



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



André Luiz dos Santos

**“Avaliação de membrana
experimental implantada em
cavidade cirurgicamente
confeccionada em calota
craniana de coelhos. Estudo
histológico.”**

Araraquara 2010



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



André Luiz dos Santos

**“Avaliação de membrana
experimental implantada em
cavidade cirurgicamente
confeccionada em calota craniana
de coelhos. Estudo histológico.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para o do Título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: *Prof^a. Dr^a. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli*

Araraquara 2010

Santos, André Luiz dos

Avaliação da membrana experimental implantada em cavidade cirurgicamente confeccionada em calota craniana de coelhos. Estudo histológico / André Luiz dos Santos.– Araraquara: [s.n.], 2010.

103 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador : Profa. Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli

1. Regeneração óssea 2. Crânio 3. Coelhos I. Título

André Luiz dos Santos

“Avaliação de membrana experimental implantada em cavidade cirurgicamente confeccionada em calota craniana de coelhos. Estudo histológico.”

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof^a Dr^a Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli

2º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

3º Examinador: Prof. Dr. Alexandre Elias Trivellato

Araraquara, 31 de março de 2010.

Dados Curriculares

NASCIMENTO 08/10/1976 – Avaré/SP

FILIAÇÃO José Benedito dos Santos

Maria Helenice Pedro dos Santos

2003-2006 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP

2008-2010 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP

Dedicatória

À Deus, por ter me dado forças nos momentos mais difíceis desta jornada, além de me ajudar a entender e superar minhas limitações.

Aos meus pais Maria Helenice e José Benedito, por serem um exemplo de dois batalhadores e nutrirem pelos filhos um amor incondicional. Sou uma pessoa abençoada por tê-los como pais. Sou grato pela confiança e amor que depositam em minha pessoa.

Agradecimentos especiais

A Bruna pelo carinho, amor e atenção que me ajudaram durante a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos Leila e César que de certa forma me ajudaram a seguir esta jornada. Sem a união da família nada disso seria possível.

A minha sobrinha, querida Lorena. Você sabe que pode contar com o tio para qualquer coisa.

Agradecimentos

A professora Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli, pela dedicação, paciência e disposição para ser minha orientadora. Além da dedicação voltada a sua profissão. Sou grato pela confiança e atenção.

Ao professor Dr. Valfrido Pereira filho, como meu co-orientador, ajudou durante o curso proporcionando o meu desenvolvimento científico. Obrigado pela confiança e amizade.

Aos professores doutores Eduardo Hochuli Vieira e Alexandre Elias Trivellato por terem aceitado participar da comissão julgadora desta dissertação.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de seu Diretor, Prof.Dr. José Cláudio Martins Segala e de sua Vice-Diretora, Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de Periodontia,
Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela formação e exemplos profissionais.

Em especial à Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico pelo apoio, carinho e atenção.

Aos amigos do curso de pós-graduação, nível de mestrado, Alliny, Andressa, Chaine, Guilherme, João, Leila, Lívia, Lucas, Mariana, Michele, Samia, Telma (Tetê).

Ao alunos do doutorado: Rubens (Rubão), Humberto, Ana Lucia (Naná), Shelon, Rodrigo, Rafael Faeda e demais amigos por sempre, de alguma forma, estarem dispostos a me ajudar.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, Claudia, Sra. Maria do Rosário, Sra. Teresa, Maria Jose (Zezé), Regina Lúcia e Ester, pela atenção, dedicação, carinho e respeito com que sempre me trataram.

A Sueli, Silvana, Telma e Toninho e demais funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia.

A Claudia (Claudinha), Pedrinho pela ajuda na confecção dos cortes histológicos apresentados neste trabalho.

Ao professor Carlos Benatti Neto e ao técnico José Antonio Sampaio Zuanon do Departamento de Patologia, por estarem dispostos para me auxiliar e também pelo conhecimento compartilhado.

A Sybele Saska doutoranda em Biotecnologia, obrigado por dispor do teu tempo para dividir seu conhecimento e auxiliarme no trabalho, isto foi fundamental.

A todos residentes do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia desta faculdade, em especial ao Marcos Dantas e Ricardo, obrigado pelo apoio e amizade.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação: Sra. Mara Cândido, Alexandre, Flávia e Rosângela pela ajuda e atenção.

Aos funcionários da Biblioteca, Maria Helena, Ceres, Odete, Eliane, Inês, Adriano e Silvia. Obrigado pela amizade, consideração e momentos de descontração.

Aos meus amigos Andressa Vilas Boas, André Gustavo Paleari e Cláudio por me ajudarem em todos os momentos. Tem uma frase de Sócrates sobre a amizade que diz: “Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolver em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos.” E eu admiro muito vocês.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização desta etapa.

A CAPES pelo apoio financeiro, com o qual se tornou viável minha permanência em Araraquara, além de poder concretizar este trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	10
Resumo.....	14
Abstract	17
INTRODUÇÃO.....	19
REVISÃO DA LITERATURA	25
PROPOSIÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODO	44
RESULTADO	56
DISCUSSÃO	72
CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	101

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
FIGURA 1 – Material cirúrgico utilizado para a realização das cirurgias	54
FIGURA 2 – Contra-ângulo e fresa trefina de 6mm de diâmetro	54
FIGURA 3 – Defeitos ósseos confeccionados com 6mm de diâmetro na calota craniana de coelho	54
FIGURA 4 – Osso autógeno particulado para utilização do preenchimento das cavidades cirúrgicas	54
FIGURA 5 – Osso autógeno posicionado no defeito ósseo do lado direito	55
FIGURA 6 – Posicionamento da membrana experimental recobrimdo os defeitos.....	55
FIGURA 7 – Peça reduzida da calota craniana para processamento histológico	55

FIGURA 8 – Grupo I (membrana experimental + osso autógeno), após período de 07 dias . 400x (HE) Tecido conjuntivo denso (✦), Vasos Sanguineos (VS), Fibroblasto (○).....	57
FIGURA 9 – Grupo I (membrana experimental+osso autógeno), 07 dias. 50x (HE). Fragmentos ósseos (➤) no centro do defeito, infiltrado inflamatório mononuclear (IM)	58
FIGURA 10 – Fotomicroscopia grupo I (membrana experimental+osso autógeno), após período de 07 dias. 200x (HE). Limite da parede do defeito ósseo (➤), matriz óssea em grande quantidade (MO)	59
FIGURA 11 – Grupo II (membrana experimental + coágulo), período de 7 dias. Aumento de 400x (HE), TC: Tecido conjuntivo denso com presença de fibroblastos no seu interior (FB), vasos sanguineos em estase vascular (VS).....	60
FIGURA 12 – Grupo II (membrana experimental + coágulo), período de 07 dias. 50x (HE). Espaço ocupado pela membrana experimental (M); com resíduo do material da membrana(R), osteoblastos (OB) ao redor do limite do defeito..	61
FIGURA 13 – Grupo III (membrana de colágeno + osso autógeno), período de 7 dias, aumento de 50x (HE). Fragmento ósseo (FO). Área hemorrágica (→). Trabéculas ósseas (TO). Limite da parede do defeito (LM). Infiltrado inflamatório moderado (IF). Tecido conjuntivo (TC)	62

FIGURA 14 – Grupo IV (membrana de colágeno + coágulo) período 7 dias, aumento de 100x (HE). Limite da parede do defeito (LM). Trabéculas ósseas (TO) com osteócitos no seu interior (OC). Processo inflamatório discreto com macrófagos presentes (IF). Tecido conjuntivo (TC)..... 63

FIGURA 15 – Grupo I (membrana experimental + osso autógeno), período 30 dias, aumento de 100x (HE). Formação óssea trabecular desorganizada (→) com osteócitos no interior (OC). Tecido conjuntivo fibroso (TC). Infiltrado inflamatório mononuclear (IF)..... 64

FIGURA 16 – Grupo II (membrana experimental + coágulo), período de 30 dias, aumento de 50x (HE). Espaço envolto em cápsula fibrosa (M). Limite da parede do defeito (LM). Área hemorrágica (H). Processo inflamatório (IF). Formação óssea na lateral do defeito (ON) 65

FIGURA 17 – Grupo III (membrana colágena + osso autógeno), período 30 dias, aumento de 100x (HE). Limite da parede do defeito (LM). Hiperemia vascular (→). Osso neoformado (ON) 66

FIGURA 18 – Grupo IV (membrana de colágeno + coágulo), período de 30 dias, aumento de 100x (HE). Tecido conjuntivo com padrão de fibras horizontais (TC). Osteoblastos (OB). Formação de fibrose (F). Vasos sanguíneos (VS)..... 67

FIGURA 19 – Grupo I (membrana experimental + osso autógeno), período de 120 dias, aumento de 50x (Tricrômio de Masson). Presença de osso neoformado e denso. Área com sistema haversiano (SH) 68

FIGURA 20 – Grupo II (membrana experimental + coágulo), período de 120 dias, aumento de 50x (HE). Cápsula fibrosa preenchendo o espaço onde existia a membrana experimental (M). O restante da cavidade preenchida com osso neoformado. Osteócitos (OC). Fibras Colágenas (FC)..... 69

FIGURA 21 – Grupo III (membrana de colágeno + osso autógeno), período 120 dias, aumento de 100x (HE). Vaso Sanguíneo (VS). Osteócito (OC)..... 70

FIGURA 22 – Grupo IV (membrana de colágeno + coágulo), período de 120 dias, aumento de 50x (Tricrômio de Masson). Área do defeito totalmente preenchida por osso Osteócitos (OC)..... 71

Resumo

Santos AL. Avaliação de membrana experimental implantada em cavidade cirurgicamente confeccionada em calota craniana de coelhos. Estudo histológico [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar histologicamente o comportamento de uma membrana experimental, de procedência nacional, membrana de Fluoreto de Polivinilideno-Trifluoreto/Cerâmica Titanato de Bário (PVDF-TrFE/BT) e comparar com os resultados da membrana de colágeno. Para tanto foram confeccionados defeitos ósseos de 6mm de diâmetro em calvária de coelhos.

Foram utilizados, um total de 30 coelhos, adultos machos, divididos em quatro grupos:

Grupo I: cavidade cirúrgica confeccionada no lado direito da calota craniana do animal, preenchida com osso autógeno e coberta pela membrana experimental de PVDF-TrFE/BT.

Grupo II: cavidade cirúrgica confeccionada no lado esquerdo da calota craniana do animal, preenchida com coágulo e coberta pela membrana experimental de PVDF-TrFE/BT.

Grupo III: cavidade cirúrgica confeccionada no lado direito da calota craniana do animal, preenchida com osso autógeno e coberta pela membrana de colágeno.

Grupo IV: cavidade cirúrgica confeccionada no lado esquerdo da calota craniana do animal, preenchida com coágulo e coberta pela membrana de colágeno.

Os animais foram eutanásia nos períodos de 07, 30 e 120 dias. Os espécimes foram tramitados para análise histológica.

O grupo I apresentou o melhor resultado em relação à consistência histológica do osso neoformado bem como acelerou o processo. Nos grupos I e II, a membrana experimental manteve o espaço do defeito para a reparação óssea. No grupo III e IV, a membrana de colágeno permitiu apenas que houvesse uma reparação parcial da cavidade cirúrgica confeccionada.

Por meio dos resultados obtidos, podemos concluir que: a utilização do enxerto ósseo proporcionou a formação de osso de melhor consistência com total reparação das cavidades ósseas; a membrana experimental apresentou melhor biocompatibilidade e qualidades compatíveis para uso como barreira para a Regeneração Óssea Guiada, enquanto que a membrana de colágeno serviu apenas para recobrimento do defeito.

Palavras-chaves: Regeneração óssea; crânio; coelhos.

Abstract

Santos AL. The evaluation of a novel membrane implanted into bone cavities in the rabbit calvarian. Histological study [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Abstract

The purpose of this study was to histologically evaluate the behavior of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate and compare the results with a collagen membrane. The defects were surgically created into the calvarian bone. The study used 30 adult, male rabbits were into from groups follow:

Group I – the bone defect of the right side was filled with autogenous bone graft and covered with the novel membrane.

Group II – the bone defect of the left side was filled with blood clot and covered with the novel membrane.

Group III - the bone defect of the right side was filled with autogenous bone graft and covered with the collagen membrane.

Group IV – the bone defect of the left side was filled with blood clot and covered with the collagen membrane.

The animals were sacrificed at 07, 30 and 120 days.

The results: The group I showed the better bone formation and the accelerated repair. The novel membrane kept the bone space to repair. In the group III and IV, the collagen membrane influenced the bone repair process, so the defects were partial filled by bone.

The conclusion: The autogenous bone grafts stimulated the osteogenesis; the novel and the collagen membranes showed biocompatibility and the novel membrane has quality to serve as Bone Gide Regeneration Process; the collagen membrane can be used to cover the grafts or implants materials.

Key-words: Bone regeneration; cranium; rabbits.

1 Introdução

1 Introdução

Durante a década de 80, uma série de estudos na Suécia documentou os princípios da “regeneração tecidual guiada” (RTG)^{7,47,60}. O princípio da RTG está baseado em restringir o crescimento do epitélio e do tecido conjuntivo gengival no defeito e permitir que somente células pluripotenciais do ligamento periodontal e osso proliferem na região do defeito.

Na década de 90, com a evolução dos implantes osseointegráveis, ocorreu o desenvolvimento da “regeneração óssea guiada” (ROG)^{5,15}, onde defeitos periodontais, defeitos causados pela extração dentária ou reabsorção óssea, puderam ser tratados para que posteriormente recebessem instalação de implantes osseointegráveis.

Atualmente, a regeneração guiada é usada como tratamento efetivo na reparação de diferentes tecidos, inclusive do tecido ósseo há mais de 20 anos²⁴. É uma técnica terapêutica comprovada tanto em estudos clínicos em seres humanos^{8,24,64}, como em estudos experimentais em animais^{26,53,68}. No caso da ROG é considerada uma técnica reconstrutiva que usa uma barreira para criar e proteger um espaço no qual o reparo do tecido pode ocorrer. Esse espaço deve ser mantido por todo o tempo do processo de reparação⁴¹. Apesar da eficácia do método, o que ainda gera grande discussão é quanto à escolha do tipo de barreira, mais comumente denominada de membrana. Para tal

finalidade e para elucidar este fato há atualmente vários estudos sobre o uso de diferentes membranas na regeneração óssea^{65,76-77}.

Não só o comportamento da própria membrana, mas o tipo do defeito ósseo e a situação clínica vão influenciar na escolha da membrana.

Existem membranas reabsorvíveis, por exemplo, de ácido glicólico, colágeno ou polímeros de lactato. Dependendo de sua composição, o tempo de reabsorção pode ser mais ou menos longo. As vantagens dessas membranas é que não exigem necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para a remoção da mesma, apresentam propriedades hidrofílicas o que as tornam fáceis de serem manipuladas e, são muito menos suscetíveis à infecção quando expostas. A grande desvantagem da membrana reabsorvível é a ausência da capacidade de manutenção de espaço ao longo do período de reparação tecidual⁴¹. Portanto, o seu emprego está mais associado à proteção de enxertos ósseos particulados ou implantes; para preenchimento de defeitos ósseos; cobertura de enxertos ósseos em bloco ou para áreas de extração dentária que tenham suficiente número de paredes.

As membranas de colágeno parecem atender bem aos propósitos da regeneração de tecidos periodontais, da mesma forma que têm sido amplamente utilizadas como cobertura em defeitos ósseos preenchidos com algum tipo de material biológico⁸¹. Essa membrana apresenta um potencial de reabsorção proveniente de um processo de

degradação ou fagocitose que pode iniciar-se após algumas semanas da instalação da mesma^{61,68,87}.

Já as membranas não reabsorvíveis apresentam necessidade de remoção e estão associadas à alta incidência de deiscência do tecido mole e conseqüente exposição da mesma, levando, freqüentemente, a resultados desfavoráveis e infecção⁴¹. Podem também apresentar resultados muito pobres quando ocorrem micromovimentos na sua superfície, principalmente no que diz respeito à migração de fibroblastos através dos tecidos⁶⁵. São consideradas inadequadas para serem usadas em grandes reconstruções ósseas devido às suas propriedades inertes no auxílio da formação óssea⁷⁵. Dentre as membranas não reabsorvíveis utilizadas, podemos citar a mais recomendada, a membrana de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), um material de teflon, macio e de fácil manipulação. Apresenta excelentes resultados do ponto de vista de biocompatibilidade³⁰, bem como o uso satisfatório deste material na Regeneração Tecidual Guiada (RTG) e posterior Regeneração Óssea Guiada (ROG)⁵⁹. Outro fator muito importante na utilização da e-PTFE é o seu alto custo o que na maioria das vezes torna sua utilização inviável.

Um material ideal apresentaria adequadas propriedades mecânicas e de biocompatibilidade para que ocorra uma regeneração favorável do tecido ósseo. Os polímeros apresentam características como: resistência, flexibilidade e fácil processamento. Por

outro lado, as cerâmicas apresentam forte resposta piezoelétrica⁹, fenômeno físico no qual alguns materiais submetidos a uma pressão mecânica respondem com a geração de cargas elétricas. Os ossos possuem essa característica e seu crescimento está associado à piezeletricidade. Partindo desses princípios, é possível que a combinação de polímero e de uma cerâmica resultasse em um compósito com potencial favorável de ser usado como barreira para regeneração guiada.

