



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

DANIELA DE OLIVEIRA PIRES

**Uso de membrana reabsorvível de cortical bovina em
defeitos críticos em calvária de ratos**

Araçatuba, SP
2015

DANIELA DE OLIVEIRA PIRES

**Uso de membrana reabsorvível de cortical bovina em
defeitos críticos em calvária de ratos**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia da Universidade
Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Araçatuba, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de bacharel
em Odontologia.**

Orientador: Prof. Ass. Dr. Francisley Ávila Souza

ARAÇATUBA/SP

2015

DANIELA DE OLIVEIRA PIRES

Uso de membrana reabsorvível de cortical bovina em defeitos críticos em calvária de ratos

Trabalho de conclusão de curso aprovado em 25/09/2015 para obtenção do título de Bacharel em Odontologia

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisley Ávila Souza

Orientador

Prof. Adjunto Ricardo Coelho Okida

Examinador

Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani

Examinador

A DEUS criador do ceu e da terra e fonte de misericórdia para os Homens.

Aos meus avós Daniel Ferraz de Oliveira e Santana Ferraz de Oliveira (*in memoriam*) por sempre me apoiarem em minhas decisões desde que meus primeiros passos.

Aos meus Pais José Carlos Pires e Cleide Silva de Oliveira Pires por sempre estarem presentes em minha vida.

Ao meu tio Rodiney Segura Manão por ser fonte segura de ensinamento e por acreditar em mim desde o início da minha graduação.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araçatuba por ter me recebido e oferecido todos os recursos e estrutura para a minha formação como profissional,

*Ao meu Orientador Professor Doutor **Francisley Ávila Souza** por realizar a orientação segura neste trabalho,*

*Ao Professor Doutor **Ricardo Coelho Okida** por sempre estar presente na minha formação acadêmica.*

*Ao Professor Doutor **Leonardo Perez Faverani** que além de me ensinar a ciência me ensinou também a humanidade, perseverança, dedicação, perfeccionismo e humildade,*

*À Senhora **Maria Dirce Colli** e ao Senhor **Paulo Gratão** pelos trabalhos laboratoriais deste estudo,,*

À todos os funcionários que permitiram, através de seus esforços diários, que hoje este trabalho e toda a minha graduação tenham sido concluídos com êxito e sucesso,

*Ao meu amigo e mestrando em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial **Igor Putini** por ter compartilhado conhecimento no decorrer da realização deste trabalho e ser o grande responsável pela realização do meu trabalho de conclusão de curso. Igor deixo aqui os meus sinceros agradecimentos e fica a eterna gratidão.*

Obrigado!

“Saber não é suficiente, é preciso aplicar.

Boa vontade não é suficiente, é preciso fazer.”

Johann Wolfgang Van Goethe

PIRES, D.O. **Uso de membrana reabsorvível de cortical bovina em defeitos críticos em calvária de ratos**

33f. Trabalho de Conclusão de Curso – FOA – UNESP – Araçatuba, 2015.

Resumo

A atrofia óssea pode ser resultado de etiologias como patologias, traumas, consequência de procedimentos cirúrgicos e da reabsorção óssea fisiológica após a perda do elemento dentário. Este fato tem proporcionado extensos estudos sobre o processo de reparação óssea. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do uso da membrana absorvível de colágeno em defeitos ósseos críticos realizados em calvária de ratos. Para tal 36 *rattus norvegicus* foram divididos em grupos controle e tratado. Os animais tiveram defeitos de 7 mm de diâmetro realizados em suas calvárias, especificamente sobre a sutura sagital mediana nos ossos frontal e parietal direito e esquerdo. No grupo controle o defeito foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo, enquanto o grupo tratado foi preenchido por coágulo sanguíneo(GC) e recoberto por membrana absorvível (GCM) de colágeno bovino. Os animais sofreram eutanásia nos períodos de 7, 30 e 60 dias pós-operatórios. A calvária foi removida e o material excedente foi eliminado, deixando apenas os ossos cranianos. As peças foram fixadas em formol 10%, seguidos da descalcificação em EDTA. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente. Após foram levadas ao micrótomo, obtendo assim cortes de 6µm de espessura e serão montadas em lâminas. As laminas destinadas a análise quantitativa foram coradas por hematoxilina e eosina. Para realizar a análise foram utilizados um microscópio óptico com objetiva de aumento de 2,5x acoplado a uma câmera de captura de imagem e conectado a um computador, com um software analisador de imagens digitalizada. Foi mensurado a extensão da área de formação óssea nos defeitos. Para tal, foi necessário a utilização de alguns critérios. A área total do defeito na região analisada devia corresponder a área ocupada pelo osso da calvária, na mesma região antes da confecção do defeito. Para determinação da área total, devia ser estabelecida a altura do defeito, tendo como parâmetro a espessura osso na borda do defeito. Após serem obtidos os valores de cada lâmina, eles serem somados e divididos de modo a obterem uma média. Esta média foi estabelecida como padrão para todos os defeitos, considerando que a espessura da calota era semelhante em todos os animais incluídos na amostra. Nos grupos experimentais de 7, 30 e 60 dias não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre GC e GCM. Assim, os resultados sugerem que a membrana de cortical bovina reasorvível apresentou comportamento biocompatível e foi reabsorvida no período de 60 dias, porém não proporcionou formação óssea superior quando comparado ao coágulo sanguíneo.

