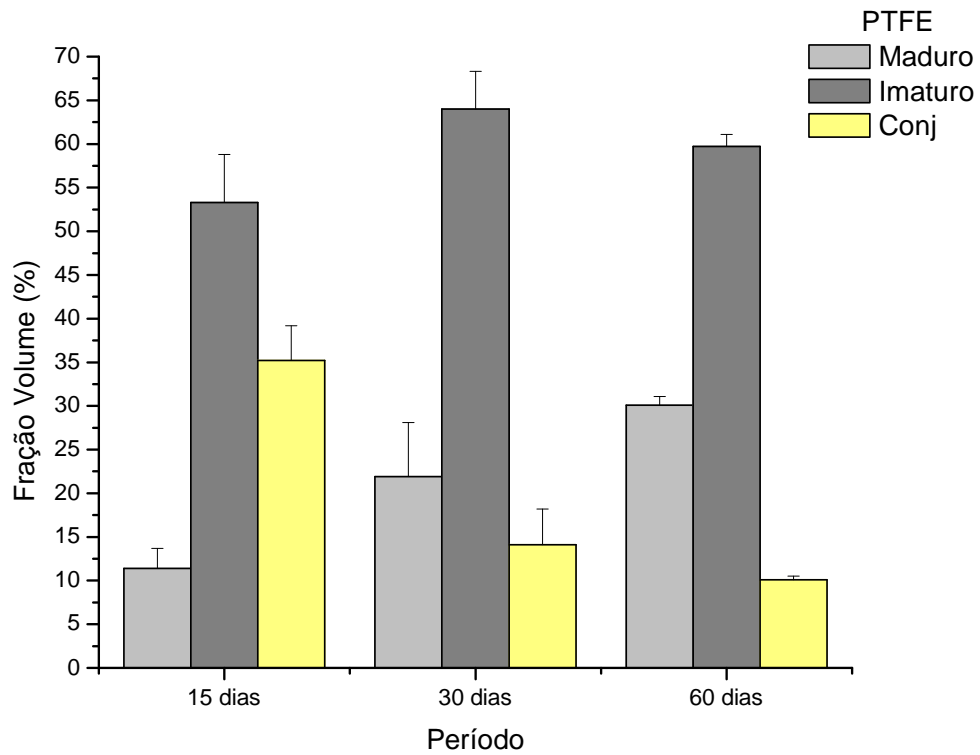


Figura 30: Valores médio e desvio Padrão da Fração do volume de Osso Maduro, Osso Imaturo e Tecido Fibrovascular relativos ao Grupo A (Látex) de acordo com os períodos de estudo.

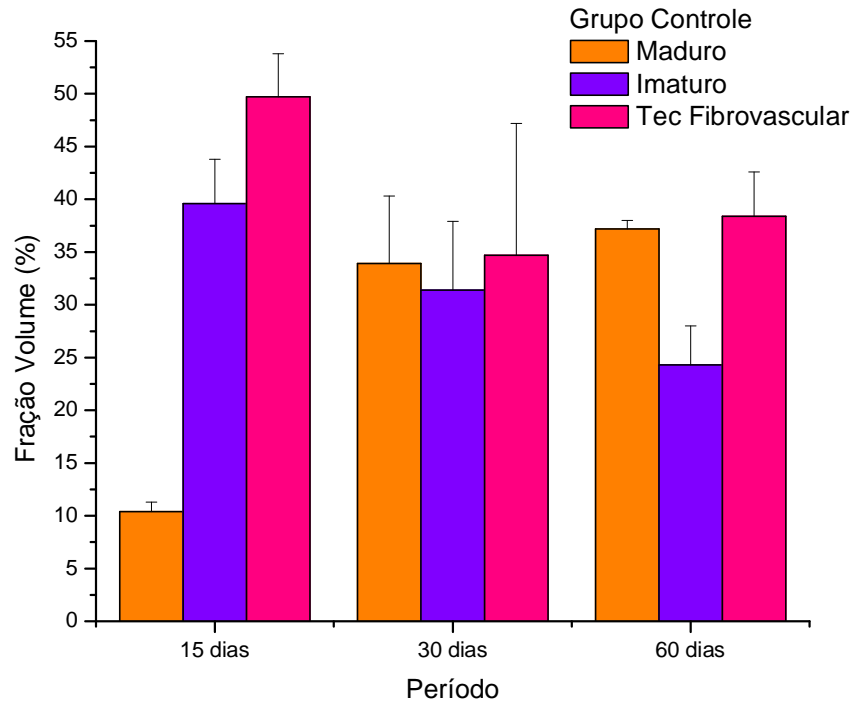


Figura 31: Valores médio e desvio Padrão da Fração do volume de Osso Maduro, Osso Imaturo e Tecido Fibrovascular relativos ao Grupo C (controle) de acordo com os períodos de estudo.

As Figuras 32, 33 e 34 ilustram comparativamente, a variação dos volumes de Osso Maduro, Osso Imaturo e Tecido Fibrovascular, respectivamente, de acordo com os períodos de estudo.

