

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

JULIANA FERREIRA FLORIANO

**ESTUDOS SISTEMÁTICOS DE BIOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL  
OSTEOGÊNICO DE MEMBRANAS BIOATIVAS EM COELHOS MACHOS**

Bauru

2013

JULIANA FERREIRA FLORIANO

**ESTUDOS SISTEMÁTICOS DE BIOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL  
OSTEOGÊNICO DE MEMBRANAS BIOATIVAS EM COELHOS MACHOS**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT), como requisito à obtenção do título de doutor, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff.

Bauru

2013

Floriano, Juliana Ferreira.

Estudos sistemáticos de biocompatibilidade e potencial osteogênico de membranas bioativas em coelhos machos/ Juliana Ferreira Floriano, 2013  
102 f. : il.

Orientador: Carlos Frederico de Oliveira Graeff

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2013

1. látex 2. biocompatibilidade.  
3.bioatividade. 4. clones. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências.  
II. Título.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE JULIANA FERREIRA FLORIANO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.**

Aos 27 dias do mês de agosto do ano de 2013, às 08:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-graduação / FC, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, Prof. Dr. LUIS AUGUSTO SOUSA MARQUES DA ROCHA do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, Prof. Dr. CARLOS ROBERTO GRANDINI do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, Profa. Dra. MARISELMA FERREIRA do(a) Universidade Federal do ABC, Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de JULIANA FERREIRA FLORIANO, intitulada "ESTUDOS SISTEMÁTICOS DE BIOCAMPATIBILIDADE E POTENCIAL OSTEOGENICO DE MEMBRANAS BIOATIVAS EM COELHOS MACHOS". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA \_\_\_\_\_. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF



*Luís Augusto Sousa*

Prof. Dr. LUIS AUGUSTO SOUSA MARQUES DA ROCHA

Prof. Dr. CARLOS ROBERTO GRANDINI

Profa. Dra. MARISELMA FERREIRA

Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

## **DEDICATÓRIA**

*Bendito seja o Senhor, minha rocha, que adentra as minhas mãos  
para a peleja e os meus dedos para a guerra;  
Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo,  
à sombra do Onipotente descansará.  
Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio,  
a minha fortaleza, e nele confiarei.  
Porque ele te livrará do laço do passarinho, e da peste perniciosa.  
Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas estarás seguros; a sua verdade será o teu escudo e  
broquel.  
Não terás medo do terror de noite nem da seta que voa de dia,  
Nem da peste que anda na escuridão,  
nem da mortandade que assola ao meio-dia.  
Mil cairão ao teu lado,  
e dez mil à tua direita, mas tu não serás atingido.  
O Senhor é a minha luz e a minha salvação; a quem temerei? O  
Senhor é a força da minha vida; de quem me recearei?  
Ainda que um exército se acampe contra mim, o meu coração não  
temerá; ainda que a guerra se levante contra mim, conservarei a  
minha confiança.  
Bem-aventurado o povo cujo Deus é o Senhor.  
Salmo 27,91 e 144.*

***Primeiramente a DEUS, Jesus e Maria nossa mãe***

*Por estarem sempre comigo, me amparando, auxiliando e iluminando á todos os meus  
caminhos.*

*Segurando nas minhas mãos nos momentos em que mais precisei, cuidando de mim em todos os momentos desta caminhada e me livrando de todo o mal.*

***À minha mãe Maria Camargo da Silva***

*A minha eterna gratidão, por sempre acreditar em mim, por lutar para que eu conseguisse chegar aonde cheguei, por todas as noites que chorou por mim, que orou por mim e por todo amor e carinho que sempre me dedicou.*

***Ao Meu esposo Emerson***

*Que teve tanta paciência, que me incentivou, nunca me deixou desistir, cuidou de mim quando eu mais precisei, me deu apoio, amor e sempre acreditou que eu conseguiria. E tenho certeza que sem você ao meu lado eu não teria conseguido.*

***À minha irmã Joseane e meus sobrinhos***

*Que sempre acreditaram em mim e me apoiaram neste carinho mesmo que distantes.*

***À minha Vó Rosina***

*Agradeço pelo carinho, amor, cuidado e paciência.*

***Aos meus amigos e colegas de trabalho***

*Que me ensinaram, tiveram carinho e muita paciência, que sempre me incentivaram e sempre me auxiliaram nos momentos em que mais precisei.*

***Ao meu pai Paulino***

*In memória*

***Ao meu filho***

*Ao meu filho que está a caminho!*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff , pela oportunidade, por me orientar e me conduzir pelo caminho correto, por acreditar em mim, pela acolhida, pelo respeito e por tudo que me ensinou para que eu me torne melhor a cada dia.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan, agradeço por tudo que me ensinou. Você sempre será uma referência em minha vida pessoal e profissional.

A Profa. Dra. Lígia por me ajudar desde o início de minha caminhada.

Ao Técnico Paulo César Georgette que me ensinou muito, que se tornou um grande amigo, que me ajudou em tudo que precisei, sei que sempre poderei contar com você.

Aos Amigos Fausto, Valquíria e Vitor.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais por todos os ensinamentos.

Aos secretários da pós-graduação pela atenção.

A todos os amigos da pós-graduação, por toda ajuda nesta caminhada.

A todos os meus familiares que sempre acreditaram em mim.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo [...]”

*Fernando Pessoa*

FLORIANO, J.F. **Estudos sistemáticos de biocompatibilidade e potencial osteogênico de membranas bioativas em coelhos machos**, 2013, 102 f. Tese ( Doutora em Ciência e Tecnologia de Materiais ) – UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2013.

## **Resumo**

O látex ou Borracha natural (BN) oriundo da seringueira possui diversas características que o tornam um excelente biomaterial que favorece o crescimento e reparação de tecidos, pele e ossos. Porém, a maioria das pesquisas encontradas na literatura com membranas da BN utiliza mistura de diferentes clones ou conservantes químicos, a fim de evitar a coagulação da BN na coleta. Neste trabalho, comparou-se a BN proveniente de cinco clones de seringueira, buscando identificar diferenças na biocompatibilidade e bioatividade, comparando métodos de coleta convencionais e sem utilização de conservantes, visando encontrar a BN ideal para produção de biomateriais. Após a coleta da BN, as membranas foram preparadas de forma asséptica e esterilizadas. Nos testes de biocompatibilidade *in vitro*, as membranas permaneceram em contato direto com as culturas por três períodos. E nos testes *in vivo*, as membranas foram implantadas no tecido subcutâneo de coelhos adultos machos. Os testes de bioatividade foram realizados por meio de implantes das membranas de BN com melhor desempenho nos testes de bioatividade, associado ao selante de fibrina em defeitos críticos no crânio de coelhos adultos. Os resultados apontam a biocompatibilidade das membranas de BN obtidos de todos os clones. Alguns induziram maior proliferação celular, sugerindo maior bioatividade. O método de coleta influenciou na resposta do biomaterial. Amostras conservadas com hidróxido de amônio apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos em culturas e necrose, aumento de células inflamatórias nos tecidos implantados. As membranas testadas são bioativas e favoreceram a regeneração tecidual, apresentando um resultado superior ao PTFE. Os dois clones testados não apresentam diferenças na bioatividade. Concluímos que todos os clones são biocompatíveis e não genotóxicos. Os dois clones selecionados para os testes de bioatividade não apresentam diferenças significativas na bioatividade. A coleta da BN sem a utilização de conservantes é a mais adequada para a produção de biomateriais.

**Palavras-chave:** Borracha natural, Clones de Seringueira, Biocompatibilidade, Bioatividade, osteogênese.



## **Abstract**

The latex derived from rubber trees has several features that make it an excellent biomaterial to promote the growth and repair of tissues, skin and bones. Most research with latex membranes uses a mixture of different clones or chemical preservatives in the collection process. In this study, we compared five clones of latex rubber, seeking to identify their differences in bioactivity and biocompatibility in order to find a latex that is ideal for the production of biomaterials, as well to compare sampling methods with and without the use of preservatives. After collection, the latex membranes were prepared aseptically and sterilized. In the *in vitro* tests, the membranes remained in direct contact with crops for three periods. In the *in vivo* tests, the membranes were implanted subcutaneously in rabbits. The results indicated the biocompatibility of the membranes obtained from all clones. Some induced greater cell proliferation, suggesting greater bioactivity. Regarding the collection method, we found that the biomaterial samples preserved with ammonia showed cytotoxic and genotoxic effects in cultures, necrosis, and increased inflammatory cells in tissues implanted. The membranes are bioactive and promote the tissue regeneration, an outcome superior to PTFE. The two clones tested did not show differences in bioactivity. We conclude that all clones are biocompatible and non-genotoxic. The two clones selected for bioactivity tests not show significant differences in the bioactivity. The collection of BN without the use of preservatives is the most suitable for the production of biomaterials.

**Keywords:** Natural rubber, rubber tree clones, ammonia, biocompatibility, bioactivity

## Lista de Ilustrações

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Esquema representativo das frações da BN após a centrifugação e separação de seus principais componentes (FRADE et al., 2001).....                                                                                                                                                                                                                                              | 17 |
| Figura 2: Estrutura química da parte isoprênica da BN (AGOSTINI et al., 2009). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 18 |
| Figura 3: Esquema utilizado para realizar a coleta com baixa temperatura. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 36 |
| Figura 4: Filmes finos de BN. (A) antes da secagem e (B) após secagem. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 37 |
| Figura 5: Células em cultivo em contato direto com as membranas. Microscopia convencional 40X. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 42 |
| Figura 6: Células viáveis aderidas ao fundo da placa de cultivo antes da coloração com o corante vermelho neutro (A), e células viáveis após a coloração com o corante (B). Microscopia convencional 40X. ....                                                                                                                                                                            | 43 |
| Figura 7: Imagens de cometa obtidas durante a realização do teste de genotoxicidade. Microscopia de fluorescência 400X. ....                                                                                                                                                                                                                                                              | 45 |
| Figura 8: Incisões para implante do material no tecido subcutâneo dos animais. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 49 |
| Figura 9: Implante dos fragmentos de membrana no tecido subcutâneo dos animais. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 49 |
| Figura 10: DCC com aproximadamente 2cm, criado em coelhos machos adultos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 56 |
| Figura 11: A: posição dos fragmentos de membrana dentro do defeito ósseo, e B: posição do fragmento de membrana recobrimdo o defeito ósseo. ....                                                                                                                                                                                                                                          | 57 |
| Figura 12: Viabilidade celular de fibroblastos medida pelo corante vital vermelho neutro nos períodos de 24, 48 e 72h após o contato direto das células em cultura com as diferentes membranas de BN oriundas dos clones: RRIM600, PB 235, GT 1, PR 255 e IAN 873. A a-membrana está representada por (RRIM 600 '). ....                                                                  | 61 |
| Figura 13: Genotoxicidade medida pelo teste do cometa no período de 72h após o contato direto das células em cultura com as diferentes membranas de BN oriundas dos clones: RRIM600, PB 235, GT 1, PR 255 e IAN 873. A a-membrana está representada pelo hachurado (RRIM 600 '). Em (A) podemos verificar o parâmetro <i>tail intensity</i> e em (B) <i>tail moment</i> . * P<0,001. .... | 63 |
| Figura 14: A e B: imagem macroscópica da região de implante de af- membranas do clone IAN 873. Em C: análise histológica da mesma amostra. ....                                                                                                                                                                                                                                           | 64 |
| Figura 15: Em A e B e C: imagem macroscópica da região de implante de a-membranas do clone IAN 873. Em D: análise histológica da mesma amostra. ....                                                                                                                                                                                                                                      | 66 |
| Figura 16: Em A: análise histológica do tecido adjacente ao implante de PTFE após 1 (A1), 4 (A2) e 12 (A3) semanas após a cirurgia, usando um aumento de 40x. Em B, a mesma                                                                                                                                                                                                               |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| descrição de A para as af-membranas oriundas do clone RRIM 600. Em C, mesma<br>descrição de B para as af-membranas oriundas do clone IAN 873. Em D, mesma<br>descrição de C, para amostras de a-membranas oriundas do clone IAN 873.....            | 67 |
| Figura 17: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das<br>membranas produzidas a partir dos clones RRIM 600 (a - membrana) e (af-membrana).<br>A banda em $1542\text{ cm}^{-1}$ está em destaque.....                   | 69 |
| Figura 18: Micrografias de af-membranas produzidas a partir do clone RRIM 600 após o<br>contato com células de fibroblastos (B), bem como a superfície porosa da membrana (A).<br>.....                                                             | 71 |
| Figura 19: Em A está apresentada a imagem de RX do animal que recebeu o coágulo<br>sanguíneo, com 30 dias de pós-cirúrgico. Em B está apresentada a imagem de RX do<br>animal que recebeu o implante de BN do clone RRIM 600 no mesmo período. .... | 72 |
| Figura 20: Imagens de RX digital do grupo tratado com af-membranas de BN produzidas a<br>partir do clone RRIM 600 no período de 60 dias após o implante em DCC.....                                                                                 | 73 |
| Figura 21: Imagens de RX digital do grupo tratado com af-membranas de BN produzidas a<br>partir do clone IAN 873 no período de 60 dias após o implante em DCC.....                                                                                  | 74 |
| Figura 22: Imagens de RX digital do grupo tratado com membranas de PTFE no período de<br>60 dias após o implante em DCC. ....                                                                                                                       | 75 |
| Figura 23: Imagens de RX digital do grupo tratado com coágulo no período de 60 dias após o<br>implante em DCC. ....                                                                                                                                 | 76 |
| Figura 24: Imagens de RX digital do grupo tratado com af-membranas de BN produzidas a<br>partir do clone RRIM 600 no período de 90 dias após o implante em DCC.....                                                                                 | 77 |
| Figura 25: Imagens de RX digital do grupo tratado com af-membranas de BN produzidas a<br>partir do clone IAN 873 no período de 90 dias após o implante em DCC.....                                                                                  | 77 |
| Figura 26: Imagens de RX digital do grupo tratado com membranas de PTFE no período de<br>90 dias após o implante em DCC. ....                                                                                                                       | 79 |
| Figura 27: Imagens de RX digital do grupo tratado com coágulo no período de 90 dias após o<br>implante em DCC. ....                                                                                                                                 | 79 |
| Figura 28: Imagens de TC do grupo tratado com af-membrana do clone RRIM 600 após o<br>implante em DCC. A: período de 60 dias e B: período de 90 dias.....                                                                                           | 80 |
| Figura 29: Imagens de TC do grupo tratado com af-membrana do clone IAN 873 após o<br>implante em DCC. A: período de 60 dias e B: período de 90 dias.....                                                                                            | 81 |
| Figura 30: Imagens de TC do grupo tratado membranas de PTFE após o implante em DCC. A:<br>período de 60 dias e B: período de 90 dias.....                                                                                                           | 81 |

|                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 31: Imagens de TC do grupo tratado com coágulo. A: período de 60 dias e B: período de 90 dias. ....                                                                                                                                   | 82 |
| Figura 32: Imagens de TC com análise da densidade óssea por meio das unidades de HU dos grupos tratados com af-membranas, nos períodos de 60 e 90 respectivamente, após o implante em DCC. A e B: clone RRIM 600, C e D: clone IAN 873. .... | 83 |
| Figura 33: Imagens de TC com análise da densidade óssea por meio das unidades de HU dos grupos tratados nos períodos de 60 e 90 dias respectivamente, após o implante em DCC. A e B: membrana de PTFE; C e D: coágulo sanguíneo.....         | 85 |

## **Lista de Tabelas**

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Composição média da BN recém-coletada.....                                     | 19 |
| Tabela 2: Valores de HU e tecido correspondente. ....                                    | 60 |
| Tabela 3: Avaliação histológica do tecido adjacente ao implante das membranas de BN..... | 68 |
| Tabela 4: Resultados da densidade óssea avaliada por meio das TCs.....                   | 86 |

## SUMÁRIO

|           |                                                                                                                           |            |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1.</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                   | <b>15</b>  |
| 1.1.      | O Látex .....                                                                                                             | 15         |
| 1.2.      | A membrana de BN como biomaterial .....                                                                                   | 21         |
| 1.2.1.    | Definição de biomateriais .....                                                                                           | 21         |
| 1.2.2.    | Estudos em modelo animal .....                                                                                            | 22         |
| 1.2.3.    | Estudos em humanos .....                                                                                                  | 26         |
| 1.3.      | Benefícios da utilização da BN como biomaterial na regeneração óssea .....                                                | 29         |
| 1.4.      | Alergia a BN .....                                                                                                        | 31         |
| <b>2.</b> | <b>MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS .....</b>                                                                                        | <b>34</b>  |
| <b>3.</b> | <b>PRODUÇÃO DAS AMOSTRAS .....</b>                                                                                        | <b>35</b>  |
| 3.1.      | Coleta e preparação das membranas de BN .....                                                                             | 35         |
| <b>4.</b> | <b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS DAS TÉCNICAS<br/>PARA AVALIAR A BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DA BN .....</b> | <b>38</b>  |
| 4.1.      | Biocompatibilidade .....                                                                                                  | 38         |
| 4.1.1.    | Testes <i>in vitro</i> .....                                                                                              | 40         |
| 4.1.1.1   | Citotoxicidade .....                                                                                                      | 40         |
| 4.1.1.2   | Genotoxicidade .....                                                                                                      | 43         |
| 4.1.1.3   | Caracterização das membranas .....                                                                                        | 45         |
| 4.1.2.    | Testes <i>in vivo</i> de Biocompatibilidade .....                                                                         | 46         |
| 4.1.2.1   | Implantes Subcutâneos .....                                                                                               | 47         |
| 4.1.2.2   | Análises histológicas .....                                                                                               | 50         |
| 4.2.      | Testes <i>in vivo</i> de bioatividade .....                                                                               | 50         |
| 4.2.1.1   | Selante de fibrina .....                                                                                                  | 53         |
| 4.2.2     | Técnica cirúrgica para avaliação da Bioatividade .....                                                                    | 55         |
| 4.2.3     | Diagnóstico por imagem .....                                                                                              | 59         |
| 4.2.4     | Análise estatística .....                                                                                                 | 60         |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                       | <b>61</b>  |
| 5.1.      | Resultados de Biocompatibilidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....                                                   | 61         |
| 5.2.      | Resultados de bioatividade .....                                                                                          | 72         |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                   | <b>88</b>  |
| <b>7.</b> | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                  | <b>90</b>  |
| <b>8.</b> | <b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....</b>                                                                                          | <b>102</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O Látex

O látex, ou borracha natural (BN) é a seiva extraída da seringueira (*Hevea brasiliensis*), planta originária da Bacia Amazônica, na América do Sul, porém o seu maior cultivo localiza-se principalmente no Sudeste da Ásia (GILBERT et al., 1973 ; GRAVE et al., 1993; HASMA et al., 1993; MORCELI et al., 2003).

A seringueira pertence à família das Euforbiáceas, que é representada por 290 gêneros e cerca de 7.500 espécies. São plantas arbóreas, arbustivas, subarbuscos e ervas com folhas alternas simples ou compostas estipuladas. As espécies mais conhecidas e de grande interesse comercial são: a seringueira e a mamona (*Ricinus communis* L.). Entre suas características botânicas observa-se a presença de substâncias laticíferas, visíveis quando a planta é submetida às injúrias mecânicas (DALL'ANTONIA et al., 2006).

A seringueira apresenta uma grande variabilidade vegetativa e produtiva. Assim, para a produção de borracha utilizada na indústria pesada (pneumática) e leve (artefatos), entre outras, são empregados diferentes clones. Um clone constitui um grupo de plantas que é obtido por meio da propagação vegetativa de uma planta matriz, e todas as árvores do clone possuem a mesma constituição genética responsável pela uniformidade existente entre elas, e neste caso ocorre o melhoramento genético da planta, unindo qualidades específicas baseadas em seus potenciais de produção e resistência (COSTA, 2001).

A introdução de clones no seringal apresenta inúmeras vantagens, e a uniformidade das plantas é a principal delas, possibilitando ao heveicultor adotar um manejo fácil e econômico. A uniformidade da BN é outro fator importante, pois para propósitos industriais específicos esta qualidade é muito apreciada, tornando essa uniformidade essencial. Por meio

de clones específicos é possível selecionar a BN para propósitos distintos, exigidos pela indústria (GONCALVEZ et al., 2006).

Estão presentes na natureza inúmeras espécies de plantas laticíferas, porém a seringueira é a única que produz BN de alta qualidade (ADIWILAGA et al., 1996). A BN possui propriedades únicas e superiores até mesmo ao seu análogo, o látex sintético. Apresenta uma excelente elasticidade e baixa histerese mecânica, por isto a BN é considerada um material ideal na produção de pneus, elementos de suspensão e para-choques (BIKALES et al., 1973) e também produtos leves de alta resistência como balões, luvas cirúrgicas e preservativos (DALL'ANTONIA et al., 2006). A BN também é considerada um material inovador, podendo ser utilizada em argamassas na construção civil, indústria aeronáutica e naval, tubos para usos em hospitais, compósitos condutores e materiais de alta precisão como válvulas e retentores (PIERRE et al., 2002).

A BN é composta por um sistema coloidal polifásico. A parte dispersa é constituída de micelas de borracha que constituem 30 a 45% de sua massa, proteínas, lutóides que constituem 10 a 20% e partículas Frey-Wyssling que estão presentes em pequena quantidade (apenas 1%) e são constituídas por carotenoides e lipídios, que conferem à BN sua coloração amarelada (WISNIEWSKI et al., 1983; HONORATO et al., 2005). O meio dispersivo é constituído pelo soro aquoso que é composto por inúmeras proteínas, aminoácidos e sais minerais (WITITSUWANNAKUL et al., 2008), como podemos verificar na Figura 1.



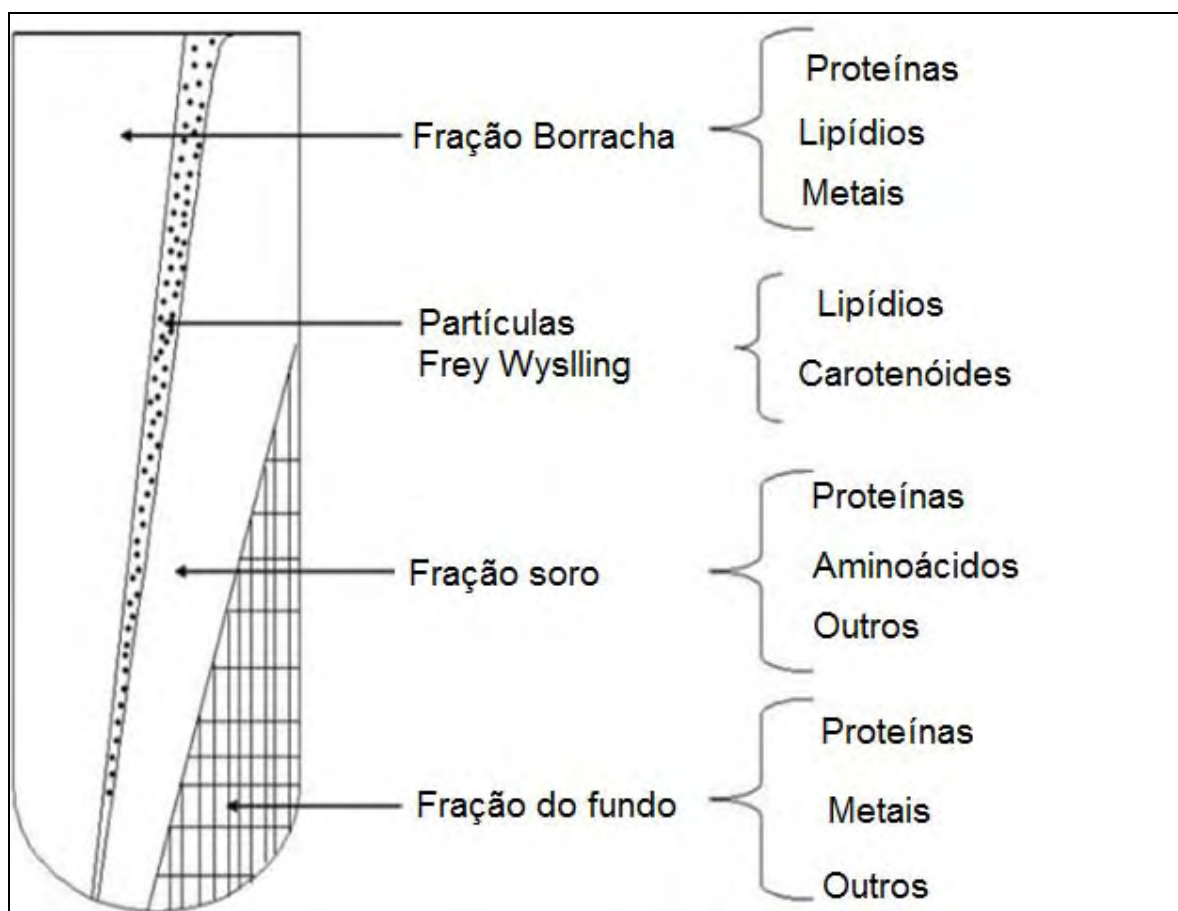


Figura 1: Esquema representativo das frações da BN após a centrifugação e separação de seus principais componentes (FRADE et al., 2001).

O peso molecular da BN depende da origem clonal, e varia de 600.000 a 950.000 g/mol, sua estrutura é composta de três unidades trans-isoprênicas (parte cristalina), cerca de 10.000 unidades cis-isoprênicas (parte amorfa), do tipo cabeça-calda (GALIANI et al., 2007), combinadas por ligações 1,4 e um grupo  $\alpha$  terminal, como pode ser verificado na Figura 2.