Palavras-chave: Membrana absorvível, Biomaterial, Reparo ósseo.

PIRES, D.O. Use of resorbable cortical bovine membrane at the critical defects in rat calvaria.

33p. Monograph – FOA – UNESP – Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

Bone atrophy can result from etiologies as pathologies, trauma, surgical procedures and result of the physiological bone resorption following tooth loss. This fact has provided extensive studies on the process of bone repair. The objective of this study was to evaluate the efficacy of collagen absorbable membrane in critical defects in rat calvaria. *Rattus norvegicus* for that 36 were divided into control and treated groups. Animals were 8 mm diameter calvaria defects in their conducted specifically on the median sagittal suture in the frontal and parietal bones right and left. In the control group the defect was filled only by blood clot, while the treated group was filled with blood clot (GC), and covered with absorbable membrane (GCM) bovine collagen. The animals were euthanized at 7, 30 and 60 days postoperatively. The calvaria were removed and the excess material was removed, leaving only the cranial bones. The pieces were fixed in 10% formalin, followed by decalcification in EDTA. The obtained pieces were embedded in paraffin separately. After they were taken to the microtome, obtaining of 6µm thick sections and are mounted on slides. The blades aimed at quantitative analysis were stained with hematoxylin and eosin. To perform the analysis we used an optical microscope at 2.5x increase objective coupled to an image capture camera and connected to a computer with a software analyzer scanned images. The extent of bone formation in the defect area was measured. To this end, the use of some criteria was required. The total area of the defect in the analyzed region should match the area occupied by the bone of the calvaria in the same region before the defect production. For determination of the total area, should be set the height of the defect, having as parameter the thickness of bone at the defect edge. Once obtained the values of each blade, they are summed and divided so as to obtain an average. This average was established as the standard for all defects, considering the thickness of the cap was similar in all animals sampled. In the experimental groups of 7, 30 and 60 days it was not observed statistical difference ($p > 0.05$) between CG and GCM. Thus, the results suggest that the material tested has biocompatible and behavior was resorbed within 60 days.

Keywords: Absorbable membran, Biomaterial, bone repair.

Lista de Figuras

Figura 1 – Desenho esquemático do defeito em calvária.	17
Figura 2 – Grupo coágulo aos 7 dias.	20
Figura 3 – Grupo coágulo aos 30 dias.	20
Figura 4 – Grupo coágulo aos 60 dias.	21
Figura 5 – Grupo coágulo Membrana aos 7 dias.	21
Figura 6 – Grupo coágulo Membrana aos 30 dias.	22
Figura 7 – Grupo coágulo Membrana aos 60 dias.	22

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparação entre os grupos experimentais.	23
Tabela 2 – Comparação entre grupos aos 7 dias.	23
Tabela 3 – Comparação entre os grupos aos 30 dias.	23
Tabela 4 – Comparação entre os grupos aos 60 dias.	24

SUMÁRIO

Introdução	12
Proposição	15
Material e Método	16
1. <i>Delineamento Experimental</i>	16
1.1. <i>Defeitos em calvária</i>	16
2. <i>Procedimentos Cirúrgicos</i>	16
2.1. <i>Defeitos em Calvária</i>	16
3. <i>Preparo das Amostras</i>	18
4. <i>Análise Histomorfométrica</i>	19
5. <i>Análise Estatística</i>	19
Resultados	20
<i>Análise Qualitativa Histológica</i>	20
<i>Análise Histométrica</i>	23
Discussão	25
Conclusão	28
Referências Bibliográficas	29
Anexo – Comitê de Ética em Experimentação em Animais	33

INTRODUÇÃO

O uso de implantes osseointegráveis tornou-se uma modalidade de tratamento muito difundida nos dias atuais para reposição protética de dentes perdidos. Para instalação de implantes osseointegráveis há a necessidade de quantidade e qualidade de remanescente ósseo. Em algumas situações como instalação de implantes imediatamente a exodontia (NOVAES-JR & NOVAES 1999) e defeitos periimplantares (SOUZA et al. 2015) pode se lançar mão de biomaterias que forneçam a propriedade biológica da osteopromoção. Osteopromoção é caracterizada pelo uso de meios físicos (membranas ou barreiras) para promover o isolamento anatômico de um local a fim de permitir a seleção e proliferação de um grupo de células, no caso do tecido ósseo, predominantemente, osteoblastos a partir do leito receptor, e simultaneamente impedir a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração (CARVALHO et al. 2010). Nesta técnica é impreterível que exista um espaço biológico entre a barreira ou membrana e o defeito ósseo.

Estudos anteriores em animais (CAFESSE et al. 1988; IMBROMITO et al. 2001; ACEVEDO-ANDRADE et al. 2004) comprovaram a possibilidade de selecionar células de determinados tecidos e impedir que células de outros tecidos repopulassem uma ferida, por meio do uso de membranas. Este processo foi denominado regeneração tecidual guiada. Posteriormente, estes estudos foram direcionados para o tecido ósseo com o uso de membranas utilizando-se da osteopromoção, e este processo foi denominado regeneração óssea guiada (ROG) (DAHLIN et al. 1988). A regeneração óssea guiada é a técnica que usa a osteopromoção como princípio biológico ((NOVAES-JR & NOVAES 1999), e auxilia no direcionamento da formação óssea (ANDRADE-ACEVEDO et al. 2004).