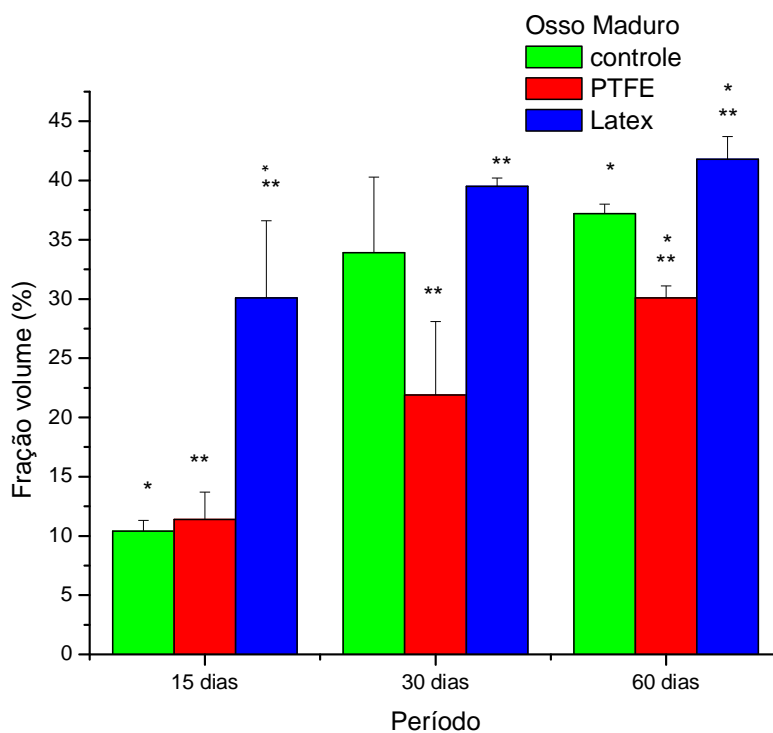


Figura 32: Análise comparativa entre os grupos da variação (média e desvio padrão) da fração de osso maduro no decorrer dos períodos. * Médias significativamente diferentes ($p < 0.05$) na comparação com o Grupo Controle e ** ($p < 0.05$) na comparação entre os grupos A e B. Análise por ANOVA e Teste Tukey para comparação entre as médias.

A análise por ANOVA e teste Tukey para comparação entre as médias mostrou que no período de 15 dias, o grupo A (Látex) apresentou média estatisticamente diferente em relação ao grupo C (controle) e também ao grupo B (PTFE) ($p < 0.05$). O grupo B (PTFE) não apresentou média estatisticamente diferente em relação ao grupo C (Controle). Em relação ao período de 30 dias, a análise estatística revelou que o grupo A (Látex) apresenta médias diferentes em relação ao grupo B (PTFE) e, em relação ao período de 60 dias, todos os grupos apresentam médias diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

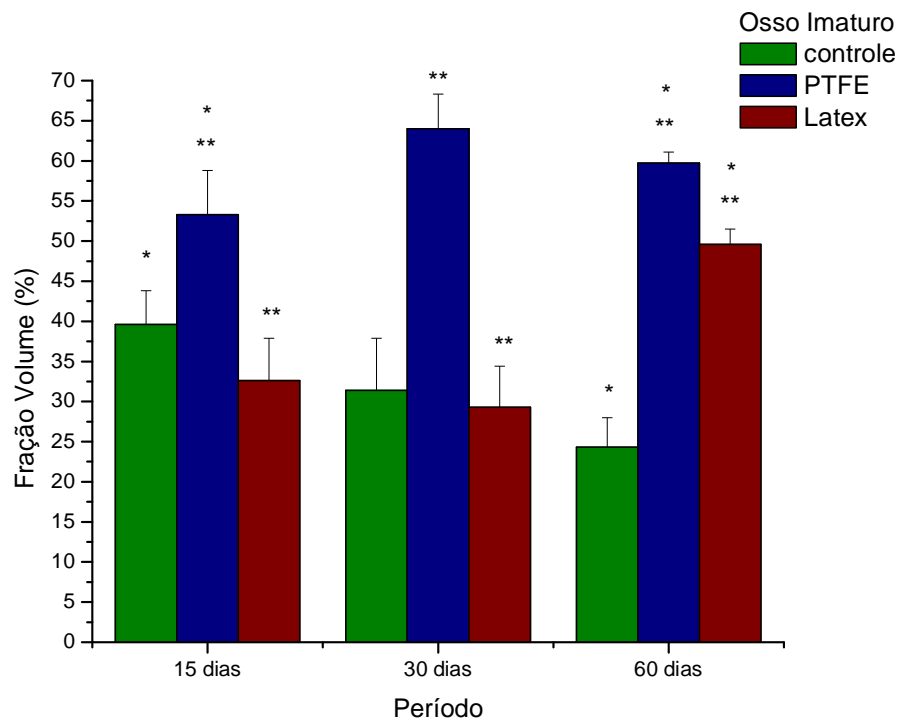


Figura 33: Análise comparativa entre os grupos da variação (média e desvio padrão) da fração de Osso Imaturo no decorrer dos períodos. * Médias significativamente diferentes ($p < 0.05$) na comparação com o Grupo Controle e ** ($p < 0.05$) na comparação entre os grupos A e B. Análise por ANOVA e Teste Tukey para comparação entre as médias.