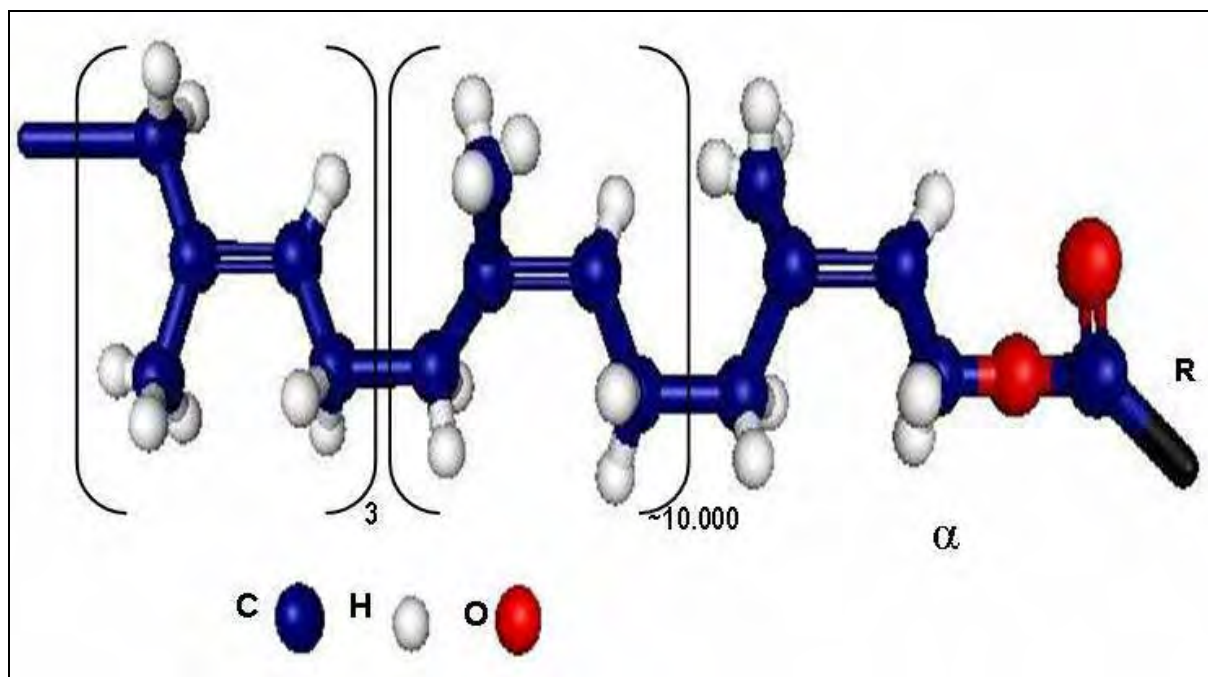


Figura 2: Estrutura química da parte isoprênica da BN (AGOSTINI et al., 2009).

A BN exibe um comportamento elástico mediante reticulação intermolecularmente. Suas partículas são cercadas por ânions e proteínas que estão carregadas negativamente. Quando exposta ao ar, ocorre a coagulação e as proteínas são rapidamente decompostas por bactérias e enzimas, enquanto a reticulação dentro das partículas de borracha conduz a uma degradação das cadeias de borracha (MARTINS, 2005).

A BN possui outros constituintes que foram relatados em alguns estudos fitoquímicos, como polissacarídeos, flavonoides, lipídeos, fosfolipídios e proteínas. Foi comprovada também a existência de alcanos, cetonas triterpênicas, triterpenóides, açúcares e ácidos graxos (UZABAKILIHO et al., 1987). A composição média da BN recém-coletada está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição média da BN recém-coletada.

| <b>Constituintes</b>                      | <b>(%) em massa na BN</b> |
|-------------------------------------------|---------------------------|
| <b>Borracha</b>                           | 25-45                     |
| <b>Proteínas</b>                          | 1-1,8                     |
| <b>Carboidratos</b>                       | 1-2                       |
| <b>Lipídeos neutros</b>                   | 0,4-1,1                   |
| <b>Lipídeos polares</b>                   | 0,5-0,6                   |
| <b>Inorgânicos</b>                        | 0,4-0,6                   |
| <b>Aminoácidos, aminas, entre outros.</b> | 0,4-0,6                   |
| <b>Água</b>                               | 49-71                     |

Fonte: RIPPEL et al., 2003.

A BN recém-coletada apresenta pH entre 6 e 7, e densidade entre de 0,975 e 0,980 g/cm<sup>3</sup>. A BN possui viscosidade variável que depende do clone, período do dia de realização da coleta e estação do ano (RIPPEL et al., 2003).

A coleta da BN é realizada por meio de um processo denominado sangria, e para a sua estabilização é utilizado hidróxido de amônio. A sangria consiste na prática de uma incisão na casca do tronco, com um equipamento denominado *jebong*, para seccionar os vasos laticíferos e permitir o escoamento de um líquido branco-leitoso, às vezes amarelado, que genericamente se chama látex, ou BN (GONÇALVES et al., 2000). Após a sangria, logo que a BN começa a fluir ocorre a penetração de água nos tecidos laticíferos a partir dos tecidos adjacentes, verificando-se um progressivo efeito de diluição da BN. As pressões na região basal do tronco da seringueira geralmente excedem às da região apical, sendo que o gradiente é de cerca de 1 atm/10 m durante à noite, aumentando gradualmente, até seis vezes o valor observado durante o dia. Durante o dia ocorre a queda da pressão de turgidez da BN devido a passagem de água do floema para o xilema sob condições de alta taxa transpiratória. Neste caso, se ocorrer forte precipitação à tarde, as pressões hidrostáticas aumentam na superfície do tronco sem decréscimo no déficit de água foliar (COSTA et al., 2010).

O escoamento da BN é provocado pela pressão interna predominante dentro dos vasos laticíferos. Inicialmente o escoamento é rápido, tornando-se lento ao longo do processo, sendo que de modo geral, esse processo pode levar de 2 a 3 horas. (MORENO et al., 2007).

A seringueira reconstrói em pouco tempo a BN retirada após uma operação de sangria. Por este motivo, sua exploração pode ser realizada continuamente durante todo ano, em dias alternados. O escoamento está intimamente relacionado com o grau de hidratação dos tecidos na área de sangria. Desta forma, as condições ecológicas influenciam no processo, podendo desfavorecer um bom fluxo de BN. Por este motivo, o horário de realização de sangria deve ser condicionado ao período de baixa evapotranspiração, isto é, preferencialmente nas primeiras horas do dia (MORENO et al., 2003).

Existem vários métodos de sangria, porém o mais amplamente utilizado nos seringais do país é o de sangria em meio espiral em dias alternados, tecnicamente denominados S/2, d/2. Para a realização deste processo torna-se obrigatória a utilização de mão-de-obra especializada. O seringueiro é de extrema importância para a coleta da BN, já que se ele não for suficientemente treinado, habilidoso e dedicado, poderá acarretar inúmeros prejuízos ao heveicultor e até danificar totalmente o seringal (ORTOLANI et al., 1998).

O hidróxido de amônio é utilizado para conservação da BN, bem como para evitar que ocorra o processo natural de coagulação após a coleta, ou seja, atua como conservante (SUM et al., 1983). Existem várias hipóteses para explicar o fenômeno de coagulação da BN, e a mais aceita propõe que a atuação de microorganismos poderiam causar a decomposição dos componentes não borracha, interferindo diretamente no pH da BN favorecendo o processo de coagulação. A queda no pH da BN de 6 para 5 está envolvida no processo de coagulação espontânea (BLACKLEY et al., 1997). O Hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) é um bactericida muito eficiente em concentrações acima de 0,35% em massa, que atua impedindo o crescimento de microorganismos, os quais podem estar envolvidos no processo de coagulação. O hidróxido de amônio também eleva o pH da BN, retardando este processo (BLACKLEY et al., 1997; RIPPEL et al., 2009), porém, sendo um agente químico, pode causar queimaduras nos olhos e pele de quem o manipula, e por ser altamente solúvel em

água, permite a dissolução em mucosas ou membranas, formando hidróxido de amônio, podendo causar necrose tecidual. Além disso, pode interagir também com o sistema nervoso central, causando encefalopatia hepática, deficiências bioenergéticas, alterações no pH, entre outros efeitos (ALBRECH et al., 2006).

## **1.2. A membrana de BN como biomaterial**

### **1.2.1. Definição de biomateriais**

Biomateriais é toda substâncias ou combinação de substâncias, exceto fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo ou de estruturas específicas do organismo que foram perdidas ou ficaram comprometidas por diversos fatores como: envelhecimento, doenças ou lesões (WILLIANS,1987; PARK et al., 2007).

Os biomateriais podem ser classificados como: biocompatível ou bioinerte, ou seja, não provoca reação de corpo estranho no organismo, não devem ser tóxicos, cancerígenos, antigênicos e mutagênicos; Biotolerados, moderadamente aceitos pelo tecido receptor e geralmente envolvidos por tecido fibroso; Bioativos, onde ocorre a ligação direta aos tecidos vivos devido aos íons, por exemplo, o  $\text{Ca}^{+2}$  e/ou  $\text{PO}_4^{-2}$  presentes nos substitutos ósseos, que favorecem uma ligação química com o tecido ósseo e Reabsorvíveis, que são lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos tecidos como os fosfato tricálcio (TCP) e os biovidros (PARK et al., 2007).

Os Biomateriais podem ser classificados também de acordo com sua natureza química; metálicos, cerâmicos, polímeros e compósitos (KAWACHI et al., 2000).

Com o avanço no uso destes materiais, concluiu-se que os biomateriais modernos não devem ter apenas a função de preenchimento de espaço e sim estar associados a uma resposta biológica particular, disparada por sinais originados em nível molecular que incluem: correntes elétricas, distribuição eletrônica, conformação molecular, estado de agregação ou propriedades físico-químicas locais particulares, características estas que podem ser introduzidas por arranjos especiais de grupos funcionais sobre uma estrutura polimérica, reações de reticulação, propriedades particulares de superfície e arranjos macromoleculares (WILLIAMS, 2009).

O conhecimento dos mecanismos fisiológicos possibilitou o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos biomateriais utilizados por milhões de pessoas, aperfeiçoando seu objetivo de substituir ou restaurar funções de tecidos danificados ou doentes. Os biomateriais possuem diversos tipos de aplicações, que vão desde implantes dentários ou de articulações, como o joelho, placas e parafusos ortopédicos, até válvulas cardíacas, lentes de contato, aparelhos intrauterinos, fios de sutura, próteses para cirurgia plástica, entre outros (BLACK, 1999).

### **1.2.2. Estudos em modelo animal**

A BN funciona como uma defesa natural da planta quando sujeita à injúria. Algumas tribos indígenas a utilizavam em seu estado natural, de forma empírica, para curar feridas da pele. Ao observar tal evento, alguns pesquisadores desenvolveram próteses feitas por meio deste material (MRUÉ, 2000), que foram utilizadas com sucesso na reconstrução de esôfagos de cães, sendo eliminadas nas fezes dos animais após dez dias de pós-operatório. Os resultados deste estudo mostraram que a membrana de BN como novo material de fonte biológica, possui características bioquímicas importantes, que foram capazes de interferir no

processo de reparação tecidual, favorecendo a formação rápida e regular de novo tecido, além de ser de fácil manuseio, dispensando técnicas complexas para sua confecção e utilização, sendo considerado um cicatrizante natural (MRUÉ, 2000).

Sader et al. (2000) avaliaram o comportamento de membranas de BN como substituto parcial do pericárdio em dezesseis cães. Onde observaram a regeneração do pericárdio nativo e afirmaram que a membrana de BN mostrou-se satisfatória para a substituição parcial do pericárdio de cães.

A membrana também foi utilizada na reconstrução da parede abdominal de cães, apresentando excelentes resultados, indicando que a membrana induz a formação de uma matriz fibrovascular capaz de substituir o tecido original onde for implantada (MRUÉ, 2000).

Excelentes resultados foram obtidos por meio da utilização das membranas de BN na expansão de bexiga no trato urinário de coelhos, sendo que neste caso a membrana permitiu o progressivo crescimento dos componentes normais da parede da bexiga, incluindo urotélio e músculo liso, e não houve a ocorrência de fístulas e formação de pedras. Histologicamente verificou-se que aos quinze dias ocorreu reação fibrovascular apresentando células inflamatórias, aos quarenta e cinco dias, hiperplasia epitelial e de músculo liso, e aos noventa dias, redução na hiperplasia e reconstituição do urotélio de forma semelhante ao original (DOMINGOS et al., 2009).

Mente et al. (2001) implantaram a membrana de BN com e sem polilisina a 0,01% no tecido subcutâneo de quatro ratos normais e em quatro ratos diabéticos, para avaliar a indução da neovascularização e biocompatibilidade. Após vinte e um dias os pesquisadores observaram que os dois tipos de membranas mostraram-se biocompatíveis, aumento da vascularização local, não foi observado aderências com o tecido adjacente e, por este motivo a membrana pode ser facilmente removida. Histologicamente ocorreu a formação de epitélio

com células alongadas semelhante ao endotélio, e infiltrado mononuclear, discreta região de fibrose e um moderado aumento na quantidade de capilares.

Membranas de BN com polilisina a 0,1% foram utilizadas em estudos de herniorrafia perineal de cães, por meio de sutura de fragmentos de membranas nos músculos adjacentes. A biomembrana permitiu a oclusão do anel herniário e formação de tecido de granulação, e quando foi removida observou-se uma base tecidual na região implantada (PAULO et al. 2005).

Rabelo et al. (2004), avaliaram a viabilidade de um compósito de BN, poliamida e polilisina a 0,1% em implantes nas hernioplastias umbilicais recidivantes em doze bovinos, mestiços, machos, por meio da justaposição do compósito sob o anel herniário. Por meio das análises histopatológicas, observaram que a membrana compósita implantada manteve seu formato original, não havendo retração ou enrugamento. Observou-se também crescimento de tecido conjuntivo fibroso sobre a membrana, e associação entre o tecido conjuntivo neoformado e o tecido muscular adjacente, promovendo assim a reparação cicatricial.

Bolina-Matos (2009) demonstrou que a BN pode ser utilizada com sucesso como substituto temporário da pele, favorecendo a cicatrização em áreas queimadas e a neoangiogênese em ratos, oferecendo ainda proteção às áreas lesadas e boa aderência. Dessa forma, a BN pode ser utilizada por um longo período de tempo, além apresentar uma ótima adaptação à região em que foi aplicada, favorecendo a formação de um tecido de granulação adequado e com presença de fibras colágenas.

Outro estudo visando avaliar a influência da membrana de BN no processo de reparo da conjuntiva ocular foi realizado com sucesso. Os pesquisadores removeram retângulos da conjuntiva de ambos os olhos de quinze coelhos adultos. Nos olhos onde foram implantadas membranas de BN, foi verificado que a membrana foi capaz de promover a reconstituição



conjuntival, quando comparada ao grupo controle, onde não se utilizou nenhum material, favorecendo assim a cicatrização conjuntival e a neoangiogênese (PINHO et al., 2004).

Paulo et al. (2005), compararam implantes de membrana de BN sem e com polilisina 0,1% e tela de márlex na reparação de defeitos abdominais iatrogênicos em ratos, onde retiraram um segmento circular de aproximadamente 3 cm da parede muscular abdominal ventral de 31 ratos Wistar. Os pesquisadores observaram formação de tecido conjuntivo fibroso e aderências viscero-parietais em todos os grupos tratados com a membrana de BN sem e com polilisina 0,1%. Os implantes foram eliminados, em média aos 13,8 dias de pós-operatório.

Em estudos para desenvolver um modelo de prótese vascular microperfurada, confeccionada a partir de tecido recoberto com um composto derivado da BN, quinze cães foram tratados. A partir de resultados positivos os pesquisadores concluíram que a prótese de BN demonstrou propriedades mecânicas que favorecem seu uso como substituto vascular. Além disso, verificaram que as próteses apresentaram biocompatibilidade com o sistema arterial do cão, apresentando adequada integração tecidual e crescimento endotelial, sendo inteiramente revestida por endotélio (BRANDÃO et al., 2007).

Em estudos para avaliar reparação no palato secundário em cães, Silva (2006) utilizou a membrana de BN para recobrir os defeitos criados. Foi observado neste estudo o fechamento completo do defeito no décimo dia de pós-operatório. No entanto, nos grupos não tratados o tempo de fechamento foi maior. A membrana manteve-se íntegra durante todo período em que permaneceu recobrindo o defeito, e não foi verificada reação alérgica ou rejeição. Além disso, a membrana não interferiu na vascularização local e garantiu o aporte sanguíneo necessário para que ocorresse o reparo.

Zimmermann et al. (2007) avaliaram a biocompatibilidade e resistência de três membranas de BN em cães, por meio de implantes entre os músculos cutâneo e reto do

abdômen. As membranas foram submetidas a testes mecânicos de tração para determinação de deformação e resistência. Conclui-se que as diferentes formulações de membranas testadas ofereceram resistência apropriada para implantação e reparação da bainha muscular em cães.

### **1.2.3. Estudos em humanos**

A partir dos resultados positivos verificados nos estudos utilizando modelos animais, ficou claro que a membrana de BN apresenta potencial de reparação tecidual e biocompatibilidade. Por estes motivos, foram desenvolvidos estudos em humanos, onde a membrana foi utilizada como material indutor de neoformação tecidual, tendo sido aplicada em pacientes com úlceras crônicas de membros inferiores. Apresentando excelentes resultados, onde foi verificado que a BN é capaz de induzir a formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, induzir a angiogênese na superfície em que foi aplicada, favorecendo a regeneração de tecidos (ERENO, 2003).

Com base nestes estudos surgiu a empresa Pele Nova, uma empresa de produtos médicos para regeneração e cicatrização da pele. O produto patenteado pela empresa leva o nome de Biocure®, uma membrana produzida a partir de BN. O Biocure® é utilizado em úlceras crônicas diabéticas, vasculares, de pressão (escaras de decúbito), pós-cirúrgicas ou traumáticas, sendo capaz de acelerar a regeneração tecidual, auxiliando feridas que demoram meses, até anos, a cicatrizar em um curto período de tempo. Atualmente a empresa lançou no mercado outro produto inovador, que é um gel à base de BN, denominado de Regederme®, que apresenta os mesmos efeitos benéficos que o Biocure®, porém é de mais fácil manuseio, permitindo que o próprio paciente possa ministrar sua aplicação, diferentemente do Biocure®, que necessitava de auxílio médico ou de enfermagem para sua aplicação (PELE NOVA, 2013).

Oliveira et al. (2003) utilizaram a membrana de BN com polilisina como implante transitório, para o fechamento da perfuração da membrana timpânica, em 238 pacientes com perfuração desta membrana ocorrida por sequela de otite média crônica. Os pesquisadores observaram a interação do material e a biocompatibilidade, e concluíram que a membrana de BN promove a neovascularização e apresenta grande potencial para uso como implante transitório em miringoplastias. Foi verificada a exuberante vascularização e hiperemia do enxerto e da membrana timpânica remanescente. Também foi verificado o fechamento da perfuração em 90,5% dos pacientes, sendo que o tempo médio de fechamento foi de 28 dias. Após o período de dois meses as membranas timpânicas já se apresentavam normais.

Em estudos de timpanomastoidectomia, Sousa et al. (2007) avaliaram, em 64 pacientes, o desempenho da membrana de BN como uma interface entre o osso cruento e o material de tamponamento, analisando seu papel na epitelização da neocavidade. Foi observado biocompatibilidade do material nos pacientes onde a membrana foi utilizada e epitelização mais precoce da neocavidade, com a presença de fibrina a partir do 14º dia.

A membrana de BN foi utilizada em ferida pósexenteração orbitária por carcinoma basocelular em paciente de sexo masculino, com o objetivo de estimular a cicatrização da cavidade orbitária. Os pesquisadores concluíram que a granulação da cavidade orbitária com o uso da membrana não mostrou-se satisfatória aos resultados esperados. Possivelmente este resultado negativo pode ser devido a grande área em que a BN foi aplicada para que promovesse a granulação ou que a própria membrana não seja capaz de promover esta granulação (FUJIMOTO et al., 2007).

A partir dos estudos de reparação tecidual, pesquisadores iniciaram uma nova área de pesquisa, utilizando a membrana de BN na regeneração óssea de defeitos em tíbia de coelhos. Silva et al. (2006) propuseram o desenvolvimento de filmes de BN e BN-modificada com proteínas indutoras da osteogênese, para utilização como membrana oclusiva em

experimentos de regeneração óssea guiada. Como resultado foi verificado que a membrana atua como uma barreira mecânica, impedindo a invasão de tecido epitelial no local da lesão óssea, o que dificultaria sua cicatrização. A BN- modificada, além da barreira mecânica, atuou como liberadora gradativa de substâncias com potenciais osteogênicos. Nestes estudos os pesquisadores concluíram que a BN é um excelente candidato ao processo de cicatrização óssea, apresentando biocompatibilidade e acelerando o processo de reparo, fato que pode ser explicado pelo seu potencial angiogênico, além de apresentar ótima flexibilidade e resistência mecânica que contribuíram para o bom desempenho da membrana neste tipo de aplicação.

Em estudos de regeneração óssea guiada e membrana oclusiva, por meio de defeitos críticos em crânio de coelhos, Ereno et al. (2007) concluíram que animais tratados com a membrana de BN não apresentaram reação inflamatória de corpo estranho. Desse modo, a membrana pode ser considerada um biomaterial promissor para futuras aplicações na regeneração óssea guiada.

Martins et al. (2010) mostraram em estudo de regeneração óssea guiada, que o uso de membranas à base de BN neste tipo de processo cirúrgico é altamente indicado, pois a membrana forma barreiras que impedem ou dificultam a migração de células incompatíveis com o tecido a ser neoformado e promovem a osteogênese. Os animais tratados com tais membranas apresentaram melhores resultados quando comparados aos tratados com membranas PTFE, e o grupo que não foi tratado com nenhum tipo de membrana apresentou pior desempenho, com desorganização do tecido frouxo, que age como obstáculo para a osteogênese. Desse modo, o emprego de membranas de BN foi considerado efetivo em processo de regeneração óssea guiada.

A membrana de BN foi empregada em estudos de ortopedia visando avaliar a aceleração da formação do osso alveolar, verificando-se a progressiva integração do material

ao osso, concomitantemente com a aceleração da formação óssea e melhora no processo de cicatrização (BALABANIAN et al., 2006).

Resultados positivos também foram obtidos em estudos de regeneração óssea por meio de defeitos críticos no crânio de ratos. Os resultados indicam que possivelmente as membranas podem ser utilizadas no tratamento de osteoporose, na odontologia e na reconstituição de ossos da face (ODONTOLÓGIKA, 2003).

Em estudo utilizando domes de titânio e uma malha à base de BN para regeneração óssea vertical guiada observou-se a formação de osso cortical, perto da parede do titânio, sendo que não foram observadas áreas de necrose ou inflamação. Os infiltrados inflamatórios foram verificados em áreas focais e foram representados por leucócitos, células mononucleares ou polimorfonucleares dispersas aleatoriamente, que provavelmente eram células remanescentes da fase aguda da inflamação no pós-operatório. Em todos os grupos experimentais não foram encontradas células gigantes de corpo estranho, mostrando mais uma vez a boa biocompatibilidade da BN e seus excelentes resultados na regeneração óssea (PONS et al. 2013).

A membrana de BN apresenta muitas características que a tornam um excelente material para a produção de biomateriais, como biocompatibilidade, alta resistência mecânica, elasticidade e baixo custo. Essas membranas tem um futuro muito promissor na medicina, pois são excelentes indutores nas situações em que são necessários reparos, como em perdas ósseas, de pele e vasos sanguíneos (MAZOCCO, 2002).

### **1.3. Benefícios da utilização da BN como biomaterial na regeneração óssea**

Existem várias patologias que podem causar perdas ósseas, como por exemplo, os traumas causados por acidentes, câncer, defeitos congênitos, alguns processos cirúrgicos entre

outros, e a substituição destas partes ósseas perdidas pode ser realizada por meio de enxertos ou implantes ósseos (MISCH, 2000).

O enxerto ósseo é o transplante de um fragmento ósseo de uma parte para outra no mesmo indivíduo ou entre indivíduos de espécies iguais ou diferentes. Pode-se acrescentar a esta definição a possibilidade de inclusão de substâncias inertes ou não inertes dentro dos defeitos ósseos, com a finalidade de ativar ou acelerar a osteogênese. Os enxertos autógenos, também conhecidos como auto-enxertos, são enxertos removidos do próprio paciente. Os locais doadores preferidos de osso autógeno extra-bucal incluem a crista ilíaca, a tíbia, a calota craniana e, em proporção menor, a costela e a fíbula (MISCH, 2000).

As cirurgias para enxertos ósseos podem trazer alguns danos aos pacientes, como dores intensas, submissão a vários processos cirúrgicos e podem causar mais deformidade no sítio doador e rejeição do implante ou enxerto. Desse modo, existe a necessidade de estudos nesta área, para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que necessitam destes procedimentos (CUNHA et. al., 2004).

Para substituir os enxertos ósseos foram desenvolvidos alguns biomateriais, como os ossos artificiais, próteses, entre outros. Um bom exemplo de substituinte de osso artificial é o produzido por meio de um material cerâmico com poros capazes de se ligarem aos tecidos orgânicos do paciente. Porém, ainda existem grandes desafios a serem vencidos na área de implantes com ossos artificiais, pois o material deve ser o mais próximo possível do tecido ósseo natural, não pode provocar respostas negativas ao organismo, deve ser estéril e reabsorvível em alguns casos. As próteses devem ser réplicas não somente na aparência, mas também em suas propriedades biológicas e mecânicas (VASCONCELOS et. al. 2008).

Dentre os diversos estudos que estão sendo desenvolvidos na área de implantes ósseos, há uma linha de pesquisa voltada a alguns produtos naturais que apresentam grande potencial

osteogênico, como a BN, que vem demonstrando excelentes resultados conforme mencionado anteriormente (subseção 1.2.3) (MARTINS et al., 2010; ERENO et al., 2006).