Dahlin et al. (1990) avaliaram o potencial de regeneração óssea utilizando membranas em defeitos previamente criados e preenchidos por tecido conjuntivo fibroso. Para isso foram criados defeitos em mandíbulas de ratos permitindo que a cicatrização ocorresse normalmente por 12

semanas, quando se verificou que os defeitos estavam preenchidos por tecido conjuntivo fibroso. Tal tecido foi removido e os defeitos foram recobertos com membranas. Após seis semanas, todos os defeitos estavam preenchidos por tecido ósseo.

A membrana é posicionada em contato direto com o defeito ósseo circundante posicionando o periósteo sobre a mesma. A literatura mostra que certos tecidos no interior do organismo possuem potencial biológico para regeneração, sempre que exista um ambiente adequado durante a cicatrização (SHENK et al. 1994). As principais indicações do uso das membranas biológicas em processos de ROG são: correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais (CORTELLINI et al. 1993); alvéolos após exodontias (WILSON & WEBER, 1993); deiscência e fenestrações após colocação de implantes mediatos e imediatos (BECKER et al. 1999) entre outros.

Para neoformação óssea ser completa pela ROG, devem existir as seguintes condições: fonte de células osteogênicas (osso viável adjacente ao defeito); fonte adequada de vascularização; o local da ferida deve permanecer mecanicamente estável durante a cicatrização, já que os micromovimentos poderão influenciar no tecido a ser formado deve existir um espaço apropriado entre a membrana e a superfície óssea, impedindo o colapso deste espaço, permitindo que seja preenchido por um coágulo sanguíneo, sendo este espaço crítico, já que nele as células osteogênicas irão se multiplicar; as membranas devem possuir propriedades de permeabilidade que permita a difusão de plasma e nutrientes, porém não a passagem de células não osteogênicas; biocompatibilidade da membrana; proteger a delicada rede vascular durante a organização do coágulo (PHILLIPS et al. 1988).

Para criação e manutenção do volume desse espaço bem como de uma geometria adequada, a membrana deve suportar seu peso e resistir à pressão dos tecidos adjacentes e forças externas, como a mastigação. O colapso da membrana está diretamente relacionado com a eliminação do espaço. A manutenção do espaço durante todo processo de cicatrização depende, também, da integridade da física da membrana. Uma membrana deve ter rigidez suficiente (memória), para criar

o espaço, entretanto deve também adaptar-se ao contorno ósseo, permitindo que retorne à sua forma, já que o mesmo não possui memória. Quanto melhor a adaptação da membrana, mais completa será a regeneração (BUSER et al. 1990).

As membranas absorvíveis devem sofrer reabsorção e degradação macromolecular por meio da associação de hidrólise e degradação enzimática, processo que ocorre na presença de enzimas como a fosfatase ácida e colagenase. A bioreabsorção requer total eliminação dos produtos da degradação sem efeitos residuais locais (MINABE et al. 2001). Estas membranas foram criadas no intuito de eliminar um segundo tempo cirúrgico. Além disso, esses biomateriais têm sido alvo de intensa investigação. Uma nova geração de membranas constituídas de copolímero de polilático e poliglicólico e as de ácido polilático estão sendo estudadas (SCHIMITZ et al. 2000). A natureza física e a quantidade de fragmentos gerados por degradação por hidrólise podem ter um efeito significativo na resposta tecidual local, podendo conduzir à uma reabsorção óssea (HARDWICK et al. 1995). Diante do exposto justifica-se estudar o comportamento biológico da membrana absorvível de cortical bovina em defeitos críticos realizados em calvária de ratos.

PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a propriedade biológica de osteopromoção da membrana absorvível de cortical bovina posicionada sobre defeitos críticos realizados em calvária de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Delineamento Experimental:

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP, de acordo com o processo 01245-2012.

1.1. Defeitos em Calvária:

Foram utilizados para a realização deste estudo 36 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), machos, adultos, com peso corporal entre 450 e 500g. Os animais foram pareados no começo do estudo para diminuir o desvio padrão. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP onde foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e foram alimentados com ração sólida padrão e água “*ad Libitum*”, durante todo o experimento.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos equitativos que compuseram a amostra do trabalho:

Grupo coágulo (GC): o defeito de tamanho crítico cirurgicamente confeccionado foi preenchido apenas com coágulo sanguíneo;

Grupo coágulo/membrana (GCM): o defeito de tamanho crítico cirurgicamente confeccionado foi preenchido com coágulo sanguíneo e recoberto por membrana cortical bovina (Gen-Derm, Baumer, Mogi Mirim, Brasil).