Por conta destas características, Gimenes et al.³⁶ em 2005, desenvolveram uma membrana experimental a partir de um compósito formado pela união de dois polímeros (copolímero) PVDF-TrFE (fluoreto de polivinilideno-trifluoretileno) e pela cerâmica titanato de bário (BT), fabricada no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, unidade de Araraquara. Em estudo experimental realizado por Beloti et al.⁹ em 2006, essa membrana apresentou melhor biocompatibilidade, *in vitro*, quando comparada com a membrana de e-PTFE. De fato, a membrana de PVDF-TrFE/BT ao final do estudo em cultura de células *in vitro* apresentou no meio de cultura a presença de formação nodular semelhante ao osso em um estágio final da osteogênese. Por essa razão, imaginamos que a membrana de PVDF-TrFE/BT (membrana experimental) poderia ser testada como um biomaterial alternativo para ser utilizado na ROG, lembrando que se trata de um material nacional com grande potencial, inclusive com possibilidade de custo viável.

Assim, julgamos oportuna a realização desse trabalho que tem o objetivo de realizar um estudo “*in vivo*” para comparar a membrana não reabsorvível de PVDF-TrFE/BT (membrana experimental) com a membrana reabsorvível à base de colágeno, verificando os resultados quanto ao comportamento, a biocompatibilidade e a capacidade de auxiliar na regeneração óssea guiada.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O avanço científico tem se desenvolvido com vertiginosa velocidade em diversos campos, isto pode ser evidenciado na área da saúde por meio de novas técnicas e metodologias criadas. Um exemplo é a busca incessante na recuperação e regeneração de tecidos perdidos. Dentre as técnicas consagradas cientificamente temos a regeneração óssea guiada (ROG), com uso de membrana servindo como barreira que é o meio mais aplicado na recuperação e reparação do tecido ósseo.

Dahlin et al.²⁶, em 1989, estudaram a possibilidade do uso da regeneração tecidual guiada para gerar osso nas partes expostas dos implantes de titânio. Nesse estudo, foram utilizados 15 coelhos e 30 implantes de titânio colocados em tíbias. As partes expostas dos implantes foram cobertas por membranas de e-PTFE. Os resultados mostraram que nos locais onde foram colocadas as membranas as roscas dos implantes foram cobertas por uma significativa quantidade de osso neoformado, indicando que a técnica da membrana é um método cirúrgico para se criar osso ao redor de partes expostas de implantes de titânio.

Gelb et al.³⁵, 1993, acompanharam 35 pacientes com 50 implantes imediatos pelo período de 3 anos. Foram utilizados 3 modalidades de tratamentos: 1) implante alógeno de osso liofilizado desmineralizado (DFDBA); 2) Membrana de e-PTFE e 3) Combinação de ambos os tratamentos. A morfologia dos defeitos ao redor dos implantes foi dividida em: defeitos sem parede; defeitos com três paredes e defeitos circunferenciais. Os autores verificaram que tanto a osseointegração como a regeneração foi obtida nos três tipos de defeitos. Porém, nos defeitos de 3 paredes e nos circunferenciais o tratamento com a utilização

da membrana de e-PTFE forneceu uma condição mais favorável para a regeneração óssea e cobertura por osso das roscas dos implantes.

Schenk⁶⁸, em 1994, caracterizou o padrão de regeneração óssea em defeitos considerados de tamanho grande que foram protegidos por membranas, em mandíbulas de cães. Foram comparadas duas qualidades diferentes de membranas de e-PTFE, com diferente rigidez. Após o período pós operatório de 2 e 4 meses, as áreas tratadas sem membrana e, que serviram como grupo controle, apresentaram reparação óssea incompleta com persistência do defeito. Outro dado observado é que a regeneração óssea não foi concluída dentro do período de 4 meses. Com base nessas informações, o autor sugere que um período maior é necessário em defeitos maiores para que ocorra a reparação óssea por completo. Além disso, observou que o uso das membranas promoveu melhor regeneração do tecido ósseo visto que a técnica da regeneração óssea guiada exclui os tecidos não osteogênicos dos defeitos ósseos. O autor constatou que as membranas de e-PTFE com reforço preservaram a forma original do osso durante todo o tempo de reparação, enquanto que as membranas de e-PTFE sem reforço apresentaram colapso parcial.

Becker et al.⁸, 1994, produziram em um estudo piloto volume ósseo por meio da regeneração óssea guiada (ROG) para colocação de implantes. A técnica utilizada consistia do uso de pinos absorvíveis para segurar a membrana de e-PTFE, evitando o seu colapso para dentro dos defeitos. Os três defeitos tratados neste estudo foram completamente preenchidos por osso neoformado e a colocação dos implantes foi bem sucesso. Biopsias dos lugares tratados revelaram neoformação óssea.

Hämmerle et al.³⁹, em 1995, determinaram a dinâmica temporal do processo de reparação de defeitos ósseos de tamanho crítico, criados na calota craniana de coelhos e que foram tratados pelo método da regeneração óssea guiada (ROG). Foram realizados defeitos

ósseos de 15mm de diâmetro no osso parietal direito de 4 coelhos. Os defeitos foram cobertos por membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) que estenderam de 4 a 5 mm além do defeito. Os animais foram sacrificados nos períodos de uma, 2, 3 e 5 semanas pós-cirúrgico.

No período de uma semana já apresentava o início da regeneração óssea que podia ser vista radiograficamente como uma camada fina adjacente às bordas do defeito. Isto representava um aumento de 23% em relação ao defeito inicial. Já no fim do período da segunda semana houve um ganho adicional de novo tecido ósseo formado nas bordas do defeito o que representava um crescimento ósseo de quase 36%; na terceira semana as ilhotas ósseas formadas aproximaram-se da parte central do defeito, os resultados radiográficos indicaram 55% do defeito foi ocupado por um novo tecido ósseo. Na quinta semana, o exame radiográfico indicou uma maior aposição óssea nas margens e presença de múltiplas ilhotas de tecido ósseo espalhadas por toda área, ocupando 81% do defeito original. Os defeitos tratados apresentaram regeneração pelo crescimento ósseo a partir das margens do defeito e formação de ilhas ósseas dentro da área do defeito. O osso reparado apresentava características histológicas de osso intramembranoso.

Com o objetivo de avaliar e comparar histologicamente o processo de reparação de defeitos ósseos, criados cirurgicamente no osso parietal de ratos. Para isto, Bosch et al.¹⁰, em 1995, implantaram uma ou duas membranas de e-PTFE em um dos defeitos o outro lado, foi utilizado como controle onde ocorreu a reparação do defeito espontaneamente. Neste estudo foram utilizados 29 ratos. No osso parietal destes animais foram realizados defeitos ósseos bilaterais com 5 mm de diâmetro. Os animais foram divididos em 2 grupos: 1- Grupo com dupla membrana de e-PTFE (n=9) sendo que sobre o defeito do lado esquerdo foi colocada uma membrana na parte interna do defeito entre a dura-máter e o osso parietal e a outra membrana foi colocada na parte

externa do defeito logo abaixo ao perióstio; 2- grupo com membrana simples (n=20) esta foi posicionada somente externamente ao defeito esquerdo abaixo do perióstio. O lado direito dos defeitos foram utilizados como controle e nenhum tipo de tratamento foi aplicado. O sacrifício dos animais ocorreu após 30 dias o ato cirúrgico. A avaliação histológica seguiu os seguintes critérios: 1- ausência de fechamento do defeito ósseo; 2- fechamento parcial neoformação a partir das bordas do defeito sem estabelecer continuidade; 3- fechamento completo, continuidade óssea entre as bordas do defeito. O grupo controle apresentou basicamente preenchimento por tecido conjuntivo, todos os defeitos apresentaram ausência de fechamento com tecido ósseo. O grupo com membrana dupla apresentou 6 espécimes com fechamento completo dos defeitos, 2 espécimes com fechamento parcial e apenas um espécime não apresentou fechamento do defeito devido a uma infecção. O grupo com membrana simples 15 espécimes não tiveram o fechamento dos defeitos, 4 obtiveram fechamento parcial do defeito e apenas um espécime teve fechamento completo do defeito. O uso de membrana dupla aumentou a taxa de regeneração óssea neste modelo de estudo e a dura-máter parece não ter um papel fundamental no processo de regeneração óssea.

Schlegel et al.⁷⁰, 1997, avaliaram em estudos pré-clinico e clínico, as reações imunológicas da membrana de colágeno Bio-Guide. No estudo experimental, foram utilizadas as membranas Bio-Guide B e Bio-Guide®, subcutaneamente, em três e quatro coelhos, respectivamente. Para avaliação da resposta imunológica utilizando o teste imuno-enzimático ELISA, foram realizadas coletas de sangue nos períodos de 7 dias e 11 semanas. O estudo piloto clínico foi realizado em 6 pacientes, submetidos à ressecção bilateral na região dos molares que foram tratadas com a implantação de membranas de colágeno Bio-Guide®. Foi realizada avaliação radiográfica padronizada nos tempos de 3, 6, e 9 meses. Nesses pacientes, realizou-se coletas sangüíneas em

três períodos (primeiro: 8-15 dias; segundo: 16-30 dias; terceiro: 35-65 dias). Para a análise imunológica utilizou-se também o teste ELISA. O estudo experimental mostrou ausência de imunogenicidade das membranas Bio-Guide®, enquanto que as membranas Bio-Guide B, observou-se uma ligeira resposta imunológica e, portanto as membranas Bio-Guide B foram excluídas do estudo clínico. No estudo clínico também indicou à ausência de imunogenicidade da Bio-Guide® em humanos. Os resultados radiográficos do estudo clínico, no período de 9 meses, indicaram melhor reparação óssea. Clinicamente, não foi notada indução de resposta imunológica pela utilização das membranas de colágeno Bio-Guide® até o período de 9 semanas estudado .

Piattelli et al.⁶³, 1997, estudaram o período de reabsorção da membrana de polímero de hidroxiapatita por meio de análise histológica. Foram utilizados 07 coelhos para instalação de 03 mini-implantes na tíbia de cada animal. Foram criados defeitos de 03 mm ao redor dos mini-implantes. No total utilizaram 42 implantes em três situações clínicas diferentes: 1) implante e defeito (controle); 2) implante, defeito e membrana; 3) implante, defeito, Biocoral (material de preenchimento e membrana. Um animal foi sacrificado após uma semana de pós-operatório e, 02 animais foram sacrificados em cada um dos períodos 04, 06 e 10 meses. O polímero da membrana foi reabsorvido no período entre 4 e 6 meses, enquanto que a hidroxiapatita, começou a ser reabsorvida após o décimo mês. Os autores concluíram que a membrana de polímero de hidroxiapatita estudada poderia ser usada na regeneração tecidual guiada, porém deve ter extremo cuidado para transpor esses dados para situação clínica.

Aaboe et al.¹, 1998, realizaram um estudo para avaliar a possibilidade do material poligalactina 910 servir como membrana para ROG, comparando os resultados com a membrana de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE). Foram utilizados 40 coelhos divididos em 4 grupos experimentais e 1 grupo controle. Defeitos bicorticais de 15mm de

diâmetro foram realizados nos crânios dos animais. Dois grupos experimentais foram tratados por meio da utilização de uma membrana de e-PTFE associada a uma de poligalactina 910 (PG). Nos outros dois grupos experimentais foram utilizadas 2 membranas de e-PTFE e 2 membranas de PG, sendo que uma membrana era colocada na parte interna do defeito logo acima da dura-máter e, a outra colocada na parte externa recobrimdo o defeito ósseo criado. No grupo controle, os defeitos ósseos não receberam membrana. Os defeitos cobertos por uma ou duas membranas de PG foram invadidos por herniação do tecido cerebral, apresentando pouca quantidade de osso neoformado nas bordas do defeito. A parte restante do defeito foi preenchida com tecido conjuntivo fibroso. O tecido conjuntivo continha muitos vasos sanguíneos e consistia de ambas as fibras colágenas densa e frouxamente arranjadas. Os defeitos cobertos pela membrana externa de e-PTFE revelaram similar padrão de reparação. Os defeitos cobertos por duas membranas de e-PTFE mostraram um padrão de melhor de reparação óssea, porém de forma incompleta. O osso regenerado era osso lamelar em processo de remodelação. O padrão de reparação dos defeitos controles confirmou que o defeito criado era um defeito crítico. Nesse caso, os defeitos apresentaram-se preenchidos pela herniação do tecido cerebral, com discreta quantidade de tecido ósseo neoformado nas bordas do defeito e, o restante da cavidade preenchida com conjuntivo fibroso. A dura-máter fusionou-se com o tecido conjuntivo fibroso. Os autores concluíram que o material de poligalactina 910 não é recomendado para utilização como membrana para regeneração óssea guiada. A colocação de forma bicortical de membranas não garante completa reparação óssea do defeito de tamanho crítico na calvária de coelhos após 8 semanas.

Ito et al.⁴⁴, 1998, verificaram o comportamento de uma membrana bio absorvível e de uma não absorvível na regeneração óssea guiada, em 08 coelhos. Para isso foram implantados parafusos de titânio na calvária dos animais, um parafuso em cada osso parental. Os

parafusos foram cobertos de um lado com membrana bio absorvível (ácido polilático) e outra não absorvível (e-PTFE). Depois de 06 meses de pós-operatório, foi realizada a eutanásia e as biópsias foram tramitadas para estudo histológico e histomorfométrico. Não foram encontradas diferenças significativas entre as membranas bio absorvíveis e não absorvíveis. Os autores concluíram que membranas não absorvíveis com suficiente dureza poderia ser usada para obter um grande volume em espessura e altura óssea quando comparadas com as membranas bio absorvíveis, permitindo um melhor processo de regeneração óssea guiada.

Zitzmann et al.⁸⁶, 1999, avaliaram por meio de estudo retrospectivo, os parâmetros que podem influenciar no resultado do tratamento da regeneração óssea guiada (ROG). Dentre os resultados apontados os autores encontraram que a quantidade média de preenchimento ósseo (87%), utilizando membrana absorvível (Bio-Guide) em combinação com enxerto Bio-Oss é comparável com os resultados de estudos apresentados por diversos autores com o uso de membranas não absorvíveis do tipo e-PTFE.

Dupoirieux et al.³⁰, em 2001, compararam o uso de três tipos de membranas (e-PTFE não absorvível, absorvível de poligalactina e absorvível de colágeno derivado de casca de ovo) para melhorar a regeneração óssea defeitos de 6mm criados no crânio de ratos. O lado esquerdo da calota craniana, foi usado como controle e permaneceu vazio; o lado direito, foi usado com os materiais experimentais. Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo 1 (n=10) membrana de e-PTFE; grupo 2 (n=10) membrana de poligalactina 910; grupo 3 (n=10) membrana hidrolizada de casca de ovo. Os animais foram sacrificados após 60 dias para as análises radiográfica e histológica. Somente a membrana de e-PTFE demonstrou bons resultados tendo em 7 dos animais regeneração óssea parcial e em 3 amostras regeneração

completa. Quanto aos outros tipos de membranas, nenhum dos grupos mostrou regeneração óssea completa.

Neste artigo de revisão Triplett et al.⁷⁸, 2001, abordam o conceito de ROG (Regeneração óssea guiada) e discutem os mais variados tipos de membranas. Apresentam os dois principais tipos de membranas: as não biodegradáveis (e-PTFE) e as biodegradáveis (membrana de colágeno, polímeros sintéticos e membrana de osso desmineralizado). Os autores demonstram que a membrana de e-PTFE apresenta vantagem por permitir espaço adequado à regeneração óssea. Apontam como desvantagem, a possibilidade de deiscência da mucosa que recobre a membrana o que ocasionaria acúmulo de placa e infecção, além de apresentarem um alto custo. Já as membranas biodegradáveis como vantagens são de fácil uso, custo menor, boa biocompatibilidade, porém apresentam certo potencial de antigenicidade (membranas de colágeno), reação de corpo estranho (polímeros) e dificuldade de estabilização.

De acordo com Pallesen et al.⁶², em 2002, observaram o modo como o tamanho das partículas do osso autógeno particulado poderia influenciar no início da regeneração óssea. Foram realizados 4 defeitos ósseos de 6mm de diâmetro sobre a calota craniana de 15 coelhos. Dois defeitos foram preenchidos com osso autógeno de diferentes tamanhos de partículas: de 0.5 a 2mm³ e de 10mm³. Além disso, um dos defeitos utilizado como controle não foi preenchido. Todos os defeitos foram cobertos pela membrana e-PTFE. O sacrifício dos animais ocorreu no período de 7, 14 e 28 dias. Os defeitos preenchidos com as partículas de menor tamanho apresentaram maior formação óssea comparado aos que foram preenchidos com partículas ósseas de maior tamanho. Os autores concluíram que partículas de 0.5 a 2mm³ de tamanho são mais indicadas para o uso no processo de auxílio da regeneração óssea do que partículas de 10mm³.