O uso da membrana de BN como acelerador dos processos de neoformação óssea pode trazer grandes benefícios à saúde humana, evitando inúmeros transtornos como transplantes e enxertos ósseos. Além disso, a BN por ser um material de baixo custo e pode ser produzida em larga escala, torna-se um biomaterial acessível a toda população.

#### **1.4. Alergia a BN**

A alergia é definida como uma reação exagerada do sistema imunológico a uma substância estranha ao organismo, ou seja, uma hipersensibilidade imunológica a um estímulo externo específico. Envolve a liberação de mediadores dos mastócitos, basófilos e recrutamento de células inflamatórias que inclui sintomas e sinais, isolados ou combinados, que ocorrem em minutos ou em até poucas horas da exposição ao agente causal. As alergias podem ser de intensidade leve, moderada ou grave. A maioria dos casos é de intensidade leve, mas podem apresentar potencial para evolução fatal. A evolução é usualmente rápida, atingindo pico entre 5 e 30 minutos, raramente pode perdurar por vários dias e é mediada especialmente pela Imunoglobulina E (IgE) (KEMP et al., 2002; BERNSTEIN et al., 2008).

A alergia a BN é um assunto muito discutido nos meios científico e médico, sendo que a maioria dos processos alérgicos desencadeados por contato com a BN está agrupado em duas classes de pacientes: trabalhadores da saúde e pacientes que sofreram múltiplos procedimentos cirúrgicos, como portadores de espinha bífida e problemas congênitos em órgãos genitais. Existe ainda um terceiro grupo menos estudado, que inclui pacientes que possuem atopia, ou seja, hipersensibilidade a diversos fatores ambientais (MEADE et. al., 2002).

A primeira reação alérgica ao látex foi descrita em 1927, mas somente em 1979 foi relatada uma reação alérgica mediada por IgE específica para os alérgenos do látex. As reações alérgicas comumente observadas são urticária generalizada, rinite, conjuntivite, asma e anafilaxia (LÓPEZ et al., 1995; LATASA et al., 1995; EBO et al., 1997).

Foram identificadas diversas proteínas da BN que estão relacionados ao desencadeamento de processos alérgicos. Dentre estas proteínas estão a heveína ou Hev b1, uma proteína com peso molecular correspondente a 14,6 Kd. Outro importante alérgeno é a Hev b 3, proteína com peso molecular de 24 Kd. Estas proteínas são responsáveis pela produção de IgE específica para o látex sendo reconhecidas por estas células em pacientes com espinha bífida podendo gerar reações alérgicas com alta gravidade. Estas proteínas estão situadas na superfície das partículas de borracha (CHEN et al., 1996; ALENIUS et al., 1996; YEANG et. al., 1998).

Yip et al. (2000), mostraram que os níveis elevados de proteínas extraíveis residuais (EPs) estão associados a respostas positivas em testes cutâneos de picadas. O nível de EPs inferior a 400 ug/g, que está presente em luvas testadas em indivíduos com alergia a BN, mostrou que 60% não apresentaram respostas alérgicas, e em níveis inferiores, cerca de 100 µg/g, 100% não apresentaram respostas alérgicas.

As reações alérgicas a produtos fabricados a partir de BN e uma grande variedade de borrachas sintéticas, são conhecidas há muitos anos, mas a grande maioria destas reações alérgicas é geralmente do tipo IV, que é uma reação retardada, manifestando-se entre 24 e 72 horas após o contato com o antígeno. Estas reações ocorrem por intermédio dos linfócitos T capazes de identificar determinados antígenos e reagir à sua presença, levando a lesões inflamatórias nos tecidos que podem ser irreversíveis (rejeição de transplantes e alergia cutânea). Por este motivo, estas reações podem estar relacionadas aos resíduos de



aceleradores e outros ingredientes da composição de produtos a base de BN (GOLDSBY, 2003; FERREIRA et al., 2009).

Os produtos à base de BN têm sido comercializados em grande escala nos últimos 50 anos, sem qualquer suspeita grave de risco à saúde de seus usuários. Alguns exemplos de produtos incluem os bicos mamadeira, fio elástico, luvas, preservativos, colchões de espuma de borracha, almofadas e adesivos (FERREIRA et al., 2009).

É importante a realização de testes na BN processada ou não, visto que, a maioria dos estudos encontrados na literatura foram desenvolvidos a partir de material já manufaturado, como luvas cirúrgicas. Muitos agentes químicos dos processos de manufatura podem estar envolvidos na resposta alérgica, mascarando assim o verdadeiro agente alergênico, se ele está ou não presente na BN pura (COSTA et. al. 2003).

Muitos estudos ainda são necessários para detectar tais proteínas indutoras de alergia e como degradá-las para tornar o material mais biocompatível principalmente para as pessoas dos grupos de riscos citados anteriormente e para a população como um todo, de forma aleatória.

## **2. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS**

A maioria das pesquisas encontradas na literatura utiliza membranas produzidas pela mistura da BN de diversos clones e, como a composição do material varia de acordo com o clone, não é possível identificar se existem diferenças na bioatividade de cada um (ISSA et al., 2010). Desse modo, o estudo apresentado nesta tese visa a avaliação da biocompatibilidade de BN produzidas por cinco clones cultivados no Brasil, a avaliação da bioatividade dos clones mais promissores na promoção de neoformação óssea, e também tem como objetivo encontrar o melhor clone para a produção de biomateriais de acordo com seu comportamento em culturas de células, implantes subcutâneos e implante em defeito crítico na calvária de coelhos machos adultos. Além disso, foi realizada a comparação de métodos de coleta da BN com e sem a utilização de aditivos químicos, de modo a avaliar a influência do hidróxido de amônio na biocompatibilidade do material.

Para os estudos propostos foram selecionados os clones RRIM 600, IAN 873, GT1, PR 255 e PB 235 para avaliação de biocompatibilidade. Por outro lado, os clones RRIM 600 e IAN 873 foram utilizados nos estudos de bioatividade.

### **3. PRODUÇÃO DAS AMOSTRAS**

Esta seção traz os detalhes de dois métodos de coleta utilizados na pesquisa, bem como a preparação e esterilização das membranas de BN.

#### **3.1. Coleta e preparação das membranas de BN**

As membranas de BN utilizadas neste trabalho foram produzidas a partir de BN coletada dos clones RRIM 600, PB 235 e GT1, cultivados comercialmente na Fazenda Bálsamo, pertencente ao grupo HeveaTec, localizada no município de Nhandeara-SP, e também dos clones PR 255 e IAN 873, cultivados na Fazenda Experimental do Lageado, pertencente à UNESP, localizada no município de Botucatu-SP. As coletas ocorreram em duas etapas, e todas na mesma época do ano (verão), nos meses de dezembro de 2010 e dezembro de 2011.

A coleta foi realizada por meio de sangria em corte meio espiral ( $\frac{1}{2}$  S d/2), no período matinal entre as 4:00h e 8:00h da manhã, utilizando o equipamento denominado jebong para a produção dos cortes na casca do tronco.

O procedimento de coleta foi realizado de duas maneiras: 1) convencional, ou seja, com a utilização de hidróxido de amônio como conservante, neste caso as amostras foram chamadas de a-membrana, para a coleta destas amostras, foi adicionada na tigela de coleta uma solução de hidróxido de amônio a 2% em uma proporção de 20 ml para cada litro de BN (WISNIEWSKI, 1983) e

2) utilizando baixa temperatura para evitar a coagulação da BN, sem que houvesse a necessidade de se utilizar um conservante químico, sendo que neste caso, foi utilizado gelo

para manter a baixa temperatura durante o processo de coleta e transporte do material, como será descrito a seguir. Estas amostras foram chamadas de af-membrana.

Nas amostras em que foi utilizada baixa temperatura, a tigela de coleta foi preenchida com gelo minutos antes da realização da sangria, sendo que no centro desta tigela foi colocado um frasco de vidro estéril com capacidade para 200 ml, onde a BN ficou depositada. O esquema utilizado está apresentado na Figura 3.



Figura 3: Esquema utilizado para realizar a coleta com baixa temperatura.

Após a coleta, o frasco foi fechado e o transporte do material foi realizado em caixa de isopor com gelo. No laboratório, a BN foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm, em uma centrífuga (marca FANEM, modelo Exelsa II, São Paulo, SP) , para remoção de impurezas oriundas da coleta.

Filmes finos de BN foram depositados em uma placa de Petri de poliestireno medindo 60x15 mm, em uma capela de fluxo laminar (marca PACHANE, Piracicaba, SP). A placa foi vedada dentro do fluxo e levada para estufa seca (marca MARCONI, Piracicaba, SP) a temperatura de 50°C, onde permaneceu por um período de 7 dias para a completa secagem do material. A Figura 4 mostra dois filmes finos de BN antes e após a secagem.

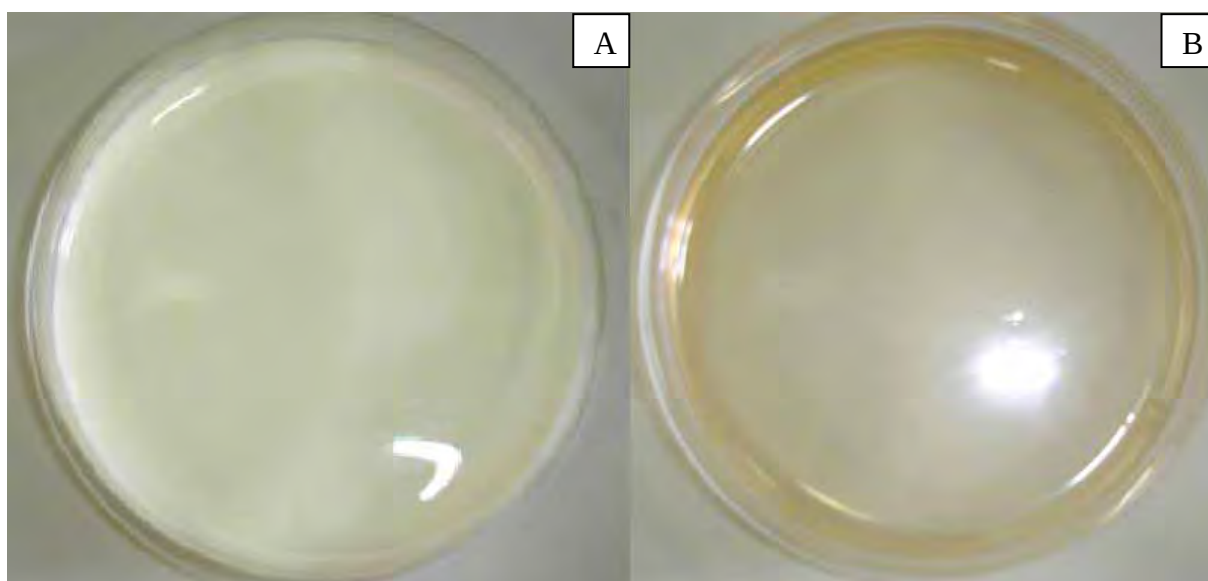


Figura 4: Filmes finos de BN. (A) antes da secagem e (B) após secagem.

As amostras de BN onde foi utilizado hidróxido de amônio na coleta foram processadas da mesma forma como descrita anteriormente, porém foram transportadas em caixas sem refrigeração.

As membranas foram esterilizadas no IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares por meio de radiação gama, realizada em um acelerador de elétrons com fonte de cobalto ( $^{60}\text{Co}$ ). O irradiador utilizado foi GAMMACELL 220 e a dose foi de 25 kGy, conforme descrição das normas ISO 11.137 “Sterilization of Health Care Products”.

#### **4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS DAS TÉCNICAS PARA AVALIAR A BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DA BN**

Nesta seção estão descritos os princípios teóricos da biocompatibilidade e bioatividade, bem como as técnicas utilizadas para as avaliações das mesmas. Além disso, é feita uma abordagem sobre as normas técnicas utilizadas durante todo o estudo.

##### **4.1. Biocompatibilidade**

Biocompatibilidade é uma palavra que é amplamente utilizado na ciência dos biomateriais , mas ainda existe uma grande dose de incerteza sobre o que realmente significa e sobre os mecanismos que estão incluídos no âmbito dos fenômenos que constituem coletivamente biocompatibilidade . Anteriormente biocompatibilidade foi definida como a capacidade de um material apresentar uma resposta apropriada ao hospedeiro numa situação específica (BLACK, 1999). No início este foi um poderoso indicativo de que biomateriais tem que executar uma função, e só pode fazê-lo se invocar uma resposta dos tecidos ou componentes de tecidos, que estão em contato, ou seja , pelo menos , compatível com a função. A definição atual de biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial de desempenhar sua função desejada no que diz respeito a uma terapia médica, sem induzir quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no destinatário ou do beneficiário que a terapia , mas gerando uma resposta celular adequada e benéfica ao tecido específico e otimizar o desempenho clinicamente relevante do que a terapia (WILLIAMS, 2008).

O termo reflete o contínuo desenvolvimento de estudos sobre como biomateriais podem interagir com o corpo humano e, finalmente, como essas interações determinam o sucesso clínico de um dispositivo médico como próteses ortopédicas e outros. O grau de

biocompatibilidade depende da estabilidade de um material ao longo do tempo, a tendência de causar inflamação ou doenças como câncer (KAMMULA et al., 2001).

A resposta imunitária e as funções de reparação no organismo são processos complexos e a investigação da biocompatibilidade de um único material em relação a um único tipo de célula ou tecido, não é adequado. Na maioria das vezes é necessária a realização de uma enorme gama de teste de biocompatibilidade envolvendo ensaios *in vitro* e *in vivo* (MULLER, 2008).

Uma vez que a realização dos testes *in vitro* esteja terminada, os testes biológicos *in vivo* podem ser realizados com base na utilização pretendida do dispositivo. Este teste pode variar de ensaios de irritação cutânea até de hemocompatibilidade e testes com implantes subcutâneos. O tempo de resposta para ensaios pode variar de três semanas até vários meses, dependendo dos testes específicos necessários. Testes de implantação subcrônica ou crônica podem durar ainda mais tempo (PARK et al., 2007).

A norma ISO 10993-1: “*General Principles*” é o principal ponto de partida para a avaliação da biocompatibilidade, a qual apresenta os princípios fundamentais que governam a avaliação biológica de biomateriais e dispositivos biomédicos, descrevendo três categorias para tais avaliações: testes de extração, testes de contato direto e testes de contato indireto.

O objetivo da realização dos testes de biocompatibilidade é determinar a aptidão de um dispositivo para uso humano, e para avaliar se o uso deste dispositivo pode ter efeitos fisiológicos potencialmente nocivos. O objetivo principal desta parte da ISO 10993 é a proteção dos seres humanos a partir de potenciais riscos biológicos decorrentes da utilização de dispositivos médicos (ISO 10993-1, 2009).

Os testes de biocompatibilidade para desenvolvimento de um novo material incluem várias etapas desde testes *in vitro* a testes *in vivo* (OREFICE et al., 2005). Estes testes são

realizados de acordo com as normas da ANVISA que seguem a descrição da ISO 10993-3, 10993-5 e 10993-6.

Por este motivo, neste trabalho todas as orientações descritas na ISO 10993-1 foram seguidas, quanto ao tipo celular, períodos de contato, testes de avaliação, entre outros.

#### **4.1.1. Testes *in vitro***

##### **4.1.1.1 Citotoxicidade**

A citotoxicidade é definida como o grau que um agente pode ser tóxico às células, podendo causar lise, ou a morte celular por meio de fenômenos imunológicos como apoptose. Para avaliar a biocompatibilidade de um material o primeiro teste a ser realizado é o de citotoxicidade, pois este permite verificar se o material provoca lise (quebra) nas células, inibição de crescimento celular e outros efeitos que podem ser causados na célula pelo material ou por extratos gerados por ele. A cultura de células neste teste deve ficar em contato com o material, e este contato pode ser direto ou indireto (PARK et al., 2007).

Este estudo foi realizado por meio contato direto das membranas de BN com a cultura de células seguindo as normas ISO 10993-5 e ASTM F-813, onde o material a ser testado foi depositado sobre a monocamada celular formada no fundo de uma placa de cultivo. Neste teste é necessária utilização de um controle positivo (substância que possui efeito citotóxico de modo reprodutível) e um controle negativo (substância que não apresenta nenhum efeito citotóxico). O contato pode ocorrer por um período de até 408h.

Após este contato devem ser realizados os testes de citotoxicidade, que podem ser feitos por meio da técnica denominada de viabilidade celular. Esta é uma técnica que utiliza corantes vitais como o vermelho neutro, que é solúvel em água e atravessa a membrana



celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares, resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI et al., 1996).

As células utilizadas para os testes *in vitro* de citotoxicidade foram da linhagem NIH3T3 - fibroblastos de camundongos na concentração de  $3,0 \times 10^5$  células/ml. O volume de 5 ml de células foi cultivado em meio de cultura DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, marca LGC, Cotia/SP), suplementado com 20% de soro fetal bovino (marca GIBCO, EUA) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (marca SIGMA, Alemanha). Este material foi semeado em placas de petri de poliestireno medindo 15x60 mm, e levado a estufa (marca FORMA SCIENTIFIC, USA) a 38°C, 95% de umidade e 5% de CO<sup>2</sup> durante 72 h. Após este período, ocorreu a formação de monocamada celular. A remoção das células foi realizada por meio da enzima Tripsina em um processo denominado de tripsinização, sendo que após este processo efetuou-se a contagem e o plaqueamento das células, em placas de poliestireno de 48 poços. O volume de 0,2 ml de uma suspensão, contendo  $2,5 \times 10^5$  células/ml, foi distribuído nos poços da placa, a qual foi posteriormente agitada e incubada por 24h, a temperatura de 37°C, em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> para a formação de uma nova monocamada celular para que todo o fundo da placa ficasse revestido pelas células, permitindo um maior contato com o material que seria depositado sobre as mesmas, como pode ser verificado na Figura 5.

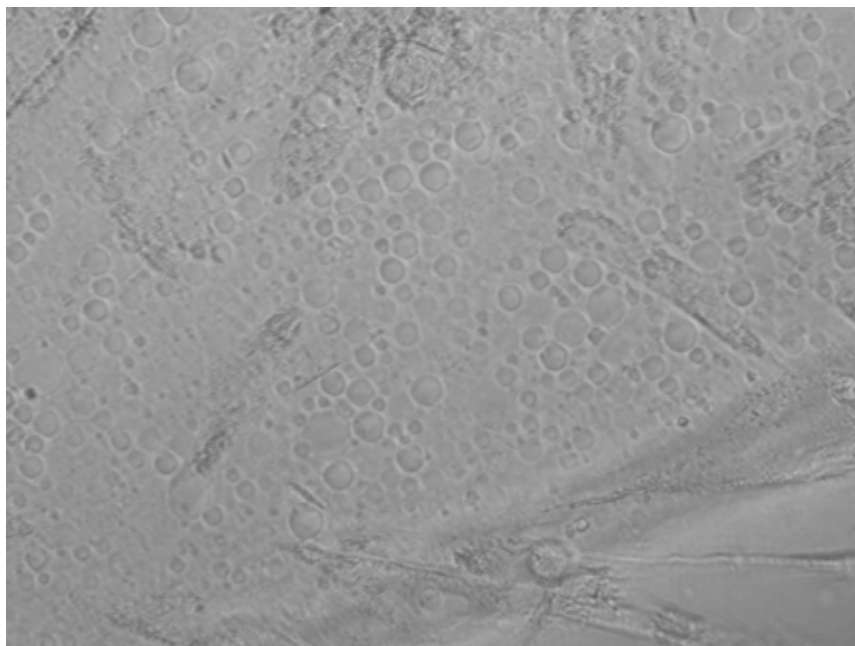


Figura 5: Células em cultivo em contato direto com as membranas. Microscopia convencional 40X.

Como controle negativo, foi utilizada a própria placa de cultivo, demonstrando na prática a resposta celular em meio biocompatível. Por outro lado, o controle positivo foi composto de fenol 0,02%, comprovando uma resposta citotóxica apropriada no ensaio. Na sequência, foram colocados os fragmentos das membranas com média de 0,5 cm de diâmetro, juntamente com 3,0 ml meio de cultivo HAM F12 (marca LGC, Cotia/SP), onde permaneceram em contato direto com as células. Realizou-se a análise em três períodos: 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade foi avaliada com a utilização de corante vermelho neutro (marca SIGMA, Alemanha), seguindo a descrição da norma ISO 10993-5. A placa foi preenchida de forma uniforme, onde a primeira fileira em todos os testes era composta pelo controle positivo, a segunda fileira pelo controle negativo e as demais fileiras pelas amostras de BN. Cabe ressaltar que em todos os testes a placa possuía a mesma constituição, 3 placas foram utilizadas no estudo e cada placa continha o material a ser testado em triplicata.

Após os períodos descritos, o meio de cultura foi substituído por 0,2 ml de meio MEM *Minimum Essential Eagle Medium*, marca LGC, Cotia/SP), contendo 50µg/ml do corante. Esperou-se 3 h e procedeu-se à remoção do meio. As células foram lavadas com tampão

fosfato-salina (PBS), sendo que posteriormente foi efetuada a lavagem com uma solução de 1%  $\text{CaCl}_2$  em 0,5% de formaldeído. Descartou-se a solução e os poços foram preenchidos com 0,2ml de uma solução contendo 1% de ácido acético e 50% de etanol. A placa foi agitada por 10 minutos e procedeu-se a leitura para avaliar a absorção do corante pelas células viáveis, em um espectrofotômetro ELX800 (marca BIO-TEK, Brasil) no comprimento de onda correspondente a 540 nm. A partir dos valores obtidos foi possível calcular a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle negativo (100%) (BORENFREUND et al., 1988; ROGERO et al., 2003). Na Figura 6 podemos verificar células viáveis antes e após a marcação pelo corante vermelho neutro.

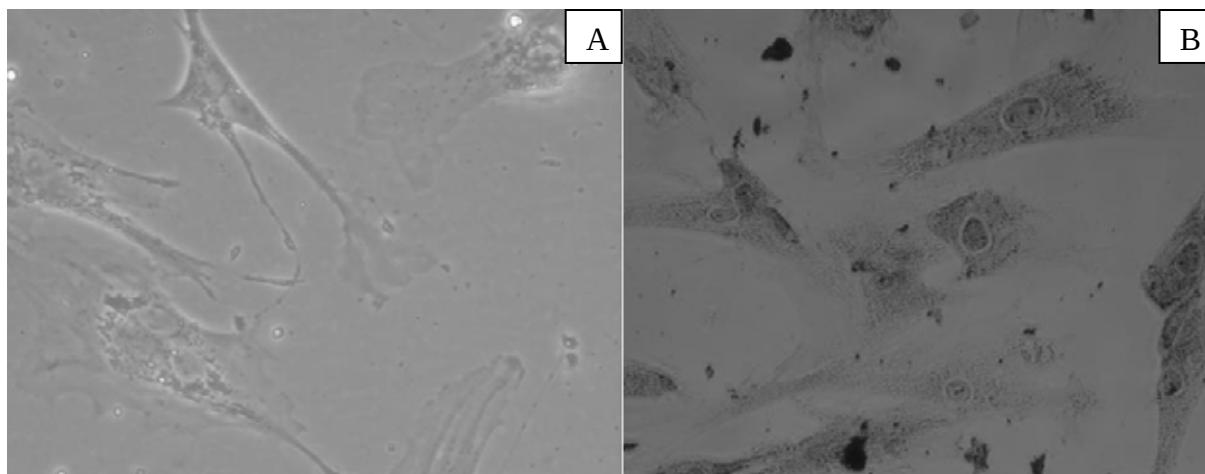


Figura 6: Células viáveis aderidas ao fundo da placa de cultivo antes da coloração com o corante vermelho neutro (A), e células viáveis após a coloração com o corante (B). Microscopia convencional 40X.

#### 4.1.1.2 Genotoxicidade

A genotoxicidade é definida como a capacidade de agentes químicos em danificar o DNA de uma célula, causando mutações que podem levar ao desenvolvimento de algumas doenças como o câncer (AARDEMA et al., 2002). A avaliação da genotoxicidade é descrita dentro das normas ISO 10993-5, e é parte importante na avaliação da biocompatibilidade de

um material, que pode não ser citotóxico, mas causar danos de DNA, que a longo prazo podem induzir as mutações (JHA et al., 2000).

Para avaliar a genotoxicidade das membranas foi utilizado o teste do Cometa, que permite a detecção de danos no DNA de uma célula. As células cultivadas que estiveram em contato com a membrana por um período de 72h foram coletadas e submetidas ao teste, que foi realizado sob condições alcalinas de acordo com um protocolo previamente descrito (TICE et al., 2000), em que 5 µL de uma suspensão com células foram misturadas a 120 µL de agarose baixo ponto de fusão 0,5% (INVITROGEN, EUA) a temperatura de 37°C e depositadas em lâminas de microscópio convencionais, pré-revestidas com agarose com ponto de fusão normal 1,5% (INVITROGEN, EUA). As lâminas foram colocadas em uma solução de lise recém-preparada (1% de Triton X-100, 2,5 mM de NaCl, 0,1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM de Tris com dimethylsulfoxido 10%, pH 10,0) por um período de dois dias. Após este período, o material foi lavado em tampão PBS e colocado em uma cuba horizontal de eletroforese (28 x 17,5 x 6,5 cm, TÉCNICA PERMATRON LTDA, Brasil) contendo tampão alcalino (0,3 M de NaOH, 1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, pH > 13) a 4°C durante 20 min. Usando o mesmo tampão, a eletroforese foi realizada a 25 V e 300 mA durante 20 min. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas duas vezes durante 5 min em tampão de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5), e fixadas durante 5 min em álcool absoluto, secas ao ar, e armazenadas à temperatura ambiente.

