UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao
Aparelho Locomotor

BRUNA LEONEL CARLOS

Efeitos da membrana de látex na regeneração de
defeito ósseo em tibia de rato

Ribeirão Preto

2017

BRUNA LEONEL CARLOS

Efeitos da membrana de látex na regeneração de defeito ósseo em tíbia
de rato

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Carlos, Bruna Leonel
Efeitos da membrana de látex na regeneração de
defeito ósseo em tibia de rato. Ribeirão Preto, 2017.
p.102; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Shimano, Antônio Carlos.

1. Regeneração óssea. 2. Látex. 3. *Hevea
brasiliensis*. 4. Rato.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CARLOS, Bruna Leonel

Título: Efeitos da membrana de látex na regeneração de defeito ósseo em tíbia de rato.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

A Deus, que me sustentou, para que eu chegasse até aqui. Me confortou nos momentos de saudade e guiou meus passos nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Adriana e Divino, por me incentivarem e apoiarem em todos os momentos. Se hoje estou aqui, foi porque vocês estavam ao meu lado e acreditaram em mim.

À minha irmã Nara, por despertar em mim a vontade de ser sempre melhor.

Obrigada por tudo!

Amo vocês!

Agradecimientos

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano, por todos seus ensinamentos, profissionais e de vida. Pelo amparo, compreensão e preocupação com nosso crescimento profissional e pessoal. Agradeço, por todos os exemplos de profissionalismo e de caráter, eles são fonte de inspiração, para que eu seja uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José B. Volpon, por permitir o acesso e utilização dos recursos do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor Prof. Dr. Marcelo Riberto e à secretária Rita de Cássia Stela Cossalter pela paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Rondinelli Donizete Herculano, por toda ajuda, disponibilidade e por compartilhar seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa, por suas orientações, valiosas contribuições e ajuda na realização das análises histológicas.

Ao Prof. Dr. Plauto Christopher Aranha Watanabe, pela colaboração para realização das análises radiológicas.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia Ariane Zamarioli, Carlos Alberto Moro, Luís Henrique Alves Pereira, Maria Teresinha de Moraes, Reginaldo Trevilato da Silva, Carmelita Maria Cândido (Lu) e Ismar Ribeiro, por toda colaboração, ajuda e agradável convívio. Deixo aqui, meu agradecimento especial ao técnico Francisco Mazzocato, por ser sempre prestativo e colaborar na realização deste trabalho, mas, além disso, por sua valiosa amizade.

À técnica Junia Ramos, por toda sua responsabilidade e grandiosa generosidade em ajudar e ensinar as técnicas histológicas. Agradeço por todo o tempo e dedicação despendidos.

À técnica e amiga Ana Paula Macedo, por todo seu apoio, conselhos e valiosa ajuda. Minha sincera admiração, pelo exemplo de profissional ética, dedicada e generosa.

À Dra. Bruna Gabriela Kotake de Oliveira, pela colaboração para a realização da análise imunohistoquímica.

Ao técnico Tarciso José Rodrigues Junior por toda sua ajuda para realização das radiografias.

Ao colega e professor Álvaro César de Oliveira Penoni, por acreditar em mim e tornar esse mestrado possível. Você é fonte de inspiração.

À amiga Gabriela Rezende Yanagihara, pela amizade que construímos durante esse período. Por toda sua ajuda, conselhos e companheirismo. Te admiro por sua humildade e disponibilidade em ajudar, independente das situações. Ribeirão Preto não seria a mesma sem você.

Às amigas Brígida Batista Bancaleon e Jessica Suzuki Yamanaka, pela amizade e por compartilharem comigo suas experiências acadêmicas, crescendo e aprendendo juntas.

Às queridas Jacqueline Atsuko Tida e Roberta Carminati Shimano pela amigável acolhida e por todos os conhecimentos compartilhados.

A todos os meus familiares, tios, tias, avós e primos, por todo carinho e torcida. A Nestor Vicente Soares Neto, por estar ao meu lado e ser meu porto seguro nos momentos difíceis. Aos amigos, que mesmo distantes fisicamente, nunca deixaram de estar ao meu lado.

Ao Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Laboratório da Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

*“Espera no Senhor, anima-te, e ele fortalecerá o teu
coração; espera, pois, no Senhor.*

(Salmo 27:14)

Resumo

RESUMO

CARLOS, B. L. Efeitos da membrana de látex na regeneração de defeito ósseo em tíbia de rato. 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Problemas de consolidação óssea são um grande desafio clínico, pois geram altos custos de tratamento, morbidades e prejuízos a qualidade de vida. A técnica de regeneração óssea guiada é empregada com o intuito de promover a melhora no processo de regeneração de defeitos ósseos através da utilização de barreiras biológicas, que protegem o local da lesão e favorecem a ação de células osteogênicas. A membrana de látex natural, extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* tem sido apontado como um biomaterial promotor da regeneração em diferentes tecidos, e por este motivo escolhido como objeto de estudo desta pesquisa. O objetivo foi avaliar o efeito da utilização de membrana de látex natural no processo de regeneração guiada de defeito ósseo em ossos longos de ratos, através de análises estruturais, radiológicas, microscópicas e da expressão de proteínas osteogênicas. Foram utilizados sessenta ratos *Wistar* divididos igualmente em quatro grupos (n=15), sendo: animais tratados com membrana de látex por uma (L1) ou quatro semanas (L4) e animais que não receberam tratamento específico por uma (C1) ou quatro semanas (C4). Um defeito ósseo de 2,5 mm de diâmetro foi realizado na região medial da tíbia esquerda de cada animal. Nos animais do grupo tratado, uma membrana de látex foi posicionada sobre os defeitos ósseos. Após os períodos experimentais de uma ou quatro semanas os animais foram submetidos a eutanásia e a tíbia esquerda de cada animal foi dissecada, limpa das partes moles e submetida às análises macroscópica, densitométrica, radiológica, mecânica, histomorfométrica, estereológica e imunohistoquímica. A influência das variáveis tempo e membrana, bem como a interação tempo*membrana sobre os dados foram avaliadas. Para os dados referentes à imunomarcagem de osteocalcina foi aplicado teste de modelo linear generalizado com fatores independentes. Para o restante dos resultados foi realizada análise de ANOVA multivariada com dois fatores independentes. Todas as comparações foram realizadas com ajuste de Bonferroni e adotado nível de significância de 5%. Foram observadas diferenças estatisticamente

significantes em relação a variável tempo, em que grupos avaliados quatro semanas após a cirurgia apresentaram resultados superiores para as medidas de comprimento ($p<0,001$), massa ($p<0,001$), força máxima ($p<0,001$) e rigidez relativa da tíbia ($p<0,001$), bem como para as medidas de densidade radiológica ($p=0,008$), densidade mineral óssea ($p=0,017$), volume ósseo neoformado ($p<0,001$) e fibras de colágeno tipo III ($p<0,001$). Em relação à utilização da membrana de látex, os grupos tratados apresentaram resultados estatisticamente superiores para as análises de rigidez relativa ($p=0,048$), fibras de colágeno tipo I ($p=0,018$), volume ósseo neoformado ($p<0,001$) e expressão de osteopontina ($p=0,037$). Concluimos que a utilização de membrana de látex em regeneração óssea guiada em defeitos realizados em tíbias de ratos melhorou sensivelmente a regeneração do tecido.

Palavras-chave: Regeneração óssea; Látex; *Hevea brasiliensis*; Rato.

Abstract

ABSTRACT

CARLOS, B. L. Effects of latex membrane on regeneration of bone defect in rat tibia. 2017. 102 f. Dissertation (Master degree) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2017.

Problems of bone consolidation are a significant clinical challenge, as they generate high treatment costs, morbidities, and damages to the quality of life. The guided bone regeneration technique is used to improve the regeneration process of bone defects through the use of biological barriers that protect the site and favor the action of osteogenic cells. The natural latex membrane extracted from the rubber tree *Hevea brasiliensis* has been identified as a biomaterial promoting regeneration in different tissues, and for this reason chosen as the object of study of this research. The objective was to evaluate the effect of the use of natural latex membrane in the process of guided regeneration of bone defect in long bones of rats, through structural, radiological, microscopic analysis and the expression of osteogenic proteins. Sixty Wistar rats were equally divided into four groups (n = 15): latex membrane treated animals for one (L1) or four weeks (L4) and animals that received no specific treatment for one (C1) or four weeks (C4). A bone defect of 2.5 mm diameter was performed in the medial region of the left tibia of each animal. In the animals of the treated group, a latex membrane was positioned over the bone defects. After the experimental periods of one or four weeks, the animals were submitted to euthanasia, and the left tibia of each animal was dissected, cleaned of soft parts and submitted to macroscopic, densitometric, radiological, mechanical, histomorphometric, stereological and immunohistochemical analysis. The influence of the variable time and membrane as well as the time * membrane interaction on the data were evaluated. For the data referring to the osteocalcin immunostaining, a generalized linear model with independent factors was applied. For the rest of the results, a multivariate ANOVA analysis was performed with two independent factors. All comparisons were performed with Bonferroni adjustment and adopted a significance level of 5%. Statistically significant differences were observed in relation to the time variable, in which groups evaluated four weeks after surgery presented superior results for the measures of length (p <0.001), mass (p <0.001), maximal

strength ($p < 0.001$) and stiffness ($P < 0.001$), as well as for measurements of radiological density ($p = 0.008$), bone mineral density ($p = 0.017$), neoformed bone volume ($p < 0.001$) and type III collagen fibers ($p < 0.001$). About the use of the latex membrane, the treated groups presented statistically superior results for analyzes of relative stiffness ($p = 0.048$), type I collagen fibers ($p = 0.018$), neoformed bone volume ($p < 0.001$) and expression of Osteopontin ($p = 0.037$). We conclude that the use of latex membrane in guided bone regeneration in defects performed in rat tibiae significantly improved tissue regeneration.

Keywords: Bone regeneration; Latex; *Hevea brasiliensis*; Rat.

Listas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do experimento.....	52
Figura 2: A) Mensuração da tíbia do animal para que fosse localizada a porção central B) Incisão de 1 cm na porção central do membro C) Posicionamento do afastador após secção da pele D) Posicionamento do afastador após secção da musculatura para exposição da tíbia.	53
Figura 3: A) Broca trefina de 2mm de diâmetro interno, acoplado a um motor de baixa rotação. B) Delimitação do defeito ósseo. C) Defeito ósseo. D) Posicionamento da membrana de látex.	54
Figura 4: A) Látex líquido depositado em placa de <i>Petri</i> B) Membrana de látex natural após 42h em estufa a 24° C) Espessura da membrana D) Membrana moldada para utilização no procedimento cirúrgico.....	55
Figura 5: Medidas macroscópicas A) Comprimento da tíbia esquerda. B) Distância entre extremidade proximal da tíbia e região do defeito ósseo.....	56
Figura 6: Imagem das tíbias no densitômetro.....	58
Figura 7: Esquema demonstrativo das medidas realizadas para posicionamento do ROI sobre o defeito ósseo.....	58
Figura 8: Radiografia da tíbia esquerda, em incidência látero-lateral (L-L), sendo possível visualizar o defeito ósseo indicado com a seta.....	59
Figura 9: Tíbia de rato preparada para ensaio de flexão de três pontos.....	60
Figura 10: A) Tíbia com o defeito (face medial) foi girada em 90°, de modo que o defeito ficasse para baixo, ao ser preparado os blocos de parafina. De acordo com esse procedimento a face medial da tíbia ficou exposta para corte. B) Bloco de parafina com face medial da tíbia exposta.	61
Figura 11: Aparência do defeito, grupo L1, a partir de corte corado com a técnica de <i>tricomio de Masson</i> em aumento de 50x.....	62

Figura 12: A) Delimitação do defeito ósseo. B) Área total preenchida por sistema de teste. C) Delimitação da área de tecido ósseo no defeito. D) Representação da área final desprezando a região que não representa tecido ósseo (nas lacunas vazias).	63
Figura 13: A) Aparência do defeito ósseo corado pela técnica de <i>Picro Sirius red</i> , em lâmina do grupo L1 B) Seleção das fibras de colágeno. As fibras de colágeno tipo I foram marcadas em azul e tipo III em vermelho. C) Seleção final, excluído as demarcações fora da área de interesse.	64
Figura 14: Imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura. A) Membrana sem uso. B) Membrana utilizada nos defeitos ósseos.	68
Figura 15: Gráfico da morfologia das tíbias quanto ao comprimento	69
Figura 16: Gráfico da morfologia das tíbias quanto a massa	70
Figura 17: Gráfico das densidades minerais ósseas na região do defeito ósseo nas tíbias	70
Figura 18: Radiografia digital das tíbias esquerdas.	71
Figura 19: Intensidade radiológica	71
Figura 20: Gráfico da força máxima das tíbias	72
Figura 21: Gráfico da rigidez relativa das tíbias	73
Figura 22: Fotomicrografia das fibras de colágeno sob luz polarizada na região do defeito ósseo (Picro sirius, em aumento de 50x).	73
Figura 23: Gráfico do percentual de área de colágeno tipo III sobre o defeito ósseo, obtido por meio da razão de área de colágeno (Col.Ar - μm^2) pela área total avaliada (Tt.Ar - μm^2)	74
Figura 24: Gráfico do percentual de área de colágeno tipo I sobre o defeito ósseo, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total avaliada (μm^2)	75
Figura 25: Fotomicrografia do osso neoformado na região do defeito ósseo para os grupos (aumento de 50x).	75
Figura 26: Fotomicrografia da coloração de tricrômio de Masson mostrando histologicamente a nova formação óssea na região do defeito ósseo nos grupos de uma semana. A) C1 em aumento de 50x. B) C1 em aumento de 200x. TC: tecido	

conjuntivo, ON: osso neoformado e setas indicam a presença de vasos sanguíneos.
.....76