A análise por ANOVA e teste Tukey para comparação entre as médias mostrou que no período de 15 dias, o grupo B (PTFE) apresentou média estatisticamente diferente em relação ao grupo C (controle) e que o grupo A (Látex) tem média diferente do grupo B (PTFE) ($p < 0.05$). O grupo A (Látex) não apresentou média estatisticamente diferente em relação ao grupo C (Controle). Em relação ao período de 30 dias, a análise estatística revelou que o grupo B (PTFE) apresenta médias diferentes em relação ao grupo C (controle) e também em relação ao grupo A (Látex). Em relação ao período de 60 dias, todos os grupos apresentam médias diferentes estatisticamente entre si ($p < 0,05$)

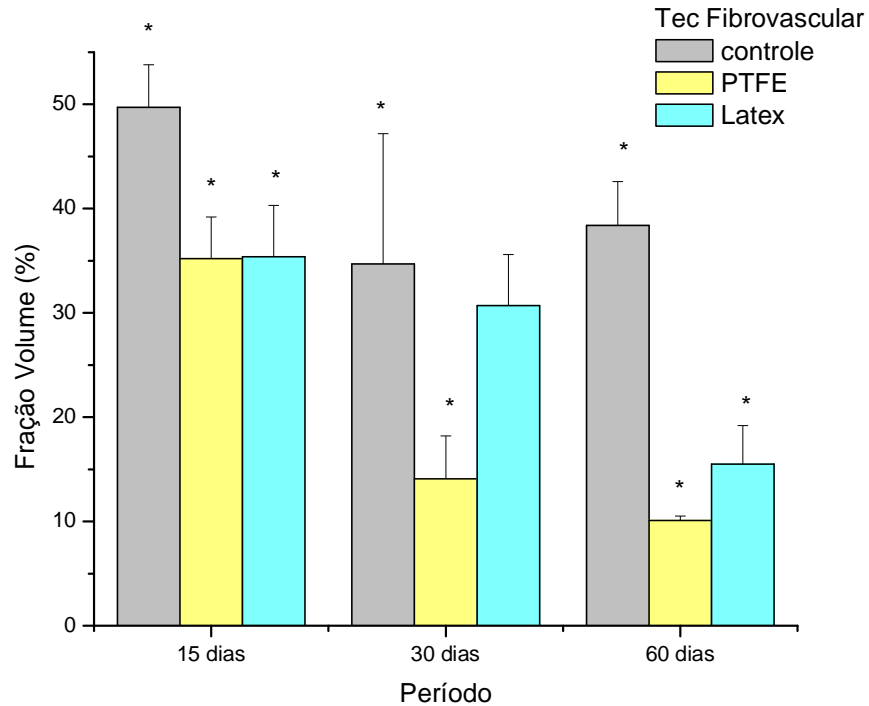


Figura 34: Análise comparativa entre os grupos da variação (média e desvio padrão) da fração do Tecido Fibrovascular no decorrer dos períodos. * Médias significativamente diferentes ($p < 0.05$) na comparação com o Grupo Controle e ** ($p < 0.05$) na comparação entre os grupos A e B. Análise por ANOVA e Teste Tukey para comparação entre as médias.

A análise por ANOVA e teste Tukey para comparação entre as médias mostrou que no período de 15 dias e 60 dias, o grupo A (Látex) e o grupo B (PTFE) apresentaram média estatisticamente diferente em relação ao grupo C (controle) ($p < 0.05$), mas os grupos A e B não apresentaram diferença entre si. Em relação ao período de 30 dias, a análise estatística revelou que o grupo B (PTFE) apresenta médias diferentes em relação ao grupo C (controle) mas o grupo A (Látex) não apresentou média estatisticamente diferente em relação ao grupo C..

5.6 Análise por Ressonância do Spin Eletrônico

5.6.1 Períodos de 15 e 30 dias

As amostras relativas aos períodos de 15 e 30 dias não apresentaram mineralização passível de ser detectada por esta técnica, como ilustra a figura 35.

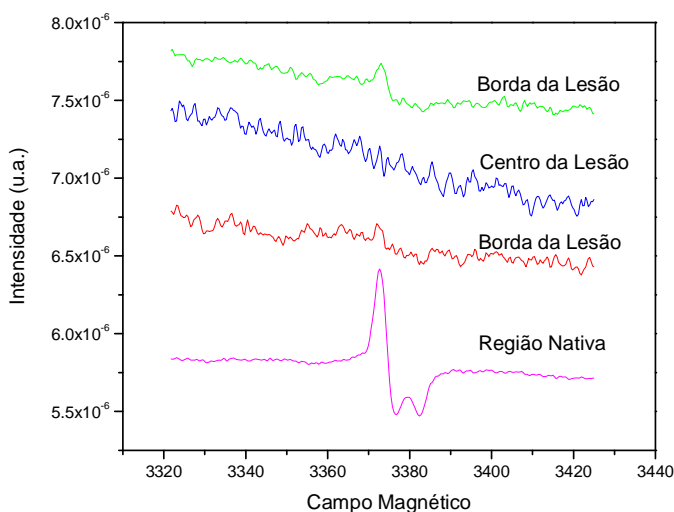


Figura 35 . Espectros de RSE de amostra de osso da região Nativa e da região da lesão, 30 dias após a cirurgia. Amostra do grupo B (PTFE).

5.6.2 Período de 60 dias

As Figuras 36 e 37 ilustram espectros de RSE referentes às regiões de neoformação óssea (borda e centro) e da região nativa (osso pré-existente). A tabela a seguir mostra os resultados das razões da amplitude do espectro (normalizado pela massa) das regiões de neoformação e do osso pré-existente. A figura na seqüência mostra graficamente estes resultados obtidos.

