

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

FREDERICO SAUERESSIG

Avaliação Microscópica do Processo de Reparo Ósseo na Presença de Enxerto Ósseo Humano Liofilizado Mineralizado e Desmineralizado e Membrana de Cortical Bovina em Calota Craniana de Ratos

Porto Alegre, 2005

FREDERICO SAUERESSIG

**Avaliação Microscópica do Processo de Reparo Ósseo na Presença de Enxerto
Ósseo Humano Liofilizado Mineralizado e Desmineralizado e Membrana de
Cortical Bovina em Calota Craniana de Ratos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pela Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira

Orientador

Porto Alegre

2005

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista,

Aos meus pais, **Leomar Saueressig** e **Maria Regina Saueressig**, pela confiança, paciência, dedicação e ajuda na conquista de mais uma etapa. Espero poder retribuir tudo o que fizeram por mim. Amo muito vocês.

À minha avó **Elna**, a única dos mais velhos ainda entre nós. Espero que sigas por um bom tempo em nosso convívio familiar.

À minha irmã **Silvia** e seu esposo **Ricardo** com os quais tive a oportunidade de morar em Porto Alegre. Esse período teve grande significado em minha vida e acredito que na de vocês também.

À minha namorada **Pâmela**, pela qual tenho grande amor e admiração.

À **Profa. Dra Marília Gerhardt de Oliveira**. Agradeço as oportunidades proporcionadas, o apoio, a disponibilidade e a preocupação demonstradas.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira**, pela sua dedicação, disponibilidade e competência na orientação desta dissertação. Agradeço seu acolhimento e a oportunidade de aprendizado. És um professor admirável, tanto pelo aspecto profissional, quanto humano.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da PUCRS em nome da **Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**, agradeço as oportunidades proporcionadas na realização do curso de mestrado. Esta oportunidade marcou decisivamente minha carreira profissional e minha vida pessoal.

Ao laboratório de Patologia Bucodental da Faculdade de Biociências da PUCRS, em especial ao funcionário **Cláudio**, pela realização de toda a parte histológica deste trabalho e pela orientação na utilização do software Image Pro Plus.

Ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Anna Filho**, pelo exemplo de postura e de uma visão lúcida da docência. O meu respeito e admiração.

Ao **Prof. Dr. Cláiton Heitz**. Obrigado pelas importantíssimas oportunidades e conhecimentos transmitidos. Sua dedicação, habilidade e experiência cirúrgica foram essenciais para minha formação profissional.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia, **Ana, Davenir, Marcos, Carlos, Luíza e Carla**, pela paciência e disponibilidade em todos os momentos que precisei de vocês.

À meus **colegas de turma** e demais contemporâneos da pós-graduação que tive a oportunidade de conhecer e conviver. Aprendemos uns com os outros a sermos melhores como pessoas e profissionais.

À **toda minha família**, em especial à minha dinda e colega **Rosa**, que, desde minha época de graduação vem me auxiliando na realização de trabalhos científicos. Sua ajuda foi essencial em toda essa minha caminhada.

Finalmente, agradeço à **Deus**, ser superior, por ter me concedido essa oportunidade e ter colocado todas essas pessoas em meu caminho.

RESUMO

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram: avaliar o potencial de formação óssea frente à utilização de enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado e mineralizado da marca U. S. Tissue & Cell®; avaliar se a utilização da membrana de cortical bovina nacional Gen-derm®, influencia na cicatrização óssea e avaliar a biocompatibilidade dos enxertos ósseos, através do processo de reparo do tecido ósseo em cavidades contendo os referidos materiais. Para a realização do experimento, utilizaram-se 36 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) distribuídos em seis grupos de seis animais cada, conforme a época do sacrifício (7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias). Com uma broca esférica de 2 mm de diâmetro em baixa rotação, foram confeccionadas três cavidades, duas na porção mais posterior e uma na anterior da calota craniana de cada animal. A perfuração posterior esquerda foi preenchida com Enxerto Ósseo Humano Desmineralizado Liofilizado, a perfuração posterior direita com Enxerto Ósseo Humano Mineralizado Liofilizado e a perfuração anterior foi preenchida com o coágulo sanguíneo do animal, servindo dessa forma como grupo controle. Em três animais de cada grupo a membrana biológica foi utilizada cobrindo as cavidades preenchidas pelos biomateriais. Os animais foram sacrificados nos intervalos de 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias e os espécimes obtidos, processados pela técnica da parafina, sendo os cortes realizados em sentido transversal e corados por HE. A avaliação microscópica consistiu numa análise histomorfométrica, através da mensuração da área de proporção de tecido ósseo neoformado, bem como do

número de células gigantes multinucleadas presentes no campo histológico. Os valores obtidos foram submetidos a avaliação estatística pela Análise de Variância (Anova) e comparações múltiplas pelo método de Bonferroni, considerando $p \leq 0,05$. Os resultados obtidos permitem concluir que: 1) o uso da membrana de cortical óssea bovina desmineralizada interferiu positivamente na cicatrização óssea; 2) os materiais enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado e mineralizado apresentam propriedades osteocondutoras; 3) os materiais enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado e mineralizado são materiais biocompatíveis; 4) O modelo animal utilizado se mostrou adequado para o design da pesquisa.

Palavras-chave: cicatrização óssea; enxerto ósseo homogêneo liofilizado; regeneração tecidual guiada; membranas.

ABSTRACT

ABSTRACT

The aims of this study was to evaluate new bone formation and biocompatibility by the utilization of Human Demineralized and Mineralized Freeze-Dried Bone Graft (U. S. Tissue & Cell®) and evaluate if Bovine Bone Cortical Membrane (Gen-derm®) enhances the bone repair through the repair process in osseous cavities containing these materials. For that, 36 albinos rats (*Rattus norvegicus*) distributed in six groups according to the time of sacrifice (7, 14, 21, 30, 60 and 90 days). With a spherical drill of 2mm in diameter at low rotation three osseous cavities were made in the calvaria of each animal. One cavity had anterior orientation and two posterior one. The left posterior cavity was filled with Human Demineralized Freeze-Dried Bone Graft, the right posterior with Human Mineralized Freeze-Dried Bone Graft, while the anterior cavity did not received any material forming the control group. In three animals of each group the cavities were covered by biological membranes. The animals were sacrificed at intervals of 7, 14, 21, 30, 60 and 90 days. The specimens obtained were processed by the paraffin technique, sectioned in the transversal way and stained by H&E. The microscopic evaluation consisted in histomorphometric analysis by the measurement of the proportion of new bone formation as well the number of giant multinucleated cells in each cavity. The obtained numbers were submitted to statistic usage, using the Anova test and Bonferroni's pairwise comparisons, considering $p \leq 0,05$. The obtained results allowed us to concluded that: 1) The Bovine Bone Cortical Membrane enhances the bone

repair; 2) Human Demineralized and Mineralized Freeze-Dried Bone Graft showed osteoconductive properties; 3) Human Demineralized and Mineralized Freeze-Dried Bone Graft are biocompatible; 4) The animal model are suitable for the research design.

Keywords: bone healing; freeze-dried bone allograft; guided tissue regeneration; membranes.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FDBA	62
FIGURA 2 - DFDBA	62
FIGURA 3 e 4 - Membrana Absorvível de Cortical Óssea Bovina Liofilizada	62
FIGURA 5 - Aspecto transoperatório do acesso cirúrgico e ostectomia	65
FIGURA 6 - Aspecto transoperatório das perfurações preenchidas pelos materiais	66
FIGURA 7 - Aspecto transoperatório da instalação da membrana e sutura em U	66
FIGURA 8 - Aspecto transoperatório da sutura em U e sutura interrompida	67
FIGURA 9 - Divisão da peça em duas porções	68
FIGURA 10 - Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo e coberta por membrana aos 21 dias. Coloração HE (40X)..	79
FIGURA 11 - Amostra histológica da perfuração preenchida por FDBA e coberta por membrana aos 21 dias. Coloração HE (40X)...	79
FIGURA 12 - Amostra histológica da perfuração preenchida por DFDBA e coberta por membrana aos 21 dias. Coloração HE (40X)	80

FIGURA 13 - Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo aos 21 dias. Hematoxilina e Eosina. Coloração HE (40X).....	81
FIGURA 14 - Amostra histológica da perfuração preenchida por FDBA aos 21 dias. Hematoxilina e Eosina. Coloração HE (40X).....	81
FIGURA 15 - Amostra histológica da perfuração preenchida por DFDBA aos 21 dias. Hematoxilina e Eosina. Coloração HE (40X).....	82

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento nos grupo estudados	72
GRÁFICO 2 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado de subgrupos com e sem membrana nos grupos estudados	73
GRÁFICO 3 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 1	75
GRÁFICO 4 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 2	75
GRÁFICO 5 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 3	76
GRÁFICO 6 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 4	76
GRÁFICO 7 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 5	77
GRÁFICO 8 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 6	77
GRÁFICO 9 – Comparação dos intervalos de confiança das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 3, com e sem a utilização da membrana biológica	78

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Divisão e Subdivisão dos grupos da pesquisa	61
--	----

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média das proporções de osso neoformado dos materiais nos diferentes intervalos de tempo	74
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BMP	Proteína Morfogenética do Osso
cc	Centímetro Cúbico
CE	Cortical Externa
CI	Cortical Interna
DFDBA	Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft Enxerto Ósseo Liofilizado Desmineralizado Alógeno
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
FDBA	Mineralized Freeze-Dried Bone Allograft Enxerto Ósseo Liofilizado Mineralizado Alógeno
fig.	Figura
HE	Hematoxilina e Eosina
J/cm ²	Joule por Centímetro Quadrado
LLLT	Low Level Laser Therapy Laserterapia de Baixa Intensidade
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
ON	Tecido Ósseo Neoformado
PDGF	Platelet Derived Growth Factor Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
μm	Micrômetros
®	Marca Registrada

ROD	Regeneração Óssea Dirigida
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RTD	Regeneração Tecidual Dirigida
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
TGF- β	Transformation Growth Factor β Fator de Crescimento de Transformação β
TONC	Tecido Ósseo Neoformado no Centro do Defeito

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISTA DA LITERATURA	34
2.1	HISTOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO	34
2.2	BASES BIOLÓGICAS DA REPARAÇÃO ÓSSEA	35
2.3	PRINCÍPIOS DO USO DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS	37
2.4	MEMBRANAS BIOLÓGICAS	38
2.4.1	Membranas Não-absorvíveis	39
2.4.2	Membranas absorvíveis	41
2.5	FDDBA	48
2.6	DFDBA	51
2.7	MODELOS DE ESTUDO	55
3	METODOLOGIA	57
3.1	PARADIGMA	57
3.2	PROBLEMAS	58
3.3	HIPÓTESES	58
3.4	CONFIGURAÇÃO DAS AMOSTRAS	59
3.5	ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS	60
3.6	CARACTERÍSTICAS DOS MATERIAIS UTILIZADOS	61
3.7	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	62
3.8	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS	67

3.9	CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E ESTUDO MICROSCÓPICO	69
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
4	RESULTADOS	72
5	DISCUSSÃO	84
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE A – Quantificação da Área de Osso Neoformado em µm² no Software Image Pro Plus	103
	APÊNDICE B – Quantificação da Área Inicial do Defeito em µm² no Software Image Pro Plus	104
	APÊNDICE C –Aspecto Microscópico da Neoformação Óssea e Presença de Células Gigantes Relacionadas com os Enxertos nos Diferentes Grupos Estudados.....	105
	ANEXO A – Aprovação do Projeto de Dissertação pela Comissão Científica e de Ética da FO/PUCRS	118
	ANEXO B – Normas para a Prática Didático-Científica de Vivissecação de Animais	119

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A utilização de enxertos para a reposição de estruturas vitais perdidas está historicamente bem documentada, sendo relatada pela ciência médica desde a antigüidade. A Odontologia, em seu enfoque reabilitador, tem tradição na área dos biomateriais devido à freqüente necessidade de sua indicação na região bucomaxilofacial.

O osso autógeno é considerado o “padrão-ouro” dentre os materiais de enxerto, devido as suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas (BECKER et al., 1995). Sua desvantagem, porém, está na necessidade da criação de outro sítio cirúrgico com suas conseqüências pós-operatórias, o que, muitas vezes, contra-indica sua utilização. (TAGA, 1996)

O material de enxerto ideal teria as qualidades descritas do osso autógeno sem as desvantagens relacionadas com o sítio doador (BECKER et al., 1995). Até o presente momento não existe tal material. Entretanto, diversos materiais e técnicas têm sido propostos.

No final da década de cinqüenta surgiu, como alternativa para o tratamento de defeitos ósseos ortopédicos, a técnica das membranas biológicas ou da regeneração óssea guiada (MURRAY; HOLDEN; ROSCHLAU, 1957). Seu princípio baseava-se na permeabilidade seletiva das membranas que proporcionavam o

isolamento de células sem interesse para a reconstrução tecidual almejada, favorecendo a migração de células com potencial osteogênico e conseqüente regeneração do tecido ósseo.

Nas décadas seguintes, a técnica das membranas foi aplicada em outras especialidades como na Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Periodontia e Implantodontia. Assim, foram desenvolvidas membranas com diferentes constituições e propriedades que, inclusive, foram testadas em diferentes associações com outros biomateriais.

Na década de sessenta, Urist (1965), iniciou os estudos sobre a utilização de osso humano liofilizado em procedimentos de enxerto. Nos dias de hoje são utilizados dois tipos de enxertos ósseos homogêneos: o mineralizado liofilizado e o desmineralizado liofilizado.

Ultimamente, há uma tendência de se associar os biomateriais no intuito de potencializar suas ações. Diversos autores associaram enxertos de osso humano liofilizado e membranas biológicas e comprovaram seu sinergismo de ação. O princípio desta associação estaria embasado nas propriedades da membrana em isolar a região enxertada de células sem potencial osteogênico e de células inflamatórias com potencial de absorver rapidamente o enxerto, além de concentrar os fatores de crescimento no seu local de ação (ZELLIN; LINDE, 1997a; ZELLIN; LINDE, 1997b).

O mercado brasileiro de biomateriais, recentemente, apresentou um grande crescimento com o aparecimento de alternativas nacionais aos biomateriais

importados, que se tornaram acessíveis em diversas especialidades médico-odontológicas. Porém torna-se necessária a realização de estudos experimentais pré-clínicos, a fim de se determinar suas reais propriedades.

O estudo de biomateriais que substituam o enxerto ósseo autógeno, poderá nos revelar um material de comportamento biológico semelhante a esse e que nos proporcione a redução da morbidade, característica dos enxertos ósseos autógenos.

Com o intuito de contribuir para o avanço do conhecimento a respeito dos efeitos do Enxerto Ósseo Humano Liofilizado e da Membrana Absorvível de Cortical Óssea Bovina Liofilizada na cicatrização óssea, propõe-se a presente pesquisa, que tem por objetivos:

a) avaliar o potencial de formação óssea frente à utilização de enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado e mineralizado da marca U. S. Tissue & Cell®¹.

b) avaliar a biocompatibilidade destes materiais.

c) avaliar se a utilização da membrana nacional Gen-derm®², influencia na cicatrização óssea.

d) avaliar os resultados dos materiais utilizados em relação ao grupo controle (coágulo).

¹ FDDBA, U. S. Tissue & Cell®, Ohio, Cincinnati, USA

DFDBA, U. S. Tissue & Cell®, Ohio, Cincinnati, USA

² Gen-derm®, Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil

e) avaliar se o modelo animal proposto é adequado para o design da pesquisa.

Os materiais acima citados são amplamente utilizados e referenciados pela literatura. Contudo, observa-se diferentes resultados conforme a marca comercial utilizada. Nosso estudo se propõe a analisar o resultado cicatricial em calota craniana de ratos.

REVISTA DA LITERATURA

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 HISTOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO

Burkitt, Young e Heath (1994), definiram o osso como uma forma especializada de tecido de sustentação no qual os componentes extracelulares são mineralizados.

Microestruturalmente, o osso pode ser categorizado em três componentes: células, matriz orgânica e matriz inorgânica. Esses são integrados em duas hierarquias macroestruturais: osso cortical e osso esponjoso (BOGLIOLO, 1994).

Para Rosemberg (1996) as células encontradas no osso são de três tipos: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, sendo os dois primeiros tipos celulares derivados das células mesenquimais denominadas células osteoprogenitoras. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese e secreção do componente orgânico da matriz extracelular e iniciam o processo de mineralização. Os osteócitos se situam em cavidades chamadas osteoplastos e desempenham um importante papel no controle dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo. Já os osteoclastos, são células gigantes multinucleadas que estão relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e participam do processo de remodelação dos ossos. São derivadas de uma célula precursora granulócito-macrófago localizada na medula hematopoiética.

Do ponto de vista bioquímico, o osso é definido como uma mistura de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%). O componente inorgânico é a hidroxiapatita de cálcio $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, mineral que confere a força e a dureza ao osso e se constitui no reservatório de 99% de todo o cálcio, 80% de todo o fósforo e 65% do sódio e magnésio do organismo. O componente orgânico é representado principalmente pelo colágeno tipo I (90%), e substâncias não colágenas (10%), como proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), proteoglicanas e glicoproteínas como osteocalcina, osteonectina e osteopontina (ROSEMBERG, 1996).

2.2 BASES BIOLÓGICAS DA REPARAÇÃO ÓSSEA

Segundo Junqueira e Carneiro (1979) a formação de osso durante o desenvolvimento do esqueleto ocorre por ossificação intramembranosa ou por ossificação endocondral. Na ossificação intramembranosa o mineral é depositado diretamente em um tecido mesenquimal, enquanto na ossificação endocondral um modelo cartilaginoso é substituído por osso.

Burkitt, Young e Heath (1994) propuseram o reparo de fratura como modelo de reparo ósseo. Neste modelo a neoformação óssea seria tanto intramembranosa como endocondral. Segundo os autores, no local da fratura forma-se um coágulo sangüíneo que é posteriormente substituído por um tecido colágeno altamente vascular (tecido de granulação). Esse tecido torna-se progressivamente mais fibroso. Células mesenquimais diferenciam-se em condroblastos e substituem o tecido de granulação por cartilagem hialina, formando um calo provisório que é flexível. Este

calo é fortalecido pela deposição de sais de cálcio dentro da matriz cartilaginosa. Células osteoprogenitoras do endóstio e perióstio são ativadas e depositam osso imaturo ao redor e dentro do calo provisório. O calo provisório é então transformado em calo ósseo. O osso imaturo formador do calo ósseo será lentamente remodelado para formar osso lamelar maduro.

Para ELLIS III (1996), o conhecimento básico de como se dá a cicatrização dos enxertos ósseos autógenos é necessário para que se entenda as vantagens dos vários tipos de enxertos ósseos disponíveis. A cicatrização ocorreria por intermédio de dois processos básicos: O primeiro processo surge a partir de células viáveis do próprio enxerto, capazes de formar tecido osteóide, já o segundo é observado no leito receptor e é iniciado por intensa angiogênese e proliferação fibroblástica com posterior osteogênese.

Schenk (1996) afirma que a formação óssea depende de dois pré-requisitos indispensáveis: suprimento vascular e suporte mecânico. O tecido ósseo exibe um potencial de regeneração surpreendente e restaura sua estrutura original e suas propriedades mecânicas, porém com certos limites e passível de falhas, caso determinadas condições não sejam observadas. Esse autor salienta alguns fatores que impedem ou dificultam o reparo ósseo: falha de vascularização, instabilidade mecânica, defeitos de grandes volumes e tecidos competidores com alta atividade de proliferação.

Em condições biológicas, uma cavidade óssea assim como os alvéolos dentários, é reparada através do processo biológico natural, cuja extensão e velocidade variam conforme as dimensões da lesão, a localização anatômica do

agente etiológico e de acordo com as características genéticas de cada modelo animal (CONSOLARO et al., 1997).

Garg (1999) definiu três diferentes processos de cicatrização associados com os enxertos ósseos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. Osteogênese é a formação e o desenvolvimento do osso. Osteoindução é o processo de estimulação da osteogênese. Osteocondução é o fornecimento de uma matriz física para a deposição de novo osso. Para o autor, esses três processos ocorreriam concomitantemente na regeneração dos enxertos ósseos autógenos.

Hollinger, Buck e Bruder (1999) reafirmaram o reparo de fratura óssea como o modelo de estudo na regeneração óssea. Salientaram a importância dos fatores de crescimento tais como TGF- β (fatores de crescimento de transformação β), PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) e BMPs (proteínas morfogenéticas do osso) no processo de reparo ósseo.

2.3 PRINCÍPIOS DO USO DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Os princípios da utilização de membranas biológicas baseiam-se na permeabilidade seletiva das mesmas, que proporcionam o isolamento de células indesejáveis, criando assim um espaço que favorece a migração de células com potencial osteogênico e conseqüente regeneração do tecido ósseo (MURRAY; HOLDEN; ROSCHLAU, 1957).

Para McGinnis et al. (1998), uma membrana ideal deve ser: bioinerte e com rigidez suficiente para proteger o coágulo sangüíneo.

Mundell et al. (1993) afirmam que as membranas devem atuar como uma barreira, impedindo a entrada de células consideradas indesejáveis ao local protegido, pois, numa área em reparação óssea, a invasão do coágulo por fibroblastos pode resultar em cicatrização fibrosa.