Figura 27: Fotomicrografia da coloração de tricrômio de Masson mostrando histologicamente a nova formação óssea na região do defeito ósseo após quatro semanas da cirurgia no grupo tratado com membrana de látex. A) aumento de 50x. B) aumento de 200x. TC: tecido conjuntivo, TC: Tecido ósseo e setas indicam a presença de vasos sanguíneos.....76

Figura 28: Fotomicrografia da coloração de tricrômio de Masson mostrando histologicamente a nova formação óssea na região do defeito ósseo após quatro semanas da cirurgia no grupo controle com membrana de látex. A) aumento de 50x. B) aumento de 200x. TC: tecido conjuntivo, TC: Tecido ósseo, ON: osso neoformado, CM: cavidades medulares.....77

Figura 29: Gráfico do volume ósseo neoformado expresso pela razão do volume de osso na região do defeito ($BV - \mu m^3$) pelo volume total da região do defeito ósseo ($TV - \mu m^3$), apresentado em %.....78

Figura 30: Gráfico da análise imunohistoquímica de Osteocalcina na região do defeito ósseo apresentada pela área (μm^2) com imunomarcção de osteocalcina. .78

Figura 31: Área imunomarcada positivamente para osteopontina expressa em cor castanha. (Osteopontina, aumento de 20x).....79

Figura 32: Gráfico da análise imunohistoquímica de osteopontina na região do defeito ósseo apresentada pela área (μm^2) com imunomarcção de osteopontina. .79

Figura 33: Área imunomarcada positivamente para osteopontina expressa em cor castanha. (Osteopontina, aumento de 200x).....80

LISTA DE ABREVIações

EUA	Estados Unidos da América
ROG	Regeneração óssea guiada
M-CSF	Fator estimulador da colônia de macrófagos
RANKL	Ligante do fator nuclear Kappa β
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa β
OPG	Osteoprogenina
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
OPN	Osteopontina
OC	Osteocalcina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
IL	Interleucina
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
C1	Grupo controle uma semana
C4	Grupo controle quatro semanas
L1	Grupo látex uma semana
L4	Grupo látex quatro semanas
ROI	Região de interesse do objeto
DMO	Densidade mineral óssea
c1	Comprimento da tíbia na escala real

p1	Posição do defeito na escala real
c2	Comprimento da tíbia imagem escaneada pelo densitômetro
p2	Posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
PBS	Solução de tampão de fosfato salina
BV	Volume ósseo
TV	Volume total

LISTA DE UNIDADES

mm	milímetro
g	gramas
°C	grau Celsius
mg	miligrama
kg	kilograma
cm	centímetro
rpm	rotações por minuto
ml	mililitro
cm ²	centímetro quadrado
N	Newton
min	minuto
mm ²	milímetro quadrado
μm	micrometro
μm ²	micrometro quadrado
μm ³	micrometro cúbico
kcal	quilocaloria

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
α	alfa
β	beta
$\pm$	mais ou menos
®	marca registrada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características do látex natural.....	54
---	----

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	32
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1	Tecido ósseo	35
2.1.1	Remodelação óssea	36
2.2	Regeneração óssea	37
2.2.1	Regeneração óssea indireta	38
2.2.2	Regeneração óssea direta	42
2.3	Regeneração óssea guiada	43
2.4	Látex natural	45
2.5	Hipóteses	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	Objetivo geral	49
3.2	Objetivo específico	49
4	MATERIAIS E MÉTODO	51
4.1	Ética experimental	51
4.2	Animais experimentais	51
4.3	Grupos experimentais	51
4.4	Procedimento cirúrgico	52
4.5	Produção das membranas de látex natural	54
4.6	Eutanásia e coleta do material	55
4.7	Análise macroscópica	56
4.8	Microscopia Eletrônica de Varredura	56

4.9	Análise da densidade mineral óssea	57
4.10	Análise radiográfica.....	59
4.11	Ensaio mecânico.....	60
4.12	Análise histológica	60
4.12.1	Quantificação da neoformação óssea	61
4.12.2	Quantificação colágeno tipo I e III	64
4.13	Análise imunohistoquímica	65
4.13.1	Quantificação das proteínas imunomarcadas	65
4.14	Análise estatística.....	66
5	RESULTADOS.....	68
5.1	Avaliação clínica	68
5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	68
5.3	Morfologia óssea.....	69
5.4	Densidade mineral óssea	70
5.5	Radiografia Digital	71
5.6	Força máxima.....	72
5.7	Rigidez relativa.....	72
5.8	Colágeno tipo III	73
5.9	Colágeno tipo I	74
5.10	Volume ósseo neoformado	75
5.10.1	Análise qualitativa	75
5.10.2	Análise quantitativa	77
5.11	Osteocalcina	78
5.12	Osteopontina.....	79
6	DISCUSSÃO	82

7	CONCLUSÃO	90
8	REFERÊNCIAS.....	92
	ANEXOS.....	99
	APENDICE	101

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Embora o tratamento para auxiliar a regeneração óssea tenha melhorado nos últimos anos, um grande número de fraturas ainda exibem problemas de consolidação (HORNER et al., 2010). Nos Estados Unidos da América (EUA) as falhas de consolidação e não uniões ocorrem em até 10% do total de fraturas, gerando altos custos de tratamento, aumento da taxa de morbidade e danos à qualidade de vida (BUZA; EINHORN, 2016; HAK et al., 2014).

Os ossos são órgãos metabolicamente ativos que possuem a capacidade de regenerar-se sem a formação de uma cicatriz fibrosa, recuperando suas características fisiológicas e mecânicas (BUZA; EINHORN, 2016; MCKIBBIN, 1978). Apesar da capacidade de auto regeneração do osso, diversos fatores podem prejudicar esse processo, tais como grandes defeitos ósseos resultantes de cirurgias ou traumas, instabilidades mecânicas, prejuízos no suprimento sanguíneo, processos infecciosos, presença de tecidos não osteogênicos competitivos, além de fatores dependentes do paciente, como idade, doenças associadas, fumo e deficiências nutricionais (GREEN; LUBAHN; EVANS, 2005).

O sucesso no processo regenerativo do osso depende de um conjunto de fatores, que englobam a formação de um coágulo sanguíneo, vascularização local adequada, processo inflamatório controlado, exclusão de tecidos não osteogênicos competitivos, dimensões do defeito ósseo, estabilidade mecânica e presença de células ósseas e fatores de crescimento (LOI et al., 2016; MARSELL; EINHORN, 2011).

A regeneração óssea guiada (ROG) é uma técnica utilizada para melhorar o processo de regeneração em grandes defeitos ósseos. Esta técnica se baseia no princípio da osteopromoção, com a utilização de uma membrana sobre o defeito com objetivo de prevenir a invasão local de células não osteogênicas, proteger o coágulo sanguíneo, promover a invasão de células osteoprogenitoras, melhorar a estabilidade local e induzir a formação de tecido ósseo (GRUBER; STADLINGER; TERHEYDEN, 2016).

Nos últimos anos, uma série de pesquisas tem sido realizadas com o objetivo de desenvolver materiais que possuam características de biocompatibilidade e osteointegração para uso em ROG. Diferentes tipos de membranas, tanto absorvíveis quanto não absorvíveis, tem sido utilizadas. Apesar de o uso de membranas absorvíveis eliminar a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para retirada da membrana, pesquisas tem demonstrado que sua utilização pode estar associada a reações inflamatórias, além de não apresentarem resultados tão satisfatórios quando comparadas às membranas não absorvíveis e por esse motivo membranas não absorvíveis são consideradas o padrão ouro para utilização em ROG (AABOE et al., 1998; DUPOIRIEUX et al., 2001; HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996).

O látex natural, extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, é um composto que possui a capacidade de melhorar processos regenerativos de diferentes tecidos, estimulando a angiogênese, adesão celular e formação de matriz extracelular (ANDRADE et al., 2011; FRADE et al., 2012). Devido à sua capacidade de auxiliar no reparo tecidual, o látex natural tem sido apontado como alternativa para melhorar a regeneração óssea, podendo ser utilizado como membrana na técnica de ROG (ERENO et al., 2010). As vantagens da membrana de látex podem ser explicadas por se tratar de um material biocompatível, de baixo custo e fácil manipulação que estimula a angiogênese e a regeneração tecidual (BALABANIAN et al., 2006; MORAES et al., 2012; ZIMMERMANN, 2012).

Os estudos sobre os efeitos da utilização de membranas a base de látex em ROG são escassos na literatura científica. As poucas pesquisas já realizadas envolvem o uso do látex em sua forma líquida ou membranosa em ossos achatados do crânio ou osso alveolar, porém não existem trabalhos que investiguem melhor as influências da membrana sobre as alterações biológicas no processo de regeneração, como por exemplo alterações na expressão de proteínas osteogênicas (ERENO et al., 2010; MOURA et al., 2014). Além disso, apesar da ROG ser amplamente utilizada em reconstruções maxilofaciais, poucas pesquisas tem sido realizadas com o intuito de analisar os efeitos da técnica em ossos longos, do esqueleto axial. Fica evidenciada, portanto, a necessidade de mais estudos que comprovem a eficácia da membrana de látex para regeneração do tecido ósseo e sua aplicabilidade em ROG de ossos longos.

Revisão bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecido ósseo

Os ossos são órgãos metabolicamente ativos compostos por um complexo tecido formado por células, matriz óssea e membranas conjuntivas, que formam a estrutura esquelética e exercem funções importantes ao organismo, como: sustentação do corpo, proteção dos órgãos internos e da medula óssea, armazenamento de cálcio e fosfato, participação na homeostase mineral e na hematopoese, além de trabalharem como um sistema de alavancas, que juntamente com o sistema muscular, é responsável pela locomoção (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006).

O tecido ósseo é composto por matriz orgânica (30-35%) e inorgânica (65-70%). A porção inorgânica consiste basicamente de cristais de hidroxapatita, que conferem rigidez ao osso, enquanto que, a porção orgânica é representada por proteoglicanos, proteínas colágenas, e proteínas não colágenas, que são responsáveis por manter as propriedades elásticas do osso (ANDRADE et al., 2007).

Macroscopicamente os ossos são formados por osso compacto (sem cavidades visíveis) e osso esponjoso (várias cavidades intercomunicantes). Apesar de variarem suas características macroscópicas, o osso compacto e o esponjoso apresentam a mesma configuração histológica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Estruturalmente os ossos podem ser classificados em ossos longos, curtos e chatos. Os ossos longos, como por exemplo, fêmur e tíbia, possuem comprimento maior que a largura e constituem-se de um corpo, chamado diáfise e duas extremidades denominadas epífises. A diáfise é formada por osso compacto e possui um canal onde fica alojada a medula óssea. As epífises, por sua vez, são formadas principalmente por tecido ósseo esponjoso. De modo a envolver a diáfise óssea existe uma camada de tecido conjuntivo denominado perióstio que possui propriedades osteogênicas capazes de auxiliar nos processos de formação e regeneração óssea (TORTORA, GERARD J. DERRICKSON, 2012).

2.1.1 Remodelação óssea

Os ossos sofrem constante processo de renovação tecidual, sendo capazes de adaptar sua estrutura a estímulos mecânicos, reparar danos estruturais e manter a integridade biomecânica do tecido (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006). A renovação tecidual é um processo complexo, ordenado por células ósseas, em um ciclo de duas fases principais: reabsorção óssea pelos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteoclastos são células ósseas multinucleadas de origem hematopoiética responsáveis pela reabsorção óssea. A ligação entre o fator nuclear kappa β (RANK) e seu ligante (RANKL) induzem a expressão de genes que caracterizam a linhagem osteoclástica. Em contrapartida, a diferenciação de osteoclastos é inibida pela ação da osteoprotegerina (OPG), que se liga ao receptor RANK, impedindo sua ação (BOYCE; XING, 2008).

Os osteoblastos, por sua vez, são derivados de células tronco mesenquimais e são responsáveis pela síntese de matriz óssea. Essas células têm a capacidade de migração, proliferação e diferenciação em osteócitos e células de revestimento. As células precursoras de osteoblastos estão presentes na medula óssea, endóstio e perióstio. Além disso, as células denominadas perícitos, localizadas perifericamente aos vasos sanguíneos, também são precursoras osteogênicas, e por esse motivo, a vascularização óssea é um fator estritamente relacionado ao processo de formação de tecido ósseo (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006).

A síntese de matriz óssea pelos osteoblastos ocorre em duas etapas principais. Primeiramente há a deposição de uma matriz orgânica, composta principalmente por colágeno tipo I (representa 90% da matriz orgânica) e proteínas não colágenas, como osteopontina (OPN) e osteocalcina (OC). A segunda etapa se dá pela mineralização da matriz orgânica, essencial para formar o osso.