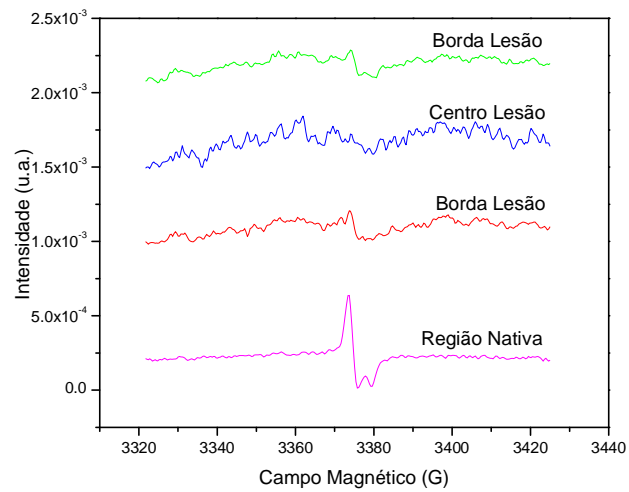


Figura 36 – Espectros de RSE de amostras ósseas coletadas 60 dias após a cirurgia referente ao grupo C (controle). As amostras coletadas da borda da lesão apresentam $(28,7 \pm 2,3)\%$ da amplitude em relação à região nativa.

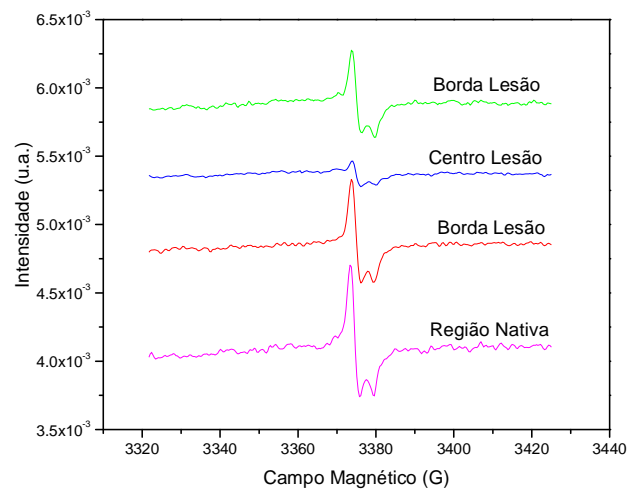


Figura 37 - Espectros de RSE de amostras ósseas coletadas 60 dias após a cirurgia, referente ao grupo A (Látex). As amostras coletadas da borda da lesão apresentam $(67,7 \pm 10,5)\%$ da amplitude em relação à região nativa e a região central, 18,6%.

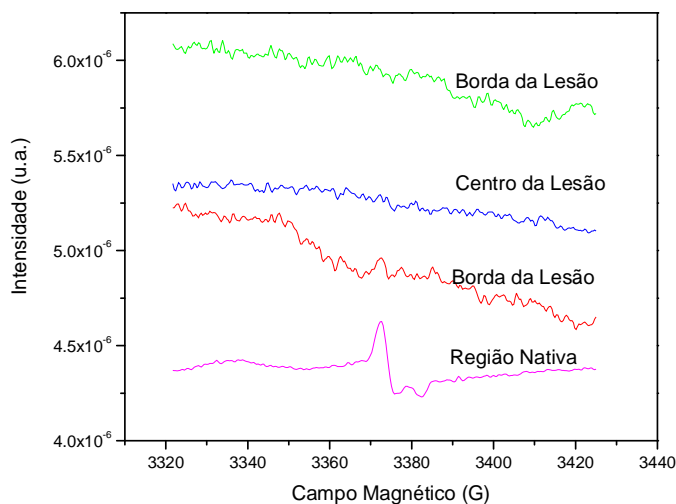


Figura 38- Espectros de RSE de amostras ósseas coletadas 60 dias após a cirurgia, referente ao grupo B (PTFE). As amostras coletadas da borda da lesão apresentam $(67,7 \pm 10,5)\%$ da amplitude em relação à região nativa e a região central, 18,6%.

A tabela 15 a seguir mostra os resultados obtidos por RSE (média e desvio padrão) referente ao período de 60 dias para todos os grupos

Tabela 15: Resultados obtidos por Ressonância do Spin Eletrônico relativo ao período de 60 dias de todos os grupos de estudo

Animal	Borda			Centro			Borda		
	Látex	PTFE	Controle	Látex	PTFE	Controle	Látex	PTFE	Controle
1	61,24%	0,00%	10,66%	19,28%	0,00%	0,00%	77,73%	0,00%	9,33%
2	33,78%	0,00%	27,42%	24,86%	0,00%	0,00%	61,62%	0,00%	33,87%
3	49,68%	0,00%	10,36%	6,41%	0,00%	0,00%	44,39%	0,00%	9,64%
Média	48,23%	0,00%	16,15%	16,85%	0,00%	0,00%	61,25%	0,00%	17,61%
DP	13,78%	0,00%	9,76%	9,46%	0,00%	0,00%	16,67%	0,00%	14,08%

A figura seguinte ilustra a representação gráfica dos resultados da tabela anterior.

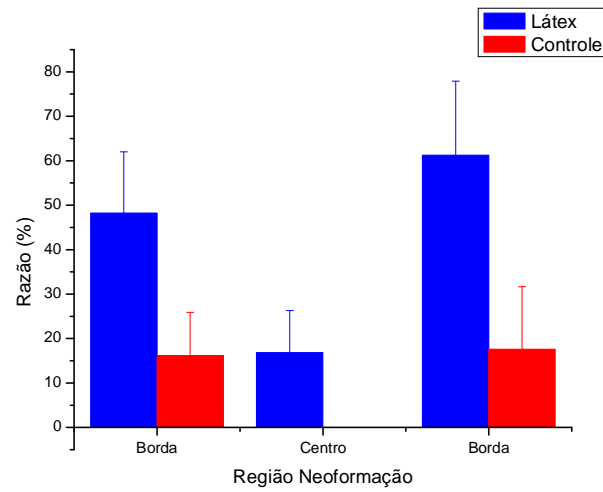


Figura 39 – Razão entre as intensidades dos espectros de RSE referentes à região de neoformação (borda e centro) e osso nativo relativo ao período de 60 dias, dos grupos A (Látex) e C (controle)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A reconstrução de defeitos ósseos de grande magnitude é um desafio para diversas áreas da medicina e da odontologia, principalmente nas especialidades de cirurgia bucomaxilofacial, periodontia, prótese e implantodontia.