Segundo Consolaro et al. (1997) a utilização de membranas biológicas impede que as células do epitélio bucal e do tecido conjuntivo participem da cicatrização do defeito ósseo, deixando que as células osteoblásticas tenham a prioridade de se conduzirem para a área. Estas membranas criam um meio propício para melhorar a regeneração funcional através do potencial biológico natural, proporcionando a estabilidade mecânica do coágulo e a manutenção do espaço por ele preenchido através do isolamento de tecidos indesejáveis no local da regeneração.

2.4 MEMBRANAS BIOLÓGICAS

As membranas biológicas se dividem em dois grandes grupos: membranas não-absorvíveis e membranas absorvíveis. Estas últimas subdividem-se em bioabsorvíveis degradadas por hidrólise, e biodegradáveis, em que há uma ação enzimática (HARDWICK; HAYES; FLYNN, 1995).

Na literatura brasileira, diferentes terminologias têm sido utilizadas para a descrição da utilização das membranas biológicas. Além de Regeneração Tecidual Guiada (RTG) e Regeneração Óssea Guiada (ROG), Spiekermann (2000) introduziu os termos Regeneração Tecidual Dirigida (RTD) e Regeneração Óssea Dirigida (ROD).

2.4.1 Membranas Não-absorvíveis

Boyne e Mikels (1968) avaliaram a técnica da Regeneração Óssea Guiada com membranas em cirurgias bucomaxilofaciais. Foram utilizados filtros de acetato de celulose como membranas sobre microtelas de titânio preenchidas com osso autógeno para o tratamento de defeitos ósseos de tamanho crítico na mandíbula de cachorros. Os autores foram os primeiros a aplicar a técnica nesta especialidade inspirados nos resultados alcançados com a aplicação da técnica para tratamento de defeitos ósseos na ortopedia médica.

Nyman et al. (1987) foram os primeiros a avaliar o efeito das membranas biológicas na regeneração tecidual guiada de defeitos periodontais em humanos. Dez pacientes, após tratamento periodontal, apresentavam onze dentes comprometidos periodontalmente. Membranas de Politetrafluoretileno Expandido (e-PTFE) instaladas entre o retalho mucogengival e a superfície radicular desses dentes permitiram a migração sobre a superfície radicular, no sentido coronário, de células do ligamento periodontal, inibindo simultaneamente o crescimento de células do epitélio gengival, do tecido conjuntivo e do tecido ósseo para a região. Após três

meses, quatro dentes foram removidos juntamente com seus tecidos moles circundantes, para possibilitar análise histológica. Os outros dentes foram mantidos em acompanhamento clínico e radiográfico, e os resultados da terapêutica foram avaliados diretamente no trans-operatório da cirurgia de remoção das membranas. Apesar da grande variação de resultados entre os pacientes, os autores salientaram as vantagens da técnica de regeneração tecidual guiada através das membranas de e-PTFE para tratamento de defeitos periodontais.

Dahlin et al. (1989) foram os pioneiros na utilização de tíbias de coelhos como modelo experimental, para avaliação do potencial de regeneração óssea guiada pela técnica das membranas, no tratamento de defeitos periimplantares. Os implantes foram instalados na cortical medial da tíbia, de forma que três a quatro roscas da região coronária de cada implante permanecessem expostas. Membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) foram adaptadas sobre os implantes no grupo experimental, enquanto no grupo controle foi aplicada a mesma técnica cirúrgica, porém, sem a instalação das membranas. Os animais foram sacrificados na sexta, nona e décima quinta semanas de pós-operatório, e as peças foram submetidas a análise clínica, radiográfica e histológica. Os resultados comprovaram as propriedades das membranas como técnica de osteopromoção, mostrando uma regeneração óssea bem mais efetiva no grupo experimental.

Becker et al. (1995) avaliaram o potencial de regeneração óssea guiada das membranas de e-PTFE isoladas e quando associadas com enxerto ósseo autógeno ou com enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado (DFDBA) em defeitos ósseos adjacentes a implantes, em alvéolos de extração dentária de cães. Os grupos experimentais foram compostos de: dois implantes que receberam apenas a

membrana de e-PTFE; dois implantes que receberam a membrana associada com osso autógeno; seis implantes que receberam a membrana de e-PTFE associada com DFDBA e o grupo controle constituído de dois implantes sem adição de qualquer material de enxerto. Os resultados após doze semanas indicaram que as membranas de e-PTFE isoladas ou associadas com enxerto de osso autógeno, produziram os melhores resultados clínicos e histológicos. O DFDBA não pareceu induzir formação óssea em quaisquer dos espécimes avaliados.

Becker et al. (1992), Caplanis et al. (1998), Lekovic et al. (1998) e Zubillaga et al. (2003) citam como desvantagens das membranas não absorvíveis a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, devido a ausência de sua incorporação ao hospedeiro, além da tendência a infecção pós-operatória.

2.4.2 Membranas absorvíveis

Marzola et al. (1996) relataram o uso de membrana de cortical óssea bovina Dentoflex®³ após a enucleação de lesões císticas na maxila e mandíbula, obtendo resultados satisfatórios.

Beltrão (1997) avaliou em diferentes períodos de tempo, o potencial de regeneração óssea guiada das membranas biológicas absorvíveis de celulose (Gengiflex®⁴), em defeitos experimentais não-críticos confeccionados na mandíbula

³ Dentoflex®, Curitiba, Brasil.

⁴ Gengiflex®, Bio Fill Produtos Tecnológicos, Curitiba, Brasil

de quarenta coelhos. Os animais foram sacrificados aos sete, quinze, trinta e noventa dias e os resultados avaliados através de microscopia óptica por um método de convenção de valores quanto à osteogênese. Os períodos de sete e quinze dias apresentaram grande atividade osteoblástica, que diminuiu gradativamente até os noventa dias, quando os defeitos ósseos se mostraram totalmente regenerados. Com base nesses resultados, o autor conclui que as membranas agiriam no reparo ósseo através da exclusão de células oriundas do perióstio, permitindo a regeneração do tecido ósseo a partir do coágulo e seus fatores de crescimento naturais e das células do endóstio.

Caplanis et al. (1997) avaliaram a associação de membranas absorvíveis com enxerto ósseo humano mineralizado liofilizado e as membranas isoladamente para tratamento de defeitos periimplantares de 5,0 mm de altura em cinco cães. Após dezesseis semanas, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada no processo de reparo periimplantar, tanto na quantidade vertical de osso regenerado, quanto na osseointegração dentro da extensão do osso neoformado e na osseointegração dentro da base alveolar. Os autores tecem as seguintes considerações: 1) o enxerto ósseo humano mineralizado liofilizado não apresentou nenhum efeito adjunto na regeneração óssea guiada no tratamento de defeitos periimplantares supra-alveolares; 2) a regeneração óssea guiada tem um potencial limitado na regeneração alveolar neste modelo experimental; 3) o intervalo de dezesseis semanas parece ser insuficiente para maturação do osso alógeno desmineralizado nos procedimentos de regeneração óssea guiada.

Consolaro et al. (1997) avaliaram o processo de reparo ósseo em cavidades de 3mm de diâmetro criadas em tíbia de ratos. Os autores utilizaram osso bovino

liofilizado, aglutinante a base de dextrana e membrana de cortical bovina para o preenchimento das cavidades no grupo experimental. Ao final do período experimental de 40 dias, puderam observar tecido ósseo preenchendo toda loja cirúrgica, não ultrapassando, no entanto, seu limite externo. O mesmo padrão de reparo ósseo foi observado nas cavidades controle, preenchidas somente com coágulo sangüíneo.

Marzola et al (1997) relataram casos clínicos onde a membrana óssea bovina Dentoflex® foi empregada na proteção de feixes vâsculo-nervosos. A membrana atuou como curativo biológico nas cirurgias para reposicionamento destes feixes.

Taga et al. (1997) avaliaram experimentalmente o destino da membrana de osso bovino, quando colocada sub-periostealmente em calvária de cobaia, no período de 1, 3 e 6 meses após a enxertia da membrana. Ao final do primeiro mês observaram em todos os casos a membrana íntegra justaposta à superfície da calvária. No grupo experimental de 3 meses, as membranas exibiam estado avançado de reabsorção, com diminuição na sua largura total. No grupo sacrificado aos 6 meses encontraram reabsorção total da membrana em 50% dos casos e quase total nos outros 50%.

Ainda Taga et al. (1997) propuseram os seguintes eventos em ordem temporal que levam à reabsorção da membrana de cortical óssea bovina: a) formação de tecido conjuntivo denso recobrando a membrana; b) invasão dos espaços da membrana, correspondentes aos canais de Havers e Volkmann, por células mononucleadas e vasos sangüíneos; c) destruição inicial das porções da membrana correspondentes ao sistema lamelar intermediário, que fica ao redor do

sistema lamelar de Havers, provavelmente pela liberação de colagenase por intermédio das células mononucleadas semelhantes aos fibroblastos; d) ocupação dos espaços, que apareceram no interior da membrana, por novas células mononucleadas; e) desaparecimento das porções da membrana correspondentes ao sistema de Havers e f) substituição da membrana por tecido conjuntivo denso ou frouxo.

Naaman e Ouhayoun (1998) avaliaram a associação da membrana absorvível de poliglactina 910 com enxerto de esqueleto natural de coral, através de análise histomorfométrica da neoformação óssea em defeitos ósseos críticos na calvária de ratos. Os defeitos foram divididos de acordo com seu tratamento em: 1) sem adição de qualquer material de enxerto, constituindo o grupo controle; 2) defeitos ósseos cobertos com disco de esqueleto natural de coral; 3) esqueleto natural de coral particulado; 4) associação de membrana de poliglactina 910 com partículas de esqueleto natural de coral; 5) membrana de poliglactina 910 isolada. Os animais foram sacrificados no vigésimo oitavo dia pós-operatório. Os três grupos que continham esqueleto natural de coral apresentaram neoformação óssea, porém apenas o grupo tratado com disco e aquele com esqueleto natural de coral associado com membrana apresentaram resultados estatisticamente significantes. Não foi constatada neoformação óssea no grupo de defeitos tratados com membrana de poliglactina 910 isoladamente e no grupo controle.

Herculiani et al. (2000) estudaram o reparo ósseo em 37 cobaias com a utilização de membrana de cortical óssea bovina (Gen-derm®), associada ou não a

enxerto ósseo bovino desmineralizado (Gen-ox⁵). Foram confeccionados defeitos cirúrgicos de 12mm de diâmetro na calvária dos animais, os quais foram divididos em dois grupos experimentais de quinze, um grupo controle com cinco e um grupo 0 hora com dois animais. No primeiro grupo experimental, o defeito foi preenchido com coágulo sangüíneo e recoberto com membrana; no segundo, a lesão foi preenchida com matriz óssea bovina desmineralizada aglutinada com coágulo e recoberta com membrana; no grupo controle e no 0 hora não foi utilizado nenhum tratamento. As calvárias dos grupos experimentais, em subgrupos de cinco animais, foram coletadas 1, 3 e 6 meses após a cirurgia, o grupo controle após 6 meses e o 0 hora logo após a cirurgia para que fossem submetidas à análise radiográfica e histológica. Embora em nenhum dos casos tenha ocorrido o fechamento completo dos defeitos após o período de 6 meses, os autores observaram maior formação de tecido ósseo no grupo tratado com enxerto ósseo bovino e membrana quando comparados com os demais grupos. Os autores associam a menor formação de tecido ósseo no grupo tratado exclusivamente com membrana a pequena resistência a pressões externas da mesma, tornando necessária a utilização de parafusos, cola cirúrgica ou enxerto ósseo para evitar seu colapso.

Pinto et al. (2000) avaliaram a associação da proteína morfogenética do osso com a membrana de cortical óssea bovina liofilizada, para a regeneração óssea guiada de alvéolos pós extração dentária em humanos. Após três meses dos procedimentos cirúrgico de enxerto, as áreas foram reabilitadas com implantes osseointegrados, quando foram coletadas amostras para avaliação histológica da região. O grupo controle constou de alvéolos de extração dentária sem a adição de

⁵ Gen-ox®, Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil.

qualquer material de enxerto. Os resultados foram avaliados por microscopia óptica. Foi constatada uma maior quantidade e maturidade do tecido ósseo neoformado no grupo que recebeu os enxertos. Embasados nos resultados clínicos, radiográficos e histológicos, os autores ressaltaram as propriedades da associação dos biomateriais na otimização do processo de reparo ósseo, porém afirmaram a necessidade da continuidade dos estudos na área, para conclusões mais efetivas através de maior casuística e maior período de preservação dos casos clínicos.

Toledo Filho, Marzola e Rodriguez Sanchez (2001), após ampla revisão de literatura, avaliaram o aumento de volume de rebordos maxilares em humanos, proporcionado por enxertos ósseos “em bloco”, combinados com uma associação de enxerto ósseo bovino liofilizado, proteína morfogenética do osso e aglutinante, coberta por uma membrana de cortical óssea bovina liofilizada. O sítio doador do enxerto ósseo autógeno foi a sínfise mandibular. Os rebordos alveolares foram medidos, de forma indireta, no pré-operatório, através de exames tomográficos e especímetro de precisão, e de forma direta, durante os procedimentos cirúrgicos de enxertia e instalação dos implantes. Os autores ressaltaram as propriedades de biocompatibilidade da associação do enxerto de osso autógeno “em bloco” combinado com os biomateriais citados. Ressaltaram também que a membrana utilizada no experimento não apresentou suficiente rigidez estrutural, sendo suscetível ao colapso, porém, a associação apresentou bons resultados nas cirurgias corretivas da maxila, permitindo o planejamento para a reabilitação com implantes osseointegrados. Os autores concluíram que os resultados encontrados seriam consequência dos efeitos osteogênicos do osso autógeno, dos efeitos osteoindutores da proteína morfogenética; dos efeitos osteocondutores do enxerto ósseo bovino liofilizado e da capacidade osteopromotora da membrana.

Carvalho et al. (2003) avaliaram histologicamente o destino da membrana óssea desmineralizada de origem bovina, aplicada em contato com tecido ósseo da tíbia de 15 ratos albinos. Os espécimes foram obtidos aos 60, 90 e 120 dias pós-operatórios. Aos 60 e 90 dias pós-operatórios foi observado uma faixa de fibroblastos e fibras colágenas entre a membrana e a superfície óssea. No período de 120 dias existiam algumas áreas com presença de delgada faixa de fibroblastos e fibras colágenas e outras apresentando união entre a membrana e a superfície óssea. Essa alteração no padrão histológico, observada no período mais tardio, pode indicar, segundo os autores, que o material em questão não é irritante aos tecidos, se tornando encapsulado, e também, não-absorvível já que mostra uma união com a superfície óssea.

Pinheiro et al. (2003) investigaram histologicamente o efeito do laser de baixa intensidade (LLLT) no reparo ósseo de cavidades de 3mm de diâmetro em fêmur de ratos, enxertados com diferentes biomateriais. Os grupos do estudo foram aleatoriamente distribuídos em: grupo I (controle, sem enxerto); grupo II (enxerto ósseo bovino inorgânico); grupo III (enxerto ósseo bovino inorgânico + LLLT); grupo IV (enxerto ósseo bovino inorgânico + membrana de cortical óssea bovina liofilizada); grupo V (enxerto ósseo bovino inorgânico + membrana de cortical óssea bovina liofilizada + LLLT). Os animais foram irradiados transcutaneamente em quatro pontos ao redor dos defeitos, com uma dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e 830nm sobre cada ponto, em intervalos de 48 horas durante quinze dias. Os animais foram sacrificados aos 15, 21 e 30 dias pós-operatórios. Os resultados mostraram evidências de um melhor reparo ósseo nos grupos que receberam irradiação, nos quais pode-se observar

uma maior formação de tecido ósseo e fibras colágenas ao redor dos enxertos em todos os períodos estudados.

Pinto, Brito e Oliveira (2003) analisaram histologicamente o processo de reparo ósseo na presença da proteína morfogenética óssea bovina (Gen-Pro®⁶) associada com uma membrana de cortical óssea bovina liofilizada (Gen-derm®) em cavidades ósseas confeccionadas em tíbias de coelhos. Para a confecção das cavidades ósseas foi utilizado protocolo para instalação de implantes osseointegrados, até a broca espiral de três milímetros de diâmetro. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, de acordo com período de sacrifício: 7, 28 e 56 dias pós-operatórios. A tíbia direita de cada animal foi determinada como grupo experimental, onde a associação de biomateriais foi utilizada sobre as perfurações, e a tíbia esquerda foi utilizada como grupo controle, permanecendo sem a adição de qualquer material de enxerto. Os autores observaram processo de reparo ósseo retardado no período de 7 dias do grupo experimental. Com o passar do tempo, à medida que a associação de biomateriais foi absorvida, observaram uma equivalência no reparo ósseo na presença ou ausência da associação.

2.5 FDBA

Com o intuito de determinar se o processo de liofilização do enxerto ósseo humano poderia diminuir sua antigenicidade, Turner e Mellonig (1981) realizaram experimento em mandíbulas de macacos babuínos. Foram utilizados seis macacos,

⁶ Gen-Pro®, Baumer, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil

sendo realizado um defeito ósseo angular em cada animal. Metade dos animais receberam enxerto de FDBA e a outra metade enxerto ósseo homogêneo fresco do mesmo doador. Testes de microtoxicidade foram usados para a mensuração da imunidade mediada por células e humoral. Os resultados mostraram uma resposta imune diminuída nos animais que receberam enxerto de FDBA.

Drury e Yukna (1991) observaram o efeito da utilização de tetraciclina associada a enxertos ósseos homogêneos de macacos babuínos. Três defeitos ósseos foram criados no osso alveolar, de cada quadrante, de seis animais: um deles preenchido com telas de nylon contendo FDBA hidratado em soro fisiológico; outro com telas de nylon contendo FDBA hidratado em solução de tetraciclina e outro com telas de nylon vazias. As telas foram removidas de três animais em cada período de observação (3ª e 5ª semana pós-operatória) sendo realizada análise histomorfométrica das mesmas. Os resultados mostraram maior quantidade de tecido ósseo neoformado nas telas que receberam hidratação com solução de tetraciclina.

Mellonig (1991) utilizou enxerto ósseo homogêneo no tratamento de quinhentos e cinco defeitos ósseos de origem periodontal. Em trezentos e vinte nove desses sítios foram utilizados enxerto ósseo humano mineralizado e liofilizado, os outros sítios foram enxertados com osso mineralizado e liofilizado misturados com osso autógeno. Após um período pós-operatório de um ano, avaliações radiográficas e reintervenções cirúrgicas foram realizadas, onde foi observado um preenchimento ósseo total ou de mais de cinquenta por cento dos defeitos em 220 sítios (67%) tratados com osso homogêneo isoladamente e em 137 sítios (78%) tratados com osso homogêneo combinado com osso autógeno. O autor concluiu que ambas

técnicas podem ser utilizadas com ótimos resultados no tratamento de defeitos ósseos periodontais e que o emprego do enxerto composto (homógeno associado ao autógeno) melhorou significativamente os resultados, especialmente nos defeitos de furca de dentes multiradiculares.

Mellonig (1994) avaliou a capacidade de regeneração do periodonto de macacos machos adultos, enxertados com Osso Humano Mineralizado e Liofilizado. No experimento defeitos ósseos periodontais foram provocados por elásticos ortodônticos introduzidos subgengivalmente. Trinta defeitos receberam enxerto ósseo e trinta não receberam nenhum tipo de material. A avaliação histológica no período de cinco a doze meses de pós-operatório demonstrou regeneração óssea completa em dezesseis dos trinta defeitos tratados com enxerto ósseo e em cinco dos trinta do grupo controle. A análise histomorfométrica demonstrou que, uma maior quantidade de osso novo, cemento e ligamento periodontal estavam presente nos sítios enxertados.

Fu et al. (2003), avaliaram o efeito da utilização de ciclosporina associada ao enxerto ósseo homógeno mineralizado liofilizado no reparo ósseo mandibular de quarenta ratos. Os autores dividiram o experimento em quatro grupos de dez animais: em um grupo os defeitos ósseos foram preenchidos somente com óleo mineral (controle); em outro com óleo mineral e ciclosporina; outro com osso homógeno e óleo mineral e o último com osso homógeno, óleo mineral e ciclosporina. Após um período de dez e vinte e oito dias amostras teciduais foram removidas para análise histológica. A histomorfometria das lâminas revelou que o grupo que continha as três substâncias mostrou a maior área de reparo ósseo.

2.6 DFDBA

Mellonig, Bowers e Cotton (1981) compararam o potencial osteocondutor entre enxerto ósseo autógeno, DFDBA e FDBA em defeitos ósseos de calotas cranianas de porcos. A análise histomorfométrica realizada aos 2 meses de pós-operatório evidenciou maior quantidade de osso neoformado nos defeitos enxertados com DFDBA, seguida pelo osso autógeno e FDBA.

Becker et al. (1992) compararam a neoformação óssea ao redor de implantes dentários associados com: membranas de ePTFE; membranas de ePTFE mais DFDBA ou membranas de ePTFE mais fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF). Os materiais foram enxertados no interior de fenestrações de alvéolos de cães pós extrações dentárias. Ao final de 130 dias os animais foram sacrificados e foi realizada análise histomorfométrica. Os resultados mostraram maior quantidade de tecido ósseo neoformado nos animais em que foram utilizados membranas e membranas mais PDGF. Foi observado também a presença de partículas de DFDBA sem atividade osteoblástica, porém sem presença de células gigantes.