Em estudo realizado em 2003 por Gosain et al.³⁷, com o objetivo de definir melhor os fatores que afetam a regeneração de defeitos ósseos, as seguintes hipóteses foram testadas: (1) verificar se a dura-máter e o tecido pericranial apresentam potencial osteogênico; (2) se a estratégia ideal para regeneração, óssea em defeitos de calvária iria variar entre animais jovens e adultos em função do potencial osteogênico da dura-máter e pericrânio. Foram utilizados 16 coelhos jovens com 6 semanas e 16 coelhos adultos, entre 8 e 12 semanas. Foram criados defeitos ósseos bilaterais de 10x10mm no crânio destes animais. Os defeitos foram divididos em grupo 1, controle, onde nenhum tipo de membrana foi utilizado para cobrir o defeito; grupo 2, membrana de e-PTFE (defeito foi coberto pela membrana na área pericranial e outra membrana na região da dura-máter); grupo 3, o defeito foi coberto por uma membrana na região pericranial somente e grupo 4, uma membrana de e-PTFE foi colocada recobrimdo a região da dura-máter. Os autores concluíram que:

- os animais mais jovens apresentaram regeneração óssea mais acelerada;
- os estudos devem quantificar a regeneração óssea por avaliação histométrica em vez de depender de medidas subjetivas de defeitos reparados contra defeitos não reparados;
- o osso neoformado da região central deveria ser, separadamente, quantificado em relação àquele da periferia do defeito, isto porque o mecanismo de formação óssea para cada um dos grupos de animais parece ser diferente.
- as diferentes porosidades da membrana deveriam ser investigadas. A membrana ideal deveria bloquear a invasão do tecido mole para o interior da cavidade óssea e ainda, permitir a ação de proteínas osteoindutivas. Se isto pudesse ocorrer, a reparação óssea dos defeitos nos animais adultos poderia ser acelerada, colocando ambas as membranas de e-PTFE nas regiões de dura-máter e pericranial para

bloquear a invasão dos tecidos moles adjacentes, beneficiando as propriedades biológicas que os tecidos da dura e o pericrânio demonstraram na formação óssea.

Thomas Von Arx⁸¹, em 2005, avaliou um novo protótipo de membranas (colágeno de origem suína tipo I e III, física e quimicamente cruzadas). Foi avaliado o tempo de degradação da membrana e a resposta tecidual após a cobertura de defeitos circulares realizados na calvaria de coelhos. Os resultados foram comparados com os resultados das membranas de colágeno e de polímeros sintéticos, clinicamente disponíveis até aquele momento. Para tanto, o autor utilizou 20 coelhos com 4 diferentes períodos de sacrifício, 02, 06, 12 e 28 semanas. Foram realizados 06 defeitos ósseos circulares de 4mm de diâmetro por 1,5mm de profundidade na calvária dos coelhos. Os defeitos foram cobertos com 06 diferentes tipos de membranas sendo 03 protótipos de membranas de colágeno (VN p; VN c/Em; VN c/E) , membrana de colágeno Bio-Guide (BG), carbonato de glicolidio-lactídiotrimetileno Osseoquest (OQ), e membrana polilactidio Atrisorb (AS).

Todas as membranas de colágeno foram encapsuladas por tecido fibroso com diferenciação de um tecido semelhante ao perióstio sobre a superfície óssea externa. O autor refere que investigações experimentais têm mostrado que a degradação do colágeno pode iniciar dentro de dias ou semanas. Esse fato foi confirmado por esse estudo, contudo um dos protótipos de colágeno, que foi modificado quimicamente, exibiu prolongada integridade e ausência de uma resposta tecidual inflamatória.

Por meio do estudo realizado em 2006 por Queiroz et al.⁶⁵, os autores avaliaram histologicamente a reparação óssea em defeitos cirúrgicos na calota craniana de coelhos. Foram utilizados 30 coelhos que receberam osteotomias bilaterais nos ossos parietais com fresa trefina de 6mm. Os defeitos ósseos foram divididos em 04 grupos. No grupo 1 os defeitos ósseos não receberam nenhum tratamento; no

grupo 2 os defeitos ósseos foram preenchidos com osso bovino liofilizado; no grupo 3, foram preenchidos com osso bovino e cobertos com uma membrana de matriz óssea e no grupo 4, foram apenas cobertos com membrana de matriz óssea. Os animais foram sacrificados nos períodos de 15, 30 e 60 dias. Aos 60 dias a neoformação óssea no grupo 2 (osso bovino) não foi satisfatória quando comparada com o grupo 3 (osso bovino+membrana). Maior quantidade de osso neoformado foi observada na maturação no grupo 3. No grupo 4 as bordas da cavidade foram remodeladas, no interior da cavidade foi encontrado pequena quantidade de tecido ósseo neoformado e uma grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso. O uso de membrana poderia atuar como uma barreira contra a migração de células do tecido conjuntivo adjacente, criando condições favoráveis para angiogênese e neoformação óssea. No entanto não bastaria o uso de uma estrutura dura como foi demonstrado quando houve o uso da membrana sem material de preenchimento. O uso do enxerto ósseo bovino associado à membrana preservou o espaço da cavidade, ao evitar o colapso da membrana, resultando em maior capacidade osteogênica.

Develioglu et al²⁸ avaliaram em 2006 os resultados em longo prazo da reparação óssea por meio de defeitos de tamanho crítico criados experimentalmente no osso parietal de ratos. Em 12 ratos foram realizados defeitos ósseos de 6mm de diâmetro, bilateralmente, no osso parietal. O lado direito do defeito foi preenchido pela cerâmica de fosfato de cálcio e o lado esquerdo não foi preenchido por nenhum tipo de material e foi utilizado como controle do experimento. Após um período de 18 meses, os animais foram sacrificados e as peças preparadas para análise histológico. Os resultados em ambos os lados testados demonstraram a formação de tecido colagenoso denso. No local de fixação das membranas foi encontrada a presença de células gigantes, porém, não foi observado sinal de infecção ou necrose tecidual. A análise estatística não apresentou diferença significativa entre os grupos

avaliados quanto ao processo de formação óssea. O material em estudo era biocompatível, porém não demonstrou auxiliar na neoformação óssea.

Também em 2006, Jung et al.⁴⁶, averiguaram a possibilidade de aplicação ou não, *in situ*, de um hidrogel sintético constituído de Polietilenoglicol (PEG), utilizado como uma membrana biodegradável para regeneração óssea guiada (ROG) e se poderia resultar na mesma quantidade de osso regenerado comparado aos resultados do uso de uma membrana de Politetrafluoretileno expandido (e-PTFE). Em 8 coelhos brancos da raça New Zealand, foram realizados 4 defeitos de 6mm de diâmetro no osso craniano. Três modalidades de defeitos foram, igualmente, distribuídas entre os 32 defeitos: Controle positivo: 10 defeitos com grânulos de hidroxiapatita tricálciofosfato (HA/TCP) e membranas de e-PTFE; Controle negativo: 10 defeitos grânulos de HA/TCP, sem membranas; Teste: 12 defeitos com grânulos HA/TCP e membranas de PEG. Foi demonstrado que a membrana de PEG poderia ser utilizada para a técnica da regeneração óssea guiada (ROG) em defeitos de tamanho não crítico em crânio de coelhos. Após o término do tempo de reparação (4 semanas), por meio de análise histomorfométrica e microtomografia computadorizada, demonstraram quantidades similares de novo osso formado para os defeitos tratados com as membranas PEG comparada com defeitos tratados com membranas de e-PTFE padrão. Esses resultados foram confirmados pelos dados estatísticos que além disso, mostraram maior formação óssea nos defeitos tratados com membrana comparada aos tratados sem membrana.

Crea et al.²¹, 2008, por meio de estudo clínico prospectivo, controlado e, randomizado compararam o resultado do tratamento da periodontite crônica avançada por meio do uso da matriz derivada do esmalte (EMD) com os resultados obtidos pela regeneração tecidual guiada (RTG). Foram avaliados 40 pacientes com defeitos ósseos de 3 paredes com profundidade do defeito maior ou igual a 4mm.

O tratamento consistiu em RTG (n=20) e EMD (n=19). Foram utilizados os seguintes parâmetros clínicos: nível de inserção, profundidade de sondagem, recessão gengival, radiografias mostrando nível ósseo do defeito, índice de placa e sangramento gengival à sondagem. Esses parâmetros foram medidos no baseline e avaliados aos 12 e 36 meses após cirurgia. Ambos os tratamentos melhoraram os parâmetros clínicos. Foi demonstrada diferença estatística tendo como melhor resultado o EMD, porém a diferença absoluta entre os tratamentos foi pequena.

Ascherman et al.², em 2008, observaram em estudo histológico o comportamento do cimento de hidroxiapatita de rápido endurecimento (Mimix) associado ou não às placas absorvíveis (LactoSorb). Neste estudo foram utilizados 20 coelhos nos quais foram realizados defeitos ósseos de 10mm de diâmetro bilaterais na região parietal. Os animais foram divididos em dois grupos cada um com dez animais cada, sendo que, em um grupo, o lado esquerdo foi preenchido com apenas cimento de hidroxiapatita; no outro grupo, foi colada uma placa absorvível sob a base do defeito (dura-máter) que depois foi preenchida com cimento de hidroxiapatita. O lado direito de todos os animais não foi preenchido com nenhum material e serviu como controle. Os animais foram então sacrificados após um período de seis meses. Nenhuma evidência de reação inflamatória importante foi notada nesse período nos grupos testes ou controle. Foi detectada a presença de neoformação óssea na periferia dos defeitos preenchidos com o cimento de hidroxiapatita (Mimix).

Chiapasco et al.¹⁹, 2009, avaliaram os resultados clínicos de implantes dentários após a regeneração óssea guiada para correção de defeitos de deiscências/fenestrações associadas à instalação dos implantes. Foi realizada pesquisa nos bancos de dados Medline de estudos em humanos publicados em inglês, focada em tais procedimentos. Foram selecionados estudos que tinham pelo menos 10 pacientes com no mínimo 12 meses de acompanhamento após o início da

carga protética. Os autores avaliaram as complicações da ROG, sobrevida dos implantes e estabilidade do tecido mole marginal ao redor dos implantes. Foram utilizadas 7 publicações com um total de 238 pacientes que receberam 374 implantes e, cujos defeitos foram tratados com membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis associadas ou não a materiais de enxerto. Os pacientes foram seguidos de 01 a 10 anos após a colocação de carga sobre os implantes. Durante o período pós-operatório, 20% das membranas não reabsorvíveis e 5% membranas reabsorvíveis tiveram exposição e/ou infecção. Porém, na maioria dos casos houve completa ou quase completa cobertura do defeito inicial. A percentagem de sobrevida global dos implantes, independente do tipo de membrana e material de enxerto, foi de 95,7%. Foram observadas durante o período de acompanhamento ausência de modificações significativas da profundidade de sondagem e/ou alteração do nível de inserção clínica em torno de implantes. Apesar dos resultados favoráveis, os autores não chegaram a uma conclusão quanto ao material mais confiável de enxerto bem como a membrana de escolha para a correção da deiscência/fenestração, devido à pequena amostra de pacientes e variedade de materiais de enxertia e membranas utilizados isoladamente ou em combinação. Além disso, a falta de ensaios clínicos randomizados, demonstrou que os procedimentos de reposição sejam realmente necessários para permitir a sobrevivência dos implantes em longo prazo.

Kozlovsky et al.⁴⁸, 2009, avaliaram histologicamente a biodegradação de uma camada dupla da membrana de colágeno Bio-Guide (BG), comparado com uma de camada simples. Foram realizados dois defeitos circulares na calvaria, com 5mm de diâmetro em 24 ratos da raça Wistar. A membrana BG, marcada com biotina, foi cortada em discos de 5mm de diâmetro e colocadas nos defeitos. Os animais foram sacrificados depois de 4 ou 9 semanas. As membranas foram coradas com peroxidase-estreptavidina conjugados e carbazole aminoetil como substrato para a detecção do colágeno marcado com biotina. A área de

colágeno e da espessura das membranas foram medidas pelo software de análise de imagem. Análise estatística foi realizada usando o teste não paramétrico de Wilcoxon. O uso de uma camada dupla da membrana Bio-Guide mostrou um aumento da barreira da área de colágeno em espessura, comparada a aplicação de uma camada simples.

Em artigo de revisão Viateau et al.⁸⁰, em 2010, com o propósito de entender a estrutura e os resultados da técnica de membrana induzida com polimetilmetacrilato (PMM), avaliaram estudos que utilizaram basicamente dois tipos de modelos animais (coelhos e ovelhas). Em alguns desses estudos o espaçador polimérico facilitou um enxerto ósseo secundário de forma semelhante ao observado em casos clínicos em humanos. Os estudos evidenciaram que a membrana apresentaria características estruturais e propriedades biológicas podendo ser utilizada na engenharia tecidual óssea.

Sahoo et al.⁶⁷, 2010, em estudo clínico compararam e avaliaram os resultados do processo de cicatrização óssea em defeitos cranianos reconstruídos com enxertos de osso autógeno ou materiais aloplásticos. Foram utilizados 22 pacientes, 11 foram tratados com o uso de enxerto de osso autógeno da região craniana; 6, tratados com o uso de malhas de titânio e 5, com placas de polimetilmetacrilato. Após um acompanhamento de aproximadamente de 2 anos, verificou-se que os pacientes tratados com enxerto ósseo não apresentaram complicações e nem infecções pós-operatório. Já dos 5 pacientes tratados com as placas de polimetilmetacrilato, 3 casos tiveram exposição do implante e um caso apresentou infecção. Dos pacientes tratados com a malha de titânio, 2 casos apresentaram sensibilidade térmica e 1, infecção. Os autores concluíram que enxertos ósseos autógenos da região da calvaria apresentam melhores propriedades mecânicas, biológicas, e imunológicas e são a melhor opção para tratamento de defeitos ósseos.

De acordo com Barboza et al.³ em 2010, através de estudo clínico, avaliaram 420 pacientes e a manutenção do rebordo

alveolar destes com o uso da membrana de PTFE não expandido que foi mantida exposta intencionalmente. Estando ou não associada à enxerto ósseo liofilizado desmineralizado (DFDB). As membranas de PTFE não expandido foram colocadas logo após a exodontia com cuidado para que, durante o procedimento, não causasse trauma ao alvéolo dentário. Na maioria dos casos, as paredes ósseas, estava intacta (348). No entanto, em 72 casos havia ausência da parede vestibular; nestes casos foi utilizado o DFDB para evitar o colapso da membrana. A remoção das membranas ocorreu entre 21 a 28 dias após a cirurgia. Após um período que variou entre 3 a 6 meses nos locais que receberam as membranas foram colocados implantes. As membranas de PTFE não expandido quando colocadas sobre o alvéolo dentário logo após a extração fornece posteriormente melhores condições teciduais para inserção de implantes dentários.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Foi propósito do presente estudo, avaliar histologicamente o comportamento das membranas de Fluoreto de Polivinilideno-Trifluoreto / Cerâmica Titanato de Bário (PVDF-TrFE/BT) e de colágeno, utilizados para recobrimento de defeitos ósseos cirúrgicos críticos criados em calota de coelhos.

4 Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostras

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FOAR-UNESP (CEEA), processo de número 14/2008, que se encontra no Anexo 1.

Para realização do presente estudo foram utilizados 30 coelhos da raça *Oryctolagus cuniculus*, adultos, machos, com peso corporal variando entre 2 a 2,5kg. Os animais foram alimentados com ração sólida comercial (ração para coelhos Purina) e água “*ad libitum*”, com exceção das 12 horas de pré-operatório quando os mesmos permanecerão em jejum.

4.2 Distribuição dos grupos

Foram realizadas duas cavidades cirúrgicas na calvária de cada animal, sendo os animais divididos em quatro grupos de acordo com o tipo da membrana utilizada para recobrimento dessas cavidades ósseas confeccionadas e do material de preenchimento. São os grupos a saber:

Grupo I: a cavidade cirúrgica confeccionada no lado direito da calota craniana do animal, foi preenchida com osso autógeno e coberta pela membrana experimental de PVDF-TrFE/BT*.

*Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Unidade de Araraquara

Grupo II: a cavidade cirúrgica confeccionada no lado esquerdo da calota craniana do animal foi preenchida com coágulo sanguíneo e coberta pela membrana experimental de PVDF-TrFE/BT.

•**Grupo III:** a cavidade cirúrgica confeccionada no lado direito da calota craniana do animal, foi preenchida por osso autógeno e coberta pela membrana de colágeno*.

•**Grupo IV:** a cavidade cirúrgica confeccionada no lado esquerdo da calota craniana do animal foi preenchida com coágulo sanguíneo e coberta pela membrana de colágeno.

Os animais foram distribuídos de forma que houvesse um número total de 05 cavidades cirúrgicas para cada grupo, lembrando que cada calota craniana recebeu a confecção de duas cavidades cirúrgicas, lado direito e lado esquerdo, perfazendo um total de 30 animais, conforme quadro 1.

Os períodos estipulados de sacrifícios foram de 07, 30, 120 dias.

*Bioplate P- Indústria de Distribuição de Materiais, Curitiba-PA

Quadro 1 – Divisão dos grupos de acordo com os procedimentos realizados por período

	Região da loja cirúrgica	Material de preenchimento	Nº de Animais- Período 07 dias	Nº de Animais- Período 30 dias	Nº de Animais- Período 120 dias	Total de animais
Grupo I	Lado direito da calota craniana	Osso autógeno + membrana experimental	5	5	5	15
Grupo II	Lado esquerdo da calota craniana	Coágulo sanguíneo + membrana experimental				
Grupo III	Lado direito da calota craniana	Osso autógeno + membrana de colágeno	5	5	5	15
Grupo IV	Lado esquerdo da calota craniana	Coágulo sanguíneo+ membrana de Colágeno				
Total de animais			10	10	10	30

4.3 Procedimentos cirúrgicos

As cirurgias foram realizadas no centro cirúrgico da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária do Campus de Jaboticabal, UNESP. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob condições assépticas utilizando-se instrumental e campos esterilizados em autoclave (Dabi Atlante – Ribeirão Preto - SP), sob pressão de 15 libras e temperatura de 134 graus Celsius ($^{\circ}$ C) por um período de 20 minutos.