Os princípios de Regeneração Óssea Guiada (ROG ou GTR) estão bem estabelecidos no tratamento de defeitos ósseos e procedimentos de aumento do volume ósseo. Diferentes tipos de membranas podem ser usadas para se evitar a colonização do defeito ósseo por tecido conjuntivo não osteogênico. A racionalidade desta técnica consiste na criação de um espaço isolado com o uso da membrana, onde o coágulo sanguíneo e ou o enxerto são estabilizados e o tecido epitelial e conjuntivo tem sua migração evitada e as células osteogênicas, de migração mais lenta, podem proliferar, resultando em nova formação óssea.

Neste trabalho, a eficácia da membrana de látex como barreira biológica foi avaliada e comparada à membrana de PTFE (largamente utilizada na prática clínica) e a um grupo controle (somente coágulo, sem membrana), objetivando num futuro próximo oferecer as informações necessárias para a seleção do material derivado do látex nos procedimentos de Regeneração Óssea Guiada. Além de propriedades mecânicas desejáveis para este tipo de aplicação como a elasticidade, flexibilidade e alta resistência, o látex natural apresenta outras vantagens, como não ter potencial para a transmissão de doenças infecciosas (por ser de origem vegetal), a capacidade de induzir a angiogênese (ALVES, 2003), o que pode contribuir positivamente na cicatrização tecidual. Outras aplicações *in vivo* do látex incluem a reconstrução conjuntival em coelhos (PINHO, 2004), Herniorrafia perineal em cães (PAULO *et al*, 2005), enxerto em alvéolo dental em ratos (BALABANIAN *et al*, 2006) e cobertura e auxílio da fusão intervertebral em coelhos (OLIVEIRA, 2008). A biocompatibilidade do látex foi observada por todos estes autores e trata-se de uma das principais propriedades de um biomaterial para a validação do mesmo para uso em humanos. Mrue *et al*, 2004 avaliaram a biocompatibilidade do látex polimerizado com o uso de enxofre, através de implante subcutâneo em ratos e não observaram sinais de rejeição do tecido hospedeiro. Em humanos, o látex tem sido usado na

forma de curativo “band-aid” (BIOCURE®), autorizado pela ANVISA, para o tratamento de úlceras de pele em pacientes diabéticos.

As membranas de látex utilizadas neste trabalho foram polimerizadas sem adição de aceleradores como carbamatos e enxofre e de substâncias anti-oxidativas, a fim de se evitar reações alérgicas. Estas reações citadas em alguns relatos são atribuídas a estas substâncias.

Estudos prévios já demonstraram a eficácia da membrana de látex natural como barreira oclusiva em procedimento de regeneração óssea guiada (ERENO, 2007), porém, para avaliar as vantagens e desvantagens em relação a outras membranas, realizou-se este trabalho comparativo, utilizando-se a membrana de Politetrafluoretileno (PTFE). Esta membrana é considerada o “Padrão Ouro” ou ‘Gold Standard’ como membrana em ROG.

Membranas de PTFE são encontradas em diferentes formas como a expandida e-PTFE, de estrutura porosa, com reforço de Titânio e, mais recentemente, com uma camada hidrofílica (BARTEE *et al*, 2008), o qual proporciona à membrana uma superfície compatível com a água, fluidos corporais, sangue, facilitando a atração e a adesão celular.

Apesar de PTFE não ser absorvível (assim como o látex) estudo comparativo entre 5 tipos de membranas (membrana fascia lata humana, membrana do pericárdio humano, membrana fascia temporalis humana, pericárdio bovino e e-PTFE), realizado por Thomaidis *et al.*, 2008, através de defeito crítico mandibular bilateral em coelhos mostrou que o uso de membrana (todas) produziu uma regeneração óssea mais avançada em relação ao lado não tratado. Além disso, e-PTFE não apresentou diferença significativa em relação a outras membranas absorvíveis estudadas.

Barber *et al.*, 2007 descrevem o uso do PTFE na forma densa d-PTFE e citam como vantagens em relação ao e-PTFE a facilidade na remoção, que os autores citam como comparáveis à retirada de suturas cirúrgicas. Segundo estes autores, a remoção do e-PTFE pode ser um procedimento extensivo e que pode causar trauma aos tecidos neoformados. Entretanto, a alta densidade do d-PTFE o faz um material de fácil remoção, evitando a necessidade de uma segunda cirurgia dificultosa. Além

disso, a macroporosidade do e-PTFE pode aumentar o risco de colonização por bactérias, quando a membrana é exposta, o que não ocorre na forma densa.

Neste trabalho utilizamos o modelo de craniotomia em coelhos para comparar os efeitos das membranas de látex e de PTFE em relação ao grupo controle na regeneração óssea. Modelos experimentais na calvária apresentam grande similaridade com a região maxilofacial, pois, assim como a mandíbula, os ossos do crânio são também constituídos de duas placas corticais preenchidas por osso esponjoso. A craniotomia em calvária representa um modelo experimental de alta seletividade para estudos de regeneração óssea devido ao fácil acesso e grande dificuldade no reparo espontâneo, devido à baixa vascularização e pouco estímulo mecânico (THALLER *et al*, 1989, ALBERIUS *et al*, 1992; Dupoirieux *et al*, 2001).