Pinholt et al. (1992) avaliaram histologicamente o reparo ósseo frente a utilização de enxerto ósseo humano desmineralizado liofilizado no rebordo alveolar desdentado de cabras. Os resultados histológicos demonstraram presença de células gigantes multinucleadas associadas as partículas do enxerto aos 7 e 14 dias de pós-operatório e encapsulação fibrosa das mesmas aos 30 dias.

Alguns estudos tem demonstrado, em modelo animal, a capacidade osteoindutiva do DFDBA (KÜBLER et al., 1993; SCHWARTZ et al., 1996).

Pinholt et al. (1994) enxertaram osso humano desmineralizado liofilizado em defeitos ósseos não-críticos realizados na mandíbula de cães. Após 90 dias do procedimento de enxertia os animais foram sacrificados e o tecido ósseo foi avaliado histologicamente. Foi observado encapsulação e presença de células gigantes relacionadas com o material de enxerto ósseo.

Becker et al. (1995), Schwartz et al. (1996) e Zhang et al. (1997) relatam que a capacidade osteoindutiva dos DFDBA dependem de vários fatores como: idade do doador, protocolo de processamento e método de esterilização utilizado pelo banco de osso, grau residual de cálcio e tamanho das partículas de enxerto.

Rabie et al. (1996) estudaram a cicatrização do enxerto ósseo humano desmineralizado liofilizado em defeitos ósseos críticos (10 x 5mm) de calota craniana de coelhos. O estudo foi dividido em quatro grupos de três animais: grupo I (controle, sem enxerto); grupo II (enxerto autógeno); grupo III (enxerto ósseo humano desmineralizado); grupo IV (enxerto ósseo humano desmineralizado e enxerto autógeno). Os animais foram sacrificados duas semanas após o procedimento cirúrgico de enxertia para a realização de avaliação histológica. Os resultados microscópicos mostraram uma cicatrização, com preenchimento de tecido conjuntivo fibroso, no grupo controle e ossificação intramembranosa com proliferação vascular e neoformação óssea do osso receptor em direção ao osso enxertado no grupo II. No grupo III e IV, foi observada ossificação endocondral, reabsorção do enxerto

ósseo humano desmineralizado, invasão vascular e neoformação óssea das margens do osso receptor em direção ao centro do defeito.

Chesmel et al. (1998) compararam a habilidade do enxerto ósseo autógeno e quatro diferentes formas de enxerto ósseo desmineralizado de induzir reparo em defeitos ósseos críticos realizados em calotas cranianas de ratos atímicos. O estudo foi dividido em seis grupos de seis animais cada: grupo I (enxerto ósseo autógeno); grupo II (enxerto ósseo particulado do rato desmineralizado embebido em glicerol-gel); grupo III (enxerto ósseo humano desmineralizado embebido em glicerol-gel); grupo IV (enxerto ósseo humano desmineralizado em fibras embebido em glicerol); grupo V (enxerto ósseo humano desmineralizado em fibras). Foram realizadas avaliações histológicas, histomorfométricas e radiográficas dos sítios enxertados, através das quais não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o enxerto ósseo desmineralizado do rato, humano e o enxerto ósseo autógeno. Os enxertos compostos por fibras (grupo IV e V) mostraram as maiores quantidades de neoformação óssea.

Matzenbacher et al. (2003), avaliaram a cicatrização óssea em defeitos ósseos críticos (8mm) em calvária de ratos, utilizando enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado. Os autores dividiram o experimento em quatro grupos: em um grupo foi enxertado glicerol; outro grupo recebeu glicerol e enxerto ósseo humano desmineralizado; num terceiro grupo, somente enxerto ósseo humano desmineralizado e o quarto não recebeu nenhum material de enxerto. Em um período de oito semanas de pós-operatório o osso da calota foi coletado e realizada a avaliação histomorfométrica. Foi observada maior formação óssea nos grupos contendo glicerol associado ao enxerto ósseo e naquele com enxerto ósseo isolado.

Os autores concluíram também que o glicerol melhorou de forma significativa a manipulação do material de enxerto ósseo.

Klepp et al. (2004) estudaram o potencial de neoformação óssea do DFDBA em cães. Foram realizadas fenestrações circulares com auxílio de brocas trefinas de 8mm, no osso alveolar vestibular na região dos quatro dentes caninos de quatorze animais. Cada sítio foi recoberto por membrana de politetrafluoretileno e preenchido com uma dos seguintes materiais: DFDBA esterilizado com óxido de etileno; DFDBA tratado por aquecimento; DFDBA não esterilizado e coágulo sanguíneo, constituindo o grupo controle. Os animais foram sacrificados na quarta semana de pós-operatório e foi realizada análise histomorfométrica das peças. Como resultado, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na quantidade de tecido ósseo neoformado nas perfurações intra-animais e sim inter-animais. Os autores atribuíram esses achados a respostas individuais de cada animal.

Yukna e Vastardis (2005) avaliaram a cicatrização óssea de defeitos criados na maxila e mandíbula de seis macacos *rhesus*. Foram realizados três defeitos em cada quadrante: um preenchido com cilindro de nylon contendo DFDBA; outro com cilindro de nylon contendo FDBA e outro com cilindro vazio, como grupo controle. Os cilindros foram removidos trinta, sessenta e noventa dias após o procedimento cirúrgico e submetidos à análise histológica. Os resultados sugeriram que o FDBA pode estimular uma neoformação óssea mais precoce, mais rápida e maior que o DFDBA no modelo animal utilizado.

2.7 MODELOS DE ESTUDO

Defeitos ósseos que não irão cicatrizar durante o tempo de vida de um animal, justificando a necessidade da utilização de algum material para preenchimento ósseo, são denominados defeitos ósseos críticos (HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Diferentes modelos animais experimentais têm sido utilizados nos estudos em Regeneração Óssea Guiada e neoformação óssea de biomateriais. Podemos citar: ratos (BUSER; DAHLIN; SCHENK, 1994; CONSOLARO et al., 1997; ZAHEDI et al., 1998; ZELLIN; GRITLI-LINDE; LINDE, 1995), cães (McGINNIS et al., 1998; SMUKLER; BARBOZA; BURLISS, 1995), coelhos (AABOE et al., 1998; ITO; NAMBA; MURAI, 1998; LUNDGREN; SENNERBY; LUNDGREN, 1998; PIATTELLI et al., 1996; SCHMID et al., 1997) e macacos (HURZELER et al., 1998). Os defeitos são criados em diferentes ossos como tíbia, calvária, fêmur e mandíbula.

A quantidade da neoformação óssea sob condições experimentais é influenciada pela espécie do animal, idade, localização anatômica, envolvimento de cortical -uni ou bicortical-, presença de perióstio e/ou dura-máter e estabilidade do defeito (AABOE; PINHOLT; HJORTING-HANSEN, 1995).

METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 PARADIGMA

Este estudo foi realizado no paradigma tradicional quantitativo e tem uma abordagem experimental classificando-se como um estudo quase experimental de materiais equivalentes (CAMPBELL; STANLEY, 1979), que apresenta o seguinte design:

ACX h_{min}h_{des}O₁.....O₇

ACX h_{minm}h_{desm}O₁.....O₇

A - Animal

C - Controle

X - Grupo Experimental

O - Observação

h_{min}- Enxerto Ósseo Humano Liofilizado Mineralizado

h_{des}- Enxerto Ósseo Humano Liofilizado Desmineralizado

h_{minm} – Enxerto Ósseo Humano Liofilizado Mineralizado + Membrana

h_{desm} – Enxerto Ósseo Humano Liofilizado Desmineralizado + Membrana

3.2 PROBLEMAS

a) Qual o potencial de osteocondução do enxerto ósseo humano desmineralizado liofilizado no modelo animal rato?

b) Qual o potencial de osteocondução do enxerto ósseo humano mineralizado liofilizado no modelo animal rato?

c) Qual a influência na cicatrização óssea, da utilização da técnica de osteopromoção com membrana biológica?

d) Qual o enxerto ósseo mostrou os melhores resultados no que diz respeito a neoformação óssea?

e) Será que o modelo animal rato, é adequado para avaliação de cicatrização óssea?

3.3 HIPÓTESES

a) O enxerto ósseo humano desmineralizado e mineralizado liofilizado apresentam adequado potencial de osteocondução.

b) A utilização da membrana biológica promove melhores resultados de cicatrização óssea.

c) O enxerto ósseo humano desmineralizado apresenta melhores resultados no que diz respeito a neoformação óssea.

d) O modelo animal proposto é adequado para avaliação de cicatrização óssea.

3.4 CONFIGURAÇÃO DAS AMOSTRAS

Esta pesquisa foi realizada após a aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, conforme protocolo 0025/4 (Anexo A).

Foram respeitados os Princípios Éticos de Experimentação Animal postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1990 apud GOLDIM, 1997), bem como as Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais (Anexo B) previstas na lei 6.638 de 8 de maio de 1979 (BRASIL, 1988).

Para a fase experimental desta pesquisa, foram utilizadas 35 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar (BERNARDI, 1994), com três meses de idade, no momento da cirurgia.

3.5 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os animais foram divididos em seis grupos de seis animais cada um. Dentro de cada grupo os animais foram subdivididos em 2 grupos de três animais cada um e mantidos conforme tal subdivisão, três a três, em gaiolas tipo caixa plástica em polipropileno, de tamanho grande (60 cm de comprimento X 50 cm de largura X 22 cm de altura), sendo todos os procedimentos de manipulação, alimentação e limpeza realizados por pessoal treinado em bioterismo (MERUSSE; LAPICHIK, 1996).

Os períodos de observação determinados foram de 07 dias para o 1º grupo, 14 dias para o 2º, 21 para o 3º, 30 para o 4º, 60 para o 5º e 90 dias para o 6º grupo (quadro 1).

Todos os animais ficaram alojados sob condições satisfatórias, com temperatura e umidade relativa adequadas, no Biotério da Fundação Estadual para Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (FEPPS).

As gaiolas foram etiquetadas e identificadas com o número do grupo, nome do subgrupo, data de nascimento dos animais, pesquisador e orientador responsável pelo experimento.

A alimentação foi feita à base de ração comercial e água *ad libitum* e a limpeza das gaiolas foi realizada três vezes por semana, com água corrente, sabão e desinfetantes.

Grupo	Subgrupo sem Membrana	Subgrupo com Membrana
I (7 dias)	3 animais	3 animais
II (14 dias)	3 animais	3 animais
III (21 dias)	3 animais	3 animais
IV (30 dias)	3 animais	3 animais
V (60 dias)	3 animais	3 animais
VI (90 dias)	3 animais	3 animais

Quadro 1 – Divisão e Subdivisão dos grupos da pesquisa
 Fonte: Dados da pesquisa (2005)

3.6 CARACTERÍSTICAS DOS MATERIAIS UTILIZADOS

Foram utilizados nesta pesquisa três tipos de biomateriais distintos: a) Enxerto Ósseo Humano Mineralizado Liofilizado, com o nome comercial FDBA da U. S. Tissue & Cell® (Figura 1). Apresenta-se na forma de grânulos com dimensões variando entre 300 e 500 μm , esterilizados por raios Gama e embalados em frascos de vidro transparente e lacrado contendo 1cc; b) Enxerto Ósseo Humano Desmineralizado Liofilizado, com o nome comercial DFDBA da U. S. Tissue & Cell® (Figura 2). Apresenta-se na forma de grânulos com dimensões variando entre 300 e 500 μm , esterilizados por raios Gama e embalados em frascos de vidro transparente e lacrado contendo 1cc. c) Membrana Absorvível de Cortical Óssea Bovina Liofilizada com nome comercial Gen-derm® (Figura 3 e 4).



FIGURA 1 - FDDBA
Fonte: Dados da pesquisa (2005)



FIGURA 2 - DFDBA
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

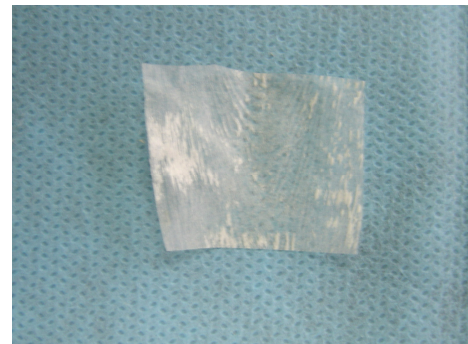
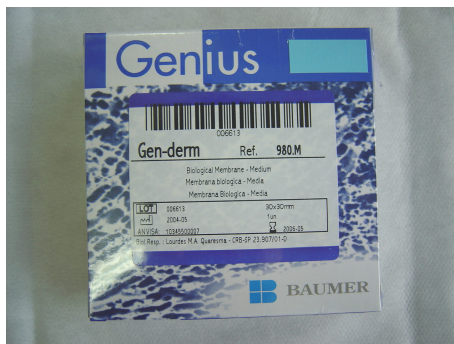


FIGURA 3 e 4 - Membrana Absorvível de Cortical Óssea Bovina Liofilizada
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

3.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

As cirurgias foram realizadas no laboratório de cirurgia experimental do Biotério da Fundação Estadual para Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul, utilizando-se instrumental padronizado para os seis grupos, esterilizados por calor seco, bem como equipamento de proteção individual.

Após pesagem, os animais foram induzidos à anestesia geral com 7mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (Anasedan®⁷) e 65mg/Kg de Cloridrato de Quetamina (Dopalen®⁸).

Uma vez induzidos à anestesia geral, os animais foram submetidos à tricotomia com *tesoura reta cirúrgica* e lâmina de barbear da região fronto-parietal e antissepsia com iodoform alcoólico a 2% (BRASIL, 1999).

Com o animal posicionado em decúbito ventral, o acesso a calota craniana foi obtido por meio de incisão bicoronal de 2,5 cm de extensão realizada na pele e tecido subcutâneo, no centro da região fronto-parietal, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 montada num cabo nº 3.

A pele e o tecido subcutâneo foram divulsionados com as pontas rombas de uma tesoura tipo *Metzemaum*, até que o periósteo fosse exposto. Em seguida o periósteo também foi incisado com a lâmina de bisturi nº 15 montada em cabo de bisturi nº 3.

Após o descolamento do periósteo foi realizada a ostectomia, com brocas esféricas nº 10 adaptadas em peça de mão, montadas em motor de baixa rotação (Figura 5), e sob irrigação constante com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Foi utilizada uma broca, com devida esterilização, a cada dois ratos, para evitar perda de corte da mesma e aquecimento do sítio cirúrgico.

⁷ Anasedan®, Agribands do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

⁸ Dopalen®, Agribands do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

Foram realizadas três perfurações na calota craniana de cada animal, duas na porção mais posterior e uma na anterior. A perfuração posterior esquerda foi preenchida com Enxerto Ósseo Humano Desmineralizado Liofilizado; a perfuração posterior direita com Enxerto Ósseo Humano Mineralizado Liofilizado e a perfuração anterior foi preenchida com o coágulo sangüíneo do animal, servindo dessa forma como grupo controle (Figura 6).

Os biomateriais foram previamente aglutinados com solução salina estéril a 0,9% e introduzidos nas perfurações com a utilização do lado convexo de uma *cureta de dentina* nº 4.

Em três animais de cada grupo, as perfurações preenchidas com os biomateriais foram cobertas pela Membrana Absorvível de Cortical Óssea Bovina Liofilizada (Gen-derm®), a qual também foi previamente hidratada com solução salina estéril a 0,9%. Antes da colocação da membrana foi realizada uma sutura contínua em U, no plano cutâneo, sem realização do nó, mantendo os tecidos moles afastados, permitindo acesso para a colocação desse material (Figura 7). Após a devida adaptação da membrana o nó do ponto foi realizado, conferindo assim sua correta estabilização (Figura 8).

A sutura foi complementada com dois pontos interrompidos simples, um de cada lado da sutura contínua (Figura 8). O fio utilizado foi monofilamentar de nylon preto (5-0), de 45 cm de comprimento, montado em agulha atraumática semicircular de 1,5 cm de comprimento e seção triangular. Para auxiliar a preensão dos tecidos, foi utilizada uma pinça denteada tipo *Adson*.

Durante o pós-operatório imediato foi administrado, junto a água dos animais, o antiinflamatório cetoprofeno a 10% (Ketofen®⁹) na dose de 3 mg/Kg de peso corporal. Todos os animais foram acompanhados por um médico veterinário durante o pré, trans e pós-operatório. Não foram constatados sinais clínicos de complicações pós-operatórias em nenhum dos ratos.



FIGURA 5 – Aspecto transoperatório do acesso cirúrgico e osteotomia
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

⁹ Ketofen®, Laboratório Neo Química Comércio e Indústria Ltda.

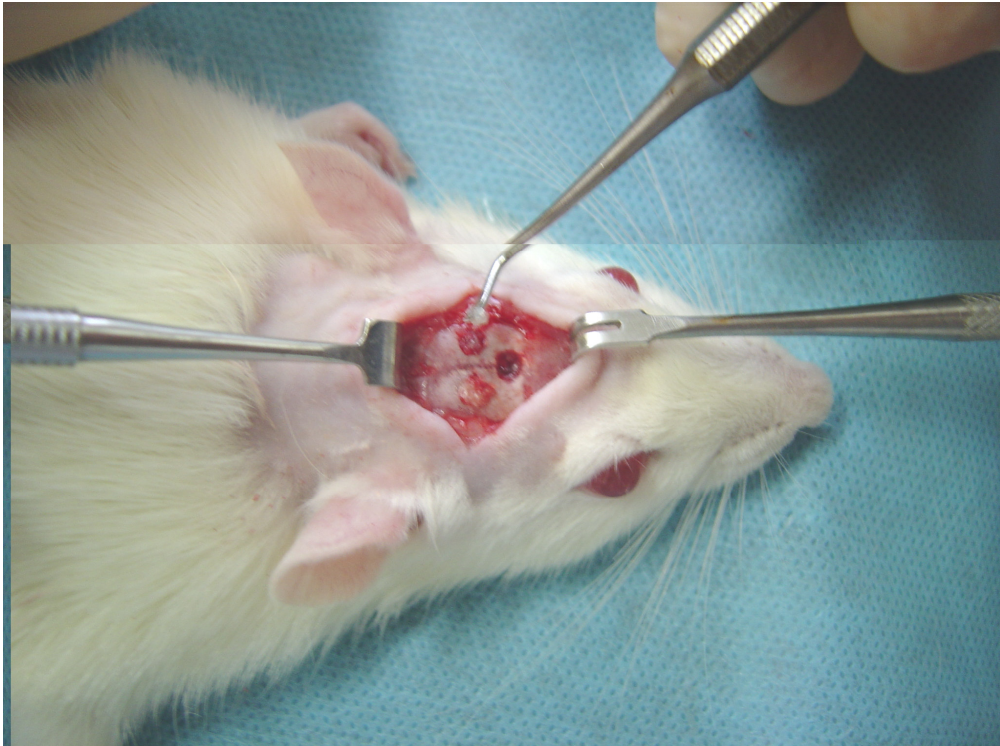


FIGURA 6 – Aspecto transoperatório das perfurações preenchidas pelos materiais
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

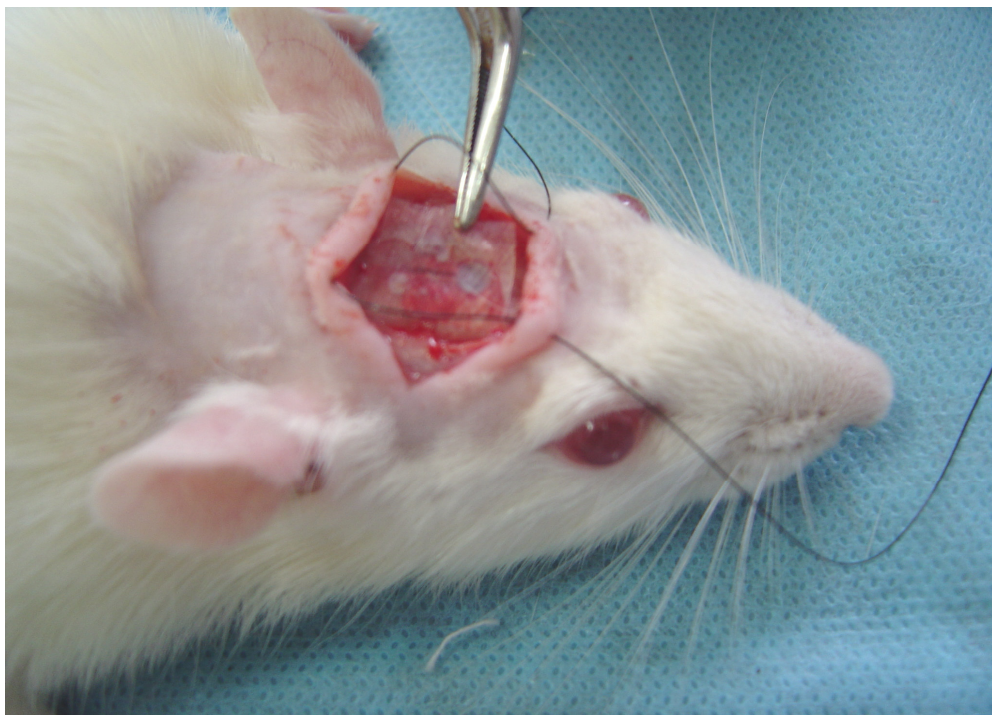


FIGURA 7 – Aspecto transoperatório da instalação da membrana e sutura em U
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