2. Procedimentos Cirúrgicos:

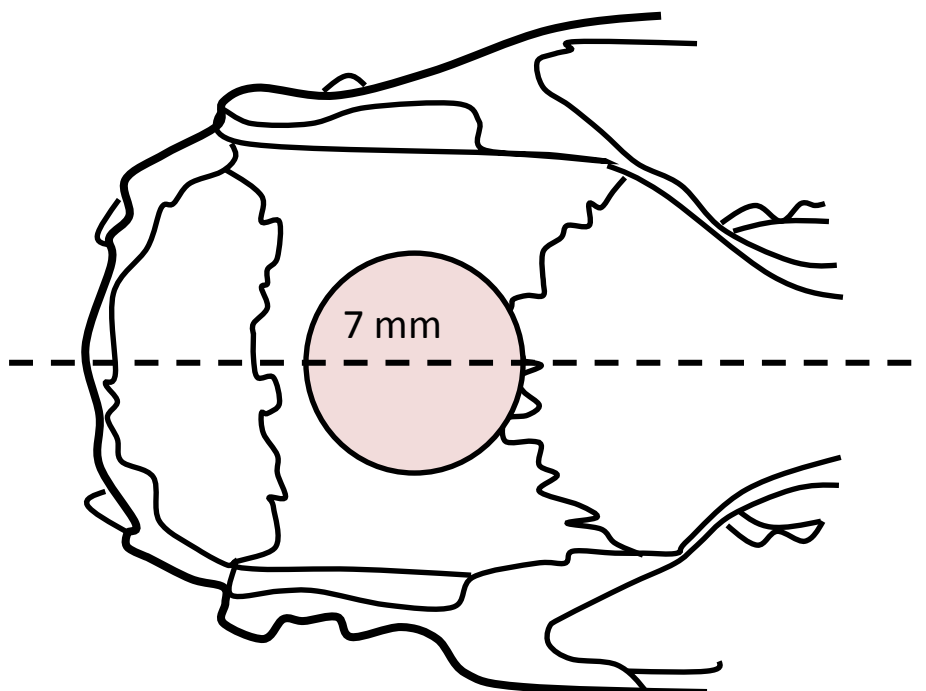
2.1. Defeitos em Calvária:

Após jejum de 12 horas os animais foram submetidos à anestesia geral pela administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e

do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), na dosagem de 5mg/Kg.

Após indução anestésica, foi realizada tricotomia manual na região fronto-parietal, posicionamento do animal em decúbito ventral, antissepsia da área com PVPI tópico (PVPI aquoso a 10%, com 1% de iodo ativo, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) e colocação de campos estéreis. Em seguida foi realizado o acesso cirúrgico por incisão linear mediana de 2 cm sobre a calvária do animal com lâmina de bisturi nº 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German). O retalho total foi descolado, rebatido e afastado com descoladores para exposição do osso parietal de ambos os lados. Com uma broca trefina de 7 mm (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) e com auxílio de um contra ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil) adaptado em um motor de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm foi realizada a osteotomia na região mediana entre os parietais envolvendo a cortical externa e interna da calvária. O osso parietal osteotomizado foi removido e a dura-máter mantida intacta (Figura 3).

Figura 1 – Desenho esquemático do defeito em calvária.



O defeito ósseo foi realizado e nos animais pertencentes ao grupo GC foi realizado uma decorticação das paredes laterais do defeito crítico a fim do defeito ser preenchido totalmente por coágulo sanguíneo. No grupo GCM após a decorticação e preenchimento total do defeito por coágulo sanguíneo uma membrana absorvível de cortical óssea bovina (Gen-Derm, Baumer, Mogi Mirim, Brasil) previamente modelada foi posicionada sobre o defeito ósseo. Após, o retalho total foi reposicionado e a sutura realizada com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

Passados 7, 30 e 60 dias os animais foram submetidos a todos os procedimentos pré-operatórios citados anteriormente, e a eutanásia dos espécimes foi realizada, sendo 6 animais por período. A eutanásia foi realizada por dose excessiva de anestésico para a remoção da calvária do animal com margem de no mínimo 3 mm de tecido ósseo ao redor do defeito cirúrgico.

3. Preparo das Amostras:

As peças foram fixadas em formol neutro 10% tamponado (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) e sofreram descalcificação em EDTA 20% (Ácido Etileno Diamino Tetracético, Merck) dissolvido em água MiliQ, com trocas semanais por um período de 6 semanas, à temperatura ambiente. Em seguida o material foi desidratado utilizando uma sequência crescente e gradativa de alcoóis 70, 90, 95 e 100, com troca de solução a cada 1 hora, em agitador orbital (KLine CT – 150®, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). Após estas etapas, foi realizada a diafanização com xilol e posterior, inclusão em parafina para obtenção de corte com 6 µm de espessura montados em lâminas de vidro para a coloração em hematoxilina e eosina (HE Merck & Co., Inc., NJ, EUA).

Previamente a realização das análises histométricas, as amostras foram codificadas de maneira onde somente o orientador tinha conhecimento a qual grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

4. Análise Histométrica:

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc. , NJ, EUA), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Intel® core i5 (CA, Estados Unidos). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem analisadas. Nos defeitos em calvária foi avaliada a área de tecido ósseo neoformado em μm^2 , por meio da mensuração realizada pelo software analisador de imagens digitalizadas ImageJ® (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá).

5. Análise Estatística:

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade Shapiro-Wilk, os quais mostraram distribuição homogênea ($p < 0,05$). Para a comparação entre os tempos experimentais de eutanásia (7, 30 e 60 dias) e grupos dos materiais utilizados para preenchimento do defeito (GC, GCM e TCPG), foi aplicada a análise de variância a 2 fatores – ANOVA. E como pós-teste para os valores que apresentaram significância estatística, aplicou-se o teste Tukey. Foi adotado para todos os testes o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Análise Qualitativa Histológica:

No grupo coágulo aos sete dias (figura 3) observou-se quase nenhum osso neoformado, mostrando o coágulo organizado entre as áreas dos cotos e sem infiltrado inflamatório significativo.