O reparo de defeitos é um bom modelo para o estudo da regeneração do osso e possui grande semelhança com o reparo primário ou direto de fraturas. Ao contrário destas últimas, os defeitos são menos sujeitos a fatores mecânicos e a obstruções do aporte sangüíneo. O modelo de defeito ósseo escolhido tem sido utilizado em muitos experimentos clássicos que analisam a influência de medidas cirúrgicas e farmacológicas para melhorar a regeneração óssea.

O estudo comparativo foi realizado através de análises radiográfica, histológica, histométrica, e por ressonância do spin eletrônico, nos períodos de 15, 30 e 60 dias após a cirurgia.

A análise radiográfica foi realizada através do sistema Digora, o qual digitaliza as imagens e proporciona uma escala de cinzas mais ampla em comparação a radiografia convencional (TAVANO *et al*, 1999). Qualitativamente, observou-se a regeneração óssea ocorrendo de forma centrípeta a partir do período de 30 dias, da borda ao centro, exceto no grupo controle, onde, na região da sutura interparietal observa-se uma área de maior radiopacidade. No período de 60 dias observa-se uma radiopacidade praticamente uniforme nos grupos tratados com membrana indicando o processo de reparo mais avançado em relação ao grupo controle. Através do histograma de tons de cinza da região do defeito, esta análise pode ser realizada quantitativamente. No entanto, devido ao alto desvio padrão encontrado entre as amostras do mesmo grupo, os resultados quando comparados, não

apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P>0.05$). Apesar da padronização da tomada radiográfica das peças, possivelmente, há a necessidade de uma maior padronização da análise digital.

A análise histológica revela o processo de regeneração óssea mais avançada nos grupos tratados (Látex e PTFE) em relação ao grupo controle, em todos os períodos estudados. Isto demonstra a eficácia do uso de barreiras mecânicas na regeneração óssea. Quantitativamente, através da histometria das lâminas, pode-se observar maior grau de maturidade nas amostras do grupo tratado com membrana de Látex, em relação aos demais grupos. A fração do volume de osso maduro, na região do defeito foi maior no grupo tratado com Látex em relação ao grupo controle nos períodos de 15 e 60 dias ($P<0.05$) e maior que o de PTFE em todos os períodos estudados ($P<0.05$) (figura 32)

A mineralização óssea foi estudada neste trabalho também por Ressonância do Spin Eletrônico. Tradicionalmente, esta técnica é utilizada para outras aplicações em medicina e biologia, por se tratar de uma técnica espectroscópica capaz de detectar radicais livres. No estudo de tecidos calcificados, o mesmo princípio da dosimetria por RSE em dentes é aplicado, ou seja, a quantificação do radical gerado na matriz mineral do osso e dos dentes (Hidroxiapatita) e foi já utilizada Dalpino, 2006 e Ereno, 2007 para se estudar a dinâmica da regeneração óssea. Neste trabalho, aos 15 e 30 dias pós-cirúrgico não foi possível se de utilizar esta análise pois a quantidade de tecido mineralizado presente foi insuficiente para se gerar um sinal de RSE com boa relação sinal/ruído. No período de 60 dias, as amostras do grupo tratado com membrana de Látex apresentaram maior grau de mineralização em relação aos demais grupos. Já as amostras do grupo tratado com PTFE não apresentaram sinais detectáveis.

É conhecido que as propriedades químicas e físicas das membranas, quando utilizadas como barreiras oclusivas, modificam a evolução do processo de reparo (MARINUCCI *et al*, 2001). Os resultados encontrados neste trabalho reforçam os resultados da literatura sobre aplicações in vivo do Látex, demonstrando também o potencial deste material para procedimentos de cicatrização tecidual.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A biomembrana de látex natural atuou efetivamente como barreira oclusiva em processos de regeneração óssea guiada, comparativamente a membrana de PTFE e grupo controle sendo, portanto, considerada um material promissor para futuros estudos em modelos de cicatrização óssea guiada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. ALBERIUS P, DAHLIN C, LINDE A. Role of Osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 50, n. 8, p. 829-834, 1992.
2. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 4 ed, Porto Alegre: Artmed, 2004.
3. ALVES, M. C. O. **Teste da angiogênese estimulada por membrana de látex natural**. 2003. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto.
4. BALABANIAN, C. A. C. A. *et al.* Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p. 201-205, 2006.
5. BARBER, HD; LIGNELLI J; SMITH, BM; BARTEE, BK. Using a dense PTFE membrane without primary closure to achieve bone and tissue regeneration. **J Oral Maxillofac Surg.** v.65, n.4, p.748-752, 2007
6. BARTEE, CM, BARTEE, BK. Guided tissue regeneration membrane for use in repairing bone defects, comprises PTFE sheet having hydrophilic portion which renders membrane surface compatible with water, body fluids, blood and aqueous solutions. Patent number US2008133010-A1, 2008-09-09
7. BERNARDES, M. S. **Sangria da Seringueira**. 2 ed, Cap 16, Piracicaba, 2000.
8. BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Guided Bone Regeneration in Calvarial Bone Defects Using Polytetrafluoroethylene Membranes. **Cleft Palate Craniofac J.**, Denmark, v. 32, n. 4, p. 311-317, Jul, 1995.
9. BOSTROM, M. P.; CAMACHO, N. P. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. **Clin Orthop Relat Res.**, United States, 355 Suppl, p. 274-282, Oct, 1998.
10. CARACELLI, I.; TERRILE, M. C.; MASCARENHAS, S. Electron-spin-resonance dosimetric properties of bone. **Health Physics**, v. 50, n. 2, p. 259-263, 1986.
11. CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G.; TAKEI, N. N. **Periodontia Clínica**. 9 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
12. CATANZARO - GUIMARAES, S. A. Possibility to reinforce bone repair with decalcified dentin matrix. **Jahrbuch Fur Orale Implatologie**, Berlin, Quintessence Verlags – GmbH, p. 33-34, 1993.