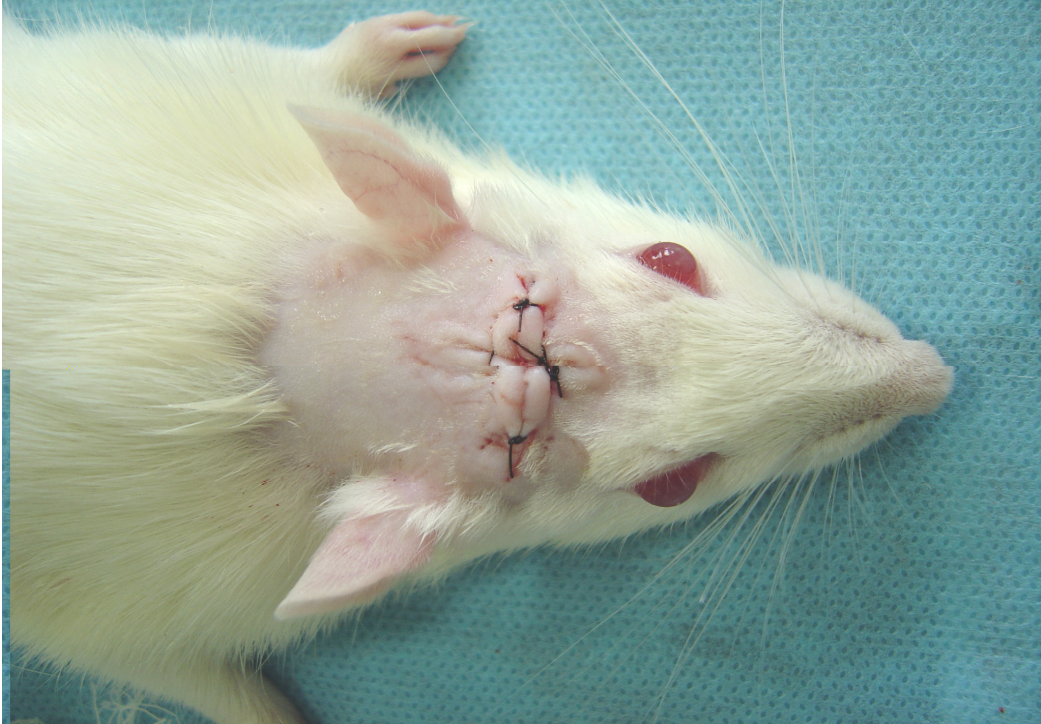


FIGURA 8 – Aspecto transoperatório da sutura em U e sutura interrompida
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

3.8 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS

O sacrifício dos animais, aos 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias, foi realizado por inalação e intoxicação com dióxido de carbono (SOUZA, 1996), com o auxílio de uma câmara fechada, até a constatação da morte dos mesmos. Após, realizou-se acesso a calota craniana através de uma incisão transversal na região cervical, na base do occipital, seguida pela dissecação da pele e tecido subcutâneo e retirada da calota com o auxílio de brocas cilíndricas nº 701 adaptadas em peça de mão, montadas em motor de baixa rotação, e sob irrigação constante com solução de cloreto de sódio a 0,9%.

As peças foram colocadas em vidros previamente preparados e etiquetados, contendo solução de formalina tamponada a 10%. Após a fixação por um período de 48 horas, as peças foram encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e submetidas à descalcificação por solução de ácido nítrico aquoso a 5%. Após a descalcificação, para facilitar a obtenção dos cortes histológicos, com auxílio de uma lâmina de micrótomo, a peça foi dividida em duas porções: uma contendo as perfurações preenchidas com Enxerto Ósseo Humano Mineralizado Liofilizado e coágulo sanguíneo e outra contendo Enxerto Ósseo Humano Desmineralizado Liofilizado, além da presença da Membrana Biológica, conforme subgrupos já citados (Figura 9). Após processamento laboratorial de rotina, os cortes das peças foram realizados com micrótomo no sentido transversal da calota com espessura de 6 μm . As lâminas histológicas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE).

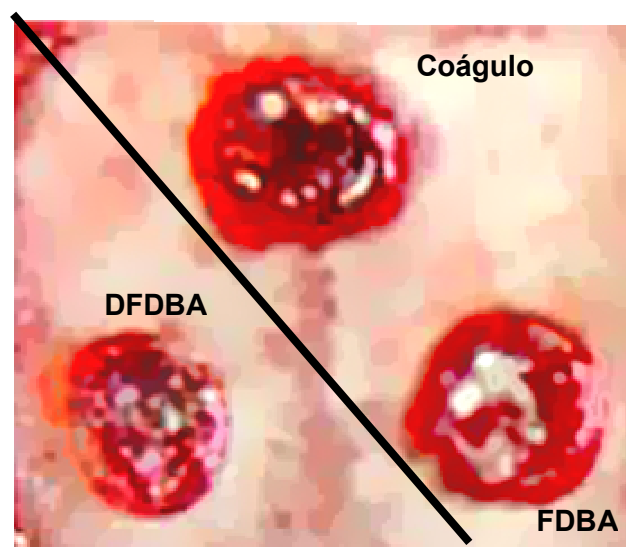


FIGURA 9 – Divisão da peça em duas porções
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

3.9 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E ESTUDO MICROSCÓPICO

O estudo microscópico foi baseado na mensuração da proporção de osso neoformado no interior das três perfurações ósseas e do número de células gigantes multinucleadas relacionadas com os biomateriais. A análise histológica e histomorfométrica foi realizada através de sistema de processamento e análise de imagem que consistia de:

- a) Microscópio Óptico, marca Olympus BX 50
- b) Câmera Capturadora de Imagem, marca Olympus, modelo DXC 107A
- c) Microcomputador Compaq com Processador Pentium 4, 128 de RAM
- d) Software Image Pro-Plus 4.5.1

De cada lâmina, a área selecionada para análise ficava circunscrita ao campo de captura da imagem. Sob um foco com clareza de campo, a imagem no microscópio, com aumento de 40X era capturada pela câmara de vídeo e transportada para a tela do computador.

Após a aquisição da imagem, realizou-se, com o auxílio do mouse, a delimitação do contorno das regiões desejadas (osso neoformado), e o valor dessas áreas, em μm^2 , foi quantificado pelo software (Apêndice A). Foi quantificada também

a área inicial de cada defeito (Apêndice B) para que pudéssemos obter a proporção de osso neoformado:

$$\text{Proporção de Osso Neoformado} = \frac{\text{Área de Osso Neoformado}}{\text{Área Total do Defeito}}$$

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados obtidos, construiu-se um modelo de *Análise de Variância* (ANOVA), sendo comparados os seis grupos (períodos), materiais utilizados e presença ou não de membrana em relação a variável proporção de osso neoformado. Como teste complementar a ANOVA foi utilizado o *Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni*, avaliando quais as médias que variavam significativamente entre si. Foi avaliado também se o tipo de material e a presença ou não de membrana foi estatisticamente significante dentro de cada grupo.

Para a realização do teste estatístico, utilizou-se o software SPSS 11.0 for Windows, tendo-se adotado como nível de significância 0.05 ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados apresentados no gráfico 1 expressam quantitativamente as médias das proporções de tecido ósseo neoformado, com os três materiais de preenchimento, nos diferentes grupos do experimento. Através dos resultados da Análise de Variância (Anova), verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre os materiais estudados nos períodos de 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias ($p \leq 0,05$). Apesar de não ter sido detectada esta diferença, nota-se uma evidente maior neoformação óssea nos orifícios que foram enxertados com DFDBA.

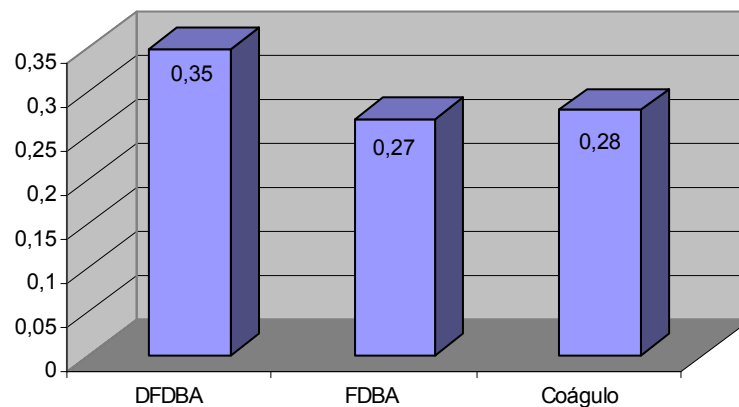


GRÁFICO 1 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento nos grupos estudados
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

Os resultados apresentados no gráfico 2 expressam quantitativamente as médias das proporções de tecido ósseo neoformado nos subgrupos com membrana e sem membrana nos diferentes períodos de observação. Através dos resultados da Análise de Variância (Anova), verifica-se existir diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos ($p \leq 0,05$).

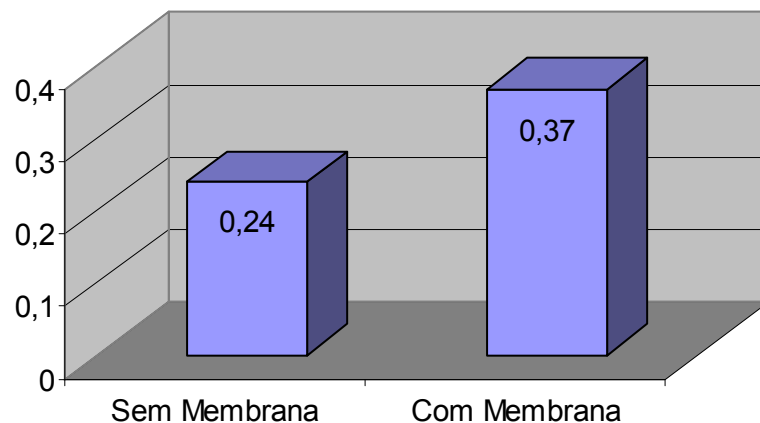


GRÁFICO 2 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado de subgrupos com e sem membrana nos grupos estudados
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

A tabela 1 mostra as médias das proporções de osso neoformado, desvio padrão e intervalos de confiança de cada material de preenchimento dentro de cada grupo. A Análise de Variância (Anova), foi o teste estatístico utilizado para comparar as médias de proporção de tecido ósseo neoformado. Na comparação verifica-se que, o único grupo onde a diferença das médias se mostrou estatisticamente significativa foi o grupo 3.

Tabela 1 – Média das proporções de osso neoformado dos materiais nos diferentes intervalos de tempo

Grupo	Média ± desvio-padrão	Intervalo de Confiança de 95%	Número de observações	Valor – p*
Grupo 1				0,2
Coágulo	0,05 ± 0,03	-0,14 – 0,24	5	
FDBA	0,15 ± 0,24	0,07 – 0,44	5	
DFDBA	0,26 ± 0,23	0,07 – 0,45	5	
Grupo 2				0,3
Coágulo	0,18 ± 0,11	0,08 – 0,34	5	
FDBA	0,16 ± 0,15	0,11 – 0,37	5	
DFDBA	0,33 ± 0,14	0,21 – 0,46	5	
Grupo 3				0,006[#]
Coágulo	0,28 ± 0,83	0,19 – 0,38	6	
FDBA	0,17 ± 0,91	0,07 – 0,24	6	
DFDBA	0,37 ± 0,89	0,29 – 0,45	6	
Grupo 4				0,1
Coágulo	0,23 ± 0,91	0,09 – 0,38	4	
FDBA	0,26 ± 0,10	0,13 – 0,39	6	
DFDBA	0,38 ± 0,21	0,29 – 0,54	6	
Grupo 5				0,2
Coágulo	0,41 ± 0,17	0,29 – 0,53	5	
FDBA	0,27 ± 0,54	0,15 – 0,39	5	
DFDBA	0,39 ± 0,13	0,18 – 0,40	6	
Grupo 6				0,3
Coágulo	0,53 ± 0,16	0,39 – 0,67	6	
FDBA	0,39 ± 0,15	0,27 – 0,55	6	
DFDBA	0,41 ± 0,12	0,25 – 0,53	5	

*teste ANOVA (p≤0,05)

Estatisticamente Significante

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

Os gráficos de números 3 a 8 ilustram a comparação entre os materiais de preenchimento dentro de cada grupo do experimento.

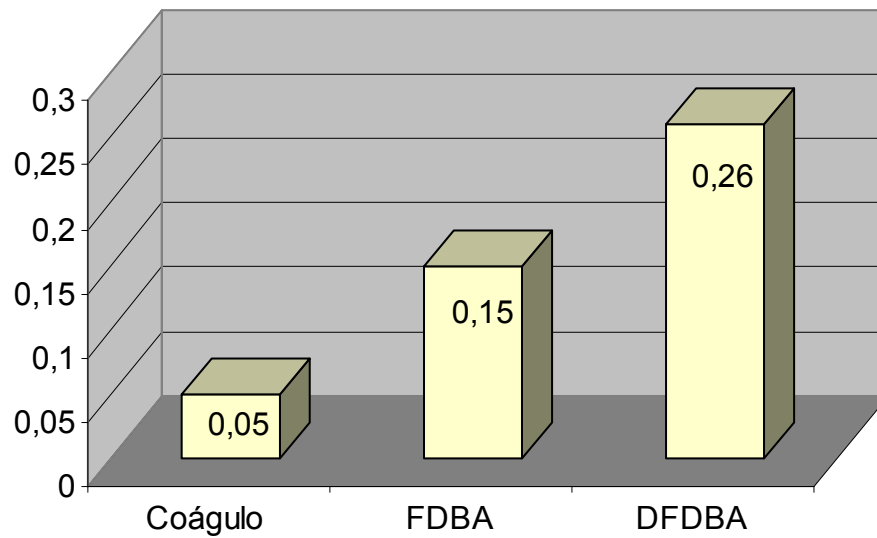
Grupo 1

GRÁFICO 3 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 1
Fonte: Dados da pesquisa (2005)

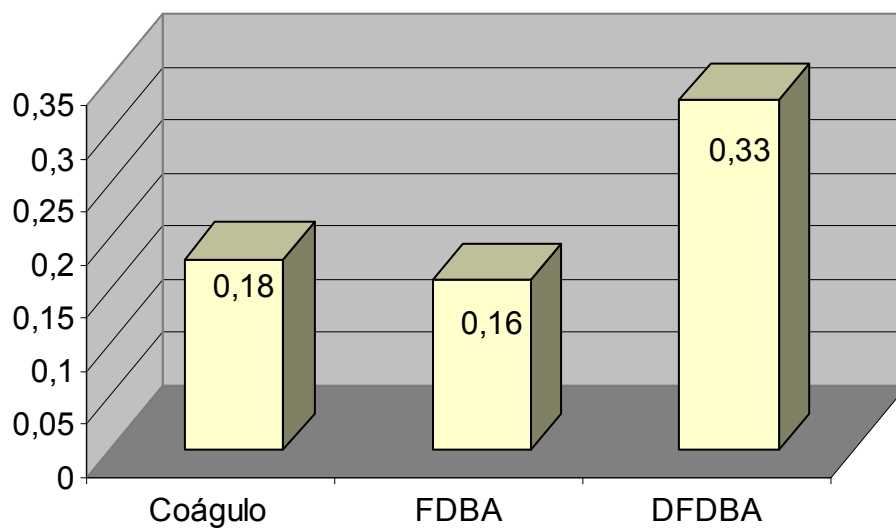
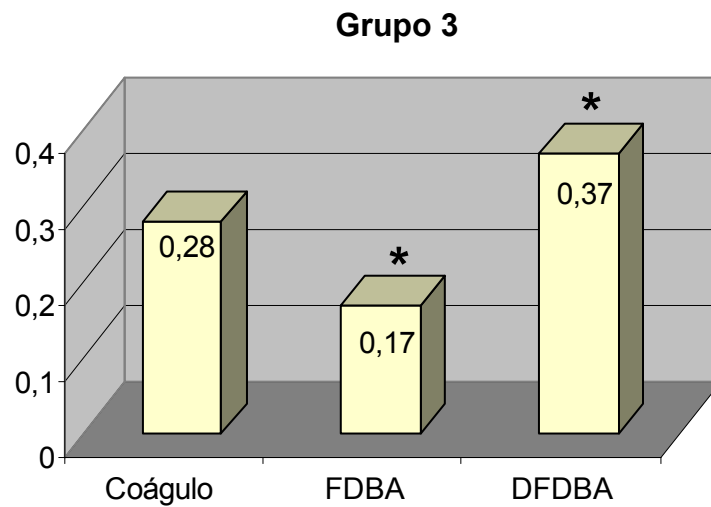
Grupo 2

GRÁFICO 4 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 2
Fonte: Dados da pesquisa (2005)



* Médias com diferença estatística significativa

GRÁFICO 5 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 3

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

No grupo 3, para a identificação de quais médias apresentavam diferenças estatisticamente significante foi realizado o teste estatístico de comparações múltiplas de Bonferroni, onde observou-se diferenças entre os materiais FDBA e DFDBA.

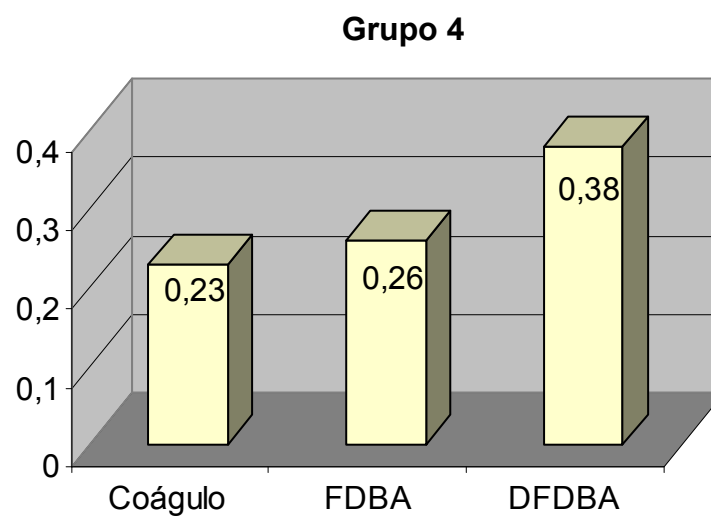


GRÁFICO 6 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 4

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

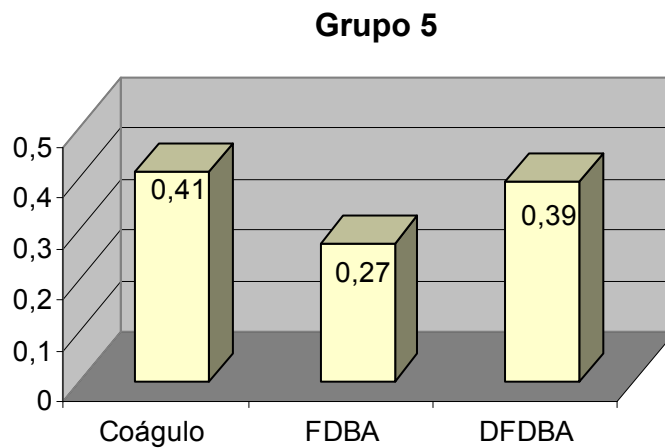


GRÁFICO 7 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 5
 Fonte: Dados da pesquisa (2005)

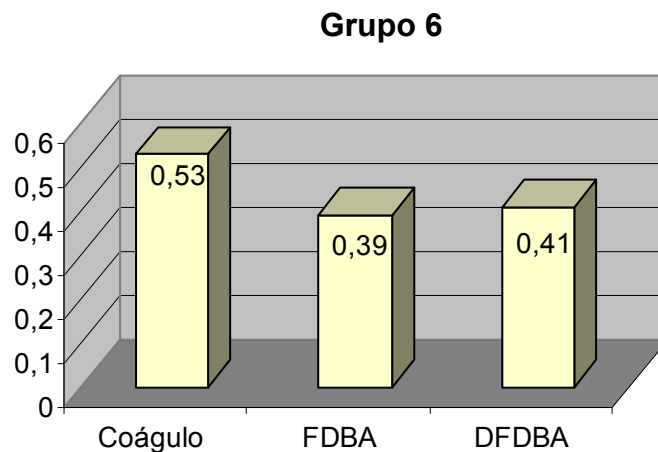


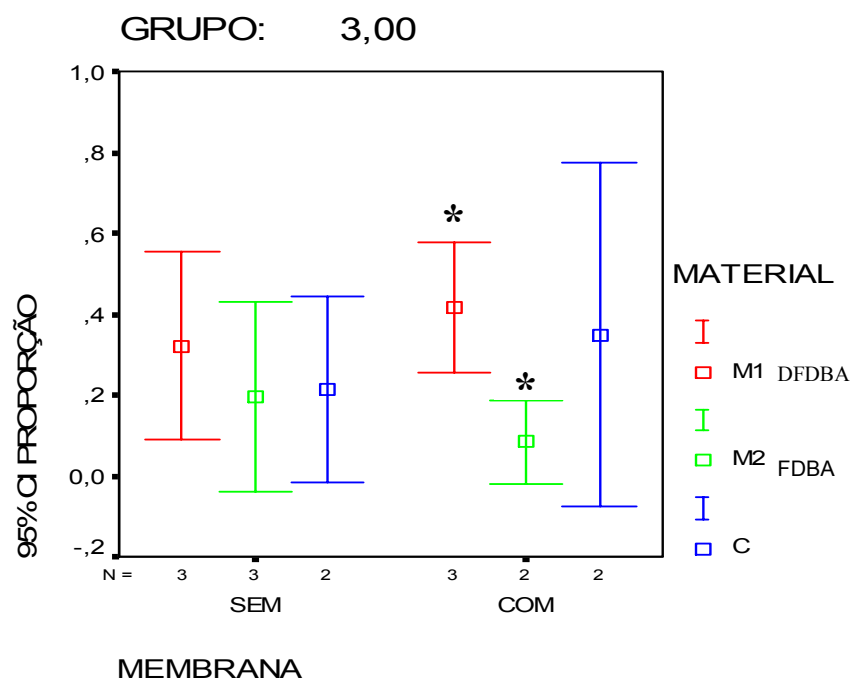
GRÁFICO 8 – Comparação das médias das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 6
 Fonte: Dados da pesquisa (2005)

Os gráficos 7 e 8, diferentemente dos anteriores, ilustram uma maior média de proporção de tecido ósseo neoformado nas perfurações que foram preenchidas pelo coágulo.