A região da calota craniana de cada animal foi escolhida como sítio para o emprego da pesquisa e foi utilizada a técnica cirúrgica descrita previamente³².

No cuidado pré-operatório imediato ao ato cirúrgico, ou seja, quinze minutos antes da anestesia geral cada animal recebeu 0,15ml/kg de Atropina a 1% (Laboratório Ariston – São Paulo – SP) em injeção intramuscular, para controle dos batimentos cardíacos. Decorrido este tempo, foi iniciada a anestesia geral por infiltração intramuscular de uma mistura de Cloridrato de Quetamina (Laboratório Cristália – Catanduva – SP) na dose de 10mg/kg e Cloridrato de Xilazina (Laboratório Coopers Brasil Ltda – Campinas – SP) na dose de 5ml/kg.

Após a anestesia, foi realizada tricotomia da região fronto-parietal. Em seguida os animais foram acomodados na posição ventral para em seguida realizar assepsia da região tricotomizada por meio da utilização de álcool iodado (Saneativo – Gama – Distrito Federal).

Com uma lâmina de bisturi nº. 15 (Becton & Dickison – Rio de Janeiro – RJ), montada em cabo de bisturi, foi realizada uma incisão no sentido sagital de aproximadamente 20mm de comprimento sobre a sutura inter-parietal. Após a incisão, foram expostos os ossos fronto-parietais, por meio de descolamento e rebatimento dos tecidos contendo epiderme, músculo e periósteo até expor a superfície óssea da

região, para este procedimento foi utilizado um descolador de Molt (Quinelato – Rio Claro – SP) (Figura 1).

Com uma trefina de 6mm de diâmetro interno (Neodent- Curitiba –PR) montada em contra-ângulo com redução de 16:1, acoplado a motor de implante (BML 600 Plus Driller – CK Driller - Brasil) e programado para 1500 rpm (Figura 2), foram realizadas as ostectomias nas regiões parietais em espessura total, bilateralmente. Respeitando a sutura mediana para que não houvesse penetração no seio sagital as cavidades de tamanho crítico¹⁷ foram confeccionadas e eqüidistantes uma da outra em cerca de 7 mm (Figura 3).

Durante toda a ostectomia foi utilizada irrigação abundante com solução fisiológica 0,9 % estéril (Fresenius Kabi – Ribeirão Preto). Os segmentos ósseos das ostectomias foram delicadamente removidos com descolador de Freer (Rhosse Instrumentos e Equipamentos Cirúrgicos – Ribeirão Preto - SP), mantendo-se a integridade da dura-máter e encéfalo.

Os defeitos do lado direito foram preenchidos com osso autógeno, já os defeitos do lado esquerdo foram preenchidos apenas por meio de coágulo sanguíneo.

O osso autógeno foi obtido a partir da trituração dos fragmentos de osso cortical retirados durante a confecção das cavidades ósseas. Os fragmentos ósseos removidos foram triturados por particulador ósseo (Neodent, Curitiba - PR) obtendo-se fragmentos da espessura total na ordem de 1,5mm de comprimento e 0,6mm de espessura (Figura 4), os quais foram mantidos em soro fisiológico até o momento de sua utilização para preenchimento das cavidades dos grupos I e III.

Após o preenchimento da cavidade cirúrgica com osso autógeno particulado (Figura 5) ou por meio do coágulo, de acordo com o grupo, a membrana experimental foi cuidadosamente posicionada

cobrindo os defeitos ósseos de forma a ultrapassar em cerca de 2mm além do diâmetro dos defeitos (Figura 6).

O mesmo procedimento foi realizado com a utilização da membrana de colágeno.

As membranas de colágeno apresentam-se em embalagens pré-estabelecidas.

As membranas experimentais sofreram um processo de esterilização em estufa 100°C por 40 minutos.

Após adaptação da membrana à cavidade óssea, com auxílio de uma pinça Dietrich (Rhosse Instrumentos e Equipamentos Cirúrgicos – Ribeirão Preto), o perióstio foi cuidadosamente reposicionado, sendo os planos profundos suturados com a utilização de fio polivícryl 5-0 (Ethicon – São José dos Campos – SP) e a pele suturada com fio de nylon 4-0 (Ethicon – São José dos Campos – SP), por meio de pontos interrompidos. Ao término da sutura, o local cirúrgico foi limpo com solução de álcool iodado.

4.4 Protocolo medicamentoso

Ao término da cirurgia foram administrados medicamentos para controle da dor e prevenir infecção pós operatória. Para tanto, foi utilizada a medicação Pentabiótico Veterinário (pó diluído em uma ampola de água de destilada estéril de 6 ml, contendo Benzilpenicilinabenzatina, procaína, potássica, diidroestreptomicina, estreptomicina) em dose única, para cada animal administrado por via intramuscular na proporção de 0,1ml/kg (Fort Dodge – Campinas – SP) e para controle da dor pós-operatória, Cloridrato de Tramadol, via intravenosa (4mg/kg) (Pfizer – São Paulo – SP) em dose única.

4.5 Desenvolvimento da membrana de PVDF-TrFE/BT

4.5.1 Obtenção da dispersão de P(VDF-TrFE)/ BT/DMF

Um compósito de resina virgem do copolímero PVDF-TrFE, bem como o polímero PVDF (Atochem-Arkema, Calvert City, USA), em forma de *pellets*, com diâmetro de 4mm, foi utilizado para confecção da membrana desse trabalho. Os *pellets* do copolímero foram prensados uni-axialmente a 50MPa, obtendo-se pedaços achatados com espessura de aproximadamente 0,5mm. Este procedimento foi empregado para aumentar a superfície de contato do copolímero, facilitando a solubilização do mesmo.

A mistura de polímero/copolímero foi solubilizada em Dimetilformamida (DMF, Mallinkrodt, Mexico) e dimetilfoacetamina (Synth, São Paulo) na proporção 50/50%. Após a dissolução da mistura polimérica DMF/DMA, acrescentou-se lentamente o pó de cerâmica denominado BT. Esta cerâmica é uma mistura de pós- cerâmicos micronizados/nanoparticulado de titanatos de bário, cálcio, titanato de bário e potássio, fosfato de calcio. A homogeneização da dispersão resultante foi realizada por agitação mecânica durante 2 horas à temperatura ambiente.

Os filmes do compósito PVDF-TrFe/BT foram preparados na fração polímero/cerâmica que produzissem resultados satisfatórios quanto: a elasticidade do filme, a homogeneidade da superfície, a biocompatibilidade de células ósseas (osteócitos) de origem humana.

4.5.2 Obtenção das Membranas

Em ambiente isento de partículas (sala limpa com pressão positiva), a dispersão P(VDF-TrFE)/BT/DMF/DMA é espalhada sobre substrato de vidro com auxílio de dispositivo. O uso do dispositivo permite um espalhamento uniforme da solução sobre o substrato, obtendo-se um filme bastante homogêneo em toda sua extensão, e com espessura controlada.

Placas de vidro com dimensões de 130x80x3mm foram utilizados como substratos. Os substratos foram limpos em banho de ultra-som, utilizando solução sulfocrômica e EXTRAN®.

Após deposição, o solvente foi evaporado a 120°Celsius/2horas em estufa sob a ação de vácuo. Posteriormente, os filmes foram retirados do substrato, padronizados quanto à homogeneidade superficial e espessura, e recortados na forma de membranas retangulares com tamanho padronizado de 60x60mm.

Dessa forma foram obtidas membranas de consistência homogênea de superfície lisa com dimensões de 8 a 10 mm de diâmetro.

As membranas experimentais foram submetidas a um processo de “esterilização” em estufa a vácuo (Fanem – Guarulhos – SP) a uma temperatura de 100°Celsius por 40minutos.

A membrana aqui descrita encontra-se em processo de patenteamento junto ao INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual – Rio de Janeiro, Brasil).

4.6 Eutanásia dos Animais

A eutanásia dos animais ocorreu pelo método da decapitação com uso de guilhotina nos períodos de 7, 30, 120 dias de

pós-operatório, perfazendo repetições de 5 animais para cada dois grupos, em cada período.

4.7 Processamento histológico

Após a eutanásia, as peças foram reduzidas de forma que a calota craniana fosse removida preservando-se os tecidos moles supraparietais bem como a dura-máter e parte do encéfalo (Figura 7). Os espécimes, assim obtidos, seguiram para processamento laboratorial de rotina onde foram fixados em formol de Lillie¹⁰ (formol tamponado a 10%) por 72 horas. A seguir, as peças foram submetidas a lavagem em água corrente e realização do início da descalcificação em solução de Morse (Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 50%)⁵⁸ que foi trocada a cada 48 horas, durante 60 dias. Após a descalcificação, os espécimes foram colocados em solução de Citrato de Sódio a 5% durante 3 dias, com trocas diárias da solução para a neutralização do ácido. Em seguida a essa etapa, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas para iniciar o processo de desidratação das peças em banhos crescentes de álcool (70º, 90º e álcool absoluto). As peças foram então, diafanizadas em xilol durante 3 horas e incluídas em parafina.

Foram obtidos cortes de 6µm (micrômetros) de espessura, corados em hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Masson para em seguida serem realizados os estudos histológicos das lâminas em microscopia óptica (Leica Reichert & Jung products, Germany), com a finalidade de avaliar a neoformação óssea ou fibrose; a permanência ou não das membranas e o grau de reação inflamatória, inicial ou crônica, no local cirúrgico. As imagens obtidas foram enviadas a um computador por meio de câmera de vídeo DXC-107A/107AP (Sony electronics Inc., Japão), acoplada ao microscópio óptico, para a descrição dos resultados.



FIGURA 1 – Material cirúrgico utilizado para a realização das cirurgias.

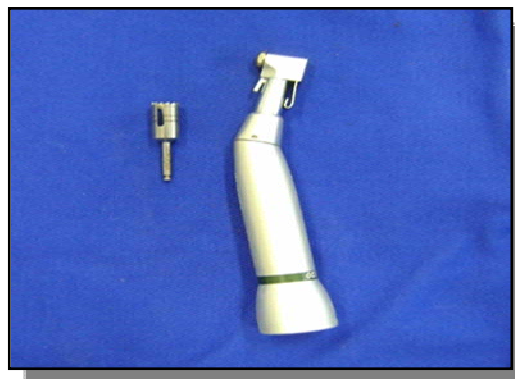


FIGURA 2 – Contra-ângulo e fresa trefina de 6mm de diâmetro.



FIGURA 3 – Defeitos ósseos confeccionados com 6mm de diâmetro na calota craniana de coelho.



FIGURA 4 – Osso autógeno particulado para utilização do preenchimento das cavidades cirúrgicas.

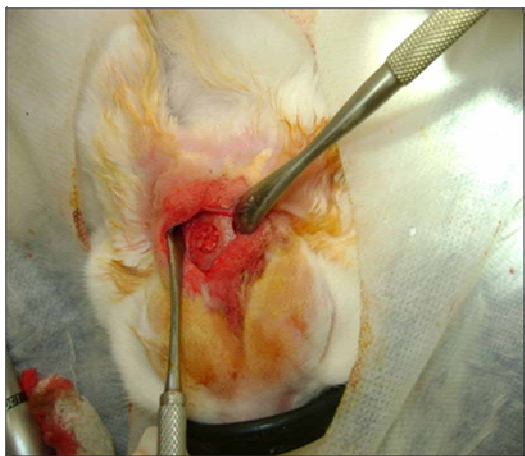


FIGURA 5 – Osso autógeno posicionado no defeito ósseo do lado direito.

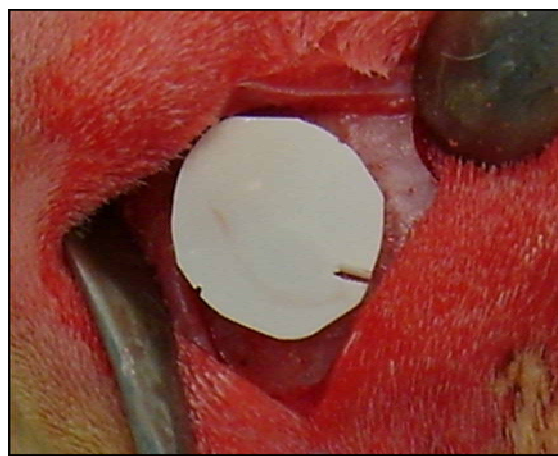


FIGURA 6 – Posicionamento da membrana experimental recobrindo os defeitos.



FIGURA 7 – Peça reduzida da calota craniana para processamento histológico.

5 Resultado

5 RESULTADO

Análise histológica

5.1 Período de 07 dias

5.1.1 Membrana Experimental e Osso autógeno

Pode- se observar a área do defeito ósseo preenchido com tecido conjuntivo com densidade colágena variável notando-se em sua base tecido conjuntivo denso com disposição regular de fibras dispostas horizontalmente (Dura-máter) (Figura 8).

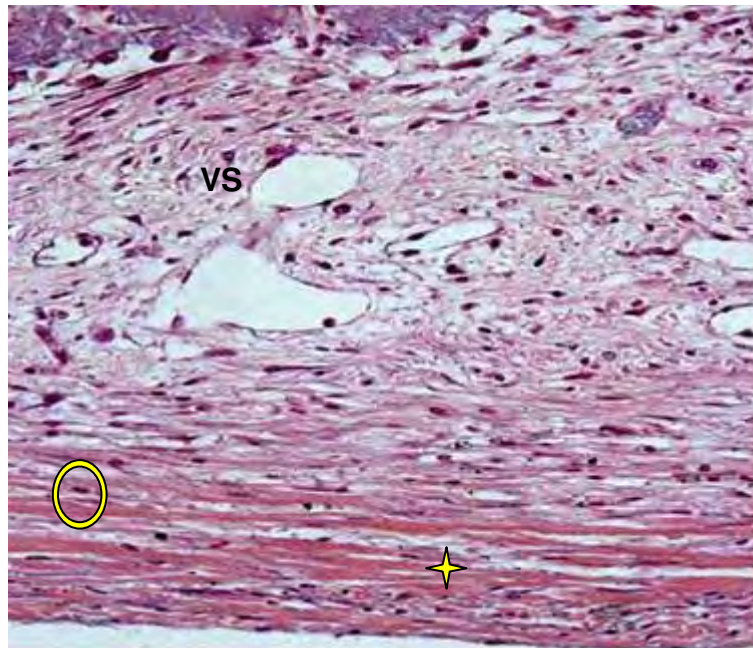


FIGURA 8 – Grupo I (membrana experimental + osso autógeno), após período de 07 dias . 100x (HE). Tecido conjuntivo denso (*), Vasos Sanguíneos (VS), Fibroblasto (O). Área superior da cavidade óssea (S) e área inferior da cavidade (I).

Em meio a esse tecido conjuntivo, observam-se fragmentos ósseos de vários tamanhos e irregulares, bem como, áreas hemorrágicas e infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 9).

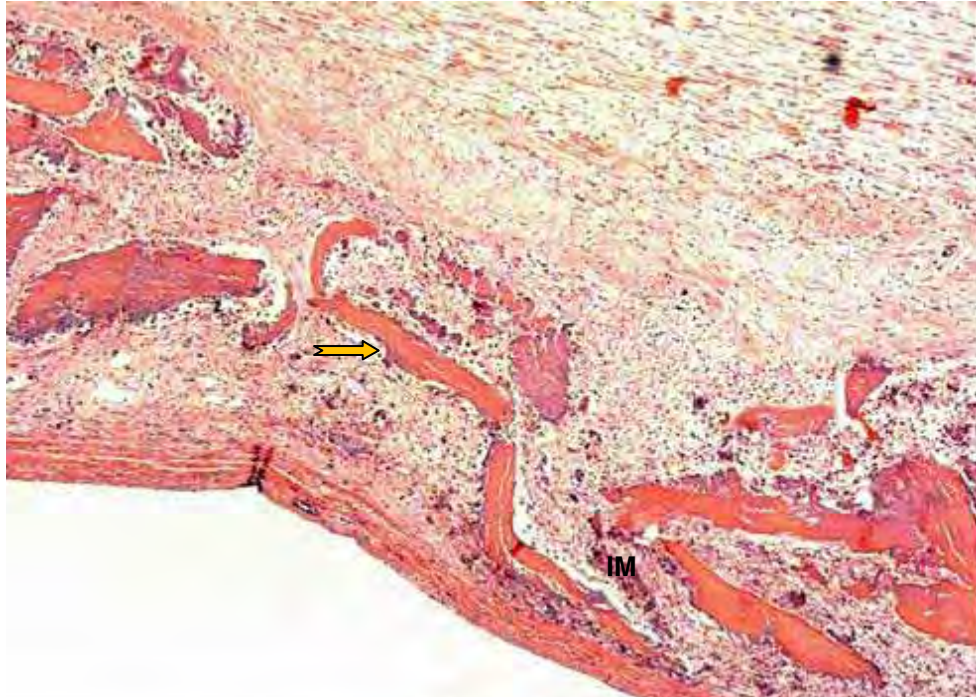


Figura 9 – Grupo I (membrana experimental+osso autógeno), 07 dias. 50x (HE). Fragmentos ósseos (➡) no centro do defeito, infiltrado inflamatório mononuclear (IM).