13. CATANZARO GUIMARÃES S. A. *et al.* Autogenous desmineralized dentin matrix for tissue engineering applications : radiographic and histomorphometric studies. **Int. J. of Oral and Maxilofacial Implants**, v. 17, n. 4, 2002.
14. CATANZARO GUIMARÃES S. A. *et al.* Histologic evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone defects in rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. **Int. J. of Oral and Maxilofacial Implants**, v. 16, n. 4, 2001.
15. CATANZARO GUIMARÃES S. A. *et al.* Osteogenic potential of autogenic demineralized dentin implanted in bony defects in dogs. **Int J Oral Maxilofacial Surg**, 1986; 15(2): 160-69.
16. DAHLIN, C. A origem científica da regeneração óssea guiada. In: BURSER, D.; DAHLIN, C.; SHENK, R. **Regeneração óssea guiada na implantodontia**. São Paulo: Santos, 1996. p. 31-48.
17. DAHLIN, C. *et al.* Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg.**, United States, v. 81, n. 5, p. 672-676, May, 1988.
18. DAHLIN, C. *et al.* Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.**, Sweden, v. 24, n. 1, p. 13-19, 1990.
19. DAHLIN, C. *et al.* Restoration of mandibular nonunion bone defects. An experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, Denmark, v. 23, n. 4, p. 237-242, Aug, 1994.
20. DAHLIN, C.; ALBERIUS, P.; LINDE A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. **J Neurosurg.**, Sweden, v. 74, n. 3, p. 487-491, Mar, 1991.
21. DALPINO, G. B. **O emprego da Ressonância do Spin Eletrônico como técnica auxiliar na determinação do grau de mineralização do osso neoformado em modelos de cicatrização óssea guiada**. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) - Universidade do Sagrado Coração, Bauru.
22. DUPOIRIEUX L, *et al.* Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. **Int J Oral Maxilofacial Surg** 2001; 30:58-62.
23. DUPOIRIEUX L, POURQUIER D, PICOT MC, NEVES M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2001; 30(1):58-62.
24. ERENO, C. Estudo radiográfico digitalizado comparativo das membranas de poliuretano e politetrafluoretileno em neoformação óssea. In: 23ª REUNIÃO ANUAL DA SBPqO, 2006, Atibaia. Brazilian Oral Research, 2006. p. 89.

25. ERENO, C. **O uso do Látex Natural como Barreira oclusiva na regeneração óssea guiada em defeitos críticos na calvária de coelhos.** 2007, 116f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) - Universidade do Sagrado Coração, Bauru.
26. FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J Oral Surg.**, United States, v. 38, n. 3, p. 176-180, Mar, 1980.
27. FRIEDENSTEIN, A. J. Precursor cells of mechanocytes. **Int Rev Cytol.**, United States, v. 47, p. 327-359, 1976.
28. GARG, A. K. **Bone – Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants,** Illinois, Quintessence Publishing Co, Inc, 2004.
29. GOSAIN, A. K.; SONG, L.; YU, P.; MEHRARA B.J.; MAEDA C.Y.; GOLD, L.I.; LONGAKER, M.T. Quantitative assessment of cranial defect healing and correlation with the expression of TGF-beta. **Plastic Reconstr Surg.**, v. 12, n. 4, p. 401-4, jul, 2001.
30. HARDWICK, R. *et al.* Parâmetros utilizados no formato da membrana para regeneração óssea guiada da crista alveolar. In: BUSER, D.; DAHLIN, C; SHENCK, R.K. (Ed) **Regeneração óssea guiada na implantodontia.** São Paulo, Quintessence, 1996. p.101-36.
31. HJORTING-HANSEN, E.; ANDREASEN, J. O. Incomplete bone healing of experimental cavities in dog mandibles. **Br J Oral Surg.**, Scotland, v. 9, n. 1, p. 33-40, Jul, 1971.
32. HOLLINGER, J.; WONG, M.E. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 82, n.6, p. 594-606, Dec, 1996.
33. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
34. KABAN, LB; GLOWACKI, J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. **J Dent Res**, v. 60, n. 7, p. 1356-64, jul, 1981.
35. KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral.** São Paulo: Medicina Panamericana, 1999. p. 39-76.
36. KINOSHITA, A. *et al.* ESR dosimetry of Sr-89 and SM-153 in bone. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 54, n. 2, p. 269-274, 2001.
37. LEGERS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res.**, United States, n. 395, p. 81-98, Feb, 2002.