Com o intuito de elucidar se a diferença estatisticamente significativa encontrada no grupo 3 (Gráfico 5) mostrava alguma relação com a presença ou não

da membrana biológica, realizou-se teste estatístico de análise de variância (Anova) e comparações múltiplas pelo método de Bonferroni para $p \leq 0,05$.

O gráfico 9 ilustra as médias de proporção de tecido ósseo neoformado do grupo 3, com os três materiais de preenchimento com e sem a utilização de membrana biológica.



* Médias com diferença estatística significativa.

GRÁFICO 9 – Comparação dos intervalos de confiança das proporções de osso neoformado com diferentes materiais de preenchimento no grupo 3, com e sem a utilização da membrana biológica

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

A diferença estatisticamente significativa encontrada no grupo 3 mostrou uma relação direta com a utilização da membrana biológica.

As figuras de números 10 a 15 mostram os resultados histológicos no grupo em que foi observada diferença estatisticamente significativa, entre as médias de

proporção de tecido ósseo neoformado, dos diferentes materiais de preenchimento (grupo 3). As figuras de número 10 a 12 representam os subgrupos onde foi utilizada a membrana biológica cobrindo os materiais.

Coágulo

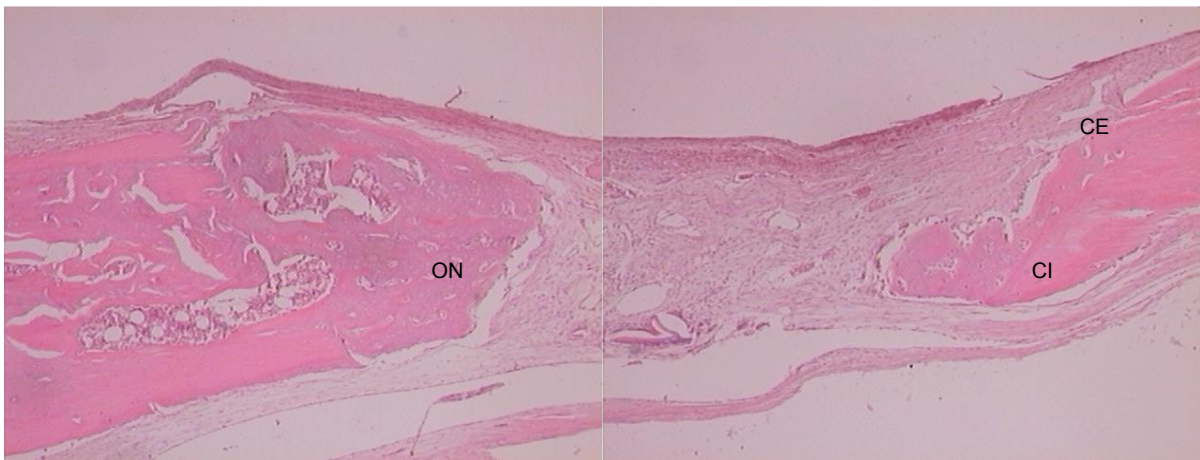


FIGURA 10 – Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo e coberta por membrana aos 21 dias. Coloração HE (40X).

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

FDBA

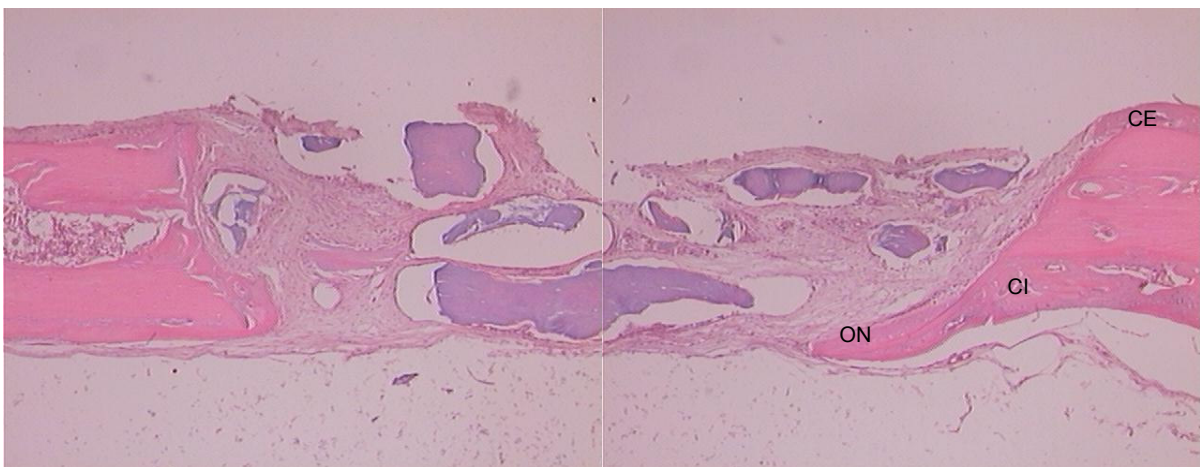


FIGURA 11 – Amostra histológica da perfuração preenchida por FDBA e coberta por membrana aos 21 dias. Coloração HE (40X).

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

DFDBA

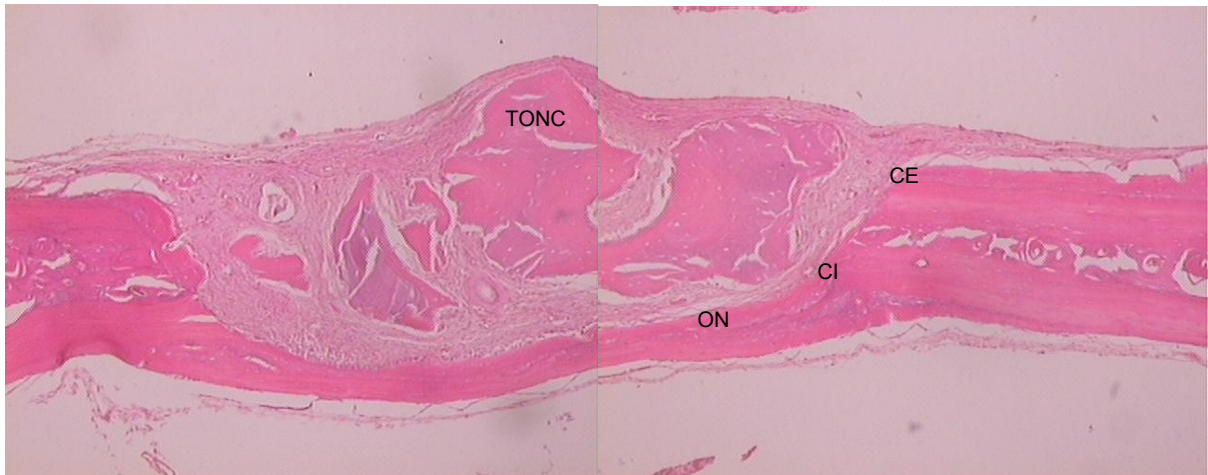


FIGURA 12 – Amostra histológica da perfuração preenchida por DFDBA e coberta por membrana aos 21 dias. Coloração HE (40X).

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

Pode-se notar nas amostras histológicas acima, uma maior neoformação óssea (ON) relacionada com a cortical interna (CI) dos defeitos em comparação com a observada na cortical externa (CE). Observa-se também, principalmente no defeito preenchido com DFDBA (fig.12), a presença de tecido ósseo neoformado localizado no centro do defeito (TONC).

As figuras 11 e 12 evidenciam a diferença de neoformação óssea entre os materiais FDDBA e DFDBA, a qual se mostrou estatisticamente significativa como já ilustrado no gráfico 5.

As figuras de número 13 a 15 representam os subgrupos onde a membrana biológica não foi utilizada.

Coágulo

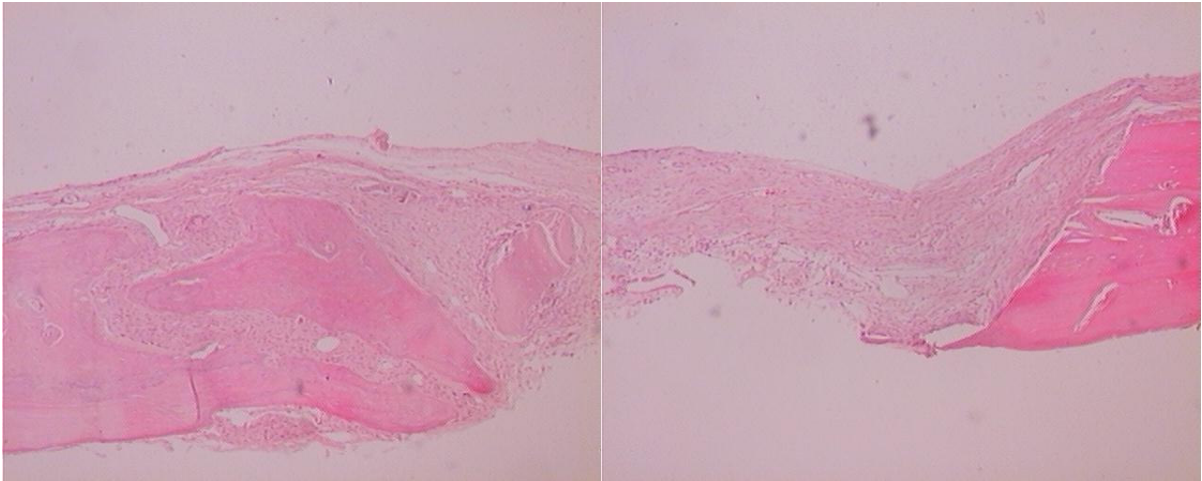


FIGURA 13 – Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo aos 21 dias. Coloração HE (40X).

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

FDDB

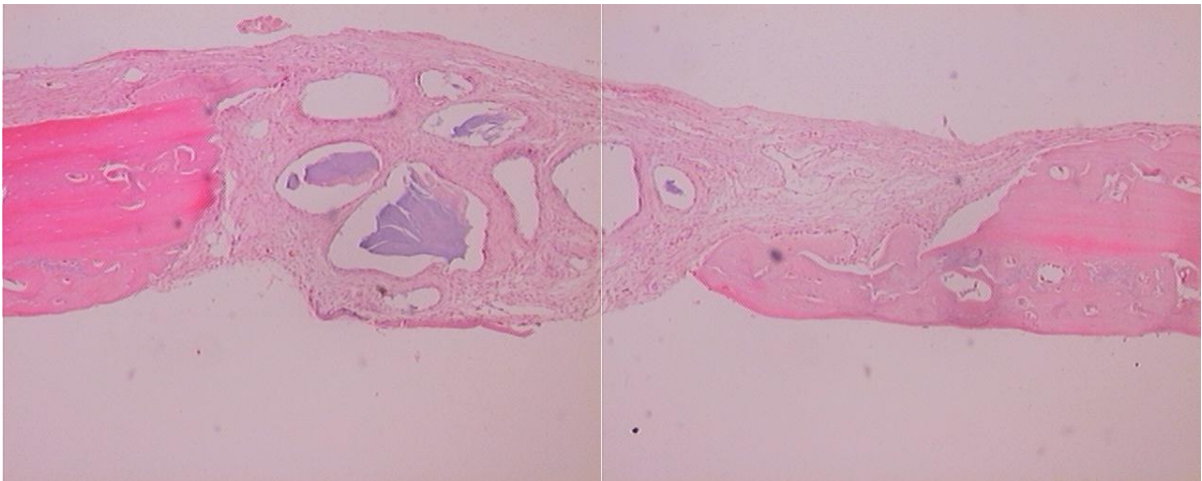


FIGURA 14 – Amostra histológica da perfuração preenchida por FDDB aos 21 dias. Coloração HE (40X).

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

DFDBA

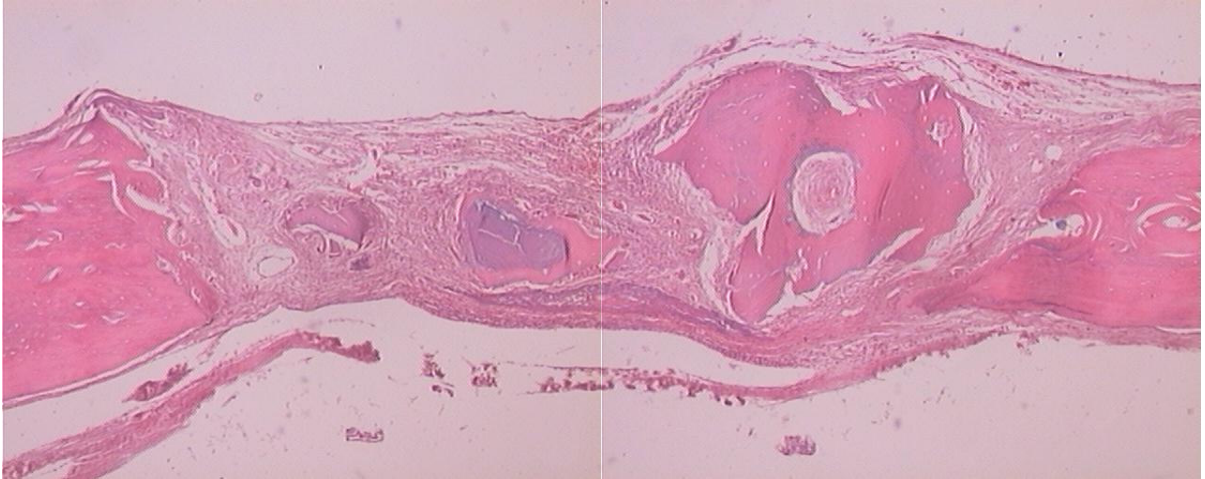


FIGURA 15 – Amostra histológica da perfuração preenchida por DFDBA aos 21 dias. Coloração HE (40X).

Fonte: Dados da pesquisa (2005)

Nota-se, nessas três amostras histológicas acima, uma menor área de tecido ósseo neoformado quando comparadas com as amostras do subgrupo onde foram utilizadas membranas, como já ilustrado no gráfico 9.

Neste estudo não foram observadas células gigantes relacionadas com as partículas do enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado e mineralizado. Esses achados histológicos, assim como os resultados microscópicos da neoformação óssea dos demais grupos do experimento podem ser visualizados no apêndice C.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A técnica cirúrgica denominada Regeneração Óssea Guiada (ROG) é utilizada para otimizar o aumento ósseo, em volume e altura, em áreas com defeitos localizados no processo alveolar.

Como a avaliação, em humanos, de materiais utilizados em regeneração óssea apresenta um questionamento ético, esforços têm sido feitos para desenvolver um modelo animal aceitável. Dessa forma, diferentes modelos animais experimentais têm sido utilizados nos estudos em ROG.

A utilização de ratos como modelo de estudo em ROG não tem sido tão freqüente como a utilização de cães (McGINNIS et al., 1998; SMUKLER; BARBOZA; BURLISS, 1995) e coelhos (AABOE et al., 1998; ITO; NAMBA; MURAI, 1998; LUNDGREN; SENNERBY; LUNDGREN, 1998; PIATTELLI et al, 1996; SCHMID et al., 1997). A fidelidade biológica dos resultados, representada pela produção de tecido ósseo com características histológicas normais, associada à necessidade de fácil aquisição dos animais, à simplicidade no desenvolvimento da técnica e ao baixo custo, levaram à escolha de ratos como modelo de estudo.

Como nesta pesquisa, Zellin, Gritli-Linde e Linde (1995) e Zahedi et al. (1998) avaliaram a ROG em ratos criando defeitos ósseos bicorticais.

O presente estudo respeita os pré-requisitos citados por Buser et al. (1993) para que ocorra o aumento e regeneração de rebordos alveolares reduzidos. Tais pré-requisitos são: criação e manutenção de espaço para a regeneração, proteção do coágulo sanguíneo formado, trepanação da cortical onde ocorrerá a regeneração e utilização de membranas como barreiras para prevenir a invasão de tecidos não osteogênicos.

Atualmente as membranas reabsorvíveis representam o material de escolha para procedimentos de ROG. Entretanto a criação e manutenção do espaço de regeneração são essenciais para que resultados favoráveis sejam obtidos com estas membranas. Isto é particularmente importante, quando a membrana não é adequadamente suportada por paredes ósseas e quando ela é posicionada acima da superfície óssea onde ocorrerá a regeneração. Nesta situação, as conseqüências do colapso da membrana incluem o comprometimento da regeneração óssea. Neste trabalho a membrana sobrepujou extensamente a área do defeito para que essa variável interveniente fosse descartada.

Assim, diversos trabalhos salientaram a importância de prevenir o colapso das membranas absorvíveis e diferentes métodos têm sido propostos para esse fim. Tais métodos incluem desde modificações estruturais reforçando as membranas (SCHMID et al., 1997), até a utilização de enxertos ósseos homogêneos (SMUKLER; BARBOZA; BURLISS, 1995), método esse que foi preconizado neste trabalho.

Concordando com Chesmel et al. (1998), foi observado que, naqueles defeitos ósseos recobertos por membrana a neoformação óssea ocorreu mais a partir das margens, diferentemente daqueles onde não foram utilizadas membranas,

ocorrendo assim, mais centralmente aos defeitos. Essa neoformação mais central pode ser atribuída a dois fatores: - ao dano térmico produzido pelas brocas durante a criação dos defeitos; - a ação de células osteoprogenitoras presentes no periósteo e duramáter que não foram isoladas pela membrana.

Foi observada maior e mais precoce neoformação óssea oriunda das corticais internas dos defeitos (figura 12,13 e 14). Essa resposta se mostra histologicamente tão evidente já que, a osteotomia dessa cortical, assim como o dano ao periósteo e tecidos moles adjacentes foram bem menores (CARVALHO et al., 2003).

Entretanto, um fato importante pode ter limitado a neoformação óssea neste estudo: o defeito ter sido recoberto apenas na sua superfície voltada para a derme, enquanto que a superfície voltada para a duramáter ficou exposta, sem recobrimento de membrana, o que pode ter permitido a invasão de tecido conjuntivo oriundo dessa região. Neste sentido, salientamos que Bosch, Melsen e Vargervik (1995) utilizaram, em defeitos bicorticais de calvária de ratos dupla membrana de ePTFE, uma na abertura tegumentar e outra na abertura epidural da lesão, evitando assim a migração celular oriunda da porção interna e externa. Nesse experimento os autores encontraram uma neoformação óssea maior no grupo com duas membranas quando comparadas ao grupo com uma única.

Já, Aaboe et al. (1998) obtiveram cicatrização óssea incompleta de defeitos ósseos críticos de calvária de coelhos com a instalação bicortical de membranas de ePTFE em um período de observação de até 6 meses. Segundo os autores essa observação indicaria uma limitação da capacidade dos osteoblastos em repopular a

área dos defeitos ósseos, mesmo perante a exclusão de fibroblastos proporcionada pelas membranas.

Todos subgrupos onde foram utilizadas membranas de cortical bovina mostraram maior proporção de osso neoformado, sendo a diferença estatisticamente significativa para aqueles que os defeitos não foram recobertos com membrana, nos grupos de 7 e 14 dias. Esse achado mostra que a membrana foi essencial para a maior neoformação óssea nos primeiros 21 dias, como já fora salientado por Herculiani et al. (2000) e Taga et al. (1997).

Embora não fosse proposição deste trabalho, observou-se a movimentação de algumas partículas do enxerto homogêneo para fora da área dos defeitos ósseos (CHESMEL et al., 1998) naqueles animais que não receberam membrana. Esta observação sugere que a proteção oferecida pela presença da membrana aumenta a estabilidade do enxerto posicionado, tal como fora proposto por Rasmusson (1998).

Neste estudo não foram observadas células gigantes relacionadas com as partículas do enxerto ósseo humano desmineralizado e mineralizado, observação essa que concorda com os achados de Becker et al. (1995) e Fu et al. (2003).