As lâminas foram coradas com 50 µL de brometo de etídio e imediatamente examinadas com uma ampliação de 400x em um microscópio de fluorescência, ligada a um sistema de análise de imagem (Comet II; Perspective Instruments, Suffolk, UK).

Lâminas codificadas foram marcadas de forma cega e 50 nucleóides foram aleatoriamente analisados. A intensidade da cauda “ Tail intensity ” (quantidade de DNA na cauda do cometa) e momento da cauda “ Tail moment ” (produto da densidade de DNA na

cauda e a distância média de migração de DNA na cauda) foram usados para medir a extensão de danos no DNA. Imagens de cometa com uma aparência "nublada" ou com uma cabeça muito pequena e cauda como um balão foram excluídos da análise (HARTMANN et al., 1997). A Figura 7 apresenta imagens do cometa obtidas durante a realização do teste de genototoxicidade.



Figura 7: Imagens de cometa obtidas durante a realização do teste de genotoxicidade. Microscopia de fluorescência 400X.

#### **4.1.1.3 Caracterização das membranas**

A caracterização das amostras foi realizada por meio de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As medidas de FTIR foram realizadas com um espectrômetro Bruker, modelo Vertex 70, no modo de ATR (Reflectância total atenuada). A região de medida analisada foi de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . As janelas utilizadas foram de KBr.

Para a realização do MEV as membranas que permaneceram em contato direto com as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% por 24h. Após a fixação inicial, o material foi

lavado em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 (três trocas de 5min), sendo pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão (30min). A desidratação foi realizada com sequência crescente de álcool etílico para posterior secagem do material através do ponto crítico em CPD 020 (BALZER UNION), com CO<sub>2</sub> líquido. Os espécimes foram fixados em suporte adequado e recobertos com ouro, em aparelho MED 010 (BALZER UNION), com camada de 20 nm. O material foi examinado e fotografado em Microscópio Eletrônico de Varredura SEM 515 (marca PHILIPS, Brasil).

#### **4.1.2. Testes *in vivo* de Biocompatibilidade**

Após a obtenção dos resultados nos teste *in vitro*, deve-se realizar os testes *in vivo*, que é a segunda etapa para a avaliação da biocompatibilidade de um material. Os testes *in vivo* são realizados por meio de experimentação animal. Nesta etapa o material deve ser implantado em animais, como coelhos e ratos entre outros. Esta implantação permite avaliar a resposta do tecido hospedeiro ao implante do material e seu desempenho funcional ao longo do tempo. (ISO 10993-6).

De acordo com as normas dos órgãos de saúde, um produto só poderá ser empregado em humanos após realização de testes prévios em um modelo animal. Apesar das diferenças entre as espécies, este teste fornece dados sobre o comportamento do biomaterial em meio biológico vivo (ISO 10993-6).

Para a implantação *in vivo* é necessário considerar as características e o uso pretendido do biomaterial, bem como a natureza do contato com os tecidos. O biomaterial em teste deve ser representativo do modelo final em todos os aspectos (ISO 10993-6).

O tecido subcutâneo é frequentemente usado para a avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais, pois é uma região de fácil acesso que permite a determinação generalizada

das respostas biológicas. Através da implantação no subcutâneo é possível detectar as reações teciduais aos agentes inflamatórios liberados pelo implante, além de determinar a espessura da cápsula fibrosa (OREFICE et al., 2005). O material pode ser implantado no subcutâneo seguindo a norma ASTM F-1408 para avaliar a resposta inflamatória local e sistêmica, através de varias técnicas, como a análise histológica de tecidos adjacente ao implante, verificando a resposta local, por meio da contagem de células do sistema imunológico, como células gigantes e células polimorfonucleadas (YOSHIKI et al., 1992).

#### **4.1.2.1 Implantes Subcutâneos**

Para a realização dos testes *in vivo* neste trabalho, foram utilizados vinte e sete coelhos adultos machos, da raça Nova Zelândia, que foram distribuídos de forma aleatória em 3 grupos (1, 4 e 12 semanas). Os animais foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A utilização dos animais nesta pesquisa seguiu todas as normas éticas vigentes e foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP, São Paulo em 11 de janeiro de 2009, sob o número 2612/46/01/08.

Os animais foram alojados em condições normais ( $22 \pm 2$  °C,  $55 \pm 10\%$  em um ciclo 12h claro-escuro) e receberam ração comercial (PRESENCE PURINA/EVIALIS de 5Kg MRGN, São Paulo, SP) e água ad libitum para um período de aclimação de 4 semanas antes do início do experimento.

Para realização dos procedimentos cirúrgicos os animais foram tranquilizados com acepromazina ( $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e butorfanol ( $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) aplicados por via intravenosa, e 15 minutos após, anestesiados com a associação de tiletamina-zolazepam ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e xilazina ( $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por via intramuscular.

Após a tricotomia da região dorsal os coelhos foram posicionados em decúbito ventral e realizou-se a anti-sepsia da área cirúrgica com iodopovidine e solução fisiológica. Com os panos de campo operatório dispostos, a ponta do processo espinhal foi palpada para identificar a coluna lombar, seguindo o modelo experimental descrito nas normas ISO 10993 parte 6. Conforme mostrado na Figura 8, foram efetuadas incisões na pele medindo cerca de 2 cm de comprimento ao longo do dorso do animal, onde ocorreu a exposição da região subcutânea. As membranas medindo 1cm de diâmetro foram inseridas no tecido subcutâneo, como pode ser verificado na Figura 9. As membranas foram implantadas em 10 locais ao longo dos músculos lombares paraespinhais (cinco de cada lado). A distância entre o material implantado foi de aproximadamente 4 cm. Foram implantadas duas amostras de cada material em posições aleatórias, sendo que para o controle negativo foram utilizadas membranas de PTFE (Politetrafluoretileno), que é um plástico denso, biocompatível, não absorvível, hidrofóbico, com baixo coeficiente de atrito, impermeável e com baixa aderência. O PTFE é constituído por uma rede intrincada de células abertas e poros multidirecionais, o que lhe confere uma combinação única de capacidade filtrante e força estrutural. A molécula de politetrafluoretileno (base química da PTFE) não pode ser quebrada quimicamente em condições fisiológicas, o que permite que sua toxicidade seja praticamente nula (MARTINS et al., 2010). As membranas de PTFE foram cedidas pela empresa Bionnovation implantes e biomateriais (Bauru – SP, Brasil). Após o implante dos materiais a incisão foi fechada com sutura contínua utilizando fio de seda 4-0.





Figura 8: Incisões para implante do material no tecido subcutâneo dos animais.



Figura 9: Implante dos fragmentos de membrana no tecido subcutâneo dos animais.

Antes da indução anestésica e 24 horas após o procedimento cirúrgico foi administrado enrofloxacina na dose de 5 mg/kg por via intramuscular. Flunixinina meglumina (1mg/kg) foi aplicada por via subcutânea (1mg/kg) a cada 24 horas no pós-operatório imediato e por mais três dias. As feridas cirúrgicas foram tratadas com iodopovidine e os pontos cutâneos foram removidos no 10º dia de pós-operatório.

#### 4.1.2.2 Análises histológicas

Após os períodos de 1, 4 e 12 semanas, os animais foram eutanasiados com pentobarbital (>100mg/kg por via intravenosa), após serem anestesiados com quetamina e xilazina.

Após a eutanásia os animais foram colocados em posição de decúbito ventral e foi realizada nova tricotomia, onde quaisquer alterações nas regiões próximas aos locais de implante foram anotadas. Realizou-se uma incisão vertical ao longo da linha média dorsal possibilitando a visualização das regiões de implantes, os quais foram coletados com uma margem de aproximadamente 1 cm ao seu redor.

As peças foram fixadas em formalina 10% tamponado durante 24 horas para inclusão em parafina. Secções seriadas das peças (pelo menos 4-6 tiras por animal) foram rotineiramente processadas. Os cortes histológicos com 5µm de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica.

A avaliação da resposta tecidual aos implantes foi avaliada a partir dos seguintes parâmetros histológicos adotados: presença de infiltrado (1), presença de células gigantes de corpo estranho (2), intensidade da resposta inflamatória (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, entre outros) (3) e formação de cápsula fibrosa (4). O parâmetro (4) foi avaliado como (0) ausente e (1) presente, os parâmetros (1), (2) e (3), foram classificados como (0) não observado, (1) baixa frequência, (2) frequência moderada e (3) alta frequência (YOSHIKI et al., 1992).

#### 4.2. Testes *in vivo* de bioatividade

Importantes avanços foram feitos no campo dos biomateriais ao longo dos últimos anos, sendo que a maioria destes avanços foi associada com o processamento de materiais

biologicamente ativos. A bioatividade se refere à propriedade inerente a alguns materiais de participarem em reações biológicas específicas. O termo bioatividade é definido como sendo a propriedade de formar tecido sobre a superfície de um biomaterial e estabelecer uma interface capaz de suportar cargas funcionais (DUCHEYNE E KOHN, 1992).

Como mencionado anteriormente, a BN apresenta bioatividade e é eficaz em situações de reparo tecidual, promovendo angiogênese, neoformação tecidual, óssea entre outros. Para elucidar o efeito bioativo da BN, Mendonça et al. (2004) estabeleceram uma relação entre a atividade do soro extraído da BN e o aumento da permeabilidade vascular, angiogênese e cicatrização de feridas. Concluíram que a fração do soro produz ativamente a neovascularização e aumenta a permeabilidade vascular. Esses efeitos não foram observados quando a fração do soro foi aquecida a 100°C ou tratada com enzima proteolítica proteinase K, levando a supor que um composto de polipeptídeo poderia ser o responsável pela bioatividade. O soro natural da BN associado ao gel de carboximetilcelulose foi aplicado em úlceras dérmicas de coelhos, acelerando o processo de cicatrização, com intensidade semelhante à observada quando da aplicação de alguns fatores de crescimento.

De acordo com Ferreira et al. (2009), a fração bioativa da BN é formada pelos constituintes não borracha, e as cadeias de poli-isopreno não são o principal responsável pela bioatividade do material. É indicado que a fração ativa extraída da BN deve ser incorporada em outros sistemas, tais como filmes finos de polímeros para melhores resultados na reparação tecidual.

Issa et al. (2010), extraíram a proteína denominada P1 do soro de BN, por cromatografia gasosa. A P1 foi testada em defeitos críticos em ratos, onde verificou-se um efeito positivo da proteína P1, quando associada ao gel de mooleina.

A BN é uma mistura rica em substâncias orgânicas, que incluem muitas proteínas diferentes que compreendem cerca de 1% a 1,5% do sistema. A maior parte destas proteínas é

removida quando a BN é processada nos seus produtos, mantendo-se apenas uma pequena fração dos produtos denominados EPs (FERREIRA et al., 2009). Portanto, para a obtenção de melhores resultados em biomateriais à base de BN são necessários vários cuidados, que vão desde a coleta do material até seu processamento final, com a finalidade de se evitar a degradação das proteínas responsáveis pela sua bioatividade.

#### **4.2.1 Modelo experimental de Defeito Crítico em Calvária (DCC)**

O modelo experimental mais adequado para a avaliação de biomateriais promotores de crescimento de tecido ósseo é o do defeito crítico em calvária (DCC). O DCC é definido como o menor tamanho de ferida intraóssea em um osso, em particular, de uma espécie de animal que não irá curar-se espontaneamente durante a vida deste animal. Foi originalmente desenvolvido como um modelo de fibrose craniofacial não-ligada e foi concebido para padronizar o ensaio dos materiais de reparação do osso que podem ser utilizados como alternativas aos implantes ósseos. O DCC é diferente de outros modelos, porque se baseia em um tamanho de defeito especificamente grande para cicatrizar o tecido ósseo (SCHMITZ et al., 1986).

O modelo DCC tem sido utilizado em muitos laboratórios para testar a capacidade osteogênica de diferentes técnicas de reparação óssea, desde sua introdução (MOONEY e SIEGEL, 2005). Além disso, modelos experimentais de defeito de tamanho crítico têm sido usados para minimizar as dificuldades devido a diferenças de idade, espécies, e local anatômico (HOLLINGER et al., 1990).

O tamanho de defeito crítico recomendado para coelhos adultos é de 15mm, pois neste caso não ocorrerá regeneração da região pelo próprio organismo (HOLLINGER et al., 1990). Neste modelo experimental se faz necessária a preservação da membrana dura-máter, pois ela

parece ser a fonte primária de células osteogênicas e também de fatores osteoindutivos durante a cicatrização da ferida na calvária (WANG et al., 1999; GOSAIN et al., 2003).

As técnicas cirúrgicas que empregam o uso de trefina podem facilmente danificar ou destruir a dura-máter subjacente ao defeito, possivelmente inibindo a cura do defeito. Portanto, a cura de um defeito de calvária pode ser influenciada não só pelo tamanho do defeito, mas também pela forma em que foi criado (GREGORY et al., 2010).

Neste trabalho, a avaliação da bioatividade das membranas de BN foi realizada pelo método DCC aplicado em coelhos machos.

#### **4.2.1.1 Selante de fibrina**

O selante de fibrina (SF) é uma espécie de cola biológica oriunda de veneno de serpente, que foi desenvolvido pelo Centro Virtual de Toxinologia – CEVAP (UNESP campus Lageado, Botucatu/SP), em 1989, com objetivo principal de criar um selante de fibrina sem componentes derivados do sangue humano. Um selante cujo fibrinogênio fosse derivado de animais de grande porte e a gioxina derivada do veneno de cascavel, substituindo a trombina bovina. Este novo produto desenvolvido mostrou-se biocompatível, biodegradável e com as características de: não conter sangue humano, não apresentar reações adversas, ter uma boa capacidade adesiva, não transmitir doenças infecciosas, podendo ser usado como coadjuvante para suturas convencionais (BARROS et al., 2009).

Segundo Rahal (2005), o SF apresentou resultados promissores em estudos para enxerto de pele em cães, onde foi observado um menor tempo de cicatrização quando comparado a sutura convencional. Histologicamente foi verificado que o selante apresentou uma rápida cicatrização com menor formação de hematoma, provavelmente devido às suas

características hemostáticas. O uso de SF mostrou-se muito eficiente, diminuindo tempo cirúrgico.

Em estudos de reparação de tendões em cães, Ferraro et al. (2005), obtiveram resultados satisfatórios utilizando SF, sendo que o selante não promoveu uma adesão excessiva, inibindo uma inflamação ao sétimo dia pós operatório, facilitando a maturação da cicatrização do tendão. A superfície dos tendões não devem apresentar áreas de irregularidade durante sua cicatrização para manter a funcionalidade da estrutura e esta foi motivação para o uso do SF neste tipo de estudo que obteve grande sucesso.

Thomazini et al. (2007) testaram o SF em nervos de ratos wistar, observando excelentes resultados, semelhantes aos obtidos em experimentos realizados com selantes comerciais, onde foi verificado que o SF permitiu adesividade adequada e regeneração tecidual.

Foram desenvolvidos estudos com SF também na área de oftalmologia em cães, onde adesivos têm sido estudados para síntese sem a formação de tecido de granulação. Outros adesivos utilizados neste tipo de estudo como a cianoacrilato, e resina epóxi, causaram irritação no tecido ocular. O tratamento com SF, neste tipo de aplicação foi eficaz, acelerando a reparação tecidual e evitando a formação de edema no olho do cão (SAMPAIO, 2007).

Na periodontia, o SF foi utilizado para fixar enxertos gengivais, sem a necessidade de suturas. Quinze pacientes que necessitavam de enxertos bilateralmente foram operados. Os resultados foram obtidos por meio de resposta subjetivas dos pacientes, sondagem e fotografias. Os resultados da sondagem foram melhores no grupo que utilizou o SF, e os pacientes relataram melhor pós operatorio, bem como o cirurgião observou um ganho de tempo na utilização do mesmo durante o procedimento, e também melhora hemostasia. Além disso, observou menor retração pós operatoria do enxerto (BARBOSA, 2007).

Barbosa (2008) desenvolveu uma pesquisa semelhante, mas com análise histológica em humanos após a utilização do SF. Após o período de pós operatório, os pacientes tratados foram biopsiados. Histologicamente o grupo testado mostrou uma maior migração de fibroblastos e maturação tecidual mais rápida. O pesquisador concluiu que o SF possivelmente promove a maturação do enxerto gengival.

A partir dos excelentes resultados obtidos por meio da utilização do SF na reparação tecidual, melhora na cicatrização e adesividade, selecionamos este material para utilizarmos como substituto ao cianoacrilato, comumente utilizado neste tipo de pesquisa, devido ao fato deste material causar aquecimento local durante sua polimerização. Este aquecimento local pode causar morte celular nas bordas do defeito afetando a regeneração óssea.

#### **4.2.2 Técnica cirúrgica para avaliação da Bioatividade**

Para a avaliação da bioatividade, foram utilizados 24 coelhos adultos, machos da raça Nova Zelândia, que foram distribuídos de forma aleatória em 2 grupos (60 e 90 dias). Os animais foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A utilização dos animais nesta pesquisa seguiu todas as normas éticas vigentes, e foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP, São Paulo em 11 de janeiro de 2009, sob o número 2612/46/01/08.

Para realização dos procedimentos cirúrgicos os animais foram tranquilizados com acepromazina (0,1mg kg<sup>-1</sup>) e butorfanol (0,1mg kg<sup>-1</sup>) aplicados por via intravenosa e, 15 minutos após, anestesiados com a associação de tiletamina-zolazepam (10 mg kg<sup>-1</sup>) e xilazina (0.5 mg kg<sup>-1</sup>) por via intramuscular.

Após a tricotomia da região do osso frontal os coelhos foram posicionados em decúbito ventral e foi realizada a anti-sepsia da área cirúrgica com iodopovidona e solução fisiológica. Com os panos de campo operatório dispostos foi efetuada uma incisão de pele e tecido subcutâneo, estendendo-se na linha média da protuberância externa do occipital até a altura dos olhos. Os músculos: frontal, interescutular e occipital foram incisados na linha média e afastados com rugina, e retraídos para expor o periósteo do osso parietal.

Foi então criado um defeito crítico circular de aproximadamente 2 cm de diametro com o uso de trefina de 1 cm de diâmetro, acionada por um micromotor cirúrgico, e abundante irrigação com solução salina 0,9 %. Foram realizadas duas perfuracoes, que foram unidas com o auxílio de um alveolótomo formando um defeito único, todo o procedimento foi realizado de maneira cautelosa com a finalidade de não danificar a membrana dura-máter. O osso cortical e esponjoso foi removido, expondo a membrana meníngea, como pode ser verificado na Figura 10.



Figura 10: DCC com aproximadamente 2cm, criado em coelhos machos adultos.



Nos coelhos dos grupos em que as membranas de BN dos 2 clones testados foram implantadas, o defeito foi preenchido com um fragmento de membrana medindo cerca de 2cm. Sobre esta membrana e também na borda do defeito foi depositado cerca de 1ml do selante de fibrina para a fixação do segundo fragmento da membrana, que foi colocado de modo a recobrir todo o defeito criado, como pode ser visto na Figura 11.

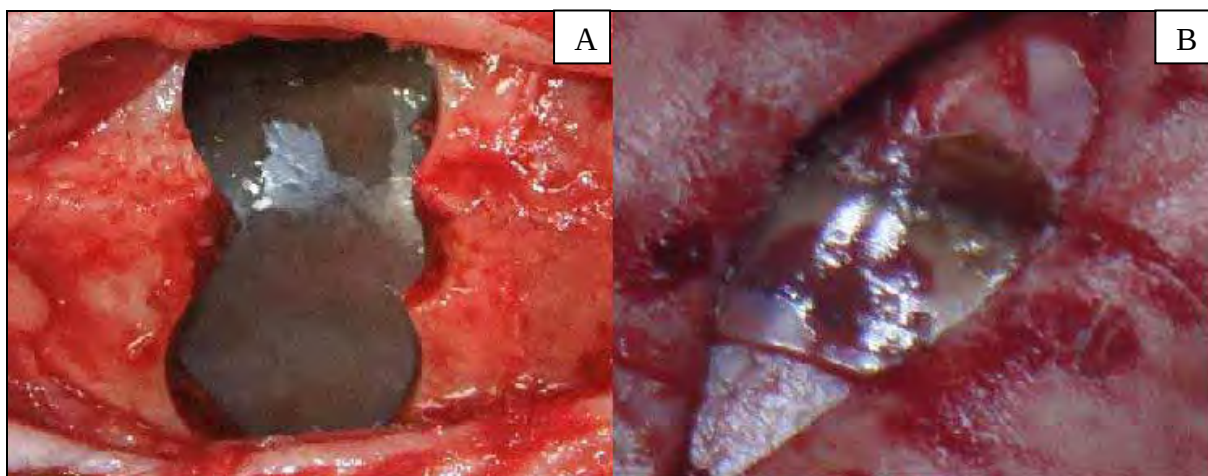


Figura 11: A: posição dos fragmentos de membrana dentro do defeito ósseo, e B: posição do fragmento de membrana recobrimdo o defeito ósseo.

No grupo controle negativo, o defeito foi preenchido por coágulo de fibrina. O coágulo fornece um arcabouço para os neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais, bem como concentra citocinas e fatores de crescimento, permitindo a formação de tecido de granulação, com novos vasos sanguíneos, colágeno e algumas células como fibroblastos e macrófagos. Após ocorrer a diferenciação celular e a maturação da matriz, forma-se o calo ósseo, que é composto de elementos vasculares, cartilagenosos e celulares que serão substituídos por osso e restabelecerá a forma e função (MARTINS et al., 2010).

Por outro lado, no grupo controle positivo o defeito foi preenchido com membranas de PTFE, seguindo o esquema do grupo tratado com membranas de BN. O uso deste material como controle positivo é bem aceito e utilizado em muitos estudos de regeneração óssea

(BARBER et al., 2007). GARG et al, (2004) relataram que algumas membranas de PTFE possuem vantagens, quando exposta à cavidade oral, não comprometendo o processo de regeneração óssea.

O periósteo e os músculos afastados foram aproximados com uma sutura contínua simples, o tecido subcutâneo com uma sutura invaginante e a pele com pontos isolados simples. Os fios utilizados foram o náilon 3-0 e o náilon 4-0.

Antes da indução anestésica e 24 horas após o procedimento cirúrgico foi administrada enrofloxacin na dose de 5 mg/kg por via intramuscular. Flunixinina meglumina (1mg/kg) foi aplicada por via subcutânea (1mg/kg) a cada 24 horas no pós-operatório imediato e por mais três dias. As feridas cirúrgicas foram tratadas com iodopovidine e os pontos cutâneos foram removidos no 10º dia de pós-operatório.

Os animais permaneceram com os implantes pelos períodos de 60 e 90 dias. Durante o experimento, os animais foram submetidos a exames de Raios X (RX) no equipamento OPTIMA XR 220AMX (marca GE, Brasil), a posição utilizada nas peças coletadas foi antero para posterior (AP) e nos animais sedados a posição utilizada foi perfil. Os exames de RX foram realizados em 3 períodos: 30, 60 e 90 dias após os implantes. As Tomografias computadorizadas (TC) foram realizadas no equipamento Shimadzu, Brasil, modelo SCT-7000, sendo que os cortes foram feitos a cada 1mm, com tempo de 1 segundo (1:1), utilizando um potencial de 120 KV e corrente elétrica de 50 mA. As TCs foram realizadas para avaliar o crescimento e densidade do osso neoformado. Após o período descrito, os animais foram eutanasiados com pentobarbital (>100mg/kg por via intravenosa), após serem anestesiados com quetamina e xilazina.

Após a eutanásia, os animais foram colocados em posição de decúbito ventral e foi realizada nova tricotomia, onde quaisquer alterações nas regiões próximas aos locais de implante foram anotadas. Realizou-se uma incisão vertical da região do osso frontal,

possibilitando a visualização da região dos implantes, que foram coletados por meio de uma broca acoplada a um micromotor cirúrgico, com uma margem de aproximadamente 1 cm ao seu redor. As peças foram fixadas em formalina 10% para a realização dos exames.

#### **4.2.3 Diagnóstico por imagem**

Após um período de 30 dias de implante, os animais foram submetidos a exames de RX para avaliar a evolução do processo de neoformação óssea, para tal, os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente. Após os períodos de 60 e 90, os animais foram eutanasiados e submetidos a novos exames de RX e TC.

A análise radiográfica digital foi adotada por oferecer melhor precisão para a realização da interpretação radiográfica durante a evolução da regeneração óssea dos grupos experimentais, sendo considerada um exame rápido e preciso na busca e análise de imagem; e permite determinar os níveis de cinza em uma ampla escala, em comparação com a radiografia convencional (TAVANO, 1999). A interpretação dos RX baseia-se na análise de diferentes densidades seguindo-se alguns princípios da radiologia, tais como espessura e peso atômico dos tecidos a serem radiografados. Desta forma, tecidos e objetos de maior espessura oferecem maior barreira à exposição do filme aos raios X, que não conseguem atravessá-los, tornando mais radiopaca (branca) a imagem obtida. A escala de densidades varia da tonalidade negra à branca, de acordo com a espessura e peso atômico dos tecidos radiografados, sendo que nesta escala o osso é radiopaco (branco), e o ar é radiolúcido (preto). A avaliação por meio do diagnóstico de RX é realizada pela observação destas áreas radiopacas (LANGLAND, 1989; TAVANO, 1999).

A avaliação da densidade do tecido neoformado, por meio das TCs, foi realizada com a utilização do software E-Film, que mede a densidade por meio de unidade Hounsfield

(HU). A unidade de HU é formada por um grande espectro de representações de tonalidades entre branco, cinza e o preto. A escala de cinza foi criada especialmente para a TC. A Tabela 2 apresenta os valores de HU correspondentes a água, ar e diversos tecidos.