Próximo as laterais do defeito, nota-se a presença de estruturas que são compatíveis com matriz óssea e pequenos fragmentos ósseos sendo incorporados pelo tecido ósseo neoformado (Figura 10). A partir da linha demarcatória da lateral do preparo do defeito ósseo (linha de reversão), observa-se formação de matriz óssea em calcificação notando-se osteoblastos em seu interior e também osteoblastos dispostos periféricamente (Figura 10). Pode ser observada a formação de matriz óssea em maior extensão na região central e na região mais profunda do defeito (Figura 9).

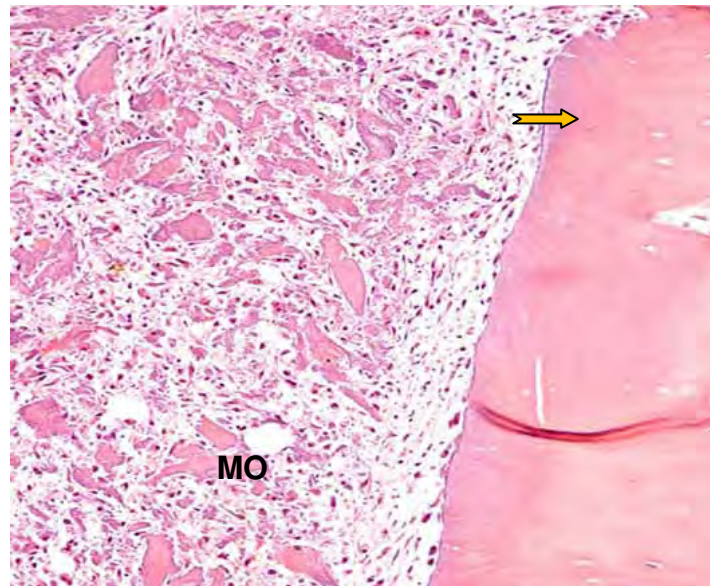


FIGURA 10 – Fotomicroscopia grupo I (membrana experimental+osso autógeno), período de 07 dias. 200x (HE). Limite da parede do defeito ósseo (→), matriz óssea em grande quantidade (MO).

5.1.2 Membrana Experimental e Coágulo Sangüíneo

Também foi possível observar uma área do defeito ósseo preenchido com tecido conjuntivo com densidade colágena variável notando-se em sua base tecido conjuntivo denso com disposição regular de fibras dispostas horizontalmente (Dura-máter) (Figura 11).

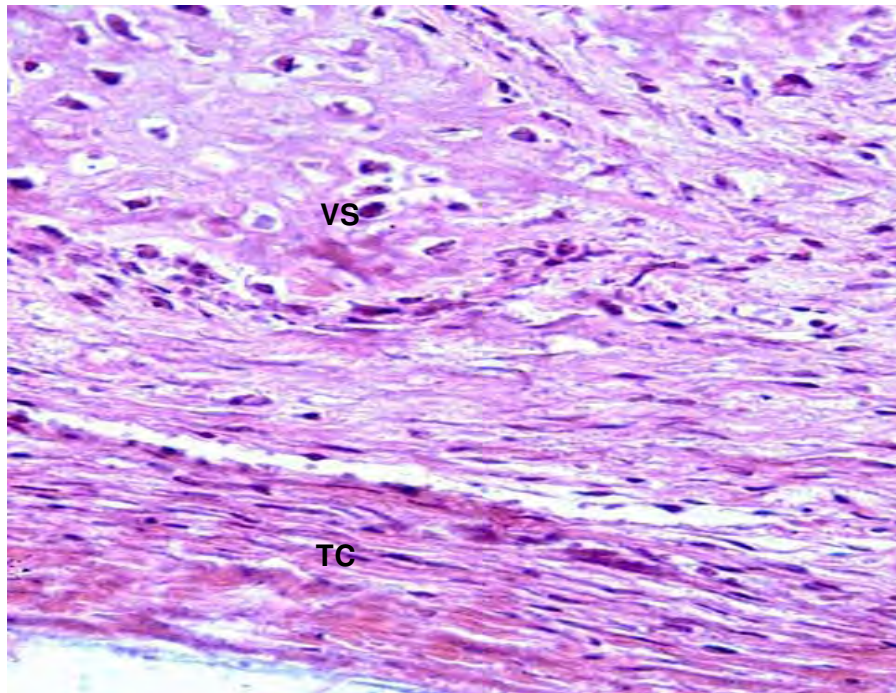


FIGURA 11 – Grupo II (membrana experimental + coágulo), período de 7 dias. Aumento de 400x (HE), TC: Tecido conjuntivo denso com presença de fibroblastos no seu interior (FB), vasos sanguíneos em estase vascular (VS).

A presença de trabéculas ósseas em calcificação com osteoblastos em seu interior dispostos periféricamente foi observada próxima à estrutura conjuntiva densa e, próximo às paredes do reparo ósseo. Também próximo as bordas do reparo foi notada a presença de uma estrutura de coloração escura, sugestiva da membrana experimental (Figura 12).

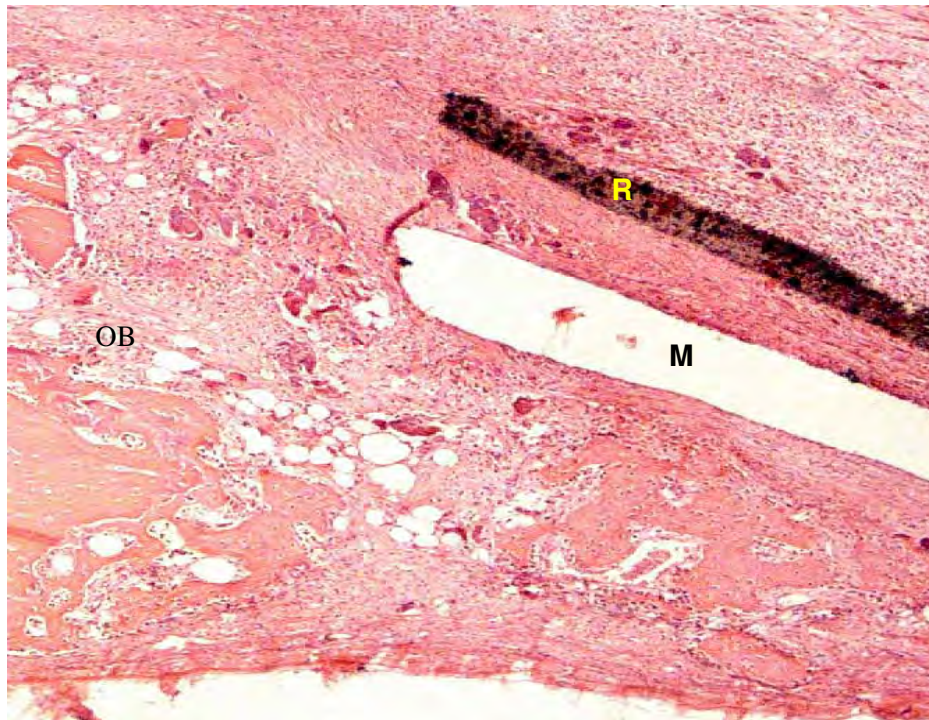


FIGURA 12 – Grupo II (membrana experimental + coágulo), período de 07 dias. 50x (HE). Espaço ocupado pela membrana experimental (M); com resíduo do material da membrana(R), osteoblastos (OB) ao redor do limite do defeito.

5.1.3 Membrana de Colágeno e Osso Autógeno

Observam-se, em área do defeito, inúmeros fragmentos ósseos de tamanho e conformação variável entremeados por tecido conjuntivo. Nota-se também a presença de áreas hemorrágicas e processo inflamatório moderado. Há presença de formação de osso trabecular em proximidade a uma lateral do preparo (Figura 13).

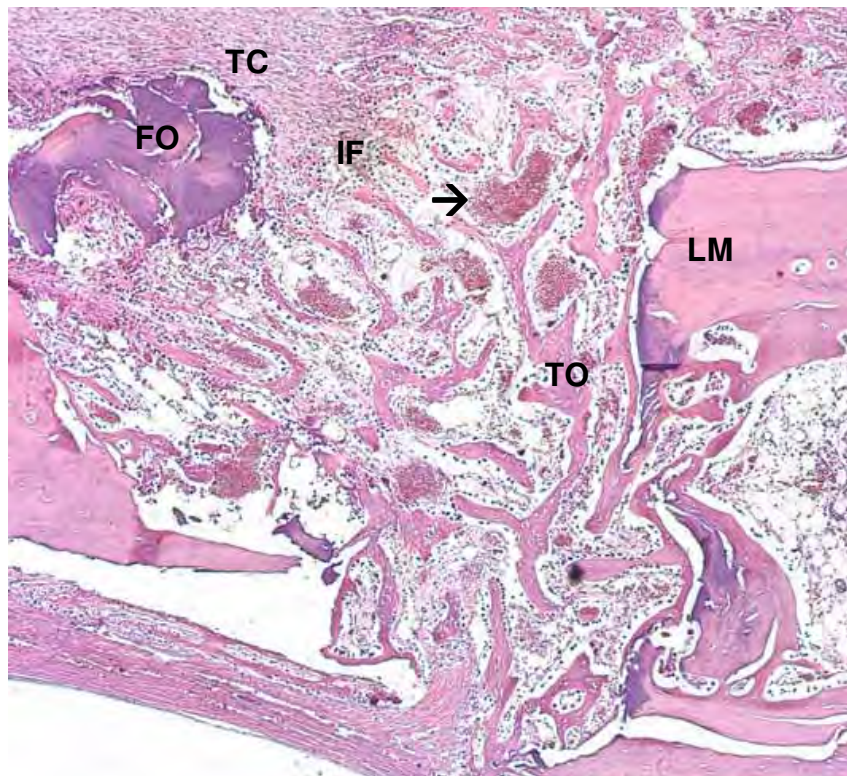


FIGURA 13 – Grupo III (membrana de colágeno + osso autógeno), período de 7 dias, aumento de 50x (HE). Fragmento ósseo (FO). Área hemorrágica (→). Trabéculas ósseas (TO). Limite da parede do defeito (LM). Infiltrado inflamatório moderado (IF). Tecido conjuntivo (TC).

5.1.4 Membrana de Colágeno e Coágulo Sangüíneo

Área do preparo preenchido com tecido conjuntivo com densidade de colágeno variável. Em um caso observa-se formação óssea trabecular imaturo com amplos espaços intertrabeculares em proximidade a parede lateral do preparo. Nota-se um processo inflamatório discreto (Figura 14).

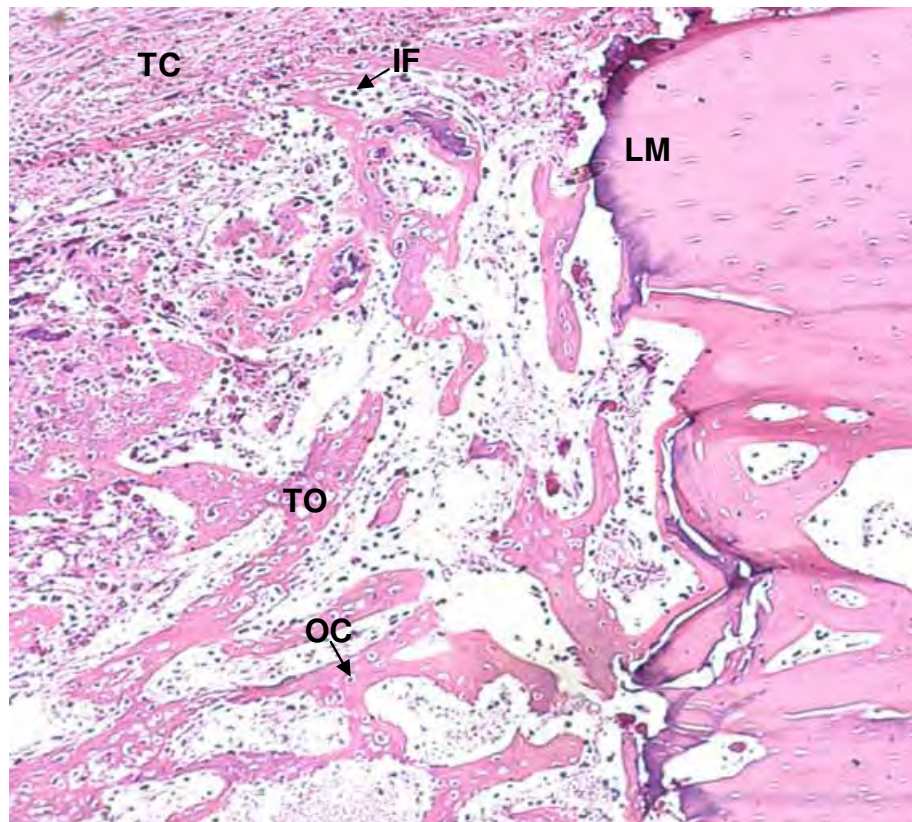


FIGURA 14 – Grupo IV (membrana de colágeno + coágulo) período 7 dias, aumento de 100x (HE). Limite da parede do defeito (LM). Trabéculas ósseas (TO) com osteócitos no seu interior (OC). Processo inflamatório discreto com macrófagos presentes (IF). Tecido conjuntivo (TC).

5.2 Período de 30 dias

5.2.1 Membrana Experimental e Osso autógeno

A área do defeito ósseo foi preenchida por tecido conjuntivo tendendo a um tecido fibroso com presença de algumas formações ósseas de forma nodular dispersas neste tecido. Em um caso neste período há presença de formação óssea em superfície voltada ao espaço que era ocupado pela membrana experimental. A formação óssea trabecular apresenta-se de forma desorganizada, com presença de infiltrado mononuclear discreto (Figura 15).

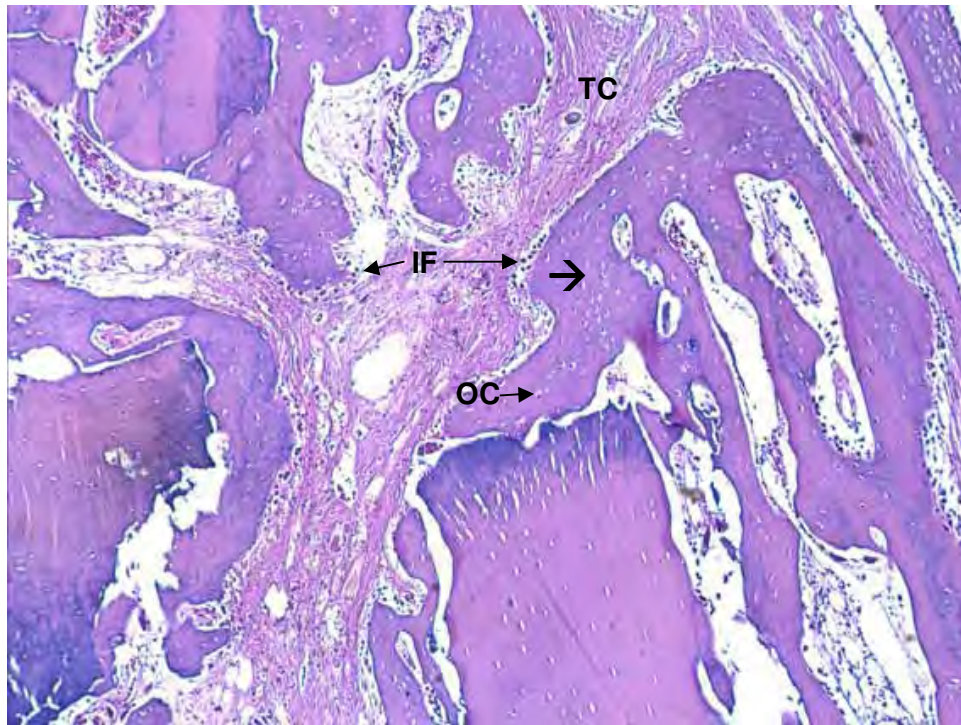


FIGURA 15 – Grupo I (membrana experimental + osso autógeno), período 30 dias, aumento de 100x (HE). Formação óssea trabecular desorganizada (→) com osteócitos no interior (OC). Tecido conjuntivo fibroso (TC). Infiltrado inflamatório mononuclear (IF)

5.2.2 Membrana Experimental e Coágulo Sangüíneo

Observa-se a área do preparo preenchida por tecido conjuntivo tendendo a fibroso com presença de algumas formações ósseas de forma nodular dispersas neste tecido. Lateralmente ao preparo há formação óssea trabecular entremeadas por hiperemia vascular e processo inflamatório mononuclear discreto.

Na superfície externa do defeito observa-se espaço vazio compatível ao local ocupado pela membrana experimental (Figura 16).

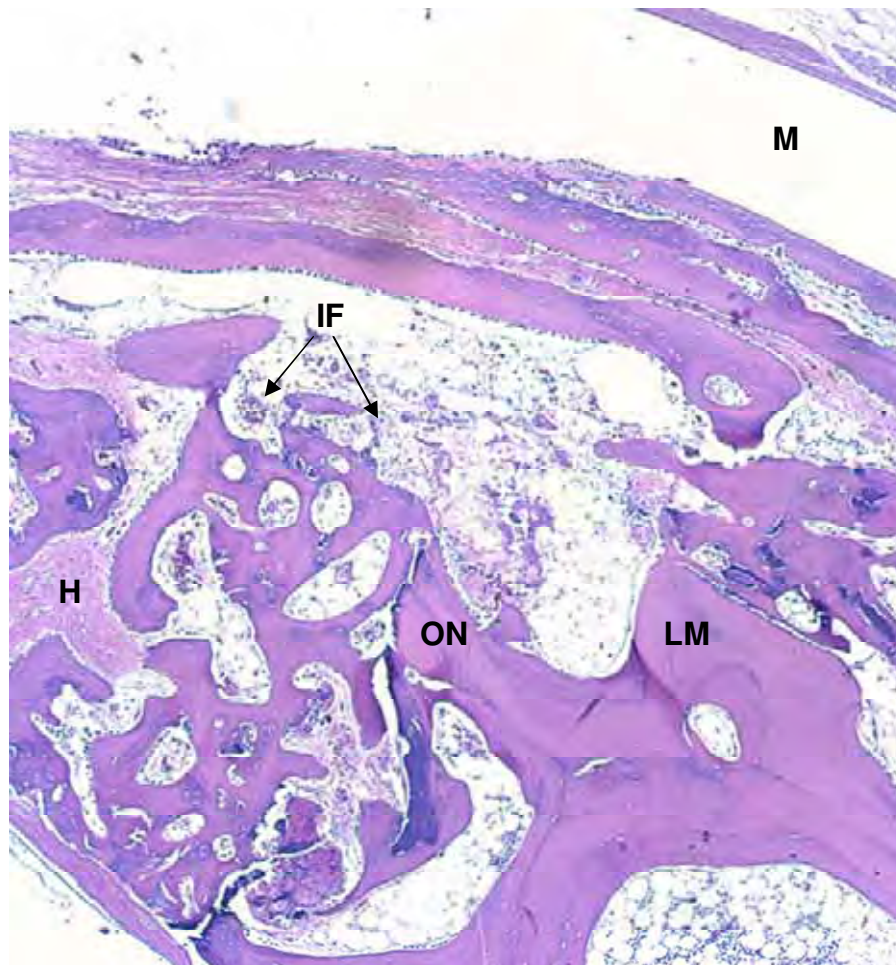


FIGURA 16 – Grupo II (membrana experimental + coágulo), período de 30 dias, aumento de 50x (HE). Espaço envolto em cápsula fibrosa (M). Limite da parede do defeito (LM). Área hemorrágica (H). Processo inflamatório (IF). Formação óssea na lateral do defeito (ON).

5.2.3 Membrana de Colágeno e Osso Autógeno

Área do preparo preenchida com tecido ósseo neoformado entremeado com tecido conjuntivo observa-se densidade de colágeno variável. Nota-se também hiperemia vascular. Não há evidência da membrana de colágeno. O tecido ósseo neoformado não apresenta continuidade com os limites do preparo (Figura 17).

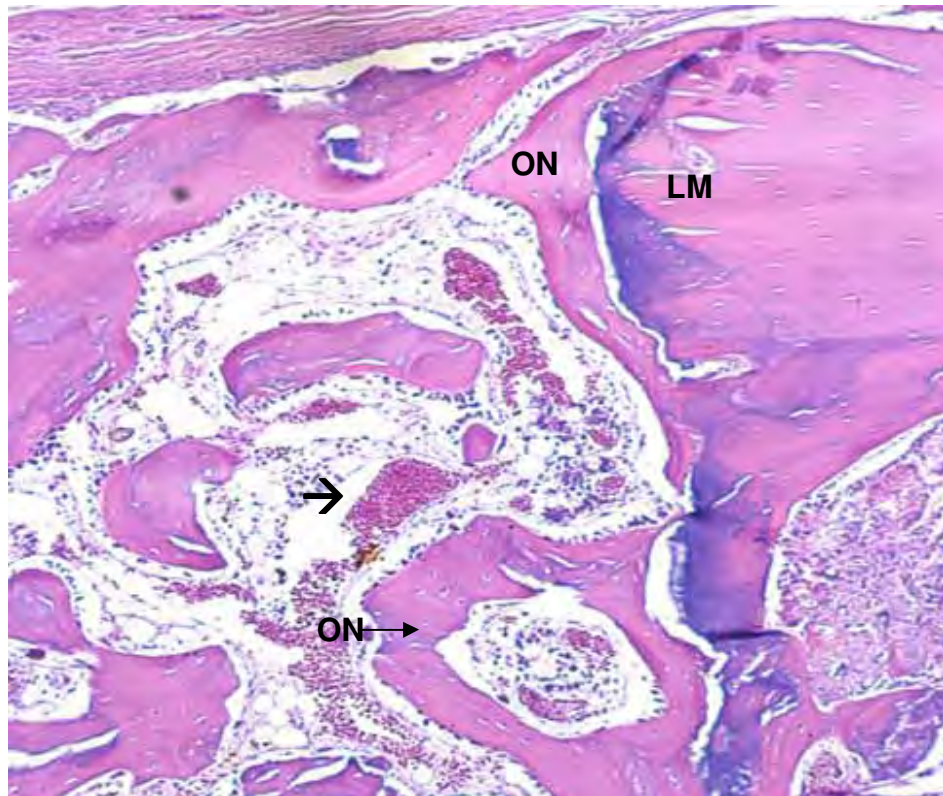


FIGURA 17 – Grupo III (membrana colágena + osso autógeno), período 30 dias, aumento de 100x (HE). Limite da parede do defeito (LM). Hiperemia vascular (→). Osso neoformado (ON).

5.2.4 Membrana de Colágeno e Coágulo Sangüíneo

Observa-se preenchimento de área com tecido conjuntivo tendendo a fibroso com disposição regular de fibras horizontalizadas. Há presença de formação óssea variando entre áreas nodulares e trabeculares observadas nas paredes laterais do preparo e situadas em meio a tecido conjuntivo denso. Não é observada a presença da membrana (Figura 18).

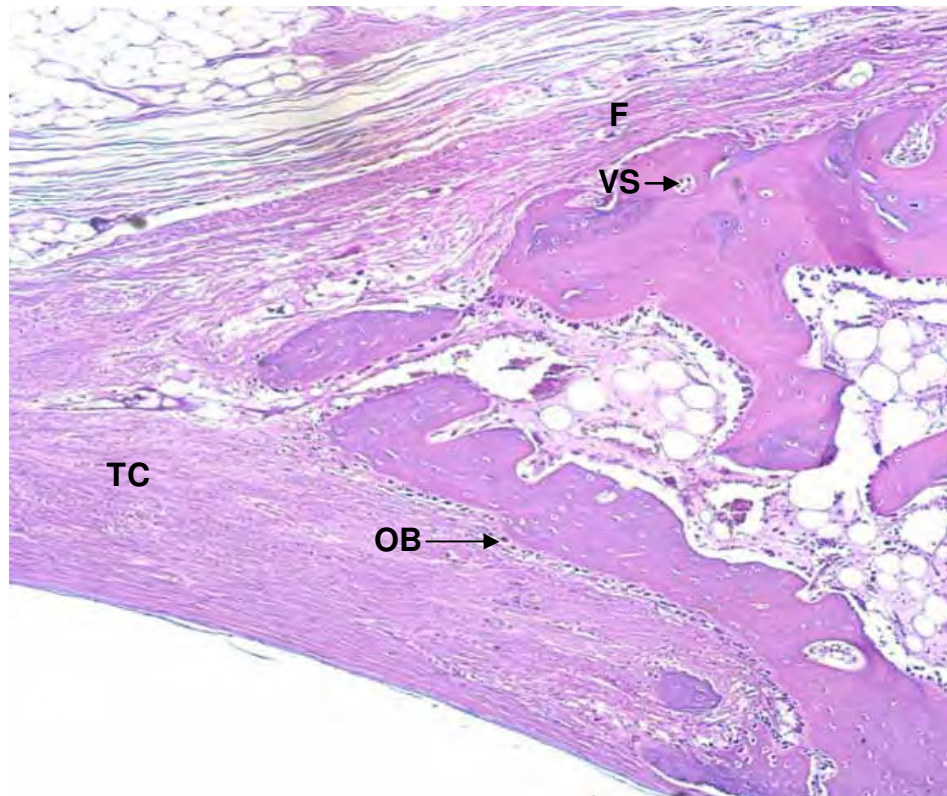


FIGURA 18 – Grupo IV (membrana de colágeno + coágulo), período de 30 dias, aumento de 100x (HE). Tecido conjuntivo com padrão de fibras horizontais (TC). Osteoblastos (OB). Formação de fibrose (F). Vasos sanguíneos (VS).

5.3 Período de 120 dias

5.3.1 Membrana Experimental e Osso autógeno

Nesse período observa-se o preenchimento da cavidade por trabéculas ósseas de formação compacta com uma maior densidade óssea. Já não é verificado um limite nítido das bordas do defeito. Presença de fragmentos ósseos envolvidos por osso neoformado. Áreas com osso haversiano, indicando maturidade óssea (Figura 19).

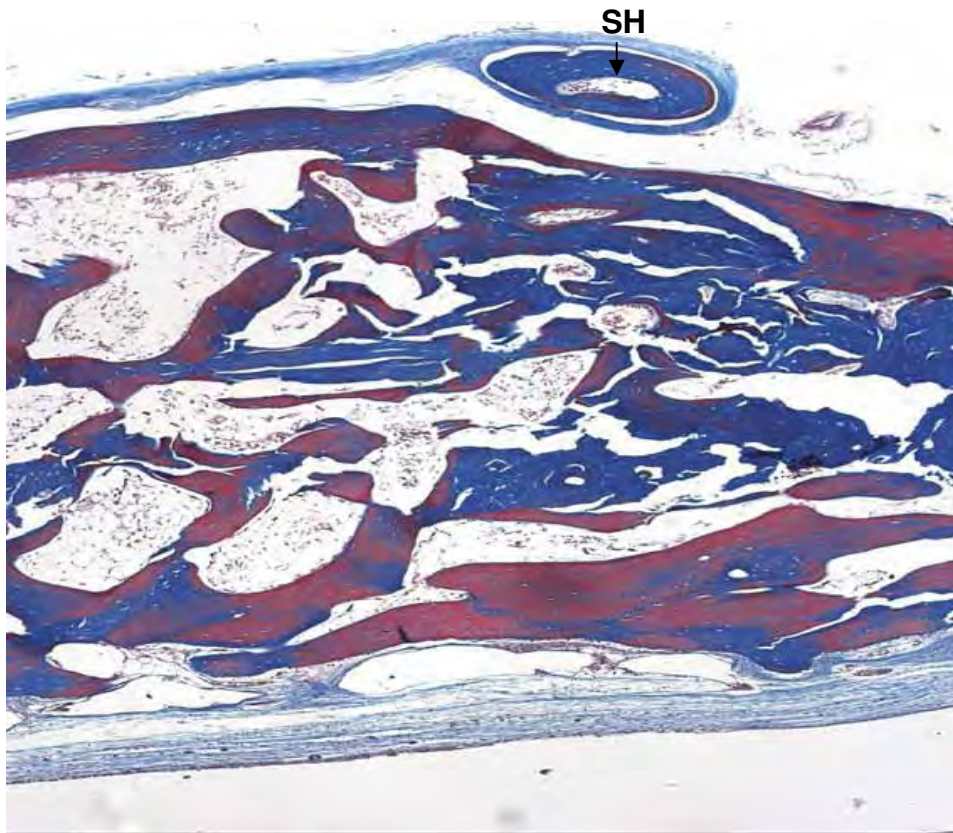


FIGURA 19 – Grupo I (membrana experimental + osso autógeno), período de 120 dias, aumento de 100x (Tricrômio de Masson). Presença de osso neoformado e denso. Área com sistema haversiano (SH).

5.3.2 Membrana Experimental e Coágulo Sangüíneo

Em área tecidual compatível com o defeito ósseo observam-se características de normalidade óssea. Em espaço vazio, compatível com a localização da membrana experimental, envolto por tecido conjuntivo denso em forma de cápsula. Nota-se também trabeculado ósseo menos organizado disperso por entre tecido conjuntivo. Não há presença de células inflamatórias. Em espaço subjacente na porção superior da cavidade onde supostamente encontrava-se a

membrana, não há formação óssea apenas uma camada de fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície (Figura 20).



FIGURA 20 – Grupo II (membrana experimental + coágulo), período de 120 dias, aumento de 50x (HE). Cápsula fibrosa preenchendo o espaço onde existia a membrana experimental (M). O restante da cavidade preenchida com osso neoformado. Osteócitos (OC). Fibras Colágenas (FC).

5.3.3 Membrana de Colágeno e Osso Autógeno

O defeito ósseo já está totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado de características maduras. Não se observa um limite das bordas do defeito ósseo. Neste momento, as partículas do osso autógeno foram totalmente reabsorvidas e substituídas por tecido ósseo maduro. Alguns vasos sanguíneos estão presentes e não há infiltrado inflamatório (Figura 21).

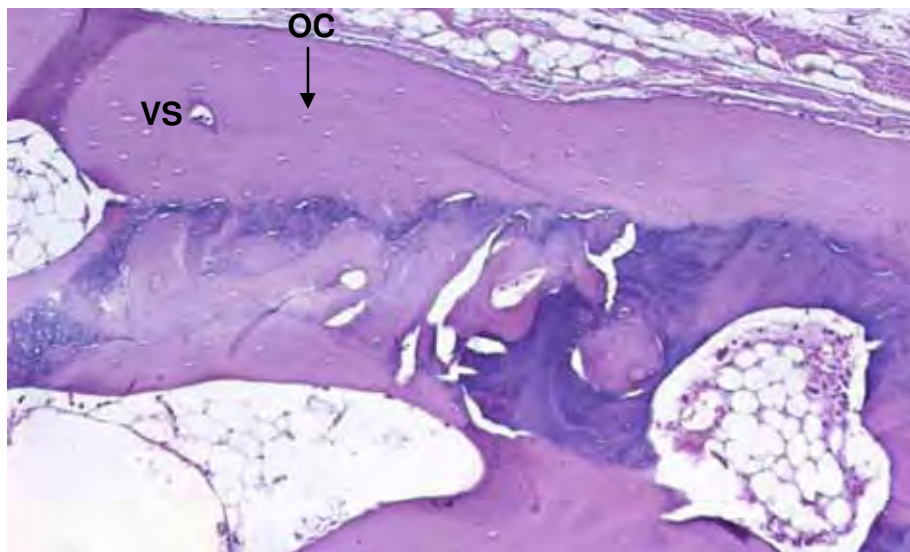


FIGURA 21 – Grupo III (membrana de colágeno + osso autógeno), período 120 dias, aumento de 50x (HE). Vaso Sanguíneo (VS). Osteócito (OC).

5.3.4 Membrana de Colágeno e Coágulo Sangüíneo

Em área compatível com o defeito ósseo apresenta características histológicas com normalidade óssea. Neste período também não foram observados os limites do defeito ósseo (Figura 22).

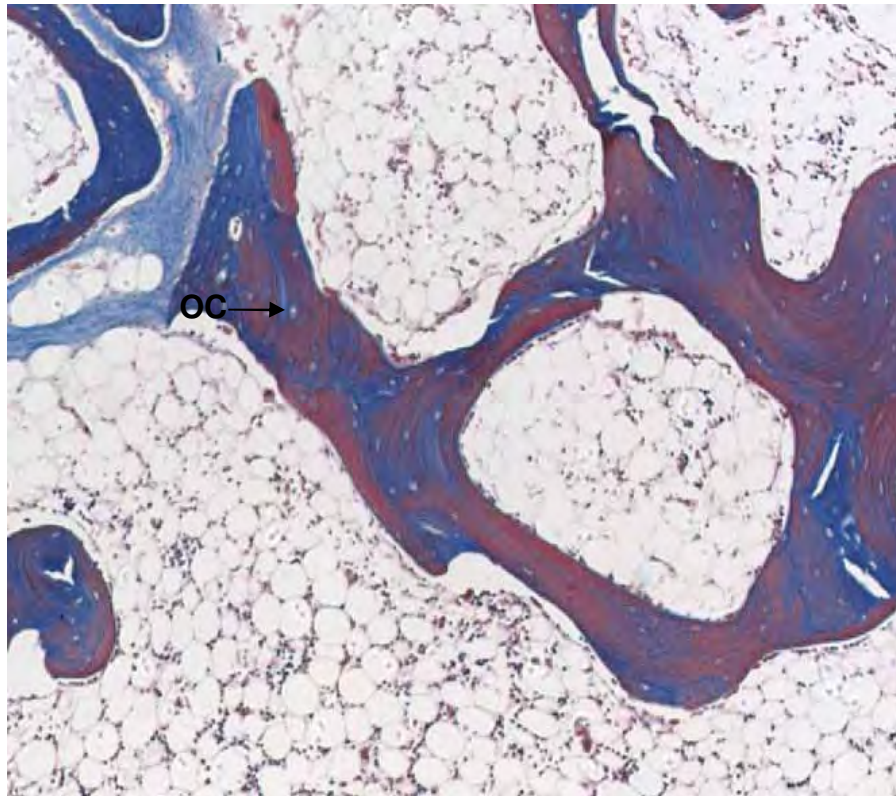


FIGURA 22 – Grupo IV (membrana de colágeno + coágulo), período de 120 dias, aumento de 100x (Tricrômio de Masson). Osteócitos (OC).