Entretanto, esses mesmos resultados podem ser confrontados com os de Pinholt et al. (1992) e Pinholt et al. (1994) que encontraram presença de encapsulação fibrosa e células gigantes multinucleadas relacionadas com as partículas de enxerto ósseo humano liofilizado. Os achados desses dois trabalhos

podem ser atribuídos ao fato do autor ter utilizado cabras e cães, respectivamente, como modelos animais e não ratos como foi utilizado nesta pesquisa.

Foi observado neste estudo, uma maior média de proporção de osso neoformado nos defeitos preenchidos por enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado aos 7, 14, 21 e 30 dias, com diferença estatisticamente significativa no grupo de 21 dias. Esse resultado pode sugerir a existência de um maior potencial osteocondutor do material (KÜBLER et al., 1993; SCHWARTZ et al., 1996). Essa diferença poderia, talvez, se mostrar estatisticamente significativa em todos os quatro grupos se a amostra do estudo fosse aumentada.

Resultados diferentes foram obtidos nos estudos realizados por Piattelli (1996), e Yukna e Vastardis (2005) onde os autores obtiveram uma maior neoformação óssea utilizando FDBA em comparação ao DFDBA. Esse achado pode estar relacionado com a ausência de potencial osteoindutor de alguns DFDBAs por apresentarem um número insuficiente de BMPs. Essa insuficiência pode estar relacionada com alguns fatores como: idade do doador, protocolo de processamento e método de esterilização utilizado pelo banco de osso, grau residual de cálcio e tamanho das partículas de enxerto (BECKER et al., 1995).

A média de proporção de osso neoformado mostrou diferença estatisticamente significativa aos 21 dias com a utilização de enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado em comparação com o grupo controle e enxerto ósseo humano liofilizado mineralizado. Essa diferença mostrou uma relação direta com a utilização da membrana biológica, de acordo com Herculiani et al. (2000). Já, Becker et al. (1992), Caplanis et al. (1997) e Caplanis et al. (1998) obtiveram resultados

diferentes quando da associação DFDBA e membrana biológica. Os autores observaram uma maior neoformação óssea quando as membranas foram utilizadas isoladamente. Esse achado pode ser justificado pela utilização de membranas não-absorvíveis (e-PTFE) e pela utilização de um modelo animal constituído de cães. Além disso a quantidade de BMPs presentes no DFDBA também pode ser questionada.

Nos períodos de observação de 60 e 90 dias foi observada uma maior neoformação óssea nas perfurações preenchidas pelo coágulo. Essa observação esta de acordo com os princípios de cicatrização óssea de defeitos não-críticos, citados por Hollinger e Kleinschmidt (1990). Por essa razão que essa perfuração foi utilizada como controle intra-animal, servindo de parâmetro de cicatrização óssea para os materiais da pesquisa. Os resultados do experimento demonstram que, em relação ao coágulo -grupo controle-, os materiais de enxerto ósseo utilizados apresentam potencial osteocondutor.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados, de acordo com a metodologia empregada neste estudo, permitiram concluir que:

a) O uso da membrana de cortical óssea bovina desmineralizada apresenta potencial para melhorar a cicatrização óssea.

b) Os materiais de enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado e mineralizado apresentam propriedades osteocondutoras.

c) Os materiais de enxerto ósseo humano liofilizado desmineralizado e mineralizado são materiais biocompatíveis.

d) O modelo animal rato se mostrou adequado para o design da pesquisa

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AABOE, M. et al. Incomplete bone regeneration of rabbit calvarial defects using different membranes. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 9, n. 5, p. 313-320, Oct. 1998.

AABOE, M.; PINHOLT, E. M.; HJORTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, London, v. 33, n. 3, p. 312-318, Oct. 1995.

BECKER, W. et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factors and insulin-like growth factor- I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 63, n. 11, p. 929-939, Nov. 1992.

_____. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barriers membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 10, n. 2, p. 143-154, Mar./Apr. 1995.

BELTRÃO, G. C. Avaliação da capacidade regenerativa do tecido ósseo, observada histologicamente, na presença da guia de regeneração tecidual-gengíflex: estudo experimental em coelhos. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 12, n. 23, p. 7-18, jun. 1997.

BERNARDI, N. Nomenclatura zoológica. In: PAPAVERO, N. **Fundamentos práticos de taxonomia zoológica**. São Paulo: UNESP, 1994. p. 169-186.

BOGLIOLO, M. C. et al. **Patologia Básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação**: referências, elaboração: NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluorethylene membranes. **Cleft Palate Craniofacial Journal**, Pittsburgh, v. 32, n. 4, p. 311-317, July 1995.

BOYNE, P. J.; MIKELS, T. E. Restoration of alveolar ridge by intramandibular transposition osseous grafting. **Journal of Oral Surgery**, Chicago, v. 26, n. 9, p. 569-576, Sept. 1968.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da república federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa de controle de infecção hospitalar: recomendações gerais**. 1999. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/doc/pt261698.doc>>. Acesso em: 5 jun. 2005.

BURKITT, P. R.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. Tecidos esqueléticos. In: _____. **Weather histologia funcional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. cap. 10. p. 173-186.

BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. Scientific background of guided bone regeneration. In: _____. **Guided bone regeneration implant dentistry**. Chicago: Quintessence, 1994. p. 33-48.

BUSER, D. et al. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration: 1 surgical procedure in the maxilla. **International Journal of Periodontics Restorative Dentistry**, Carol Stream, v. 13, n. 1, p. 29-45, Feb. 1993.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 1979.

CAPLANIS, N. et al. Effects of allogenic freeze-dried demineralized bone matrix on guided tissue regeneration in dogs. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 69, n. 8, p. 851-856, Aug. 1998.

_____. Effects of allogenic, freeze-dried, demineralized bone matrix on guided bone regeneration in supra-alveolar peri-implant defects in dogs. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 12, n. 5, p. 634-642, Sept./Oct. 1997.

CARVALHO, A. C. P. et al. Membrana óssea descalcificada implantada em contato com osso e em tecido conjuntivo subcutâneo: análise histológica em ratos. **Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implantes**, Curitiba, v. 10, n. 38, p. 137-141, abr./jun. 2003.

CHEMEL, K. et al. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 56, n. 7, p. 857-863, July 1998.

CONSOLARO, A. et al. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado "Osseobond"[®] e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado- Estudo microscópico em tibia de ratos. **Revista Brasileira de Implantodontia**, Niterói, v. 4, n. 1, p. 8-14, jan./fev. 1997.

DAHLIN, C. et al. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 4, n. 1, p. 19-25, Spring 1989.

DRURY, G. I.; YUKNA, R. A. Histological evaluation of combining tetracycline and allogenic freeze-dried bone on bone regeneration in experimental defects in baboons. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 62, n. 11, p. 652-658, Nov. 1991.

ELLIS III, E. Reconstrução cirúrgica dos defeitos na mandíbula. In: PETERSON, L. J. et al. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p. 606-616.

FU, E. et al. Effects of low: dose cyclosporin on osteogenesis of human demineralized bone grafts in a surgically created mandibular defects in rats. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 74, n. 8, p. 1136-1142, Aug. 2003.

GARG, A. K. Grafting materials in repair and restotation. In: LINCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. **Tissue engineering**: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago: Quintessence, 1999. cap. 5. p. 83-101.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em saúde**: leis, normas e diretrizes. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

HARDWICK, R.; HAYES, B. K.; FLYNN, C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 66, n. 6, p. 495-505, June 1995.

HERCULIANI, P. P. et al. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Revista Brasileira de Implantodontia**, Niterói, v. 6, n. 2, p. 7-14, abr./jun. 2000.

HOLLINGER, J. O.; BUCK, D. C.; BRUDER, S. P. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In: LINCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. **Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Chicago: Quintessence, 1999. cap. 2. p. 17-53.

HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, Boston, v. 1, n. 1, p. 60-68, Jan. 1990.

HURZELER, M. B. et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 27, n. 4, p. 315-320, Aug. 1998.

ITO, K.; NAMBA, K.; MURAI, S. Effects of bioabsorbable and non-resorbable barrier membranes on bone augmentation in rabbit calvaria. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 69, n. 11, p. 1229-1237, Nov. 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

KLEPP, M. et al. Histologic evaluation of demineralized freeze-dried bone allografts in barrier membrane covered periodontal fenestration wounds and ectopic sites in dogs. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 31, n. 7, p. 534-544, July 2004.

KÜBLER, N. et al. Osteoinductive, morphologic and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogenic human bone. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 51, n. 11, p. 1346-1357, Nov. 1993.

LEKOVIC, V. et al. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 69, n. 9, p. 1044-1049, Sept. 1998.

LUNDGREN, A. K.; SENNERBY, L.; LUNDGREN, D. Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 135-140, Apr. 1998.

MARZOLA, C. et al. Implantes de bioapatita+osseobond+membrana reabsorvível dentoflex+aglutinante dentoflex. Apresentação de casos clínicos cirúrgicos. **Revista Brasileira de Ciências Estomatológicas**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 51-63, 1996.

_____. Membrana reabsorvível de osso liofilizado: sua utilização na proteção de feixe vâsculo-nervoso. Apresentação de casos clínicos cirúrgicos. **BCI- Revista Brasileira de Implantodontia**, Niterói, v. 3, n. 4, p. 22-28, 1997.

McGINNIS, M. et al. Comparison of resorbable and nonresorbable guided bone regeneration materials: a preliminary study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 13, n. 1, p. 30-35, Jan./Feb. 1998.

MATZENBACHER, S. A. et al. In vivo effectiveness of a glycerol-compounded demineralized freeze-dried bone xenograft in the rat calvarium. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 74, n. 11, p. 1641-1646, Nov. 2003.

MELLONIG, J. T. Freeze-dried bone allografts in periodontal reconstructive surgery. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 35, n. 5, p. 505-520, July, 1991.

_____. Osseous grafts and periodontal regeneration. In: POLSON, A. **Periodontal regeneration**. Chicago: Quintessence, 1994. p. 71-102.

MELLONIG, J. T.; BOWERS, G.; COTTON, W. R. Comparison of bone graft materials: part II: new bone formation with autografts and allografts: a histological evaluation. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 54, n. 3, p. 297-302, Nov. 1981.

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHIK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual ara técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: H. A. Rotschild, 1996. p. 15-25.

MUNDELL, R. D. et al. Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 51, n. 9, p. 1004-1012, Sept. 1993.

MURRAY, G.; HOLDEN, R.; ROSCHLAU, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. **American Journal of Surgery**, New York, v. 93, n. 3, p. 385-387, Mar. 1957.

NAAMAN, N. B.; OUHAYOUN, J. P. Bone formation with discs or particles of natural coral skeleton plus polyglactin 910 mesh: histologic evaluation in rat calvaria. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 13, n. 1, p. 115-120, Jan./Feb. 1998.

NYMAN, S. et al. New attachment formation by guided tissue regeneration. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 22, n. 3, p. 252-254, May 1987.

PIATTELLI, A. et al. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. **Biomaterials**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 791-796, Apr. 1996.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 21, n. 6, p. 383-388, May 2003.

PINHOLT, E. M. et al. Alveolar ridge augmentation by osteoconductive materials in goats. **Scandinavian Journal Dental Research**, Stocolm, v. 100, n. 6, p. 361-365, Dec. 1992.

_____. Titanium implant insertion into dog alveolar ridges augmented by allogenic material. **Clinical of Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 5, n. 4, p. 213-219, Dec. 1994.

PINTO, L. P. et al. Regeneração óssea guiada de alvéolos de extração dentária: por que fazê-la? **Revista Brasileira de Implantodontia**, Niterói, v. 6, n. 3, p.9-12, jul./set. 2000.

PINTO, L. P.; BRITO, J. H. M.; OLIVEIRA, M. G. Avaliação histológica do processo de reparo ósseo na presença da proteína morfogenética óssea (Gen-Pro[®]) associada com uma membrana biológica (Gen-Derm[®]). **Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implantes**, Curitiba, v. 10, n. 37, p. 25-32, jan./fev. 2003.

RABIE, A. B. M. et al. The effect of demineralized bone matrix on the healing of intramembranous bone grafts in rabbit skull defects. **Journal of Dentistry Research**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1045-1051, Apr. 1996.

RASMUSSEN, I. **On implant integration in membrane-induced and grafted bone**. 1998. Thesis (PhD)–Department of Biomaterials/Handicap Research, Institute for Surgical Sciences, Göteborg University, Göteborg, 1998.

ROSEMBERG, A. E. Sistema esquelético e tumores de partes moles: ossos. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, 1996, p. 1094-1112.

SCHENK, R. K. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. **Regeneração óssea guiada na implantodontia**. São Paulo: Quintessence Books, 1996. p. 49-100.

SCHMID, J. et al. Blood-filled spaces with and without filler materials in guided bone regeneration. A comparative experimental study in the rabbit using bioresorbable membranes. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 8, n. 2, p. 75-81, Apr. 1997.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Chicago, v. 23, n. 205, p. 299-308, Apr. 1986.

SCHWARTZ, Z. et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 67, n. 9, p. 918-926, Nov. 1996.

SMUKLER, H.; BARBOZA, E. P.; BURLISS, C. A new approach to regeneration of surgically reduced alveolar ridges in dogs: a clinical and histologic study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 10, n. 5, p. 537-551, Sept./Oct. 1995.

SOUZA, N. L. Eutanásia. In: COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: H. A. Rotschild, 1996. p. 171-177.

SPIEKERMANN, H. Regeneração óssea dirigida. In: _____. **Implantologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 329-342.

TAGA, E. M. Biomateriais para uso em clínica médica odontológica. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, Curitiba, v. 3, n. 1, p.59-70, jul./ago. 1996.

TAGA, R. et al. Destino da membrana de cortical óssea bovina colocada em posição subperiosteal na calvária de cobaia. **Revista Brasileira de Implantodontia**, Niterói, v. 3, n. 6, p. 24-29, nov./dez. 1997.

TOLEDO FILHO, J. L.; MARZOLA, C.; RODRIGUEZ SANCHEZ, M. P. R Os enxertos ósseos e de biomateriais e os implantes osseointegrados. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, Curitiba, v. 8, n. 30, p.126-143, abr./jun. 2001.

TURNER, D. W.; MELLONIG, J. T. Antigenicity of freeze-dried bone allograft in periodontal osseous defects. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 16, n. 1, p. 89-99, Jan. 1981.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, Washington, v. 150, n. 698, p. 893-899, Nov. 1965.

YUKNA, R. A.; VASTARDIS, S. Comparative evaluation of decalcified and non-decalcified freeze-dried bone allografts in rhesus monkeys: histologic findings. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 76, n. 1, p. 57-65, Jan. 2005.

ZAHEDI, S. et al. Evaluation of a diphenylphosphorylazide collagen membrane for guided bone regeneration in mandibular defects in rats. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 69, n. 11, p. 1238-1246, Nov. 1998.

ZELLIN, G.; GRITLI-LINDE, A.; LINDE, A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. **Biomaterials**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 601-609, May 1995.

ZELLIN, G.; LINDE, A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes: an experimental study using rhBPM-2 in a rat mandibular defects. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v. 35, n. 2, p. 181-190, May 1997a.

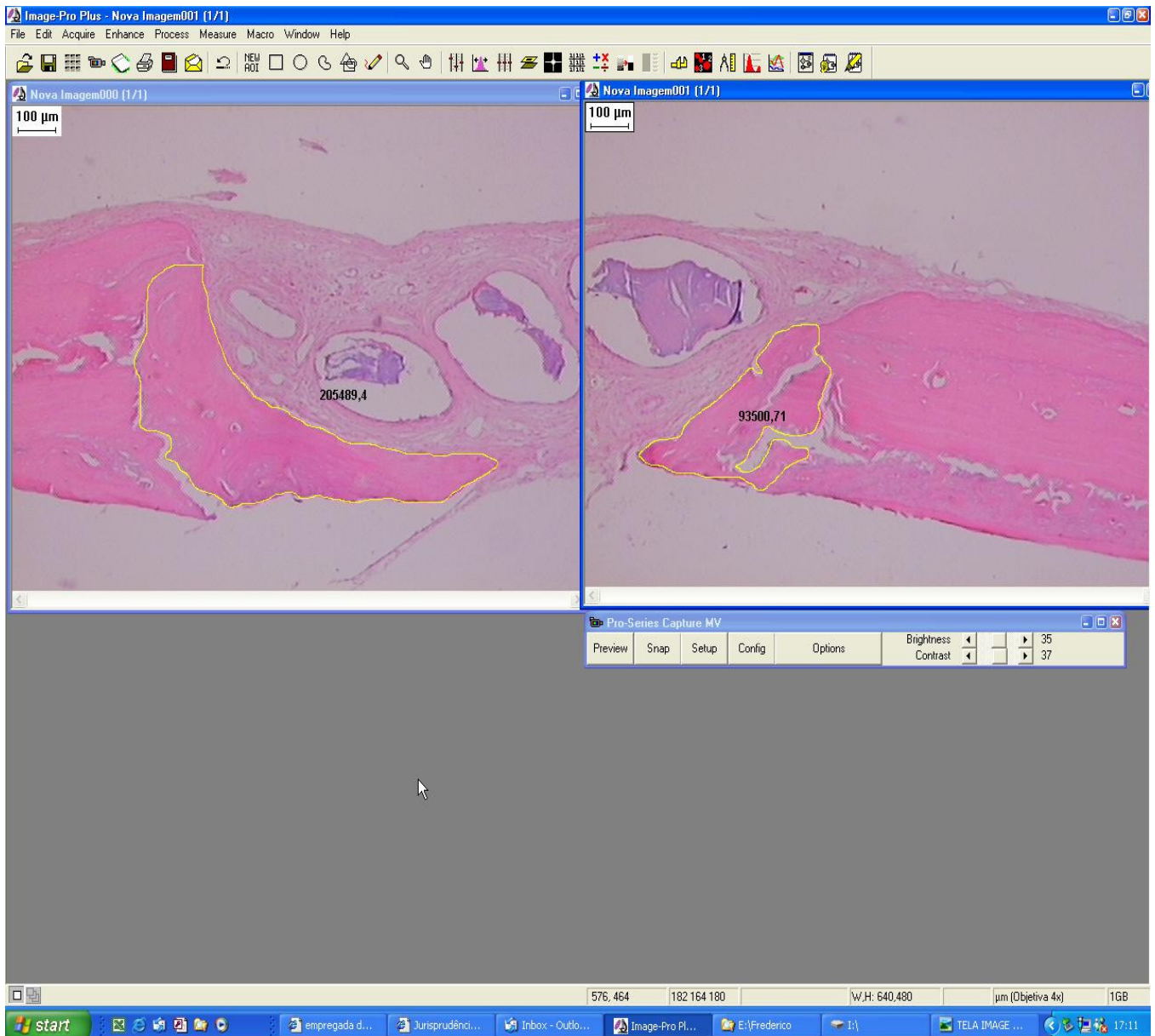
_____. Treatment of segmental defects in long bone using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2: an experimental study in rabbits. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 97-104, June 1997b.

ZHANG, M. et al. Effects of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 68, n. 11, p. 1085-1092, Nov. 1997.