Tabela 2: Valores de HU e tecido correspondente.

| <b>Valores de HU</b> | <b>Tecido correspondente</b>              |
|----------------------|-------------------------------------------|
| <b>0</b>             | Água                                      |
| <b>-1000</b>         | Ar                                        |
| <b>&gt; 600</b>      | Cortical óssea muito densa                |
| <b>400 a 600</b>     | Osso córtico-esponjoso                    |
| <b>&lt; 200</b>      | Osso córtico-esponjoso de baixa densidade |
| <b>- 120 a - 80</b>  | Gordura                                   |
| <b>50 a 55</b>       | Músculo                                   |

Fonte: FEEMAN, 2010

A TC é uma das mais úteis técnicas de imagiologia médica para avaliar densidade óssea. Desenvolvida por Godfrey Hounsfield em 1973, as unidades de Hounsfield (HU) podem medir a densidade óssea, pois estão diretamente relacionadas aos coeficientes de atenuação de tecidos. A TC possui capacidade de abordar o papel da arquitetura trabecular sobre as propriedades mecânicas do osso por meio da avaliação de parâmetros específicos tridimensionais (FANUSCU et al., 2004).

#### **4.2.4 Análise estatística**

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa Jandel Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Os resultados de viabilidade, genotoxicidade e densidade óssea foram analisados por meio de testes não paramétrico Kruskal-Wallis. A significância estabelecida foi  $P < 0,001$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Resultados de Biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*

A Figura 12 apresenta o gráfico de viabilidade celular das membranas de BN testadas, que permaneceram em contato direto com as células em cultura nos períodos de 24, 48 e 72 h.

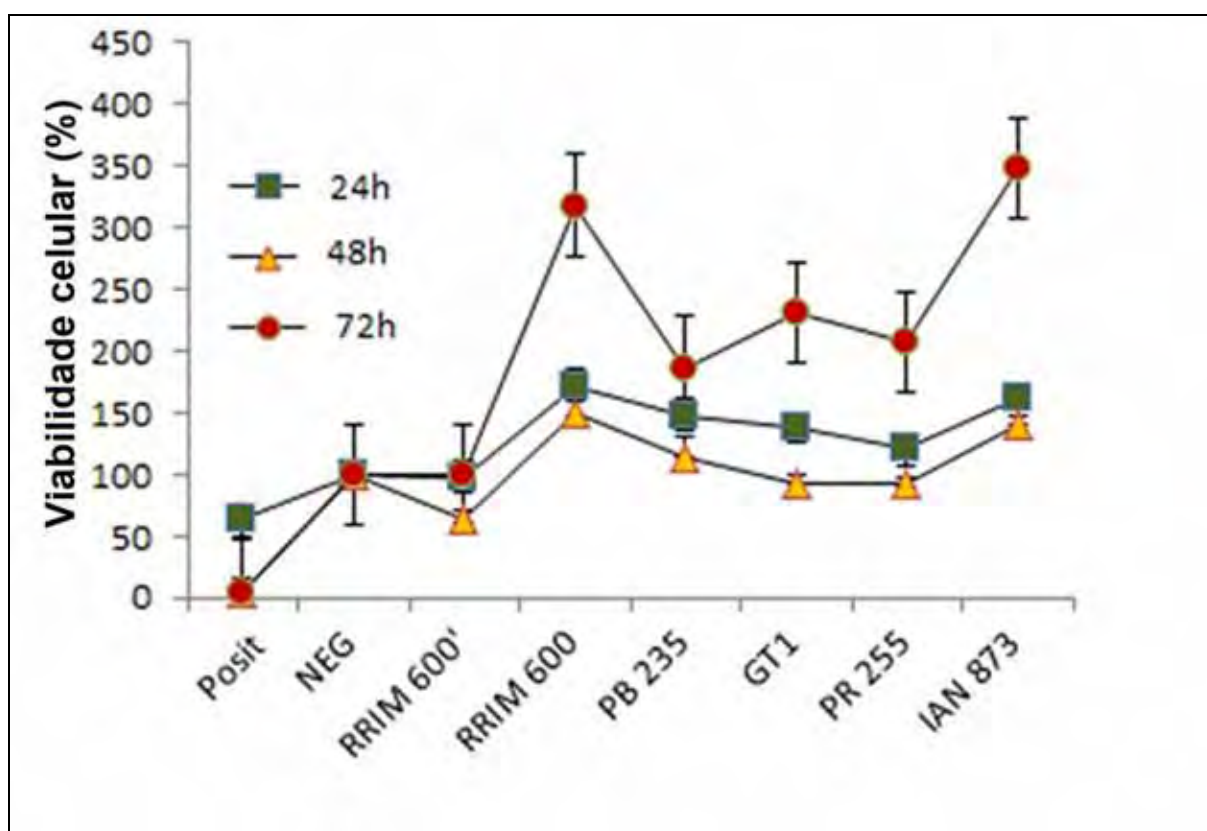


Figura 12: Viabilidade celular de fibroblastos medida pelo corante vital vermelho neutro nos períodos de 24, 48 e 72h após o contato direto das células em cultura com as diferentes membranas de BN oriundas dos clones: RRIM600, PB 235, GT 1, PR 255 e IAN 873. A a-membrana está representada por (RRIM 600').

Conforme pode ser observado na Figura 12, todas as amostras sem a utilização de hidróxido de amônio na coleta apresentam um comportamento semelhante ao controle negativo, ou seja, não tóxico. Por outro lado, as amostras onde foi utilizado hidróxido de amônio na coleta apresentaram um número de células viáveis reduzido, quando comparado

com as demais amostras e o controle negativo, indicando um efeito citotóxico destas membranas. Além disso, pode ser observado um aumento significativo de células cultivadas nas af-membrana dos clones RRIM 600, PB235 e IAN873 em dois períodos 24 e 48h e do clone GT1 no último período 72h, quando comparados com o controle negativo, sugerindo maior bioatividade do material coletado destes clones quando as membranas são produzidas a partir do material sem a utilização de hidróxido de amônio como conservante ( $P < 0,001$ ). As af- membrana produzidas a partir dos cinco diferentes clones apresentaram uma ótima viabilidade celular, semelhantes ou superior ao controle negativo. Comparando-se as amostras ao controle positivo, verificamos um aumento de 3 vezes na viabilidade das células, confirmando que estas membranas não são citotóxicas ( $P < 0,001$ ). No período de 72 horas verificou-se que há um aumento significativo na proliferação de células nas culturas em contato com af-membranas, em comparação ao controle negativo. A proliferação celular foi 3 vezes maior em alguns casos, como nos clones RRIM 600 e IAN 873. Essas diferenças foram estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ).

Da Figura 12, verificou-se também que as a-membranas apresentaram uma viabilidade celular 3 vezes menor, quando comparadas com af-membranas em 72 horas. A diminuição da viabilidade celular das a-membranas foi evidente em todos os períodos de testes, de forma estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ). Observou-se um grande aumento na proliferação celular em culturas que permaneceram em contato com as af- membranas produzidas a partir de clones RRIM 600 e IAN 873, sugerindo um aumento da bioatividade destes clones. Um aumento de 2 vezes na proliferação celular destas amostras foi observado, quando comparado com o clone PB 235 no período de 72 horas. Comparando-se os clones RRIM 600 e IAN 873 com o controle negativo, é possível verificar um aumento de 3 vezes na proliferação de células ( $P < 0,001$ ), sendo que este aumento não é observado em outros clones. Em um modelo experimental de peritoniotomia em cão, verificou-se que a membrana de BN produzida a

partir do clone RRIM 600 promoveu a reparação tecidual, como nenhum outro biomaterial (MRUÉ et al., 2004). Assim, nossos resultados estão em concordância com a literatura e mostram que a BN é bioativa. Além disso, vemos que há diferenças na bioatividade de diferentes clones. A variação na composição da BN de cada clone pode explicar o aumento da bioatividade (MORENO et al., 2003; ISSA et al., 2010). Os clones mais promissores encontrados neste estudo são RRIM 600 e IAN 873. Foi verificado também um ligeiro aumento na proliferação celular em amostras GT 1.

A Figura 13 mostra os resultados obtidos no ensaio do Cometa de fibroblastos em cultura, avaliados 72h após contato direto com as membranas.

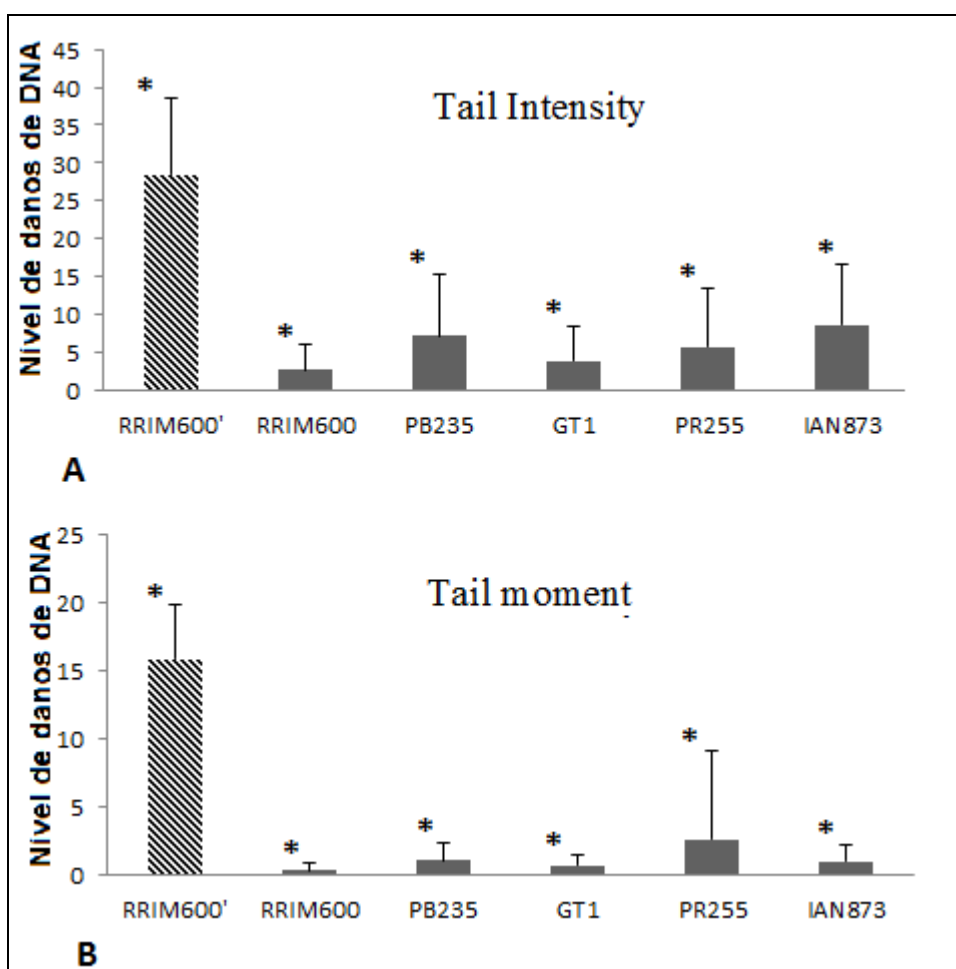


Figura 13: Genotoxicidade medida pelo teste do cometa no período de 72h após o contato direto das células em cultura com as diferentes membranas de BN oriundas dos clones: RRIM600, PB 235, GT 1, PR 255 e IAN 873. A a-membrana está representada pelo hachurado (RRIM 600'). Em (A) podemos verificar o parâmetro *tail intensity* e em (B) *tail moment*. \* P<0,001.

Da Figura 13, pode ser observado que os níveis de danos no DNA (momento da cauda e os parâmetros de intensidade da cauda) foram significativamente maiores nos grupos de a-membranas, quando comparados às af-membranas. As af-membranas não foram genotóxicas, uma vez que o nível de danos de DNA detectado foi pequeno, aproximando-se de zero no caso das af-membranas produzidas a partir dos clones RRIM 600 e GT 1 ( $P < 0,05$ ). As a-membranas apresentaram níveis de danos de DNA extremamente elevados, indicando que houve um efeito genotóxico destas amostras sobre as células em cultura. Foi verificado um aumento de 15 vezes no nível de danos de DNA em comparação com as af-membranas.

A Figura 14 apresenta as análises macroscópicas da região de implante de af-membranas produzidas a partir do clone IAN 873, e também análise histológica do tecido adjacente ao implante da mesma amostra.

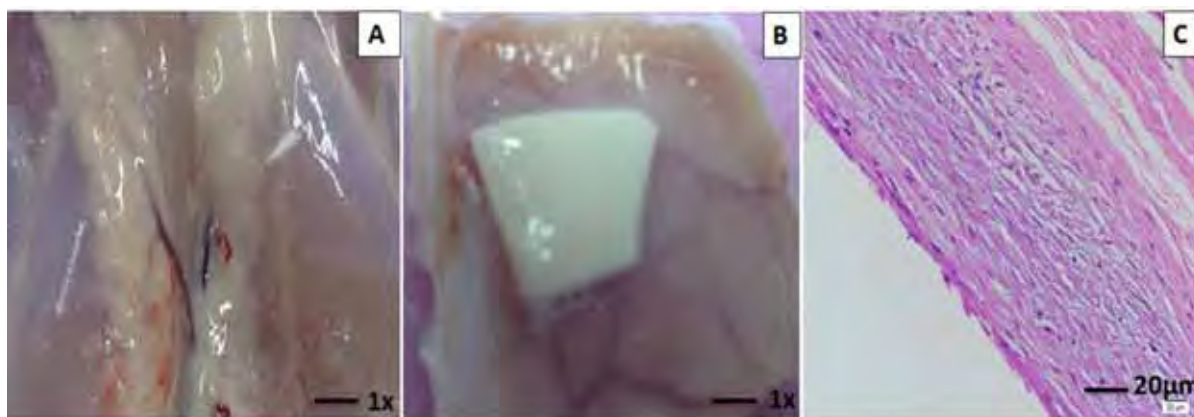


Figura 14: A e B: imagem macroscópica da região de implante de af- membranas do clone IAN 873. Em C: análise histológica da mesma amostra.

Conforme pode ser verificado na Figura 14, nos testes *in vivo* todos os coelhos do grupo que continha af-membranas, assim como os do controle negativo, apresentaram uma boa recuperação pós-cirúrgica, com boa cicatrização das feridas, não apresentaram nenhuma alteração comportamental como perda de apetite e apatia e nenhuma região de necrose e ulceração foi observada no local da cirurgia. O tecido subjacente ao implante apresentava



aspecto normal sem alterações relevantes. As af-membranas não mostraram qualquer resposta tóxica, e os resultados das análises histológicas mostram um pequeno número de células inflamatórias, semelhante ao que foi observado nos implantes de membranas de PTFE (padrão de ouro). A presença moderada de célula inflamatória, neste caso, pode estar relacionada com o processo de cicatrização, o que envolve uma sequência complexa de acontecimentos celulares e bioquímicos (PARK, 2004). Nossos resultados são consistentes com os obtidos por Thomazini et al. (1997), realizado por histologia, microscopia óptica e eletrônica de varredura, onde concluíram que as membranas de BN não causam reação alérgica e induz respostas inflamatórias semelhantes ao processo de cicatrização normal.

Na Figura 15 estão representadas as análises macroscópicas da região de implante de a- membranas produzidas a partir do clone IAN 873, e também análise histológica do tecido adjacente ao implante da mesma amostra.

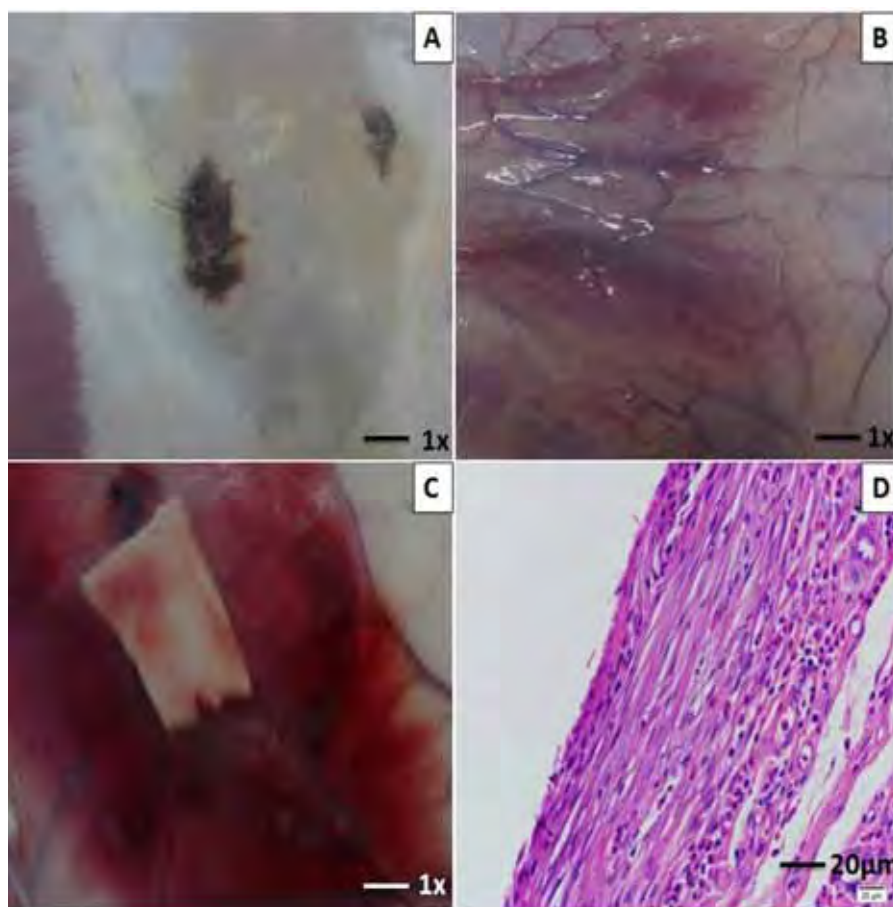


Figura 15: Em A e B e C: imagem macroscópica da região de implante de a-membranas do clone IAN 873. Em D: análise histológica da mesma amostra.

Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que nos grupos onde foram implantadas as a-membranas dos cinco diferentes clones, ocorreram à formação de ulcerações, retardo no processo de cicatrização, necrose tecidual e resposta inflamatória aguda. Esta resposta inflamatória pode estar relacionada com a morte celular induzida por a-membranas. Neste grupo, os animais apresentaram ainda alterações comportamentais como apatia e perda de apetite, além de apresentar uma elevada reatividade nos tecidos adjacentes ao implante, com um número elevado de células do sistema imunológico, células gigantes de corpo estranho e formação de cápsula fibrosa.

Cabe ressaltar, que em todos os grupos experimentais, o inchaço diminuiu gradativamente até o segundo dia após a cirurgia. Não ocorreu infecção ou contaminação da cirurgia e nem óbito de animais durante todo o experimento.

A Figura 16 traz os resultados das análises histológicas do tecido adjacente ao implante de todos os grupos testados, após os períodos de 1, 4 e 12 semanas após o implante.

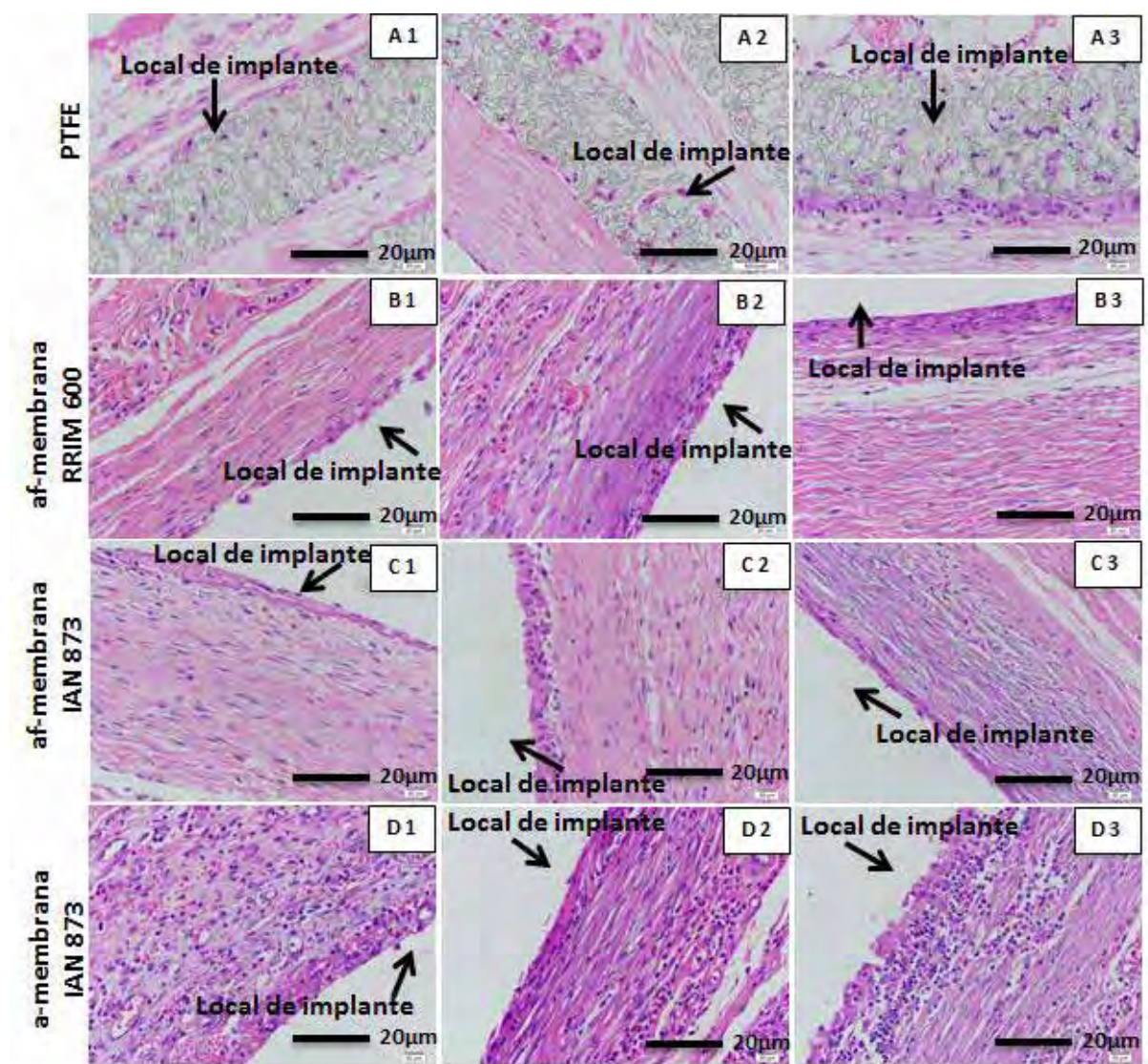


Figura 16: Em A: análise histológica do tecido adjacente ao implante de PTFE após 1 (A1), 4 (A2) e 12 (A3) semanas após a cirurgia, usando um aumento de 40x. Em B, a mesma descrição de A para as af-membranas oriundas do clone RRIM 600. Em C, mesma descrição de B para as af-membranas oriundas do clone IAN 873. Em D, mesma descrição de C, para amostras de a-membranas oriundas do clone IAN 873.

Na Figura 16 podemos observar as respostas teciduais ao implante das membranas de BN. Nos grupos que receberam os implantes de PTFE (padrão ouro), pouca ou nenhuma reatividade tecidual foi observada. Nos grupos que receberam os implantes de af-membranas

foi verificada uma reatividade tecidual moderada e nos grupos que receberam os implantes de a-membranas foi verificada uma alta reatividade tecidual, que está correlacionada com citotoxicidade devido a alta frequência dos 4 parâmetros avaliados que estão apresentados na Tabela 3.

A Tabela 3 apresenta os valores dos quatros parâmetros avaliados na Figura 16: presença de infiltrado (1), células gigantes (2), aumento de células do sistema imunológico (3) e formação de cápsula fibrosa (4), que são correlacionados com citotoxicidade do material.

Tabela 3: Avaliação histológica do tecido adjacente ao implante das membranas de BN

| <b>Amostras</b>                | <b>Parâmetro<br/>1</b> | <b>Parâmetro<br/>2</b> | <b>Parâmetro<br/>3</b> | <b>Parâmetro<br/>4</b> | <b>Total</b> |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| <b>PTFE</b>                    | 1                      | 0                      | 1                      | 0                      | 2            |
| <b>a-membrana RRIM<br/>600</b> | 3(1)                   | 3(1)                   | 3(1)                   | 1(1)                   | 10(4)        |
| <b>a-membrana<br/>PB 235</b>   | 3(1)                   | 3(1)                   | 3(1)                   | 1(1)                   | 10(4)        |
| <b>a-membrana<br/>GT 1</b>     | 3(1)                   | 3(1)                   | 3(1)                   | 1(1)                   | 10(4)        |
| <b>a-membrana<br/>PR 255</b>   | 3(1)                   | 3(1)                   | 3(1)                   | 1(1)                   | 10(4)        |
| <b>a-membrana<br/>IAN 873</b>  | 3(1)                   | 3(1)                   | 3(1)                   | 1(1)                   | 10(4)        |

Para af-membranas os resultados são apresentados entre parênteses.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3, é possível observar que nos grupos onde foram testadas as af-membranas, as amostras apresentaram baixa toxicidade *in vivo*, pois o valor final obtido foi semelhante ao apresentado pelo grupo PTFE (inerte). Por outro lado, nos grupos onde foram utilizadas a-membranas, foi verificada uma alta reatividade tecidual, com alta frequência dos quatro parâmetros mostrados na Tabela 3, e a pontuação total de soma dos últimos grupos foi correlacionada com citotoxicidade. Os nossos resultados indicam que as a-membranas não são biocompatíveis e a sua utilização como um biomaterial deve ser descartada. Assim, o modo de preservação pós-coleta influencia na biocompatibilidade da

BN. Isto é de certa forma esperado, uma vez que é sabido que o hidróxido de amônio pode causar inúmeras reações adversas. Desse modo, a utilização de hidróxido de amônio como um conservante deve ser evitada quando a BN vai ser utilizada para produzir biomateriais.