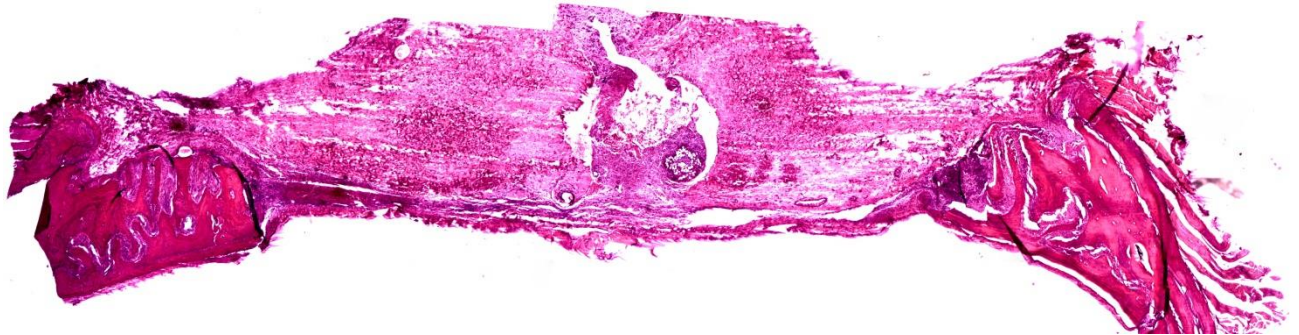


Figura 2 – Grupo coágulo aos 7 dias.

No período de 30 dias (figura 4), o Grupo coágulo apresentava uma área óssea neoformada maior próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes estava preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado.

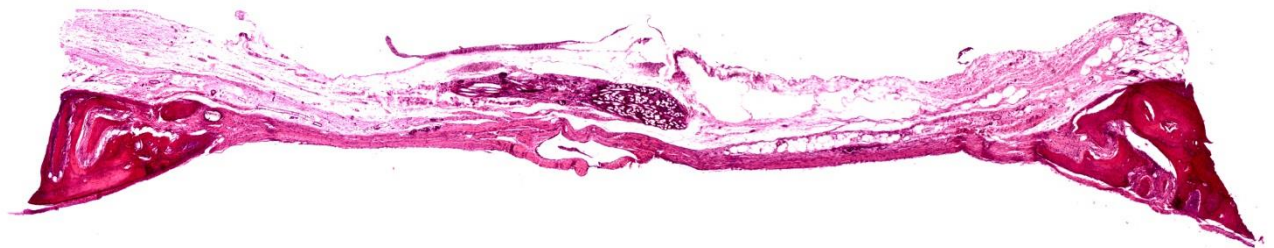


Figura 3 – Grupo coágulo aos 30 dias.

No período de 60 dias (figura 5) observou-se uma maior aproximação dos cotos do defeito, contudo, tendo fechado apenas em torno de 52% do defeito, conforme análise histométrica. No espaço que ainda restava foi possível observar um tecido conjuntivo fibroso.

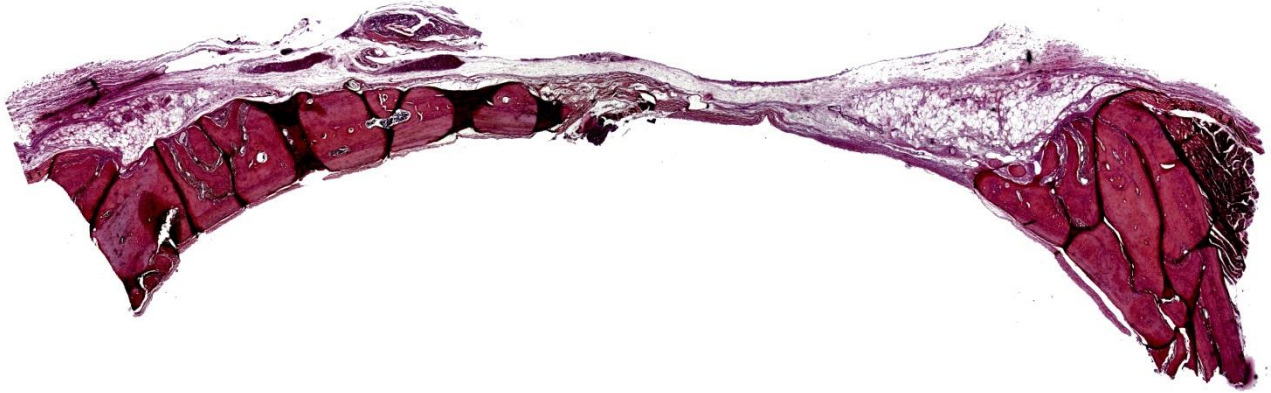


Figura 4 – Grupo coágulo aos 60 dias.

No grupo coágulo sanguíneo recoberto por membrana cortical bovina, aos 7 dias (figura 6) foi possível observar a membrana cortical bovina sobre a área do defeito, uma organização do coágulo com um discreto infiltrado inflamatório entre os cotos e, assim como no grupo coágulo aos 7 dias, não foi possível observar uma relevante área de osso neoformado.

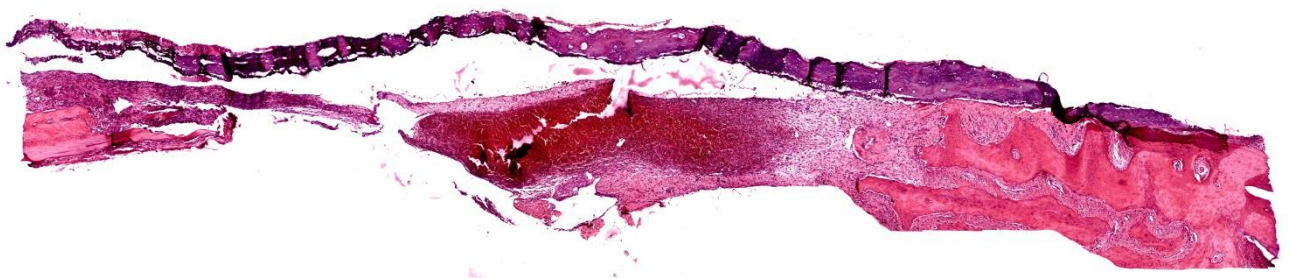


Figura 5 – Grupo Coágulo Membrana aos 7 dias.

No período de 30 dias (figura 7) a membrana instalada já havia sido reabsorvida, e como no grupo de 30 dias do grupo coágulo a área de osso neoformado nas áreas dos cotos era maior que em 7 dias. Contudo ainda havia uma grande área de defeito, sendo esta preenchida por um tecido conjuntivo frouxo não modelado.

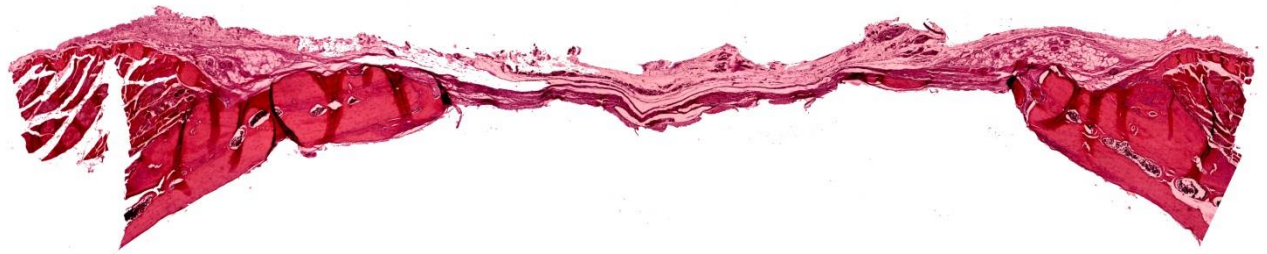


Figura 6 – Grupo Coágulo Membrana aos 30 dias.

E no período de 60 dias (Figura 8), o grupo coágulo sanguíneo recoberto por membrana cortical bovina havia fechado apenas em torno de 38% do defeito e apresentava no defeito entre os cotos um tecido conjuntivo fibroso.

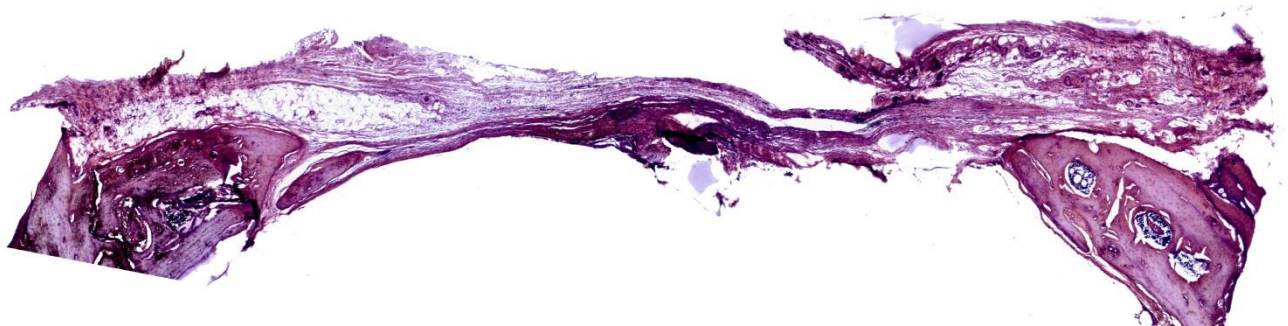


Figura 7 – Grupo Coágulo Membrana aos 60 dias.

2 Análise Histométrica

A área de osso neoformado (AON) em μm^2 dos grupos GC e GCM foi similar, sem diferenças estatisticamente significante. (Tukey, $p=0,815$). (Tabela 3).

Tabela 1 – Comparação entre os Grupos experimentais

Comparisons for factor: GRUPO					
Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
GC vs. GCM	27999270,244	3	0,865	0,815	No

Aos 7, 30 e 60 dias não foram observadas diferenças no parâmetro AON entres os grupos (Tukey, $p>0,05$) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 2 – Comparação entre grupos aos 7 dias

Comparisons for factor: GRUPO within 7					
Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
GC vs. GCM	11339444,215	3	0,202	0,989	No

Tabela 3 – Comparação entre os grupos aos 30 dias.