6 Discussão

6 Discussão

Reconstrução de defeitos ósseos, a partir de anomalias congênitas ou após a perda óssea por processos traumáticos, neoplásicos ou infecciosos como a periodontite avançada, continua sendo um grande desafio nas áreas da cirurgia buco-maxilo-facial e implantodontia¹⁰. Os mais variados campos experimentais e clínicos têm tentado solucionar o problema buscando desenvolver o princípio da osteopromoção como um auxílio para a regeneração óssea. Esse princípio implica em, a fim de promover a reparação óssea ou a neogenese óssea, um compartimento de tecido selado por meios físicos, tais como uma membrana, impedindo que células dos tecidos moles interfiram no processo de osteogênese⁸⁴⁻⁸⁵. A técnica da membrana oclusiva foi, primeiramente, descrita por Hurley et al.⁴³, em 1959, para tratamento experimental na região da espinha dorsal. Já nos anos 60, Boyne¹¹⁻¹³ utilizou uma membrana microporosa (Millipore®), formada por um filtro de acetato de celulose, na reconstrução de defeitos ósseos, em região facial.

O termo “regeneração tecidual guiada” (RTG) surgiu no início dos anos 80 quando Gottlow et al.³⁸, em estudo realizado em macacos, avaliaram a regeneração tecidual após o uso de membrana sobre a superfície radicular e obtiveram maior inserção nas superfícies onde foram utilizadas a técnica da RTG em comparação com o controle onde não foi utilizada a membrana.

O objetivo final da ROG é, utilizando um dispositivo ou barreira para preservar um ambiente, permitir a osteogênese e regeneração naturais para recompor o tecido perdido²⁰.

A membrana “ideal” deveria ter algumas características básicas como: ser biocompatível; apresentar integração tecidual⁸³; o material deve ter a capacidade de manter o espaço para o preenchimento; promover crescimento do tecido original; atingir requisitos

clínicos como fácil recorte e adaptação⁵²; não permitir transmissão de doenças infecto-contagiosas e ser passível de esterilização.

Segundo Dahlin²⁵, em 1994 a utilização das membranas na ROG seguiria os seguintes mecanismos: 1) prevenção de ocupação do defeito pelos fibroblastos; 2) prevenção de inibição de contato por interações celulares heterotópicas; 3) exclusão de fatores inibitórios solúveis derivados de células; 4) concentração local de fatores de estimulação do crescimento e, 5) propriedades da própria membrana no sentido de proporcionar estímulos para tais eventos.

A partir disto, muitos estudos com vários tipos de membranas foram desenvolvidas para serem utilizadas no processo de regeneração óssea através da ROG^{1,3,6,8,10,16}.

Existem, basicamente, dois tipos de membranas as não reabsorvíveis como exemplo, membrana de Teflon (e-PTFE)^{6,8,24,26,68} e, as reabsorvíveis, destacando-se as membranas de colágeno^{48,61}, ácido poliláctico⁴⁴ e a membrana derivada de osso bovino⁷⁴. Devido à grande controvérsia sobre o tipo de membrana a ser utilizado na ROG, esse estudo, *"in vivo"*, teve por objetivo avaliar, histologicamente, o reparo ósseo em defeitos realizados, bilateralmente, no osso parietal de coelhos frente ao uso da membrana experimental de PVDF-TrFE/BT^{9,36} comparando os resultados obtidos com àqueles da membrana de colágeno.

O colágeno é citado como possível agente de indução à neoformação óssea⁷² e apresenta capacidade de reabsorção. É consagradamente utilizado há anos como material para confecção de membranas, com bons resultados. Por isso, foi utilizado como material de escolha para a membrana que serviu como controle aos resultados da membrana experimental.

A membrana de PVDF-TrFE/BT (composto de fluoreto de polivinilideno-trifluoretileno e pela cerâmica Titanato de Bário), é experimental e produzida pelo Instituto de Química de Araraquara-

UNESP. Apresenta os seguintes componentes: polímero, fácil de processar e com grande flexibilidade e a cerâmica que apresenta boa resposta piezoelétrica. A combinação do polímero com cerâmica poderia resultar em um composto com potencial para o uso em regeneração tecidual guiada. Baseado nisso, Gimenes³⁶, 2005, desenvolveu a membrana que está sendo testada *"in vivo"* nesse experimento a qual apresenta propriedades eletromecânicas desejáveis⁹.

Os fenômenos elétricos desenvolvidos a partir dos processos biológicos do tecido ósseo têm sido alvo de estudo em várias pesquisas. Um exemplo é o método que se utiliza dos fenômenos elétricos para o tratamento dos vários distúrbios de patologias ósseas promovendo, por abordagens eficazes o estímulo da osteogênese por meio das propriedades biofísicas do osso³⁶. Sabe-se que as interações eletromecânicas agem regulando o desenvolvimento, diferenciação e função celular. As fontes de energia elétrica residem intrinsecamente no osso. Os potenciais de repouso resultantes do esforço aplicado, principalmente nas células do colágeno, agiram convertendo energia mecânica em elétrica, gerando assim, potenciais de repouso na faixa de microvolts. Lembrando que, diferenças de potenciais dependem da viabilidade celular em permitir trocas de eletrólitos, por meio de permeabilidade da membrana celular e do esforço mecânico aplicado para que esses fenômenos ocorram.

A piezoelectricidade é a capacidade de converter energia mecânica em elétrica e vice-versa, esta foi observada em diversos componentes extracelulares do osso, particularmente no colágeno³¹. O significado biológico da piezoelectricidade constitui a parte mais importante dos fenômenos elétricos que regulam a atividade das células formadoras de osso. O resultado final de deformações mecânicas repetidas e de contrações musculares são pulsos de corrente elétrica que induz uma seqüência de fenômenos bioquímicos, causando uma série de modificações na permeabilidade da membrana celular, e na síntese de

adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico). Com aumento da corrente elétrica a membrana torna-se mais permeável ao AMP, diminuindo assim, o nível de AMP intracelular e desencadeando o processo de síntese de DNA e divisão celular^{36,45}, o que, teoricamente, levaria a uma estimulação de osteogênese.

A técnica da ROG pode ou não estar associada ao uso de algum tipo de material de preenchimento como osso autógeno, considerado “padrão ouro”, ou materiais aloplásticos^{2,18,51,54,62,66-67,82}. A reparação pode ocorrer, basicamente, por meio de um dos três tipos de processos: osteogênese, osteocondução ou osteoindução.

A osteogênese ocorre a partir de osteoblastos e células precursoras de osteoblastos viáveis que foram transplantados com o material de enxerto para o interior do defeito, fazendo surgir os centros de formação óssea. Essa é uma resposta possível, de forma limitada, em enxertos de osso autógeno, especialmente osso trabeculado⁵⁵. A osteocondução ocorre quando células mesenquimais indiferenciadas invadem materiais implantados ou transplantados, a partir do leito receptor, provocando, posteriormente, neoformação óssea. Este é o tipo de processo que ocorre, por exemplo, na ossificação endocondral. Nos locais de ossificação intramembranosa os enxertos ósseos são progressivamente reabsorvidos e invadidos por tecido conjuntivo e vasos sangüíneos, com posterior ossificação. Portanto, o material atua como um arcabouço para o desenvolvimento de células precursoras de osteoblastos para o interior do defeito⁴. Já a osteoindução é a formação de novo osso pela diferenciação local das células mesenquimais não diferenciadas, em células formadoras de osso sob a influência de um ou mais tipos de agentes indutores^{52,54}. Esse é o processo que ocorre em áreas onde materiais provoquem neoformação óssea ectópica⁷⁹.

Nesse estudo foi realizada a associação das membranas, experimental e a base de colágeno à enxerto ósseo autógeno, grupos I e III, respectivamente. A escolha do osso autógeno

ocorreu por ser considerado o melhor material para a reconstrução óssea por ser um material osteogênico mantendo, parcialmente, a viabilidade de seus componentes celulares e moleculares⁶⁶.

Por outro lado, utilizamos também o coágulo sangüíneo associado tanto a membrana experimental como a membrana de colágeno, grupos II e IV, respectivamente. O coágulo sangüíneo serviu como controle negativo, pois, apresenta a capacidade de se organizar e promover meio para que células progenitoras se proliferem dando origem à formação óssea. Um dos intuitos, portanto foi utilizar esse controle para comparar a cronologia do reparo.

Vários modelos animais foram utilizados para a avaliação da ROG com uso de membranas, como exemplo: cão, porco-da-índia, coelho e rato^{56,61,74}. No presente estudo foram utilizados coelhos por ser um modelo animal relativamente fácil para tratar e cuidar, e principalmente por fornecer uma área cirúrgica ampla e estável, como exigia a metodologia desse trabalho. Assim, a região da calvária desse animal foi escolhida conforme metodologia aplicada por Gabrielli et al.³², 2000.

Há grande controvérsia quanto ao tamanho do defeito ósseo a ser utilizado. Sabe-se que em relação ao tamanho dos defeitos os trabalhos de Hollinger, Kleinschmidt⁴², em 1990 e posteriormente Dodde et al.²⁹, em 2000, afirmam que não há reparação óssea espontânea em defeitos ósseos, na calota craniana de coelhos, iguais ou maiores do que 15mm de diâmetro sendo estes considerados críticos. No entanto, outros autores como Kurashina et al.⁵⁰, 1998; Moghadam et al.⁵⁷, 2004; Kuemmerle et al.⁴⁹, 2005 e Gabrielli et al.³²⁻³³, 2000 e 2009, descrevem defeitos ósseos críticos criados cirurgicamente em modelos experimentais no crânio de animais, inclusive coelhos e demonstram que o tamanho do defeito foi suficiente para inibir a reparação do mesmo por osso. Esse comportamento foi observado por esses autores em defeitos de 6mm de diâmetro no crânio de coelhos.

O presente estudo constitui o primeiro trabalho experimental em modelo animal em que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT está sendo testada. Entretanto, foi realizado um estudo “*in vitro*”⁹ desse material em que foi descrito bons resultados quanto à biocompatibilidade e crescimento de tecido ósseo.

Do ponto de vista da análise histológica realizada, aos 7 dias, o grupo I (membrana experimental + osso autógeno) exhibe um discreto processo inflamatório, caracterizado, principalmente, por células mononucleadas, dispersas no tecido conjuntivo que está disposto regularmente e com densidade colágena variável. Não foram observadas células gigantes, características de reação de corpo estranho. Dessa forma, podemos considerar que mesmo no período inicial a membrana experimental apresenta um comportamento bom no sentido de biocompatibilidade. De fato, Beloti et al.⁹, em 2006, em estudo realizado “*in vivo*”, apresentam resultados favoráveis em relação à biocompatibilidade dessa membrana. Observa-se a formação óssea seguindo das bordas dos defeitos para o centro com presença de tecido ósseo trabecular crescendo em meio a tecido conjuntivo altamente vascularizado^{1,40} e de forma independente do processo de formação óssea trabecular advinda das paredes da cavidade. Apresenta também, formação óssea ao redor das partículas de osso do enxerto, com presença de osteoblastos. Esse fato confirma a propriedade osteogênica do osso autógeno enxertado no defeito ósseo, pois nos leva a entender que a presença desses fragmentos, possivelmente, é decorrente do enxerto colocado e que está estimulando a formação óssea sem depender das trabéculas ósseas formadas à partir das paredes da cavidade. O restante do tecido que compõem o preenchimento da cavidade óssea, encontra-se viável para o preenchimento ósseo completo do defeito, inclusive com processo adiantado, se compararmos com o grupo II (membrana experimental + coágulo).

No grupo II (membrana experimental + coágulo), o padrão de formação óssea é proveniente da periferia e fundo da cavidade para a região central. Próximo à borda superior da cavidade é evidenciada a membrana experimental, subjacente à ela, há presença de tecido conjuntivo com moderado número de fibroblastos no seu interior. As características histológicas encontradas para ambos os grupos conferem as afirmações de Schenk⁶⁹, 1996, Summer⁷³, 2002.

Aos 30 dias, para o grupo I (membrana experimental + osso autógeno), observa-se que a cavidade cirúrgica encontra-se preenchida em sua maior parte com tecido ósseo bem desenvolvido, porém poucas áreas são ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea.

Para o grupo II (membrana experimental + coágulo), nesse mesmo período, há presença de formação óssea com trabeculado organizado, porém existente, predominantemente, no fundo da cavidade óssea. Lateralmente à parede da cavidade, presença de formações ósseas nodulares independentes da parede óssea lateral do defeito, com presença de hiperemia vascular, definindo um padrão de preenchimento da cavidade óssea por osso, porém em um estágio atrasado se comparado com o grupo I. Esses resultados histológicos vão de encontro com resultados obtidos na literatura da utilização de outros tipos de membranas, como por exemplo: membrana de acetato e politetrafluoretileno^{10,23-24}.

Em um espécime, desse período, para o grupo I, foi observada a formação óssea inclusive na região superior da cavidade, diretamente em contato com a membrana experimental. Devemos informar que, no referido espécime, foi possível a manutenção da membrana para realização da tramitação laboratorial. Em alguns espécimes, dos grupos I e II nesse período, foi necessária a remoção da membrana para que fosse possível a confecção dos cortes pelo micrótomo. Assim, poderíamos sugerir que, talvez, nesses espécimes, se

fosse possível a manutenção das membranas, esse achado histológico pudesse também existir. Entretanto, é difícil afirmar que a membrana experimental induziu a formação óssea em áreas subjacentes ao espaço que ela ocupava, como é sugerido por Gimenes³⁶, 2005 e Beloti et al.⁹, 2006, devido às suas propriedades piezoelétricas, visto que no grupo II (membrana experimental + coágulo) esse fenômeno não estava presente, inclusive nos espécimes em que foi possível a permanência da membrana para a tramitação laboratorial.

Idealmente, as membranas deveriam facilitar a adesão celular e migração de células progenitoras. No caso da reparação óssea, células osteoblásticas seriam aderidas para dar continuidade à cascata da reparação óssea, ou seja, proliferação, diferenciação e maturação óssea¹⁴. Essa adesão depende da interação entre o substrato-matrix-célula e do tipo de material da membrana, incluindo sua topografia, reações químicas e energia/disponibilidade de fluidos da membrana. Beloti et al.⁹, 2006, quando compararam a mesma membrana experimental com a membrana de e-PTFE (politetrafluoretileno expandido), obtiveram maior capacidade de adesão, proliferação e diferenciação para a membrana experimental utilizada no presente estudo.

Mesmo assim, podemos inferir que, do ponto de vista de manutenção de espaço e de barreira, impedindo invasão de tecidos vizinhos, fatores importantes para a Regeneração Óssea Guiada, a membrana experimental está cumprindo com o seu papel.

Ainda, aos 30 dias, tanto no grupo I quanto no grupo II, é observada a presença de infiltrado inflamatório. Muito embora não haja a presença de células gigantes que caracteriza fagocitose, permanece discreto número de células mononucleares que possivelmente estão presentes em decorrência da permanência do material e ausência de incorporação do mesmo ao tecido ósseo.

Aos 120 dias de pós-operatório, para os grupos I e II (membrana experimental + osso autógeno e membrana experimental + coágulo, respectivamente), as cavidades ósseas encontram-se totalmente preenchida por tecido ósseo. Para o grupo I, o preenchimento da cavidade se faz por trabéculas ósseas compactas, mostrando coalescência das trabéculas dando um aspecto sólido ao tecido. Inclusive, em algumas áreas, estão presentes sistema haversiano, indicando maturidade óssea. Ainda, nesse período são vistos fragmentos ósseos sendo substituídos por osso neoformado.

Para o grupo II, no mesmo período, o tecido ósseo que preenche a cavidade apresenta trabéculas ósseas menos organizadas e com maior espaçamento. Ainda existe a presença, em poucos espaços, de tecido conjuntivo. Na região subjacente à área em que a membrana ocupava estão presentes fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície da cavidade, típico de tentativa de encapsulamento da membrana. Esse processo demonstra mais uma vez que *“in vivo”*, talvez, a membrana experimental não apresente a capacidade de adesão e proliferação tecidual como os resultados obtidos por Beloti et al.⁹, 2006, *“in vitro”*.

Em relação aos grupos III e IV que foram tratados com membrana de colágeno + osso autógeno e membrana de colágeno + coágulo, respectivamente, no período de 7 dias, encontramos as seguintes características: para o grupo III, presença dos fragmentos ósseos em meio ao tecido conjuntivo, com inúmeros osteoblastos ao redor porém, não é ainda observada neoformação óssea ao redor dessas partículas. Há a presença de células inflamatórias do tipo reacional, dispersas no tecido conjuntivo. Existe, também, de forma sutil, a presença de trabéculas ósseas nas proximidades das paredes laterais do preparo. Essas características demonstram que existe um atraso no processo de reparo da cavidade quando comparado com o grupo I. O que difere o grupo III do grupo I é apenas a membrana utilizada. Assim, pode ser que

o material que compõe a membrana de colágeno retarde o processo de reparação. Analisando o grupo III, observamos uma maior atividade de resposta inflamatória. Esses achados vão de encontro aos resultados obtidos por Gabrielli et al.³⁴, 2001, que utilizaram colágeno associado a hidroxiapatita em cavidades ósseas, apresentando a mesma resposta. Da mesma forma, o colágeno heterógeno, associado ou não a outros materiais, é considerado imunogênico^{27,78}.

Para o grupo IV, no pós-operatório de 7 dias, apenas um dos espécimes apresenta início de formação de trabeculado ósseo na proximidade da parede lateral e de forma muito menos acentuada em relação aos eventos do grupo II. Também apresenta grau semelhante de processo inflamatório que o grupo III.

No período de 30 dias, para o grupo III, observa-se formação óssea na cavidade, porém em menor proporção que àquela apresentada para o grupo I. Independentemente do atraso do processo de reparação, o enxerto ósseo permitiu osteogênese, visto que a formação óssea não está relacionada com as paredes do defeito. Naquele grupo, uma maior área é ocupada por tecido conjuntivo colagenoso. Não há evidência da membrana de colágeno em nenhum espécime dos grupos tratados com essa membrana.

Na análise do grupo IV, com 30 dias, houve preenchimento parcial da cavidade, variando com áreas nodulares de osso e trabeculado ósseo imaturo, principalmente, no fundo da cavidade. A porção mais superior da cavidade encontra-se com grande quantidade de tecido conjuntivo denso que possivelmente, tenha se formado pelo colapso da membrana de colágeno ou, pela degradação do colágeno num tempo precoce ou, pelos dois fatores. Como foi constatado por Dupoirieux et al.³⁰, 2001; Strietzel et al.⁷¹, 2006, que encontraram para as membranas reabsorvíveis, as cavidades parcialmente reparadas.

Já no grupo III, os fragmentos de osso autógeno enxertados funcionaram para manter o espaço recoberto pela membrana

de colágeno. Sem o preenchimento do espaço, a membrana teria colapsado, impedindo a proliferação de células osteogênicas²².

Aos 120 dias, os grupos tratados com membrana de colágeno apresentam reparação óssea por osso maduro e sem infiltrado ósseo. A única diferença existente entre os grupos III e IV foi ausência de reparação total das cavidades cirúrgica deste último grupo, mantendo o mesmo padrão do que discutimos para o período anterior.

Dessa forma, a membrana que proporcionou resultado mais adequado foi a membrana de P(VDF-TrFE)/BT, tendo em vista que a reparação nos períodos estudados, mostrou qualidade óssea mas madura e organizada. Os resultados da associação da membrana experimental e coágulo mostram que a mesma permite manutenção de espaço para que haja reparação com tecido original.

Porém, durante o transcorrer desse estudo foi encontrada grande dificuldade para esterilização da membrana experimental. Os métodos realizados utilizando autoclave ou exposição à radiação gama alteram as propriedades físico-químicas da membrana, tornando-a endurecida, ressecada e friável. Descartou-se também a possibilidade do uso da esterilização por meio de óxido de etileno (ETO) por deixar resíduos tóxicos sobre o material. Na tentativa de reduzir pelo menos algumas bactérias e fungos que são possíveis de serem eliminados pelo aquecimento com estufa, realizamos um protocolo de “esterilização” em estufa a 100°C por 40 minutos. Esse foi o tempo máximo possível de aplicação sem deformar ou desestruturá-la quimicamente. Devemos considerar que este método foi utilizado para investigação animal; certamente, não pode ser transferido para humanos. Por isso, há necessidade de futuras adequações quanto ao método eficaz de esterilização para uso de forma viável.

Assim, por ter sido comparada com um material de utilização clínica de boa procedência, com melhores resultados, no que diz respeito à Regeneração Óssea Guiada, a membrana experimental tem

potencial para futura utilização clínica. Para tanto são necessários outros testes em animais, em solicitação diversificada e com outras metodologias.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, nos limites da metodologia empregada, é lícito concluir que:

- 1 - A utilização do enxerto ósseo proporcionou um reparo ósseo de melhor consistência.
- 2 - A membrana experimental apresentou melhor biocompatibilidade.
- 3 - A membrana experimental apresenta qualidades compatíveis para uso como barreira para a Regeneração Óssea Guiada, enquanto que a membrana de colágeno serve apenas para recobrimento.
- 4 - A membrana experimental permitiu total reparação óssea das cavidades cirúrgicas.

8 Referências

8 Referências*

1. Aaboe M, Pinholt EM, Schou S, Hjorting-Hansen E. Incomplete bone regeneration of rabbit calvarial defects using different membranes. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9: 313-20.
2. Ascherman JA, Foo R, Nanda D, Parisien M. Reconstruction of cranial bone defects using a quick-setting hydroxyapatite cement and absorbable plates. *J Craniofac Surg.* 2008; 19: 1131-5.
3. Barboza E, Bianca S, Ferreira VF, Carvalho W. Guided Bone Regeneration Using Nonexpanded Polytetrafluoroethylene Membranes in Preparation for Dental Implant Placements—A Report of 420 Cases. *Implant Dent.* 2010; 19: 2-7.
4. Bays R. The pathophysiology and anatomy of edentulous bone loss. In: Fonseca R, Davis W, editors. *Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery* Philadelphia: Saunders; 1986. p. 1-39.
5. Becker W. Periodontal regeneration: myth or reality? *J Calif Dent Assoc.* 1999; 27: 118-24.
6. Becker W, Becker BE, McGuire MK. Localized ridge augmentation using absorbable pins and e-PTFE barrier membranes: a new surgical technique. Case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994; 14: 48-61.

* De acordo com o estilo Vancouver.
Disponível em http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Becker W, Becker BE, Berg L, Prichard J, Caffesse R, Rosenberg E. New attachment after treatment with root isolation procedures: report for treated Class III and Class II furcations and vertical osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1988; 8: 8-23.
8. Becker W, Dahlin C, Becker BE, Lekholm U, van Steenberghe D, Higuchi K, et al. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994; 9: 31-40.
9. Beloti MM, de Oliveira PT, Gimenes R, Zaghete MA, Bertolini MJ, Rosa AL. In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 79: 282-8.
10. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *Cleft Palate Craniofac J*. 1995; 32: 311-7.
11. Boyne P. Regeneration of alveolar bone beneath cellulose acetate filter implants. *J Dent Res*. 1964; 43: 827.
12. Boyne P, Bassett CAL. Repair and remodelling in milipore-isolated defects in cortical bone. *Acta Anat*. 1967; 68: 509-31.
13. Boyne P, Mikels TE. . Restoration of alveolar ridges by intramandibular transposition osseous grafting. *J Oral Surg*. 1968; 26: 569-76.

14. BurrIDGE K, Molony L, Kelly T. Adhesion plaques: sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl.* 1987; 8: 211-29.
15. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993; 13: 29-45.
16. Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol 2000.* 1999; 19: 151-63.
17. Cancian D, Hochuli-Vieira E, Marcantonio R, Marcantonio EJ. Use of BioGran and Calcitite in bone defects: histologic study in monkeys (*Cebus apella*). *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14: 859-64.
18. Cancian D, Hochuli-Vieira E., Marcantonio RA, Garcia Júnior IR. Utilization of autogenous bone, bioactive glasses, and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in *Cebus apella* monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19: 73-9.
19. Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20 (Suppl 4): 113-23.
20. Christgau M, Schmalz G, Reich E, Wenzel A. Clinical and radiographical split-mouth-study on resorbable versus non-resorbable GTR-membranes. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 306-15.

21. Crea A, Dassatti L, Hoffmann O, Zafiropoulos GG, Deli G. Treatment of intrabony defects using guided tissue regeneration or enamel matrix derivative: a 3-year prospective randomized clinical study. *J Periodontol.* 2008; 79: 2281-9.
22. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg.* 1991; 74: 487-91.
23. Dahlin C, Lekholm U, Linde A. Membrane-induced bone augmentation at titanium implants. A report on ten fixtures followed from 1 to 3 years after loading. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1991; 11: 273-81.
24. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988; 81: 672-6.
25. Dahlin C, Sandberg E, Alberius P, Linde A. Restoration of mandibular nonunion bone defects. An experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994; 23: 237-42.
26. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1989; 4: 19-25.
27. DeLustro F, Condell R, Nguyen M, McPherson J. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J Biomed Mater Res.* 1986; 20: 109-20.

28. Develioglu H, Serpil Ünver Saraydin, Laurent Dupoirieux, Zeynep Deniz Sahin. Histological findings of long-term healing of the experimental defects by application of a synthetic biphasic ceramic in rats. *J J Biomed Mater Res.* 2006; 80A: 505-8.
29. Dodde Rn, Yavuzer R, Bier UC, Alkadri A, Jackson IT. Spontaneous Bone Healing in the Rabbit. *J Craniofac Surg.* 2000; 11: 346-9.
30. Dupoirieux L, Pourquoiier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 30: 58-62.
31. Fukada E, Takamatsu T, Yasuda I. Callus formation by electret pn. *J Appl Phys.* 1975; 14: 2079-80.
32. Gabrielli MFR, Ambrizzi DR, Okamoto T, Hochuli-Vieira E, Padilha Filho J, Gabrielli MAC. Reconstrução de calota cranina através de enxertos ósseos e implantes de polietileno poroso de alta densidade. Estudo histológico comparativo em coelhos. *Salusvita.* 2000; 19: 31-45.
33. Gabrielli MFR, Gabrielli MAC, Hochuli-Vieira E, Padilha Filho J, Saska S, Okamoto T, et al. Reconstrução de calota craniana por meio de diferentes materiais. Estudo histológico comparativos em coelhos. *Rev Brasileira de Cir e Traumatologia Buco-maxilo-facial.* 2009; 6: 43-52.
34. Gabrielli MAC, Marcantonio Júnior E, Góissis G, Okamoto T, Gabrielli M, Hochuli-Vieira E. Hydroxylapatite implantes with or without collagen in the zygomatic arch of rats. Histological study. *Br Dent J.* 2001; 12: 9-15.

35. Gelb DA. Immediate implant surgery: three-year retrospective evaluation of 50 consecutive cases. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993; 8: 388-99.
36. Gimenes R. Síntese e Caracterização de Compósitos Poli(fluoreto de vinilideno-trifluoretileno)/Titanato de Bário para uso em Regeneração Tecidual Guiada [tese de doutorado]. Araraquara: Instituto de Química da UNESP; 2005.
37. Gosain AK, Santoro TD, Song LS, Capel CC, Sudhakar PV, Matloub HS. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 112: 515-27.
38. Gottlow J, Nyman S, Karring T. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1984; 11: 494-503.
39. Hammerle CH, Fourmoussis I, Winkler JR, Weigel C, Bragger U, Lang NP. Successful bone fill in late peri-implant defects using guided tissue regeneration. A short communication. *J Periodontol.* 1995; 66: 303-8.
40. Hammerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 53: 167-74.
41. Handelsman MCR. Alveolar ridge augmentation using membranes. . *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2004; 16: 33-9.

42. Hollinger JO, Kleinshmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990; 1: 60-8.
43. Hurley L, Stinchfiels FE, Bassett ACL, Lyon WH. The role of soft tissues in osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am.* 1959; 41a: 1243-54.
44. Ito K, Nanba K, Murai S. Effects of bioabsorbable and non-resorbable barrier membranes on bone augmentation in rabbit calvaria. *J Periodontol.* 1998; 69: 1229-37.
45. Johnson GS, Morgan WD, Pastan I. Regulation of cell motility by cyclic AMP. *Nature.* 1972; 235: 54-6.
46. Jung RE, Zwahlen R, Weber FE, Molenberg A, van Lenthe GH, Hammerle CH. Evaluation of an in situ formed synthetic hydrogel as a biodegradable membrane for guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 426-33.
47. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol.* 1980; 7: 96-105.
48. Kozlovsky A, Aboodi G, Moses O, Tal H, Artzi Z, Weinreb M, et al. Bio-degradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide) applied in a double-layer technique in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20: 1116-23.
49. Kuemmerle J, Oberle A, Oechslin C, Bohner M, Frei C, Boecken I, et al. Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep. *J Craniomaxillofac Surg.* 2005; 33: 37-44.

50. Kurashina K, Kurita H, Kotani A, Kobayashi S, Kyoshima K, Hirano M. Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short-term experiment in rabbits. *Biomaterials*. 1998;19: 701-6.
51. Lim SC, Lee MJ, Yeo HH. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathol Int*. 2000; 50: 594-602.
52. Lindhe J, editor. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. 1013 p.
53. Lundgren D, Nyman S, Mathisen T, Isaksson S, Klinge B. Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *J Craniomaxillofac Surg*. 1992; 20: 257-60.
54. Marx R. Bone and bone graft healing H. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2007;19: 455-66.
55. Marx R, Snyder R, Kline S. Cellular survival of human marrow during placement of marrow-cancellous bone grafts. *J Oral Surg*. 1979; 37: 712-8.
56. Messoria M, Nagata MJH, Dornelles RCM, Bomfim SRM, Furlaneto FAC, Melo L et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res*. 2008; 43: 723-9.

57. Moghadam H, Sándor G, Holmes H, Clokie C. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62: 202-13.
58. Morse A. Formic Acid-Sodium Citrate Decalcification and Butyl Alcohol Dehydration of Teeth and Bones for Sectioning in Paraffin. *J Dent Res* 1945; 24: 143-53.
59. Nyman S. Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1991;18: 494-8.
60. Nyman S, Karring T, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol.* 1980; 7: 394-401.
61. Owens KW, Yukna RA. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dent.* 2001;10: 49-58.
62. Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjorting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002; 17: 498-506.
63. Piattelli A, Franco M, Ferronato G, Santello MT, Martinetti R, Scarano A. Resorption of composite polymer-hydroxyapatite membranes: a time-course study in rabbit. *Biomaterials.* 1997; 18: 629-33.
64. Piattelli A, Scarano A, Paolantonio M. Bone formation inside the material interstices of e-PTFE membranes: a light microscopical and histochemical study in man. *Biomaterials.* 1996; 17: 1725-31.

65. Queiroz TP, Hochuli-Vieira E, Gabrielli MA, Cancian DC. Use of bovine bone graft and bone membrane in defects surgically created in the cranial vault of rabbits. Histologic comparative analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006; 21: 29-35.
66. Ripamonti U, Petit JC, Moehl T, van den Heever B, van Wyk J. Immediate reconstruction of massive cranio-orbito-facial defects with allogeneic and alloplastic matrices in baboons. *J Craniomaxillofac Surg*. 1993; 21: 302-8.
67. Sahoo N, Roy ID, Desai AP, Gupta V. Comparative evaluation of autogenous calvarial bone graft and alloplastic materials for secondary reconstruction of cranial defects. *J Craniofac Surg*. 2010; 21: 79-82.
68. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994;9: 13-29.
69. Schenk RK, , Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Regeneração óssea: Bases biológicas. In: Misch CE, editor. *Regeneração óssea guiada na implantodontia*. São Paulo: Quintessence; 1996. p. 49-100.
70. Schlegel AK. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®). *Biomaterials*. 1997; 18: 535-8.
71. Strietzel FP, Khongkhunthian P, Khattiya R, Patchanee P, Reichart PA. Healing pattern of bone defects covered by different membrane types--a histologic study in the porcine mandible. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006; 78: 35-46.

72. Sugaya A, Minabe M, Hori T, Tatsumi J, Watanabe Y, Ikeda K, et al. Effects on wound healing of tricalcium phosphate-collagen complex implants in periodontal osseous defects in the dog. *J Periodontal Res.* 1990; 25: 60-3.
73. Summer G. Bone formation and development. 2nd ed. New York: Thieme; 2002.
74. Taga ML, Granjeiro JM, Cestari TM, Taga R. Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008; 23: 427-36.
75. Takata T, Wang HL, Miyauchi M. Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12: 332-8.
76. Thoma DS, Halg GA, Dard MM, Seibl R, Hammerle CH, Jung RE. Evaluation of a new biodegradable membrane to prevent gingival ingrowth into mandibular bone defects in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20: 7-16.
77. Thomaidis V, Kazakos K, Lyras DN, Dimitrakopoulos I, Lazaridis N, Karakasis D, et al. Comparative study of 5 different membranes for guided bone regeneration of rabbit mandibular defects beyond critical size. *Med Sci Monit.* 2008; 14: BR67-73.
78. Triplett RG. Bone augmentation with and without biodegradable and non biodegradable microporous membranes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2001; 13: 411-22.

79. Urist M, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 1828-32.
80. Viateau V BM, Guillemain G, Petite H, Hannouche D, Anagnostou F, Pélissier P. Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies. *Orthop Clin North Am*. 2010; 41: 49-56.
81. Von Arx T, Broggini 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: 843-53.
82. von Arx T, Cochran DL, Schenk RK, Buser D. Evaluation of a prototype trilayer membrane (PTLM) for lateral ridge augmentation: an experimental study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 31: 190-9.
83. Warrer K, Karring T. Guided tissue regeneration combined with osseous grafting in suprabony periodontal lesions. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 1992; 19: 373-80.
84. Zellin G. AG-LaAL. Healing of mandibular defects with different biodegradable and nonbiodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials*. 1995; 16: 601-9.
85. Zhao S, Pinholt EM, Madsen JE, Donath K. Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2000; 28: 116-22.

86. Zitzmann NU, Scharer P, Marinello CP. Factors influencing the success of GBR. Smoking, timing of implant placement, implant location, bone quality and provisional restoration. *J Clin Periodontol*. 1999; 26: 673-82.
87. Zitzmann NU, Scharer P, Marinello CP. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 16: 355-66.

Anexos

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal, autorizando a realização desta pesquisa.



Proc. CEEA nr. 14/2008

Araraquara, 15 de dezembro de 2009

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 14/12/2009, após a apreciação do Relatório Parcial referente ao projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação da membrana de PVDF-TrFe/BT utilizada em cavidade óssea confeccionada em calota craniana de coelhos. Estudo histológico e histométrico" (Proc. nr. 14/2008) APROVOU o referido Relatório, bem como autorizou a alteração da metodologia, devendo o RELATÓRIO FINAL ser apresentado em MAIO/2010.

Atenciosamente.



Prof. Dra. ELENY ZANELLA BALDUCCI
Coordenadora do CEEA

À

Prof. Dr. MARISA APARECIDA CABRINI GABRIELLI

DD. Pesquisadora Responsável

a/c André Luiz dos Santos

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 31 de março de 2010.

André Luiz dos Santos