Avaliando os resultados obtidos nos ensaios de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, podemos concluir que as af-membranas estudadas neste trabalho são biocompatíveis e não apresentam efeito genotóxico. Os resultados estão em acordo com os dados encontrados por Mente et al. (2005), que concluíram que a biocompatibilidade da BN (poli-isopreno) está relacionada à sua semelhança com estruturas de biopolímeros encontradas nos mamíferos.

A BN é mencionada na literatura como responsável por respostas alérgicas (BANERJEE et al., 2003). Os nossos resultados indicam que estas respostas alérgicas podem ser provenientes do método de processamento. No nosso caso, ficou evidente que a utilização de hidróxido de amônio como um método de preservação causou reações negativas.

A Figura 17 apresenta os espectros de FT-IR das a-membranas e af-membranas produzidas a partir dos clones RRIM 600.

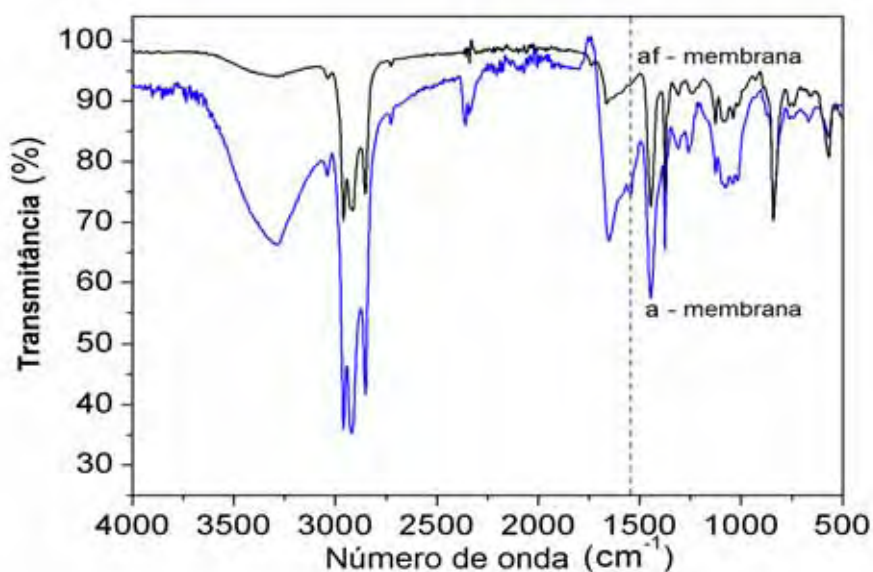


Figura 17: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das membranas produzidas a partir dos clones RRIM 600 (a - membrana) e (af-membrana). A banda em  $1542\text{ cm}^{-1}$  está em destaque.

Na Figura 17 pode ser verificado que existem algumas diferenças em picos específicos entre as duas amostras testadas, sendo que as amostras de af-membranas são correspondentes aos dados publicados na literatura, onde em  $1660\text{ cm}^{-1}$  é referente à ligação peptídica  $\text{C}=\text{O}$ , em  $1540\text{ cm}^{-1}$  estiramento  $\text{C}-\text{N}$  e em  $1560\text{ cm}^{-1}$  flexão  $\text{NH}$  (AGOSTINI et al., 2008). Por outro lado, a a-membrana apresentou algumas bandas distintas, sendo que essas diferenças podem estar relacionadas com a presença de amidas secundárias. Em torno da região  $2333\text{ cm}^{-1}$  pode ser verificado a presença da banda referente às ligações de  $\text{CO}_2$ , que podem ser originadas durante o processo de medida, provenientes da atmosfera. A banda observada em  $1542\text{ cm}^{-1}$  para a amostra de a-membrana é referente à amida primária, com deformação  $\text{C}=\text{O}$  em ligação de hidrogênio com água. Quando o hidróxido de amônio reage com o material ocorre uma reação de esterificação. Ocorre também a formação da amida  $\text{R}-\text{CONH}_2$ . As ligações referentes ao hidróxido de amônio podem estar sendo mascaradas pela banda referente à  $\text{H}_2\text{O}$  em torno de  $3282\text{ cm}^{-1}$ .

Cabe ressaltar que as membranas estudadas neste trabalho não passaram por processos de vulcanização, ou quaisquer outros processos que promovam a remoção de hidróxido de amônio residual. Por esta razão, nós acreditamos que as nossas amostras mostram um aumento na quantidade de hidróxido de amônio, em comparação com outras membranas de BN. Este fato é provavelmente a razão para o aparecimento da banda na região de  $1542\text{ cm}^{-1}$  encontrada no FT-IR, que não é usualmente observada.

A vulcanização é conhecida por melhorar as propriedades químicas e físicas da BN. Porém, o processo envolve o uso de elevadas temperaturas e adição de produtos químicos, tais como enxofre e os óxidos metálicos como  $\text{Zn}$ ,  $\text{Ca}$ ,  $\text{Mg}$  e  $\text{Pb}$  (STELESCU et al., 2013). No entanto, as altas temperaturas podem degenerar as proteínas responsáveis pela bioatividade da BN e por este motivo, todas as membranas produzidas neste trabalho foram mantidas  $50^\circ\text{C}$ . Foi verificado em alguns estudos, que membranas preparadas a uma temperatura superior a



85° C não apresentam atividade angiogênica quando comparadas com membranas preparadas em temperaturas inferiores (FERREIRA et al., 2009).

As micrografias das amostras de af-membranas que permaneceram em contato direto com as células por um período de 72h estão apresentadas na Figura 18.

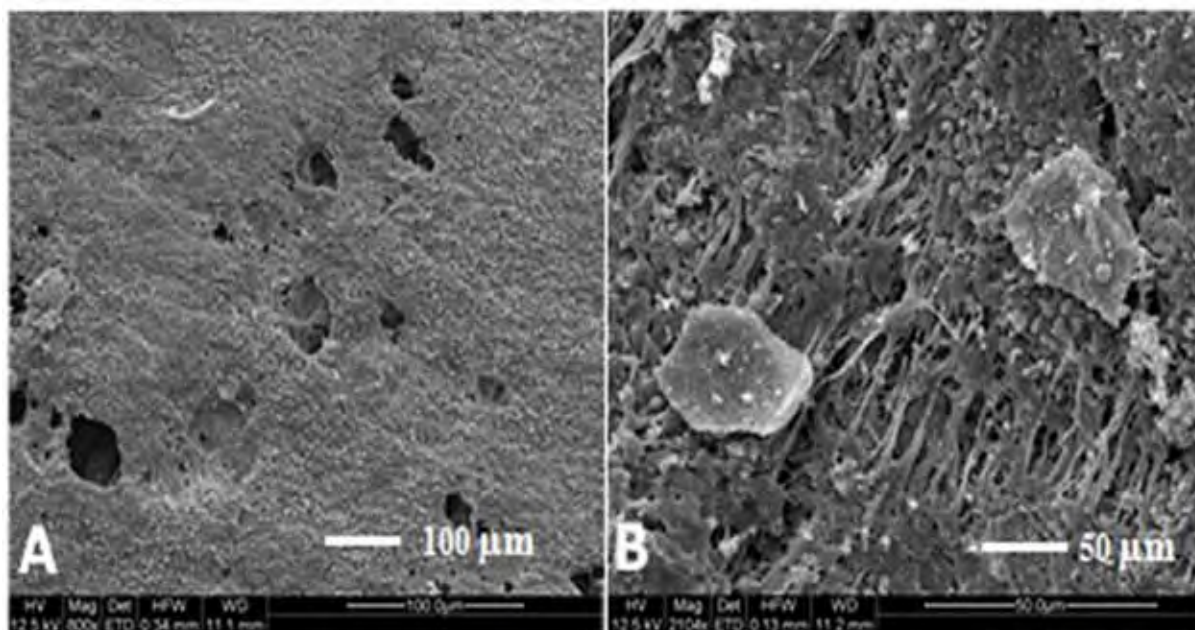


Figura 18: Micrografias de af-membranas produzidas a partir do clone RRIM 600 após o contato com células de fibroblastos (B), bem como a superfície porosa da membrana (A).

Como pode se observar nas imagens de microscopia eletrônica de varredura apresentadas na Figura 18, as af-membranas apresentam adesão celular em sua superfície, sendo que estas células apresentam morfologia mais achatada e estrelada, que é um indicativo de adesão celular ao substrato, sendo que quando as células ainda não estão aderidas, sua morfologia apresenta a forma arredondada. A adesão celular é um importante marcador de biocompatibilidade de um biomaterial. A adesão de células ao substrato não somente estimula a proliferação, mas também sua atividade biossintética (LOMBELLO et al., 2000).

É bem conhecido na literatura que a porosidade está intimamente ligada à biocompatibilidade, além de ser um fator crítico para a migração celular e elaboração de uma

matriz óssea e de contribuir muito para sua fixação auxiliando o crescimento celular (BOYAN et al., 1996; TEMENOFF et al., 1999). Todas as membranas produzidas neste estudo apresentaram porosidade superficial e as amostras de af-membranas mostraram boa adesão celular e porosidade. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados com cães, nos quais a membrana de BN foi implantada por via subcutânea e analisada por microscopia eletrônica de varredura, onde observou-se que a membrana foi capaz de adesão celular e formação da matriz extracelular (MRUÉ et al., 2004).

## 5.2. Resultados de bioatividade

A Figura 19 (A) mostra as imagens de RX dos animais implantados do grupo controle, que recebeu coágulo sanguíneo, e a Figura 19 (B) mostra imagens dos animais que receberam membranas de BN, produzidas a partir do clone RRIM 600, após um período de 30 dias. A seta indica as áreas radiopacas que apresentaram neoformação óssea.



Figura 19: Em A está apresentada a imagem de RX do animal que recebeu o coágulo sanguíneo, com 30 dias de pós-cirúrgico. Em B está apresentada a imagem de RX do animal que recebeu o implante de BN do clone RRIM 600 no mesmo período.



Conforme pode ser observado na Figura 19, os animais que receberam as membranas de BN do clone RRIM 600 apresentavam regeneração óssea nas regiões de DCC, verificado por meio das regiões radiopacas na superfície do defeito. Embora não mostrados, os grupos que receberam membranas de BN do clone IAN 873 e PTFE apresentaram resultados semelhantes. Por outro lado, o grupo coágulo não apresentou nenhuma região de neoformação óssea neste período. Foi possível observar uma boa evolução no pós-operatório dos animais.

As Figuras 20 e 21 apresentam as imagens radiográficas dos grupos tratados com as af-membranas de BN, produzidas a partir do clone RRIM 600 e IAN 873, no período de 60 dias após o implante. Em todas as figuras de imagens radiográficas, as setas indicam as áreas radiopacas que apresentaram neoformação óssea. Todas as imagens foram obtidas logo após eutanásia e coleta das peças dos animais.

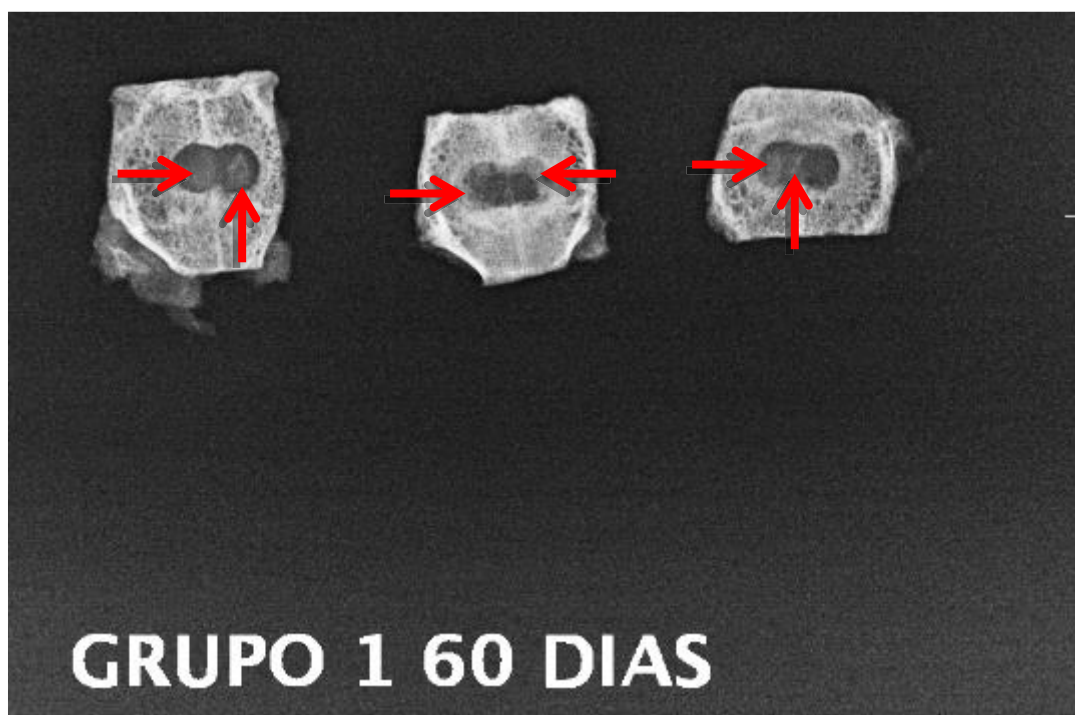


Figura 20: Imagens de RX digital do grupo tratado com af-membranas de BN produzidas a partir do clone RRIM 600 no período de 60 dias após o implante em DCC.

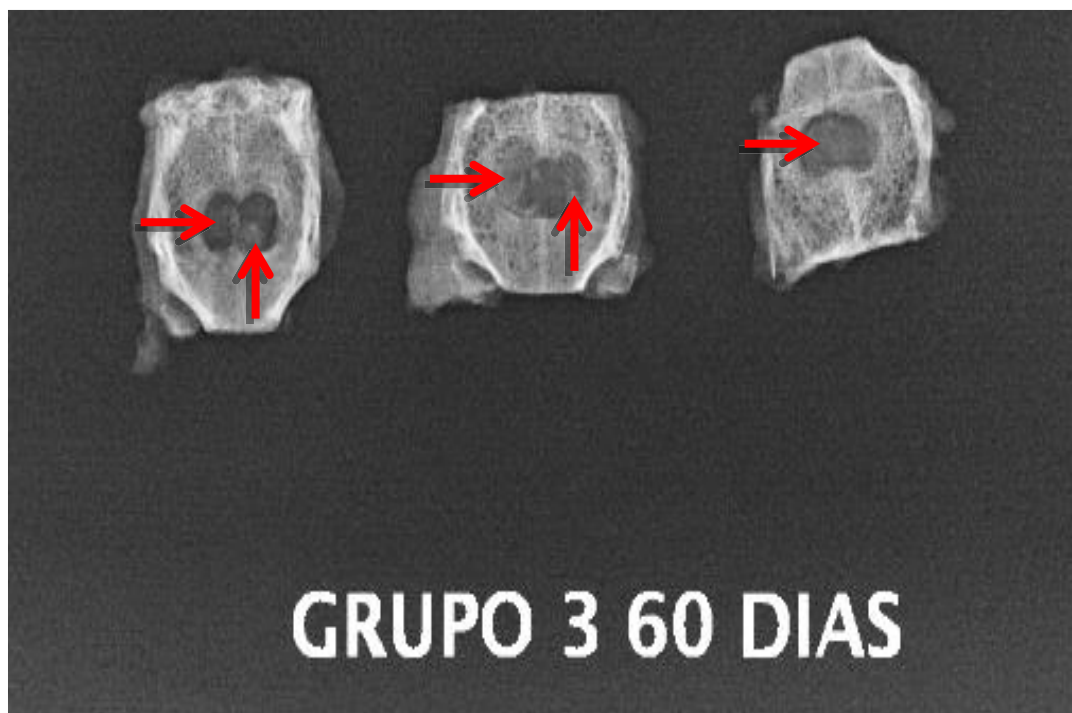


Figura 21: Imagens de RX digital do grupo tratado com af-membranas de BN produzidas a partir do clone IAN 873 no período de 60 dias após o implante em DCC.

As imagens de RX digital apresentadas nas Figuras 20 e 21 mostram a presença de tecido ósseo neoformado em todos os animais tratados destes grupos experimentais. Dessa forma, os resultados indicam que as membranas de BN produzidas a partir dos clones RRIM 600 e IAN 873, mostraram-se efetivas como material promotor da regeneração óssea. Comparando os resultados dos dois grupos, podemos observar áreas de neoformação óssea semelhantes, indicando que os dois clones não apresentam diferenças significativas na bioatividade neste período do teste. Este resultado está em acordo com os dados encontrados na literatura, onde em estudos semelhantes utilizando DCC e membranas de BN na regeneração óssea guiada, foi possível observar áreas radiopacas nos exames de RX (após um período de 30 dias do implante das membranas), indicando maior neoformação óssea nos grupos tratados com BN em comparação ao grupo tratado com coágulo e PTFE no mesmo período (MARTINS et al, 2010).

A Figura 22 mostra as imagens radiográficas dos grupos tratados com as membranas de PTFE 60 dias após o implante.

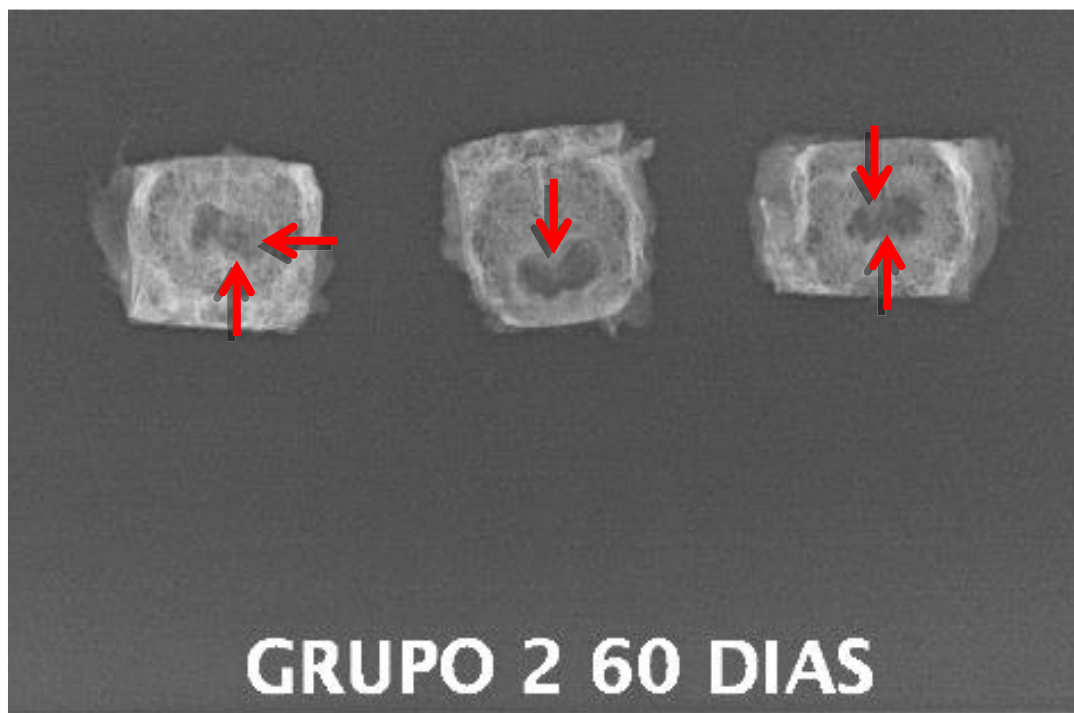


Figura 22: Imagens de RX digital do grupo tratado com membranas de PTFE no período de 60 dias após o implante em DCC.

As imagens de RX digital apresentadas na Figura 22 mostram a presença de tecido ósseo neoformado em todos os animais tratados deste grupo experimental. No entanto, em comparação com os grupos tratados com membranas de BN dos clones RRIM 600 e IAN 873, verifica-se uma menor quantidade de osso neoformado, sugerindo que as membranas de BN apresentam resultados superiores ao PTFE.

A Figura 23 traz as imagens radiográficas dos grupos tratados com coágulo, 60 dias após o implante.

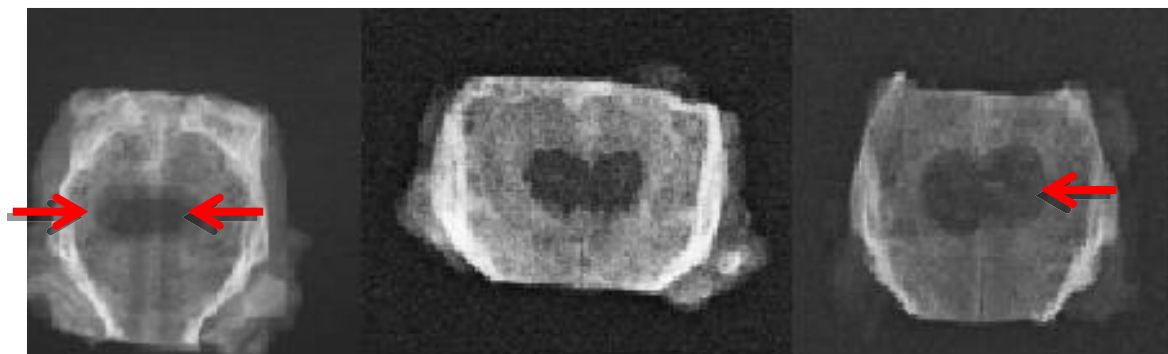


Figura 23: Imagens de RX digital do grupo tratado com coágulo no período de 60 dias após o implante em DCC.

As imagens de RX digital apresentadas na Figura 23 mostram uma pequena presença de tecido ósseo neoformado nos animais 1 e 3. O animal 2 não apresentou áreas de neoformação óssea neste período de teste. Fato que é esperado, pois o DCC é referente a lesões de menores dimensões em que a reparação não ocorre de forma espontânea (SCHIMITZ et al., 1986). Além disso, o conceito de DCC minimiza diferenças relacionadas à idade, espécie e sítio anatômico em estudos *in vivo*, o que permite a padronização para comparações experimentais (HOLLINGER et al., 1990).

As Figuras 24 e 25 apresentam as imagens radiográficas dos grupos tratados com as af-membranas de BN dos clones RRIM 600 e IAN 873, 90 dias após o implante.

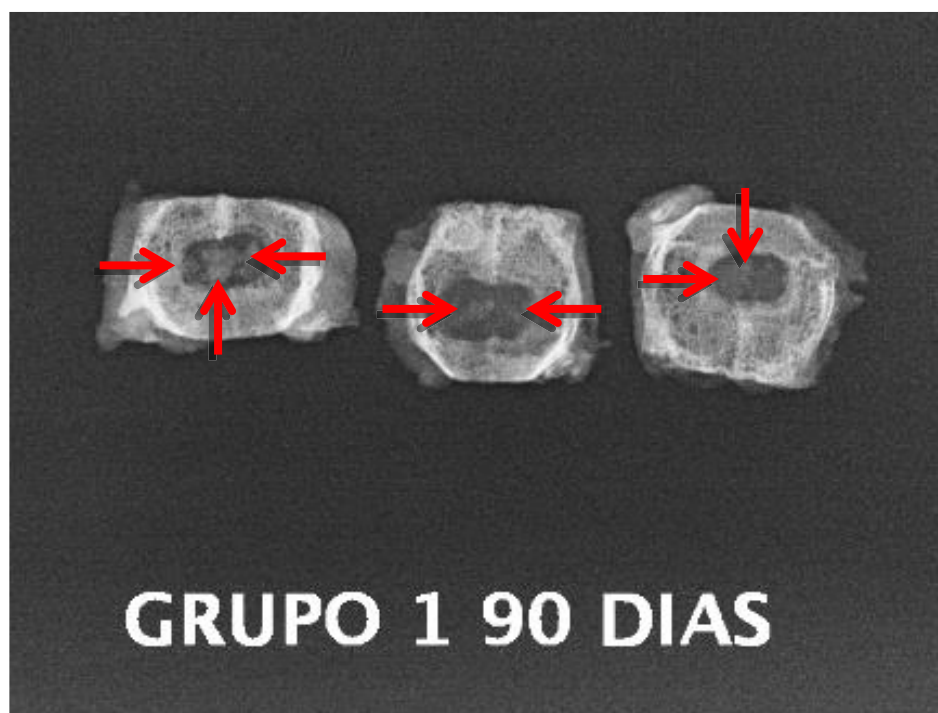


Figura 24: Imagens de RX digital do grupo tratado com af-membranas de BN produzidas a partir do clone RRIM 600 no período de 90 dias após o implante em DCC.