38. LUNDGREN, A.; LUNDGREN, D.; TAYLOR, A. Influence of barrier occlusiveness on guided bone augmentation. An experimental study in the rat. **Clin Oral Implants Res.**, Denmark, v. 9, n. 4, p. 251-260, Aug, 1998.
39. MANN, F.A.; PAYNE, J.T. Bone healing. **Seminars in Vet Med Surg.**, United States, v. 4, n. 4, p. 312-321, Nov, 1989.
40. MARINUCCI, L; LILLI, C; BARONI, T; BECCHETTI, E; BELCASTRO, S; BALDUCCI, C; LOCCI, P. In Vitro Comparison of Bioabsorbable and Non-Resorbable Membranes in Bone Regeneration. **J Periodontol**, v. 72, n.6, p. 753-759, 2001.
41. MASCARENHAS, S.; HASEGAWA, A.; TAKESHIT, K. EPR Dosimetry of bones from hiroshima A-bomb site. **Bulletin of the American Physical Society**, v. 18, n. 4, p. 579, 1973.
42. MELCHER, A. H. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. **Arch Oral Biol.**, England, v. 14, n. 9, p. 1101-1109, 1969.
43. MELCHER, A. H.; DREYER, C. J. Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects. **J. Bone Joint Surg.**, v. 44, n. 2, p. 424-430, 1962.
44. Melcher, A.H. On the repair potential of periodontal tissues. **Journal of Periodontology**, vol 47, number 5: 256-260, 1976.
45. MRUÉ, F , J.COUTINHO-NETTO, R.CENEVIVA, J.J. LACHAT, J.A. THOMAZINI and H. TAMBELINI, *Mater. Res.* **7(2)** (2004) 277
46. MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex. Estudo experimental em cães.** 1996. Tese (Doutorado). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; Ribeirão Preto.
47. MURRAY, G. , ROSCHALAU, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. **Amer J Surg** 1957; 93: 385.
48. MURRAY, G.; HOLDEN, R.; ROSCHLAU, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. **Am J Surg.**, United States, v. 93, n. 3, p. 385-387, 1957.
49. NYMAN, R. *et al.* Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. **Acta Orthop Scand.**, England, v. 66, n. 2, p. 169-173, Apr, 1995.
50. NYMAN, S. Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. **J Clin Periodontol.**, Sweden, v. 18, n. 6, p. 494-498, Jul, 1991.
51. NYMAN, S., *et al.* New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol.**, Sweden, v. 9, n. 4, p. 290-296, 1982b.

52. NYMAN, S., et al. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **J Clin Periodontol.**, Sweden, v. 9, p. 257-265, 1982a.
53. OGISO B, HUGHES FJ, MELCHER AC, McCULLOCH CAG. Fibroblasts inhibit mineralized bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. **J Cell Physiol** 1991; 146(3): 442.
54. OGISO, B. *et al.* Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. **J Cell Physiol**, Canadá, v. 146, n. 3, p. 442-450, Mar, 1991.
55. OLIVEIRA, F.A.F. **O uso de membrana de Látex natural como cobertura e auxílio da fusão intervertebral lombar.** 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) - Universidade do Sagrado Coração, Bauru.
56. PINHO, E. C. C. M. *et al.* Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arq. Bras Oftalmol.**, Brasil, v. 67, p. 27-32, 2003.
57. SADER, S. L. *et al.* Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, Brasil, v. 15, p. 338-44, 2000.
58. SAKATA, M. M. *et al.* Estudo da interação polímero/carilagem/osso utilizando poli (ácido láctico – co – ácido glicólico) e poli (p-Dixonona) em côndilo femoral de coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 14, n° 3, p. 176-180, 2004.
59. SCHENK, R. K. Bone Regeneration Biologic Basis. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. **Guided bone regenerations in implant dentistry.** Chicago: Quintessence, p. 49-100, 1994.
60. SCHMITZ, J. P. *et al.* Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anat**, Switzerland, v. 138, n. 3, p. 185-192, 1990.
61. SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, United States, n. 205, p. 299-308, Apr, 1986.
62. STRIETZEL, F. P. *et al.* Healing pattern of bone defects covered by different membrane types--a histologic study in the porcine mandible. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, United States, v. 78, n. 1, p. 35-46, Jul, 2006.
63. SZACHOWICZ, E. H. Facial bone wound healing. An overview. **Otolaryngol Clin North Am.**, United States, v. 28, n. 5, p. 865-880, Oct, 1995.
64. SWEENEY, TM; OPPERMAN, LA; PERSING, JA, OGLE, RC. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. **J Neurosurg**, v. 83, n. 4, p. 710-5, oct, 1995.

65. TAVANO, O. *et al.* Estudo da densidade radiografica digital do tecido osseo face ao implante do polimero de mamona em coelhos. **Revista da FOB**, Brasil, v. 7, n. 34, 1999.
66. Thaller SR, Kim JC, Kawamoto HK. Calvarial bone graft donor site : a histological study in a rabbit model. **Ann Plast Surg** 1989; 23(5):390-395.
67. THOMAIDIS, V; KAZALOS, K; LYRAS, DN, DIMITRAKOPOLULOS, I; LAZARIDIS, N; KARAKASIS, D; BOTAITIS, S; AGROGLANNIS, G. Comparative study of 5 different membranes for guided bone regeneration of rabbit mandibular defects beyound critical size. **Med Sci Monitor** v.14, n.4, p. BR67-BR73, 2008.

ANEXO



PRPPG
Pró-reitoria
de Pesquisa e
Pós-graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Protocolo nº 14/07

Título do Projeto: “Estudo comparativo entre membrana de látex e membrana de politetrafluoretileno (PTFE) na regeneração de defeitos ósseos”

Pesquisador (a) Responsável: Prof.^a Dr.^a Angela Mitie Otta Kinoshita

Comitê de Ética:

O CEP analisou, baseado em parecer competente, o presente projeto e o considerou aprovado.

Data: 29/3/2007

Assinatura do Presidente:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marcos da Cunha Lopes Virmond', is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond