

MARTINHO DINOÁ MEDEIROS JÚNIOR



**GEL DE POLISSACARÍDEO ASSOCIADO ÀS PROTEÍNAS
ÓSSEAS MORFOGENÉTICAS NA REGENERAÇÃO DE
DEFEITOS CRÍTICOS NA CALVÁRIA DE RATOS**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

ORIENTADOR

PROF. DR. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR

PROFESSOR ASSOCIADO DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA, CCS.
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**RECIFE
2013**

M488g Medeiros Júnior, Martinho Dinoá.
Gel de polissacarídeo associado às proteínas ósseas morfogenéticas na regeneração de defeitos críticos na calvária de ratos / Martinho Dinoá Medeiros Júnior. – Recife: O autor, 2013.
101 folhas : il. ; tab.; figs.; 30 cm.

Orientador: Drº. José Lamartine de Andrade Aguiar.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, 2013.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Biopolímeros. 2. Polissacarídeo. 3. Transplante ósseo. 4. Regeneração óssea. 5. Ratos. I. Aguiar, José Lamartine de Andrade (Orientador). II. Título.

617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-021)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fábio de Oliveira Vilar

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

MARTINHO DINOÁ MEDEIROS JÚNIOR

**GEL DE POLISSACARÍDEO ASSOCIADO ÀS PROTEÍNAS
ÓSSEAS MORFOGENÉTICAS NA REGENERAÇÃO DE
DEFEITOS CRÍTICOS NA CALVÁRIA DE RATOS**

APROVADO EM ____/____/____

ORIENTADOR: **PROF. DR. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR**

PROFESSOR ASSOCIADO DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA, CCS,
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROF. DR. EDMUNDO MACHADO FERRAZ (Presidente)

PROF. DR. JOSEMBERG MARINS CAMPOS

PROF. DR. FÁBIO DE OLIVEIRA VILAR

PROF. DR. SILVIO ROMERO DE BARROS MARQUES

PROF. DR. RICARDO EUGÊNIO VARELA AYRES DE MELO

RECIFE
2013

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese

**A Deus, criador de toda a grandeza infinita, a qual
nosso pensamento ainda é inatingível;**

**Ao meu pai, pela ajuda irrestrita nos momentos mais
necessários;**

**À minha mãe, por ensinar que a formação
educacional é imprescindível;**

**À minha esposa, Karla, e aos meus filhos, Rhyan e
Rayna, que compartilharam, todas as etapas desta
realização, com amor e incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Lamartine**, pela paciência, desprendimento, disponibilidade, apoio, compreensão e incentivo, lição de vida. Ser humano digno de toda atenção e deferência.

Ao **Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz**, que conduz a coordenação da pós-graduação em cirurgia com primoroso princípio de justiça e ao **Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia**, pela transmissão dos conhecimentos, aos mestres **Prof. Edmundo Machado Ferraz**, **Prof. Salvador Vilar Correia Lima**, **Prof. Josemberg Marins Campos**, **Prof. Fábio de Oliveira Vilar**, **Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo**, **Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto**, **Prof^a. Magdala de Araújo Novaes**, **Prof. Sílvio Caldas Neto**.

Ao **Prof. Dr. Jairo de Andrade Lima**, que através de nosso convívio pôde referenciar nossa relação profissional, propiciando minha aprovação em etapa importante da minha vida profissional.

À minha irmã, **Prof^a. Maria Teresa Vasconcelos Medeiros Hamad**, pela dedicação e cuidados dispensados na correção da ortografia e gramática, convívio fraterno e apoio incondicional.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Eugênio Varella Ayres de Melo**, que me incentivou e confiou plenamente na minha capacidade profissional.

À **Prof^a. Elaine Judite**, pela atenção e dedicação irrestrita no estudo histológico, sempre receptiva e prestes a colaborar.

Ao **Dr. Marcos Frazão** por disponibilizar, despretensiosamente, os meios para realização do estudo imaginológico.

Ao **Dr. Antônio Roberto de Barros**, pela recepção gentil no Núcleo de Cirurgia Experimental do CCS-UFPE.

Ao **Prof. Edmilson Mazza**, pelos cuidados e dedicação na orientação e análise estatística.

A **Isabela Nogueira Pimentel**, pela receptividade e gentileza, por ter secretariado de forma plausível o Curso de Pós-Graduação.

A **Sidcley Bernardino**, que muito contribuiu, através das técnicas histológicas de laboratório, para concretizar esta pesquisa.

Ao médico **Heron Schols**, que, durante a realização dos procedimentos cirúrgicos, ainda acadêmico, participou de forma efetiva nos auxílios e pela grande ajuda na obtenção e no tratamento dos resultados imaginológicos.

A **Dra. Adriana Ferreira Cruz**, médica veterinária do Núcleo de Cirurgia Experimental do CCS-UFPE, pela participação ativa e prestimosa neste estudo.

A empresa **Genius S/A**, pela doação do material de enxerto utilizado.

Ao funcionário **Paulo Antônio Barbosa**, do Núcleo de Cirurgia Experimental do CCS-UFPE, pelos cuidados na manutenção da higiene e alimentação dos animais.

Às técnicas de enfermagem do Núcleo de Cirurgia Experimental, **Maria Auxiliadora Farias da Silva e Maria de Lourdes Cordeiro da Silva**, pelo zelo dos materiais cirúrgicos utilizados nesta pesquisa.

Aos **meus colegas** do curso de doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	05
3. LITERATURA.....	07
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO.....	99

RESUMO

Introdução: As BMP's abriram novas perspectivas nas reconstruções ósseas; são indutoras da reparação do tecido ósseo e necessitam de carreadores para transporte e liberação de forma controlada. O carreador utilizado foi o gel de polissacarídeo, que é biocompatível, de baixa toxicidade e apresenta características físicas e químicas adequadas para a função de enxertos.

Objetivos: Avaliar as propriedades do gel de polissacarídeo de melão, como carreador das Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMP) na reparação de defeitos críticos na calvária de ratos.

Métodos: Trinta e seis ratos machos adultos Wistar foram distribuídos em quatro grupos experimentais, um grupo controle positivo e um grupo controle negativo, com seis animais cada grupo. Foi realizado defeito crítico de 11 mm na calvária dos animais sob condições de assepsia e anti-sepsia. Nos animais experimentais foram enxertados: gel+matriz orgânica do osso liofilizado cortical (gen-ox-org®)+proteína morfogenética do osso (genpro®) um grupo com membrana biológica de origem bovina (genderm®) e um grupo sem membrana; gel + osso bovino inorgânico liofilizado esponjoso (gen-ox-inorg®) + proteína morfogenética do osso (genpro®) um grupo com membrana biológica de origem bovina (genderm®) e um grupo sem membrana; o grupo controle positivo utilizou o enxerto com osso orgânico e membrana, sem gel, o grupo controle negativo com confecção do defeito e sacrifício imediato. O sacrifício ocorreu 180 dias após a cirurgia. As cabeças foram fixadas em formaldeído a 10% tamponado. Para obtenção das imagens foi utilizado um aparelho tomógrafo iCATVision (cone-beam 3D), que permitiu, após reconstrução das imagens e tratamento com Photoshop 10.0 CS3, o cálculo das áreas radiolúcidas. Os defeitos residuais foram medidos com paquímetro; a partir da metade do defeito foi realizada secção da calota e utilizado o segmento caudal para análise histológica qualitativa, após serem corados com hematoxilina e eosina. Foi realizado estudo histomorfométrico para avaliar a intensidade da angiogênese.

Resultados: Os grupos que utilizaram o gel+osso bovino inorgânico liofilizado esponjoso (gen-ox-inorg®)+proteína morfogenética do osso (genpro®), o grupo com membrana biológica de origem bovina e o grupo sem membrana foram os que apresentaram menor área radiolúcida, melhor reparação na observação qualitativa histológica, com diferença significativa a 5% comparada ao controle positivo na análise do número de artérias e veias.

Conclusão: Os resultados sugerem que o gel de polissacarídeos, associado ao osso liofilizado inorgânico, pode ser usado como carreador eficiente para a BMP na estimulação da cicatrização óssea.

Descritores: Biopolímeros; Polissacarídeos; Regeneração Óssea; Transplante Ósseo; Ratos.

ABSTRACT

Introduction: Bone morphogenetic proteins (BMPs) have opened up new perspectives in bone reconstruction as they induce bone healing. BMPs need a carrier for their proper transport and release. A biopolymer of polysaccharide was used in the bone graft, which is biocompatible, has low toxicity and presents physical and chemical characteristics suitable for use in bone grafting. **Objectives:** To assess the properties of polysaccharide gel as a carrier of BMP in the healing of severe bone defects on the calvarium of rats. **Method:** Thirty-six male adult Wistar rats were divided into four experimental groups, one positive control group and one negative control group composed of six rats. A severe 11-mm wound was made in the rat skulls under perfect infection control conditions. The experimental groups were divided as follows: Group 1: gel + organic matrix of the cortical lyophilized bone (gen-ox-org®) + BMP(genpro®) but no membrane; Group 2: gel + bovine trabecular inorganic bone (gen-ox-inorg®) + BMP (genpro®) but no membrane; Group 3: gel + organic matrix of the cortical lyophilized bone (gen-ox-org®) + BMP (genpro®) + bovine biologic membrane (genderm®); Group 4: gel + bovine trabecular inorganic bone (gen-ox-inorg®) + BMP (genpro®) + bovine biologic membrane (genderm®). In the positive control group the same organic bone graft was used but without gel, and the animals were put down after 180 days. In the negative control group the wound was made in the rat skulls, but the animals were put down immediately. The rats in the experimental group were put down 180 days after operation. 10% tampon formaldehyde was used to fix the head tissues. The CT scanner iCATVision (cone-beam 3D) was used for obtaining the radiographic images that made possible the measurement of the radiolucent areas after the reconstruction of the images and their treatment with photoshop 10.0 CS3. The residual defects were measured using a pachometer. A section of the skull from the middle of the residual defect and the caudal segment was used for a qualitative histological analysis after staining with hematoxylin and eosin. To assess the intensity of angiogenesis a histomorphometric study was performed. **Results:** Group 4 (gel + bovine trabecular inorganic bone /gen-ox-inorg®) + BMP (genpro®) + bovine biologic membrane (genderm®) and group 2 (bovine trabecular inorganic bone /gen-ox-inorg®) + BMP (genpro®) but no membrane presented the lowest radiolucent area on the radiograph, i.e. the best repair as observed on the qualitative histological study, presenting a 5% significant difference when compared with the positive control when the number of arteries and veins formed was analyzed. **Conclusion:** The results suggest that polysaccharide gel in association with inorganic lyophilized bone can be used as an efficient carrier for the BMP in stimulating bone healing.

Keywords: Biopolymers; Polysaccharides; Bone Regeneration; Bone Transplantation; Rats

INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios aos cirurgiões e pesquisadores, que atuam na área de reabilitação tem sido a reconstrução de perdas ósseas. O objetivo de aumentar a longevidade com qualidade de vida tem despertado a busca por alternativas para reparar e substituir tecido ósseo.¹

A utilização de substâncias que promovem a reparação óssea de forma mais rápida¹⁻⁵ são resultados de pesquisas e estudos iniciados na década de 60 por Urist⁶, e em publicações que se sucederam.⁷⁻⁹

Essas perdas ósseas podem resultar de traumas, processos infecciosos, neoplasias, anomalias de desenvolvimento, doença periodontal, extrações traumáticas, cirurgias ressectivas, doenças osteolíticas, deformidades dentofaciais, pseudo-artrose congênita ou processos tumorais ^{10,11}. Tais perdas em condições normais são reparadas através de processo biológico natural, respeitando os limites de extensão, desde que o agente causador tenha sido eliminado. A extensão e a velocidade desses processos estão na dependência da localização anatômica do agente etiológico, das dimensões da lesão e das características biológicas de cada indivíduo.

A necessidade do suprimento sanguíneo adequado, a formação e a manutenção do coágulo são fatores prementes para desencadear a cascata de eventos inflamatórios que levarão ao reparo de um defeito ósseo. Esta reparação tecidual possui limitações quando o defeito excede o tamanho crítico para a região, idade e espécie a ser tratada. Estas restrições geram dificuldades na resolução de tratamentos na traumatologia e odontologia.^{12,13}

As abordagens convencionais para a resolução de defeitos críticos ósseos incluem o uso de enxertos ósseos autógeno, alógeno ou xenógeno, substitutos ósseos e implante de materiais aloplásticos. Nenhum material se iguala ao osso autógeno como material de enxerto, no entanto seu uso está associado a problemas como limite de volume, custo, morbidade, possibilidade de complicações, aumento do tempo operatório e perda sanguínea.¹⁴

A reconstrução de grandes deficiências esqueléticas representa um problema desafiante. Em geral, os esforços têm sido feitos no sentido de

encontrar um material que promova a reparação nas perdas significativas do arcabouço esquelético facial, além de evitar a reabsorção do osso residual, estimulando e acelerando o processo de reparo deste tecido tão especializado. Para a reconstrução total ou parcial de estruturas ósseas acometidas por lesões extensas, foram desenvolvidas técnicas com o objetivo de diminuir a ocorrência de infecção secundária, favorecer a cicatrização, prevenir a invaginação de tecidos moles para o interior dos defeitos ósseos, favorecer a formação de tecido ósseo, recuperar o contorno anatômico e restaurar sua função. Diferentes métodos são utilizados na tentativa de resolver este problema, sendo dos mais comuns os que envolvem a coleta e implantação de enxertos autólogos e heterólogos, associados ou não aos biomateriais, como nos casos dos polímeros.^{14,15}

Os biomateriais ideais apresentam propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, ou leito receptor, de modo a estimular uma resposta adequada. Atuam de três formas, através da osteogênese, osteoindução e osteocondução, podendo, desta forma, concomitantemente, participar do processo de consolidação do tecido ósseo.^{16,17}

Outra forma de material muito utilizada nas técnicas de enxerto é a técnica da repação tecidual guiada, na qual se utiliza uma membrana de osso cortical bovino, de colágeno ou de tetrafluoretileno, entre outros materiais. Nessa técnica a membrana é chamada de barreira biológica, pois impede mecanicamente a invaginação do tecido conjuntivo ou do epitélio juncional para o interior da cavidade óssea. Na prática cirúrgica, freqüentemente constata-se dificuldade de reparação de defeitos ósseos, dado o rápido crescimento de tecido conjuntivo para o interior dos defeitos. Esse fato impede a formação de tecido ósseo, causando alterações anatômicas e perturbações funcionais, exigindo novos procedimentos operatórios reconstrutivos, que têm na enxertia óssea seu principal método de tratamento.^{11,14}

Assim pode-se afirmar que o objetivo primário da enxertia óssea é o de preencher ou unir o defeito com material osteoindutivo e/ou osteocondutivo.

O sucesso da enxertia depende da participação ativa do enxerto no processo da osteogênese reparativa.

Urist, em 1965, ao implantar matriz óssea desmineralizada no subcutâneo e no músculo de ratos, induziu a formação de osso heterotópico⁶, processo que foi então chamado de osteoindução⁷. Foi postulado então que células-tronco mesenquimais pluripotentes são atraídas por quimiotaxia para o sítio de implantação por algum fator ainda desconhecido e induzem a formação de osso e cartilagem.⁸ Esses fatores foram posteriormente isolados e clonados, sendo então denominados de Proteínas Morfogenéticas Ósseas ou BMP's (do inglês Bone Morphogenetic Proteins)⁹. A descoberta das BMP's por Urist⁶ abriu novas perspectivas nas reconstruções ósseas, tanto na área odontológica quanto na área médica.

Um novo material, de estrutura química polimérica, foi obtido por síntese a partir do melaço de cana-de-açúcar na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina – EECAC-UFRPE. O biopolímero é biocompatível, de baixa toxicidade e apresenta características físicas e químicas adequadas para a utilização em enxertias. O novo material está sendo pesquisado em diferentes formas de implantação, com resposta positiva por parte dos organismos, demonstrando biointegração, característica esperada, com possibilidade de aplicação futura.

O desafio no estudo dos biomateriais é obter um material com características próximas ao tecido vivo, de forma que o organismo passe a reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como agente agressor e estranho. Que o material contribua para a restauração da anatomo-morfologia funcional e estética, e participe ativamente nas etapas dinâmicas da reparação celular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar as propriedades do gel de polissacarídeo associado às Proteínas Ósseas Morfogenéticas e osso liofilizado na reparação de defeitos críticos na calvária de ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, através de tomografia, a área dos defeitos ósseos 180 dias após a cirurgia pelo estudo das imagens radiolúcidas;
- Analisar qualitativamente através da histologia a angiogênese, reabsorção da membrana cortical, reorganização do periósteo e formação do tecido ósseo e tecido integrador;
- Analisar quantitativamente através da histomorfometria artérias e veias presentes no defeito ósseo.

LITERATURA

1 . Necessidade da Utilização dos Enxertos

Apesar de aparentar um estado estático, o osso é um tecido altamente dinâmico e complexo, no qual osteoblastos e osteoclastos, numa harmoniosa cooperação, garantem o equilíbrio durante o crescimento, manutenção e reparação do tecido ósseo. As pesquisas na área da genômica e da proteômica têm ampliado os horizontes sobre a descoberta de fatores de crescimento que controlam ou induzem a osteogênese, possibilitando novas alternativas terapêuticas.

O tratamento de grandes perdas de tecido ósseo¹⁰⁻¹⁷, verificadas principalmente nas altas incidências de traumas em face¹⁸, confere hoje um capítulo desafiador para a odontologia e a medicina. O enxerto autógeno¹⁰⁻¹⁷, realizado em grande escala atualmente, com 450.000 procedimentos realizados em 2000 nos EUA¹⁹, é de alta morbidade, custo e muitas vezes os resultados são imprevisíveis.

Pode-se explicar o interesse pelos morfogenes e seus produtos, como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e seus carreadores, os quais interferem positivamente com o equilíbrio do processo de ossificação, favorecendo a aposição de osso novo. Por esta razão diversas pesquisas têm estudado a utilização das BMP's, naturais ou recombinantes, como elemento terapêutico, pois há uma grande necessidade de avaliar estes materiais quanto à sua citotoxicidade, biocompatibilidade e efeito biológico.

2. Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMP's)

As BMP's surgiram a partir dos trabalhos de LEVANDER em 1938²⁰, LACROIX em 1945²¹ e em 1947²², HEINEN²³ et al. em 1949, que estudaram o comportamento de fragmentos ósseos autólogos vivos implantados em regiões ectópicas, cujos resultados serviram de subsídios para as pesquisas relacionadas aos fatores osteogênicos.

Na década de 1950, a utilização de modelos de estudo mais sofisticados foi possível para se comprovar a existência e ação dos fatores osteogênicos. Consistia em implantação em ante-câmara do olho e de filtros em subcutâneo contendo osso de calvária de rato. Num período compreendendo duas a oito semanas, novo osso era evidenciado nestes locais ectópicos, presumivelmente em resposta à difusão osteoindutora de componente contido na calvária.^{24, 25}

O mecanismo de calcificação nos tecidos extra-ósseos era disputado por diversos pesquisadores no início da década de 60. Numa programada série de pesquisas objetivando testar a teoria da calcificação, em 1965, URIST et al.(Fig 1) realizaram a descoberta, na qual amostras de osso descalcificadas e não tratadas, implantadas em músculo de coelhos e ratos, resultaram na formação ectópica de novo osso e nova cartilagem.⁶

Em contrapartida, apesar de não ter sido Urist⁶ o primeiro a especular sobre a existência da substância responsável pela osteoindução, atribui-se a ele grande parte dos trabalhos iniciais relacionados ao isolamento da proteína óssea morfogenética.

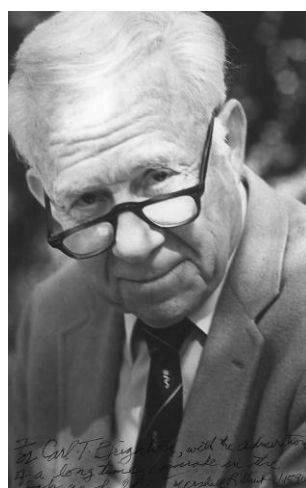


Fig 1. Marshall R. Urist, MD, PhD

Van de Putte e Urist partiram do princípio de que, para haver uma avaliação adequada da capacidade indutora óssea de um implante de

tecido desmineralizado, o enxerto deveria ser inserido no tecido celular subcutâneo ou no tecido muscular, distante do osso ortotópico. Diversas espécies animais foram utilizadas, os implantes tratados com diferentes agentes químicos em concentrações, temperaturas e tempos de exposição variáveis, apresentaram respostas diferentes. Os ossos descalcificados com ácido cítrico e EDTA não apresentavam resposta osteogênica. No entanto, os implantes descalcificados com ácido hidrocloreídrico induziram a osteogênese. Quando o ácido nítrico era utilizado, ocorria intensa reação inflamatória, com rápida desintegração do implante e ausência de formação óssea. Usando o EDTA em baixas concentrações a 4°C em pH neutro, havia limitada formação óssea em ratos e coelhos e ausência de ossificação em porcos.²⁶

No final da década de 60, existia a evidência de que a substância responsável pela indução óssea mantinha íntima relação com o colágeno do osso. Havia incerteza sobre se a propriedade de indução ocorria devido às características químicas ou se a estrutura física do colágeno direcionava, de alguma forma, o mecanismo de diferenciação de células mesenquimais.²⁷ Em 1971 Urist e Strates⁷ nomearam o fator capaz de induzir formação de novo osso ectópico, de "Proteína Morfogenética do Osso".