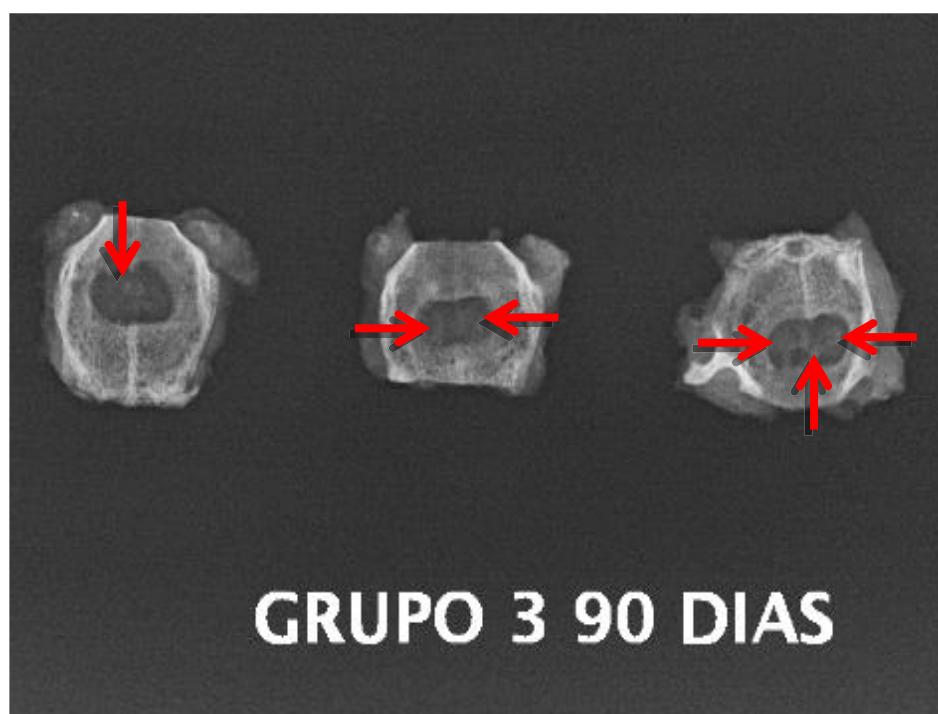


Figura 25: Imagens de RX digital do grupo tratado com af-membranas de BN produzidas a partir do clone IAN 873 no período de 90 dias após o implante em DCC.

As imagens de RX digital apresentadas nas Figuras 24 e 25 mostram grandes áreas radiopacas, deixando evidente a presença de tecido ósseo neoformado nestes grupos experimentais. Na figura 24, o animal 1 foi o que apresentou a maior área de neoformação óssea. Os animais 2 e 3 apresentaram regiões menores de osso neoformado neste período de teste. Por meio dos resultados obtidos verifica-se que as membranas de BN de RRIM 600 e IAN 873 apresentam efetividade na neoformação óssea neste período do teste. Na Figura 25 o animal 3 foi o que apresentou maior área de neoformação óssea. Os animais 1 e 2 apresentaram regiões menores de osso neoformado neste período de teste. Ficou claro que os dois clones apresentam bioatividade semelhantes. Neste período de teste foi possível observar ainda uma neoformação óssea mais homogênea em comparação com o grupo PTFE e coágulo.

A avaliação dos resultados, dos períodos de 60 e 90 dias após o implante das membranas de BN dos clones testados neste estudo, permite afirmar que essas membranas são efetivas na reparação óssea, e apresentam excelentes resultados em todos os períodos de testes, sendo superiores ao padrão ouro (PTFE). Além disso, as membranas não apresentam respostas negativas ao tecido hospedeiro. Desse modo, fica evidente que a BN é um excelente biomaterial para regeneração óssea e que os dois clones testados são altamente indicados para a produção de biomateriais (apresentam bioatividades semelhantes). A membrana de BN dos dois clones apresenta também características semelhantes, sendo de fácil manuseio e ótima aplicabilidade em defeitos ósseos. Os resultados indicam que essas membranas podem ser utilizadas em aplicações em implantodontia.

A Figura 26 mostra as imagens radiográficas dos grupos tratados com as membranas de PTFE, 90 dias após o implante.

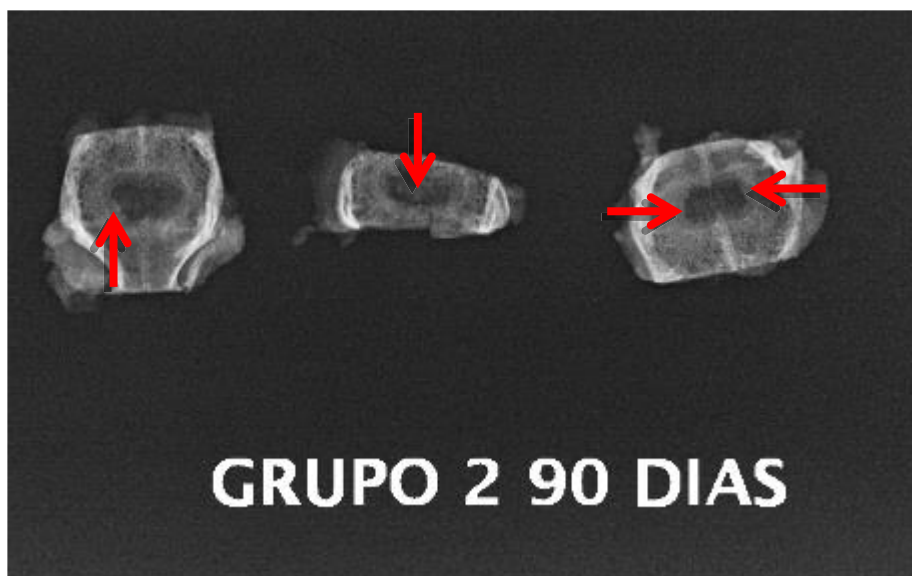


Figura 26: Imagens de RX digital do grupo tratado com membranas de PTFE no período de 90 dias após o implante em DCC.

As imagens de RX digital apresentadas na Figura 26 mostram poucas e pequenas áreas de neoformação óssea neste grupo experimental. Se compararmos este grupo aos grupos onde foram implantadas as membranas de BN dos dois clones testados neste mesmo período de teste, fica evidente que as amostras de BN são mais efetivas na regeneração óssea que as membranas de PTFE, confirmando novamente a bioatividade da BN e seu potencial para o uso neste tipo de aplicação. O SF se mostrou efetivo e adequado para o uso neste tipo de cirurgia, pois todas as membranas permaneceram aderidas e bem fixadas ao osso.

A Figura 27 apresenta as imagens radiográficas dos grupos tratados com coágulo, 90 dias após o implante.



Figura 27: Imagens de RX digital do grupo tratado com coágulo no período de 90 dias após o implante em DCC.



As imagens de RX digital apresentadas na Figura 27 mostram poucas e pequenas áreas de neoformação óssea neste grupo experimental. Se compararmos este grupo aos grupos onde foram implantadas as membranas de BN dos dois clones testados e PTFE neste mesmo período de teste, fica evidente que não houve regeneração óssea espontânea adequada, devido aos resultados menos favoráveis observado nas imagens analisadas.

A Figura 28 apresenta as imagens dos exames de TC dos animais que receberam implantes da membrana de BN do clone RRIM 600 nos períodos de 60 e 90 dias. Em todas as imagens apresentadas nas figuras de TC, as setas representam as regiões hiperdensas observadas.

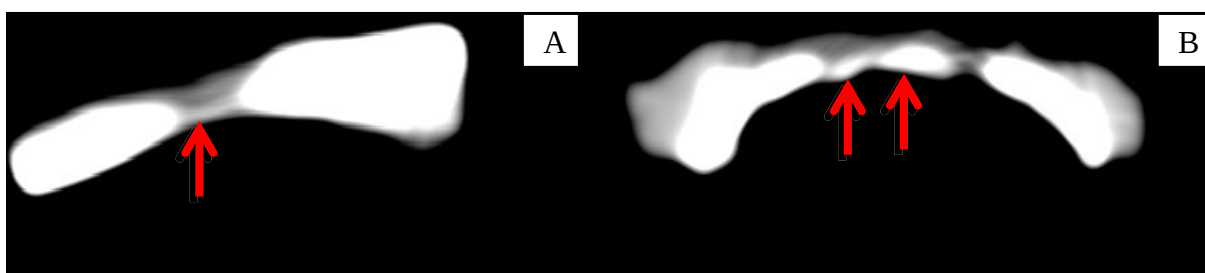


Figura 28: Imagens de TC do grupo tratado com af-membrana do clone RRIM 600 após o implante em DCC. A: período de 60 dias e B: período de 90 dias.

A partir dos resultados apresentados na Figura 28 é possível observar, nos dois períodos de testes, uma lâmina hiperdensa nas regiões basais do defeito, que são regiões representadas pelas áreas mais claras mostradas nas TCs (MOSS, 1980). As regiões hiperdensas representam as áreas onde estão ocorrendo o processo de neoformação óssea, que mostra-se eficiente neste grupo experimental. Além disso, é possível verificar uma ótima evolução do processo, sendo que no período de 90 dias as regiões hiperdensas são maiores e mais homogêneas.

A Figura 29 apresenta as imagens dos exames de TC dos animais que receberam implantes da membrana de BN do clone IAN 873 nos períodos de 60 e 90 dias.



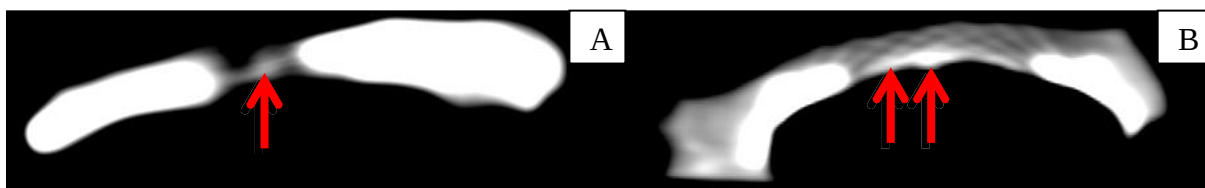


Figura 29: Imagens de TC do grupo tratado com af-membrana do clone IAN 873 após o implante em DCC. A: período de 60 dias e B: período de 90 dias.

Da Figura 29, é possível observar a presença de lâminas hiperdensas na região basal do defeito, nos dois períodos de testes analisados, semelhante ao verificado nos grupos onde foram implantadas as membranas de BN do clone RRIM 600 (Figura 28). O processo de neoformação óssea mostrou-se eficiente neste grupo experimental.

A Figura 30 traz as imagens dos exames de TC dos animais que receberam implantes da membrana de PTFE nos períodos de 60 e 90 dias.

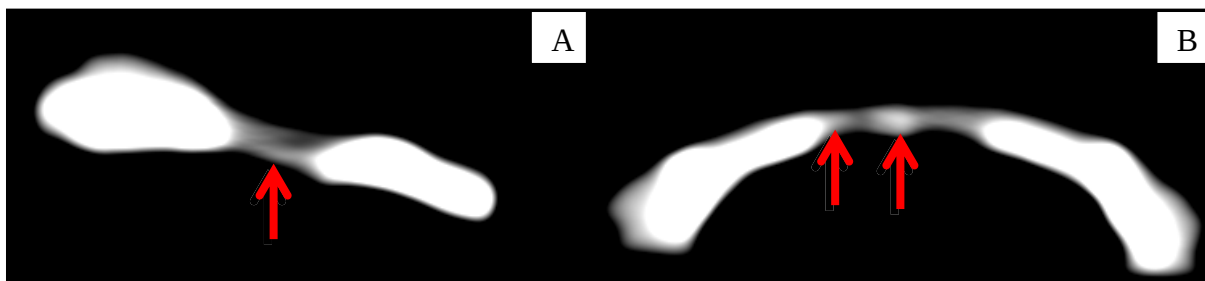


Figura 30: Imagens de TC do grupo tratado membranas de PTFE após o implante em DCC. A: período de 60 dias e B: período de 90 dias.

Conforme pode ser verificado na Figura 30, nos dois períodos de testes analisados, é possível observar uma pequena lâmina hiperdensa na região basal do defeito. Comparando-se este resultado com os apresentados pelos demais grupos testados, onde foi utilizada a membrana de BN dos dois clones avaliados (Figuras 28 e 29), fica evidente que a BN é mais eficiente na regeneração óssea. Da Figura 30 também é possível verificar uma ótima

evolução do processo de neoformação óssea, pois no período de 90 dias as regiões hiperdensas são maiores e mais homogêneas.

A Figura 31 apresenta as imagens dos exames de TC dos animais do grupo coágulo nos períodos de 60 e 90 dias.



Figura 31: Imagens de TC do grupo tratado com coágulo. A: período de 60 dias e B: período de 90 dias.

Conforme pode ser observado na Figura 31, diferentemente dos resultados apresentados pelos demais grupos experimentais, no grupo tratado com coágulo não há presença das regiões hiperdensas, comprovando que o DCC não regenera espontaneamente sem a utilização de um material bioativo para estimular a neoformação óssea.

A Figura 32 apresenta as imagens dos exames de TC e a avaliação da densidade óssea por meio da escala HU, dos animais do grupo que receberam as membranas de BN dos clones RRIM 600 e IAN 873, nos períodos de 60 e 90 dias.

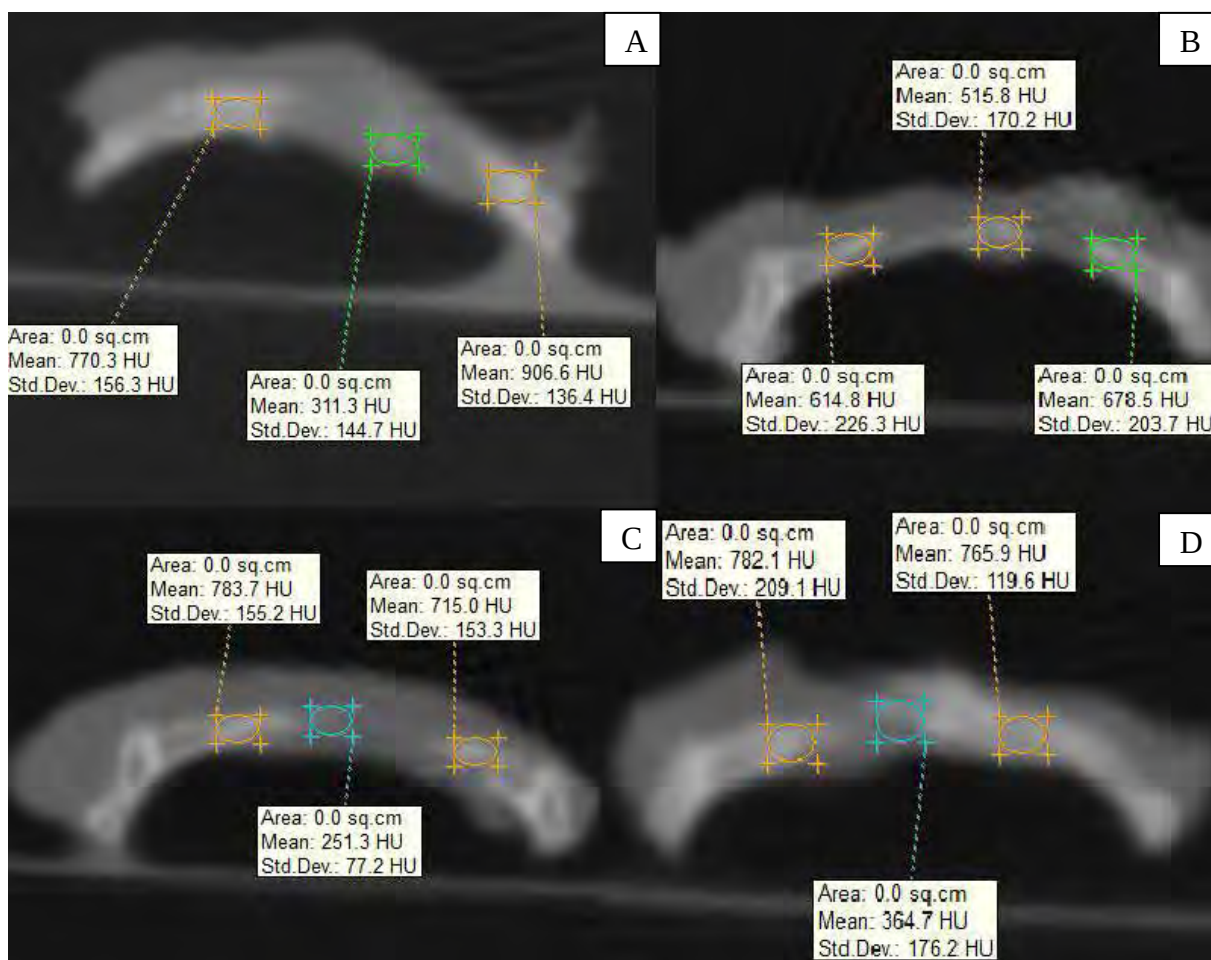


Figura 32: Imagens de TC com análise da densidade óssea por meio das unidades de HU dos grupos tratados com af-membranas, nos períodos de 60 e 90 respectivamente, após o implante em DCC. A e B: clone RRIM 600, C e D: clone IAN 873.

A partir dos resultados mostrados na Figura 32, pode ser verificado que o grupo que recebeu membranas do clone RRIM 600 apresentou maior densidade óssea nos dois períodos de teste, em comparação com o grupo que recebeu as membranas do clone IAN 873, porém este aumento não foi estatisticamente significativo. Além disso, a densidade óssea aumentou com o período analisado, pois os dois grupos apresentaram maior densidade no período correspondente a 90 dias.

De acordo com a classificação do tipo ósseo proposta por Reddy e Kumaravel (2010), no grupo que recebeu a membrana de BN do clone RRIM 600, no primeiro período observa-se a presença de osso tipo D4, que é formado por uma fina camada de osso cortical revestindo osso medular com trabéculas grandes. Já no período de 90 dias verifica-se a presença de osso

tipo D3, que é formado por uma fina camada de osso cortical revestindo osso medular com trabéculas pequenas (MISH, 1999). Neste caso é possível observar a evolução do processo de neoformação óssea e verificar a formação de osso de melhor qualidade e resistência, no período de 90 dias. No grupo que recebeu a membrana de BN do clone IAN 873, também foi observado, no período de 60 dias, presença de osso do tipo D4. Por outro lado, presença de osso tipo D3 foi observada no período de 90 dias, ou seja, resultado semelhante ao obtido pelo grupo que recebeu as membranas de RRIM 600. Desse modo, podemos concluir que os dois clones foram capazes de auxiliar em uma reparação óssea eficiente e que o osso neoformado apresenta excelente qualidade, sendo que densidade óssea aumentou com o tempo de implante.

A Figura 33 apresenta as imagens dos exames de TC e a avaliação da densidade óssea por meio da escala HU, dos animais do grupo que receberam as membranas de PTFE e coágulo nos períodos de 60 e 90 dias.

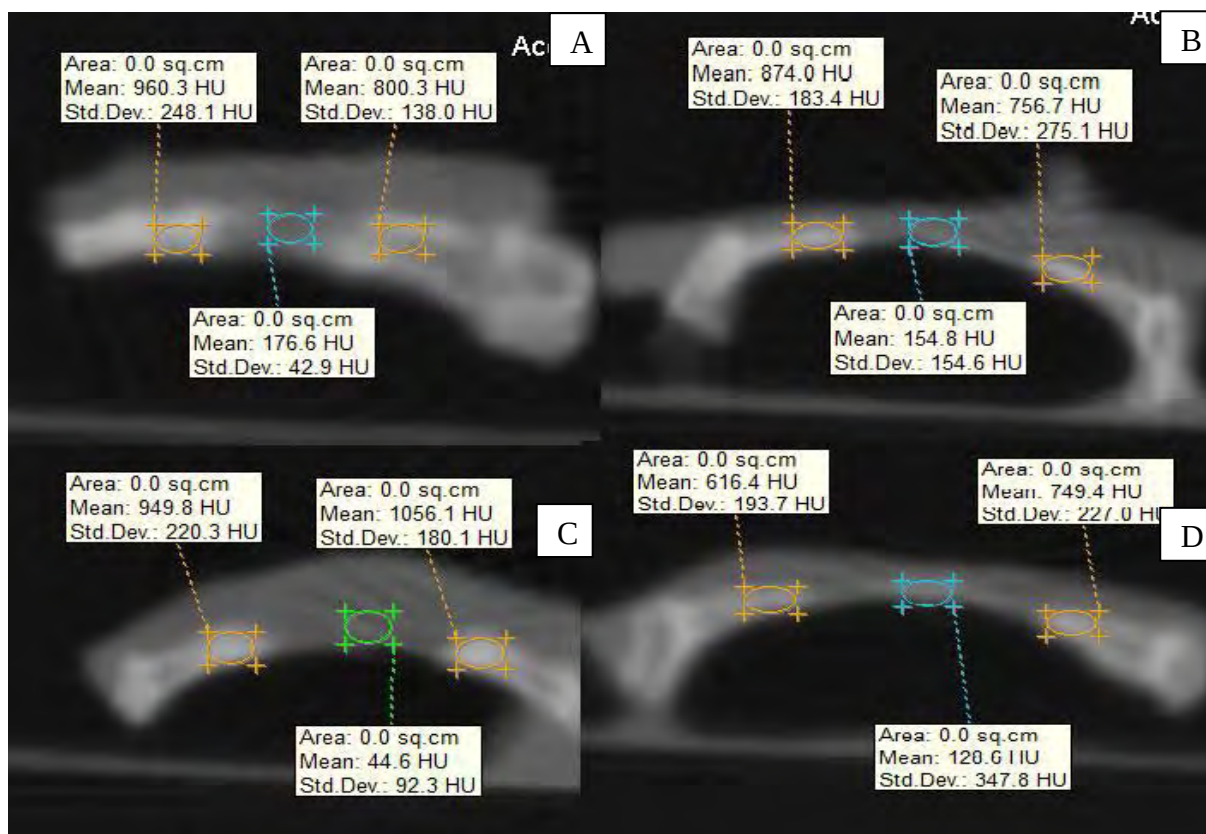


Figura 33: Imagens de TC com análise da densidade óssea por meio das unidades de HU dos grupos tratados nos períodos de 60 e 90 dias respectivamente, após o implante em DCC. A e B: membrana de PTFE; C e D: coágulo sanguíneo.

Da Figura 33, é possível verificar o grupo que recebeu a membrana de PTFE apresentou uma menor densidade óssea, nos dois períodos de teste, em comparação aos grupos que receberam membranas de BN. A densidade óssea não aumentou com o decorrer do tempo de implante, sendo semelhante nos dois períodos (60 e 90 dias).

De acordo com a classificação do tipo ósseo, avaliada por HU, nos períodos de 60 e 90 dias nota-se a presença de osso tipo D4. Neste caso é possível observar que não houve evolução do processo de neoformação óssea, e a qualidade do osso não evoluiu com o decorrer do tempo de implante. No grupo que recebeu o coágulo, observa-se que no período de 60 dias ainda não é possível notar a presença de osso neoformado. Por outro lado, no período de 90 dias nota-se a presença de osso tipo D5, que é a fase inicial da formação óssea (REDDY e KUMARAVEL, 2010). Fica evidente que o processo de reparação óssea não é

eficiente sem a utilização de um material bioativo, e o animal por si próprio não é capaz de regenerar o DCC criado.

Na tabela 4 estão apresentados os resultados da análise da densidade óssea de todos os grupos tratados. Uma comparação com o osso nativo do rebordo do defeito também está apresentada.

Tabela 4: Resultados da densidade óssea avaliada por meio das TCs.

| Grupo Experimental        | Média HU à esquerda do defeito<br>( $\pm$ d.p.) | Média HU à direita do defeito<br>( $\pm$ d.p.) | Média HU do defeito<br>( $\pm$ d.p.) |
|---------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>RRIM 600 - 60 dias</b> | 662,63 $\pm$ 160,3                              | 737,1 $\pm$ 80,2                               | 297,6 $\pm$ 154,5*                   |
| <b>RRIM 600 - 90 dias</b> | 926,4 $\pm$ 71,5                                | 1082,4 $\pm$ 227,4                             | 408,8 $\pm$ 57,9*                    |
| <b>IAN 873 - 60 dias</b>  | 922,9 $\pm$ 112,4                               | 987,9 $\pm$ 214,2                              | 287 $\pm$ 45,5 *                     |
| <b>IAN 873 - 90 dias</b>  | 785,6 $\pm$ 7,7                                 | 710,26 $\pm$ 47,5                              | 445,5 $\pm$ 100,5*                   |
| <b>PTFE - 60 dias</b>     | 898,5 $\pm$ 106,4                               | 971,7 $\pm$ 169,6                              | 122,5 $\pm$ 38,5**                   |
| <b>PTFE - 90 dias</b>     | 601,3 $\pm$ 202,4                               | 632,8 $\pm$ 88,1                               | 107,9 $\pm$ 56**                     |
| <b>Coágulo - 60 dias</b>  | 936,3 $\pm$ 90,1                                | 960 $\pm$ 178,2                                | 15,5 $\pm$ 64,2 #                    |
| <b>Coágulo - 90 dias</b>  | 715 $\pm$ 69,7                                  | 747,4 $\pm$ 20,9                               | 71,1 $\pm$ 83,2 #                    |

\* não houve diferença significativa; \*\*  $P < 0,05$ ; #  $P < 0,001$

De acordo com a tabela 4, é possível observar que a média de HU do defeito nos grupos tratados com BN foi maior nos 2 períodos do teste. No período de 90 dias a densidade aumentou significativamente, tendo seu valor mais próximo dos valores de HU do osso nativo do rebordo do defeito. No grupo que recebeu a membrana de PTFE, a densidade óssea além de menor que a do grupo tratado com BN, também não aumentou ao longo do período, onde nota-se um valor de HU muito semelhante nos dois períodos de teste. Já no grupo coágulo, verifica-se que não houve a neoformação óssea adequada como já era esperado.

Nossos resultados estão de acordo com a literatura, que afirma que a BN é um excelente material para ser utilizado em aplicações que envolvam reparação óssea (SILVA et al., 2006). Além disso, não foram observadas diferenças significativas na bioatividade dos dois clones testados, sendo que os dois clones apresentam excelente bioatividade e atuam de

maneira semelhante na reparação óssea, promovendo uma neoformação óssea de qualidade, que evolui ao longo do tempo. Por estes motivos, os dois clones são altamente indicados para a produção de biomateriais que visam à reparação óssea.

## 6. CONCLUSÕES

A partir de nossos resultados podemos concluir que as membranas de BN produzidas a partir dos cinco diferentes clones são biocompatíveis e não são genotóxicas.

Verificou-se também que as membranas de BN apresentam porosidade superficial, adequada para o crescimento celular.