Comparisons for factor: GRUPO within 30					
Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
GCM vs. GC	30311167,006	3	0,541	0,923	No

Tabela 4 – Comparação entre os grupos aos 60 dias.

Comparisons for factor: GRUPO within 60					
--	--	--	--	--	--

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
GC vs. GCM	102969533,525	3	1,837	0,405	No

DISCUSSÃO

Com o desenvolvimento do conceito de osteopromoção por meio das membranas, diversos trabalhos (DAHLIN et al. 1988; DAHLIN et al. 1990; MINABE et al. 1993; SCHENK et al. 1994; ZITZMAN, 2001; von ARX et al. 2005; von ARX & BUSER 2006; BUSER et al. 2006; BUSER 2010; ROTHAMEL et al. 2007) foram publicados demonstrando as diferenças entre as membranas não absorvíveis e as reabsorvíveis. No final da década de 80 início dos anos 90, quando surgiu a técnica da Regeneração Tecidual Guiada, membranas não absorvíveis foram desenvolvidas e melhoradas sendo usadas como barreira física. Quando se realiza a regeneração tecidual guiada especificamente no tecido ósseo, a técnica passa a se chamar de Regeneração Óssea Guiada – ROG (BUSER 2010). A membrana de politetrafluoretileno estendido (e-PTFE) tem mostrado melhores resultados, contudo esta tem a necessidade da realização de um segundo tempo cirúrgico para remoção da mesma (DAHLIN et al. 1988; DAHLIN et al. 1990; MINABE et al. 1993; SCHENK et al. 1994).

Além de evitar o colapso que favorece a invasão e proliferação do tecido conjuntivo, exercendo sua função de barreira, as membranas utilizadas em ROG tem que apresentar alta biocompatibilidade levando melhoria de uma angiogênese para obter sucesso clínico da regeneração tecidual. Estudos recentes, pesquisando especificamente a cicatrização da ferida, mostra que ocorre menos deiscências do tecido mole na presença de membranas reabsorvíveis quando comparadas as não reabsorvíveis além de uma resposta inflamatória reduzida. Ela também explora sua adesão ao defeito e suas propriedades flexíveis e hidrofílicas (ZITZMAN et al. 2001; von ARX et al. 2005; von ARX & BUSER, 2006; ROTHAMEL et al. 2007).

Um dos métodos utilizados para avaliação da osteopromoção ocorre por meio da confecção de defeitos críticos (não se reparam espontaneamente) e o uso de membranas. Na metodologia deste trabalho confeccionou-se defeito crítico de 7 mm na calvária de ratos sobre o qual foi utilizada a

membrana de cortical bovina reabsorvível diretamente sem a interposição de anteparo ou de biomaterial que mantivesse o espaço biológico. Os resultados obtidos demonstraram que esse tamanho de cavidade não consegue reparar espontaneamente, conforme demonstrado no Grupo Coágulo Sanguíneo, uma vez que tanto aos 30 como aos 60 dias a quantidade de neoformação óssea obtida não foi suficiente para fechar completamente o defeito ósseo criado.

A membrana absorvível utilizada nesse trabalho, cortical de osso bovino (Gen-Derm®), foi desenvolvida para eliminar a cirurgia de reabertura para retirada da mesma, reduzindo a morbidade, aumentando o conforto para os pacientes (TAGA, et al. 2000). Os resultados histológicos demonstram que ela foi reabsorvida completamente no período de 60 dias, permitindo crescimento ósseo por osteopromoção. Herculani et al., 2000, encontrou resultados semelhantes a este estudo em que a membrana de cortical bovina foi totalmente reabsorvida em períodos tardios sem reação de corpo estranho e processo inflamatório exagerado.

Na análise histométrica (aposição de osso neoformado) foi possível observar que não houve diferença estatisticamente superior ($p < 0,05$) entre o grupo coágulo e coágulo recoberto por membrana não foi estatisticamente superior, com resultados de neoformação óssea superiores para o Grupo Coágulo. Este fato pode ser explicado pelo processo de incorporação da membrana pelo tecido ósseo ser complexo e envolver diversos mediadores (ROTHAMEL et al. 2007). A falta da interposição da membrana por um biomaterial colaborou para a pequena neoformação óssea. Trabalho publicado (GE Y et al. 2010) avaliou o uso da membrana Bio-Gide®, com e sem associação ao Bio-Oss®. Após 12 semanas não foi observada diferença quando a membrana foi associada ao Bio-Oss® em comparação a membrana sem interposição do biomaterial.

No entanto resultados diferentes foram encontrados em um estudo clínico em humanos (JIANG BQ et al. 2010) que investigaram o resultado da regeneração óssea guiada em 29 pacientes que receberam 40 implantes em maxila anterior recobertos pela membrana de colágeno porcino (Bio-Gide®) e 26 pacientes que também receberam 40 implantes em maxila anterior sem proteção

da membrana. A espessura foi medida com paquímetro e a densidade determinada por exames radiográficos, que mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os implantes que receberam a membrana.