Durante o processo de formação da matriz óssea, as proteínas são importantes para a diferenciação de células osteoprogenitoras e manutenção do volume ósseo. A OPN é uma glicoproteína secretada por osteoblastos, e está presente na matriz orgânica do osso. Ela tem papel importante na regulação do processo de mineralização, estimulando ou inibindo a formação de cristais de hidroxiapatita, além de regular a proliferação e adesão celular (SUBRAMAN et al., 2015). A OC é uma proteína que desempenha importante função na ligação do

cálcio à matriz orgânica do osso e regula a atividade dos osteoclastos. Ela está expressa em osteoblastos maduros e por esse motivo é considerada um marcador da fase final de remodelação óssea (LI et al., 2016).

Ao final da síntese do tecido ósseo, os osteoblastos, envolvidos por matriz calcificada, sofrem apoptose ou diferenciam-se em osteócitos ou células de revestimento.

O processo de remodelação óssea é regulado tanto por estímulos bioquímicos (hormônios e fatores de crescimento) quanto por estímulos mecânicos. As cargas mecânicas aplicadas sobre o osso desempenham função primordial na manutenção do tecido ósseo, pois os sinais mecânicos são transformados em sinais biológicos que estimulam a osteogênese (ROSA et al., 2015).

As cargas mecânicas são reconhecidas pelas células ósseas através de um processo denominado mecanotransdução, que produz alterações bioquímicas que atuam em nível celular levando a inibição da apoptose, aumento da proliferação celular, dentre outros efeitos que auxiliam a osteogênese (GUSMÃO; BELANGERO, 2009).

Além da mecanotransdução, outro efeito importante causado por forças externas aplicadas sobre o tecido ósseo é o efeito piezoelétrico. A deformação óssea leva a ativação de canais iônicos mecanossensíveis, principalmente de cálcio e potássio, induzindo o fluxo iônico na célula óssea, gerando potenciais de membrana, que são negativos (hiperpolarização) em áreas de compressão e positivos (despolarização) nos locais de tração. A hiperpolarização está associada a osteogênese, enquanto que a despolarização, com a reabsorção óssea (BUTCHER et al., 2008; ROSA et al., 2015).

2.2 Regeneração óssea

A regeneração óssea é um complexo processo biológico que visa reestabelecer as características fisiológicas e biomecânicas dos ossos, apresentando uma sequência de eventos específicos que podem ser influenciados por fatores anatômicos, bioquímicos e mecânicos.

A regeneração ocorre de forma direta, com formação óssea intramembranosa, ou indireta, que consiste de formação óssea intramembranosa e

endocondral (MARSELL; EINHORN, 2011). O tipo e local da fratura, as forças mecânicas aplicadas no local da lesão e principalmente o grau de movimento entre os fragmentos ósseos são fatores que determinam a mecanobiologia da cicatrização óssea (CLAES, 2011). O movimento moderado entre os fragmentos ósseos leva à regeneração óssea endocondral, com formação de um calo ósseo, enquanto que, mínima quantidade de movimento entre os fragmentos resulta em regeneração óssea intramembranosa, com formação óssea direta, a partir da conversão de tecido mesenquimal em osso (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012).

2.2.1 Regeneração óssea indireta

Em grande parte das fraturas, a regeneração óssea acontece indiretamente e envolve uma resposta inflamatória aguda, formação de um calo ósseo primário, calcificação do calo ósseo e finalmente a remodelação óssea. Este tipo de regeneração ocorre principalmente em ossos longos e não necessita de redução e estabilização rígida da fratura. Entretanto, a regeneração óssea indireta está mais sujeita a falhas, podendo atrasar o processo de consolidação ou até mesmo levar a má união ou pseudoartrose (MARSELL; EINHORN, 2011).

2.2.1.1 Processo Inflamatório

O trauma associado a fratura causa o rompimento de vasos sanguíneos, hipóxia local e lesão de células e tecidos, o que ativa um processo inflamatório agudo. Essa etapa é importante para iniciar o reparo tecidual, pois estimula a angiogênese, atrai e promove a diferenciação celular e aumenta a síntese de matriz extra celular (SCHMIDT-BLEEK et al., 2012; KOLAR et al., 2010).

O processo inflamatório agudo tem início logo após o trauma e atinge seu pico nas primeiras 24 horas após a lesão. Apesar de ser de extrema importância nos estágios iniciais, o processo inflamatório tem efeitos negativos sobre o osso e por isso a secreção de moléculas pró-inflamatórias após a lesão deve ser breve e bem regulada, durando cerca de 7 dias (MARSELL; EINHORN, 2011).

Após o trauma, o extravasamento de sangue decorrente da ruptura dos vasos sanguíneos leva a conversão do fibrogênio em fibrina, pela ação da trombina. A fibrina juntamente com as plaquetas formam um coágulo sanguíneo. O coágulo

tem um importante papel nos estágios iniciais de regeneração, pois será utilizado como molde para a formação do calo ósseo. Além disso, a liberação de citocinas para a degranulação das plaquetas dá início ao processo inflamatório agudo (TERHEYDEN et al., 2012).

Diversas células, citocinas e fatores angiogênicos estão envolvidos no processo inflamatório agudo. Nos estágios iniciais da inflamação há a ativação do sistema imunológico, onde neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos são recrutados. Neutrófilos polimorfonucleares são células de vida curta responsáveis pela fagocitose de bactérias e pela liberação de citocinas que atraem os macrófagos (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012). Os neutrófilos se acumulam rapidamente no local da lesão e são atraídos por substâncias incluindo: produtos da polimerização do fibrinôgeno, produtos da fibrinólise, fator de ativação plaquetário, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 8. Muitos desses fatores são produzidos por neutrófilos e macrófagos presentes no local da lesão e pela morte celular (TERHEYDEN et al., 2012).

Os macrófagos por sua vez, têm papel importante no processo inflamatório e na regeneração óssea, pois além de serem responsáveis pela fagocitose de células e remoção de detritos, influenciam na formação óssea através da liberação de fatores químicos que controlam a inflamação, estimulam a angiogênese e dão origem a osteoclastos (TERHEYDEN et al., 2012).

Um dos principais fatores expresso por macrófagos é o TNF- α que é um agente químico que induz a diferenciação de células tronco mesenquimais em células osteogênicas, atuando principalmente na ativação de osteoclastos. Além do TNF- α , outras citocinas são liberadas, tais como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), Interleucinas (Il-1 e Il-6 principalmente), RANKL, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e fatores de crescimento transformadores (TGF- β) principalmente, BMP 2, BMP 4, BMP 5 e BMP 6 (MARSELL; EINHORN, 2011).

Estimulados pela ação de bFGF, os fibroblastos dirigem-se para o local da fratura e liberam metaloproteinases que degradam a matriz de fibrina, substituindo o coágulo por um tecido de granulação rico em colágeno. (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012).

Durante a fase inicial do processo inflamatório também são liberados fatores angiogênicos, principalmente angiopoetina 1 e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), descritos nos capítulos subsequentes (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012).

2.2.1.2 Revascularização e neoangiogênese

Uma rede de suplemento sanguíneo no local da fratura é fundamental para regeneração óssea (MARSELL; EINHORN, 2011), pois reestabelece condições adequadas de oxigenação tecidual, além de ser um fluxo para a remoção de produtos metabólicos e proporcionar acesso para células osteoprogenitoras ao local da lesão (SCHMIDT-BLEEK et al., 2012; GRUBER; STADLINGER; TERHEYDEN, 2016).

Após o trauma, o fluxo sanguíneo diminui devido à ruptura de vasos e a vasoconstrição fisiológica. Nas fases subsequentes, há um aumento gradativo da vascularização (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012). A degranulação de plaquetas e a consequente liberação de substâncias, como a bradicinina e histamina, são responsáveis pela vasodilatação. A bradicinina aumenta a permeabilidade vascular enquanto que as histaminas vasodilatadoras aumentam o fluxo sanguíneo (TERHEYDEN et al., 2012).

A angiogênese por sua vez é estimulada pela hipóxia inicial. Macrófagos são atraídos pela hipóxia local e estimulam a expressão de VEGF, que promove a vasculogênese (proliferação e agregação de células tronco mesenquimais endoteliais em um plexo vascular) e a angiogênese (crescimento de vasos a partir de vasos já existentes). Proteínas morfogenéticas vasculares (principalmente angiopoietinas 1 e 2) também são importantes nesse processo, pois promovem um crescimento vascular inicial, a partir de vasos existentes no periósteo (MARSELL; EINHORN, 2011; TERHEYDEN et al., 2012).

2.2.1.3 Formação do calo ósseo

A principal característica da regeneração óssea indireta é a formação de um calo ósseo cartilaginoso, que será mineralizado, absorvido e substituído por tecido ósseo.

Após a formação do hematoma, os fatores de coagulação são responsáveis pela formação um tecido de granulação rico em fibrina. É a partir deste tecido que ocorre a ossificação endocondral. Primeiramente os condrócitos (células cartilaginosas) sintetizam uma matriz rica em colágeno, formando um calo cartilaginoso, conhecido como calo ósseo primário, ou calo mole. Em ratos, foi observado que a formação do calo ósseo primário ocorre sete a nove dias após a fratura (MARSELL; EINHORN, 2011).

Ao mesmo tempo, ocorre um processo de ossificação intramembranosa, que se inicia a partir do perióstio, onde células mesenquimais se diferenciam em células osteoprogenitoras que sintetizam matriz óssea (MARSELL; EINHORN, 2011). A matriz óssea sintetizada é depositada nas extremidades dos fragmentos ósseos, formando um calo ósseo rígido nas extremidades do calo ósseo cartilaginoso. O tecido ósseo sintetizado é desorganizado e por isso mais fraco (HOPPENFELD; MURPHY, 2001).

A síntese de colágeno envolve a participação de diversas moléculas de sinalização, por exemplo, o TGF- β . Os fatores de crescimento TGF- β desempenham diversas funções no processo de regeneração óssea, principalmente as BMPs por se ligarem às células osteoprogenitoras, aumentando assim a transcrição de genes osteoindutivos, além de atuarem nas demais fases da ossificação, como por exemplo, na formação do calo ósseo cartilaginoso (CAO; CHEN, 2005; RYOO; LEE; KIM, 2005).

2.2.1.4 Mineralização e reabsorção do calo ósseo primário

O calo ósseo primário, composto principalmente de estrutura cartilaginosa, é substituído por osso, formando um calo ósseo secundário, também conhecido como calo duro. Após a formação do tecido cartilaginoso, os condrócitos tornam-se hipertróficos, liberam cálcio e sofrem apoptose. A diminuição do movimento entre os fragmentos ósseos com a formação do calo ósseo primário faz com que a proliferação de vasos sanguíneos no local melhore e conseqüentemente, há um aumento no recrutamento de monócitos e células mesenquimais (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012).

Essa fase da regeneração envolve a proliferação e diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos ou osteoclastos e um aumento na deposição de matriz extracelular. O pico da formação do calo duro, ocorre cerca de 14 dias após a fratura em ratos (MARSELL; EINHORN, 2011).

Os macrófagos diferenciam-se em células similares a osteoclastos e reabsorvem a matriz cartilaginosa, ao passo que a células mesenquimais dão origem a osteoblastos, que preenchem as lacunas com tecido ósseo, levando a formação de tecido ósseo de estrutura trabecular (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012).

2.2.1.5 Remodelamento ósseo

O calo ósseo secundário é uma estrutura rígida, porém não é capaz de restaurar completamente as propriedades mecânicas do osso, pois a matriz óssea é desorganizada. Para que a capacidade biomecânica seja novamente reestabelecida, é necessário que o osso seja remodelado, ou seja, uma segunda fase de reabsorção ocorre, remodelando o osso com um tecido ósseo lamelar e reestruturando o canal medular. Em ratos esse processo ocorre aproximadamente entre 5 e 8 semanas e em humanos pode levar anos (MARSELL; EINHORN, 2011).

Para o sucesso da remodelação óssea, é necessário que exista uma rede vascular adequada, estabilização óssea adequada e aplicação de carga mecânica sobre o osso.

2.2.2 Regeneração óssea direta

A regeneração óssea direta ocorre em uma quantidade menor de casos, como por exemplo em ossos achatados do crânio, pois necessita de um ambiente onde a movimentação entre os fragmentos ósseos seja praticamente inexistente e a lacuna entre os fragmentos tenha um tamanho mínimo ou não exista. Este tipo de regeneração não necessita da formação de um calo ósseo pois ocorre a remodelação direta do osso lamelar (MARSELL; EINHORN, 2011).

A regeneração óssea direta ocorre por contato direto entre os fragmentos ou por uma pequena lacuna existente entre eles.

Quando as superfícies ósseas são estabilizadas com uma lacuna menor que 0,01 mm e a tensão entre os fragmentos é menor que 2% é chamado de processo de regeneração por contato. Os osteoclastos atravessam a linha da fratura, formando canais que são, em seguida, preenchidos por osso produzido por osteoblastos. Simultaneamente, são formados os canais de *Havers*, que permitem a penetração de vasos sanguíneos para reestabelecer o suprimento de sangue (MARSELL; EINHORN, 2011).

Quando a lacuna que existe entre as superfícies ósseas tem um tamanho de até 1 mm, a remodelação e a formação de canais de *Havers* não ocorre simultaneamente. Primeiramente o local da fratura é preenchido por osso lamelar com direção das lamelas perpendicular ao eixo do osso. O osso neoformado precisa então ser substituído, para que as lamelas ósseas estejam longitudinais ao eixo longo do osso e reestabeleçam as propriedades mecânicas ósseas (MARSELL; EINHORN, 2011).

2.3 Regeneração óssea guiada

A ROG é uma técnica empregada para otimizar a formação óssea, utilizando uma membrana biocompatível como barreira física contra a invasão local de tecidos não osteogênicos e como proteção para o coágulo sanguíneo (GRUBER; STADLINGER; TERHEYDEN, 2016).

O princípio da regeneração guiada começou a ser estudado nos anos 50, onde estudos experimentais mostravam os benefícios de criar um local anatômico isolado para oferecer melhores condições de cicatrização. Murray et al. (1957), isolaram defeitos ósseos em fêmur de cachorro com aparato plástico e relataram melhora na neoformação óssea (MURRAY; HOLDEN; ROSCHLAU, 1957). Estudos prévios com a utilização de filtros de acetato de celulose sobre diferentes tipos de tecido, como por exemplo nervo e tendão, também demonstraram resultados promissores em relação a regeneração tecidual (ASHLEY et al., 1959; CAMPBELL et al., 1956).

A técnica começou a ser empregada como modalidade terapêutica por volta dos anos 80, onde uma membrana era aplicada como barreira para tecidos moles adjacentes a defeitos ósseos, com o objetivo de proteger o local da lesão e melhorar

o processo regenerativo. Desde então vem sendo cada vez mais utilizada e vários estudos demonstram seus benefícios no auxílio ao reparo tecidual (DAHLIN et al., 1988; GOTTLLOW et al., 1986; PONTORIERO et al., 1987).

Além de proteger o coágulo sanguíneo e impossibilitar a migração de células de funções não osteogênicas (conjuntivas e epiteliais), a utilização da membrana propicia um ambiente adequado para proliferação de células osteogênicas e impede a reabsorção óssea, pois protege o local da lesão de células progenitoras de osteoclastos, que são originárias de vasos sanguíneos dos tecidos moles ao redor da lesão. Evitar a presença de células de reabsorção óssea nos estágios iniciais da reparação é benéfico, pois permite que a neoformação óssea seja otimizada (GRUBER; STADLINGER; TERHEYDEN, 2016).

Em um estudo recente, Turri et al. (2016) demonstram que a utilização da técnica também influencia mecanismos moleculares da regeneração. Em seu estudo, observaram que a utilização de membrana sobre defeitos ósseos realizados em fêmur de ratos, promoveu a formação óssea desde o início do processo regenerativo, bem como, alterou positivamente os padrões de genes associados a regeneração óssea, produção de proteínas ósseas e o recrutamento de células osteogênicas.

Para ser utilizada em técnica de ROG a membrana deve atender os seguintes princípios: ser biocompatível; possuir permeabilidade, mas não permitir a passagem de células; funcionar como suporte físico ao tecido mole circundante; proteger o coágulo sanguíneo; proteger a rede vascular e excluir células não osteogênicas (RETZEPI; DONOS, 2010). Diferentes tipos de membranas são utilizadas para ROG e podem ser tanto absorvíveis quanto não-absorvíveis. A escolha do material depende do tamanho e morfologia do defeito, bem como, preferência do clínico e do paciente (ALGHAMDI; CIANCIO, 2009). Contudo, ainda não está bem estabelecido qual tipo de material é mais recomendado para uso na prática clínica (LEE; KIM, 2014).

O uso de membranas não-absorvíveis, como por exemplo membranas de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE), foi a primeira alternativa para ROG. O e-PTFE é um polímero com estrutura em poros de forma flexível e biocompatível que comprovadamente auxilia o processo regenerativo ósseo e por esse motivo é amplamente utilizado. As membranas absorvíveis por sua vez, são confeccionadas

de diferentes materiais biodegradáveis, incluindo colágeno, poliuretano, poliglactina e outros. O tempo necessário para degradação da membrana depende das características do material, pH, temperatura local e espessura da membrana, consequentemente, a duração da função da barreira não é controlada, bem como, pode interferir negativamente na regeneração óssea. Estudo realizado por Von Arx et al. (2005) com uso de diferentes membranas bioreabsorvíveis em calvaria de ratos apresentaram em seus resultados problemas no desempenho das membranas e reações inflamatórias inadequadas (VON ARX et al., 2005). Schwarz et al. (2007) concluíram que membranas de colágeno, as mais utilizadas em ROG, sofrem uma rápida degradação devido à atividade enzimática de macrófagos e leucócitos, resultando em uma baixa resistência de membrana, o que a torna suscetível ao colapso no defeito. Apesar de o uso de membranas bioreabsorvíveis evitar a necessidade de um procedimento cirúrgico para remoção da membrana, as complicações relacionadas ao seu uso fazem com que a utilização de membranas não reabsorvíveis seja o padrão ouro para ROG (RETZEPI; DONOS, 2010).

2.4 Látex natural

O látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* foi utilizado por tribos indígenas da Amazônia, de forma empírica, para cura de feridas de pele e recentemente vem sendo estudado como um possível biomaterial a ser empregado na prática clínica. Sua aplicação em diferentes tecidos tem demonstrado bons resultados, ampliando as pesquisas na área e demonstrando a eficácia do biomaterial em diversas finalidades terapêuticas (MORAES et al., 2012).

A membrana de látex natural, utilizada na área da saúde, foi desenvolvida pelo Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo/USP pelo professor Joaquim Coutinho Netto em 1994 e desde então, pesquisadores tem estudado as características bioquímicas que conferem ao biomaterial a capacidade de influenciar processos cicatriciais, favorecendo a formação rápida e regular de um novo tecido (MRUÉ, 2000).

A membrana de látex tem sido aplicada como promotora de regeneração e aceleração de lesões em diferentes tipos de tecidos como em úlceras cutâneas (FRADE et al., 2012), pericárdio (SADER et al., 2000), parede abdominal (MRUÉ,

2000), conjuntiva ocular (PINHO et al., 2004), nervo (BARREIROS et al., 2014), tímpano (OLIVEIRA; HYPPOLITO; COUTINHO-NETTO, 2003) e mais recentemente em tecido ósseo (ERENO et al., 2010).

Mrué em 2000 estudou as alterações histológicas causadas pelo implante de membrana de látex natural no esôfago e parede abdominal de cães. Após a remoção do tecido foi possível observar, a nível histológico, a formação de vasos sanguíneos, adesão celular e formação de matriz extracelular, sem a formação de tecido fibrótico, favorecendo o processo cicatricial.

Sader et al. (2000) utilizaram a membrana de látex como substituto parcial do pericárdio de cães. Após um ano da data do implante, em 50% dos animais dos grupos que utilizaram a membrana houve completa regeneração do pericárdio nativo, enquanto que nos cães do grupo em que um retalho do pericárdio foi utilizado como implante foi observado um quadro de regeneração irregular, demonstrando que a membrana foi adequada para substituição desse tecido. Além disso, os autores não observaram reações adversas, como infecção local ou alterações no leucograma.

Zimmerman em 2007 objetivou estudar a biocompatibilidade de membranas de látex. Para isso implantou três tipos de membranas na musculatura abdominal de 18 cães, onde, dois grupos receberam implante com membranas a base de látex (látex centrifugado e não centrifugado) e um grupo membrana utilizada comercialmente. Após 45 dias, apenas nos animais que receberam membrana à base de látex não centrifugado foram observadas características de rejeição da membrana; nos demais grupos não foram observados sinais adversos, concluindo que membranas de látex centrifugado são biocompatíveis.

Também com o objetivo de estudar a biocompatibilidade da membrana de látex, Balabarian et al. em 2006 realizaram estudo com aplicação de grânulos de látex em cavidades ósseas alveolares em ratos. Após os períodos experimentais de 7, 21 e 42 dias as análises histológicas não mostraram qualquer reação de corpo estranho, ou persistência da reação inflamatória aguda inicial, bem como os dados quantitativos confirmaram a aceleração da formação óssea em paralelo com uma diminuição do tecido conjuntivo nas áreas ao redor dos implantes, demonstrando que o látex é biologicamente compatível.

Em humanos o uso da membrana de látex foi iniciado em lesões cutâneas. Frade et al. (2004) avaliaram o tratamento de úlceras de membros inferiores com biomembrana de látex natural em pacientes portadores de úlceras maiores que 1 cm e mais de dois meses de instalação. Clinicamente, foi observado formação de tecido de granulação com diminuição do sintoma de dor. A nível histopatológico foi observada diferenciação do tecido cicatricial e áreas de neoangiogênese com aumento de fatores de crescimento como VEGF e TGF- β .

Visto que a membrana de látex possui características que favorecem a proliferação tecidual, pesquisadores iniciaram os estudos da sua utilização para a promoção da osteogênese. Ereno et al. (2010) utilizaram a membrana de látex na regeneração óssea guiada em calvária de coelhos. Os autores não observaram sinais de alergia, processo inflamatório crônico ou rejeição, bem como as análises qualitativas sugerem que o uso de membrana acelerou a regeneração óssea nos defeitos.

As membranas a base de látex possuem características desejáveis para uso em regeneração óssea, sendo elas: elasticidade, flexibilidade, alta resistência mecânica, biocompatibilidade, baixo custo e capacidade de auxiliar a neoangiogênese, porém, estudos que comprovem seus mecanismos de ação e sua real eficácia na regeneração óssea, ainda são necessários.

2.5 Hipóteses

H1: A membrana de látex natural auxilia no processo de regeneração óssea observada em tíbias de ratos.

H0: A membrana de látex natural não auxilia no processo de regeneração óssea observada em tíbias de ratas.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da utilização de membrana de látex natural no processo de regeneração de defeito ósseo em ossos longos de ratos.

3.2 Objetivo específico

Avaliar as propriedades ósseas sobre diferentes tempos de reparação através de análises macroscópicas, microscópicas e mecânicas.

Materiais e Método

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Ética experimental

Este trabalho seguiu as normas descritas pelo Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - USA, 2011) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP) sob protocolo nº 061/2015.

4.2 Animais experimentais

Foram utilizados sessenta ratos da raça *Rattus norvegicus albinus*, da variedade *Wistar*, com sete semanas de idade e peso médio de 300g $\pm$ 20g. Os animais foram fornecidos pelo Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da USP e foram alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, em ambiente com controle de temperatura (22°C $\pm$ 2), umidade (55% $\pm$ 10) e luminosidade (12 horas claro e 12 horas escuro). Água e ração padrão para ratos foram fornecidas *ad libitum*.

Cada animal recebeu um número de identificação, através de marcações na cauda, feitas com caneta permanente. Ao chegarem ao Biotério do Laboratório de Bioengenharia os animais permaneceram cerca de dois dias, em caixas coletivas, com cinco animais cada, para adaptação ao ambiente. Após o procedimento cirúrgico os animais foram alojados em caixas individuais, para acompanhamento do período pós-cirúrgico.

4.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos ao acaso em quatro grupos (n=15), sendo: animais tratados com membrana de látex por uma (L1) ou quatro semanas (L4) e

animais que não receberam tratamento específico por uma (C1) ou quatro semanas (C4), (Figura 1), conforme segue:

- C1: Animais tratados sem intervenção terapêutica específica e submetidos à eutanásia uma semana após procedimento cirúrgico.
- C4: Animais tratados sem intervenção terapêutica específica e submetidos à eutanásia quatro semanas após procedimento cirúrgico.
- L1: Animais tratados com membrana de látex e submetidos à eutanásia uma semana após procedimento cirúrgico.
- L4: Animais tratados com membrana de látex e submetidos à eutanásia quatro semanas após procedimento cirúrgico.

Figura 1: Fluxograma do experimento

4.4 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado em todos os grupos experimentais.

Primeiramente os animais foram pesados e em seguida anestesiados com uma solução composta por Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), aplicada via intramuscular na região glútea, no membro pélvico esquerdo. Após instalado o efeito do anestésico foi realizada a tricotomia e a assepsia do membro pélvico esquerdo. Os animais foram então posicionados em supino, fixando o membro pélvico esquerdo em rotação externa e tríplice flexão (Figura 2A).

A região central da tíbia foi mensurada com auxílio de um paquímetro (Figura 2A) e então realizada uma incisão linear na pele e na musculatura de aproximadamente 1 cm de extensão (Figura 2B) com lâmina de bisturi número 15,

previamente montada em cabo de bisturi número 3. Em seguida a pele e os músculos foram cuidadosamente afastados e posicionados com auxílio de um afastador para expor a superfície óssea (Figura 2C e 2D).

Figura 2: A) Mensuração da tíbia do animal para que fosse localizada a porção central B) Incisão de 1 cm na porção central do membro C) Posicionamento do afastador após secção da pele D) Posicionamento do afastador após secção da musculatura para exposição da tíbia.

O defeito ósseo foi realizado no terço médio da face medial da tíbia, com uma broca trefina de 2 mm de diâmetro interno e 2,5 mm de diâmetro externo, acoplado a um motor de baixa rotação (Micro Motor 210/ 105L, Strong®, Korea) usado na odontologia, ajustado em aproximadamente 3000 rpm. Utilizou-se irrigação constante com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) para evitar o superaquecimento do local (Figura 3A). O osso cortical foi removido, criando o defeito ósseo (Figura 3B e 3C).

Nos animais do grupo látex, uma membrana de látex, previamente esterilizada e moldada em tamanho adequado, foi posicionada sobre o defeito ósseo, envolvendo parte da tíbia, protegendo o coágulo sanguíneo autólogo (Figura 3D). Nos grupos controle não houve a inserção da membrana.

Posteriormente, a musculatura foi suturada com fio absorvível de Vicryl 0,4 e a pele com fio não absorvível de Nylon 0,3. Uma dose de 0,1 ml de pentabiótico foi administrada via intramuscular logo após o procedimento cirúrgico, com o animal ainda anestesiado.

Todos os procedimentos foram realizados com material previamente esterilizado.

Figura 3: A) Broca trefina de 2mm de diâmetro interno, acoplado a um motor de baixa rotação. B) Delimitação do defeito ósseo. C) Defeito ósseo. D) Posicionamento da membrana de látex.

Após a cirurgia os animais permaneceram em caixas individuais e foram observados durante todo período experimental. Diariamente foi administrada uma dose subcutânea de Dipirona Ibaso (2,5g/kg) em cada animal durante 2 dias para analgesia.

4.5 Produção das membranas de látex natural

O látex utilizado neste estudo foi fornecido pela empresa BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA (Guarantã, Brasil) e cedido pelo professor Dr. Rondinelli Donizeti Herculano do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista.

Tabela 1. Características do látex natural utilizado

Requisitos	Valores
Sólidos totais	61
Borracha seca	60
Diferença entre sólidos totais e borracha seca	1,00
NH ₃	0,71
pH	10,20
Viscosidade	30 s
Estabilidade mecânica	515
VFA	0,0136
Cor	Normal
Odor	Normal

Fonte: BDF Comércio de Produtos Agrícolas Ltda.

O látex natural fornecido provém de uma mistura dos clones RRIM 600 e PB 235 e foi centrifugado a 60% com o objetivo de suprimir proteínas contidas no látex natural que causam reações alérgicas e preservado pela adição de 0,5% de amônia.

A produção das membranas de látex natural seguiu o protocolo utilizado por Ereno et al. (2010), através do método simples de deposição. 10 ml de látex líquido foram depositados em placa *Petri* com 84 mm de diâmetro, formando uma fina camada de aproximadamente 0,25 mm (Figura 4A e B). Em seguida as placas permaneceram em estufa, com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante dois dias. Após o período de polimerização as membranas foram delicadamente retiradas e colocadas em invólucro próprio para esterilização.

As membranas foram esterilizadas em óxido de etileno pela empresa Oxetil, (Santo Anastácio, Brasil). Previamente à sua utilização, as membranas foram cortadas, com material estéril, em tamanho ideal (Figura 4D).

Figura 4: A) Látex líquido depositado em placa de *Petri* B) Membrana de látex natural após 42h em estufa a 24° C) Espessura da membrana D) Membrana moldada para utilização no procedimento cirúrgico

4.6 Eutanásia e coleta do material

Após o período experimental de 1 ou 4 semanas os animais foram submetidos à eutanásia com uma dose excessiva de xilazina e ketamina. As tíbias

esquerdas foram dissecadas, identificadas e armazenadas seguindo o protocolo específico para cada análise.

O total de 15 tíbias de cada grupo foi dividido da seguinte forma para as análises: dez tíbias foram destinadas para análise macroscópica, densitometria, radiografia, e ensaio mecânico (congeladas em freezer -20°C e descongeladas 24h precedentes às análises) e cinco tíbias foram destinadas à análise histológica e imunohistoquímica (imediatamente armazenadas em formol 10%).

4.7 Análise macroscópica

O comprimento das tíbias foi medido com paquímetro digital da marca Mitutoyo® com precisão de 0,01 mm (Figura 5A) e o peso em balança de precisão da marca Marte®, modelo AC-2000 (São Paulo, Brasil) com precisão de 0,01 g.

Além do comprimento da tíbia, foi mensurada a distância entre a extremidade proximal e a região do defeito ósseo na tíbia (Figura 5B).

Figura 5: Medidas macroscópicas A) Comprimento da tíbia esquerda. B) Distância entre extremidade proximal da tíbia e região do defeito ósseo.

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

A membrana de látex foi submetida à análise por microscopia eletrônica de varredura para avaliação estrutural do material após utilização nos defeitos ósseos. Após serem retiradas dos animais, as membranas foram limpas com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e em seguida mantidas em recipiente com gel de sílica durante sete dias para retirar a umidade do material.

As membranas, não utilizadas (n=3) e aquelas retiradas do animal quatro semanas após o implante (n=3) foram fixadas em suporte de alumínio (*stubs*) com cola condutora à base de prata e grafite, para melhorar o escoamento de elétrons. Após o posicionamento as membranas foram metalizadas em ouro, em um pulverizador de ouro (*sputter*) modelo SCD 050 SputterCoater (Coater 220 VAC, Ted Pella, Redding, USA), em 400s, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP.

Em seguida, os *stubs* com as membranas foram posicionados no Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss® Evo-MA10, Alemanha) pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP para realização da análise. As imagens foram capturadas por programa Image Tools (The University of Texas Health Science Center at San Antonio) em aumento de 500x, salvas e avaliadas qualitativamente.

4.9 Análise da densidade mineral óssea

A análise densitométrica foi realizada em um densitômetro de dupla emissão de raios X, modelo DPX-IQ, Lunar®, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Foi utilizado o programa para exames em pequenos animais em modo de alta resolução. As aquisições de imagem foram realizadas com os ossos alinhados com a face medial da tíbia direcionada para cima e imersos sob profundidade de 2 cm em solução fisiológica em um recipiente plástico.

Com auxílio do mesmo programa computacional utilizado na aquisição das imagens, foram realizadas as análises dos exames. Usando a ferramenta de seleção, os ossos foram demarcados na região de interesse (ROI) do objeto em uma área de 45 mm² na região correspondente ao defeito ósseo, localizado na região medial do terço médio da tíbia, colhendo as informações de densidade mineral óssea (DMO) (Figura 6).

Figura 6: Imagem das tíbias no densitômetro.

Para o posicionamento do ROI sobre o defeito ósseo foi utilizado um cálculo para transpor medidas de tamanho real em uma escala correspondente na imagem. O local do defeito na tíbia dissecada foi mensurado com auxílio de um paquímetro e por meio dessa medida foi feita uma transposição da escala real para a imagem escaneada no *software* do equipamento (Figura 7). Através dessa escala foi possível posicionar o ROI no mesmo ponto do defeito, seguindo o seguinte cálculo:

$$p2 = \frac{p1 \times c1}{c2}$$

(Equação 1)

Onde: c1 é o comprimento da tíbia na escala real

p1 é a posição do defeito na escala real

c2 é o comprimento da tíbia imagem escaneada pelo densitômetro

p2 é a posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro.

Figura 7: Esquema demonstrativo das medidas realizadas para posicionamento do ROI sobre o defeito ósseo.

4.10 Análise radiográfica

As radiografias digitais foram realizadas com equipamentos de raios-X Siemens, pertencente ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, pelo sistema de PSP (placas de fósforo). As amostras foram posicionadas em caixa de acrílico com água (para atenuar a incidência dos raios X) sobre um cassete digital, marca Kodak-View 25x30 cm a uma distância de 40 cm do tubo de focagem. O equipamento foi ajustado em 65kVp e 15mAs. Na figura 8 é possível observar a radiografia obtida de uma tíbia da amostra, onde pode-se ver o local onde foi realizado o defeito ósseo.

Figura 8: Radiografia da tíbia esquerda, em incidência látero-lateral (L-L), sendo possível visualizar o defeito ósseo indicado com a seta.

O software Photoshop® CC foi utilizado para análise das imagens a partir da ferramenta de seleção de área, utilizado para selecionar a região correspondente ao defeito e acionar a ferramenta de análise histograma de densidade. O objetivo foi analisar a osteogênese no local do defeito ósseo, refletido pela intensidade de pixel dentro do ROI.

Primeiramente foi realizada a equalização das imagens, com base em 10 áreas de exposição direta que atingiram diretamente o filme entre as 20 tíbias da amostra. Em seguida, um ROI pré-definido nas dimensões de 20x20 pixels foi posicionado diretamente sobre os defeitos ósseos e a densidade radiográfica média, de cada defeito foi obtida.

4.11 Ensaio mecânico

Após a densitometria as tíbias foram submetidas aos ensaios mecânicos de flexão em três pontos. Os ensaios mecânicos foram realizados em Máquina Universal de Ensaio da marca EMIC®, Modelo DL10.000 (São José dos Pinhás, Brasil) do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, utilizando uma célula de carga com capacidade de 500N, com pré-carga de 5N. O osso foi apoiado sobre dois pontos de apoio com distância de 25 mm. A carga foi aplicada em sentido pósterio-anterior da tíbia e a velocidade de aplicação da carga foi padronizada em 1mm/min (Figura 9). Um programa Tesc® foi utilizado para gerar um gráfico de carga *versus* deslocamento para cada ensaio. As propriedades mecânicas analisadas foram força máxima (N) e rigidez relativa (N/mm).

Figura 9: Tíbia de rato preparada para ensaio de flexão de três pontos.

4.12 Análise histológica

Após 24h em formol 10%, os ossos foram então descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% por 30 dias à temperatura ambiente, com troca da solução realizada a cada 2 dias.

Após a descalcificação os ossos foram lavados em água corrente *overnight* e desidratados em álcool com concentração crescente de 70% a 100%, permanecendo 1 hora em cada concentração. Subsequentemente os materiais foram diafanizados em uma sequência de três xilóis, por 1 hora em cada e em três banhos em parafina (55°C) por 1 hora em cada. Em seguida, foram

confeccionados os blocos retangulares de parafina de modo que a face medial da tíbia ficasse voltada para baixo (Figura 10A e 10B).

Figura 10: A) Tíbia com o defeito (face medial) foi girada em 90°, de modo que o defeito ficasse para baixo, ao ser preparado os blocos de parafina. De acordo com esse procedimento a face medial da tíbia ficou exposta para corte. B) Bloco de parafina com face medial da tíbia exposta.

As peças foram seccionadas em cortes longitudinais de 5 μ m de espessura. Em cada tíbia foram coletados 48 cortes semi-seriados, em que após a coleta de 8 cortes, os 4 cortes subsequentes eram descartados e o procedimento era repetido até percorrer toda a profundidade do defeito. Os fragmentos foram capturados em lâminas de vidro com polilisina, sendo posicionados 2 cortes em cada lâmina. Das 24 lâminas obtidas seis foram coradas pela técnica de Picro sirius red (lâminas 3, 7, 11, 15, 19 e 23), 12 pela técnica de tricrômico de Masson (lâminas pares), e 2 destinada a imunohistoquímica (lâminas 13 e 17).

Para o exame das lâminas foi utilizado o microscópio óptico AxionImager® Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera digital (Zeiss®) pertencente ao Laboratório de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP).

4.12.1 Quantificação da neoformação óssea

Na região do defeito (Figura 11) a esterologia foi utilizada para calcular o volume de tecido ósseo e então avaliar a porcentagem da razão de volume de osso

neoformado pelo volume total (BV/TV - %) utilizando a técnica de Cavalieri no *software* Stereoinvestigator (MBF, USA). Através da técnica de Cavalieri é possível estimar o volume ósseo a partir de uma imagem bidimensional com espessura conhecida. As áreas de interesse da superfície do corte são avaliadas e multiplicadas pela espessura do corte, obtendo-se o volume estimado (ODACI et al., 2003; OLIVEIRA, 2016).

Figura 11: Aparência do defeito, grupo L1, a partir de corte corado com a técnica de *tricomio de Masson* em aumento de 50x.

Os cortes corados em *Masson* foram analisados sob aumento de 50x. Primeiramente foi demarcada manualmente a área correspondente ao defeito, desprezando as corticais ósseas (Figura 12A). Em seguida foi criado um sistema de grades através da técnica de Cavalieri com pontos de seleção de 15 µm de distância dentro da região contornada (Figura 12B). O volume total foi então calculado pelo programa, considerando a espessura do corte de 5 µm. O cálculo é dado pela seguinte Equação:

$$V = t \times ap \times \sum P$$

(Equação 2)

Onde: t é a espessura do corte,

ap é a área representada por cada ponto dentro do sistema de grade

ΣP é o número total de pontos contados (SCALIZE et al., 2015).

Em seguida foi demarcada a área do defeito correspondente a tecido ósseo, excluindo as áreas que não representassem osso (Figura 12C e 12D) e calculado o volume correspondente.

Figura 12: A) Delimitação do defeito ósseo. B) Área total preenchida por sistema de teste. C) Delimitação da área de tecido ósseo no defeito. D) Representação da área final desprezando a região que não representa tecido ósseo (nas lacunas vazias).

A porcentagem de volume de tecido ósseo no defeito foi calculada pela seguinte equação:

$$V = \frac{BV}{TV} \times 100$$

(Equação 3)

Onde: V: Volume tecido ósseo neoformado em porcentagem

BV: Volume de tecido ósseo

TV: Volume total do defeito ósseo

4.12.2 Quantificação colágeno tipo I e III

A avaliação da área de colágeno foi realizada através das lâminas coradas através da técnica de *picro sirius red* (Figura 13A). As lâminas foram analisada em microscópio (Zeiss, Germany) com luz polarizada e através da birrefringência foi possível observar as fibras colágenas, sendo que, o colágeno tipo I foi representado pelas cores amarelo e vermelho e colágeno tipo III em verde (CURY et al., 2016).

A análise das fibras de colágeno foi feita na objetiva de 5x, na região do defeito ósseo, pelo programa Axiovision®, que capta as diferentes tonalidades de vermelho e verde e quantifica a área correspondente em μm^2 referentes às fibras sobre a luz polarizada. A área foi expressa pela razão da área de colágeno pela área total e apresentada em porcentagem de área (Col.Ar/Tt.Ar - %) (PARFITT et al., 1987).

Primeiramente foi feita a demarcação dos colágenos (Figura 13B) e em seguida foram excluídas da quantificação as áreas demarcadas fora do defeito (Figura 13C).

Figura 13: A) Aparência do defeito ósseo corado pela técnica de *Picro Sirius red*, em lâmina do grupo L1 B) Seleção das fibras de colágeno. As fibras de colágeno tipo I foram marcadas em azul e tipo III em vermelho. C) Seleção final, excluído as demarcações fora da área de interesse.

4.13 Análise imunohistoquímica

Os cortes histológicos passaram por processo de desparafinização em estufa e em seguida com xilol. Posteriormente, os cortes foram hidratados em série decrescente de etanol (100°, 100°, 100°, 90° e 70°). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Após lavagens em solução de tampão de fosfato salina (PBS) 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio, por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, depois das lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados em 3% de soro albumina bovinos por 12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OC (osteocalcina) do rato gerado em coelho (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-OPN (osteopontina) do rato gerado em coelho (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes empregou-se o Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, lavadas e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX procedeu-se a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, as amostras foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

4.13.1 Quantificação das proteínas imunomarcadas

Os cortes histológicos foram analisados sob iluminação de campo claro em microscópio óptico AxionImager® Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera

digital (Zeiss®) sob objetiva de 20x. A imunomarcação foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento citosólico das células.

Utilizando o programa Axionvision® as regiões marcadas positivamente foram quantificadas por meio da expressão da cor castanha. Os resultados foram apresentados pelas áreas marcadas positivamente no defeito ósseo.

4.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS® (Versão 20.0) e foi adotado nível de significância de 5%.

Os dados foram testados quanto à normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov.

A influência das variáveis tempo e membrana, bem como a interação tempo*membrana sobre os dados foram avaliadas. Para os dados referentes a imunomarcação de osteocalcina foi aplicado teste de modelo linear generalizado com fatores independentes. Para o restante dos resultados foi realizada análise de ANOVA multivariada com dois fatores independentes. Todas as comparações foram realizadas com ajuste de Bonferroni.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica

Após o procedimento cirúrgico, durante a avaliação dos animais, não foram observados sinais clínicos de stress, verificados pela presença de porfirina na região periorbital e ocular, bem como, sinais de infecção na ferida cirúrgica.

A observação macroscópica mostrou que as membranas de látex permaneceram intactas e sobre os defeitos ósseos nos grupos tratados.

Foi observado um tecido mole no local do defeito nas amostras de ambos os grupos de uma semana. Um tecido duro no local do defeito foi observado nos grupos de quatro semanas; este tecido foi mais denso do que os encontrados nos primeiros períodos, mas ainda era possível observar o local do defeito ósseo.

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A figura 14 apresenta imagens da membrana antes e após a sua utilização obtidas através de microscopia eletrônica de varredura em aumento de 500x vezes.

Figura 14: Imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura. A) Membrana sem uso. B) Membrana utilizada nos defeitos ósseos.

Qualitativamente, podem ser observadas rachaduras nas membranas utilizadas nos defeitos ósseos. No entanto, não foram observadas outras alterações estruturais na membrana.

5.3 Morfologia óssea

A análise morfológica das amostras permitiu avaliar o comprimento e massa óssea das tíbias. Em relação ao comprimento das tíbias (Figura 15), foi possível observar diferença estatisticamente significativa na variável tempo, em que o comprimento de ossos dos grupos avaliados quatro semanas após a cirurgia foi significativamente maior que de animais dos grupos avaliados uma semana após a cirurgia ($p < 0,001$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa para a variável membrana ($p = 0,236$) e para interação tempo*membrana ($p = 0,919$).

Figura 15: Gráfico da morfologia das tíbias quanto ao comprimento

Para a massa das tíbias (Figura 16), foi observada influência estatisticamente significativa da variável tempo ($p < 0,001$), onde tíbias dos grupos de quatro semanas obtiveram massa óssea maior do que tíbias dos grupos de uma semana. A variável membrana ($p = 0,345$) e a interação tempo*membrana ($p = 0,522$) não apresentaram diferenças significativas.

Figura 16: Gráfico da morfologia das tíbias quanto a massa

5.4 Densidade mineral óssea

Para as medidas de DMO (Figura 17) observou-se diferença estatisticamente significativa para a variável tempo ($p=0,017$), em que, animais dos grupos de quatro semanas obtiveram valores de DMO maiores do que animais pertencentes aos grupos de uma semana. Ao avaliar a DMO em relação a variável membrana ($p=0,391$) e para interação tempo*membrana ($p=0,179$) não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Figura 17: Gráfico das densidades minerais ósseas na região do defeito ósseo nas tíbias

5.5 Radiografia Digital

Figura 18: Radiografia digital das tíbias esquerdas.

As radiografias de ambos os grupos de uma semana revelaram áreas radiotransparentes delimitando os defeitos ósseos. Foram observadas radiopacidades maiores nos defeitos ósseos das amostras do grupo tratado. Em relação aos grupos de quatro semanas as áreas radiotransparentes delimitando o defeito ósseo são mais difíceis de observar, como pode ser visto na figura 24.

Através da análise estatística dos dados obtidos a partir do histograma de densidade (Figura 19) foi observada diferença estatisticamente significativa para a variável tempo ($p=0,008$), demonstrando que os grupos de quatro semanas apresentaram maior nível de radiopacidade na região do defeito ósseo ou apresentaram maiores valores de intensidade de pixel. Em relação a utilização da membrana de látex ($p=0,071$) e a interação tempo*membrana ($p=0,643$) não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

Figura 19: Intensidade radiológica

5.6 Força máxima

Ao analisar a influência das variáveis sobre a força máxima da tíbia (Figura 20) foi possível observar diferença estatisticamente significativa para a variável tempo ($p<0,001$), em que grupos com quatro semanas obtiveram resultados superiores aos grupos de uma semana. Para a variável membrana ($p=0,473$) e para a interação tempo*membrana ($p=0,859$) não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Figura 20: Gráfico da força máxima das tíbias

5.7 Rigidez relativa

Ao comparar o efeito das variáveis na rigidez relativa das tíbias foi possível observar diferença significativa para o tempo ($p<0,000$), em que os grupos com quatro semanas apresentaram maior rigidez relativa do que os grupos de uma semana. A utilização da membrana após a cirurgia também foi influente na rigidez relativa ($p=0,048$), onde os grupos que utilizaram a membrana como forma de tratamento apresentaram maior rigidez quando comparados com os grupos que não utilizaram a membrana. A interação tempo*membrana não foi estatisticamente significativa ($p=0,161$). A figura 21 apresenta o efeito do tempo e da membrana na rigidez relativa das tíbias.

Figura 21: Gráfico da rigidez relativa das tíbias

5.8 Colágeno tipo III

As fibras de colágeno foram avaliadas na região do defeito ósseo e são expressas em tons de verde, como é possível observar na figura 22.

Figura 22: Fotomicrografia das fibras de colágeno sob luz polarizada na região do defeito ósseo (Picro sirius, em aumento de 50x).

Para os resultados da quantificação de colágeno tipo III (Figura 23) foi possível perceber influência significativa da variável tempo ($p=0,001$), onde a quantidade de fibras de colágeno nos grupos de uma semana foi menor do que nos grupo de quatro semanas. Em relação a variável membrana ($p=0,830$) e a interação tempo*membrana ($p=0,501$) não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Figura 23: Gráfico do percentual de área de colágeno tipo III sobre o defeito ósseo, obtido por meio da razão de área de colágeno (Col.Ar - μm^2) pela área total avaliada (Tt.Ar - μm^2)

5.9 Colágeno tipo I

Na figura 22 é possível observar as fibras de colágeno tipo I na região do defeito ósseo, expressas em tons amarelo e vermelho.

O percentual de colágeno tipo I no defeito ósseo apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a variável membrana ($p=0,018$), onde a utilização da membrana de látex melhorou a produção de matriz de colágeno no local do defeito ósseo, em ambos os tempos avaliados. Para a variável tempo ($p=0,091$) e interação tempo*membrana ($p=0,876$) não foram observadas diferenças estatisticamente significante. Entretanto, ao analisar as médias dos grupos, podemos perceber que, em relação ao tempo, o percentual de colágeno no grupo C1 ($42,76 \pm 7,09$) obteve uma média menor do que o grupo C4 ($51,46 \pm 14,34$). Da mesma forma, o grupo L1 ($55,19 \pm 10,60$) obteve uma média menor do que o grupo L4 ($62,49 \pm 5,18$), como pode ser observado na figura 24.

Figura 24: Gráfico do percentual de área de colágeno tipo I sobre o defeito ósseo, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total avaliada (μm^2)

5.10 Volume ósseo neoformado

5.10.1 Análise qualitativa

A figura 25 mostra os aspectos morfológicos do defeito ósseo bem como o progresso do processo de regeneração aos 07 e 28 dias pós-operatório para ambos os grupos.

Figura 25: Fotomicrografia do osso neoformado na região do defeito ósseo para os grupos (aumento de 50x).

As características histológicas se mostraram similares entre os grupos com uma semana de pós-operatório (Figura 26A). As margens do defeito estavam bem definidas e foi possível observar que grande parte do defeito ósseo foi preenchido por tecido conjuntivo (localizado principalmente nas extremidades) com presença de tecido ósseo imaturo. Além disso, foi possível observar a presença de vasos sanguíneos em ambos os grupos. Em aumentos maiores (Figura 26B) foi possível observar ilhas de tecido ósseo neoformado com a presença de células osteogênicas.

Figura 26: Fotomicrografia da coloração de tricrômio de Masson mostrando histologicamente a nova formação óssea na região do defeito ósseo nos grupos de uma semana. A) C1 em aumento de 50x. B) C1 em aumento de 200x. TC: tecido conjuntivo, ON: osso neoformado e setas indicam a presença de vasos sanguíneos.

Após quatro semanas da cirurgia, nas amostras do grupo tratado, é possível perceber que o defeito foi preenchido quase em sua totalidade com tecido ósseo, pequena quantidade de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. O tecido ósseo conectou as bordas do defeito a continuidade óssea (Figura 27).

Figura 27: Fotomicrografia da coloração de tricrômio de Masson mostrando histologicamente a nova formação óssea na região do defeito ósseo após quatro semanas da cirurgia no grupo tratado com membrana de látex. A) aumento de 50x. B) aumento de 200x. TC: tecido conjuntivo, TO: Tecido ósseo e setas indicam a presença de vasos sanguíneos.

Nas amostras do grupo controle, após quatro semanas da cirurgia, ainda é possível delimitar a região do defeito ósseo, pois o tecido ósseo neoformado não foi suficiente para unir a região do defeito ao osso intacto. Pode-se observar grandes cavidades medulares bem definidas, tecido ósseo em processo de maturação e tecido conectivo (Figura 28).

Figura 28: Fotomicrografia da coloração de tricrômio de Masson mostrando histologicamente a nova formação óssea na região do defeito ósseo após quatro semanas da cirurgia no grupo controle com membrana de látex. A) aumento de 50x. B) aumento de 200x. TC: tecido conjuntivo, TC: Tecido ósseo, ON: osso neoformado, CM: cavidades medulares.

5.10.2 Análise quantitativa

Foi observada diferença estatisticamente significativa para a variável tempo ($p < 0,001$), em que os grupos de quatro semanas obtiveram maior volume ósseo do que grupos de uma semana. Em relação à utilização da membrana de látex ($p = 0,001$), também foi encontrada diferença estatisticamente significativa, em que grupos que utilizaram a membrana de látex como tratamento obtiveram resultados superiores aos grupos sem tratamento específico (Figura 29). Em relação a interação tempo*membrana, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,465$).

Figura 29: Gráfico do volume ósseo neoformado expresso pela razão do volume de osso na região do defeito (BV - μm^3) pelo volume total da região do defeito ósseo (TV - μm^3), apresentado em %.

5.11 Osteocalcina

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para a área com imunomarcção de osteocalcina em relação as variáveis tempo ($p=0,480$), membrana ($p=0,917$) e interação tempo*membrana ($p=0,220$), como pode ser observado na figura 30.

Figura 30: Gráfico da análise imunohistoquímica de Osteocalcina na região do defeito ósseo apresentada pela área (μm^2) com imunomarcção de osteocalcina.

Figura 31: Área imunomarcada positivamente para osteopontina expressa em cor castanha. (Osteopontina, aumento de 20x)

5.12 Osteopontina

Foi observada diferença estatisticamente significativa na área imunomarcada por osteopontina em relação a variável membrana ($p=0,037$), como pode ser observado na figura 32. A variável tempo ($p=0,206$) e a interação tempo*membrana (0,744) não foram influentes nos resultados.

Figura 32: Gráfico da análise imunohistoquímica de osteopontina na região do defeito ósseo apresentada pela área (µm²) com imunomarcagem de osteopontina.

Figura 33: Área imunomarcada positivamente para osteopontina expressa em cor castanha. (Osteopontina, aumento de 200x)

Discussão

6 DISCUSSÃO

A regeneração óssea sob condições adversas ainda é um grande desafio clínico, dado que, um grande número de fraturas não exhibe sucesso de consolidação, gerando altos custos de tratamento e danos a qualidade de vida dos indivíduos (BUZA; EINHORN, 2016, HAK et al., 2014). Um dos desafios no processo de consolidação são grandes defeitos ósseos, que podem resultar de doenças, traumas e procedimentos cirúrgicos.

A busca por novos biomateriais que possuam biocompatibilidade e capacidade osteoindutiva é crescente, visto a necessidade do desenvolvimento de materiais economicamente acessíveis (LEE; KIM, 2014). O látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* possui propriedades que auxiliam a regeneração tecidual, além de ser um biomaterial de baixo custo e fácil manipulação e por estes motivos foi escolhido como objeto de estudo desta pesquisa (ANDRADE et al., 2011). Nosso objetivo foi comprovar a eficácia da utilização de membranas de látex no auxílio à regeneração do tecido ósseo em ossos longos, através de análises estruturais, microscópicas e expressão de proteínas osteogênicas.

As propriedades osteoindutivas da membrana de látex foram avaliadas e os resultados encontrados nesse estudo mostraram que a membrana influenciou positivamente a regeneração óssea, pois, grupos tratados obtiveram resultados superiores aqueles que não receberam tratamento específico em relação ao volume ósseo neoformado, colágeno tipo I, propriedades mecânicas e expressão de osteopontina.

Para que a membrana de látex em ROG seja utilizada na prática clínica, estudos experimentais são necessários, para obter uma avaliação mais específica do comportamento dos materiais biológicos frente ao tratamento (AERSSENS, 1998). O objetivo do estudo em animais é conhecer o impacto de uma variável, neste caso a utilização de membrana de látex natural, na regeneração de ossos longos. Dessa forma o estudo com animais além do aspecto ético permitiu o controle e padronização das amostras para garantir a credibilidade dos resultados (HISTING et al., 2011).

Neste estudo, para avaliar a ação da membrana de látex foi realizado um defeito ósseo de 2,5 mm de diâmetro na tíbia de ratos, com o intuito de criar um ambiente de cicatrização óssea retardada, para avaliar a capacidade do biomaterial em auxiliar a regeneração do tecido. Segundo Hollinger e Kleinschmidt (1990), um defeito ósseo crítico pode ser definido como “o menor defeito ósseo que não se cicatrize espontaneamente ao longo da vida de um animal”, porém, para fins de pesquisa, um defeito ósseo crítico pode ser considerado como aquele que não se repara no período de duração do estudo (GARCIA et al., 2013). Prado et al. (2006) realizaram um estudo a fim de padronizar o tamanho de defeitos ósseos em tíbias de ratos e concluíram que, em ratos Wistar, machos e adultos, defeitos ósseos de 2,5 mm de diâmetro, realizados com broca trefina na tíbia dos animais, não foram passíveis de fechamento total da área do defeito após 45 dias de experimento. Esse achado justifica a utilização do modelo experimental utilizado neste estudo, que realizou um defeito ósseo de 2,5 mm de diâmetro interno para pesquisa sobre o reparo ósseo.

As imagens da membrana de látex após a utilização nos defeitos ósseos realizadas em microscópio eletrônico de varredura mostraram rachaduras no material. Este resultado se justifica pela técnica utilizada no preparo da amostra. Antes de serem metalizadas em ouro, as membranas que haviam sido aplicadas nos animais permaneceram alguns dias em recipiente com sílica gel, para secagem do material. Este procedimento pode ter ocasionado o ressecamento do material, justificando as rachaduras encontradas. Quando implantada no animal, a membrana permaneceu em contato direto com fluido biológico, o que favoreceu que o material tenha se mantido íntegro durante o tratamento.

Análises histológicas são amplamente utilizadas para avaliação da regeneração óssea, pois possuem alta acurácia para caracterização e quantificação do tecido neoformado. Em nosso estudo, os resultados obtidos pela análise histológica quantitativa, através da estereologia, nos permitem inferir que a utilização da membrana de látex influenciou positivamente a regeneração óssea, pois, grupos tratados apresentaram maior quantidade de tecido ósseo neoformado em comparação aqueles que não receberam tratamento específico em todos os períodos de tempo estudados.

Corroborando com nossos achados, Ereno et al. (2010) avaliaram o uso de membrana de látex em regeneração óssea na calvária de coelhos. O estudo avaliou a neoformação óssea através de análises radiográficas, histológicas e histomorfométricas, nos tempos de 15, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório. Os resultados mostraram que animais tratados com a membrana obtiveram uma taxa de formação óssea maior em todos os períodos avaliados, bem como não apresentaram reações adversas relacionadas ao látex.

Além da quantificação do tecido ósseo neoformado, a presença de colágeno no defeito também foi avaliada, pois o colágeno é um dos principais componentes da matriz óssea não mineralizada, além de ser essencial para o reparo ósseo.

A quantificação das fibras de colágeno tipo III e I, analisadas através da densitometria óptica pela birrefringência das fibras colágenas coradas com Picrosirius red, demonstrou um aumento na quantidade de colágeno no período de quatro semanas tanto para grupo controle quanto tratado. Além disso, grupos que utilizaram membranas de látex apresentaram uma quantidade maior de fibras de colágeno tipo I em ambos os períodos experimentais. Ao observar as médias dos grupos, podemos perceber que em uma semana as fibras tipo III foram maiores no grupo controle. Durante o processo de regeneração osteoblastos sintetizam colágeno tipo III que é subsequentemente substituído por colágeno tipo I (TERHEYDEN et al., 2012), podendo as fibras colágeno tipo III serem consideradas imaturas e fibras de colágeno tipo I maduras. Nossos resultados sugerem que a membrana de látex proporcionou maior produção e maturação das fibras de colágeno, visto que a quantidade de colágeno tipo I foi maior nos grupos tratados em ambos os períodos de tempo.

Sabe-se que o sucesso na regeneração óssea está relacionado a diversos fatores, que incluem desde a formação do coágulo sanguíneo, aporte vascular adequado e ação coordenada de células ósseas. Todo este processo envolve uma série de eventos biológicos comandados por fatores de crescimento ósseos e vasculares. Por este motivo o estudo de proteínas ósseas que influenciam a formação da rede vascular no local da lesão e a produção de tecido ósseo são importantes no estudo da regeneração óssea.

Estudos prévios com a utilização de membrana de látex demonstraram que este biomaterial melhora os níveis de VEGF e a resposta inflamatória inicial,

comprovando sua propriedade biológica de estimular a neoangiogênese (FERREIRA et al., 2009; ANDRADE et al., 2011), porém investigações sobre a influência da membrana na expressão de proteínas osteogênicas ainda não haviam sido realizadas. Para compreender o comportamento desses fatores com tratamento empregado, os marcadores de formação óssea osteopontina e osteocalcina foram quantificados através de análise imunohistoquímica.

A expressão de osteopontina foi maior nos grupos tratados com membrana de látex natural em ambos os períodos experimentais. A osteopontina é uma proteína de formação óssea responsável pela mineralização e adesão de osteoblastos e osteoclastos na superfície da matriz óssea (ANDRADE et al., 2007; SUBRAMAN et al., 2015). Seu aumento nos grupos tratados sugere que a melhora na neoformação óssea observada na análise histológica quantitativa pode estar intimamente relacionada ao aumento desta proteína desde a fase inicial do reparo ósseo.

Em relação a osteocalcina, não foram observadas diferenças em sua expressão tanto relacionada ao tratamento quanto ao tempo. A osteocalcina é um importante marcador de osteoblastos maduros e também está relacionada a mineralização e regulação da atividade osteoclástica (ANDRADE et al., 2007). Como a osteocalcina é uma proteína relacionada a fase final do reparo ósseo, principalmente à fase de remodelação do tecido neoformado, os resultados obtidos sugerem que os períodos avaliados não foram suficientes para alterar os níveis desta proteína na matriz óssea, pois, em ratos a remodelação do tecido ósseo neoformado ocorre entre 5 e 8 semanas (MARSELL; EINHORN, 2011). Apesar dos níveis de osteocalcina não terem sido influenciados pelo tempo e uso da membrana, foi possível perceber uma expressão desse marcador durante todo o processo de regeneração. Corroborando com nossos achados, Machado et al. (2015) avaliaram a ação de BMP-2, fração do látex e de selante de fibrina no reparo tecidual de defeito ósseo em tíbia de ratos e observaram uma expressão de osteocalcina em todos os grupos experimentais nos períodos de duas e seis semanas pós-operatórias.

Para os resultados das análises radiográficas os grupos avaliados quatro semanas após o procedimento cirúrgico apresentaram valores de densidade radiológicas maiores do que os grupos avaliados uma semana após a cirurgia, visto que, a atenuação dos raios X no tecido ósseo depende da crescente calcificação

durante o processo de regeneração (AUGAT et al., 2014). Entretanto, diferenças significativas entre os grupos controles e tratados, não foram encontradas. Ereno et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes para a análise radiológica, pois apesar dos achados histológicos evidenciarem melhora na neoformação óssea nos grupos tratados com membrana de látex, não foram observadas diferenças significativas nas densidades radiológicas entre grupos tratados e controle. Os autores explicam esse resultado devido à baixa heterogeneidade das densidades radiológicas entre os grupos no local do defeito.

Assim como na análise radiológica, para as medidas de DMO, observou-se diferença nos dados de densidades em relação aos períodos experimentais, onde grupos avaliados quatro semanas após a cirurgia obtiveram resultados superiores comparados aos grupos de uma semana. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos em um mesmo período de tempo. Esse achado também se mostra conflitante aos dados encontrados para avaliação microscópica da neoformação óssea, em que grupos que utilizaram a membrana apresentaram níveis maiores de volume ósseo neoformado. Para compreender os achados das análises das imagens obtidas a partir da incidência de raios X, fatores relacionados ao processo de mineralização e aos tempos experimentais devem ser considerados.

Durante a regeneração óssea o processo de mineralização é realizado em duas fases principais. Na fase inicial ocorre uma mineralização rápida, mas relativamente desorganizada do tecido, seguida, em fases finais, pela retirada do osso neoformado por osteoclastos que é então substituído por osso lamelar. Durante a segunda fase de mineralização é que são formadas placas de cristais de hidroxiapatita orientadas uniaxialmente de forma nanométrica, dentro das fibras de colágeno (TERHEYDEN et al., 2012). Levando-se em consideração que a regeneração óssea completa em ratos ocorre por volta 5 a 8 semanas, Histing et al. (2011) recomendam os períodos de uma a duas semanas para avaliar as fases iniciais da regeneração enquanto que os períodos de quatro a seis semanas são apropriados para avaliação das fases finais de reparo. Porém, sugere-se que, apesar da quantidade de tecido ósseo neoformado ter sido maior nos grupos tratados, o período de quatro semanas não foi suficiente para a maturação completa do tecido e conseqüente alterações na DMO e densidades radiológicas.

O sucesso no reparo de fraturas é alcançado quando o tecido ósseo é capaz de reestabelecer suas funções fisiológicas e suas propriedades mecânicas. Sendo assim, o progresso na consolidação do tecido é acompanhado por um aumento na força e rigidez da estrutura óssea (AUGAT et al., 2014), como pode ser percebido nos achados de nosso estudo, em que, as propriedades de força máxima e rigidez observadas nos grupos de quatro semanas foram maiores comparadas aos grupos de uma semana. Diferentemente dos resultados desejados para a cicatrização de defeitos maxilofaciais, onde o objetivo principal é restaurar o volume ósseo, para a regeneração de ossos longos os objetivos são direcionados para restabelecer propriedades mecânicas adequadas do osso (GUDA et al., 2013). Em nosso estudo, os grupos tratados com membranas de látex obtiveram valores de rigidez relativa superiores aos grupos sem tratamento específico. Esse achado pode ser relacionado a maior taxa de tecido ósseo neoformado nesses grupos, como observado pela análise quantitativa histológica. A rigidez da fratura aumenta duas vezes mais rapidamente do que a força óssea, isso significa que quando a rigidez atingir sua quantidade original, a força será apenas metade (AUGAT et al., 2014). Portanto, a rigidez é um indicador mecânico adequado de cicatrização de fraturas. Em relação a força máxima, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao uso da membrana, porém a observação das médias revela valores maiores de força nos grupos tratados com membrana de látex, que sugere que a maior quantidade de tecido ósseo neoformado nesse grupo melhorou também a propriedade mecânica de força máxima.