Em 1984, Urist et al.²⁸ isolaram e purificaram uma proteína de osso bovino desmineralizado, a proteína óssea morfogenética, e comprovaram a sua capacidade osteoindutora com a indução da formação de osso em animais de laboratório e em humanos.

No final da década de 80, com os resultados dos estudos acumulados em 20 anos, verificou-se que não era uma única proteína mas um grupo de proteínas, da matriz óssea, o responsável pela osteoindução.^{29,30} Desde então, mais de 16 BMP's humanas diferentes foram identificadas com o auxílio de técnicas da biologia molecular.^{29,30,31,32,33}

A obtenção das BMP's, o isolamento e purificação foram difíceis, pelo fato da pequena quantidade presente no osso quando comparado com outras proteínas não colagênicas.³⁴ Existem aproximadamente 1-2µg de

BMP's nativas/kg de osso cortical, desta forma são necessárias grandes quantidades de osso para produzir BMP's para experimentos.³⁵

O principal avanço ocorreu em 1988 quando, através de SDS-poliacrilamida gel de eletroforese, um grupo de proteínas de 30kDa de osso bovino foram identificadas e clones recombinantes desenvolvidos, para cada proteína. Foram utilizadas seqüências de aminoácidos de 16, 18 e 30 kDa para realizar varreduras de bibliotecas de DNA complementar (cDNA) bovino. Os resultados da obtenção dos clones recombinantes eram utilizados para a varredura de bibliotecas de cDNA humanas correspondentes. Assim foram obtidas as recombinantes humanas BMP-1, BMP-2A e BMP-3, com suas características bioquímicas e biológicas, além da determinação das suas seqüências de aminoácidos.³⁰

Até o estudo de Ozkaynak e Schnegelsberg³³, nove BMP's foram identificadas, estando oito destas relacionadas entre si. Com exceção da BMP-1, devido à sua seqüência de aminoácidos, as BMP-2 a BMP-9 são classificadas como pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformador beta- TGF- β , derivados das cadeias precursoras polipeptídicas com tamanho que varia entre 396 e 513 aminoácidos³³. Este grupo de fatores de crescimento e diferenciação desempenha um papel importante durante a embriogênese e reparo de tecidos por toda a vida.^{30,31,33,36,37,38,39}

Um estudo de Termaat et al., de 2005, ressaltou a designação das BMP's em BMP-1 a BMP-16 com divisão em vários subgrupos, de acordo com a semelhança estrutural entre as moléculas no interior de cada subfamília.⁴⁰

O estudo realizado em 1996 por RABIE; DAN; SAMMAN⁴¹ foi voltado para identificar as células envolvidas no reparo de enxertos ósseos autógenos de origem intramembranosa e endocondral. Em 18 coelhos da Nova Zelândia, foram realizados 36 defeitos nos crânios. Os defeitos foram preenchidos com enxerto ósseo intramembranoso (IM), enxerto ósseo endocondral (EC) e matriz óssea desmineralizada (DBM) ou a combinação de IM-DBM e EC-DBM. Foi utilizada microscopia óptica e eletrônica na identificação das células após 7 e 14 dias. Nos espécimes utilizando IM pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos foram observados sem estágio

intermediário cartilaginoso; no grupo que utilizou EC, condroblastos e condrócitos estavam presentes. Nos enxertos com DBM e IM-DBM foi encontrado um estágio cartilaginoso. Chegaram à conclusão de que o osso IM reparava por meio de uma ossificação osteogênica enquanto que o osso EC reparava com uma ossificação endocondral, na presença da matriz desmineralizada, e o osso IM induziu um padrão de ossificação endocondral.

A formação de cartilagem e osso induzida pela BMP é um processo complexo e de vários estágios, o qual envolve a ação de diversos fatores de crescimento produzidos localmente, além de hormônios disponíveis sistemicamente.⁴²

Em 1992 Rutherford et al.⁴³ ressaltaram que ainda não era completamente entendido, mas o mecanismo de ação das BMP's compreendia a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e condroblastos com subsequente formação óssea.

As proteínas morfogenéticas ósseas iniciam a condrogênese e osteogênese com grau variado de intensidade. A família das BMP's trabalha em conjunto para regenerar o tecido ósseo. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que uma única BMP recombinante (rhBMP-2) reconstituída com ICBM (matriz óssea colagenosa insolúvel) foi suficiente para reparar defeitos por craniotomia em ratos.⁴⁴

Os estudos de Xiang et al.⁴⁵ demonstraram a neoformação óssea no local da implantação das BMP's, apresentando todas as características de osso normal, com formação de cartilagem e ossificação endocondral.

A BMP atua basicamente de duas formas, provocando quimiotaxia de células indiferenciadas para o local da implantação, e promovendo diferenciação destas células em células responsáveis pela produção de matriz óssea. Condroblastos, derivados de células mesenquimais, secretam componentes da matriz extracelular para formar uma estrutura cartilaginosa. A cartilagem hipertrofiada e a matriz extracelular tornam-se vascularizadas por células hematopoiéticas e endoteliais; osteoblastos e osteoclastos aparecem localmente e a cartilagem é reabsorvida e substituída por osso.

Cheng et al. demonstraram, em células mesenquimais osteoblásticas e progenitoras infectadas pelo adenovírus, mediando a transferência de genes de BMP's, a relativa osteoindução de diferentes BMP's em diversas etapas do processo de diferenciação.⁴⁸ As BMP's-2, 6 e 9 desempenham um papel importante na fase inicial da diferenciação de células progenitoras mesenquimais em pré-osteoblastos, enquanto as demais famílias de BMP's promovem a diferenciação terminal destes pré-osteoblastos em osteoblastos. Estes achados poderiam indicar que a BMP-2, 6 e 9 podem ser mais eficazes numa situação em que estão presentes células pluripotentes, na aplicação de um transplante ósseo autólogo ou recrutamento destas células no tecido muscular adjacente. Nas fraturas com cicatrização sem intercorrência, em que os pré-osteoblastos são predominantes, a maioria das BMP's são adequadas para a promoção da osteogênese. No entanto, a relevância clínica desta cascata, em que diferentes BMP's são importantes em diversos estágios da diferenciação no processo conducente à formação óssea, permanece desconhecida.⁴⁰

3. Utilização de Carreadores na terapia com BMP

A eficiência do material de transporte, chamado carreador, é importante para determinar o sucesso ou fracasso dos enxertos osteoindutores em cirurgias de reconstrução. Entre os fatores que tornam um carreador ideal estão o aumento da exposição dos tecidos do hospedeiro à substância de crescimento e a segurança de uma distribuição uniforme. Deve ser biocompatível, biodegradável e reabsorvido à medida que vai ocorrendo a formação óssea.⁴⁹

O processo de osteoindução *in vivo* ocorre pela oferta gradual de BMP's, assim a utilização de carreadores que ofereçam uma liberação controlada otimiza a ação das BMP's com esta finalidade.⁵⁰

A presença de um carreador vai influenciar tanto o volume de osso formado, quanto diminuir a quantidade de BMP's necessária para a indução de osso nos defeitos.⁴⁹

A cinética de um carreador tem um significativo efeito sobre a rapidez e a eficácia da indução óssea. A função primária desses materiais é o aumento da eficácia das BMP's, impedindo a sua difusão rápida.⁵¹ Com a utilização de um sistema tampão de entrega, menos de 5% da dose de BMP permanece no local de aplicação; por outro lado combinações de BMP's com espuma gelatina, colágeno ou pasta de fosfato de cálcio aumentam a retenção em 15% a 55%.⁵² O carreador propicia uma estabilidade na liberação da matriz osseocondutora das BMP's e, assim, reduz sua quantidade ideal para aplicação.⁵³

Ainda é necessária investigação adicional para determinar o melhor tipo de material carreador na liberação das BMP's nas indicações clínicas. Para o tratamento do reparo das fraturas, a liberação deve ser conjugada com um material que degrade de forma rápida, para atender a nova taxa de formação óssea, evitando que a presença do material comprometa a cicatrização. Para o tratamento das faltas de união e para a fusão espinhal, o carreador deve apresentar uma lenta liberação de BMP's, com suficiente tempo de permanência e promovendo suporte da matriz osseocondutora para que haja infiltração das células osteogênicas e prevenir a invasão dos tecidos moles.⁵¹

Diversos e diferentes materiais carreadores têm sido usados em experimentos animais. Estes incluem matriz óssea colágena desmineralizada,^{54,55,56,57} produtos de colágeno,^{51,55,58} polímeros reabsorvíveis como os poliláticos^{59,60} e poliláticos-co-glicólicos,^{61,62,63,64,65} hidrogéis gelatinosos^{66,67} fosfatos de cálcio cerâmicos como os fosfatos tricálcicos^{68,69} e hidroxiapatitas,^{70,71} cimento fosfato de cálcio reabsorvíveis⁷² e combinações destes materiais.^{73,74,75,76}

4. Defeito de tamanho crítico em calvária

Como a capacidade regenerativa da calvária é baixa, este tem sido um dos locais de escolha para pesquisas com agentes que estimulem a reparação⁷⁷. Assim, diversos trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de observar a resposta biológica e poder indutor da combinação de enxertos em defeitos ósseos induzidos na calvária de ratos.⁷⁸⁻⁸³

Defeito em tecido ósseo é um desafio para diversas áreas da Medicina e da Odontologia, principalmente nas especialidades de ortopedia, neurocirurgia, cirurgia plástica, cirurgia buco-maxilo-facial, periodontia, prótese e implantodontia. O reparo de defeitos é um bom modelo para o estudo da regeneração do osso e possui grande semelhança com o reparo primário de fraturas. Ao contrário destas últimas, os defeitos são menos sujeitos a fatores mecânicos e a obstruções do aporte sangüíneo. Este modelo tem sido utilizado em muitos experimentos clássicos que analisam a influência de medidas cirúrgicas e farmacológicas para melhorar a regeneração óssea.⁸⁴

Conforme afirmativas de Schmitz e Hollinger, um defeito ósseo experimental deve ser tão grande que não ocorra reparo espontâneo, pois só nesta situação o potencial osteogênico do implante, enxerto ou medicamento pode ser considerado real.⁸⁵

Instituiu-se o conceito de defeito ósseo de tamanho crítico para minimizar diferenças relacionadas à idade, espécie e sítio anatômico em animais experimentais, padronizando-se os defeitos para possibilitar a comparação dos resultados dos vários estudos, além de se poder considerar sem erro o potencial osteogênico do material em teste.⁸⁶

Defeitos críticos utilizados em diversos experimentos são de 8 mm^{78,81,82,83} e de 5 mm⁸⁰, estes últimos baseados em URIST⁸⁷. Em crânio de ratos defeitos de 0,8 cm de diâmetro são incapazes de reparo espontâneo.⁸⁷ No entanto existem

estudos com defeitos maiores, com 9 mm de diâmetro⁸⁸. Tamanhos de defeitos críticos são bem caracterizados na região craniomandibulofacial em várias espécies animais.^{85,89,90,91}

5. Reparação Óssea Guiada

Os estudos acerca da osteopromoção iniciaram-se com o trabalho de Murray, Holden, Roachlau⁹² (1957), que protegeram o coágulo sanguíneo com um envoltório plástico fenestrado, que foi preenchido de osso de fêmur, ílio e coluna espinhal. Concluíram o estudo afirmando que, para o crescimento do tecido ósseo, eram necessários três fatores: presença de coágulo sanguíneo, osteoblastos preservados e contato com tecido vivo.

Desde então, na década de 50, o selamento físico de um sítio anatômico através de barreira mecânica com a função de excluir células não desejáveis da área da ferida e favorecer a proliferação de células específicas para a regeneração tecidual tem sido utilizado na cirurgia reconstrutiva e regeneração neural. Foram utilizados filtros semipermeáveis de acetato de celulose (Millipore) para a regeneração de feixes nervosos e tendões.^{93,94}

A viabilidade da Regeneração Tecidual Guiada (RTG), na restauração de lesões ósseas perenes, na espinha dorsal e na porção cortical de ossos longos, foi demonstrada por Hurley⁹⁵ e colaboradores em 1959, com uma barreira física de filtros semipermeáveis de acetato de celulose (Millipore). Um estudo de Linghorne⁹⁶ de 1960 mostrou que o tratamento de lesões segmentares de 15 mm em fíbula de cães, cobertas com tubos de polietileno e preenchidas com coágulo sanguíneo e enxerto ósseo medular, resultou na reparação completa da lesão, enquanto no lado controle ocorreu apenas fibrose. Boyne⁹⁷, em 1964, obteve regeneração de osso alveolar na região buco-facial com a RTG.

O princípio da Regeneração Tecidual Guiada (RTG) é utilizar uma barreira física para criar um ambiente adequado, protegido da invasão de células. Isolar a área de células menos diferenciadas e proliferativas dos tecidos vizinhos, principalmente fibroblastos e células epiteliais, promovendo a proliferação de células originariamente características da região para a regeneração do tecido natural da área.⁹⁸

A partir dos trabalhos de Nyman et al.⁹⁹ (1982) e Dahlin et al.¹⁰⁰ (1989) foram definidos os termos RTG, para o tratamento de defeitos periodontais, e ROG (Regeneração Óssea Guiada) ou Osteopromoção, para defeitos ósseos não periodontais.

Uma variedade de experimentos em modelos animais mostrou o sucesso na ROG, tendo sido observado reparo completo de defeitos de tamanho crítico em mandíbulas de ratos¹⁰¹, bem como em calvária de ratos¹⁰²; apicectomias em macacos¹⁰³; em alvéolos após exodontias; na correção de rebordos ou defeitos residuais; em defeitos do tipo deiscência, produzidos no ato da instalação de implantes dentais e na recuperação de implantes afetados por periimplantite.¹⁰⁴

A neoformação óssea se desenvolve por meio do periósteo e de células derivadas da medula óssea que apresentam potencial osteogênico. Com a utilização de membranas há facilitação na seleção das células com potencial osteogênico da população celular dos canais haversianos e de Volkman e, principalmente, da medula óssea e do endósteo. Desta forma, o periósteo é excluído porque fica readaptado na superfície externa da membrana.¹⁰⁵

Conforme Buser, Dahlin, Schenk (1994), a membrana possui características ideais proporcionando: permeabilidade que permite a difusão de plasma e nutrientes, mas não a passagem de células; biocompatibilidade; prevenção do colapso do espaço necessário para a formação óssea, funcionando como suporte físico ao tecido mole circundante; criar e manter um espaço preenchido com coágulo sanguíneo no qual células osteogênicas possam migrar; proteger a delicada rede

vascular durante a organização do coágulo; excluir células não osteogênicas e prevenir a formação da cicatriz tecidual.¹⁰⁵

Schimtz et al., em 1990, através da análise por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, observaram reparo de defeitos ósseos na calvária de ratos com diâmetro de 3, 4 e 8 mm. Relataram que apenas os defeitos de 3 e 4 mm regeneraram, apresentando maior formação óssea. Os defeitos de 8 mm apresentaram formação óssea apenas na periferia da lesão, enquanto na região central formou-se uma união não óssea de tecido conjuntivo fibroso, possivelmente em virtude da carência de fatores ósseos de crescimento e diferenciação, não havendo estímulo à diferenciação e maturação de células para produzir e calcificar a matriz óssea.¹⁰⁶

A osteopromoção foi utilizada com sucesso para o aumento da quantidade de tecido ósseo na calvária de ratos. Os autores utilizaram uma membrana rígida em forma de cúpula, com 5 a 8 mm de diâmetro na calvária de ratos, criando um espaço para a migração de células osteogênicas oriundas da calvária através do coágulo mantido em posição. A análise histológica chegou a comprovar 80% de neoformação óssea em termos volumétricos. Foi observado que a quantidade de osso neoformado dependeu da qualidade da membrana, tipo, porosidade, rigidez e o tempo de reparo. Este importante estudo demonstrou que a osteopromoção pode ser um fator de grande valia para a cirurgia reconstrutiva¹⁰⁷, o que foi confirmado posteriormente num estudo com coelhos.¹⁰⁸

Hodiernamente, as bases da RTG e da Osteopromoção/RGO baseiam-se na utilização de duas formas de barreiras, as absorvíveis e as não absorvíveis. A indicação de que classe de membrana utilizar está diretamente ligada ao tipo de defeito escolhido, à relação custo-benefício e à disponibilidade ou interesse do paciente em fazer a cirurgia de reentrada para a remoção da membrana não absorvível.

Trabalhos científicos utilizando modelos em animais de laboratório e em humanos têm sido amplamente relatados na literatura com sucesso na RGO.¹⁰⁹⁻¹¹² Estudos comprovaram que a utilização de enxertos ósseos para criação e manutenção de espaço tende a melhorar os resultados na ROG.

Estes estudos ressaltaram uma dificuldade marcante, quando da utilização de membranas não absorvíveis, decorrente da alta incidência de deiscência, exposição da membrana e/ou remoção prematura da mesma, causando impacto negativo na quantidade de osso regenerado pela ROG.¹¹³⁻¹¹⁸

Em um estudo para avaliar a estrutura de membrana composta por colágeno, fabricada no Brasil, concluiu-se, através da análise microestrutural, que a presença de poros compatíveis com os canais de Harvers e Volkman conferiu a qualidade de ser biocompatível e biodegradável. A membrana favoreceu o reparo ósseo por ter permanecido íntegra por tempo suficiente para a reorganização do coágulo e a osteopromoção, com a formação de novo osso a partir das bordas do defeito, além de ter exibido propriedades de osteocondução, favorecendo a neoformação óssea nas suas superfícies.⁹¹

6. **Gel de Biopolímero**

A partir de 1990 na Estação Experimental de Cana de Açúcar de Carpina – Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, foram iniciados os estudos de um produto flocoso colhido em tanques de fermentação de álcool. Dessas formações, foram isoladas bactérias, classificadas como Zoogloea sp no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. A partir das bactérias isoladas, foram obtidas, de forma sistemática, membranas, quando as colônias eram submetidas a um processo controlado em diversos meios de cultura obtidos a partir de produtos derivados da cana-de-açúcar.

O estudo sistemático da síntese do biopolímero levou à produção de membranas com características físicas como flexibilidade e resistência à ruptura. Em 2000 foi determinada a composição química deste biopolímero, não existindo percentuais de resíduos desconhecidos na sua estrutura química, encerrando uma composição centesimal absoluta de monômeros orgânicos biocompatíveis, não desenvolvendo nenhuma reação de

incompatibilidade biológica. O biopolímero encerra na sua composição centesimal: Glicose 87,57; Xilose 8,58; Ribose 1,68; Ácido Glucurônico 0,83; Manose 0,82; Arabinose 0,37; Galactose 0,13; Fucose 0,01; Ramnose 0,01, caracterizando-o assim como um polissacarídeo com diferentes bases monoméricas. O referido estudo resultou na definição de uma pureza absoluta do exopolissacarídeo, constituído apenas de compostos orgânicos biocompatíveis.¹¹⁹

Em 2002, já com uma produção sistemática estabelecida, foram iniciados os primeiros ensaios clínicos controlados na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFRPE. A observação consistiu do tratamento de feridas acidentais em cães com as membranas do biopolímero. O tratamento resultou em granulação precoce das feridas e epitelização no quinto dia, demonstrando aceleração do processo cicatricial e controle da infecção com efeito bacteriostático e bactericida.¹²⁰

Em 2003 foram divulgados os estudos da determinação da cinética de produção do exopolissacarídeo a partir do melaço da cana-de-açúcar.¹²¹

No Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) - do Departamento de Cirurgia da UFPE, no Lika e no Departamento de Ciências Farmacêuticas, foram utilizados, em diferentes experimentos¹²²⁻¹²⁹, nos quais se definiram sua biocompatibilidade e sua citotoxicidade, testes indispensáveis para avaliar a aplicabilidade biológica e experimental em diferentes subáreas da cirurgia, como cirurgia geral¹²², urologia¹²³⁻¹²⁷, cirurgia buco-maxilo-facial¹²⁸⁻¹²⁹, traumatologia¹³⁰, otorrinolaringologia¹³¹ e cirurgia cardiovascular¹³², entre outras.

Em estudos para comprovação da citotoxicidade *in vitro*, em testes comparativos com materiais utilizados em próteses cirúrgicas, o biopolímero não apresentou reação citotóxica. Os resultados foram semelhantes aos produtos de última geração disponíveis no mercado para aplicação clínica. Foi demonstrado que a purificação deste biopolímero produzia tecido homogêneo, estável e de elevada histocompatibilidade. Neste ensaio a

viabilidade das células expostas às membranas de e-PTFE foi de 91,2%, enquanto a das expostas ao biopolímero foi de 95,3%.¹³⁰

As membranas de biopolímero de cana-de-açúcar foram também empregadas na reconstrução ureteral em cães, comprovando a sua capacidade de substituir tecidos biológicos com boa tolerabilidade e pequeno grau de reação inflamatória.^{123,127}

A membrana de biopolímero de cana-de-açúcar empregada como enxerto livre em miringoplastias em *Chinchilla laniger* apresentou uma resposta semelhante à dos enxertos de fáscia autóloga.¹³¹

Em estudo recente, com base nos resultados obtidos com o modelo experimental utilizado, durante o período de observação de 180 dias, concluiu-se que a membrana do biopolímero de cana-de-açúcar constitui-se em um substituto arterial adequado quando utilizado sob forma de remendos em artérias femorais de cães.¹³²

Em todos os estudos, observacional e analítico em ratos, coelhos e cães por períodos de três meses a 18 meses, acerca da biocompatibilidade, o biopolímero tanto na apresentação de membranas, fios de sutura como a de gel apresentou biointegração aos tecidos.^{122-129, 131,132}

As amostras do biopolímero para os ensaios clínicos são produzidas e tratadas sob controle de qualidade e de boa prática de produção, acondicionadas em filme de polipropileno ou acetato de poliéster e na apresentação de gel em seringas para aplicação única. As membranas e fios de sutura são mantidos hidratados em solução de álcool isopropílico a 70%. Os modelos de utilidades são esterilizados em irradiação gama.

Na área de bioquímica, com vistas à produção de bio-sensores, as membranas do polissacarídeo foram utilizadas para a fixação de enzimas.^{133,134}

Entre os principais produtos já testados e em desenvolvimento pode-se ressaltar:

a) Membranas contínuas para correção de defeitos cardiovasculares, tratamento de perfurações timpânicas, miringoplastia.^{127,131,135}

b) Membranas micro perfuradas para correção de hérnias e defeitos na cavidade peritoneal.¹³⁶

c) Gel para a suspensão e condutor na aplicação de células-tronco. Como suporte para a liberação controlada de medicamentos e como biomaterial de preenchimento na confecção de válvulas para o tratamento da incontinência urinária, do refluxo vésico-ureteral.^{123,126, 133,137}

d) Fios de sutura confeccionados a partir do biopolímero estão sendo testados em diferentes aplicações cirúrgicas.¹²⁹

e) Novos projetos, como em engenharia de tecidos, estão em desenvolvimento. As membranas e o gel estão sendo utilizados como condutores de células, em cultura e em co-cultura com células-tronco, para reimplante na reconstrução de tecidos e órgãos, como urotélio na reconstrução de bexiga, tecido ósseo, epitélio estratificado e tecido nervoso.¹²⁶

A produção de membranas, o gel e os respectivos modelos de utilidades estão patenteados pela UFPE, IP0206132-5, IP0301912-8.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Considerações Éticas

Este estudo seguiu os princípios que regem o Código de Ética Experimental e as Leis de proteção dos animais, especialmente a Lei nº 9.605 – art. 32 e o Decreto nº 3.179 – art. 17 de 21/09/1999, que tratam da questão do uso de animais para fins científicos. Portanto foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Com base nesses critérios de avaliação e julgamento, a Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, emitiu parecer favorável através do Ofício nº 01/06 em 13 de fevereiro de 2006. (Anexo 2)

2. População e Local do Estudo

Para a realização deste estudo, foram utilizados 36 (trinta e seis) ratos Wistar adultos, com peso médio de 311 gramas e provenientes do biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE. Cada grupo foi composto por 6 (seis) animais, em um total de seis grupos; quatro grupos experimentais, um grupo controle positivo e um grupo controle negativo. Os procedimentos cirúrgicos, manutenção dos animais e sacrifício foram realizados no Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UFPE. As imagens tomográficas foram obtidas na Clínica de Radiologia Boris Berenstein. As preparações histológicas e a histomorfometria foram feitas no Laboratório do Curso de Mestrado em Anatomia Patológica do Departamento de Anatomia (Setor de Morfologia Aplicada) do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. A análise histológica foi realizada no Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Especialização em Patologia Bucal do Curso de Odontologia da UFPE.

3. Tipo do Estudo

Trata-se de um estudo analítico, experimental, prospectivo.

4. Constituição dos Grupos

Grupo 1 (G 1): GEL + Proteína Morfogenética do Osso/BMP (Genpro®) + Matriz orgânica do Osso Liofilizado Cortical (Gen-ox-org®) 180 dias;

Grupo 2 (G 2): GEL + Proteína Morfogenética do Osso/BMP (Genpro®) + Osso Bovino Inorgânico Liofilizado Esponjoso (Gen-ox-inorg®) 180 dias ;

Grupo 3 (G 3): GEL + Proteína Morfogenética do Osso/BMP (Genpro®) + Matriz orgânica do Osso Liofilizado Cortical (Gen-ox-org®) + Membrana Biológica de Origem Bovina (GenDerm®) 180 dias;

Grupo 4 (G 4): GEL + Proteína Morfogenética do Osso/BMP (Genpro®) + Osso Bovino Inorgânico Liofilizado Esponjoso (Gen-ox-inorg®) + Membrana Biológica de Origem Bovina (GenDerm®) 180 dias;

Grupo Controle Positivo (G 5): Proteína Morfogenética do Osso/BMP (Genpro®) + Matriz orgânica do Osso Liofilizado Cortical (Gen-ox-org®) + Membrana Biológica de Origem Bovina (GenDerm®) 180 dias;

Grupo Controle Negativo (G 6): Confeção do defeito, com sacrifício imediato.

5. Procedimentos

5.1 **Ambiente**

Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do NCE, com refrigeração constante, mantidos com luz programada a cada doze horas, alimentados com ração sólida (Labina®) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

5.2 **Procedimento Cirúrgico**

Os animais foram pesados, submetidos a anestesia geral por meio de injeção por via intraperitoneal de Hidrato de Cloral a 10% (1mL = 100 mg - Farmácia de Manipulação ARTFARMA), na dose de 0,4 mL/100 g de peso. A indicação do anestésico teve como base a manutenção da perfusão tecidual. Na seqüência, realizava-se antissepsia com polivinilpirrolidona iodada e tricotomia do campo operatório, região craniana dos animais ,área a ser incisada. Repetia-se a antissepsia da pele com polivinilpirrolidona iodada, em seguida os animais eram colocados sobre a mesa cirúrgica e cobertos com campos cirúrgicos estéreis. Era infiltrada uma solução de anestésico local de Cloridrato de Lidocaína 2% com vasoconstrictor 1:200.000 de Epinefrina, de 1(um) mL da solução, Astra®. Com o auxílio de bisturi Barder-Parker nº 3 montado com lâmina nº 15, era realizada incisão elíptica sobre as porções anteriores do crânio envolvendo a pele, fáscia muscular e periósteo (Fig 2).



Fig. 2. Incisão elíptica sobre as porções anteriores do crânio envolvendo a pele, fáscia muscular e periósteo

O periósteo foi descolado com um esculpador Hollembach, os tecidos foram afastados lateralmente, expondo o plano ósseo. Utilizando-se uma ponta reta (Dabi Atlante) montada em micro-motor (Vector) e uma broca trefina de 11 mm de diâmetro (Fig 3) era delimitada a área para a realização da ostectomia. Em seguida, com uma broca esférica Carbide® nº 0,5, era realizada a complementação da ostectomia, sempre sob irrigação externa abundante por controle térmico com soro fisiológico 0,9% (Drogasil) (Fig 4 e 5).



Fig. 3. Broca trefina de 11 mm para demarcação do defeito



Fig. 4. Broca esférica Carbide® nº 0,5 durante a complementação da ostectomia



Fig. 5. Preservação do seio sagital após complementação da osteotomia

Era removida a porção da calota craniana(ostectomia) com preservação do seio sagital, com um instrumental odontológico Hollembach e cureta alveolar (Fig. 6a e 6b). As cavidades ósseas tinham, aproximadamente, 11 mm de diâmetro e a dura-máter era descolada da calota, evitando sua remoção (Fig. 7).



6a



6b

Fig. 6. Remoção da porção da calota craniana(ostectomia) com 11 mm de diâmetro (a), com um instrumental Hollembach e cureta alveolar (b).

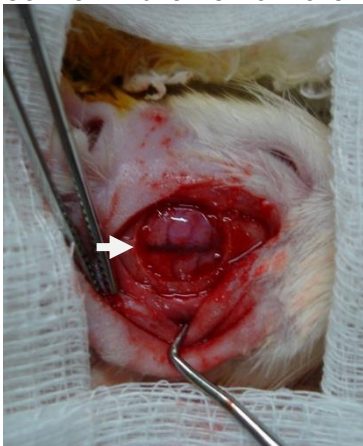


Fig. 7. A dura-máter era descolada da calota evitando sua remoção; visão do seio sagital.

Os enxertos eram pesados em uma balança digital BIOPRECISA®, modelo JA3003N, seguindo a seguinte constituição conforme determinação do fabricante: enxertos liofilizados orgânico ou inorgânico (Empresa Baumer S/A) 77µg; proteína óssea morfogenética (BMP)(Empresa Baumer S/A) 8 µg e gel de polissacarídeo 535 µg. Em seguida, o defeito era preenchido com o enxerto, utilizando-se uma cureta alveolar (Fig. 8a e 8b) e coberto com membrana biológica bovina(Empresa Baumer S/A) previamente hidratadas com solução salina a 0,9% (Drogasil). (Fig. 9)

A pele era suturada com fio de poligalactina - Vycril® 6-0 (Ethicon – Johnson&Johnson, New Brunswick, New Jersey), em pontos separados. Antibioticoterapia profilática foi realizada 30 (trinta) minutos antes do ato operatório e 6 horas após o início da cirurgia, com cefalotina sódica correspondente a 1 g de base, carbonato ácido de sódio 30 mg, diluído para 5 mL com água para injeção(EUROFARMA®).

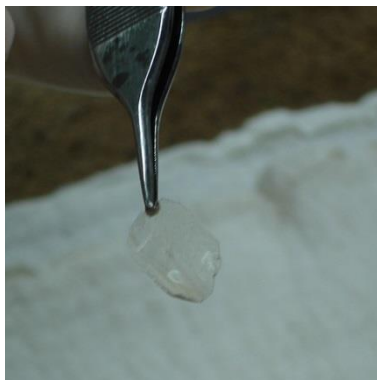


8a

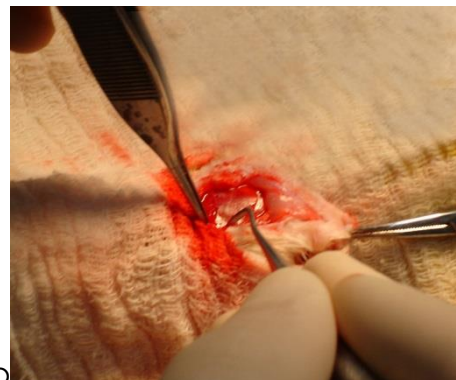


8b

Fig. 8. Defeito crítico preenchido com o material de enxerto contendo osso orgânico (a) e inorgânico (b)



9a



9b

Fig. 9. Maleabilidade da membrana biológica de origem bovina após hidratação(a), aplicação e adaptação(b)

Realizada a cirurgia os animais eram alojados em gaiolas individuais por um período de sete primeiros dias, quando foram redistribuídos, em número de 3 (três) por gaiola, onde permaneceram por todo o período dos experimentos.

5.3 Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados 180 (cento e oitenta) dias após o procedimento cirúrgico por meio de administração de dose letal de pentobarbital sódico, por via intraperitoneal.

5.4 Obtenção da região de interesse ao estudo

Após o sacrifício, os animais eram submetidos à decapitação através de tesouras cirúrgicas do tipo Mayo e lâmina de bisturi nº 22 montada em cabo nº 4. Realizou-se cuidadosamente a dissecação por planos teciduais, utilizando-se tesouras tipo Iris, pinça de Mead e bisturi cabo nº 3 e lâminas nº 15. A pele era separada do tecido subjacente (Fig. 10a e 10b) e em seguida dissecado o plano muscular do tecido ósseo. Nesse procedimento era preservado o pericrânio, visando as estruturas intactas na região do enxerto. Os crânios foram fixados em formaldeído a 10%, tamponado com fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico, numa proporção de 6,5 e 4,0 gramas, respectivamente, para um litro da solução, com pH aproximadamente em torno de 7,0.



Fig. 10. Visão lateral do crânio após dissecado (a), defeito crítico com preservação do perióstio (b)

6. Imaginologia do Estudo

As imagens foram obtidas com um aparelho tomógrafo iCATVision (cone-beam 3D), que permitiu a reconstrução das áreas de enxerto.

As imagens tomográficas foram obtidas em conjunto por grupos. Os crânios foram fixados em depressões em uma placa de isopor e acondicionados em reservatórios plásticos tipo Tupperware®, permitindo posicioná-los uniformemente em um plano.

Para tratamento das imagens, permitindo movimentá-las em todos os sentidos, corrigindo a posição, e realizar a medição das áreas de interesse, foram utilizados os programas:

1. iCAT Vision 1.6.2
2. Photoshop 10.0 CS3
3. Sistema operacional: Windows XP 32 bits

Foi utilizado o programa iCATVision da empresa Imaging Sciences International; após padronizada a área do enxerto, utilizou-se a escala das dimensões que o programa forneceu.

Para o cálculo da área em questão, a imagem foi salva no formato jpg em uma resolução padronizada de 2680x2680 pixels.

Foi seguida a seguinte sequência que permitiu obter as imagens desejadas para quantificar a formação óssea, dentro da área radiolúcida encontrada:

1. Em primeiro lugar, executou-se o programa iCATVision e o grupo desejado foi selecionado (Fig. 11):

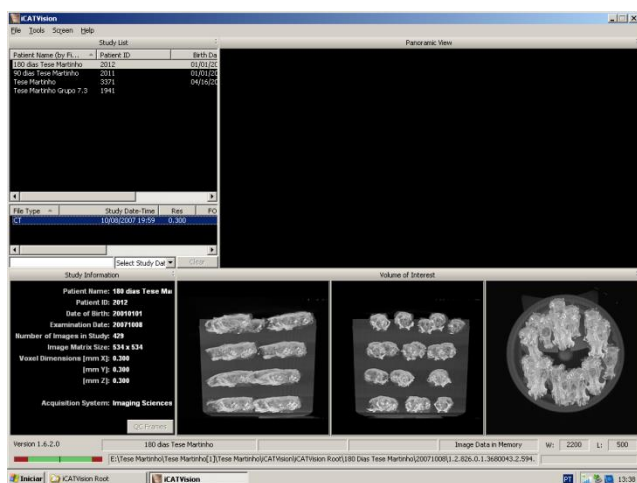


Fig. 11. Execução do programa iCATVision

e seleção do grupo

2. Após a seleção do grupo, foi utilizado o modo de visualizar as imagens como radiografia (Fig. 12):

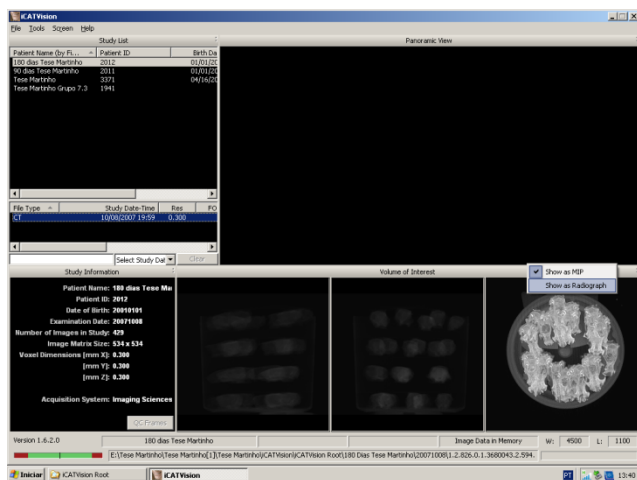


Fig. 12. Seleção da opção de visualizar as

imagens como radiografia

3. O modo de visão foi selecionado para se observar os três planos das imagens e selecionar o tamanho da imagem dos cortes para 2.10 mm em todos os planos (planos: vermelho axial, verde – sagital, azul coronal); foi utilizado o plano axial para aferir a região relacionada ao enxerto (Fig. 13 e Fig. 14).

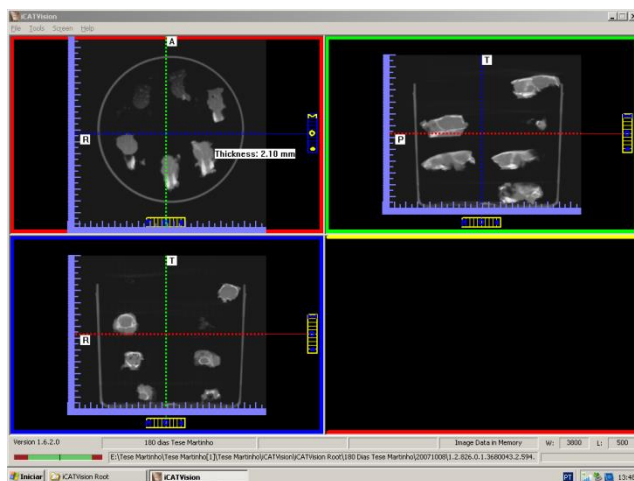


Fig. 13. Visualização dos três planos das imagens

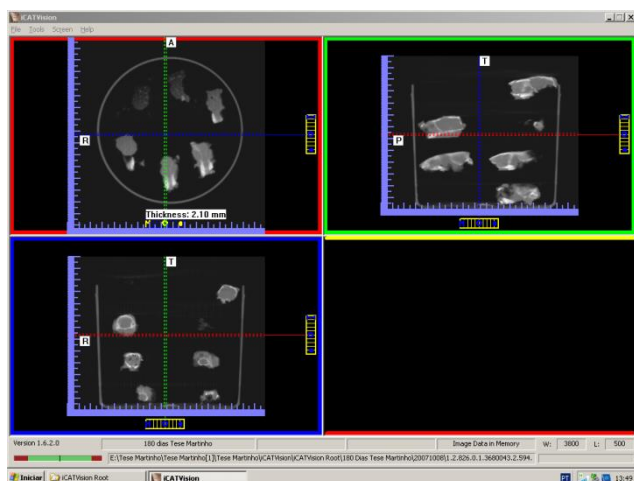


Fig. 14. Seleção do tamanho da imagem dos cortes para 2.10 mm

4. As imagens foram rotacionadas para melhor visualização do plano desejado para aferir a região da calota craniana onde não houve atuação do enxerto (Fig. 15):

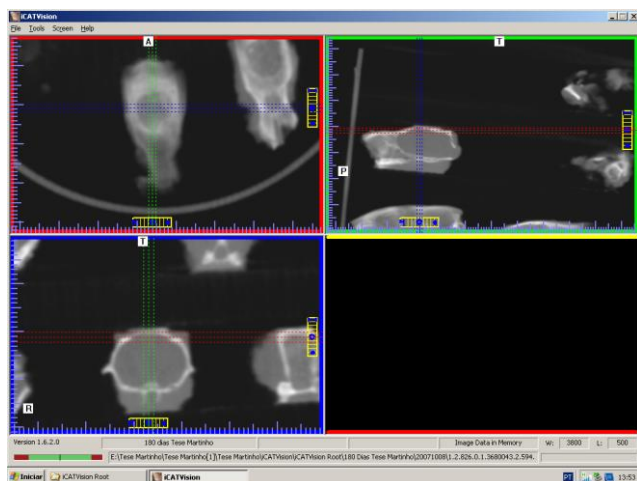


Fig. 15. Utilização das ferramentas que permitiram a rotação das imagens

5. Após ajuste da melhor visualização da área do enxerto, foi criada uma legenda em unidades de milímetros para determinar a escala da imagem, com o botão direito do mouse para abrir o menu e selecionar "Distance", com o objetivo de criar uma medida padrão de 6 mm (Fig. 16).

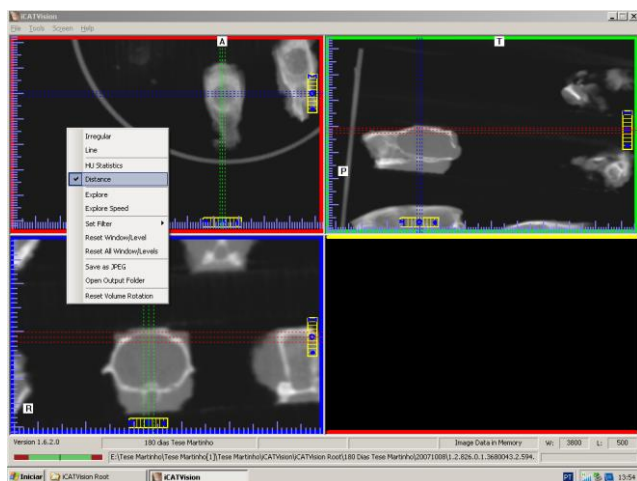


Fig. 16. Criação de uma legenda em unidades de milímetros para determinar a escala da imagem

6. Foi traçada uma linha reta até o valor de 6 mm que serviu de padrão para medição das áreas radiolúcidas (Fig. 17):

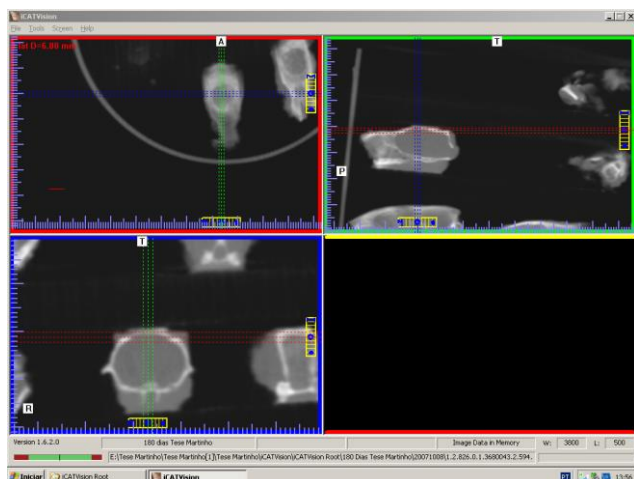


Fig. 17. Traçada a linha com 6 mm, padrão para medição das áreas

7. Foram exportadas as imagens no formato jpg, na resolução padronizada de 2680x2680 pixels (Fig. 18).

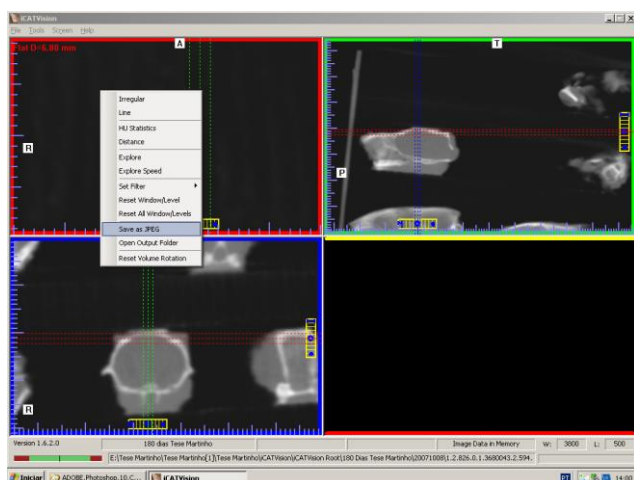


Fig. 18. Salvas as imagens selecionadas no formato jpg

8. Foi utilizado o programa Photoshop CS3 para abrir as imagens salvas e deixar a região da calota craniana em evidência (Fig. 19).

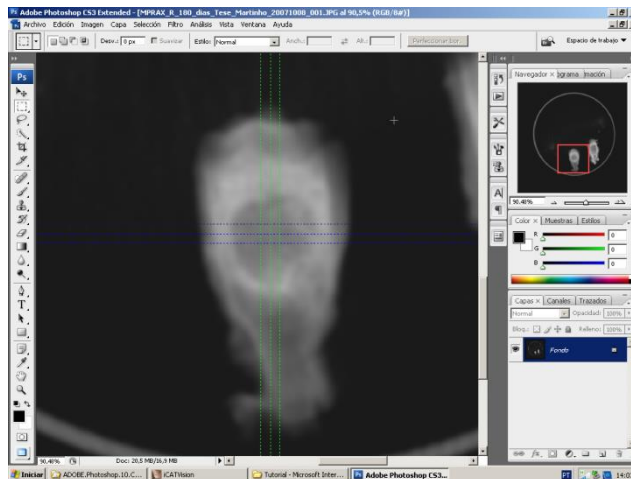


Fig. 19 Evidenciação das imagens da calota com o programa Photoshop CS3

9. Pixels foram transformados em milímetros, calculando-se em número de pixels o valor da linha traçada com 6 mm. O primeiro procedimento foi marcar a medida da imagem, com a linha em milímetros. Foi feito indo ao menu análise, selecionado-se “configurar escala de medida” e em seguida “a medida” (Fig. 20).

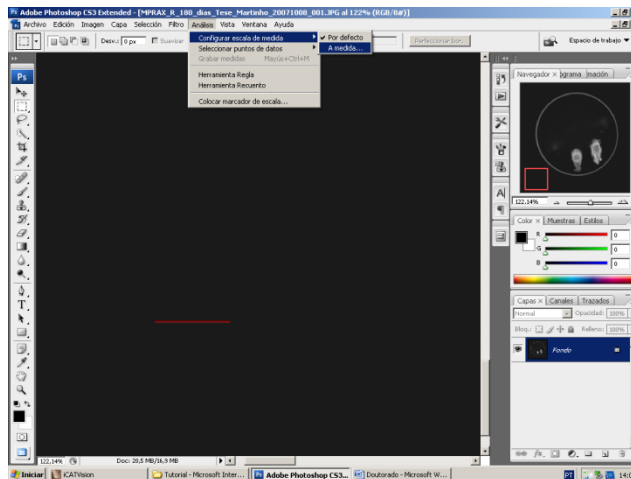


Fig. 20. Marcação da linha de 6 mm para obter o número de pixels

10. Esta linha foi traçada para que pudesse utilizar ferramenta que já tinha aferição em certa parte da imagem, no caso a régua de 6,0 mm pré-

determinada no iCATVision. Então foi selecionada essa região com a ferramenta de aferição (Fig. 21):

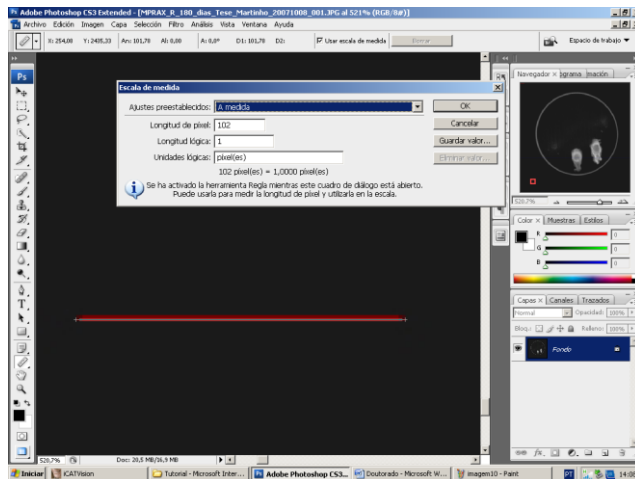


Fig. 21. Utilização da escala de medidas com valores conhecidos

11. Foi digitado o número e unidade de medida correspondente aos pixels da imagem (no caso, 102 pixels correspondem a 6 milímetros) (Fig. 22).

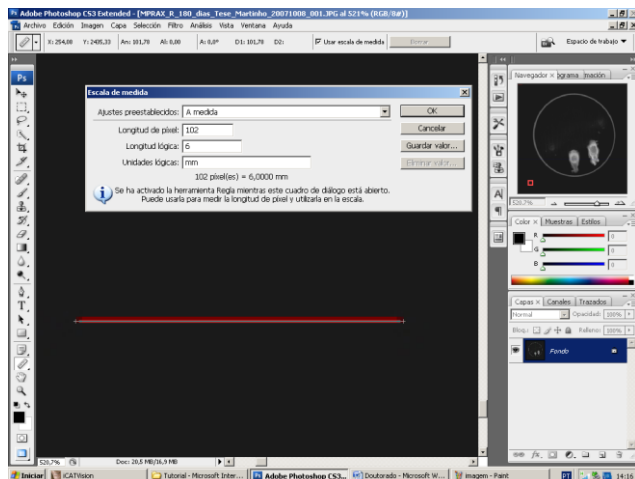


Fig. 22. Em uma área de 6 mm foi calculado o valor de 102 pixels

12. Padronização da escala para utilização nas imagens subseqüentes, chamada de "escala enxerto" (Fig. 23):

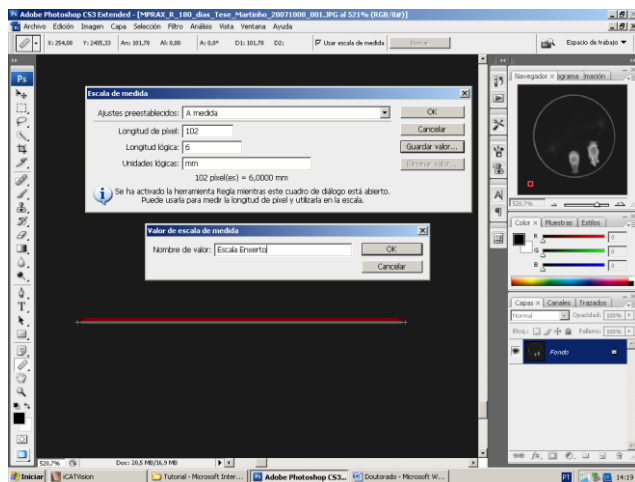


Fig. 23. Foram padronizados os valores em pixels que foram usados nos passos seguintes

13. Foi utilizada a ferramenta de seleção rápida do Photoshop CS3 para realizar aferição da área da calota craniana radiolúcida (Fig. 24):

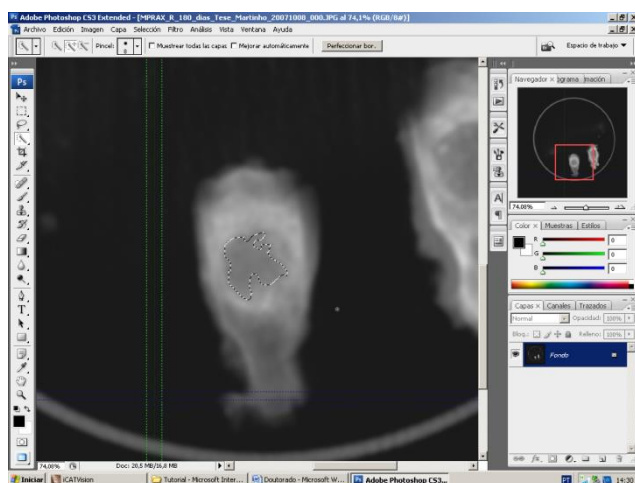


Fig. 24. Seleção da área radiolúcida

14. Após a seleção, foi utilizada a ferramenta “degradê” para deixar a área radiolúcida em evidência (Fig. 25):

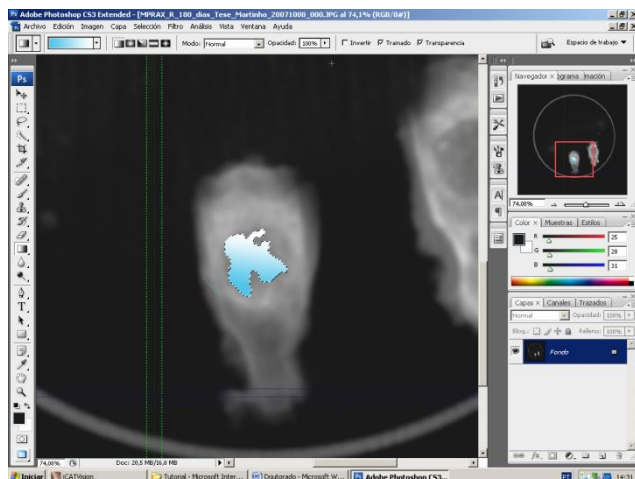


Fig. 25. Destaque da área radiolúcida

15. Com a região selecionada, novamente foi acessado o menu “análise” e em seguida “gravar medidas” (Fig. 26):

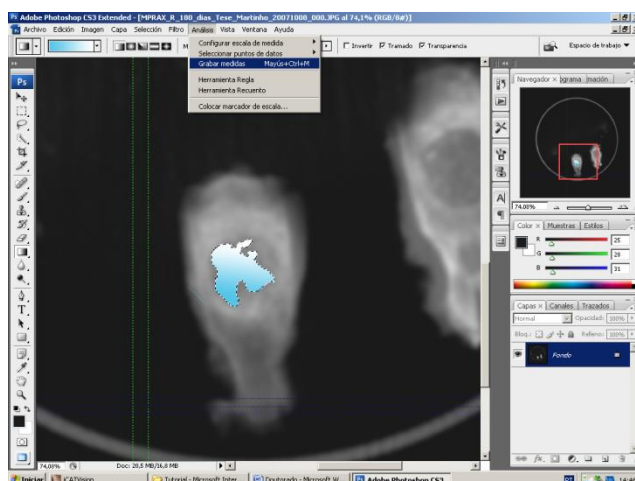


Fig. 26. Gravação das medidas da area radiolúcida

16. Foram anotados os valores das áreas para análise após o surgimento da caixa de diálogo, que mostrou a área da região de interesse, em milímetros quadrados, (Fig. 27).

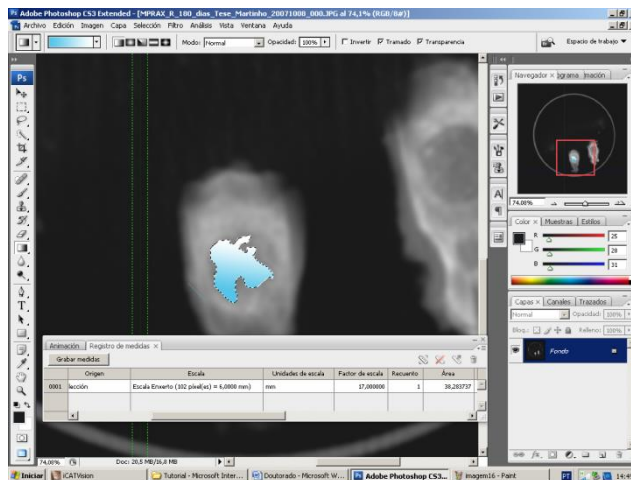


Fig. 27. Caixa de diálogo com o resultado da área de interesse

7. Processamento histológico

O processo de descalcificação consiste na remoção de sais de cálcio depositados nos tecidos orgânicos a fim de facilitar o seu corte e coloração.

138

Por meio do método descrito por Aires et al.¹³⁸ em 2005, o agente descalcificador é composto por uma solução de ácido clorídrico e ácido fórmico, ambos a 8% (solução comercial), partes iguais. Os crânios foram imersos na solução e permaneceram em temperatura ambiente por 24 horas.

Após a descalcificação, os crânios foram examinados e realizada a macroscopia pós-descalcificação, nesta fase utilizando um paquímetro Vonder®. Os defeitos foram medidos no sentido crânio-caudal (Fig. 28) e as peças cortadas no ponto médio do defeito encontrado, com lâminas de micrótomos (Fig. 29).



Fig. 28. Medição dos defeitos críticos

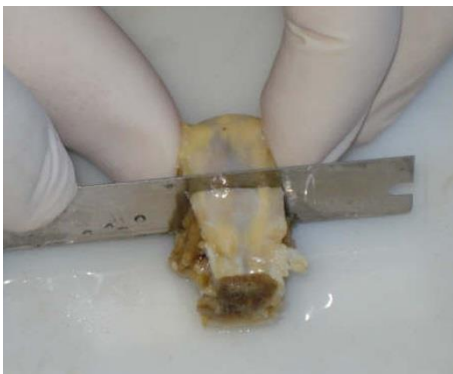


Fig. 29. Corte da calvária no ponto médio do defeito

Desta forma foram obtidos dois segmentos do crânio, o segmento anterior denominado de segmento frontal e um segmento posterior denominado de segmento caudal (Fig. 30a e 30 b). Em seguida o processamento histológico foi realizado no segmento caudal.



30a



30b

Fig 30. Visão do segmento frontal (à direita) e do segmento caudal (à esquerda) (a); visão macroscópica da peça, após corte, de interesse à histologia (b).

Em seguida, as peças foram lavadas em solução tampão de sulfato de sódio a 5% depois lavadas em H₂O corrente, desidratadas em alcoóis em concentrações crescentes (70 – 80 – 90 – 100%) por uma hora. Após este procedimento, foram diafanizadas em xilol I e II, por 30 minutos cada, em

temperatura ambiente. Incluídos em parafina I e II por 30 minutos cada, em temperatura de 56 °C.^{139,140}

Os blocos foram cortados em um Microtomo Rotativo Leyka®, ajustado para 4 micra. Os cortes obtidos foram montados em lâminas de vidro e corados pela técnica da Hematoxilina – Eosina e Picro Sirius (Sirius Red).

Análise microscópica e histomorfométrica

A avaliação microscópica foi realizada por meio de microscópio binocular de luz branca (Zeiss), procurando-se avaliar aspectos morfológicos do reparo ósseo do defeito experimental, bem como a evolução do fechamento, procurando-se comparar estes dados entre os quatro grupos experimentais e o grupo controle positivo. Realizado por um patologista do serviço de Patologia Oral da UFPE. Esta análise foi qualitativa, na qual se observaram:

- intensidade da angiogênese;
- presença de tecido de granulação;
- reabsorção da membrana cortical óssea bovina;
- reorganização do periósteo;
- formação do tecido ósseo / tecido integrador.

A avaliação histomorfométrica quantitativa foi realizada com a finalidade de proceder à contagem de vasos presentes no defeito, veias e artérias, utilizando-se aumento original de 25x e 40x. Para além de uma descrição subjetiva, as lâminas dos grupos experimentais e controle positivo, foram avaliadas por dois revisores, patologistas professores do Curso de Mestrado em Patologia da UFPE, avaliaram a quantidade de vasos diferenciando veias e artérias para cada espécime. Em seguida, foi procedido com o tratamento estatístico.

MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para análise dos dados imaginológicos foram obtidas as medidas estatísticas: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e valor máximo, técnicas de estatística descritiva, e foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis como comparações pareadas de Conover, 1980, e Mann-Whitney, técnicas de estatística inferencial. Ressalta-se que a escolha dos testes não paramétricos foi devida ao número de casos, especialmente no grupo controle.^{141,142}

O nível de significância utilizado para definição dos testes estatísticos foi de 5,0%. Os dados foram digitados na planilha Excel e o "software" estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

Nos estudos imaginológicos, observou-se em cada tempo de avaliação se existiu ou não diferença significativa entre os grupos em relação à média da área radiolúcida. Em cada grupo foi verificado se existiu ou não diferença significativa entre os tempos de avaliação em relação à média da área radiolúcida encontrada nestes exames.

No estudo histomorfométrico, observou-se em cada tempo de avaliação se existiu ou não diferença significativa entre os grupos em relação à média de cada uma das variáveis, número de artérias e número de veias. Foi verificado se existiu ou não diferença significativa entre os tempos de avaliação em relação à média de cada uma das variáveis, número de artérias e número de veias nos grupos com membrana.

RESULTADOS

RESULTADOS DOS ESTUDOS IMAGINOLÓGICOS

Tabela 1 – Estatística da área radiolúcida conforme o grupo

Grupo	Estatísticas					
	Média	Mediana	Desvio	Coefficiente	Mínimo	Máximo
	(mm²)	(mm²)	padrão	Variação(%)		
Gel + BMP + ORG (G1)	50,51	51,37 ^(A)	8,10	16,04	39,88	62,67
Gel + BMP + ORG + Membrana (G3)	53,96	54,44 ^(A)	6,17	11,43	45,24	62,27
Gel + BMP + INORG (G2)	26,65	26,57 ^(B)	2,92	10,96	22,36	29,73
Gel + BMP + INORG + Membrana (G4)	14,98	15,39 ^(C)	3,65	24,37	8,55	18,82
Controle positivo BMP + ORG + Membr (G5)	35,81	30,95 ^(B)	19,74	55,12	13,49	64,46
Controle negativo (G6)	92,96	92,90 ^(D)	0,62	0,67	92,04	93,94
Valor de p	p ⁽¹⁾ < 0,001*					

(*) : Diferença significativa a 5,0%.
(1): Através do teste Kruskal-Wallis com comparações pareadas segundo a metodologia apresentado no Conover.
Obs.: Se as letras entre parênteses são distintas comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes.
-Os valores devem ser lidos em mm², pois referem-se às áreas que receberam o enxerto

RESULTADOS DOS ESTUDOS QUALITATIVOS HISTOLOGICOS

Tabela 2 – Avaliação da intensidade da angiogênese conforme o grupo

Tempo de avaliação	Grupo	Leve	Moderada	TOTAL
• 180 dias	Gel + BMP + ORG (G1)	3	3	6
	Gel + BMP + INORG (G2)	2	4	6
	Gel + BMP + ORG + Membr (G3)	3	3	6
	Gel + BMP + INORG + Membr (G4)	1	5	6
	Controle positivo (G5) BMP + ORG + Membr	5	1	6

Tabela 3 – Ocorrência da reabsorção integral da membrana cortical óssea conforme o grupo

Tempo de avaliação	Grupo	Sim	Não	TOTAL
• 180 dias	Gel + BMP + ORG (G1)	-	-	-
	Gel + BMP + INORG (G2)	-	-	-
	Gel + BMP + ORG + Membr (G3)	6	-	6
	Gel + BMP + INORG + Membr (G4)	6	-	6
	Controle positivo (G5) BMP + ORG + Membr	6	-	6

Tabela 4 – Ocorrência da reorganização do periósteo conforme o grupo

Tempo de avaliação	Grupo	Sim	Não	TOTAL
• 180 dias	Gel + BMP + ORG (G1)	6	-	6
	Gel + BMP + INORG (G2)	6	-	6
	Gel + BMP + ORG + Membr (G3)	6	-	6
	Gel + BMP + INORG + Membr (G4)	6	-	6
	Controle positivo (G5) BMP + ORG + Membr	6	-	6

Tabela 5 – Ocorrência da formação do tecido ósseo e tecido integrador conforme o grupo

Tempo de avaliação	Grupo	Sim	Não	TOTAL
• 180 dias	Gel + BMP + ORG (G1)	6	-	6
	Gel + BMP + INORG (G2)	6	-	6
	Gel + BMP + ORG + Membr (G3)	6	-	6
	Gel + BMP + INORG + Membr (G4)	6	-	6
	Controle positivo (G5) BMP + ORG + Membr	6	-	6

RESULTADOS DOS ESTUDOS HISTOMORFOMÉTRICOS.

Tabela 6 – Estatística do número de artérias conforme o grupo

Grupo	Média	Mediana	Estatísticas			
			Desvio Padrão	Coefficiente Variação	Mínimo	Máximo
Gel + BMP + ORG (G1)	39,83	40,00 ^(A)	3,13	7,85	35	44
Gel + BMP + INORG (G2)	38,50	38,00 ^(A)	4,59	11,93	32	45
Gel + BMP + ORG + Membr (G3)	41,33	43,00 ^(A)	4,32	10,45	35	46
Gel + BMP + INORG + Membr (G4)	42,33	42,50 ^(A)	10,56	24,94	26	57
Controle positivo (G5) BMP + ORG + Membr	23,00	23,00 ^(B)	3,10	13,47	18	27
Valor de p	p ⁽¹⁾ = 0,005*					

(*) : Diferença significativa a 5,0%.
(1): Através do teste Kruskal-Wallis com comparações pareadas segundo a metodologia apresentado no Conover.
Obs.: Se as letras entre parênteses são distintas comprova-se diferença significativamente os grupos correspondentes.

Tabela 7 – Estatística do número de veias conforme o grupo

Grupo	Estatísticas					
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Coefficiente Variação	Mínimo	Máximo
Gel + BMP + ORG (G1)	93,33	96,00 ^(B)	6,62	7,09	81	99
Gel + BMP + INORG (G2)	161,67	166,50 ^(A)	31,63	19,57	104	193
Gel + BMP + ORG + Membr (G3)	78,83	80,00 ^(B)	10,17	12,93	63	90
Gel + BMP + INORG + Membr (G4)	166,83	156,50 ^(A)	60,82	36,46	101	247
Controle positivo (G5) BMP + ORG + Membr	122,17	123,50 ^(C)	27,07	22,15	89	155
Valor de p	p ⁽¹⁾ < 0,001*					

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste Kruskal-Wallis com comparações pareadas segundo a metodologia apresentado no Conover.

Obs.: Se as letras entre parênteses são distintas comprova-se diferença significativamente os grupos correspondentes.

PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS

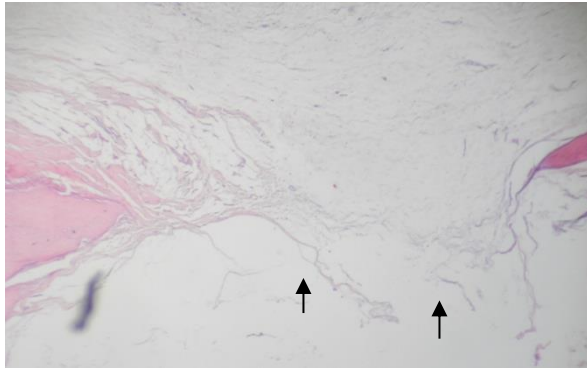


Fig 31 Controle Positivo (coágulo+bmp+org+membrana 180 dias- G5) com aspecto geral da região do defeito que se vê apenas tecido conjuntivo fibrilar e delicado. 10X

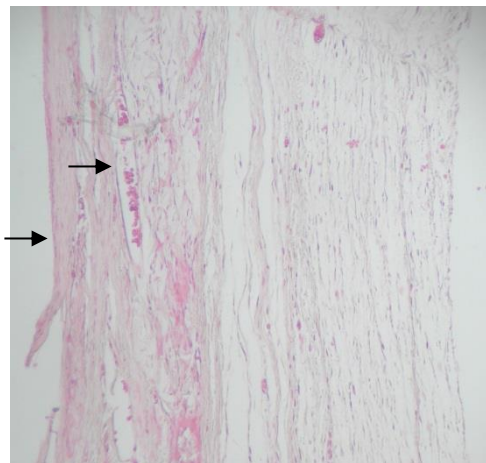


Fig 32 (Gel+bmp+org 180 dias- G1) tecido conjuntivo fibroso organizado em atividade proliferativa em que se observa espaços vasculares congestionados. 20X

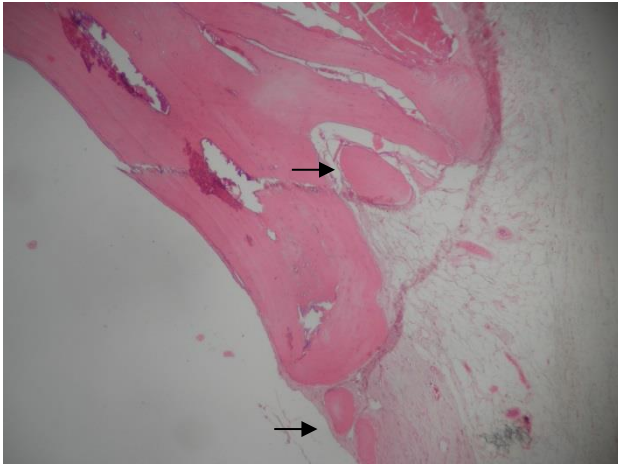


Fig 33 (Gel+bmp+org 180 dias- G1) borda do defeito cirúrgico em que se vê a formação de pequenas ilhas de osso neoformado. 20X

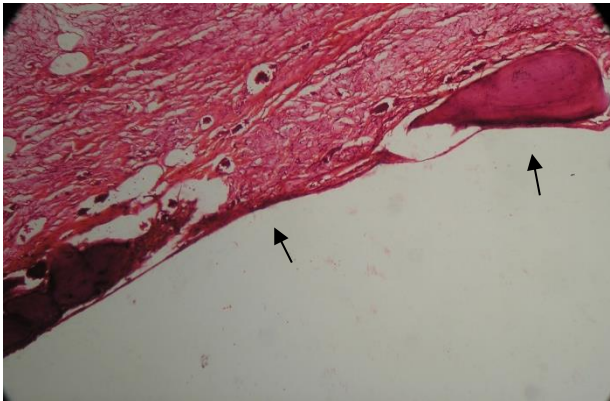


Fig 34 (Gel+bmp+org+membrana 180 dias- G3) ilhas de osso neoformado, tecido conjuntivo bem organizado. 20X

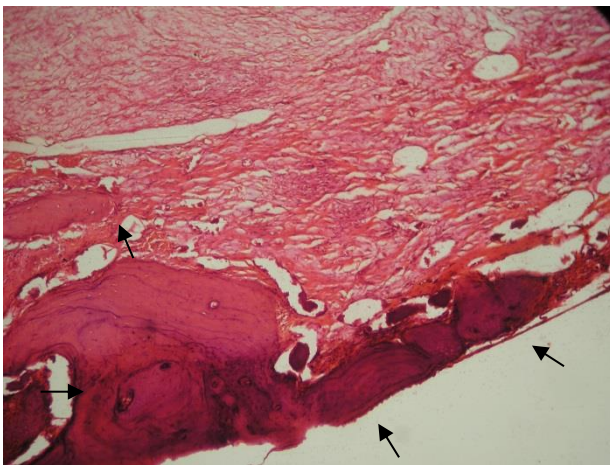


Fig 35 (Gel+bmp+org+membrana 180 dias- G3) diversas ilhas de osso neoformadas. 20X

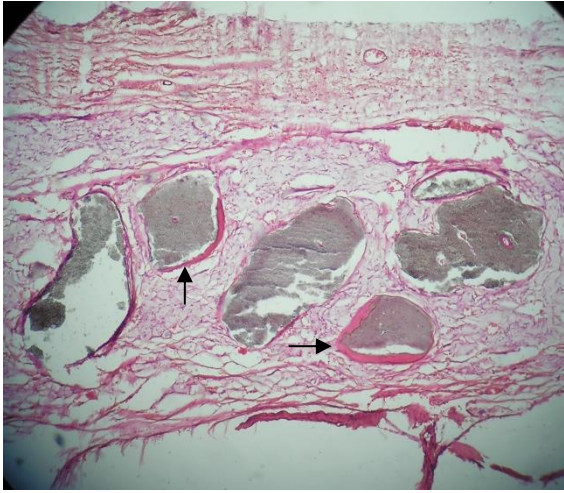


Fig 36(Gel+bmp+inorg 180 dias-G2) grânulos do enxerto ósseo inorgânico com neoformação óssea dispostos em ilhotas, bem celularizadas, e áreas com condensação do tecido conjuntivo sugerindo formação de osteóide. 20X

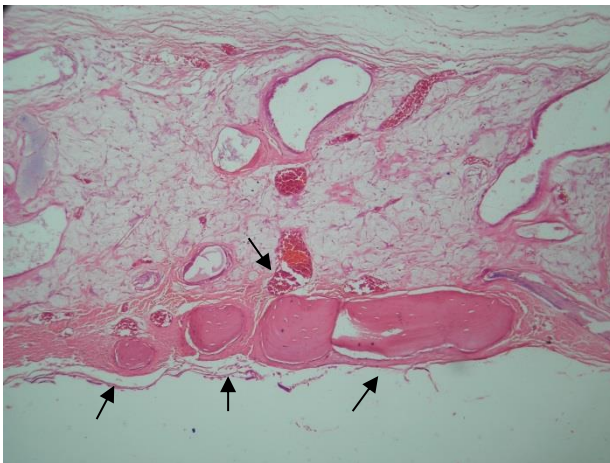


Fig 37 (Gel+bmp+inorg+membrana 180 dias- G4) presença de inúmeras ilhas de neoformação óssea, em tecido conjuntivo bem organizado. 20X

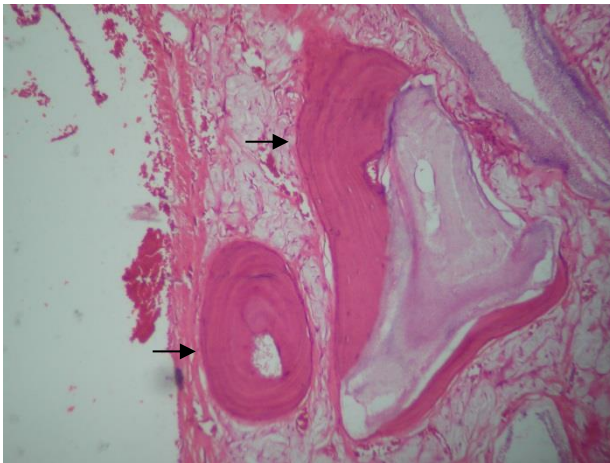


Fig 38 (Gel+bmp+inorg+membrana 180 dias- G4) ilhas de neoformação óssea, ao redor do osso inorgânico com formação óssea. 40X

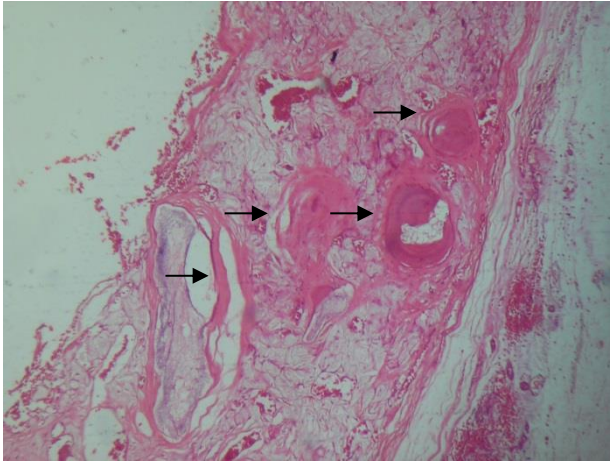


Fig 39 (Gel+bmp+inorg+membrana 180 dias- G4) diversos focos de reparação com neoformação óssea em ilhas. 40X

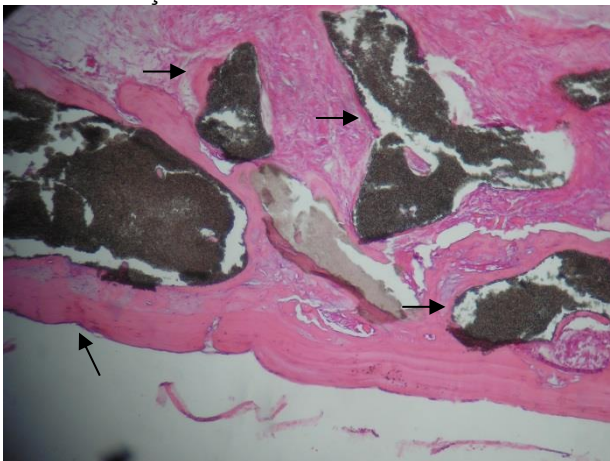


Fig 40 (Gel+bmp+inorg+membrana 180 dias- G4) marcante neoformação óssea, ao centro osso inorgânico, distintos estágios de calcificação. 40X

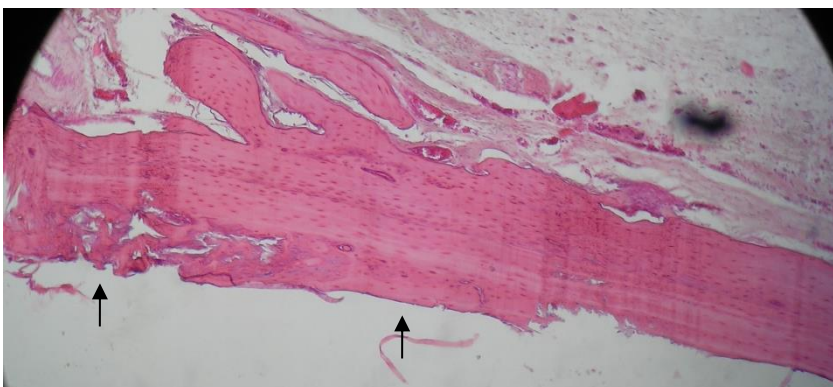


Fig 41 (Gel+bmp+inorg+membrana 180 dias- G4) formação óssea expressiva, reparação de parte do defeito experimental. 40X

DISCUSSÃO

Uso dos Enxertos

O presente estudo avaliou, através da histologia, da histomorfometria e da imaginologia, a capacidade de osteopromoção da associação do gel de polissacarídeo à proteína óssea morfogenética, enxertos ósseos liofilizados, orgânicos e inorgânicos, e da membrana colágena, no tratamento de defeitos críticos na calvária de ratos, 180 dias após a cirurgia.

Uma das características biológicas do tecido ósseo é a sua alta capacidade de reparação espontânea quando lesionado, repondo, depois de breve intervalo de tempo, toda a porção perdida. No entanto, em alguns casos, defeitos ósseos extensos, produzidos por trauma, processos patológicos ou anomalias do desenvolvimento, não têm a capacidade de repararem-se espontaneamente, havendo necessidade, nesses casos, de se utilizar várias técnicas cirúrgicas e materiais na tentativa de reparação da deficiência óssea.

O conhecimento da fisiologia, dinâmica de crescimento e reparo do tecido ósseo é de fundamental importância para compreender as etapas necessárias no restabelecimento funcional e morfológico deste tecido; as influências que podem sofrer durante os estágios de reparo e remodelação; a participação de substâncias que promovam de forma mais rápida e efetiva seu restabelecimento compilam preceitos que embasaram este estudo e forneceram meios para descobertas, alicerçadas em publicações clássicas.¹⁻⁹

Concordar com autores¹⁰⁻¹⁹ que afirmaram que o 'grande desafio aos pesquisadores e profissionais que realizam reconstrução, sobretudo de tecido ósseo, com perdas significativas e número crescente de pacientes acometidos por fatores que resultem nesta problemática', seria buscar formas de resolutibilidade através de novos materiais. Diversas publicações inerentes ao assunto demonstraram a característica invasiva, a dificuldade e o alto custo destes procedimentos.¹⁰⁻¹⁹ Assim, esta pesquisa escolheu as alternativas que têm surgido de métodos e técnicas para a reparação de

tecidos perdidos, utilizando-se dos conhecimentos da área da genômica e do proteoma (BMP), ampliando os horizontes quanto à descoberta de fatores de crescimento, controlando ou induzindo a osteogênese.^{1-9,20-77} Logo, ao corroborar com esta visão de forma significativa na resolução desta dificuldade e adicionar um polímero em estudos desenvolvidos na UFPE é exercer contribuição para a sociedade.

O uso das proteínas relacionadas ao proteoma, associadas a polímeros, objetivando estimular a regeneração óssea pode representar terapia promissora para a Medicina e a Odontologia, além de ser uma alternativa viável para se evitar enxertos autólogos ou homólogos e, conseqüentemente, os inconvenientes destes procedimentos. Enfim, o uso de biomateriais para restaurar a função de tecido traumatizado e degenerado ou para substituir a perda de tecido mineralizado tem ampla aceitação em cirurgias odontológicas e ortopédicas. Além disso, o uso de biomateriais em doenças crônicas, como artrites, osteoartrites e osteoporose, pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes e restaurar a mobilidade normal, entre outros benefícios.

Modelo do Estudo

Animal

Os modelos animais são utilizados durante décadas, em experimentos, para testar medicamentos, materiais cirúrgicos e técnicas de tratamento. Atualmente, os modelos animais criados em condições de laboratório totalmente padronizados seguem condições éticas pré-estabelecidas e aprovadas, com confiança, pela comunidade científica. Protocolos experimentais adequados para determinadas pesquisas surgiram a partir de tentativas e erros, os quais levavam em consideração a semelhança das respostas entre humanos e modelos animais. Assim, os modelos animais de laboratório de pequeno porte apresentaram maior capacidade

regenerativa óssea que em humanos. Diversas pesquisas estudadas demonstraram a confiabilidade e resposta consistente ao utilizarem-se deste tipo de modelo.^{44,50,56,63,65,78,80-83,86,88,90,91,102,107} Nesta pesquisa, foi avaliada a associação de polímero de polissacarídeo de melação de cana-de-açúcar a substâncias de enxerto de origem bovina com proteínas morfogenéticas do osso, através de defeitos de tamanho crítico em crânio de ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), por estar sedimentado este modelo de pesquisa e apresentar-se economicamente viável.

Localização e Tipo do Defeito

Foi eleita a região da calvária para confecção dos defeitos ósseos, por se tratar de uma região de capacidade regenerativa baixa. A calvária é um dos locais de escolha para pesquisas com agentes que estimulem a reparação⁷⁷. Diversos trabalhos⁷⁸⁻⁸³ tiveram por objetivo a observação da resposta biológica e poder indutor da combinação de enxertos em defeitos ósseos, produzidos na calvária de ratos. A utilização da calvária na realização de defeitos críticos deve-se à pobre vascularização e à relativa deficiência de medula óssea em comparação a outros ossos, além de ser assaz similar à da região maxilo-facial. Em termos embriológicos e morfológicos, a calvária desenvolve-se por ossificação intramembranosa, semelhante aos ossos da arquitetura facial. A calvária, anatomicamente, consiste em duas tábuas corticais, delimitando a delgada região central medular, semelhante ao osso alveolar.¹⁰⁶ Nela, os defeitos são menos sujeitos a fatores mecânicos e a obstruções do aporte sanguíneo.

A escolha na realização dos defeitos no centro da calvária teve como fatores determinantes: a inclusão da sutura sagital, por não sofrer a interferência da musculatura da orelha; a disponibilidade de uma área maior de osso; a permissão de criar um defeito de maior diâmetro; a facilidade na obtenção das imagens de avaliação e a cicatrização dos tecidos moles incisados, sem a interferência com a reparação dos defeitos do tecido duro.

Não foram realizados defeitos bilaterais em cada animal para análise pareada entre o defeito controle e o teste, por acreditar que eles ficam muito próximos, podendo a reparação de um defeito interferir no defeito contralateral e mesmo haver a intercomunicação entre os defeitos por reabsorção da fina faixa divisória de osso, transformando-o em um único grande defeito, conforme colocação de alguns pesquisadores.¹⁰²

O reparo de defeitos é um bom modelo para o estudo da regeneração do osso e possui grande semelhança com o reparo primário ou direto de fraturas. Considerando que os defeitos são menos sujeitos a fatores mecânicos e a obstruções do aporte sanguíneo, este modelo reparacional é utilizado em muitos experimentos clássicos, o qual analisa a influência de medidas cirúrgicas e farmacológicas para melhorar a regeneração óssea.^{84,87,89}

Os defeitos críticos foram utilizados neste estudo por serem defeitos ósseos experimentais e terem dimensões grandes para não ocorrer reparo espontâneo, pois, só nesta situação, o potencial osteogênico do implante, do enxerto ou do medicamento pode ser considerado real.⁸⁵ Desta forma, pode-se considerar sem erro o potencial osteogênico do material em teste.⁸⁶

Tipo de Incisão

A incisão realizada na calvária possuiu característica que facilitou a visão do leito cirúrgico, com retalho de fácil manejo, manteve o perióstio íntegro, deteve o material em experimentação no local e permitiu maior praticidade na sutura. O processo de reparação pode ser desvirtuado nos casos em que a incisão é realizada em cima da sutura sagital, pois a coaptação do retalho e perióstio ficam sobre o defeito, fazendo com que os dois processos de regeneração, o do tegumento e do osso, fiquem sobrepostos, possibilitando interferência entre eles. Nesse caso, se a sutura for realizada sem cuidados, pode haver deslocamento do material enxertado ou, se ocorrer ruptura, haverá exposição do material em experimento e

aparecimento de processo infeccioso, com alteração do resultado final.¹⁰⁴ Desta forma, neste trabalho, foi realizada a incisão semi-lunar⁹¹, deixando o retalho e o periósteo íntegros sobre o defeito, localizando a sutura ao lado do defeito a uma distância segura, sem a possibilidade de deslocamento do material pesquisado.

Utilização de Membranas

A falta de formação de novo tecido duro nos defeitos ósseos deve-se à rápida invasão e ao preenchimento da área por células altamente proliferantes de origem não óssea, advindas de tecidos conjuntivos circunjacentes, como resposta obtida em estudos anteriores.⁸⁵ Foi utilizado o princípio da Regeneração Tecidual Guiada (RTG) e Regeneração Óssea Guiada (ROG), com a utilização da membrana colágena. Esta técnica consiste em utilizar membrana biológica, para formar uma barreira física, criar um ambiente adequado, protegido da invasão de células competidoras, menos diferenciadas e assaz proliferativas dos tecidos vizinhos, principalmente, fibroblastos e células epiteliais, além de promover a proliferação de células originariamente características da região para a regeneração dos tecidos naturais da área. Todo esse embasamento, encontrado em pesquisas, ressalta técnicas operatórias, o qual consistiu em grande valia para este estudo.¹⁰⁹⁻¹¹⁸

Esta pesquisa baseada na viabilidade da RTG e ROG, na restauração de lesões ósseas perenes, teve como suporte os primeiros estudos realizados por Hurley et al.⁹⁵ em 1959, os quais utilizaram na espinha dorsal e cortical de ossos longos, como barreira física, filtros semipermeáveis de acetato de celulose (Millipore). Através dos diversos estudos iniciais⁹²⁻⁹⁷ às pesquisas recentes,^{91,98-118} com modelo animal e humano, demonstraram-se a necessidade e a objetividade do uso de barreiras mecânicas na intenção da formação de tecido ósseo, sem interferência de células que não façam parte deste tecido duro e que componham tecidos adjacentes moles. Nos

animais dos grupos experimentais e controle positivo, os quais fizeram uso de membranas biológicas, foi evidenciado um tecido conectivo mais organizado, espesso e de melhor qualidade. Traduz-se como uma resposta à barreira, a membrana de cortical bovina, a qual não permitiu que houvesse interferência dos tecidos moles, pois recobriu com eficiência a associação de enxertos utilizados.

O emprego das barreiras biológicas nos procedimentos cirúrgicos reconstrutivos facilita a seleção das células com potencial osteogênico da população celular dos canais haversianos e de Volkman e, principalmente, da medula óssea e do endóstio. Destarte, perióstio é excluído porque está readaptado na superfície externa da membrana, conforme citações da literatura.¹⁰⁵ Nos animais estudados por Dahlin et al.¹⁰¹⁻¹⁰³, foi observada, em todos os grupos, a reorganização mais acentuada do perióstio, pois a membrana fez parte da proteção ao defeito ósseo. Não foi constatada reação inflamatória traduzida por edema e elementos figurados do sangue, nem infecção. Permitindo, assim, reafirmar os mesmos eventos neste corrente estudo, desenvolvido com a utilização do gel de polissacarídeo, enxertos e membranas.

A metodologia que regeu o estudo de Linde et al.¹⁰⁷ influenciou a metodologia deste estudo ora desenvolvido, a qual resultou em sucesso no aumento da quantidade de tecido ósseo, osteopromoção na calvária de ratos, assemelhando-se também aos seus resultados. Esta corrente pesquisa corrobora com a análise histológica conforme Linde et al.¹⁰⁷, que chegou a comprovar 80% de neoformação óssea em termos volumétricos, logo foi observado 84% de neoformação óssea no grupo experimental G4, que utilizou gel+BMP+osso inorgânico+membrana. Pode-se ressaltar que, além do gel e dos materiais de enxerto que promoveram a diferenciação celular, propiciando formação óssea, a quantidade de osso neoformado dependeu da qualidade da membrana, tipo, porosidade, rigidez e do tempo de reparo. A osteopromoção é um fator de grande valia para a cirurgia reconstrutiva, confirmado em um estudo que utilizou coelhos.¹⁰⁸

Os resultados obtidos dos grupos experimentais resultaram em maior formação óssea naqueles onde foram utilizadas as membranas como barreiras, demonstrando maior formação óssea nas imagens tomográficas e na análise qualitativa histológica, com formação de tecido ósseo mais distante das bordas da lesão, mais próximo ao centro. Comparando-se com estudos anteriores,¹⁰⁹⁻¹¹² observou-se que houve sinergismo comprobatório na intenção de ganho maior de tecido ósseo, adotando esta técnica.

A membrana utilizada nesta pesquisa, membrana biológica liofilizada de cortical óssea bovina desmineralizada (Gen-derm®), constitui-se basicamente de fibras colágenas ósseas e foi submetida à análise microestrutural,⁹¹ em que foi observada a presença de poros compatíveis com os canais de Havers e Volkman, o que lhe conferiu qualidade de ser biocompatível e biodegradável. Por essas razões, favoreceu o reparo ósseo por ter permanecido íntegra por tempo suficiente para a reorganização do coágulo e da osteopromoção, com a formação de novo osso a partir das bordas do defeito, além de ter exibido propriedades de osteocondução, favorecendo a neoformação óssea nas suas superfícies. Assim, fundamentou-se a escolha desta barreira biológica, que melhor se adequou a esta pesquisa.

As membranas utilizadas eram cortadas em um formato igual ao defeito, circular, sem ângulos nas bordas. As margens das membranas ficaram a uma distância de 2 ou 3 mm além da borda do defeito, como preconizado na utilização de membranas para a osteopromoção.¹⁰⁴ Os ângulos retos, principalmente, nas membranas não absorvíveis, podem causar dilaceração no retalho e no periósteo, expondo o leito cirúrgico, o material de enxerto ou mesmo a membrana ao meio ambiente, favorecendo a formação de colônias bacterianas e iniciando o processo infeccioso com conseqüente inflamação na região, prejudicando, assim, o processo regenerativo requerido.

Utilização das BMP's

Esta pesquisa foi embasada nos estudos relativos aos proteômas,^{54,55,92} tema submetido a diversas investigações científicas.^{88-91,143,144} A reparação óssea nos casos de fratura é semelhante à reparação de enxertos biocompatíveis, contudo daqueles que não despertam uma exacerbada reação de corpo estranho, semelhante às respostas observadas nas lâminas histológicas examinadas. Nesta condição, a reparação é uma mimetização dos eventos embrionários de formação óssea, a qual inclui interações complexas de fatores de crescimento e respostas das populações celulares presentes no local.

É obtida como resposta, geralmente, a regeneração da estrutura óssea que fisiológica e biomecanicamente configuram-se indistinguíveis do original. Todos estes eventos são dependentes dos fatores de crescimento e, em particular, das Proteínas Ósseas Morfogenéticas, conforme observado nesta pesquisa e em outros estudos anteriores^{35-37,39-41}.

A descoberta^{6,7,20-26,34} e reconhecimento da ação e influência da BMP's no tecido ósseo foram exaustivamente pesquisadas,^{1,2,8,9,27-33,39} no intuito de se obter o mecanismo de calcificação, induzido por esta proteína. Nomeada em 1971, por Urist e Strates⁷, de "Proteína Morfogenética do Osso", verificou-se, no fim da década de 80, que não era uma única proteína, mas um grupo de proteínas, na matriz óssea, responsável pela osteoindução.²⁹⁻³³

Apenas em 1984, as BMP's foram, por Urist et al.²⁸ isoladas e purificadas a partir de osso bovino desmineralizado, comprovando a capacidade osteoindutora, com a formação de osso em animais e humanos, confirmando os resultados desta pesquisa, que utilizou o gel de polissacarídeo em associação.

Para integrar as BMP's nesta pesquisa, levou-se em consideração a sua relação com a indução de tecidos ósseos e propriedades na angiogênese. As BMP's possuem efeitos sobre a direção da diferenciação celular, também atuam como sinais de posição e proveem bases necessárias para o padrão de informações. Considerando estas características, as BMP's se ajustam

apropriadamente na categoria de morfogênes, sendo oportuna sua associação nos enxertos adicionados ao gel de polissacarídeos.

Outro conhecimento que permitiu esta associação com as BMP's foram as informações da genética recombinante, que confirmaram a ação destas na formação embriológica e participação na reparação de tecido ósseo.^{30,33, 44,46-49,52,54,56,58,63}

Até então se entendia que as proteínas morfogenéticas ósseas iniciavam a condrogênese e osteogênese com grau variado de potência e que a família das BMP's trabalhava em conjunto para regenerar osso. Mas, pela primeira vez, em 1994, foi demonstrado que uma única BMP recombinante (rhBMP-2), reconstituída com ICBM (matriz óssea colagenosa insolúvel), foi suficiente para reparar defeitos por craniotomia em ratos.⁴⁴

O mecanismo pelo qual as BMP's aceleram a regeneração óssea pode ser explicado pela conversão de células pluripotenciais em osteoblastos, as quais estejam diretamente relacionadas à dose de proteína osseointutiva⁵⁶, não diferindo a forma de indução das BMP's não recombinantes e recombinantes. Estudos com protocolo semelhante ao da presente pesquisa com o gel utilizaram BMP's recombinantes(rhBMP-2) para reparo de defeitos ósseos em calota^{56,63,81,82} ou em outros ossos^{54,53-55,57}, obtendo também, como resposta, osteoindução significativa e satisfatória nas reparações observadas.

A presente pesquisa utilizou o que se denomina na literatura de "pool" de BMP's, que compreende uma mistura deste fator sem separação das subfamílias^{29-33,40}. Diversos estudos experimentais trabalharam com diferentes espécies animais para demonstrar que a BMP purificada (recombinante)^{44-47,56,57,61} e a semipurificada (mistura)^{70,71,83}, extraídas de osso bovino, possuem alta capacidade de estímulo na formação de tecido ósseo, para promover o reparo de vários tipos de defeitos ósseos críticos. A BMP extraída do osso bovino mostrou-se quimicamente homologa à BMP humana, através da demonstração da clonagem do DNA.⁷⁰

O que foi observado analisando os resultados desta pesquisa com o gel de polissacarídeos está em consonância com Ripamonti et al.⁷¹, quando

da sua afirmação: “a estratégia de adsorção de BMP's em substratos porosos inorgânicos não imunogênicos pode ajudar a projetar sistemas e dispensação adequados para função osteogênica nas aplicações craniofaciais e ortopédicas em humanos”.

Dose de BMP's Utilizada

As BMP's foram utilizadas em uma diluição de uma parte de Gen-Pro® (BMP) para dez partes de osso orgânico ou inorgânico (Gen-Org® ou Gen-inorg®). A diluição foi feita com base na recomendação do fabricante. A dose de BMP muito baixa acarreta formação óssea insuficiente; se for demasiada, haverá formação óssea elevada e mais rápida que a osteoindução desejada.⁹¹ Em contrapartida, outros estudos^{40,62,63,66} relatam que, com doses elevadas de BMP's, a reabsorção óssea localizada inicialmente pode ser vista como resultado de aumento da atividade osteoclástica, por estimular a osteoclastogênese e assim despertar a atividade osteoclástica.

Reforçando este princípio, outros autores^{40,66,68} relataram que uma dose mais elevada de BMP não tem efetividade, pois, após determinado limite, já não ocorre aceleração da formação óssea. Desse modo, o protocolo desta pesquisa associou à BMP's o gel de biopolímero, observando com precisão, através da utilização de balança eletrônica, a quantidade correta e recomendada para mistura dos componentes do enxerto.

Diversas pesquisas^{1,4,5,8,9,40,45-48} de renome formam um verdadeiro compêndio de descobertas das ações das BMP's no estímulo molecular, através de eventos ocorridos no meio intracelular, resultando na indução e formação de tecido ósseo, inclusive com descobertas recentes que demonstram a utilização de equipamentos modernos e de alta tecnologia, as quais forneceram importantes informações e base para esta pesquisa.

Utilização do Gel como Carreador

A BMP é uma proteína difusível e, para iniciar o processo osseoindutivo *in vivo*, é necessário que haja liberação gradual desta, que pode ser obtida com a utilização de carreadores ideais.⁵⁰ Portanto, a associação com substâncias ósseas liofilizadas de origem orgânicas e inorgânicas é necessária, e este estudo teve o propósito de adicionar o gel de polissacarídeo para estabilizar esta associação de enxertos.

Levou-se em consideração que a cinética de um carreador tem um profundo efeito sobre a rapidez e a eficácia da indução óssea. A função primária do carreador é o aumento da eficácia das BMP's, impedindo a difusão rápida do agente indutivo para longe do local do implante, com uma sustentada liberação da proteína, base e princípios relatados em publicações anteriores⁵¹⁻⁵³, eventos que foram observados neste processo de reparo com a associação do gel de biopolímero, resultando em aumento da formação óssea.

Vale salientar que as investigações crescem no sentido de determinar o melhor tipo de material carreador na liberação das BMP's nas indicações clínicas. Para o tratamento do reparo das fraturas, a liberação deve ser conjugada com um material que atenda a nova taxa de formação óssea, a fim de que transporte o material e não comprometa a cicatrização. Para o tratamento das faltas de união^{54,55,59} e para a fusão espinhal,⁶⁸ o carreador deve possuir características que incluam uma lenta liberação de BMP's, com suficiente tempo de permanência e suporte da matriz osteocondutora para infiltração das células osteogênicas e prevenção da invasão dos tecidos moles.^{51,59,68}

Assim, ao observar as respostas obtidas com a associação do gel de biopolímero, descortina-se um horizonte com um leque muito amplo de pesquisas e observações a serem implementadas acerca da aplicação nesta liberação, que deve ser gradual e programada.

Diversos materiais foram pesquisados^{67,74,76,81-83,86} na tentativa de se obter o melhor carreador para estas proteínas, BMP's, que possuem características por serem extremamente lábeis quando inseridas nos tecidos orgânicos sem substâncias que a estabilizem e a mantenham protegidas.

As rhBMP's disponíveis para aplicação clínica são carregadas através de colágeno bovino tipo-I, pela esponja de colágeno (utilizado com BMP-2)^{61,63,64,65} ou partículas de colágeno (utilizado com BMP-7). Os atuais carregadores clínicos de colágeno liberam BMP em altas doses e isso requer também altas doses de BMP para produzir os efeitos. Os carregadores a base de colágenos^{74,76} são eficazes para a primeira e atual geração desses produtos, mas eles terão de ser substancialmente melhorados, a fim de alcançar eficácia clínica em doses mais baixas e, portanto, a um custo mais baixo. Ainda não se sabe se uma liberação sustentada de BMP's do osso é necessária ao longo de todo o processo de cicatrização, e esta questão deve ser esclarecida por investigações futuras.

Neste sentido, materiais que possam melhorar a estabilidade da BMP no meio do qual será enxertada servirão de incremento nas propriedades qualitativas da formação óssea. O gel de polissacarídeo foi associado aos enxertos, utilizados no intuito de observar seu comportamento neste tipo de tecido, como também sua função de liberação controlada de BMP's. É um material recente, ainda não usado como carregador no tratamento de lesões ósseas, e tem demonstrado biocompatibilidade e baixa citotóxicidade nos estudos que antecederam esta pesquisa.¹¹⁹⁻¹³⁷

A ampla potencialidade de aplicações do biopolímero de cana-de-açúcar, particularmente, nas áreas de ciências da saúde, biológica e farmacotécnica permite predizer o seu alto valor agregado, favorecendo sua produção em escala, e confirmando o seu potencial em agregar valor a um produto regional de baixo valor, o melaço da cana-de-açúcar, haja vista a alta taxa de conversão.¹²¹ Do ponto de vista socioeconômico, a sua produção em escala e comercialização resultará na geração de emprego e de capital pela redução da importação de similares com alto valor agregado.

A partir do polímero, foram desenvolvidos modelos de utilidades nas apresentações de membranas, telas, tubos, fios de sutura e gel, os quais vêm sendo testados em cães, ratos e coelhos, com bom resultado na reposição de tecidos para a correção de falhas funcionais e tratamento de doenças.

Entre as principais aplicações, pode-se ressaltar a utilização das membranas e telas para a correção de defeitos, como hérnias,¹²² retalhos para reparos de lesões vasculares de artérias e veias,¹³² *slings* para o tratamento da incontinência urinária,^{123,126} timpanoplastia no tratamento das perfurações do tímpano¹³¹ e fios de sutura com utilização em tecidos viscerais¹³⁶ e cutâneos.¹²⁹ A aplicação de gel está sendo testada com sucesso no tratamento de refluxo vésico ureteral e na incontinência urinária, preenchimento de espaços na cirurgia plástica e na suspensão de medicamentos para a sua liberação controlada em farmacotecnia.

Em todos os seguimentos das pesquisas realizadas com o biopolímero, a resposta dos animais é significativamente biocompatível. Naqueles que permaneceram com o polímero por mais de um ano ocorreu uma biointegração expressa por intensa neoformação vascular no interior do polímero, definindo uma incorporação do polímero ao organismo receptor. Nos ratos que permaneceram com o biopolímero na apresentação de gel, telas e fios de sutura não foram detectados quaisquer efeitos colaterais.^{122,129,131} Estudos comparativos observacionais em animais, entre o polímero e outros materiais, já de uso corrente em humanos, muito embora, ainda sem dados para conclusão dos estudos estatísticos, revelaram superioridade do biopolímero.^{129,132,135}

Nesta pesquisa de reparação óssea, foi observado que, durante os procedimentos cirúrgicos, quando o gel foi incorporado às substâncias de enxerto, na forma de carreador, o sangramento transcirúrgico era evidentemente controlado. Assim, revela-se mais uma propriedade a ser pesquisada com a utilização deste gel. Além disso, ressalta-se que os grupos que utilizaram o gel de biopolímero tiveram reparação óssea de boa qualidade e quantidade, sem observação histológica de células reacionais multinucleadas.

Dos Resultados Estatísticos

Resultados da Imaginologia

Os defeitos críticos foram avaliados por meio de tomografia computadorizada volumétrica de feixe cônico. Este método permitiu obter imagens rotacionais, assim, consentiu girar as calotas no sentido desejado e uniformizar a metodologia de obtenção dos dados, uma vez que girar a calota no sentido ântero-posterior e latero-lateral foi de importância para obter os cortes desejados e padronizados. Isto evitou a sobreposição da base do crânio nas tomadas radiográficas convencionais, a qual deixaria obscura a formação óssea dos defeitos nas calotas, consequentemente, os resultados. Esta metodologia foi superior às descritas na literatura estudada.^{70,83,91}

Os resultados revelaram que a associação da membrana como barreira, a BMP e o osso inorgânico foram carregados de forma bastante efetiva pelo gel de polissacarídeo, pois apontaram os grupos de maior formação óssea, com diminuição dos defeitos críticos.

Para análise dos dados, foram obtidas as medidas estatísticas: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e valor máximo (técnicas de estatística descritiva) e foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis, como comparações pareadas de Conover¹⁴² e teste de Mann-Whitney (técnicas de estatística inferencial)¹⁴¹. Ressalta-se que a escolha dos testes não paramétricos foi devido ao número de casos em cada grupo.

O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0%. Os dados foram digitados na planilha Excel e o “software” estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

Os resultados quantitativos do estudo imaginológico, observados nos tempos de 180 dias, indicaram que as medidas média e mediana foram correspondentemente mais elevadas nos grupos com material orgânico que nos grupos com material inorgânico, o grupo controle positivo apresentou valor intermediário. Para os grupos com material orgânico, as médias variaram de 50,51 (G1) a 53,96 (G3) e as medianas de 51,37 (G1) e 54,44 (G3),

enquanto nos grupos com material inorgânico, as médias variaram de 14,98 (G4) a 26,65 (G2) e as medianas variaram de 15,39(G4) a 26,57(G2) respectivamente. Diferenças significativas foram registradas entre os grupos ($p < 0,001$) e através das comparações pareadas, com exceção dos pares G1com G3 e do G2 com Controle positivo(G5); para todos os demais pares, comprova-se diferença significativa. Pode-se afirmar que, ao exame imaginológico, a ocorrência de maior formação óssea apresentou-se nos grupos em que foi empregado o osso inorgânico carregado pelo gel de polissacarídeo, G4 e G2.

Todos os grupos estudados tiveram diferença significativa quando comparados ao grupo controle negativo(G6), tiveram reparação óssea e mudança no seu padrão de defeito com neoformação de tecido duro. Foi de importância a realização deste grupo controle negativo para comparação com os grupos experimentais que receberam os enxertos, pois revelou quantitativamente a área inicial medida em milímetros quadrados, sem formação nenhuma de osso, partindo-se de um referencial para o ganho obtido por cada grupo, em neoformação de tecido ósseo.

O grupo controle positivo teve um ganho ósseo intermediário quando comparado aos grupos experimentais que utilizaram os enxertos ósseos de origem orgânica e inorgânica, tanto em associação com a membrana biológica quanto sem a associação com esta membrana. Os enxertos que utilizaram o osso orgânico associado, ou não à membrana e ao gel e BMP's tiveram menor ganho ósseo em comparação aos demais grupos. Foram observados nos grupos que utilizaram o osso inorgânico associado, ou não à membrana e ao gel e BMP's os maiores ganhos apresentados entre os grupos pesquisados.

O gel é uma substância que demonstrou em diversas pesquisas biointegração com neoformação vascular no interior do polímero.^{122,129,131} Esta propriedade foi confirmada nesta pesquisa sendo de importância relevante na reparação dos defeitos críticos, os quais foram confeccionados com tamanho significativo de perda estrutural para a região anatômica operada.

Houve sinergismo desta propriedade em prover neoanginogênese na associação do gel de polissacarídeos com as BMP's, que também possuem propriedades semelhantes.^{73,81}

Em adição à manutenção necessária de uma estrutura que forme um arcabouço que impeça a proliferação de tecidos moles na área de reparação do tecido ósseo, demonstrou ser a mistura osso inorgânico, membrana, BMP e gel de polissacarídeos a melhor resposta experimental, no intuito de reparar, com formação óssea eficiente, o defeito. O gel de biopolímero ocupou uma função de destaque, pois manteve em suspensão, com liberação controlada, as BMP's em conjunto com o osso inorgânico, promovendo a diferenciação celular principal para a formação óssea.

O osso inorgânico e o gel promoveram proteção destes morfogenes e de uma estrutura complexa formada pelo material de enxerto. Essa porção inorgânica objetivou conter e impedir o colapso dos tecidos moles, ocupando a área destinada à formação de tecido ósseo. Onde a membrana agiu impedindo a invasão dos tecidos moles adjacentes, por consequência, evitando a interferência das células do tecido conjuntivo e pericrânio em todo o material enxertado, inclusive o material osteocondutor, o complexo formado pelo gel e osso inorgânico. Portanto, foi a tradução de uma formação óssea expressiva, com diminuição das áreas radiolúcidas, expressando na radiopacidade, obtida através de tomografia, a formação de tecido duro requerido.

Resultados Qualitativos Histológicos

O modelo utilizado na presente pesquisa foi para avaliar a capacidade da associação de substâncias classicamente indutoras da osteogênese, carregadas pelo gel de biopolímero. Essa associação de substâncias era composta por matriz óssea xenogênica orgânica ou inorgânica, em sítio ortotópico, ou seja, em sítio ósseo, onde as condições microambientais são mais favoráveis à ocorrência de osteogênese induzida.

Como todos os defeitos ósseos, mantiveram-se sem fechamento completo, os resultados obtidos tiveram alta relevância, uma vez que o reparo ósseo que ocorreu nos defeitos críticos tratados só pôde ser atribuído à associação de substâncias contendo o Gel de polissacarídeos como carreador para BMP's, com matriz óssea xenogênica orgânica ou inorgânica, utilizada no preenchimento das lesões.

A histotécnica usada neste trabalho diferiu da literatura observada no que concerne ao processo de descalcificação utilizado. Em pesquisa com tecido ósseo, particularmente, com o uso de enxertos, o processo de descalcificação, quando não bem executado, desvirtua os resultados. Os principais descalcificadores utilizados em laboratórios de histotecnologia são constituídos de ácidos orgânicos fortes diluídos. Durante o processo de descalcificação, o material pode sofrer alterações morfológicas, dificultando a interpretação histológica. Frente às dificuldades encontradas quanto ao processamento na descalcificação de cabeças de ratos, foi utilizada a padronização de uma técnica mais viável para essa etapa do trabalho. Empregou-se um agente descalcificador para que garantisse a preservação das estruturas morfohistológicas, não comprometendo a sensibilidade dos diferentes tipos de tecidos encontrados nas cabeças dos ratos, como também considerando o fator tempo, diminuindo de forma muito significativa o período necessário para uma completa descalcificação, visto que alguns descalcificadores de rotina necessitam de até 30 dias para a completa descalcificação, conforme citado em algumas pesquisas.^{70,83,91}

Por meio do método descrito por Aires et al.¹³⁸ em 2005, o agente descalcificador foi composto por uma solução de ácido clorídrico e ácido fórmico, ambos a 8% (solução comercial), em partes iguais. Esta técnica permitiu diminuir o tempo de descalcificação, além de garantir a preservação das estruturas histológicas estudadas. Esta etapa foi de importância para a correta obtenção das calotas regeneradas sob influência dos enxertos, mantendo a qualidade morfológica das estruturas estudadas, a qual requereu esforços na procura de uma técnica com as características descritas.

O estudo histológico teve, como principais parâmetros para avaliação, a intensidade da angiogênese, reabsorção da membrana cortical óssea bovina, reorganização do periósteo e formação do tecido ósseo/tecido integrador, de acordo com estudos que avaliaram a intensidade de formação óssea com utilização de enxertos.^{83,91}

Como houve uma variação evidente no item da intensidade da angiogênese, foi realizada histomorfometria, utilizando-se do número de vasos por área de defeito, o qual representou um diferencial para o estudo. A angiogênese é um parâmetro utilizado para avaliar a neoformação óssea e nos ensaios de avaliação das BMP's como osteoindutor.^{40, 43-48} A presença de neovasos e fibroblastos é importante no estágio inicial de reparação óssea.^{2,70,91} Esta observação nos estágios mais adiantados denotaram a intensão de reparação por completo do defeito residual, traduzindo as propriedades do gel de polissacarídeos e das BMP's em sinergismo, conforme observação em ensaios de pesquisas anteriores com o gel entremeado por vasos.

A reabsorção da membrana cortical óssea bovina foi observada em todos os grupos, visto que se trata de uma membrana de origem biológica reabsorvível. Aos 90 dias, as membranas já teriam passado por esse processo.⁹¹

A formação do tecido ósseo e a do tecido integrador foram analisadas em conjunto, pois, em todos os grupos, houve a formação de um tecido conjuntivo fibroso, conectando as bordas do defeito ósseo remanescente. Ocorreu grau variado de formação óssea em todos os grupos, com formação de ilhas de tecido duro e evidente formação óssea a partir das bordas, quantificadas no estudo da imaginologia, apesar de não ter ocorrido o fechamento completo do defeito ósseo, o que o caracteriza como defeito crítico, promovendo segurança ao trabalho quanto aos resultados obtidos, conforme embasamento na literatura.⁸⁴⁻⁸⁶

Não se podem descartar alguns eventos que ocorram durante esse reparo, os quais devem ser salientados, considerando o processo de reparo de lesão, induzido por matriz óssea alogênica desmineralizada,¹⁴³ tais quais:

atraso nos eventos que levam ao processo de osteogênese; uma menor intensidade osteoindutiva ou osteocondutiva, uma vez que a espessura da cortical óssea formada é menor que a originalmente existente na região e a não ocorrência de fechamento completo dos defeitos. Essas diferenças talvez se devam aos componentes imunológicos presentes na matriz óssea bovina, apesar do fabricante proceder a liofilização do material, diminuindo a antigenicidade que, de alguma maneira, atuaria modulando os eventos em cascata que ocorrem durante a indução da osteogênese.

A utilização da membrana biológica para funcionar como barreira protetora da zona do defeito^{96,98,100-105,107-018,110-115} é de suma importância, visto que o defeito foi muito extenso na calota e a membrana era reabsorvível, podendo ter sido reabsorvida em um momento de reparação óssea relevante para a região.

Os carreadores foram seguramente ideais, pois um estudo de Ferreira et al.,⁸³ utilizando hidroxiapatita(HA) misturada à BMP, demonstrou que a utilização de BMPb-HA no tratamento de defeitos ósseos cranianos em ratos promove a formação de reação granulomatosa, tipo corpo estranho, que inibe profundamente a neoformação óssea, sugerindo que a hidroxiapatita sintética microgranular não é um bom carreador para as BMP's expressarem o seu potencial indutor. Contudo, ao final de seis meses, os focos de reação granulomatosa diminuíram em número e tamanho, e os defeitos diminuíram a sua área em 22% em relação ao controle 0 hora, devido à neoformação óssea nas suas bordas. Ao contrário do que foi obtido neste estudo experimental com o gel de polissacarídeos, onde não foi observado reação granulomatosa de corpo estranho e foi obtida reparação óssea de até 84% da área experimental, nos defeitos críticos.

Em convergência aos resultados observados, Mendonça⁸⁸ utilizou o Gen-Ox inorgânico e demonstrou a maior capacidade osteocondutora dentre os materiais testados. O enxerto utilizado na presente pesquisa, além de osso inorgânico esponjoso ou osso orgânico cortical, utilizou o gel de polissacarídeos para conduzir as BMP's. Dessa forma, ao comparar as áreas radiolúcidas na imagiologia dos grupos experimentais ao grupo controle

negativo, evidenciou-se a formação óssea significativa em todos estes grupos experimentais. Foi possível afirmar que os enxertos utilizados constituem material biocompatível, com capacidade osteogênica. Em particular, os enxertos com osso inorgânico esponjoso, permitiram que o tecido ósseo neoformado mantivesse contato com suas partículas, o que caracteriza atividade osteocondutora. Este quadro pôde ser observado nos cortes histológicos, onde foram encontradas partículas de osso inorgânico junto ao osso neoformado, na área mais central do defeito e nas bordas.

Apesar de Urist⁶ afirmar que a utilização de osso desmineralizado apresenta potencial osteoindutivo, devido à presença de fatores de crescimento solúveis no seu interior, foi evidenciado que houve menor formação de tecido ósseo neste grupo, em comparação com o uso do osso inorgânico na mistura do enxerto. Com a metodologia empregada neste trabalho, foi possível confirmar esta afirmação, porque o estudo da osteoindução, para ser comprovado, necessita de um sítio diferente de uma cavidade óssea, em que haverá o reparo ósseo promovido pelas células osteoprogenitoras locais, salvo em defeitos críticos. Assim, demonstra-se a importância de misturar as BMP's a substâncias mais estáveis, e a melhor forma de avaliação de osteoindução é através de estudos com defeitos críticos.

No estudo de Schimtz et al.,¹⁰⁶ não foram utilizados fatores de crescimento, mas utilizou membrana, foi comparado reparo de defeitos ósseos na calvária de ratos com diâmetro de 3, 4 e 8 mm. Concluíram que apenas os defeitos 3 e 4 mm regeneraram completamente, apresentando maior formação óssea. Os defeitos de 8 mm, apresentaram formação óssea apenas na periferia da lesão, enquanto, na região central formou-se uma união não óssea de tecido conjuntivo fibroso.

Diferentemente desta presente pesquisa, que demonstrou, qualitativamente, formação óssea em diversos grupos experimentais e em áreas mais distantes das bordas, mesmo realizando defeito

significativamente maior, de 11 mm. Desta forma, pode-se confirmar a importância da utilização de membranas e dos princípios da osteopromocção^{107,108}, mas a presença de fatores de crescimento e a escolha de condutor que seja efetivo na área aplicada são fundamentais na promoção da reparação do tecido ósseo.

Resultados Quantitativos Histomorfométricos

A presente pesquisa avaliou a intensidade da angiogênese por ter sido um item do estudo histológico qualitativo que apresentou variação entre os grupos estudados. No intuito de fornecer dados detalhados, foi feito um levantamento de artérias e veias, não se considerando apenas a presença do número de vasos, por se tratar de um achado de valia na pesquisa da formação óssea e avaliação de enxertos.^{80,88}

Os dados histomorfométricos observados na avaliação do número de artérias com 180 dias foram a média e a mediana, sendo essas as menos elevadas no grupo Controle(G5); as médias dos outros grupos variaram de 38,50(G2) a 42,33(G4) e as medianas variaram de 38,00(G2) a 43,00(G3)). Foi registrada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), sendo comprovada diferença significativa entre o grupo controle positivo com cada um dos outros grupos. Foi observado maior número de artérias no grupo G4, o qual se utilizou osso inorgânico, membrana, BMP e gel.

Nos dados histomorfométricos observados na avaliação do número de veias com 180 dias, destacam-se a média e a mediana mais elevada, as quais ocorreram no grupo G4 e foram menos elevadas no grupo G3; as médias variaram de 78,83(G3) a 166,83(G4) e as medianas variaram de 80,00(G3) a 166,50(G2), com diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$), com exceção dos grupos G2 e G4 comprova-se diferença significativa entre os demais pares de grupos. Ficou patente que o maior número de

veias também foi no grupo que foi utilizado osso inorgânico, membrana, BMP e gel.

Esta pesquisa desperta para a avaliação e distinção da formação de artérias e veias durante a formação de tecido ósseo, quando se utiliza enxertos. Apesar dos estudos encontrados na literatura^{80,83,88,91}, avaliarem apenas a angiogênese de forma indistinta, os dados desta experiência são de relevância, conforme anteriormente descrito pela comparação realizada no decorrer do processo de reparo do tecido ósseo.

Assim, como as proteínas ósseas morfogenéticas, outros fatores de crescimento estão envolvidos na osteogênese e podem abrir uma nova perspectiva para o tratamento de fraturas e regeneração de grandes perdas ósseas. O PRP extensamente estudado demonstrou ser útil na formação vascular de feridas cirúrgicas, mas não foi efetivo quando utilizado em associação com material de enxerto inorgânico,¹⁴⁴ da mesma origem e marca comercial que esta presente pesquisa, pois, ao contrário dos resultados obtidos na associação com o gel e BMP, quando associado ao PRP, não demonstrou eficácia.

As células-alvo das BMP's são as células mesenquimais não especializadas do tecido conjuntivo. Como parte da superfamília dos TGF, participam também dos processos de reparação, têm grande espectro de ação nas atividades celulares, incluindo controle da proliferação e da atividade metabólica de células precursoras mesenquimais ósseas, tais como condrócitos, osteoblastos e osteoclastos, assim como potente ação quimiotática para macrófagos, além de estimular a angiogênese.

Perante a literatura consultada^{63-65,81-83} e tendo em vista o grande potencial clínico das BMP's, verificam-se os avanços nos estudos clínicos que avaliam o emprego destas substâncias osteoindutoras no emprego de difícil resolução, uma vez que diversas pesquisas experimentais em várias espécies já demonstraram eficácia e segurança na sua utilização. Sob este aspecto, os pesquisadores vêm adotando o uso de agentes osteoindutores, principalmente BMP's e seus carreadores, e a avaliação dos resultados parciais aponta alta eficácia. Muitos carreadores já foram testados

experimentalmente, mas o material ideal para carrear as BMP's ainda não foi definido, dependendo, provavelmente, da indicação clínica para o uso da proteína morfogenética. O gel de polissacarídeo, associado às substâncias testadas, mostrou-se biocompatível, com boas propriedades para servir como carreador. Estudos imuno-histoquímico e de biodegradabilidade devem ser realizados futuramente.

CONCLUSÕES

Com base no modelo experimental, metodologias empregadas e os resultados obtidos, analisados com uma margem de segurança de 95%, se conclui que:

- O Gel de polissacarídeo de melaço de cana de açúcar é biocompatível e carreador das proteínas ósseas morfogenéticas;
- A associação gel de polissacarídeo de melaço de cana de açúcar, proteína óssea morfogenética e osso liofilizado, é uma preparação indutora de angiogênese e reparação óssea em defeitos críticos em calvaria de ratos;

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Barboza EP, Duarte MAL, Geolás L . Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. J Periodontol. 2000;71(3):488-496
2. Gonçalves EAL, Guimarães SAC, Garcia RB. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. Rev Odontol Univ São Paulo. 1998;12(3):299-304.
3. Liebschner MAK. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. Biomaterials. 2004; 25:1697-1714.
4. Yudell RM, Block MS. Bone gap healing in the dog using recombinant human bone morphogenetic protein-2. J Oral Maxillofac Surg. 2000;58(7):1-9.
5. Winn SH, Uludag H, Hollinger JO. Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. Adv Drug Deliv Rev. 1998;31:303-318.
6. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science. 1965 Nov;150 (3698) : 893-9.
7. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. J Dent Res. 1971; 50:1392-406.
8. Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. Trends in Biotechnol. 2001; 19(7): 255-265.
9. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science. 1988 Dec 16; 242 (4885): 1528-34.
10. Medeiros Jr MD. Reconstrução de Assoalho Orbitário com Calota Craniana. Rev. ABO Nac. 2005 Dez-2006 Jan;13(6) supl. 1.
11. Ferraz NMP, da Silva ALG, Ferraz AP, Miranda RRS, Medeiros Jr MD. Lesão Transfixante de terço médio da face provocada por instrumento corto-contuso. Rev. da ABO Nac. 2008 Jan;15(6), supl. 1.