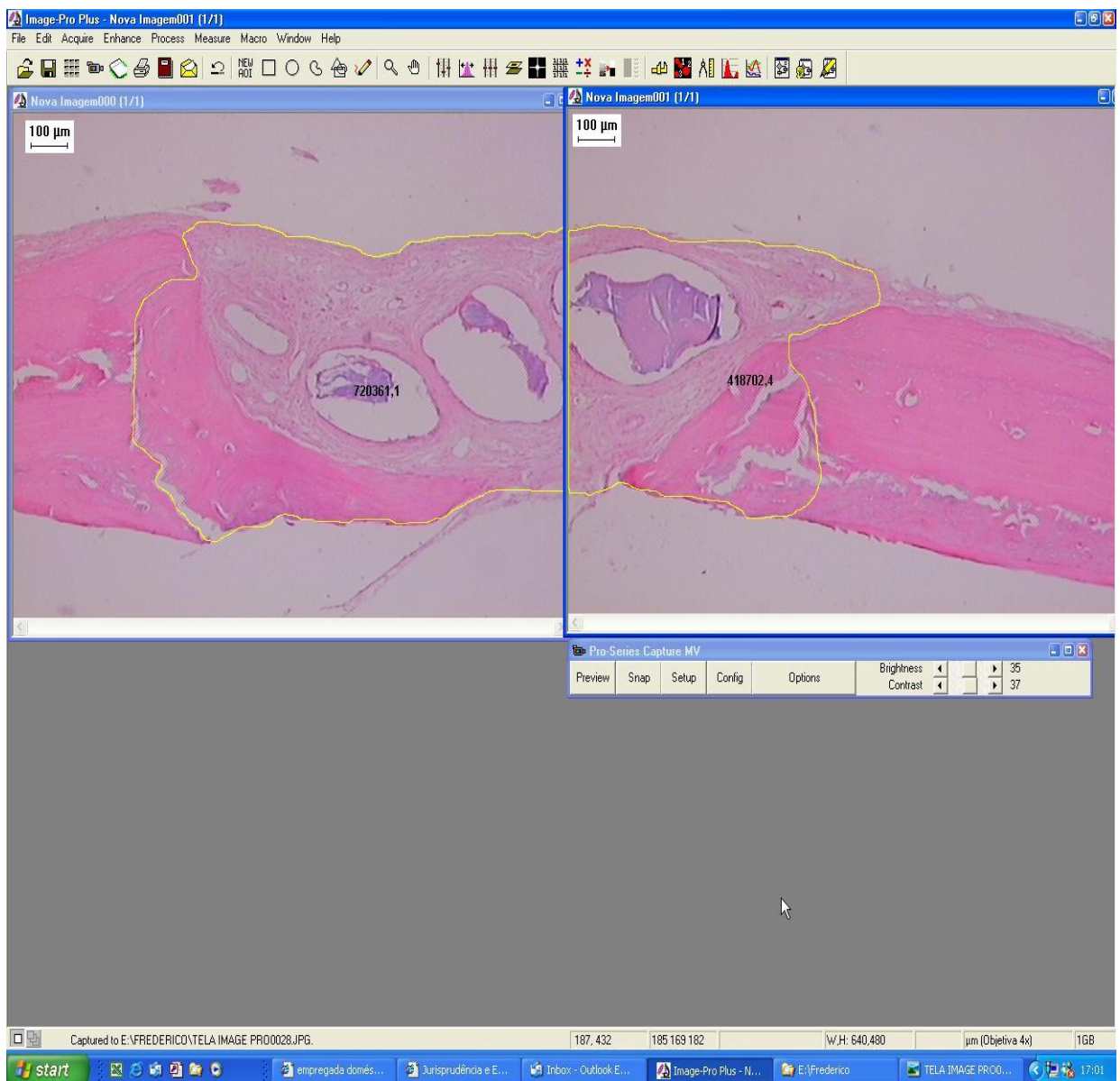
ZUBILLAGA, G. et al. Changes in alveolar bone height and width following post-extraction ridge augmentation using a fixed bioabsorbable membrane and demineralized freeze-dried bone osteoinductive graft. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 74, n. 7, p. 965-975, July 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Quantificação da Área de Osso Neoformado em μm^2 no Software Image Pro Plus

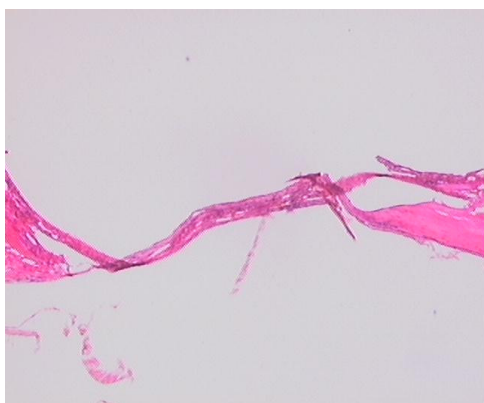


APÊNCICE B – Quantificação da Área Inicial do Defeito em μm^2 no Software Image Pro Plus

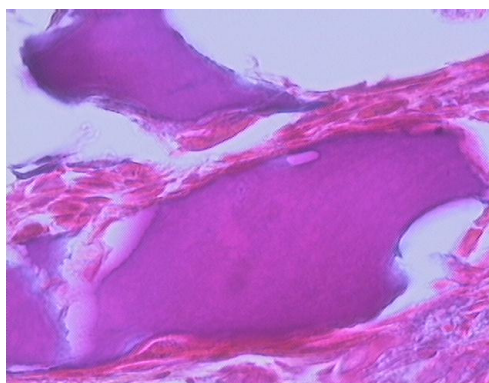
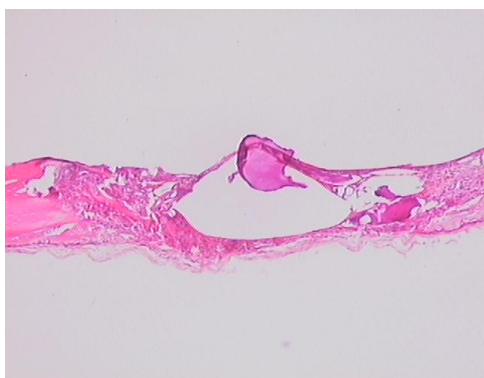


APÊNCICE C –Aspecto Microscópico da Neoformação Óssea e Presença de Células Gigantes Relacionadas com os Enxertos nos Diferentes Grupos Estudados

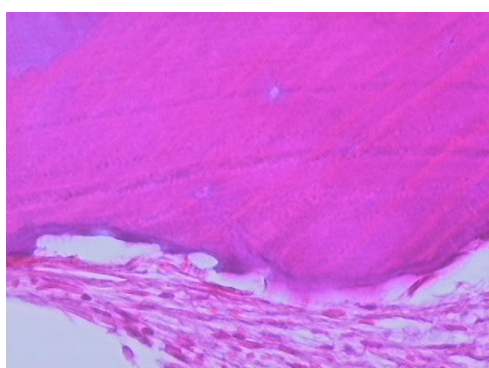
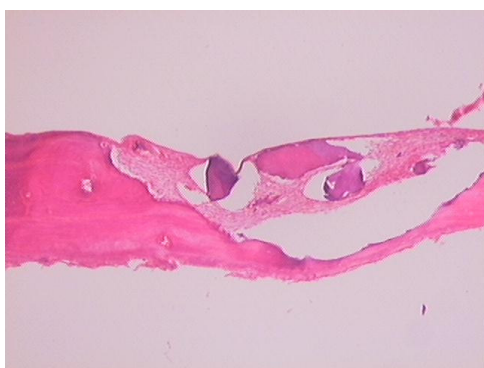
Grupo I- Com Membrana



Coágulo

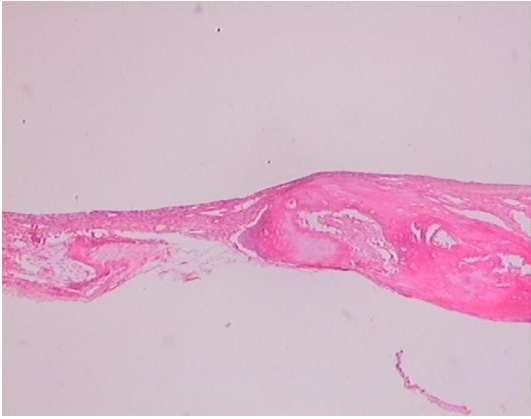


FDDB

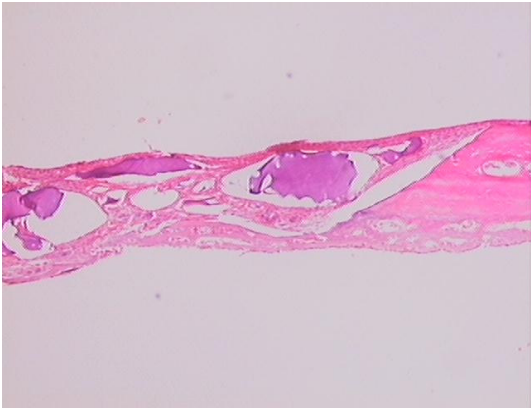


DFDB

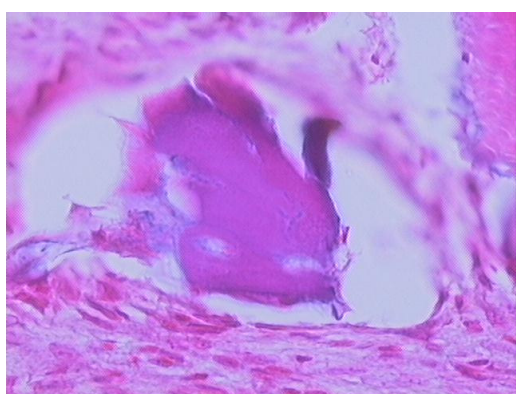
Grupo I- Sem Membrana



Coágulo

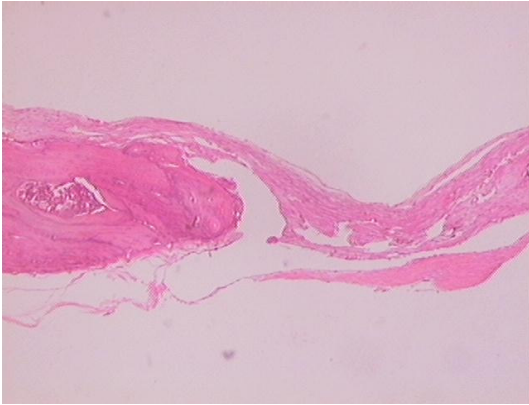


FDDBA

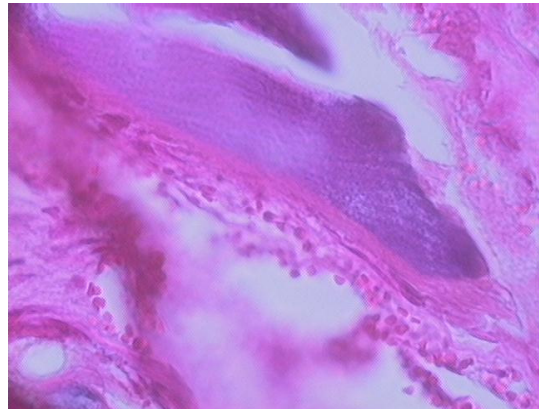
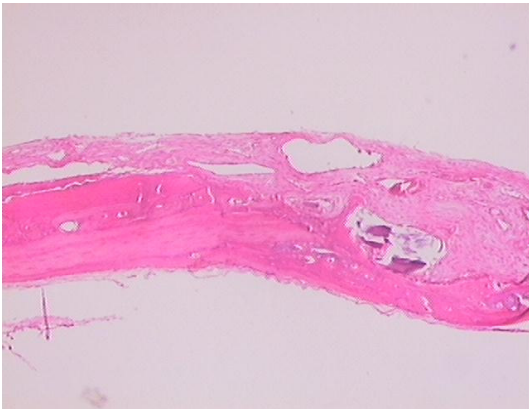


DFDBA

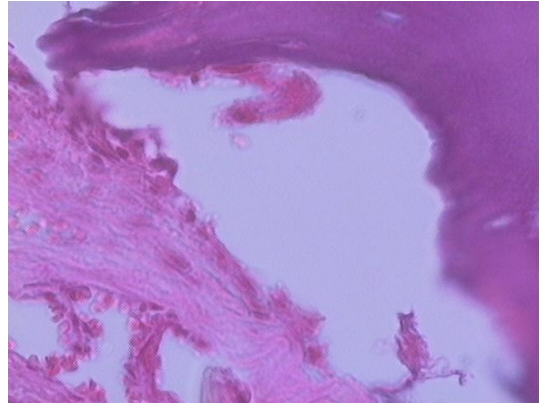
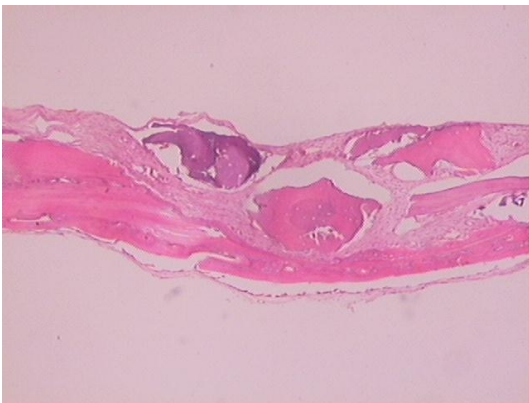
Grupo II- Com Membrana



Coágulo

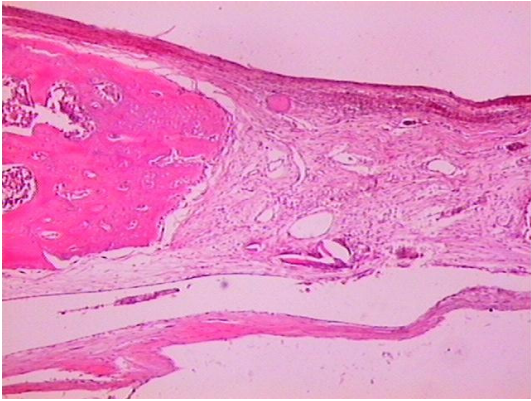


FDBA

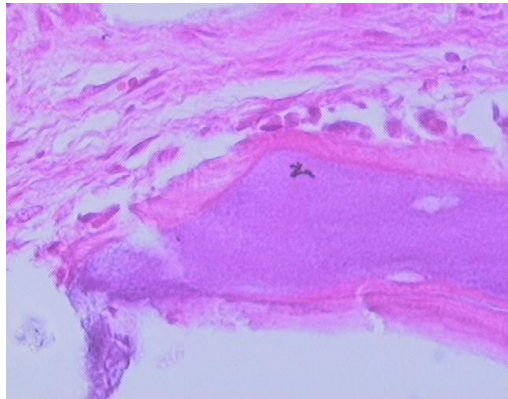


DFDBA

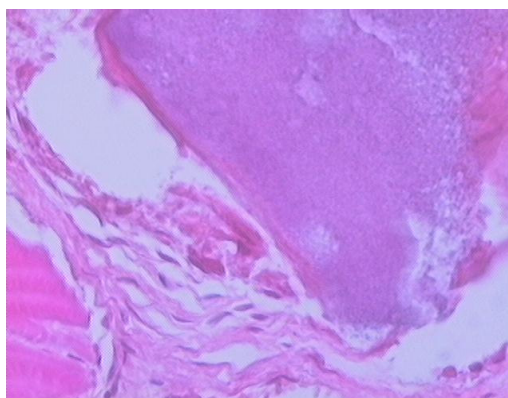
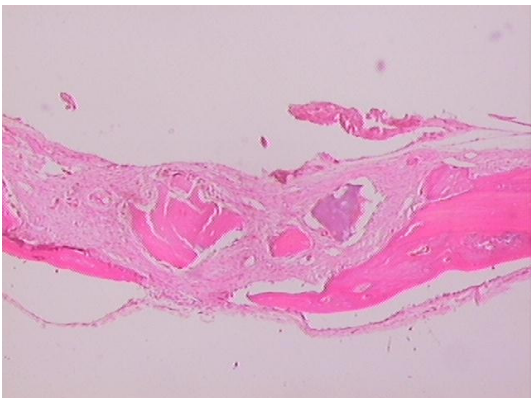
Grupo II- Sem Membrana



Coágulo

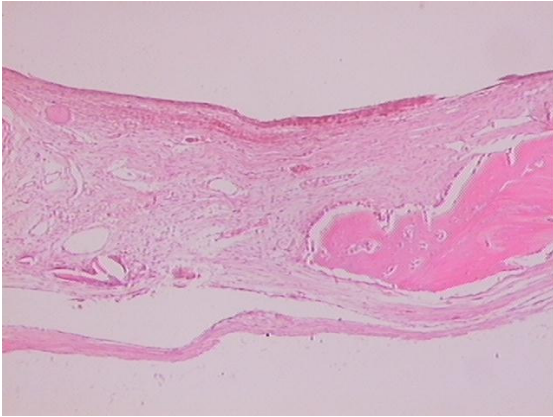


FDBA

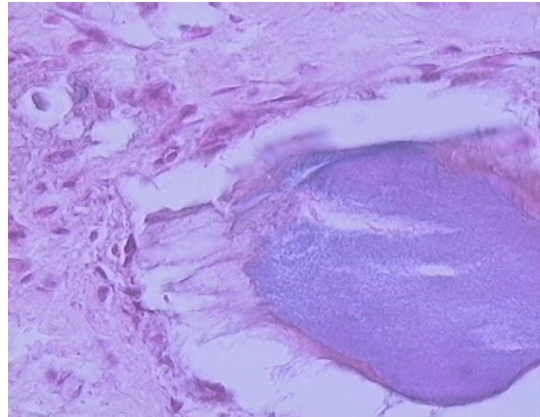
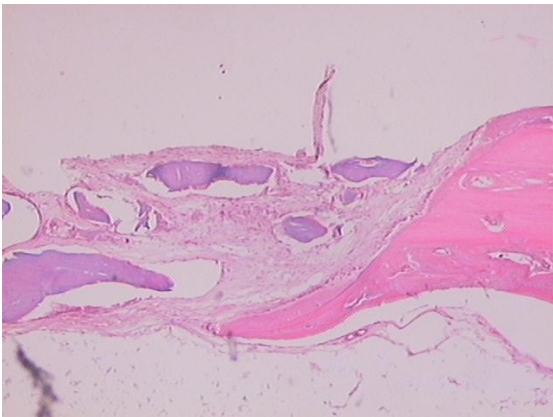


DFDBA

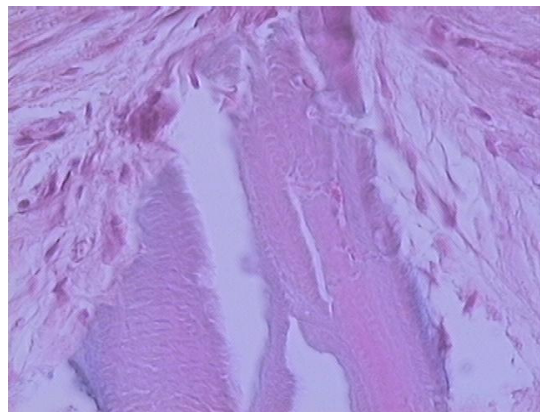
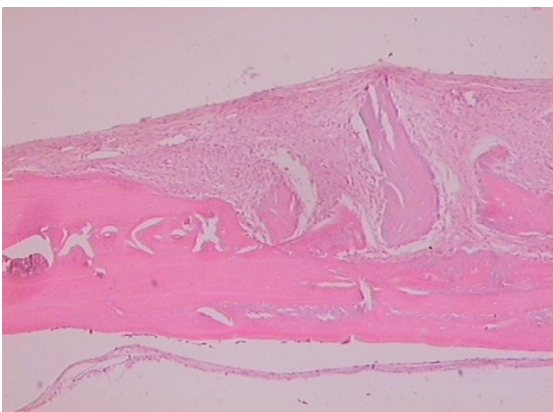
Grupo III- Com Membrana



Coágulo

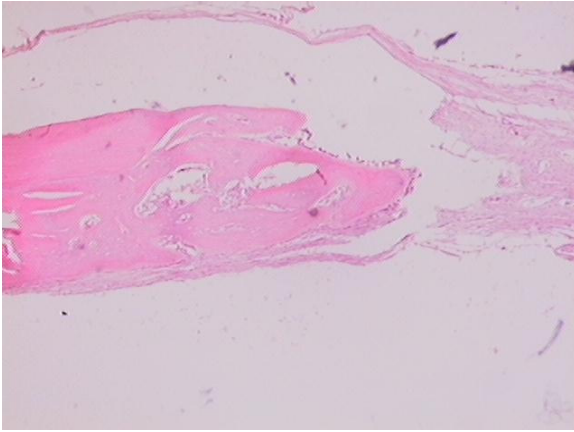


FDDBA

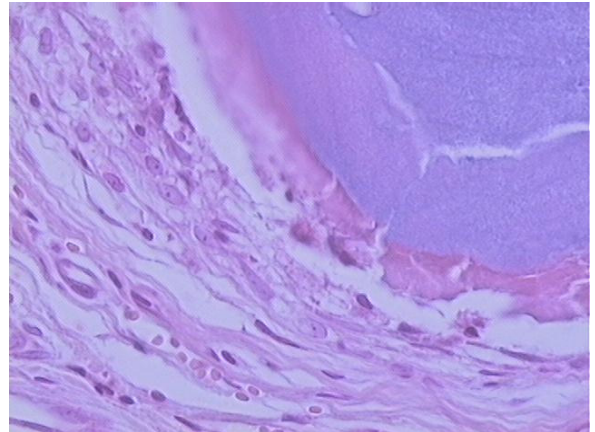
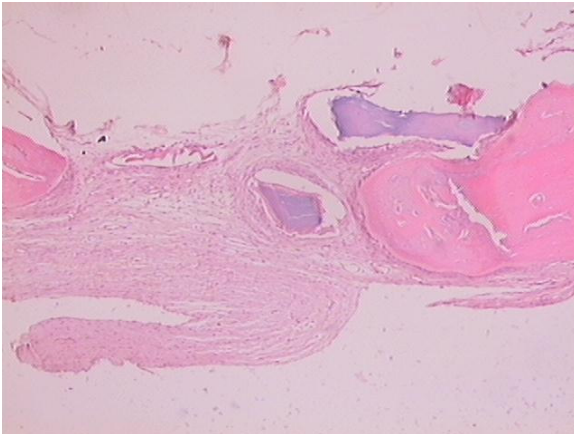


DFDBA

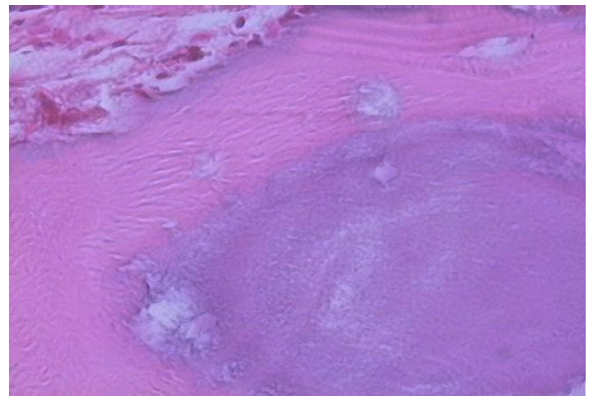
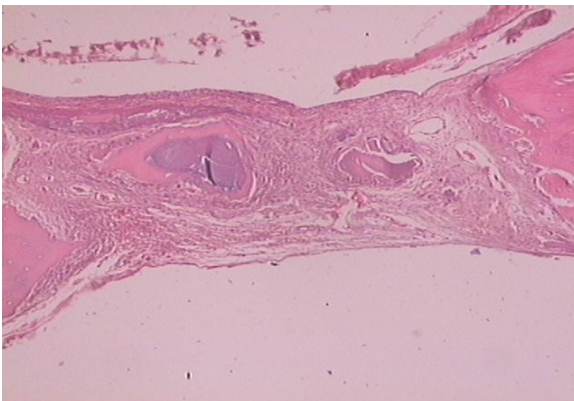
Grupo III- Sem Membrana