A ROG é um método bem estabelecido para auxílio no reparo de defeitos ósseos, através do uso de membranas que protegem o local e auxiliam a regeneração pela ação de células osteogênicas. A utilização de membranas bioreabsorvíveis ou não ainda é uma questão em aberto. Apesar do uso de membranas bioreabsorveis ser uma alternativa interessante, estas membranas ainda apresentam limitações relacionadas a rápida degradação, reações inflamatórias inadequadas e alto custo (LEE; KIM, 2014; VON ARX et al., 2005). Por estas razões, o uso de membranas não reabsorvíveis pode ser considerado adequado em GBR, especialmente em ossos longos, onde seu uso permite associar o preenchimento do defeito ósseo com fatores de crescimento ou enxertos ósseos.

Membranas PTFE não reabsorvíveis, tem sido amplamente utilizadas e consideradas padrão para ROG. Moura et al. (2014) objetivaram comparar o desempenho de membranas de látex ao de membranas de PTFE. Seus resultados permitiram concluir que as membranas de látex induziram a formação óssea em calvária de ratos e obtiveram desempenho semelhante as membranas PTFE.

O custo relacionado a utilização das membranas ainda é um obstáculo para realização ROG. Nossos resultados encorajam a utilização de membranas a base de látex, como uma alternativa eficaz e com custos acessíveis, pois a melhora na regeneração mostra que ela foi capaz de desempenhar seu papel como uma barreira biológica, auxiliando a neoformação do tecido ósseo. Porém, apesar do estudo da membrana ter demonstrado bons resultados, mais esclarecimentos sobre seus mecanismos de ação, suas influências em outros fatores de crescimento bem como sua real efetividade comparada com diferentes membranas e materiais osteoindutivos ainda se fazem necessários.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Em conclusão o presente estudo demonstrou que a utilização da membrana de látex natural em defeitos ósseos críticos de tíbias de ratos, aumentou o volume ósseo neoformado, a matriz de colágeno tipo I e a expressão de osteopontina, bem como melhorou a rigidez relativa da tíbia. Esses resultados foram observados tanto em estágios iniciais quanto finais do processo de reparação óssea, permitindo inferir que este material é capaz de beneficiar a regeneração óssea desde o início do reparo tecidual até fases mais tardias da regeneração de ossos longos. Além disso, sugere-se que o látex é capaz de gerar estímulos e alterar a ação de células osteogênicas.

Referências

8 REFERÊNCIAS

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

AERSSSENS, J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. **Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 663-670, 1998.

ALGHAMDI, A. S.; CIANCIO, S. G. Guided tissue regeneration membranes for periodontal regeneration-a literature review. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 11, n. 3, p. 226-231, 2009.

ANDRADE, A. D. et al. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **ImplantNews**, v. 4, n. 6, p. 659-662, 2007.

ANDRADE, T. A. M. et al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, 2011.

AUGAT, P. et al. Biomechanical methods for the assessment of fracture repair. **Injury**, v. 45, n. SUPPL. 2, p. S32-S38, 2014.

BALABANIAN, C. A. C. A. et al. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p. 201-205, 2006.

BARREIROS, V. C. P. et al. Morphological and morphometric analyses of crushed sciatic nerves after application of a purified protein from natural latex and hyaluronic acid hydrogel. **Growth Factors**, v. 32, n. 5, p. 164-170, 2014.

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139-146, 2008.

BUTCHER, M. et al. In vivo strains in the femur of river cooter turtles (*Pseudemys concinna*) during terrestrial locomotion: tests of force-platform models of loading mechanics. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 15, p. 2397-2407, 2008.

BUZA, J. A.; EINHORN, T. Bone healing in 2016. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 101-105, 2016.

CAMPBELL, J. B. et al. Application of Monomolecular Filter Tubes in Bridging Gaps in Peripheral Nerves and for Prevention of Neuroma Formation. **Journal of Neurosurgery**, v. 13, n. 6, p. 635-637, 1956.

CAO, X.; CHEN, D. The BMP signaling and in vivo bone formation. **Gene**, v. 357, n. 1, p. 1-8, 2005.

CLAES, L. Biomechanical Principles and Mechanobiologic Aspects of Flexible and Locked Plating. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 25, n. SUPPL 1, p. S4-S7, 2011.

CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n.3, p. 133-43, 2012.

CURY, D. P. et al. Structural and Ultrastructural Characteristics of Bone-Tendon Junction of the Calcaneal Tendon of Adult and Elderly Wistar Rats. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. 1-18, 2016.

DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 81, n. 5, p. 672-676, 1988.

DUPOIRIEUX, L. et al. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defectsInternational. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 30, n. 1, p. 58-62, 2001.

ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 95A, n. 3, p. 932-939, 2010.

FERREIRA, M. et al. Angiogenic Properties of Natural Rubber Latex Biomembranes and The Serum Fraction of Hevea brasiliensis. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 3, p. 564-569, 2009.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-17, 2015.

FRADE, M. A. C. et al. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 32, n. 4, p. 157-162, 2004.

FRADE, M. A. C. et al. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 1, p. 45-51, 2012.

GARCIA, P. et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. **European Cells and Materials**, v. 26, p. 1-14, 2013.

GOTTLOW, J. et al. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration Case reports. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 13, n. 6, p. 604-616, 1986.

GREEN, E.; LUBAHN, J. D.; EVANS, J. Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. **Journal of Surgical Orthopaedic Advances**, v. 14, n. 2, p. 64-72, 2005.

GRUBER, R.; STADLINGER, B.; TERHEYDEN, H. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration: molecular and cellular mechanisms. **Clinical Oral Implants Research**, [s.n], p. 1-8, 23, 2016.

GUDA, T. et al. Guided bone regeneration in long-bone defects with a structural hydroxyapatite graft and collagen membrane. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 17, p. 1879–1888, 2013.

GUSMÃO, C. V. B.; BELANGERO, W. D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 44, n. 4, p. 299-305, 2009.

HAK, D. J. et al. Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. **Injury**, v. 45, n. 2, p. S3–S7, 2014.

HERCULANO, R. D. et al. Natural Rubber Latex Used as Drug Delivery System in Guided Bone Regeneration (GBR). **Materials Research**, v. 12, n. 2, p. 253–256, 2009.

HISTING, T. et al. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. **Bone**, v. 49, n. 4, p. 591-599, 2011.

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

HOPPENFELD, S.; MURPHY, V. L. **Tratamento e Reabilitação de Fraturas**. São Paulo: Manole, 2001.

HORNER, E. A. et al. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 16, n. 2, p. 263–271, 2010.

HUTMACHER, D.; HÜRZELER, M. B.; SCHLIEPHAKE, H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for gtr and gbr applications. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 11, n. 5, p. 667–678, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KOLAR, P. et al. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, n. 4, p. 427–434, 2010.

LEE, S.-W.; KIM, S.-G. Membranes for the Guided Bone Regeneration. **Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 36, n. 6, p. 239–246, 2014.

LI, J. et al. An overview of osteocalcin progress. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 34, n. 4, p. 367–379, 2016.

LOI, F. et al. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**, v. 86, p. 119–130, 2016.

MACHADO, E. G. et al. A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 3, p. 288–296, 2015.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551–555, 2011.

MCKIBBIN, B. The biology of fracture healing in long bones. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60-B, n. 2, p. 531–533, 1978.

MORAES, R. C. N. et al. Estudo comparativo do desempenho de diferentes membranas oclusivas de látex natural no reparo ósseo. **Salusvita**, v. 31, n. 3, p. 213–228, 2012.

MOURA, J. M. L. et al. Comparison of the performance of natural latex membranes prepared with different procedures and PTFE membrane in guided bone regeneration (GBR) in rabbits. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 9, p. 2111–2120, 2014.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina: Aplicabilidade na formação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães.** 2000. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

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

ODACI, E. et al. Rapid estimation of the vertebral body volume: A combination of the Cavalieri principle and computed tomography images. **European Journal of Radiology**, v. 48, n. 3, p. 316–326, 2003.

OLIVEIRA, B. G. K. **Avaliação do reparo ósseo após a aplicação de látex natural em diferentes tipos de enxertos ósseos em calvária de ratos Wistar.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

OLIVEIRA, J. A. A.; HYPPOLITO, M. A.; COUTINHO-NETTO, M. M. Miringoplastia com a utilização de um novo material biosintético. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 5, p. 649–655, 2003.

PARFITT, A. M. et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. **Bone and Mineral Research**, v. 2, n. 6, p. 595–610, 1987.

PINHO, E. C. C. M. et al. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 1, p. 27-32, 2004.

PONTORIERO, R. et al. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 14, n. 10, p. 618-620, 1987.

PRADO, F. DE A. et al. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 18, n. 1, p. 7-13, 2006.

RETZEPI, M.; DONOS, N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 6, p. 567-576, 2010.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, n. 1, p. 455-498, 2006.

ROSA, N. et al. From mechanical stimulus to bone formation: A review. **Medical Engineering and Physics**, v. 37, n. 8, p. 719-728, 2015.

RYOO, H.-M.; LEE, M.-H.; KIM, Y.-J. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 51-57, 2005.

SADER, S. L. et al. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 15, n. 4, p. 338-344, 2000.

SCALIZE, P. H. et al. Low-level laser therapy improves bone formation: stereology findings for osteoporosis in rat model. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 1599-1607, 2015.

SCHMIDT-BLEEK, K. et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 3, p. 567-73, 2012.

SUBRAMAN, V. et al. OPN –Revisited. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 6, p. ZE10-3, 2015.

TERHEYDEN, H. et al. Osseointegration - communication of cells. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 10, p. 1127-1135, 2012.

TORTORA, GERARD J. DERRICKSON, B. **Corpo Humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TURRI, A. et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. **Biomaterials**, v. 84, p. 167-183, 2016.

VON ARX, T. et al. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 6, p. 843-853, 2005.

ZIMMERMANN, M. et al. Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1719-1723, 2007.

ZIMMERMANN, M. **Caracterização da membrana de látex Hevea brasiliensis e reação tecidual após implante no subcutâneo de equinos e bovinos**. 2012. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2012.

Aneiros

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 061/2015, sobre o projeto intitulado “Efeitos da membrana de látex na regeneração de defeito ósseo em tibia de rato”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Antonio Carlos Shimano** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de outubro de 2015.

We certify that the protocol nº 061/2015, entitled “*Effects of latex membrane in default of bone regeneration in rat tibia*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/26/2015.

Ribeirão Preto, 26 de outubro de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – (16)3315-3301

Apêndice

APENDICE

Tabela: Resultados morfologia óssea, DMO, propriedades mecânicas, histologia, Imunohistoquímica e raios-X em relação as variáveis estudadas.

	C1	L1	C4	L4	TEMPO		MEMBRANA		INTERAÇÃO (Tempo*Membrana)
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Efeito	P	Efeito	P	P
Morfologia óssea									
Comprimento Tíbia (mm)	37,761 (1,224)	38,372 (0,999)	40,245 (2,280)	40,970 (1,886)	↑	0,000	ns	0,236	0,919
Massa Tíbia (g)	0.791 (0.093)	0.781 (0.103)	1,172 (0,114)	1,120 (0,086)	↑	0,000	ns	0,345	0,522
DMO									
DMO (g/cm ²)	0,120 (0,017)	0,124 (0,014)	0,153 (0,034)	0,134 (0,029)	↑	0,017	ns	0,391	0,179
Propriedades mecânicas									
Força máxima (N)	25,618 (10,203)	28,944 (9,333)	58,197 (14,586)	60,206 (10,059)	↑	0,000	ns	0,473	0,859
Rigidez relativa (N/mm)	45,036 (17,857)	48,265 (12,401)	117,951 (19,057)	136,138 (13,809)	↑	0,000	↑	0,048	0,161
Histologia									
Colágeno I (%)	42,760 (7,092)	55,196 (10,605)	51,468 (14,344)	62,493 (5,181)	ns	0,091	↑	0,018	0,876
Colágeno III (%)	33,356 (11,486)	30,690 (9,277)	51,190 (19,659)	56,341 (6,427)	↑	0,001	ns	0,830	0,501
Volume ósseo (BV/TV - %)	40,411 (1,239)	50,171 (3,543)	53,008 (10,739)	66,879 (4,609)	↑	0,000	↑	0,001	0,465
Imunohistoquímica									
OPN (µm ²)	9299,41 (4148,38)	20310,76 (3926,89)	4814,08 (3533,84)	12888,18 (6935,49)	ns	0,206	↑	0,037	0,744
OC* (µm ²)	13141,94 (-3471; 41681)	26981,53 (-61545; 195520)	25889,53 (-128500; 331638)	41124,88 (28712; 60970)	ns	0,480	ns	0,917	0,220

Raio-X									
Densidade	71,328	72,530	82,312	85,111	↑	0,008	ns	0,071	0,643
Radiológica	(5,014)	(7,459)	(9,760)	(4,569)					
DP = Desvio padrão; ns = não significante; ↑ = aumento; ↓ = diminui * Resultados apresentados em mediana valores mínimos e máximo									