Evidenciamos uma banda distinta nos espectros de FT-IR que não está presente nas amostras de BN sem hidróxido de amônio, provavelmente devido ao acúmulo de hidróxido de amônio residual nestas amostras, que não foram submetidas a processos de remoção de hidróxido de amônio residual ou de vulcanização, que pode atuar eliminando o hidróxido de amônio das amostras.

A adição de produtos químicos para a conservação da BN pode afetar sua biocompatibilidade. As membranas apresentaram um péssimo desempenho tanto nos testes *in vitro* quanto nos testes *in vivo*. Assim, a extração da BN sem a utilização de conservantes é o método mais adequado para a produção de biomateriais.

De todos os cinco clones estudados, as membranas fabricadas a partir dos clones RRIM 600 e 873 IAN apresentaram maior proliferação celular, o que sugere que estes clones apresentam diferenças na bioatividade em comparação aos demais clones testados.

Os clones RRIM 600 e IAN 873 apresentam bioatividade e são efetivos no processo de reparação óssea, e mostram-se superiores ao PTFE. Não foram encontradas diferenças significativas na bioatividade destes dois clones, sendo que os dois obtiveram ótimos resultados neste tipo de aplicação.

A BN mostrou ser capaz de promover uma reparação óssea de qualidade, que evolui ao longo do tempo. Os dois clones estudados são altamente recomendados para sua utilização como biomaterial que visam à reparação óssea.



As membranas de BN também apresentaram ótima aplicabilidade, elasticidade e resistência para a aplicação nos defeitos ósseos. O selante de fibrina mostrou-se eficiente para este tipo de aplicação, sendo que todas as membranas permaneceram bem aderidas à superfície óssea, não havendo nenhum caso de descolamento das membranas durante todo o estudo.

## 7. REFERÊNCIAS

AARDEMA M, MACGREGOR JT. Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “omics” technologies. **Mutat Res** 2002; 78: 13-25.

ADIWILAGA K, KUSH A. Cloning and characterization of cdna encoding farnesly diphosphate synthase from rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Plant. Mol. Biol** 1996, 30; 935.

AGOSTINI DLS. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**. Presidente Prudente. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia 2009.

ALBRECH J, NORENBURG MD. Glutamine: A Trojan horse in 10 ammonia neurotoxicity. **Hepatology** 2006; 9:994-998.

ALENIUS H, KALKKINEN N, REUNALA T, TURJANMAA T, PALOSUO T. The main IgE-binding epitope of a major latex allergen, prohevein, is present in its N-terminal 43-amino acid fragment, hevein. **J Immunol** 1996; 156 :1618-625.

BALABANIAN CACA, COUTINHO JN, LAMANO CTL, LACERDA SA, BRENTAGANI LG. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science** 2006; 48:201-205.

BANERJEE B, KANITPONG K, FINK JN, ZUSSMAN M, SUSSMAN GL, KELLY KJ, KURUP VP. Unique and shared IgE epitopes of Hev b 1 and Hev b 3 in latex. **Allerg Mol Immunol**. 2000;37:789-798.

BARBER D, LIGNELLI J, SMITH BM, BARTEE BK. Using a dense PTFE membrane without primary closure to achieve bone and tissue regeneration. **J Oral Maxillofac** 2007; 65:748-752.

BARROS LC. **Atividade coagulante e da toxicidade da giroxina e irradiada com Cobalto-60 isolada do veneno de Crotalus durissus terrificus**. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

BERNSTEIN IL, LI JT, BERNSTEIN DI, HAMILTON R, SPECTOR SL, TAN R. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. **Ann Allergy Asthma Immunol** 2008; 100: 148.

BIKALES N, MARK M, GAYLORD HFN. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**. New York: American Chemical Society, 1973.

BLACKLEY DC. **Polymers Latices**; Chapman & Hall: Glasgow, 1997. vol. 2.

BLACK J. **Biological performance of material/fundamentals of biocompatibility**. New York; Basel: Marcel Dekker Inc.; 1999; 321-453.

BOCK SA, MUNOZ-FURLONG A, SAMPSON HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods, **J Allergy Clin Immunol** 2001; 107:191-193.

BOLINA- MATOS RS, ALVES PHM, LIBERTI EA. Effects of the natural latex biomembrane (*Hevea brasiliensis*) in wistar rat skin submitted to body thermal injury by scalding. In: The 10 Conference of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA) 2009, Cape Town. Programme and abstract books of the 17 Conference of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA) 2009; 562-562.

BORENFREUND E, BABICH H, MARTIN-ALGUACIL N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-the neutral red (nr) and Tetrazolium mtt tests. **Toxicology in vitro** 1988; 2:1-6.

BOYAN BD. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cells response. **Biomaterials** 1996; 17:137-146.

BRANDÃO ML. Prótese vascular derivada do látex. **Journal of Vascular Bras** 2007; 6: 130-141.

CHEN Z, VAN KAMPEN V, RAULF-HEIMSOTH M, BAUR X. Allergenic and antigenic determinants of latex allergen Hev b1: peptide mapping of epitopes recognized by human, murine and rabbit antibodies. **Clin Expe Allergy** 1996; 26 :406-15.

CIAPETTI G, GRANCHI D, VERRI E, SAVARINO L, CAVEDAGNA D, PIZZOFERRATO A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials** 1996;17:1259-1264.

COSTA HM, VISCONTE LLY, NUNES RCR, CRISTINA RG, FURTADO EL. Aspectos Históricos da Vulcanização. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2003; 13:125-129.

COSTA RB, BRITO R, RESENDE MDV, SOUZA PG, ROA RAR, FEITOSA KCO. Predição de parâmetros e valores genéticos para caracteres de crescimento e produção de látex em progênes de seringueira, **Bragantia** 2010; 69: 49-56.

COSTA RB. Melhoramento e conservação genética aplicados ao desenvolvimento local – o caso da seringueira (Hevea sp). **Revista Internacional de Desenvolvimento Local** 2001; 1:51-58.

CUNHA F, JÚLIO J. Colocação de implantes osseointegrados em enxertos autógenos microvascularizado de fíbula para reconstrução mandibular – relato de um caso clínico. **Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implantes** 2004; 11: 96 -100.

DALL'ANTONIA AC. Avaliação de Clones de Borracha Natural Crua por Ensaio Padrão e Análise Dinâmico-Mecânica, **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2006; 16: 239-245.

DOMINGOS ALA, TUCCI JR, GARCIA SB, BESSA JR, COLOGNA AJ, MARTINS ACP. Use of a latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: biocompatibility, clinical and histological outcomes. **International Brazilian Journal of Urology** 2009; 35:217-226.

DUCHEYNE P, KOHN DH. Materials for Bone and Joint Replacement. **Materials Science and Technology-A Comprehensive Treatment** 1992; 14: 29-109.

EBO DG, STEVENS WJ, BRIS CH, DE CLERCK LC. Latex-specific IgE, skin testing, and lymphocyte transformation to latex allergy. **J Allergy Clin Immunol** 1997; 100(5):618-23.

ERENO, D. Curativo de Borracha. **Revista Pesquisa Fapesp**. São Paulo, v. 6, n. 88, 2003. Disponível em: < <http://www.fapesp.org.br/revistapesquisa.fapesp.br> > . Acesso em 15 de agosto de 2008.

ERENO C. **O uso do Látex Natural como Barreira oclusiva na regeneração óssea guiada em defeitos críticos na calvária de coelhos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Universidade do Sagrado Coração, Bauru 2007.

FRADE MA, VALVERDE RV, ASSIS RV, COUTINHO-NETTO J, FOSS NT. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **Int J Dermatol** 2001; 40:238-40.

FANUSCU MI, CHANG TL. Three-dimensional morphometric analysis of human cadaver bone: microstructural data from maxilla and mandible. **Clin. Oral Implants Res** 2004; 2: 213-218.

FEEMAN TG. The Mathematics of Medical Imaging: A Beginner's Guide. **Springer Undergraduate Texts in Mathematics and Technology**. Springer 2010; 9 :78-88.

FERRARO GC, MORAES JRE, PEREIRA GT, MORAES FR, BUENO DE CAMARGO MH. Clinical and morphological evaluation of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 2005; 11: 433-46.

FERREIRA M, MENDONÇA RJ, COUTINHO NETTO J, MULATO M. Angiogenic Properties of Natural Rubber Latex Biomembranes and The Serum Fraction of Hevea. **Brazilian Journal of Physics** 2009; 39:564-569.

FUJIMOTO, F. et al. Uso da biomembrana de látex em cavidade enxertada: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia** 2007; 5: 854-85.

GALIANI PD, MALMONGE JA, SANTOS DP, MALMONGE LF. Avaliação de Clones de Borracha Natural Crua por Ensaio Padrão e Análise Dinâmico-Mecânica, **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2007; 17: 93-97.

GARG AK. **Bone biology, harvesting, and grafting for dental implants: Rationale and clinical applications**. In: Garg AK, ed. Review of bone-grafting materials. Chicago, IL: Quintessence Publishing Co, Inc.: 2004:52.

GILBERT NE, DODDS KS, SUBRAMANIAN S. J. Progress of breeding investigations with *Hevea brasiliensis*. Analysis of data from earlier crosses, J Rubber Res. Inst. **Malaysia** 1973; 3:365-380.

GONÇALVES, PS, SOUZA, SR, BRIOSCHI, AP, VIRGENS FILHO, AC, MAY, A, CAPELA-ALARCON, RS. Efeito da frequência de sangria e estimulação no desempenho produtivo e econômico de clones de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 2000, 35:1081-1091.

GRAVE HH, BAYER AG, LEVERKUSEN AG. **Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry** 1993;221-35.

GREGORY MC, MARK PM, HUARD J. Scalp Reconstruction: Regeneration With Acellular Dermal Matrix. **Plast Reconstr Surg**. 2010; 6: 1685-1692.

GREGORY MC, MARK PM, GOSAIN AK, CAMPBELL PG, LOSEE JE, HUARD J. Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). **Plast Reconstr Surg** 2011; 6: 1685-1692.

GOLDSBY A, RICHARD E. **Immunology**, 5 edition, W.H.Freeman and Company, 2003.

GONÇALVES P, BORTOLETTO SN, FURTADO LE, SAMBUGARO L, BATAGLIA OC, ORTOLANI AA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 2001;36:589-598.

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;112:515-527.

HASMA H. Proteins of natural rubber latex concentrate. **Journal of Natural Rubber Research** 1993;12:21-32.

HARTMANN A, SPEIT G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol Lett** 1997; 90:183-188.

HOLLINGER JO, KLEINSCHMIDT JC: The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **J Craniofac Surg** 1990; 1: 60-68.

HONORATO SB. **Efeito Antioxidante de Componentes do Látex da Seringueira e Mangabeira Sobre a Degradação termo-oxidativa do Poli(1,4-cis-isopreno) Sintético**. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Química Inorgânica), Universidade Federal do Ceará - UFC – Fortaleza, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION ISO 10993: Part 5. **Biological testing of medical and dental materials and devices-tests for cytotoxicity *in vitro* methods**. Geneve; 1999.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION ISO 10993: Part 3. **Biological evaluation of medical devices - tests for cytotoxicity *in vitro* methods**, Geneve; 1992.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION ISO 10993: Part 6. **Biological evaluation of medical devices - tests for cytotoxicity *in vitro* methods**, Geneve; 1992.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION ISO 11.137: **Review: Sterilization of health care products**, Geneve; 2006.

ISSA JPM, DEFINO HLA, COUTINHO-NETTO J, VOLPON JB, REGALO SCH, SIESSERE S, TIOSSI R . Evaluation of rhBMP-2 and Natural Latex as Potential Osteogenic Proteins in Critical Size Defects by Histomorphometric Methods. **Anat Rec.** 2010;293:794-801.

JHA AN, CHEUNG VV, FOULKES ME, HILL SJ, DEPLEDGE MH. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Mutat. Res** 2002; 2: 213-28.

KAMMULA RG, MORRIS JM. Considerations for the Biocompatibility Evaluation of Medical Devices. **Medical Plastics and Biomaterials** 2001; 1: 58-65.

KAWACHI EY, BERTRAN CA, REIS RR, ALVES OL. Bioceramics and perspectives of an interdisciplinary area. **Química Nova** 2000; 4: 518 - 522.

KEMP SF, LOCKEY, RF. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms, **J Allergy Clin Immunol** 2002; 110:341-345.

LANGLAND OE. **Panoramic Radiology**. 2 edition. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989, 440p.

LATASA M, DIEGUEZ I, SANZ MI, PARRA A, PAJARON MJ, OEHLING A. Fruit sensitization in patients with allergy to latex. **J Invest Allergol Clin Immunol** 1995; 5: 97-102.

LOMBELLO CB, MALMONGE SM, WADA MLF. Morphology of fibroblastic cells cultured on poly (HEMA-co-AA) substrates. **Cytobios** 2000; 397:115-122.

LÓPEZ S, DI DOMÊNICO MSDB, CASTRO FFM. Alergia ao látex. **Rev Bras Alergia Imunopatol** 1995; 18(4):126-29.

MARTINS CFP. **Estudo da biodegradabilidade e envelhecimento de Filmes de borracha obtidos por processos de Vulcanização do látex por radiação induzida de Fonte gama**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares ipen. Autarquia associada à Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais 2005.

MARTINS R, KINOSHITA AMO, NARA T, GUIMARÃES SAC. Comparative study of bone response guided tissue regeneration technique - macroscopic evaluation. **Dentistry in Science** 2010; 3: 224-230.

MARTINS, MA. **Evaluation of natural rubber from IAC series clones by solid state <sup>13</sup>C NMR**. Anais do 8o Congresso Brasileiro de Polímeros. 2005.

MAZOCCO, F. Látex extraído da seringueira é utilizado com sucesso na medicina. **Tecnologia, Brasil**, p.58-61, 2002.

MEADE BJ, WEISSMAN DN, BEEZHOLD DH. Latex Allergy: past and present. **International Immunopharmacology** 2002; 2: 225-238.

MENDONÇA, R.J. **Caracterização biológica de uma fração angiogênica do latex natural da seringueira Hevea brasiliensis**. Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2004.

MENTE ED, CENEVIVA R, CUTINHO-NETO J, SACRAMENTO EMF, SANKARANKUTTY AK, SILVA JR, CASTRO OE. **Development of Natural Latex Biomembrane Device for Pancreatic Islet Macroencapsulation**. In: Organ Donation Congresses, 8th ISODP, 5th ITCS, 2005, Gramado - RS. , 2005.

MISCH CE. **Doação de enxertos ósseos autógenos extra orais para implantes sendo ósseo. Implantes Dentários Contemporâneos**, 2ºed, Santos livraria editora, São Paulo, C33, p 521 - 535, 2000.

MISCH CE. **Contemporary Implant Dentistry**, 2 edition, St. Louis: Mosby 1999.

MORCELI P. **Borracha natural: Situação atual e perspectiva**. Brasília: CONAB; 2003.

MORENO RMB, JOB AA, SOUZA P. Monitoramento e Avaliação da Borracha Natural Crua Utilizando a Técnica de Análise Térmica Dinâmico-Mecânica, **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2006; 16: 235-238.

MORENO RMB, FERREIRA M, GONÇALVES OS, MATTOSO LHC. Avaliação do látex e da borracha natural de clones de seringueira no Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 2003; 5: 583-590.



MOONEY MP, SIEGEL MI. **Animal models for bone tissue engineering**. In: Wnek G, Bowlin G, editors. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. New York: Marcel Dekker; 2005; 1-19.

MORENO RMB, GONÇALVES PS, MATOSO LHC. Performance of latex and natural rubber of new rubber tree clones (IAC series). **KGK: Kautschuk Gummi Kunststoffe** 2007; 12: 659-661.

MORENO RMB, GONÇALVES PS, MATOSO LHC, FERREIRA M. Avaliação do látex e da borracha de clones de seringueira no Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 1977; 38: 583-590.

MOSS AA, GOLDEBERG HI. Computed tomography, ultrasound and X-ray: an integrated approach. **Academic Press**, 1980; 564p.

MRUÉ F, COUTINHO-NETTO J, CENEVIVA R, LACHAT JJ, THOMAZINI JS, TAMBELINI H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Mat Res**. 2004;7:277-283.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomenbrana de látex natural com polilisina**. Tese: Ribeirão Preto (SP): Departamento de Cirurgia e Anatomia, FMRP-USP, 2000.

MULLER U. In Vitro Biocompatibility Testing of Biomaterials and Medical Devices. **Medical Device Technology** 2008; 1: 95-98.

OREFICE RL, PEREIRA MM, MANSUR HS. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Editora Cultura Médica 2005.

ORTOLANI AA. Fatores climáticos condicionantes da produção de látex da seringueira. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRES A HEVEICULTURA PAULISTA, 1., Barretos, 1998. Anais p.19-30.

Odontologika. Descoberto novo uso para o látex: reconstrução óssea, Conexão. São Paulo, 21 fev. 2003. Capturado em 26 abr. 2006. On line. Disponível na Internet: <http://www.conexaomaster.com.br/index.php?pag=noticia&lang=pt&id=2517>.

PARK JB, LAKES RS. **Biomaterials. An Introduction**. 3nd. Edition, New York: Plenum Press, 2007.

PARK JE, BARBUL A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am J Surg**. 2004;187: 11S-16S.

PAULO NM. Membrana de látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polilisina a 0,1% e tela de márlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** 2005; 20: 305-310.

PAULO N M. Biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) com polilisina a 0,1% para herniorrafia perineal em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae** 2005; 33: 79-82.

Pierre R, Jean-Luc C. Vulcanizable rubber composition for the manufacture of a tire, and a tire, the tread of which comprises such a composition. **Michelin rech** 2003; 28: 456-458.

PINHO ECCM, SOUSA SJF, CHAHUD F. Experimental use of látex biomembrane in conjunctival reconstruction. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** 2004; 67:27-32.

PONS DK, CONSOLARO A, ELEUTERIO RG, HOLGADO LA, MARQUES L, GRAEFF CFO, BAFFA O, KINOSHITA A. Vertical Guided bone augmentation using titanium mesh domes coated with natural latex extracted from *Hevea brasiliensis*. In print 2013.

Site empresa pele nova <<http://www.pelenova.com.br/pesquisa.php> acessado em 27/05/2013>.

RAHAL SC, AMARAL MSP, PAI VD, BARRAVIERA SRCS, CAPORAL EHG, CROCCI AJ. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 2005; 10: 161-72.

RABELO RE. Emprego do compósito látex, poliamida e polilisina a 0,1% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. **Acta Scientiae Veterinariae** 2005; 2: 169-175.

REDDY TK, KUMARAVEL N. Segmentation and classification of jaw bone ctimages using curvelet based texture features. **Bangladesh J. Med. Science** 2010; 9: 33-43.

RIPPEL MM, LEE LL, GALEMBECK F. Skim and Cream Rubber Particles: Colloidal Properties, Coalescence and Film Formation, **Journal of Colloid and Interface Science** 2003; 268: 330-40.

RIPPEL MM, GALEMBECK F. Nanostructures and adhesion in natural rubber: New era for a classic. **Journal of the Brazilian Chemical Society** [online] 2009; 20:1024-1030.

ROGERO SO, MALMONGE SM, LUGAO AB, IKEDA TI, MIYAMARU L, CRUZ AS . Biocompatibility study of polymeric biomaterials. **Artificial organs**, uk 2003; 27:424-427.

SADER S L. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana do látex natural. **Rev Bras Cir Cardiovas** 2000; 15: 338-344.

SCHMITZ JP, HOLLINGER JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop**. 1986:299-308.

SILVA EB. **Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% em cães com defeito palatino experimentalmente induzido**. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SILVA GA, COUTINHO OP, DUCHEYNE P, REIS RL. Materials in particulate form for tissue engineering applications in bone. **J Tissue Eng Regen Méd** 2007; 1: 97 - 109.

STELESCU MD, MANAILA E, CRACIUN G. Vulcanization of ethylene-propyleneterpolymer-based rubber mixtures by radiation processing. **J Appl Polymer Sci**. 2013; 128: 2325-2336.

SUM NC. Preservative systems for field latex. In: RRIM training manual on natural rubber processing. Kuala Lumpur: RRIM 1982; 9-22.

TEMENOFF JS, LU L, MIKOS AG. **Bone-tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds**. Bone Engineering. 1st ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd. 1999

ZELLER JM. Surgical implants. Physiological response. **Aorn J**. 1993;7:1284-1291.

THOMAZINI-SANTOS IA, BARRAVIERA SRCS, MENDES-GIANNINI MJS, BARRAVIEIRA B. Surgical adhesives. **J Venom Anim Toxins**. 2007; 7: 159-71.

THOMAZINI JA, MRUÉ F, LACHAT JJ, ZABOROWISKI AC, DURAN JHR, CENEVIVA R, COUTINHO-NETTO J. Morpfological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from latex natural of *Hevea brasiliensis* for medical utilization. **Acta microscópica** 1997; 6:798-799.

TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU JC, SASAKI YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagenesis** 2000; 35:206-221.

UZABAKILIHO B, LARGEAU C, CASADEVALL E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry** 1987; 11: 3041-3045.

VASCONCELOS Y. Ossos artificiais. **Revista Ciência e Tecnologia no Brasil – Fapesp** 2008; 150: 92- 95.

WANG J, GLIMCHER MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II. Origins of bone-forming cells. **Calcif Tissue Int.**1999;65:486–493.

Wisniewski, A. Látex e borracha. Belém: **FCAP**, SDI, 1983. 171p (FCAP informe didático4).

WILLIAMS DF. Definitions in biomaterials, Elsevier, Amsterdam 1987.

WILLIAMS DF. To engenieer is to create: the link between engineering and reneration. **Trends Biotechnol** 2006; 24: 4-8.

WILLIAMS DF . On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials** 2008; 20: 2941–2953.

WITITSUWANNAKUL R. A rubber particle protein specific for Hevea latex lectin binding involved in latex coagulation. **Phytochemistry** 2008; 69: 1111-1118.

YEANG HY, WARD MA, ZAMRI AS, DENNIS MS. Aminoacid sequence similarity of Hev b 3 to two previously reported 27 and 23 KDa latex proteins allergenic to spina bifida patients. **Allergy** 1998; 53: 513- 519.

YIP L, HICKEY V, WAGNER B, LISS G, SLATER J, et al. Skin prick test reactivity to recombinant latex allergens. **Int Arch Allergy Immunol** 2000; 4: 292-9.

YOSHIKI I, KAZUHIRO T, NAOMI O, TAKAO U, TOSHIE T, MASA-AKI K, MICHIO S, MICHIHITO T, AKITADA N. Comparative studies by cell culture and *in vivo* implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. **J Biomed Mater Res.** 1992; 26: 339-356.

WIDU F, DRESCHER D, JUNKER R, BOURAUUEL C. Corrosion and biocompatibility of orthodontic wires. **J Mater Sci Mater Méd** 1999; 10: 275 - 281.

## 8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

FLORIANO, J.F ; BIDINOTTO LUCAS TADEU ; BARBISAN LF . EVALUATION OF CLASTOGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS BY *Ilex paraguaiensis* (MATE TEA) INFUSIONS IN MALE WISTAR RATS. In: IV Graduation Workshop - Botucatu Medical School-UNESP, 2008, Botucatu/SP. IV Graduation Workshop. Botucatu: jvat, 2008. v. 14.

FLORIANO, J.F ; BIDINOTTO LUCAS TADEU ; BARBISA LUÍS FERNANDO. EVALUATION OF CLASTOGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS BY *Ilex paraguaiensis* (MATE TEA) INFUSIONS IN MALE WISTAR RATS. In: 8th São Paulo Research Conferences, 2007, São Paulo. EVALUATION OF CLASTOGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS BY *Ilex paraguaiensis* (MATE TEA) INFUSIONS IN MALE WISTAR RATS. São Paulo: Applied Cancer Research, 2007. v. 27. p. 1-82.

FLORIANO, J.F ; BIDINOTTO LUCAS TADEU ; BARBISA LUÍS FERNANDO . EVALUATION OF CLASTOGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS BY *Ilex paraguaiensis* (MATE TEA) INFUSIONS IN MALE WISTAR RATS. In: III Graduation Workshop - Botucatu Medical School-UNESP, 2007, Botucatu. EVALUATION OF CLASTOGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS BY *Ilex paraguaiensis* (MATE TEA) INFUSIONS IN MALE WISTAR RATS. Botucatu: Jvat, 2007. v. 13.

FLORIANO, J.F ; BIDINOTTO LUCAS TADEU ; L.T.,SALVADORI ; RODRIGUES MAM ; BARBISAN LF . Mate attenuates dna damage and carcinogenesis induced by diethylnitrosamine and thermal injury in rat esophagus. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p. 1-9, 2009.

FLORIANO, J.F ; BIDINOTTO LUCAS TADEU ; FURTADO KS ; SALVADORI DMF ; RODRIGUES MAM ; BARBISAN LF . Mate and green tea attenuate DNA damage and carcinogenesis induced by diethylnitrosamine and thermal injury in rat esophagus. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.52 p.256-264, 2009.

MARQUES, L.; HOLGADO, L. A.; SIMÕES, R. D.; PEREIRA, J. D. A. S.; FLORIANO, J. F.; MOTA L. S. L. S.; GRAEFF, C. F. O.; CONSTANTINO, C. J. L.; MATSUMOTO, M.; KINOSHITA, A. Subcutaneous tissue reaction and cytotoxicity of PVDF (Poly Vinylidene Fluoride) and P(VDF-TrFE) (Poly Vinylidene Fluoride-Trifluoroethylene) blends associated with natural polymers. **Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials**. (artigo aceito para publicação).

FLORIANO, J.F.; MOTA, L. S. L. S. , FURTADO, E. L.; ROSSETTO, V. J. V.; GRAEFF, C. F.O. Biocompatibility studies of natural latex rubber from different tree clones and collection methods. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. (artigo aceito para publicação).