A manutenção do espaço biológico para que a neoformação óssea possa ocorrer é um fator que sempre deve ser avaliado. Estudo anterior (HURZELER et al. 1998) avaliou neoformação óssea em alvéolos de macacos, separados em grupo controle, grupo membrana nova reabsorvível, grupo com membrana nova reabsorvível mais Bio-Oss® e grupo membrana de e-PTFE mais Bio-Oss®. Após 6 meses a análise histométrica mostrou uma enorme diferença entre os que foram associados a colocação do Bio-Oss® e os que não o receberam biomaterial. No entanto quando utilizou-se o biomaterial Bio-Oss® com membrana reabsorvível ou não absorvível de e-PTFE, não foi encontrado diferença estatisticamente superior entre as duas. Este resultado sugere que o uso de membranas deve estar associado a algum biomaterial a fim de manter fisicamente espaço biológico para se obter o máximo da propriedade biológica da osteopromoção pelas membranas.

Para uma melhor compreensão dos resultados deste trabalho e inclusive, definição do mecanismo da neoformação óssea, das propriedades biológicas de osteopromoção e/ou osteocondução novas pesquisas devem ser realizadas associando-se esta membrana a biomateriais ou anteparos que potencializem a manutenção do espaço biológico.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados foi possível demonstrar que a membrana de cortical bovina reabsorvível apresentou comportamento biocompatível e foi reabsorvida no período de 60 dias, porém não proporcionou formação óssea superior quando comparado ao coágulo sanguíneo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo-Andrade R et al. Bases clínicas e biológicas da regeneração óssea guiada (ROG) associada à barreiras ou membranas. Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implantes. 2004; 11: 251-257.

Becker W, Dahlin C, Lekholm U, et al. Five-year-evaluation of implants placed at extraction and with dehiscences and fenestration defects augmented with ePTFE membranes:Results from a prospective multicenter study. Clin Implant Dent Relat Res 1999;1(1):27-32.

Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. Clin Oral Implants Research. 1990; 1(1): 22-32.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. J Oral Maxillofac Surg 1996; 54: 420-432.

Buser D. 20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry. Quintessence Publishing Co, 2^a edition, 2010

Cafesse RG et al. New Attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. Journal of Periodontology. 1988; 59(9): 589-594.

Carvalho PSP, Rosa AL, Bassi APF, Pereira LAVD. Biomateriais aplicados a Implantodontia. ImplantNews 2010; 7(3a): 56-65.

Cortellini P; Piniprato G; Tonetti MS. Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *J Periodontol* 1993; 64(4): 254-60.

Dahlin DC, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects guided tissue regeneration. *Plastic Reconstructive Surgery*. 1988; 81(5): 672-6.

Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1990; 24:13-19.

Ge Y, Feng H, Wang L. Application of a Novel membrane in the Treatment of Calvarial Defect in Rats. *J Biomater Sci Polym*, 2011; 22(18): 2417-29.

Hardwick R; Hayes B.K; Flynn C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. *Journal of Periodontology*. 1995; 66(6): 495-505.

Herculani PP, Cestari TM, Taga EM, Taga R. Enxertos xenógenos: tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. *Rev Bras Implantologia* 2000; 1: 7-14.

Hurzeler MB, Koal RJ, Naghsbandi J, Mota LF, Conradt J, Hutmacher D, Caffesse RG. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; 27: 315-320.

Imbronito AV; Chaves VEA; Todescan JI. Regeneração óssea guiada: revisão da literatura. Revista SOBRAPE. 2001 Mar1: 1-11.

Jiang BQ, Xu X, Liu X, Liu GL, Liang J. Clinical retrospective study on membrane guided bone tissue regeneration technique in dental implants in the anterior maxilla. Shanghai Kou Qiang Yi Xue, 2010; 19 (6): 586-9

Minabe M, Kodama T, Kogou T, Fushimi H, Sugiyama T, Takeuchi K, Miterai E, Nishikubo S. Clinical significance of antibiotic therapy in guided tissue regeneration with reabsorbable membrane. Periodontal Clin. Investigate. 2001; 23(1): 20-30.

Novaes Jr AB, Novaes AB. Regeneração óssea guiada. In Cirurgia periodontal com finalidade protética. São Paulo: Artes Médicas; 1999.

Phillips JH e Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft resorption. Plastic and Reconstructive Surgery. 1988; Nov; 82: 872-877.

Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. Clin Oral Implants Res 2005; 16: 369-378.

Schenk R.K, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. Int J Oral Maxillofac Implants. 1994; 9(1): 13-29.

Schmitz JP, Lemke RR, Zardeneta G, Hollinger JO, Milam SB. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a guided bone regeneration case report. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*. 2000; 58 (8): 888-893.

Souza FA, Aranega AM, Garcia-Jr IR, Benetti F, Bagio DM, Ferreira S, Oliveira WC, Nímia HH. Reconstrução imediata de fenestração peri-implantar por meio de enxerto autógeno em bloco obtido do ramo mandibular. *Implant News* 2015; 12(1): 33-37.

Zitzmann NU, Naf R, Scharer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:844-852.

Taga R, Hassunuma CY, Cestari TM, Ferreira PM. Destino de membrana de cortical óssea bovina colocada em posição subperióstica na calvária de cobaias. *Rev Bras Implant* 1997 nov-dez 24-29.

von Arx T, Broggin N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 843-853.

von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: A clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 359-366.

Wilson GJ e Weber BA. A compliant Corethane/Dacron composite vascular prosthesis Comparison with 4-mm ePTFE grafts in a canine model. J ASAIO. 1993; 39(3): 526-531.

ANEXOS

Comitê de Ética em Experimentação em Animais