Coágulo

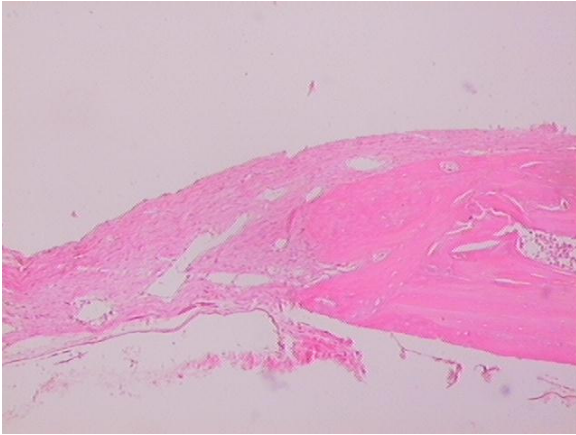


FDDBA

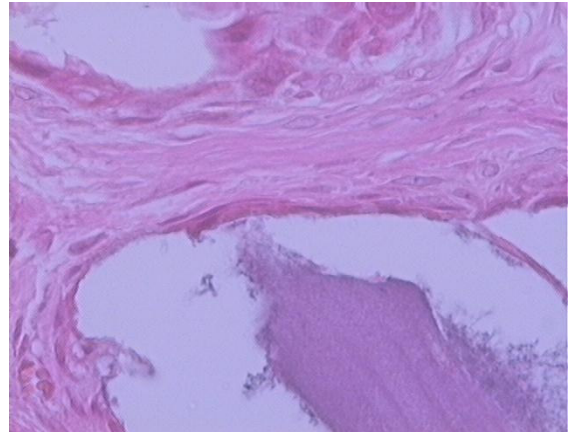
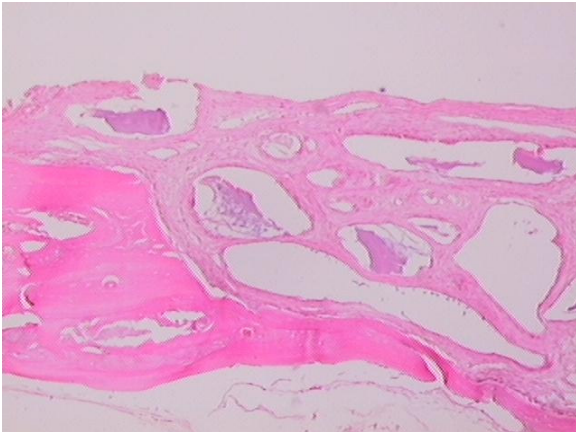


DFDDBA

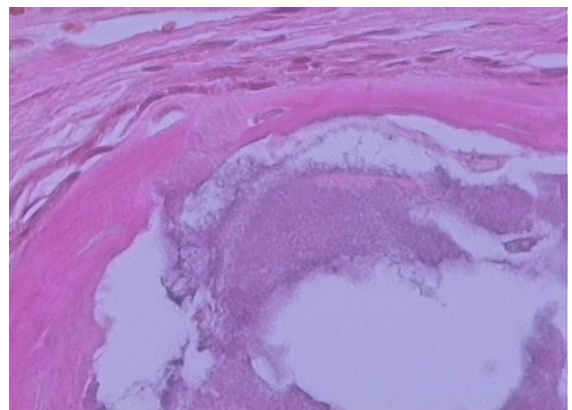
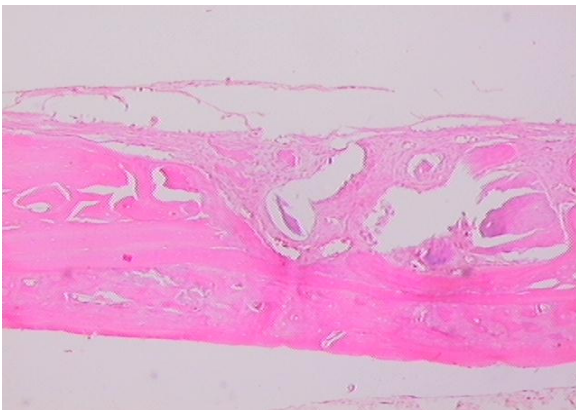
Grupo IV- Com Membrana



Coágulo

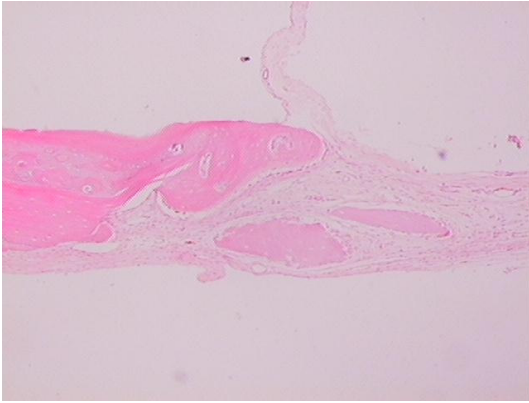


FDBA

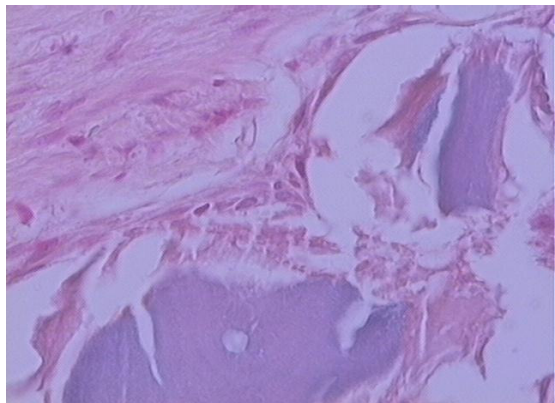
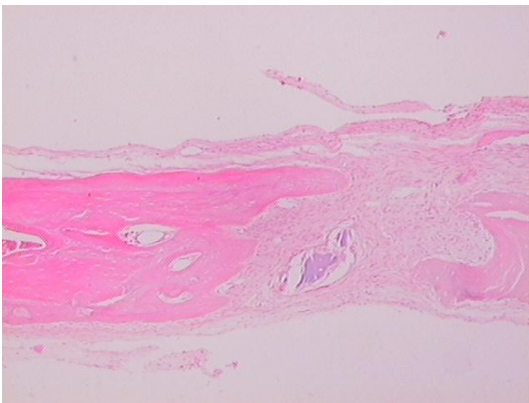


DFDBA

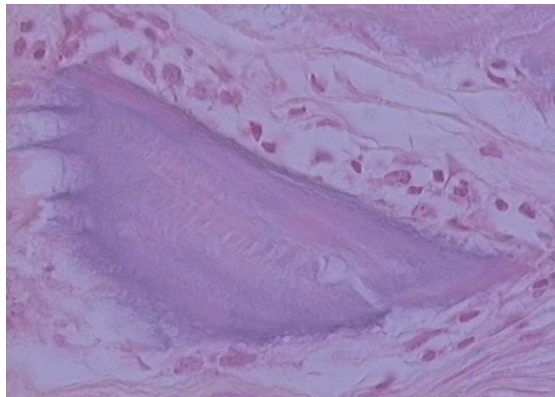
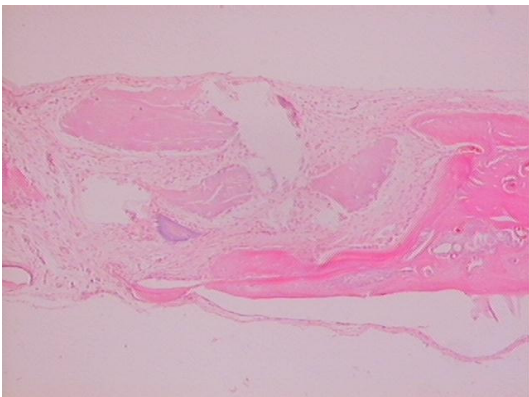
Grupo IV- Sem Membrana



Coágulo



FDBA

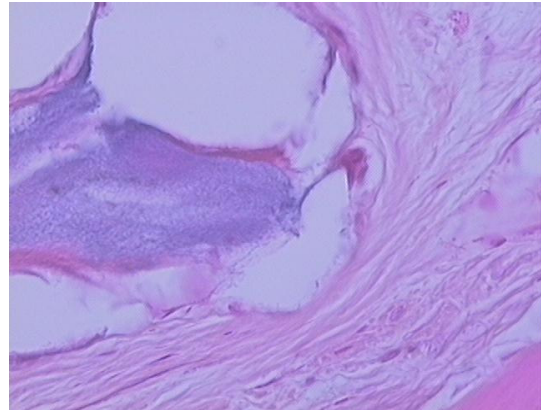
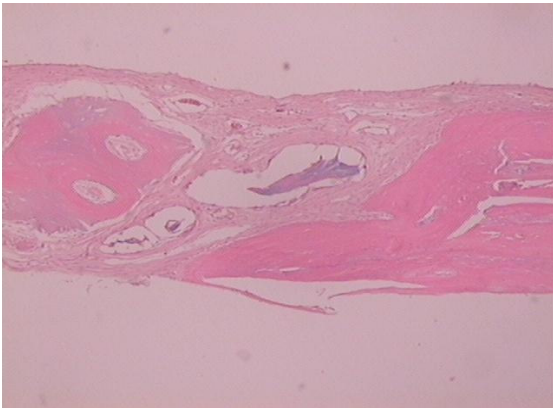


DFDBA

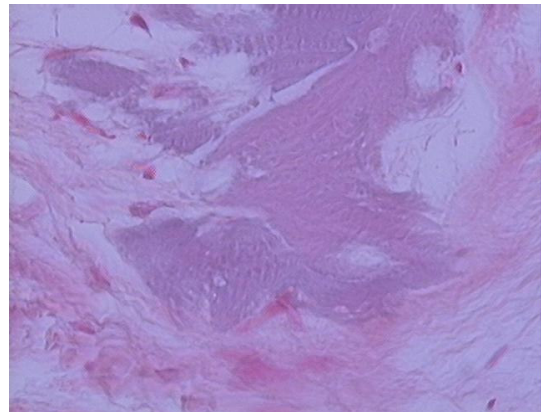
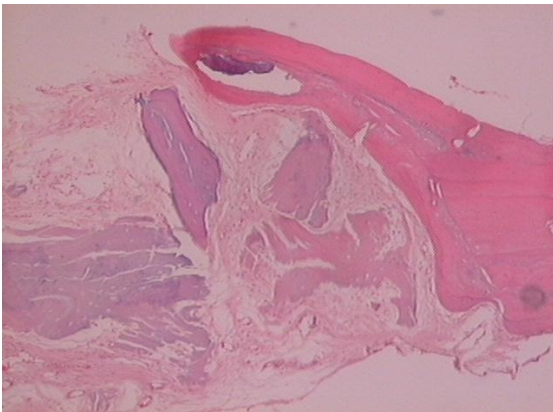
Grupo V- Com Membrana



Coágulo



FDBA

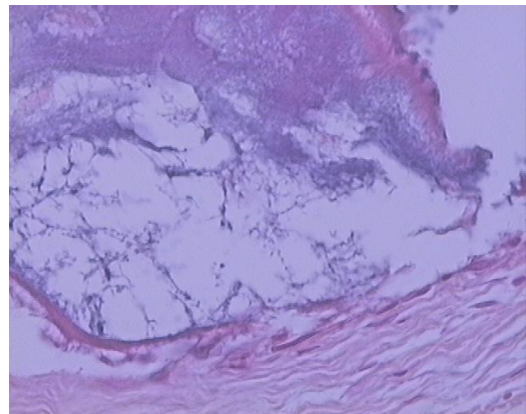


DFDBA

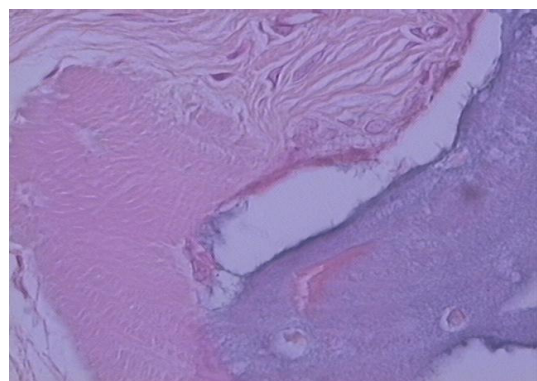
Grupo V- Sem Membrana



Coágulo

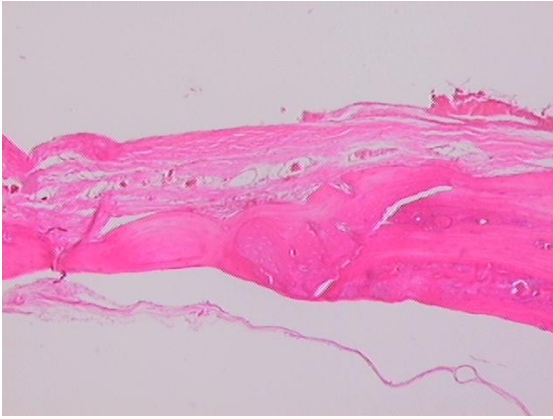


FDBA

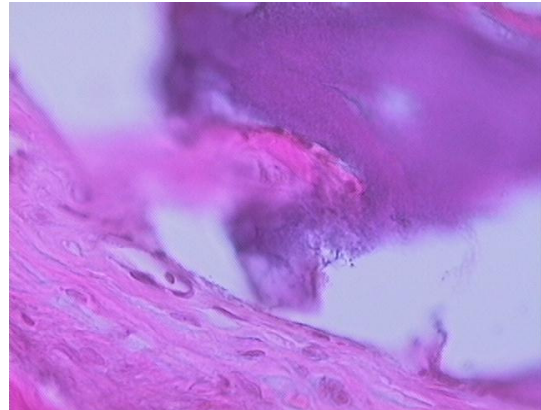


DFDBA

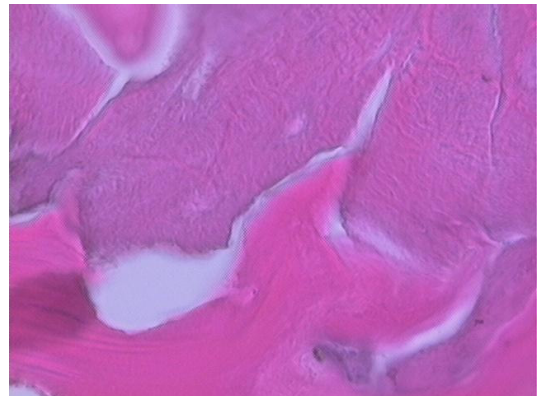
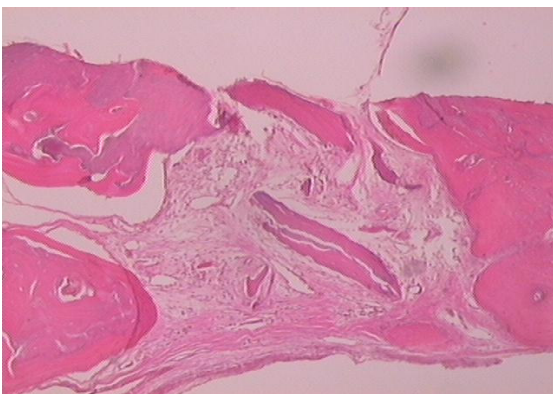
Grupo VI- Com Membrana



Coágulo

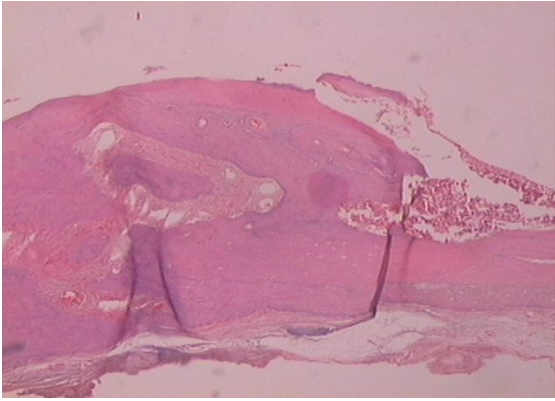


FDBA

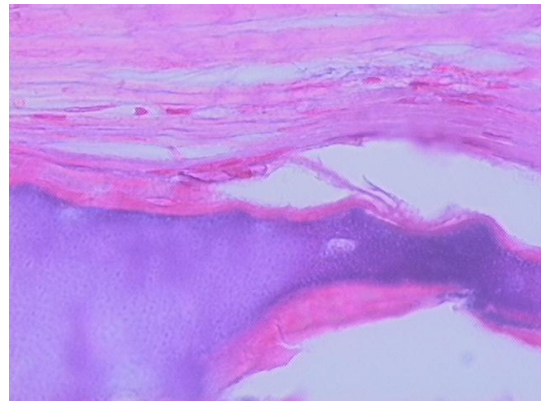
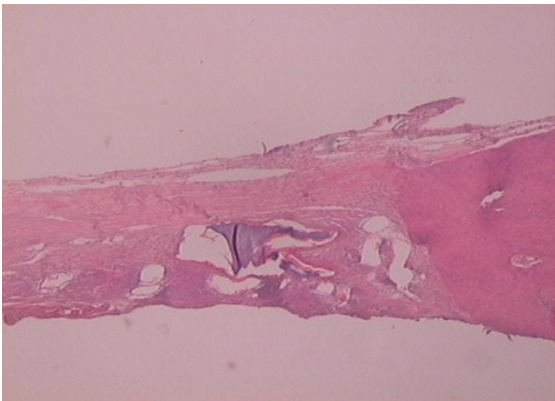


DFDBA

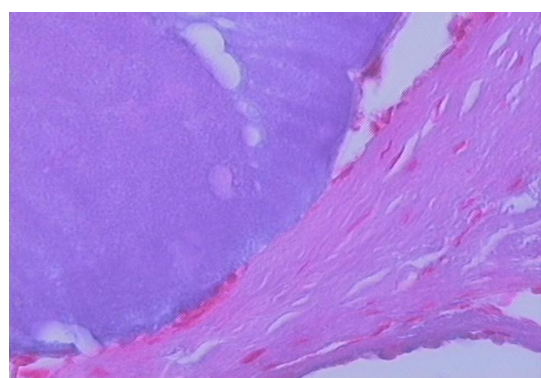
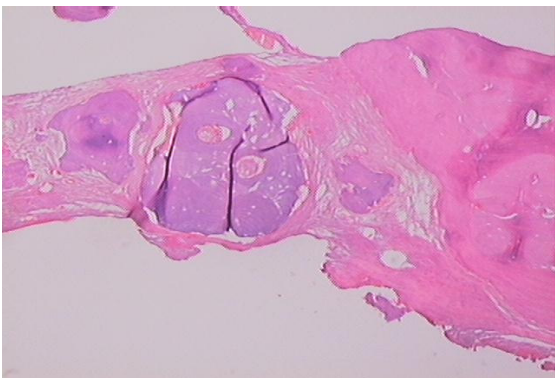
Grupo VI- Sem Membrana



Coágulo



FDDBA



DFDBA

ANEXOS

**ANEXO A – Aprovação do Projeto de Dissertação pela Comissão
Científica e de Ética da FO/PUCRS**



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 01 de julho de 2004.

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob nº: 0025/04

Intitulado: *Avaliação histológica de processo de reparo ósseo na presença de enxerto de osso homogêneo mineralizado liofilizado e membrana cortical bovina em calota craniana de ratos.*

do(a) aluno(a): *Frederico Saueressig*

Programa de: *Odontologia*

do curso de: *Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial*

Nível: *Mestrado*

Orientado pelo(a): *Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 01 de julho de 2004.

Prof. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B – Normas para a Prática Didático-Científica de Vivisseção de Animais

Art. 1 - Fica permitida, em todo território nacional, a vivisseção de animais, nos termos desta Lei.

Art. 2 - Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3 - A vivisseção não será permitida:

- I - sem o emprego de anestesia;
- II - em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competente;
- III - sem supervisão de técnico especializado;
- IV - com animais que não tenham permanecido mais de 15 (quinze) dias em biotérios legalmente autorizados;
- V - em estabelecimento de ensino de 1º e 2º graus e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

Art. 4 - O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de

aprendizagem cirúrgica, quando, durante ou após a vivissecação, receber cuidados especiais.

Parágrafo 1 - Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas;

Parágrafo 2 - Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30 (trinta) dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

Art. 5 - Os infratores desta Lei estarão sujeitos:

I - às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto-lei 3.688, de 03/10/41, no caso de ser a primeira infração;

II - à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência.

Art. 6 - O Poder Executivo, no prazo de 90 (noventa) dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

I - o órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiência e demonstrações com animais vivos;

II - as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;

III - órgão e autoridades competentes para fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

Art. 7 - Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 8 - Revogam-se as disposições em contrário.