- 12.Kong Z et al. Dynamic compression promotes proliferation and neovascular networks of endothelial progenitor cells in demineralized bone matrix scaffold seed. J Appl Physiol August 15, 2012 113:(4) 619-626.
- 13.Street J et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99(15):9656-9661.
- 14.Klesper B, Lazar F, Siebegger M, Hidding J, Zoller JE. Vertical distraction osteogenesis of fibula transplants for mandibular reconstruction – a preliminary study. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2002; 30:(5)280-285.
- 15.Casa Nova PM, Mota LF, Medeiros Jr MD, Takano MM, Cardoso SO. Confecção de endopróteses com a utilização de prototipagem rápida. Rev. da ABO Nac. 2008 Jan;15(6):137, supl. 1.
- 16.Mota LF, Casa Nova PM, Cardoso SO, Takano MM, Medeiros Jr MD. Aplicabilidade de endopróteses em grandes reconstruções mandibulares. Rev. da ABO Nac. 2008 Jan;15(6):137, supl. 1.
- 17.Ferraz NMP, Gomes da Silva AL, Miranda RRS, Medeiros Jr MD. Enxerto de calota na reconstrução de assoalho de órbita. Rev. da ABO Nac. 2008 Jan;15(6):132, supl. 1.
- 18.Melo REVA, Medeiros Jr MD, Bezerra APA, Melo CBP, Aguiar JLA. Análise da ocorrência de traumatismo facial em 1.128 pacientes. An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernambuco. 2006;51(2).
- 19.Service RF. Tissue engineers build new bone. Science.2000;289(5484):1498-1500.
- 20.Levander G. A study of bone regeneration. Surgery, Gynecology and Obstetrics. 1938; 67:705-14.
- 21.Lacroix P. Recent investigations on the growth of bone. Nature. 1945; (156):576-8.
- 22.Lacroix P. Organizers and the growth of bone. J Bone Joint Surg. 1947; 29A:292-96,

23. Heinen JH, Dabb GH, Mason HA. The experimental production of ectopic cartilage and bone in muscle of rabbits. *J. Bone Joint Surg.* 1949; 31A:765-75.
24. Goldhaber P. Preliminary observations on bone isografts within diffusion chambers. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958; 98: 53-6.
25. Goldhaber P. Osteogenic induction across Millipore filters in vivo. *Science.* 1961; 133: 2065-67
26. Van de Putte KA, Urist MR. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin. Orthop.* 1960;(43):257-70.
27. Urist MR. Transmembrane bone morphogenesis across multiple-walled diffusion chambers. *Arch. Surg.* 1977;(112):612-9.
28. Urist MR et al. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl Acad Sci USA, Washington.* 1984;81: 371.
29. Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington.* 1988;85(24):9484-9488.
30. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988 Dec;242:1528-33.
31. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:9843-7.
32. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann H. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J.* 1990;9:2085-93.
33. Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Jin DF, Clifford GM, Warren FD, Drier EA, Oppermann H. Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267:25220-7.

34. Urist MR, Jurist JM, Dubuc FL, Strates BS. Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. Clin Orthop Rel Res. 1970;68: 279-93,.
35. Tuominen T, Jämsä T, Tuukkanen J, Nieminen P, Lindholm TC, Lindholm TS, Jalovaara P. Native bovine bone morphogenetic protein improves the potential of biocoral to heal segmental canine ulnar defects. International Orthopaedics. 2000;24(5):289-294.
36. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. J Bone Miner Res. 1999;14:1805-15.
37. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem. 2003;88:873-84.
38. Glienke J, Schmitt AO, Pilarsky C, Hinzmann B, Weiss B, Rosenthal A, Thierauch KH. Differential gene expression by endothelial cells in distinct angiogenic states. Eur J Biochem. 2000;267:2820-30.
39. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orthop Relat Res. 1998; 346:26-37
40. Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJTHM. Current concepts review. Bone Morphogenetic Proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. The Journal of Bone & Joint Surgery. 2005 June; 87-A(6).
41. Rabie, A-DM, Dan Z, Samman N. Ultrastructural identification of cells involved in the healing of intramembranous and endochondral bones. Int. J. Oral Maxillofacial Surg. 1996;25:383-8.
42. Urist MR et al. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979 Apr;76(4):1828-1832.
43. Rutherford RB et al. Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. Int. J. Oral Maxillofacial Implants. 1992;7(3):297-301.

44. Marden LJ et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy in rats. *J. Biomed. Mater. Res.* 1994 Oct;28(10):1127-1138.
45. Xiang W et al. The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. *J. Oral Maxillofacial Surg.* 1993;51:647-51.
46. Cook SD, Wolfe MW, Salked SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defect in non-human primates. *Journal of Bone and Joint Surgery.* 1995;77:734.
47. Kirker-Head CA. Recombinant bone morphogenetic proteins: novel substances for enhancing bone healing. *Veterinary Surgery.* 1995;24:408-419.
48. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:1544-52. Erratum in: *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:141.
49. Wang EA. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990 Mar ;87: 2220-2224.
50. Miki T. Effect of freeze-dried poly-L-lactic acid discs mixed with bone morphogenetic protein on the healing of rat skull defects. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1994 Apr;52:387-391.
51. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;367 Suppl:S95-106.
52. Hollinger JO, Uludag H, Winn SR. Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;31:303-18.
53. Wang EA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): therapeutic potential in healing bony defects. *Trends Biotechnol.* 1993;11:379-83.
54. den Boer FC, Bramer JA, Blokhuis TJ, Van Soest EJ, Jenner JM, Patka P, Bakker FC, Burger EH, Haarman HJ. Effect of recombinant human

- osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. *Bone*. 2002;31:158-64.
55. Bostrom MP, Saleh KJ, Einhorn TA. Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *Orthop Clin North Am*. 1999;30: 647-58.
56. Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res*. 1994;28:1127-38.
57. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL Jr, Wozney JM, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Addition of human recombinant bone morphogenetic protein-2 to inactive commercial human demineralized freeze-dried bone allograft makes an effective composite bone inductive implant material. *J Periodontol*. 1998; 69:1337-45.
58. Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res*. 2000;18:289-302.
59. Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT. The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73:750-64.
60. Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa H, Hashimoto J, Suzuki S, Ono K. Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*. 1992;278:274-85.
61. Boyan BD, Lohmann CH, Somers A, Niederauer GG, Wozney JM, Dean DD, Carnes DL Jr, Schwartz Z. Potential of porous poly-D,L-lactide-co-glycolide particles as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 during osteoinduction in vivo. *J Biomed Mater Res*. 1999;46:51-9.
62. Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, Aufdemorte TB, Lohmann CH, Morgan T, Boyan BD. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions

- implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81:1717-29.
63. Kenley R, Marden L, Turek T, Jin L, Ron E, Hollinger JO. Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Biomed Mater Res.* 1994;28:1139-47
 64. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Armstrong R, Schelling SH, Carmel LA. Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;349:205-17.
 65. Lee SC, Shea M, Battle MA, Kozitza K, Ron E, Turek T, Schaub RG, Hayes WC. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *J Biomed Mater Res.* 1994;28:1149-56.
 66. Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials.* 2003;24:4375-83.
 67. Hong L, Tabata Y, Miyamoto S, Yamamoto M, Yamada K, Hashimoto N, Ikada Y. Bone regeneration at rabbit skull defects treated with transforming growth factor-beta1 incorporated into hydrogels with different levels of biodegradability. *J Neurosurg.* 2000;92:315-25.
 68. Minamide A, Kawakami M, Hashizume H, Sakata R, Tamaki T. Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for spinal fusion. *Spine.* 2001;26:933-9.
 69. Laffargue P, Hildebrand HF, Raimate M, Frayssinet P, Amoureux JP, Marchandise X. Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects. *Bone.* 1999;25(2 Suppl):55S-8S.
 70. [da Costa](#) LC, [Taga](#) R, [Taga](#) EM. Rabbit bone marrow response to bovine osteoinductive proteins and inorganic bovine bone. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.* 2001 nov-dec;16(6): 799-808
 71. Ripamonti U, Ma SS, van den Heever B, Reddi AH. Osteogenin, a bone morphogenetic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrata,

- induces rapid bone differentiation in calvarial defects of adult primates. *Plast Reconstr Surg*. 1992;90:382-93.
72. Lee DD, Tofighi A, Aiolo M, Chakravarthy P, Catalano A, Majahad A, Knaack D. alpha-BSM: a biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;367 Suppl:S396-405.
73. den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res*. 2003;21:521-8
74. Gao T, Lindholm TS, Marttinen A, Urist MR. Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. *Int Orthop*. 1996;20:321-5.
75. Ogawa Y, Schmidt DK, Nathan RM, Armstrong RM, Miller KL, Sawamura SJ, Ziman JM, Erickson KL, de Leon ER, Rosen DM. Bovine bone activin enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation. *J Biol Chem*. 1992;267:14233-7.
76. Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*. 1988;234:250-4.
77. Sato K, Urist MR. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin Orthop* 1985; 197:301-11.
78. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S. Bone Formation With the Combination of Simvastatin and Calcium Sulfate in Critical-Sized Rat Calvarial Defect. *J Pharmacol Sci*. 2007; 104:384 –6.
79. Nussenbaum B, Rutherford RB, Krebsbach P H. Bone Regeneration in Cranial Defects Previously Treated with Radiation. *Laryngoscope*. 2005 July; 115(7):1170-1177.
80. Braz F, Rahal S C, Rocha N S, Taga E, Biasi F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em

- crânio de ratos. Acta Cir Bras [serial online] 2003 Jan-Fev;18(1). Available at: <http://www.scielo.br/acb>.
81. [Ahn SH](#), [Kim CS](#), [Suk HJ](#), [Lee YJ](#), [Choi SH](#), [Chai JK](#), [Kim CK](#), [Han SB](#), [Cho KS](#). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 with carriers in rat calvarial defects. [J Periodontol](#). 2003 Jun;74(6):787-97.
 82. [Hong SJ](#), [Kim CS](#), [Han DK](#), [Cho IH](#), [Jung UW](#), [Choi SH](#), [Kim CK](#), [Cho KS](#). The effect of a fibrin-fibronectin/beta-tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. [Biomaterials](#). 2006 Jul;27(20):3810-6.
 83. Ferreira GR, Cestari TM, Granjeiro JM, Taga R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. Braz Dent J. 2004 Sept/Dec;15(3).
 84. Schenk RK. Bone regeneration: biologic basis. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Books; 1994. p.49-100
 85. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop. 1986 Apr; 205.
 86. Sweeney TM, Opperman LA, Persing JA, Ogle RC. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. J Neurosurg 1995.
 87. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM. Bone cell differentiation and growth factors. Science 1983; 220:680-5.
 88. Mendonça, TA. Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*) [Dissertação Mestrado]. Bauru: Universidade de São Paulo/ Faculdade de Odontologia de Bauru; 2005
 89. Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker, MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-(beta) isoforms. Plastic Reconstr Surg. 2000 Aug ;106(2):360-71.

90. Kaban LB, Glowacki J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. *J Dent Res*. 1981 Jul; 60.
91. Taga MLL. Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobaia (*Cavia porcellus*) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.
92. Murray G, Holden R, Rachlau W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg*. 1957;93:385.
93. Campbell JB, Basset CAL. The surgical application of monomolecular filters (Milipore) to bridge gaps in peripheral nerves and to prevent neuroma formation. *Surg Forum*. 1956;7:570-4.
94. Ashley FL, Stone RS et al. Experimental and clinical studies on the application of monomolecular cellulose filter tubes to create artificial tendon sheaths in digits. *Plast Reconstr Surg*. 1959;23:526-34.
95. Hurley LA et al. The role of soft tissue in osteogenesis. An experimental study of canine spinal fusions. *J Bone Joint Surg*. 1959;41A:1243-54.
96. Linghorne WJ. The sequences of events in osteogenesis as studied in polyethylene tubes. *Ann NY Acad Sci*. 1960; 445.
97. Boyne PJ. Regeneration of alveolar bone beneath cellulose acetate filter implants. *J Dental Res*. 1964;43(Abstract 9):827.
98. Nyman S. et al. Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*. 1980 Oct ;7(5):394-401.
99. Nyman S. et al. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982 July;9(4):290-6.
100. Dahlin C et al. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989;4(1):19-25, Spring.
101. Dahlin C et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1988 May;24(1):672-6.

102. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg.* 1991 Mar;74(3):487-91.
103. Dahlin et al. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1990;24(1):13-9.
104. Wang H-L, Carroll WJ. Guided bone regeneration using bone grafts and collagen membranes. *Quintessence Int.* 2001;32(7):504-15.
105. Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Guided bone regeneration in implants dentistry. Chicago: Quintessence books; 1994.
106. Schmitz JP et al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat(Basel).* 1990;138(3):185-92.
107. Linde A et al. Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: an experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993 Aug;51(8):892-7.
108. Ito K, Nanba K, Murai S. Effects of bioabsorbable and non-resorbable barrier membranes on bone augmentation in rabbit calvaria. *J Periodontol.* 1998 Nov;69(11):1229-37.
109. Colangelo P et al. Bone regeneration guided by resorbable collagen membranes in rabbits: a pilot study. *Implant Dent.* 1993;2(2):101-5, Summer.
110. Sevor JJ, Meffert RM, Cassingham RJ. Regeneration of dehiscenced alveolar bone adjacent endosseous dental implants utilizing a resorbable collagen membrane: clinical and histologic results. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993;13(1):71-83.
111. Parodi R, Santarelli G, Carusi G. Application of slow-resorbing collagen membrane to periodontal and peri-implant guided tissue regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1996 Apr;16(2):174-85.
112. Dongieux JW et al. The effect of different membranes on onlay bone graft success in the dog mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Aug;86(2):145-51.

113. Zitzmann NU, Naef R, Scharer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Nov/Dec;12(6):844-52. Erratum in: *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998 July/Aug;13(4):576.
114. Hürzeler MB et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Aug;27(4):315-20.
115. Benque E et al. Tomodensitrometric and histologic evaluation of the combined use of a collagen membrane and a hydroxyapatite space for guided bone regeneration: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Mar/Apr;14(2):258-64.
116. Hockers T et al. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res*. 1999 Dec;10(6):487-98.
117. Brunel G et al. Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases. *J Periodontol*. 2001 Feb;72(2):257-64.
118. Zitzmann NU, Scharer P, Marinello CP. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001 May/June;16(3):355-66.
119. Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros V. A Cellulosic Exopolysaccharide Produced from Sugarcane Molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydrate Polymers*. 2000; 42: 375-383.
120. Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota R, Tenório Filho F. Biopolímero Produzido a Partir da Cana-de-Açúcar para Cicatrização Cutânea, *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002;17(suppl. 1): 1-7.
121. Melo FD. Contribuição ao Estudo Cinético da Produção de Polissacarídeos Extracelulares por *Zoogloea* sp em Melaço de Cana-de-Açúcar [Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2003.

122. Lima FR, Lima JRA, Hirakawa P, Medeiros Junior MD, Lima FMT, Aguiar JLA. Resposta Inflamatória da Membrana de Biopolímero de Cana-de-Açúcar e Telas de Polipropileno Implantadas no Peritônio Parietal de Ratos. An. Fac. Méd.Univ. Fed. Pernamb. 2005;50: 37-40.
123. Vilar FO, Lima SVC, Aguiar JLA. Um novo material para tratamento da incontinência urinária: Estudo em ratos. In: IX Congresso Nacional de Cirurgia Experimental, 2005, Natal. Acta Cirúrgica Brasileira. 2005; 20:319.
124. Vilar FO, Lima SVC, Lucena RG, Aguiar JLA. Utilização do biopolímero de cana-de-açúcar na túnica albugínea: estudo experimental em cães. In: 30º Congresso Brasileiro de Urologia, 2005, Brasília. Publicado no International Brazil J Urol. 2005;30:126.
125. Castro CMMB, Lima SVC, Melo FD, Aguiar JLA, Vilar FO. Citotoxicidade de biopolímero de cana de açúcar. In: 30º Congresso Brasileiro de Urologia, 2005, Brasília. Publicado no International Brazil J Urol. 2005;30:127.
126. Lucena RG, Lima SVC, Vilar FO, Aguiar JLA. Um novo material para o tratamento da incontinência urinária: estudo experimental. In: 30 Congresso Brasileiro de Urologia, 2005, Brasília. Publicado no International Brazil J Urol. 2005;30:105.
127. Chagas AM, Aguiar JLA, Vilar FO, Lima SVC. Uso da membrana de biopolímero de cana de açúcar em reconstrução uretral. In: 30º Congresso Brasileiro de Urologia, 2005, Brasília. Publicado no International Brazil J Urol, 2005;30:43.
128. Andrade, C. E. M. C. ; Aguiar, J. L. A. . Biopolímero De Cana-De-Açúcar: Estudo De Biocompatibilidade. In: Congresso de Iniciação Científica/PIBIC, 2002, Recife. Anais do CONIC/CNPQ/UFPE2002;1:173.
129. Medeiros Jr MD, Pereira AM, Aguiar JLA, Lima JRA. Estudo comparativo da cicatrização de suturas com fios de mononylon 5-0 e com fios de biopolímero de cana-de-açúcar em dorso de ratos. In: V Congresso Norte Nordeste de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial/ III Encontro Cearense de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-

- Facial. Publicado nos Anais do V Congresso Norte Nordeste de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial/ III Encontro Cearense de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial. 2006: P. 189.
130. Castro CMM, Aguiar JLA, Melo FAD, Silva WTF, Marques E, Silva DB. Cito toxicidade de Biopolímero de Cana-de-Açúcar, An. Fac. Méd.Univ. Fed. Pernamb. 2004;49(2):119-123.
131. Silva DB, Aguiar JLA, Marques A, Coelho ARB, Rolim Filho EL. Meringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar e fáscia autóloga em *Chinchilla laniger*. An Fac Med Univ Fed Pernamb 2006; 51:45-51.
132. Marques SRB, Lins EM, Aguiar JLA, Albuquerque MCS, Rossiter RO, Montenegro LT, Vieira RJ. A new vascular substitute: femoral artery angioplasty in dogs using sugarcane biopolymer membrane patch – hemodynamic and histopathologic evaluation. J Vasc Bras. 2007;6(4):309-15.
133. Cavalcante AHM. Imobilização de Tripsina em Membranas Produzidas por *Zoogloea* sp. [Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco;2005.
134. Cavalcante AHM, Carvalho Jr LB, Carneiro da Cunha MG. Cellulosic Exopolysaccharide Produced by *Zoogloea* sp as a Film Support for Trypsin Immobilisation, Biochemical Engineering Journal, 2006.
135. Aguiar JLA, Lins EM, Marque SRB, Coelho ARB, Rossiter RO, Melo RJV. Sugarcane Biopolymer Patch in Femoral Artery Angioplasty on Dogs. Acta Cirúrgica Brasileira. 2007;22:77-81.
136. Falcão SC. Membranas de celulose microbiana (*Zoogloea* sp.) e de politetrafluoretileno expandido na reconstrução de defeitos produzidos na parede abdominal de ratos. Estudo comparativo [Tese Doutorado em Ciência Veterinária]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2007.
137. Nérís MA. Desenvolvimento e Caracterização de Gel de Biopolímero Produzido pela Fermentação de Melaço da Cana-de-

- Açúcar pelo Microorganismo Zoogloea sp Contendo Ácido Úsnico [Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco: 2007.
138. Aires AL, Araújo SB, Paz ST, Abreu-e-Lima MC. Padronização da Técnica de Descalcificação de Cabeça de Rato realizada no Mestrado em Patologia – HC UFPE. Anais do VI Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFPE / XIII Congresso de Iniciação Científica. 2005.
139. Michalany J. Anatomia Patologica – Prática e Propedêutica. São Paulo: Lemos, 2005.
140. Michalany J. Técnica Histologica em Anatomia Patologica – com Instrução para Cirurgião, Enfermeira e Citotécnico. 3 ed. São Paulo: Michelany, 1998.
141. Altman, D. G. Practical Statistics for Medical Research. Chapman and Hall. 1991, Great Britain, London, 611 pg.
142. Conover, W.J. John Wiley & Sons. 2th Edition. New York 1980 – 495 pg.
143. Taga R, Cestari TM, Silva TL, Stipp ACM. Reparo de Defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. Available at: <http://www.ibi-implante.com.br/Artigos/reparo%20defeito%20osseo%20perene.htm>. Accessed in 16/04/08
144. Bassi APF, Carvalho PSP. Repair of Bone Cavities in Dog's Mandible Filled with Inorganic Bovine Bone and Bioactive Glass Associated with Platelet Rich Plasma. Braz Dent J. 2011;22(1):14-20.

ANEXOS

Normalização

Esta tese está de acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver)

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

International Committee of Medical Journal Editors
Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to
Biomedical Journals: Sample References
Updated February 2006

Last reviewed: 15 July 2011

Last updated: 15 July 2011

First published: 09 July 2003

Metadata | Permanence level: Permanent: Dynamic Content

Copyright, Privacy, Accessibility

U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda,
MD 20894

National Institutes of Health, Health & Human Services

www.icmje.org/

www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 01/06

Recife, 13 de fevereiro de 2006

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: Prof. José Lamartine Aguiar
Departamento de Cirurgia - UFPE

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO NOS DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATO".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA