

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DE UMA MEMBRANA DE COLÁGENO  
ASSOCIADA A EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS  
NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS COM PERDA  
ÓSSEA.**

***ESTUDO EXPERIMENTAL EM FÍBULAS DE RATOS***

**WAGNER COSTA ROSSI JUNIOR**

**PIRACICABA**

**2002**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DE UMA MEMBRANA DE COLÁGENO  
ASSOCIADA A EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS  
NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS COM PERDA  
ÓSSEA.**

**ESTUDO EXPERIMENTAL EM FÍBULAS DE RATOS**

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCGP-036/83  
CPG, 20 / 10 / 2002  
Assinatura do Orientador

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em  
Biologia Buco-Dental (Área de Anatomia) da  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba-  
Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP,  
para obtenção do título de Doutor em Biologia  
Buco-Dental.

**Orientador:** Prof. Dr. Fausto Bérzin

**WAGNER COSTA ROSSI JUNIOR**

**PIRACICABA**

**2002**

9007.970030

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP R735i
V	EX
TOMBO BC/	51666
PROC.	16-837-02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	06-12-02
Nº CPD	

CM00176939-1

BIB ID 271548

### Ficha Catalográfica

Rossi Junior, Wagner Costa.

~~R735i~~  
R735i

Influência de uma membrana de colágeno associada a extrato etanólico de própolis na consolidação de fraturas com perda óssea. Estudo experimental em fíbulas de ratos. / Wagner Costa Rossi Junior. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.  
xiii, 139p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Fausto Bérzin.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ossos – Regeneração. 2. Fosfatase alcalina. 3. Produtos naturais. 4. Membranas. I. Bérzin, Fausto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 06 de Setembro de 2002, considerou o candidato WAGNER COSTA ROSSI JUNIOR aprovado.

1. Prof. Dr. FAUSTO BERZIN

2. Prof. Dr. GILMAR DA CUNHA SOUSA

3. Profa. Dra. MARIA DE FÁTIMA SANT'ANNA

4. Profa. Dra. HELOISA AMELIA DE LIMA CASTRO

5. Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES

Agradeço, antes de mais nada, a Deus, que me concedeu a oportunidade de realizar este trabalho.

*" Diante da natureza, marcada pelas imarscecíveis belezas que revigoram a alma, passo a refletir no torvelinho bruxuleante do tecnicismo hodierno.*

*Agradeço-Te, todavia, óh! Senhor, pelos valores científicos com que enriqueces a atualidade dos homens; mas rogo-Te, óh! Pai do universo, que não deixes a humanidade se embriagar nas fantasias do artificialismo coberto pela neve densa do materialismo.*

*É nobre a função do cérebro, entretanto, jamais devemos esquecer as imortais florações do sentimento. O raciocínio abre a visão do homem para que possas evitar quedas nos obstáculos comuns a qualquer estrada, contudo, só o coração devidamente abastecido com a seiva do amor, dá-lhe condição de desferir vôo pelas faixas superiores da vida.*

*Quando a criatura humana surgiu no palco da Terra, a Terra a recepcionou num banquete ornamentado de flores, pedras, rios,...E, em sua chegada, o hóspede deslumbrou-se com o imenso tapete das vegetações e estático ante o luzeiro do firmamento.*

*Não permitas Senhor, que o homem se engolfe nos prazeres que o cérebro ilusoriamente possa traduzir, em detrimento das alegrias que só o coração pode alcançar! Que estejamos na civilização, amando a todos e ajudando o progresso. Mas, que tenhamos sempre a sensibilidade espontaneamente voltada para as coisas puras da natureza!*

*Nesse estado interior de reconhecimento e afeto, equilíbrio e harmonia, a vida ser-nos-á mais bela e mais abundante, na sublime caminhada da evolução.*

TAGORE, psicografado por Ariston S. Teles

Dedico este trabalho aos meus pais, **Wagner Costa Rossi e Dirce Sanches**

**Rossi**, sem os quais nada teria acontecido em minha vida. Nem sequer teria existido.

*"Perdoem a falta de jeito,*

*Perdoem o pouco tempo,*

*Perdoem toda a correria.*

*Perdoem se, às vezes, não chegamos,*

*Perdoem quando não entendemos,*

*Perdoem sempre que não ligamos*

*Perdoem o amor que não mostramos.*

*Mais saibam que acima de tudo,*

*Que antes de todas as coisas,*

*Além de toda ciência*

*Maior que qualquer grandeza,*

*É saber que não teríamos chegado até aqui*

*Se vocês não existissem ..."*

Aos meus irmãos **Luciano Sanches Rossi** e **Paulo Eduardo Rossi**, cujo apoio sempre presente, me transformou em gigante, capaz de seguir adiante, apesar das dificuldades, buscando sempre a conquista de um ideal. Peço a Deus que possamos sempre reviver cada momento em que crescemos, vibramos e choramos juntos; peço que tenhamos a permissão de caminharmos sempre juntos, no mais puro sentimento de amizade, que nos une além da vida material.

À Rafaela Rangel Rosa por toda sua contribuição; por acreditar em mim quando eu achei difícil acreditar em mim mesmo; por dizer algumas vezes o que eu realmente precisava ouvir; por se abrir comigo; por me confiar seus pensamentos, suas decepções e seus sonhos; por ter posto tanta sabedoria, cuidado e imaginação em nossa relação; por compartilhar tantas coisas boas e tantas coisas ruins. Obrigado por toda sua honestidade, gentileza e presença quando mais foi necessário. Obrigado por ser, antes de qualquer coisa, minha melhor amiga, na concepção da palavra e obrigado por todo companheirismo, amor e gratidão em todo tempo de nossa convivência.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao professor Doutor **Fausto Bérzin**, por toda sua influência em minha vida profissional e por todos seus conselhos, toda sua orientação e toda sua amizade a mim demonstrada. Serei para sempre grato.

*"Ser mestre não é apenas lecionar.*

*Ensinar não é só transmitir matéria.*

*Ser mestre é ser instrutor e amigo, guia e companheiro,*

*é caminhar com o aluno passo a passo, é transmitir a*

*este os segredos da caminhada.*

*Ser mestre é ser exemplo.*

*Exemplo de dedicação, doação,*

*dignidade pessoal e sobretudo amor.*

*Nosso carinho ao mestre que soube, além de transmitir-nos*

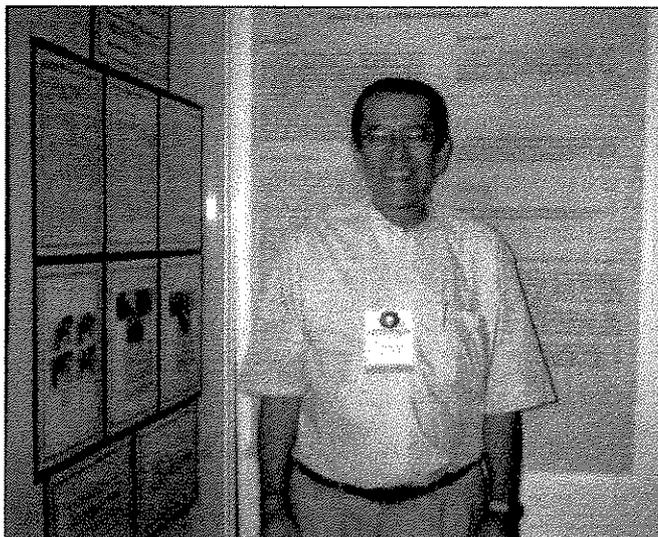
*sua experiência e seu conhecimento, apoiar-nos em nossas*

*dificuldades."*

## HOMENAGEM

" O verdadeiro homem de bem é aquele que pratica a lei da justiça, lei de amor e lei de caridade em sua maior pureza. Se interroga a consciência sobre seus próprios atos, pergunta a si mesmo se não violou esta lei; se não fez o mal; e se fez todo o bem que podia; se negligenciou voluntariamente uma ocasião de ser útil; se ninguém tem o que reclamar dele; enfim, se fez ao outro tudo o que queria que se fizesse para com ele..."

Professor Doutor **Carlos Roberto Hoppe Fortinguerra**, homem de bem...



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Gilmar da Cunha Sousa**, por todo incentivo e colaboração que sempre foram demonstrados.

À professora Doutora **Heloísa Amélia de Lima Castro**, pela boa vontade e ajuda prestadas nos momentos de necessidade.

À professora Doutora **Maria de Fátima Sant'Anna**, por todo carinho e amizade e por toda colaboração, sem a qual, este trabalho não teria sido concluído.

Ao professor Doutor **Pedro Duarte Novaes**, que sempre colaborou e sempre transmitiu tranqüilidade, serenidade e competência profissional, servindo como espelho para meu crescimento moral e profissional.

À professora Doutora **Darcy de Oliveira Tosello**, pelo bom humor e simpatia que sempre me foram transmitidos e que de forma inconsciente ou não, servia como um fortalecimento para pudesse ocorrer a conclusão deste trabalho.

Ao amigo professor Doutor **Paulo Henrique Ferreira Cária**, por toda colaboração mesmo nos poucos momentos de convivência, mas sem dúvida, indispensáveis.

Ao amigo professor **João Carvalho Filho**, que sempre esteve e está ao meu lado demonstrando e ensinando que existe algo mais valioso que a simples busca por riquezas materiais.

Ao amigo professor **José Ronaldo Vieira da Costa**, que sempre incentivou (quase diariamente) a realização e conclusão deste trabalho.

Ao professor **Vinícius Vieira Vignoli**, pela grande cooperação e exemplo a mim demonstrados que foram fundamentais para a execução desta pesquisa.

Ao amigo **Laércio Martelli**, técnico do laboratório de Anatomia da EFOA - CEUFE, por toda ajuda dedicada.

Ao amigo **João Batista Leite de Campos**, técnico do laboratório de Anatomia da FOP-UNICAMP, pela amizade sempre demonstrada.

Ao amigo Professor Doutor **Masaharu Ikegaki**, por toda ajuda e conhecimentos a mim transmitidos, indispensáveis para alcançar meus objetivos.

Ao Professor **Noé Vital Ribeiro Júnior**, pela grande cooperação.

Aos amigos **Fábio Ramoa Pires** e **Márcio Espíndola Patrianova**, por toda ajuda e por todos os conselhos.

Às amigas **Andréa Beatriz Bonisi**, **Marlene Aparecida Moreno Ganzela** e **Adah Regina Freire**, por todo carinho e por toda amizade, mesmo que a distância nos separe.

À **Rúbia Helena Rangel Rosa**, pela grande colaboração e por todo incentivo para que este trabalho pudesse ser concluído.

À amiga **Cláudia Ramos Pinheiro**, cuja alegria e bom humor servem de ânimo para que possamos sempre seguir em frente.

Ao amigo **Edinaldo Rocha**, por toda ajuda e amizade demonstrada.

À **Andrea Aparecida dos Santos**, por toda cooperação e boa vontade, sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

Aos professores de Histologia da EFOA - CEUFE, **Benno Kuehne**, **Antonella Sachsida Braga Vilela** e **José Renan Vieira da Costa**, cuja colaboração e tempo dispendidos foram indispensáveis para a conclusão desta pesquisa.

À amiga **Joelma Aparecida Macchi** sempre mostrando boa vontade e simpatia em todas as vezes que precisei de sua ajuda.

A todos aqueles que contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído e que acidentalmente, não foram mencionados. Peço desculpas e devo eterna gratidão.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	01
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	03
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
PROPOSIÇÃO.....	21
REVISÃO DA LITERATURA.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS.....	67
DISCUSSÃO.....	111
CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS

M = Músculo

Mm = Músculos

μl = Microlitros

EEP = Extrato Etanólico de Própolis

e-EPTF = Politetrafluoretileno Expandido

RTG = Regeneração Tecidual Guiada

ROG = Regeneração Óssea Guiada

GTR = Guided Tissue Regeneration

BMP = Bone Morphogenetic Protein (Proteína Morfogenética do Osso)

TGF-β = Fator de Crescimento Transformador Beta

EGF = Fator de Crescimento Epidermal

PDGF = Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

PGE2 = Prostaglandina E2

HE = Hematoxilina- Eosina

PVPI = Polivinilpirrolidona iodada

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figuras</b>		<b>Página</b>
1	Tórax exposto para coleta de sangue	60
2	Cavidade torácica aberta para exposição do coração (seta)	61
3	Coleta de sangue do átrio direito	61
4	Tricotomia (a) e incisão (b) da face lateral da perna esquerda	63
5	Afastamento do tecido muscular (a) e exposição da fibula (b)- seta)	63
6	Defeito ósseo de 3,5 mm entre os terços proximal e médio da diáfise (a)- seta; e adaptação da membrana no defeito ósseo (b)- seta	64
7	Notar a membrana fixada ao coto proximal (a)- seta; membrana fixada nos cotos proximal e distal formando um tubo (b)- seta	64
8	Reposição de tecido muscular (a); sutura (b)	64
9	Fragmento da membrana de colágeno com 7 x 5 mm. de área (seta)	65
10	Representação esquemática da região da diáfise da fibula onde foi retirado de 3,0 a 3,5 mm de osso	65
11	Aspecto radiográfico de uma fibula totalmente regenerada radiograficamente (a) e de uma fibula não regenerada (b); seta indica defeito ósseo	71

- 12 Aspecto histológico de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 %, de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. A porção à esquerda mostra o coto distal (CD), enquanto à direita vê-se o coto proximal (CP). As setas indicam as bordas da membrana mostrando sua eficiência em evitar a entrada de tecidos moles na região do defeito. Aumento de 20 x 81
- 13 **A-** Aspecto histológico de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia mostrando coto proximal (CP) à esquerda. À direita do coto proximal, observa-se uma pequena ilha de cartilagem. Aumento de 80 x. **B-** Ilha de cartilagem em maior aumento (IC) e fragmentos da membrana em reabsorção (FM). Aumento de 150 x 81
- 14 Aspecto histológico de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia; notar a proliferação celular proveniente da medula óssea (MO) para dentro da área de fratura (IM); (CP)- coto proximal; mais inferiormente, notar uma pequena ilha de osso necrótico (†). Aumento de 110 x 82
- 15 Áreas basófilas no centro do defeito (setas) indicando possíveis locais onde esteja ocorrendo deposição de tecido 82

- ósseo. Aumento de 850 x
- 16 Barreira de células (setas) criada na periferia da membrana em uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10% de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. Aumento de 865 x 83
- 17 Aspecto de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. A- região do coto proximal (CP); notar células da medula óssea (MO) invadindo o defeito ósseo (IM) e região de deposição de novo osso (★). Aumento de 140 x; B- Região do coto distal com sinais de reabsorção (‡); aumento de 90 x. 83
- 18 Aspecto histológico de uma fibula direita de um animal do grupo I sacrificado 14 dias após a cirurgia. A- Extremidade do coto proximal (CP); tecido muscular (TM); aumento de 20 x; B- Extremidade do coto distal (CD); tecido muscular (TM). Aumento de 20 x 84
- 19 Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a etanol 80 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. As setas indicam "encolhimento" da membrana para o interior do defeito. (CP)- coto proximal; (TM)- tecido muscular. Aumento de 25 x 87

- 20 Áreas de cartilagem nas adjacências do coto proximal de uma fíbula tratada com membrana de colágeno associada a álcool 80 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. (CP)- coto proximal; (IC)- ilha de cartilagem neo-formada. Aumento de 115 x 87
- 21 **A-** Aspecto histológico do coto distal de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a etanol 80 % mostrando osteoclastos (OC) na sua superfície (aumento de 20 x); **B-** Coto distal em maior aumento; as setas indicam, osteoclastos reabsorvendo o osso; osso necrótico (†); aumento 150 x 88
- 22 Aspecto histológico de uma fíbula direita de animal do grupo II sacrificado 14 dias após a cirurgia. **A-** coto proximal (CP) mostrando novo tecido ósseo depositado (☆);(aumento de 100 x). **B-** coto proximal (CP) em maior aumento mostrando o tecido recém-depositado (☆); aumento de 150 x. As setas indicam a barreira de tecido conjuntivo nas margens do coto. 88
- 23 Aspecto histológico de uma fíbula direita de um animal tratado com membrana de colágeno associada a etanol 80 %. **A-** coto distal (CD), mostrando tecido mole logo a sua frente; observar tecido muscular (TM); (aumento de 20 x). **B-** coto distal (CD) com células em sua extremidade tentando se propagar para o defeito ósseo (seta); observar osso necrótico (†); (aumento de 100 x). 89

- 24 Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a solução fisiológica de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia, mostrando sua eficácia em evitar a entrada de tecido muscular no interior do defeito ósseo (setas); (CD)- coto distal; (CP)- coto proximal. (Aumento de 25 x). 93
- 25 Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada à solução fisiológica, de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. A- Região do coto proximal (CP), mostrando a membrana começando a se fragmentar (FM) e uma ilha de osso necrótico (†) na região; observar osso recém-depositado em sua extremidade (☆); aumento de 85 x. B- Ilha de osso necrótico (†) em maior aumento; 120 x. 93
- 26 Região do coto distal (CD) de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a à solução fisiológica de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. Notar a presença de osso necrótico (†); aumento de 20 x. 94
- 27 Centro do defeito ósseo de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada à solução fisiológica de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. A- Notar ilhas de cartilagem (IC) e fragmentos de membrana (FM) em reabsorção; (aumento de 60 x). B- Maior aumento da ilha de cartilagem (IC); (aumento de 115 x). 94

- 28 Interior do defeito ósseo de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada à solução fisiológica de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. Observar áreas basófilas circundadas por células semelhantes a osteoblastos (setas). Aumento 1000 x 95
- 29 Aspecto histológico de uma fibula direita de um animal do grupo III sacrificado 14 dias após a cirurgia. Observar a grande quantidade de tecido muscular (TM) no centro do defeito ósseo; (CP)- coto proximal. Aumento de 30 x. 96
- 30 Aspecto histológico de uma fibula direita de um animal do grupo III sacrificado 14 dias após a cirurgia. A- coto proximal (CP) com novo tecido ósseo depositado em sua extremidade (☆); observar uma pequena reação do periósteo (seta); aumento de 100 x. B- coto distal (CD) com osso necrótico à esquerda da figura (‡); observar tecido cartilaginoso (TC) na tentativa de ocorrer o processo de regeneração. Aumento de 95 x. 96
- 31 Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 %, de um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. (CP)- coto proximal; (CD)- coto distal; as setas indicam as bordas da membrana mostrando sua eficiência em suportar o tecido muscular circunjacente (Aumento de 30 x). 100

- 32 Aspecto histológico de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 % de um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. (CP)- coto proximal; (CD)- coto distal; A- região do coto proximal mostrando à direita da figura uma pequena ilha de cartilagem (IC) e ao centro, restos da membrana implantada (FM); aumento de 60 x. B- região do coto proximal com áreas de tecido ósseo recém-depositado (☆); aumento de 100 x. C- região do coto distal, observando-se à esquerda osso necrótico (‡) e logo a frente do coto, osso sendo depositado (☆); aumento de 100 x. 100
- 33 Células criada ao redor da membrana de colágeno implantada em uma fíbula esquerda associada a EEP 10% de um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia (à direita da figura) evitando a penetração de tecido muscular (TM). Aumento de 1000 x. 101
- 34 Aspecto histológico de uma fíbula direita de um animal do grupo I sacrificado 28 dias após a cirurgia. (CP)- coto proximal; (CD)- coto distal. Observar a grande quantidade de tecido mole entre os fragmentos (aumento de 25 x). 102
- 35 Aspecto histológico de uma fíbula direita de um animal do grupo I sacrificado 28 dias após a cirurgia. A- Região do coto proximal (CP); observar tecido ósseo depositado 102

- recentemente (☆); aumento de 90 x. **B-** Região do coto distal (CD); observar à direita da figura uma ilha de cartilagem (IC) associada ao coto e à esquerda área com osso necrótico (†); aumento de 85 x.
- 36 Aspecto histológico de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a etanol 80 % em um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. Observar que a membrana (setas), foi pressionada pelo tecido muscular (TM); observar também uma pequena ilha de osso necrótico (†) e ao seu lado o fio de sutura (FS) em reabsorção; aumento de 25 x. 105
- 37 Aspecto histológico de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a álcool 80 % em um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. Observar na região do coto distal (CD) osso necrótico (†) sendo reabsorvido por osteoclastos; **A-** Aumento de 100 x. **B-** Aumento de 140 x 105
- 38 Aspecto histológico de uma fíbula direita de um animal do grupo II. (CP)- coto proximal; (CD)- coto distal. **A-** observar na região correspondente ao coto proximal (CP), tecido ósseo recentemente depositado (☆); aumento de 85 x. **B-** observar também na extremidade do coto distal (CD), nova deposição de tecido ósseo (☆). Notar o tecido muscular invadindo a área do defeito ósseo; aumento de 95 x 106
- 39 Aspecto histológico de uma fíbula esquerda tratado com 109

membrana de colágeno associada a solução fisiológica de um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. **A-** Observar a eficiência da membrana (seta) em evitar a entrada de tecido muscular (TM) para dentro do defeito ósseo; observar também na região do coto proximal (CP), tecido ósseo imaturo (☆), provavelmente proveniente de células da medula óssea (MO). Notar ainda na região do coto distal (CD), a existência de tecido ósseo imaturo (☆). Aumento de 25 x. **B-** aumento de 110 x.

- 40 Aspecto histológico de uma fíbula direita de um animal do grupo III, sacrificado 28 dias após a fratura. Observar a grande quantidade de tecido muscular (TM) logo a frente do coto proximal (CP); (MO)- medula óssea. Aumento de 120 x 110
- 41 Coto distal (CD) de uma fíbula direita de um animal do grupo III, sacrificado 28 dias após a fratura. **A-** observar a extremidade do coto distal rodeada por tecido muscular (TM) e uma ilha de osso necrótico (†); aumento de 100 x. **B-** ilha de osso necrótico sendo reabsorvida (†) por osteoclastos (OC); aumento de 130 x. 110

#### Tabelas

- |   |   | <b>Pag.</b> |
|---|---|-------------|
| 1 | Resultados numéricos da análise radiográfica dos animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia. | 72          |
| 2 | Resultados numéricos da análise radiográfica dos animais  | 73          |

sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia tratados com membrana de colágeno associada a própolis (grupo I).

- 3 Resultados numéricos da análise radiográfica dos animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia tratados com membrana de colágeno associada a etanol a 80 % (grupo II). 73
- 4 Resultados numéricos da análise radiográfica dos animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia tratados com membrana de colágeno associada à solução fisiológica (grupo III). 73
- 5 Valores da fosfatase alcalina em animais sacrificados 14 dias após a cirurgia. 76
- 6 Valores da fosfatase alcalina em animais sacrificados 28 dias após a cirurgia. 77
- 7 Comparação dos valores da fosfatase alcalina em animais sacrificados 14 dias após a cirurgia. 77
- 8 Comparação dos valores da fosfatase alcalina em animais sacrificados 28 dias após a cirurgia. 77
- 9 Comparação dos valores da fosfatase alcalina entre os animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia. 77

## RESUMO

Este trabalho verificou a capacidade de uma membrana de colágeno, associada ao extrato etanólico de própolis (EEP) a 10 %, em impedir a entrada de tecidos moles em falhas ósseas criados nas fíbulas de ratos albinos Wistar, com idade média de 50 dias e peso médio de 175 gramas. As falhas ósseas foram criadas na diáfise das fíbulas esquerdas e direitas através da retirada de um fragmento de 3,0 a 3,5 mm de comprimento, na região de transição entre os terços proximal e médio. A membrana embebida em 15  $\mu$ l de EEP a 10 % foi adaptada no local do defeito das fíbulas esquerdas de 20 animais, enquanto que as fíbulas direitas permaneciam sem membrana, servindo portanto, para observar a taxa de regeneração espontânea do osso. Ainda como controle, em 20 animais adaptou-se no defeito ósseo, a membrana embebida em 15  $\mu$ l de etanol a 80 % e nos outros 20 animais, a membrana embebida 15  $\mu$ l de solução fisiológica. Fez-se a dosagem da fosfatase alcalina no soro dos animais, uma vez que esta enzima encontra-se relacionada com o processo de consolidação de fraturas.

Os animais foram sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia; seus membros posteriores esquerdo e direito removidos; radiografados; e as fíbulas dissecadas e processadas para a análise histológica. Os cortes foram feitos em sentido longitudinal e corados em H.E. O sangue para se dosar a fosfatase alcalina foi coletado no momento do sacrifício.

Os resultados mostraram que a taxa de regeneração do osso foi pequena, não havendo diferenças significativas entre as fíbulas direitas (controle) e as esquerdas (implante de membrana). A membrana mostrou-se bastante eficiente em evitar a entrada de tecidos moles, especialmente tecido muscular, no interior do defeito ósseo, quando embebida em EEP a 10 % e em solução fisiológica. Porém, embebida em álcool a 80 %, não foi eficiente em impedir a invasão do defeito ósseo pelos tecidos circunjacentes. Observou-se pouca formação de cartilagem na área da

fratura, contrariamente ao que geralmente ocorre na consolidação de fraturas de osso longos. A fosfatase alcalina mostrou-se elevada nas fases iniciais, decrescendo à medida que o processo de regeneração se processa.

Pôde ser constatado que a membrana de colágeno, quando associada ao EEP a 10 %, foi eficiente em impedir que tecidos moles circunjacentes invadissem o defeito ósseo. Entretanto, a utilização desta membrana parece retardar o processo de consolidação.

**Palavras-chave:** própolis; regeneração tecidual guiada; ossos longos; membranas bioabsorvíveis; fosfatase alcalina.

## ABSTRACT

A collagen membrane associated to 10% propolis ethanolic extract (PEE) was evaluated in its ability to prevent the penetration of soft tissues into bone defects made in albino Wistar rats with an average age of 50 days and weighing around 175 grams. The osseous defects were made in the diaphysis of the left and right fibulae by removing a 3.0 by 3.5 mm long fragment from the transitional region between the proximal and medium thirds. Soaked in 15  $\mu$ l of 10% PEE, the membrane was applied to the defect of the left fibulae of 20 animals, while the right fibulae remained without a membrane in order to provide a site for the observation of the rate of bone spontaneous repair. Still as control, 20 animals had the osseous defects covered by a collagen membrane soaked in 15  $\mu$ l of 80% ethanol, while a collagen membrane soaked in 15  $\mu$ l of saline was used in the fibula defects of other 20 animals. The serum alkaline phosphatase was titrated in the animals, once that enzyme is related to the process of bone repair.

The animals were sacrificed in 14 and 28 days after the surgery; their left and right hind limbs were removed and x-rayed, and the fibulas were dissected and histologically processed. Cut longitudinally, the sections were stained by H.E. Blood was collected at the time of sacrifice for the titration of alkaline phosphatase.

The results showed a low rate of bone repair without any significant differences between the right (control) and left (membrane implant) fibulae. When soaked in 10% PEE, the membrane was very efficient in preventing the penetration of soft tissues, especially muscular tissue, into the osseous defect; however, when soaked in 80% ethanol, it was not efficient in preventing the invasion of the defect by the surrounding tissues. Cartilage formation was small in the fracture area, in opposition to what generally occurs in the repair of long bones. Alkaline phosphatase was high in the initial stages, decreasing as the regeneration process continued.

When associated to 10% PEE, the collagen membrane was efficient in preventing the surrounding soft tissues to invade the osseous defect. However, the use of such a membrane seems to slow the repair process.

**Key-words:** propolis; guided tissue regeneration; bioresorbable membranes; regeneration of long bones; alkaline phosphatase.

## INTRODUÇÃO

A regeneração óssea é um assunto extremamente importante e bastante estudado. Muitos avanços têm surgido na compreensão do reparo deste tecido através de experimentos utilizando animais, que têm esclarecido muitos aspectos do processo biológico e permitem testar materiais ou substâncias que possam interferir positivamente ou não neste processo. Na regeneração do tecido ósseo, muito importante é o estudo das condições em que existe perda óssea, situação bastante comum no organismo humano decorrente de traumas, tumores ou infecções. Embora existam vários materiais para a reposição do osso, (como osso de origem bovina ou hidroxiapatita), enxertos ósseos autógenos são os mais utilizados, pois o material é colhido do próprio paciente (AXHAUSEN, 1956; BULCHOLZ, R.W. et al., 1987; HULTH, 1989; AABOE et al., 1995).

Estudos em que são provocados defeitos ósseos ou fraturas com perda óssea em fíbulas de ratos não são freqüentes, talvez pelo fato deste osso não suportar diretamente o peso do animal uma vez que está articulada diretamente com a tíbia, recaindo todo o peso do animal neste osso. Porém ações musculares são exercidas sobre a fibula e ela fornece um modelo bastante satisfatório, pois defeitos de grandes dimensões, normalmente não sofrem reparo espontâneo, devido a interposição de tecido mole, principalmente tecido muscular, entre os cotos da fratura (CHAKKALAKAL, et al., 1999).

Para se tentar solucionar este problema, iniciou-se as terapias de regeneração tecidual guiada (GTR - guided tissue regeneration) ou a chamada regeneração óssea guiada (GBR - guided bone regeneration). O princípio de GTR usando membranas de barreira, foi inicialmente desenvolvido para a cirurgia periodontal. Através do uso de uma barreira mecânica inerte colocada entre a superfície radicular e o flap mucogengival, células ósseas, tecido conectivo gengival e células epiteliais gengivais são impedidas de invadir a área de cicatrização. Em contraste, permite-se que células do ligamento

periodontal repopulem a superfície radicular em direção coronal levando ao desenvolvimento de uma nova aderência.

A GTR, devido às suas propriedades, tem sido uma técnica muito utilizada no tratamento de defeitos ósseos. O primeiro estudo foi realizado em 1957 por MURRAY, que cobriu defeitos em fêmur e íleo de cachorros com um material plástico. Hoje, várias membranas são utilizadas para a GTR, destacando-se uma barreira não-reabsorvível constituída de politetrafluoretileno expandido (e-EPTF ou Gore-Tex), material química e biologicamente inerte e capaz de resistir a ataques enzimáticos e microbiológicos (BECMEUR et al. 1990). De grande interesse, são as membranas biodegradáveis, pois evita-se um estágio cirúrgico posterior para a remoção da membrana. Dentre estas membranas, destacam-se as constituídas de poliglactina 910 (Vicryl) e as membranas de colágeno, materiais degradados lentamente e, aparentemente, sem causar reações teciduais agressivas (CONN et al., 1974; FLEISHER et al., 1988; MAURER & McDONALD, 1985; BECKER, et al., 1992; AABOE et al. 1995).

Especialmente nas últimas décadas, tem havido um interesse cada vez maior em se utilizar produtos naturais (MAGRO FILHO et al., 1987; MAGRO-FILHO & CARVALHO, 1990; MAGRO-FILHO & CARVALHO, 1994; YAN et al., 1994; HUANG & YOU, 1997), pois estes se caracterizam por diversas atividades, destacando-se ações antiinflamatória, antibiótica, antipirética, analgésica, cicatrizante etc. (BANKOVA et al., 1983; HAVSTEEN, 1983; GREENAWAYN et al., 1990; DOBROWDSKI et al., 1991; MARCUCCI, 1995; MIZOERVA & CALDER, 1996).

Dentre estes produtos, a própolis tem se destacado por suas propriedades terapêuticas e um provável potencial no processo de aceleração do reparo de tecido cartilaginoso (SCHELLER et al., 1977) ou do reparo de tecido ósseo (STOJKO et al., 1978).

Própolis é o nome genérico de uma substância resinosa coletada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* de várias partes de uma planta (botões, flores, brotos) e que posteriormente, sofre alterações pela adição de substâncias oriundas das próprias abelhas (GHISALBERTI, 1979).

A palavra própolis é derivada de *pro* = *em* defesa e *polis* = *cidade*, atuando como um meio de proteção para a colméia, selando suas paredes e atuando como um meio embalsamador de pequenos insetos capturados pelas abelhas, para evitar que sejam decompostos.

Vários trabalhos têm mostrado os compostos ativos encontrados na própolis. Dentre estes, destacam-se os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, que têm sido considerados como as substâncias mais ativas da própolis (SCHELLER et al., 1977; BANKOVA et al., 1983; HAUSTEEN, 1983; PARK et al., 1995; PARK et al.; 1997; KOO & PARK, 1997). Porém, sua composição é bastante variável e depende muito da região onde as abelhas são encontradas (TATEFUJI et al., 1996). Conseqüentemente, suas atividades biológicas variam de acordo com a região geográfica onde a própolis foi coletada.

Este trabalho irá avaliar o potencial de uma membrana de colágeno obtida comercialmente em isolar tecidos moles que estejam circunjacentes a defeitos ósseos criados em fíbulas de ratos, estando a membrana associada à própolis, em decorrência das várias propriedades terapêuticas apresentada por esta substância.

## **PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente trabalho foi verificar a capacidade de uma membrana de colágeno, associada a extrato etanólico de própolis (EEP) a 10%, em isolar defeitos ósseos criados cirurgicamente em fíbulas de ratos, dos tecidos moles circunjacentes, especialmente tecido muscular. Esta avaliação se deu através de estudos radiográficos, bioquímicos e histológicos. Buscou-se observar também se existiu ativação ou retardo no processo de consolidação óssea, ou se não houve nenhuma influência sobre esta resposta biológica.

## REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão será apresentada referindo-se à composição e aplicações da própolis, seguido por relatos quanto aos mecanismos envolvidos nas fases da consolidação de uma fratura e finalmente o tratamento de defeitos ósseos com associação de algum material que possa ser utilizado na reposição do osso ou interferir no processo de regeneração.

### Própolis

A composição química da própolis e seus efeitos antibiótico e antimicóticos, têm sido comprovados por vários autores. SCHELLER et al. (1977), analisaram algumas das propriedades físico-químicas da própolis, observando nesta investigação, que os flavonóides são os compostos prevalentes. O mecanismo de ação da própolis nos microrganismos é extremamente complexo e não se pode fazer nenhuma analogia ao mecanismo de ação de outros antibióticos. O teste da ação antibiótica de cada fração da própolis separadamente, não inibiu o crescimento de estafilococos porém, quando todos os seus componentes foram associados, realizaram sua atividade primária. Esses resultados indicam que a ação antibacteriana da própolis não é devida à ação de uma substância em particular mas o resultado da ação complexa de vários dos seus componentes. Estes autores avaliaram também a influência do pH na atividade da própolis, constatando que a alcalinização do meio inibe suas atividades antibacterianas. Estas atividades são mantidas somente em pH neutro ou ácido.

No mesmo ano, os autores analisaram também a ação do EEP a 3% em células cultivadas *in vitro* com finalidade de testar sua capacidade de regeneração.

Foi utilizada uma cultura de células embrionárias mononucleares, usando-se um meio com EEP a 3% e um meio controle contendo solução salina. Analisado o número de mitoses, constatou-se que no meio contendo o EEP a 3% houve um aumento nítido no número de células (mitoses) quando comparado com o meio controle. Uma forte ativação de enzimas do ciclo de KREBS (NADH<sub>2</sub> redutase) foi também demonstrada no grupo contendo o EEP a 3%. Os autores sugerem que o EEP a 3% intensificou o metabolismo celular.

Ainda em 1977, SCHELLER et al., investigaram a influência do EEP na regeneração do tecido cartilaginoso de articulações. Foram utilizados cachorros "sem raça definida" nos quais se realizava cirurgias para remoção de uma parte da cartilagem articular da cabeça do fêmur e do acetábulo e colocava-se nestes locais uma pomada contendo EEP a 3%. Então reposicionava-se as partes moles e os membros eram imobilizados por três semanas. Após seis semanas da cirurgia, os animais foram sacrificados para investigações radiológicas e histológicas. Foi observado através das radiografias o aparecimento de uma sombra formada nas regiões onde ocorreu a perda da cartilagem, sendo estas "sombras" mais visíveis no grupo tratado com o EEP a 3%. Histologicamente, o grupo experimental mostrou a presença de fibrocartilagem com características de transição entre tecido ligamentoso e cartilaginoso, caracterizando uma estrutura histológica de nova cartilagem articular.

Em 1978, SCHELLER et al. analisaram os efeitos do EEP na polpa dental. Para isso, foram abertos 48 dentes de 2 cachorros, sob efeito de anestesia geral, com a finalidade de que houvesse exposição pulpar e, então, a polpa era traumatizada mecanicamente. Os animais foram sacrificados 7 e 28 dias após a cirurgia. Os autores observaram que a aplicação do EEP levou a uma regressão do processo

inflamatório e causou mudanças no desenvolvimento da polpa, estimulando ainda a formação de pontes de colágeno e de dentina fibrosa. O EEP também apresentou um efeito positivo no aspecto morfológico das células formadoras de dentina.

Também em 1978, STOJKO et al., observaram a ação do EEP na regeneração de tecido ósseo, utilizando 20 cachorros da raça "Beagle". Três cavidades foram realizadas na parte média do osso rádio direito dos animais, ocorrendo sempre comunicação com a cavidade medular, distanciando-se as aberturas, 1 cm uma da outra. As aberturas foram preenchidas com uma pomada contendo ou não extrato etanólico de própolis a 3%, com uma determinada atividade antibacteriana. Os efeitos do Extrato etanólico de própolis na osteogênese foram verificados radiograficamente em intervalos de duas semanas. Os resultados obtidos mostram claramente que o extrato etanólico de própolis tem um efeito acelerador na osteogênese. Duas semanas após a cirurgia, as aberturas que continham o extrato etanólico de própolis a 3% apresentavam-se cicatrizadas enquanto que nas aberturas que não continham o extrato, um novo tecido ósseo "radiográfico" foi visualizado somente quatro semanas após a cirurgia. Os autores sugerem que esta formação óssea acelerada ocorre devido a uma estimulação do metabolismo tecidual.

BANKOVA et al. (1983), estudaram os flavonóides da própolis, pois apesar de ela ter uma composição bastante complexa (ácidos graxos, compostos fenólicos e seus ésteres, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftalenos) as atividades fisiológicas atribuídas à própolis se deve, em grande parte, aos flavonóides. Dentre estas atividades destacam-se os efeitos antibacterianos e antifúngicos, uma ação anestésica local, ação espasmolítica, atividade anti-inflamatória e ação anti-úlceras.

Também em 1983, HAVSTEEN revisou e estabeleceu considerações sobre os flavonóides, destacando-os como uma classe de substâncias com alto potencial farmacológico e encontrado em grande quantidade na própolis. Os flavonóides são encontrados naturalmente em plantas que quando ingeridas, influenciam o nosso organismo. Eles ocorrem como aglicanas, glicosídeos e derivados metilados. Das várias ações realizadas pelos flavonóides, destaca-se sua atividade anti-inflamatória, atuando na síntese de prostaglandinas, tromboxanos ou leucotrienos, através das prostaglandinas cicloxigenases ou lipoxigenases, diminuindo a dor no local e normalizando a temperatura corporal nos casos de febre. Os flavonóides também atuam na hidroxilação da prolina, isto é, na síntese de colágeno. Embora os efeitos dos flavonóides são mais visíveis nas reações inflamatórias, eles atuam também na diabetes melitus, em reações alérgicas, neoplasias malignas, viroses e outros distúrbios que podem afetar os organismos vivos.

KYRIAKIDIS et al. (1986), examinaram os efeitos de vários flavonóides na atividade da enzima fosforilase cinase de músculos esqueléticos de coelhos. Esta enzima está intimamente envolvida na regulação do metabolismo do glicogênio. De 14 flavonóides testados, a quercetina e a fasetina foram eficientes inibidores, enquanto a herpecetina estimulou a atividade da enzima. A eficiência da quercetina em inibir a atividade das cinases é bastante alta quando a enzima é estimulada pelo etanol ou quando encontra-se em pH alcalino. Este tipo de avaliação foi realizada examinar a ação dos bioflavonóides atuando como ferramentas na identificação e caracterização bioquímica dos locais ou sítios catalíticos destas cinases.

MAGRO FILHO et al. (1987), analisaram uma pomada constituída por confrei, mel e própolis. O confrei atua como cicatrizante, a própolis como bactericida, agindo contra microrganismos Gram positivos e alguns Gram negativos;

e o mel, além de bactericida, agiria como nutriente. Os autores utilizaram 42 ratos da raça Wistar, que foram submetidos à divulsão dos espaços subcutâneos no dorso e abdome, onde foram implantados tubos de polietileno (dois no dorso e um no ventre) sem e com o medicamento (pomada contendo 90% em partes iguais das três substâncias e 10% de vaselina e lanolina). Os tubos foram analisados 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 60 dias após a cirurgia. Os resultados indicaram que a pomada de confrei, mel e própolis acelerou a neoformação conjuntiva até os 10 primeiros dias pós-operatórios ocorrendo baixa infiltração de neutrófilos, histiócitos e células mononucleares. Os autores sugerem que este tipo de medicamento é uma alternativa para ser aplicada em feridas superficiais.

Em 1990, MAGRO-FILHO & CARVALHO, examinaram histologicamente os efeitos da aplicação tópica da própolis em alvéolos dentais e em feridas cutâneas. Uma solução hidro-alcoólica de própolis a 10% ou uma solução hidro-alcoólica sem própolis, foram aplicadas em feridas cutâneas e em alvéolos dentais após exodontia. Os ratos foram sacrificados 3, 6, 9, 15, 21 dias após a realização da cirurgia. Os autores concluíram que a aplicação tópica da solução hidro-alcoólica de própolis a 10% acelerou o reparo epitelial depois que se realizou a exodontia, porém não mostrou resultados significativos em relação à cicatrização do alvéolo dental.

DOBROWDSKI et al. (1991), testaram a ação antibactericida, antifúngica, anti-inflamatória e antipirética da própolis e do pólen. Os autores utilizaram duas fórmulas para a administração da própolis e uma para a administração do pólen. Na ação antibacteriana, as duas formulações contendo própolis mostraram alguma atividade, especialmente contra microrganismos Gram positivos, mostrando também alguma atividade antifúngica. Quanto a ação anti-inflamatória, as formulações contendo própolis mostraram ação que variou de moderada a intensa em processos

de artrite induzida por formoldeído e edema induzido por PGE<sub>2</sub>, na pata dos animais. O efeito máximo contra a PGE<sub>2</sub> foi visível 4 horas após a realização do teste. Embora tenham demonstrado boa atividade anti-inflamatória, as formulações não demonstraram uma atividade antipirética significativa. Estudos bioquímicos para dosar a quantidade de fosfatase alcalina também foram realizados e os autores concluíram que o nível da enzima permaneceu inalterado quanto se administrou as formulações que continham a própolis.

Para analisar os efeitos de um rinse bucal contendo própolis no reparo de feridas cirúrgicas após sulcoplastias, MAGRO FILHO & CARVALHO (1994), utilizaram 27 pacientes divididos em três grupos: grupo 1 (sem enxaguatório), grupo 2 (enxaguatório contendo solução alcoólica sem própolis) e grupo 3 (enxaguatório contendo solução alcoólica de própolis a 5%). Em torno de 7 a 14 dias após a cirurgia, começaram a aparecer diferenças significativas no processo de cicatrização. Em relação à inflamação, decorridos 7 dias, os grupos 1 e 2 mostraram infiltrado neutrofilico intenso, enquanto o grupo 3 mostrou um infiltrado histiolinfoplasmocitário e conseqüentemente, uma reação mais branda. 14 dias após a cirurgia, o grupo 3 mostrou reação inflamatória moderada, leve ou ausente, enquanto que os outros dois grupos ainda apresentavam intensa atividade inflamatória. Estas observações confirmam a ação anti-inflamatória da própolis, clinicamente caracterizada por uma aceleração da epitelização. Quanto a dor, decorridos 7 dias da cirurgia, os grupos 1 e 2 apresentaram dor intensa, moderada ou ausente, enquanto que no grupo 3, a dor foi moderada ou não existiu. Estes resultados sugerem uma ação analgésica da própolis.

IVANOVSKA et al. (1995), estudaram os derivados da própolis solúveis em água após administração por diferentes vias em camundongos. Para provocar um

edema na pata dos animais, foi injetado zimozan por via intravenosa ou intraperitoneal. Os autores observaram que ocorria um rápido aumento na atividade do sistema complemento na primeira hora após a administração do zimozan e, em seguida, a atividade do sistema se reduzia de tal forma que 24 horas após a indução do edema, tudo estava normalizado. Isto sugere que os compostos hidrosolúveis da própolis são ativos somente no início das reações alérgicas ou inflamatórias.

MARCUCCI (1995), descreve que a própolis é uma substância de composição bastante complexa e com claras atividades terapêuticas e farmacológicas, destacando-se ações contra protozoários, antibacteriana, antiviral, antifúngica, e atividade citotóxica (efeito anti-tumor). Outros efeitos incluiriam estímulo na regeneração de tecido cartilaginoso, tecido ósseo, polpa dental e ainda efeitos anestésico, hepatoprotetor e aumento da população do sistema imune. É evidente que, embora possa atuar em várias disfunções, não atua em todas ao mesmo tempo. O grande problema é a sua composição, que varia de acordo com a flora da região, o tempo de coleta e substâncias que possam contaminar a própolis.

A composição química da própolis é bastante complexa, contendo mais de 160 componentes, principalmente compostos fenólicos, sendo que a maioria destes pertencem a três grupos: flavonóides aglicanas, ácidos fenólicos e ésteres fenólicos. PARK et al. (1995), analisaram e selecionaram métodos de análise da própolis de diversas regiões do Brasil, determinando sua qualidade em relação ao teor de flavonóides. Os dados obtidos demonstraram uma grande variação na concentração de flavonóides aglicanas de acordo com a origem da amostra e conseqüentemente, de acordo com a flora da região.

TATEFUJI et al. (1996), isolaram e identificaram os componentes da própolis de uma região brasileira e avaliaram o seu efeito na estimulação da mobilidade e difusão dos macrófagos uma vez que isto é fase preliminar que antecede a infiltração macrofágica nos tecidos afetados por injúria ou infecção. São as primeiras células recrutadas e apresentam-se como a primeira linha de defesa dos tecidos. Foram isolados 6 compostos sendo todos fenólicos, os quais estimularam visivelmente, a difusão e mobilidade macrofágica, podendo-se sugerir um efeito imunomodulador para a própolis. Além disso, alguns de seus componentes impediam a liberação de histamina pelos mastócitos. Estes resultados contribuem para assegurar que a própolis apresenta uma boa atividade anti-inflamatória.

Também em 1996, VOLPERT & ELSTNER analisaram a ação de extratos de própolis em leucócitos e algumas enzimas como lipoxigenase, NADPH oxidase e mieloperoxidase. Observaram que somente em altas concentrações os extratos de própolis estimularam as enzimas analisadas e conseqüentemente, apresentaram atividade anti-inflamatória. Esta ação anti-inflamatória ocorreu principalmente, devido a capacidade dos componentes dos extratos de própolis de se ligarem a radicais livres liberados na inflamação, tais como os superóxidos produzidos pelas NADPH oxidases.

Para investigar o possível mecanismo de ação da própolis, MIZOERVA & CALDER (1996), realizaram um estudo levando em conta três considerações: os efeitos dos componentes da própolis na produção de eiconasóides por macrófagos peritoneais de ratos *in vitro*; os efeitos dos mesmos componentes na produção de eiconasóides durante inflamação aguda *in vivo*; e os efeitos da dieta com própolis no metabolismo do ácido araquidônico. O extrato etanólico de própolis suprimiu a produção de prostaglandinas e leucotrienos pelos macrófagos peritoneais *in vitro* e

durante inflamação induzida por zimozan, *in vivo*. A dieta com própolis suprimiu significativamente a formação das lipoxigenases envolvidas no metabolismo do ácido aracdônico, *in vivo*. Dos componentes analisados, o ácido cafeico foi o modulador mais potente envolvido no metabolismo do ácido aracdônico.

Em 1997, PARK et al. investigaram os flavonóides aglicanas da própolis das regiões Sul e Sudeste do Brasil e examinaram sua atividade antibacteriana contra estafilococos aureus. Quarenta e seis amostras foram coletadas para análise quanto à concentração total de flavonóides. A qualidade dos flavonóides foram diferentes nas regiões Sul e Sudeste, sugerindo diferenças nas floras das regiões. Os extratos etanólicos de própolis da região Sul mostraram 7 flavonóides enquanto que na região Sudeste, 9 flavonóides foram isolados. Quanto a sensibilidade do estafilococos aureus, não houveram diferenças significativas nos diferentes extratos; os dois demonstraram atividade em inibir o crescimento bacteriano.

Em 1997, KOO & PARK investigaram a qualidade e a quantidade de flavonóides aglicanas na própolis coletada em diferentes variedades de abelhas. Dependendo do tipo de abelha, a coleta do pólen é feita em diferentes plantas, podendo-se afirmar que as diferenças químicas existentes entre os vários tipos de própolis não se deve somente à flora de uma região mas também ao tipo de abelha envolvida.

BANSKOTA et al. (1998), avaliaram a qualidade da própolis coletada em diferentes partes de Brasil. Todos os compostos isolados foram testados contra fibrosarcoma e carcinoma de cólon. Os componentes da própolis mostraram forte atividade citotóxica em relação aos tumores analisados. Os resultados indicam que a

atividade anti-câncer da própolis brasileira é primariamente devido aos compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides aglicanas.

BURDOCK (1999), revisou as propriedades biológicas e a toxicidade da própolis observando que ela é uma resina com grande número de compostos sendo o grupo predominante os flavonóides aglicanas, que são encontrados em uma grande quantidade de plantas. Outros componentes encontrados na própolis são a hidroquinona, ácido caféico e seus ésteres e o quercetin. A própolis e seus constituintes flavonóides exibem boa atividade anti-tumoral, tanto in vivo quanto in vitro além de apresentarem atividade citotóxica contra várias bactérias e parasitas e clinicamente, tem propriedades de estimular o sistema imunológico.

ISLA et al. (2001), estudaram a atividade antioxidativa de extratos de própolis argentina. Os flavonóides encontrados na própolis podem reduzir a formação de radicais livres, tendo um efeito protetor contra a oxidação dos lipídeos séricos. Isto é muito importante para o funcionamento saudável do cérebro, coração e a maioria dos órgãos depende de fluxo sanguíneo em vasos não obstruídos, para a liberação de nutrientes e oxigênio e remoção de metabólitos prejudiciais. Como o colesterol e outras gorduras não podem se dissolver no sangue, são transportados por carreadores especiais chamados de lipoproteínas. Quando estas proteínas sofrem algum processo oxidativo o colesterol começa a ser depositado nas células prejudicando sua função. A administração de antioxidantes exógenos, como os extratos de própolis podem retardar o processo oxidativo destas lipoproteínas ou impedir que elas sofram oxidação, ou qualquer outra mudança na corrente sanguínea.

## **Consolidação de fraturas**

A cicatrização de uma fratura óssea é um dos mais interessantes processos de reparo que ocorre na natureza, não havendo simplesmente a formação de uma cicatriz, mas a reconstituição total dos tecidos injuriados, que podem retomar sua forma original. É conclusivo dizer que todos os mecanismos envolvidos neste processo estejam elucidados pois acredita-se que envolvam problemas de homeostasia celular, que sofrem a influência de vários fatores.

Quando se considera uma fratura, um determinado osso é separado em dois fragmentos. Simultaneamente, existe dilaceração do periósteo e os fragmentos são deslocados de modo que suas extremidades não ficam em perfeita aposição uma em relação à outra. Assim, em muitos casos, deve-se reduzir cirurgicamente uma fratura, isto é, deve ser feita uma intervenção cirúrgica para reconduzir os fragmentos ósseos a uma posição em que suas extremidades se aproximem e o eixo ósseo seja restaurado (HAM & CORMACK, 1983).

De forma resumida podemos assim descrever os principais estágios que envolvem a regeneração de uma fratura. No local onde ocorreu a fratura, existe rompimento de vasos sangüíneos causando hemorragia; ocorre também, decorrente do trauma, destruição da matriz existente na região e morte de células ósseas a uma certa distância nos dois fragmentos da fratura. Para que se inicia o processo de reparo, o coágulo que se formou deve ser removido juntamente com os restos celulares e restos de matriz ali existentes. Esta remoção é feita principalmente pela ação de macrófagos. Importante salientar que todos estes elementos presentes até o momento, liberam substâncias que influenciam de alguma forma a continuidade do processo (fatores quimiotáticos, fatores de crescimento etc.). Simultaneamente,

periósteo e endósteo respondem com uma intensa proliferação, originando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras que formam um colar em torno da fratura e que vai penetrar entre as extremidades óssea fraturadas. Nesse anel ou colar conjuntivo, bem como no conjuntivo entre as extremidades, começa a aparecer osso primário, tanto pelo mecanismo endocondral, como pelo mecanismo intramembranoso. Assim, na área de reparo, são encontradas áreas de cartilagem, áreas de ossificação endocondral e áreas de ossificação intramembranosa. Este processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, um calo ósseo (calo duro) de osso primário, que envolve as extremidades dos ossos fraturados mantendo sua união. As trações e pressões exercidas sobre o osso durante a reparação e após o reinício às atividades normais, causam a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por osso secundário. Ressalta-se que todos estes estágios são regulados por fatores bioquímicos e biofísicos que devem ser levados em consideração, tais como a presença de substâncias químicas na região liberadas por células (fatores plaquetários, fatores liberados por células ósseas, mediadores da inflamação existente no local, especialmente as prostaglandinas etc.), a bioeletricidade nos tecidos envolvidos, a vascularização da região, a presença ou ausência de oxigênio e outros fatores (HURLEY et al., 1959; BASSET & HERRMANN, 1961; TRUETA, 1963; McKIBBIN, 1978; HAM & CORMACK, 1983; MARKS & POPOFF, 1988; CORNELL & LANE, 1992; MUNDY et al., 1995; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1998)

Em algumas situações, além de ocorrer fratura óssea, existe também a perda de substância ou de tecido ósseo, sendo isto normalmente referido como "defeito ósseo", ou seja, existe um espaço maior ou menor, que deverá ser preenchido por tecido ósseo (BERNARD, 1991).

Baseado nisto, alguns trabalhos foram revisados na tentativa de elucidar os principais pontos que podem nos ajudar a entender melhor como se processa o mecanismo de consolidação de fraturas em um determinado osso.

A ação do periósteeo como membrana osteogênica é bastante controversa na literatura, encontrando-se autores favoráveis e desfavoráveis quanto a sua participação no processo de regeneração óssea. Em 1742, DUHAMEL apud CHASE & HERNDON (1955), observou um espessamento do periósteeo e que esta membrana seria responsável pela formação de um calo de fratura. Porém em 1763, VON HALLER apud. CHASE & HERNDON (1955), afirmou que o periósteeo não apresentava capacidade osteogênica, atuando simplesmente como suporte para os vasos sangüíneos, sendo estes, os principais responsáveis pela osteogênese no local da fratura.

Para MACEWEN (1912) apud. BASSET (1962), o periósteeo é simplesmente uma membrana limitante e as células responsáveis pela produção de novo tecido ósseo pertencem, certamente, à superfície do osso, ou seja, os osteoblastos. O periósteeo tem apenas a função de conter a proliferação de osteoblastos na superfície do osso.

Para ROBISON (1923), a enzima fosfatase alcalina participa no processo de formação e calcificação do osso. A enzima hidrolisa hexosemonofosfato, aumentando a concentração local de fosfato de cálcio, sendo um importante fator para o processo de calcificação, porém, provavelmente, não é fator crítico.

Para AXHAUSEN (1956), o periósteeo é bastante importante na formação óssea. Existem no periósteeo, células especializadas na formação do osso que se

tornam ativas somente quando há a liberação de substâncias pelo osso necrótico da região ocasionado a diferenciação destas células e conseqüentemente, a formação de tecido ósseo.

Para YOUNG (1962), o periósteo é constituído internamente por uma camada de células em forma de fuso, as quais são indistinguíveis de fibroblastos normais. Estas células são denominadas células osteoprogenitoras, para que possam ser distinguidas de osteoblastos e com alto poder de divisão celular

Em 1963, PRITCHARD estudando o processo de cicatrização óssea, distinguiu um tecido reparativo ou blastema, que surgia da camada externa do periósteo de um outro tecido que surgia da camada interna e do canal medular, o qual foi denominado de blastema osteogênico. Este, normalmente, é mais centralizado e produz um novo osso que vai unir os fragmentos enquanto a zona mais periférica é mais fibrosa e mantém a continuidade do periósteo. Em determinadas circunstâncias, este blastema periférico pode invadir a fenda da fratura e cessar o desenvolvimento do reparo, a não ser que este tecido fibroso seja removido ou convertido em osso.

Quanto à origem das células osteogênicas, basicamente duas teorias podem se descritas de acordo com OWEN (1970). Na primeira teoria, o tecido de reparo surge de células especializadas com um compromisso "pré-determinado" para a formação óssea; são células encontradas na superfície do osso ou no canal medular. Na segunda teoria, o tecido de reparo não surge de células especializadas, mas de fibroblastos prévios que passam a desenvolver atividade osteogênica desde que submetidos a estímulos adequados, desenvolvendo-se então a partir dos tecidos moles circunjacentes.

STRATES et al. (1971), estabelecem que a enzima fosfatase alcalina não tem participação nenhuma no processo de calcificação óssea. Já JAFFE & JOHNSON, em 1973, induziram experimentalmente a osteocondrodisplasia em fetos de ratos, demonstrando que enquanto se tem o desenvolvimento esquelético normal, a atividade da fosfatase alcalina aumenta substancialmente. Por outro lado, nas situações de lesão em que o desenvolvimento esquelético é anormal, a atividade da enzima torna-se substancialmente menor. Exames histológicos dos membros anormais revelaram que o desenvolvimento esquelético anômalo era similar ao das desordens esqueléticas humanas como a acondroplasia e a hipofosfatasia.

Em 1976, JAFFE estudou a atividade da fosfatase alcalina em membros de fetos de ratos. O desenvolvimento do esqueleto dos membros começa com a síntese de matriz extracelular por células óssea rudimentares. Em seguida, ocorre a precipitação de fosfato de cálcio nesta matriz e finalmente a ossificação. O objetivo do estudo foi determinar a atividade específica da fosfatase alcalina comparando-a a vários fatores. A enzima está diretamente relacionada ao pH do meio e à concentração do substrato. Isto indica que a quantidade da enzima aumenta à medida que se formam os elementos do esqueleto e, este aumento, é histologicamente visível pelo aumento de ribossomos e vesículas livres que surgem na região.

NAJJAR & KAHN (1977), compararam os efeitos de estímulos fisiológicos normais na cicatrização e remodelação em vários ossos de diferentes origens embriológicas, usando para isso coelhos e cachorros. Os achados mostraram que a cicatrização e o remodelamento na tíbia e mandíbula, foram diretamente proporcionais a magnitude das forças que agem nestes ossos, como a tensão criada pela ação da musculatura neles inserida, a pressão exercida sobre a tíbia decorrente do peso corporal e a compressão exercida sobre a mandíbula decorrente da

mastigação. Uma cicatrização mais lenta foi observada na maxila sendo atribuída a pequena incidência de forças. Na análise dos ossos do crânio, observou-se que não houve remodelamento o que se deu, provavelmente, a força externa mínima que incide sobre estes ossos.

Estudando a biologia do reparo de fraturas, em 1978 McKIBBIN, observou que o perióstio é constituído por duas camadas, uma externa, fibrosa e outra camada interna ou camada câmbio, onde estão situadas as células osteoprogenitoras. Assim, quando o perióstio é retirado do osso, ele carrega consigo estas células com potencial osteogênico, isto é, se for retirado um fragmento de osso com seu perióstio, este poderá produzir novo osso.

Segundo McKIBBIN, o reparo de fraturas pode ocorrer em seis estágios diferentes, apresentando cada um características fisiológicas e histológicas próprias. O primeiro estágio inclui o impacto ou o trauma que ocasiona a fratura e termina até que haja dissipação total da energia. O segundo é chamado de indução, caracterizado pela formação de um hematoma; em seguida, se inicia a necrose das extremidades e as células necrosadas liberam subprodutos no meio. Este hematoma contém baixo nível de O<sub>2</sub>, baixo pH, cininas, prostaglandinas e proteínas ósseas não colagenosas. Este estágio é pequeno e termina com células inflamatórias invadindo a região. O terceiro estágio ou inflamação começa dentro de 48 horas e permanece até aparecer cartilagem e osso. Na inflamação aparecem neutrófilos, macrófagos, mastócitos e osteoclastos. Também surgem fibroblastos e com isso o hematoma vai sendo substituído por tecido de granulação. Inicia-se então o quarto estágio ou calo mole, que aparece entre as extremidades da fratura, aumentando cada vez mais o número de células em virtude da alta vascularização e proliferação perióstica, surgindo condroblastos que depositam um tecido condróide. A partir daí, se dá o quinto

estágio ou calo duro, onde se vê um calo cartilaginoso disposto entre os dois fragmentos de fratura que cresce da superfície para o centro e que, gradativamente, vai sendo convertido em osso esponjoso ou trabecular pelo mecanismo endocondral. O sexto e último estágio consiste na remodelação óssea da região, onde se vê substituição do osso trabeculado por osso lamelar, reconstrução do canal medular e restauração do diâmetro que o osso apresentava antes da fratura.

CYBORON & WUTHIER (1981), caracterizou e purificou a fosfatase alcalina em cartilagem epifisária de frangos. Para os autores, a enzima é encontrada em altas concentrações em tecidos que estão em calcificação, porém seu papel neste processo não é bem definido. Observou-se que a atividade da enzima está associada à presença de vesículas extracelulares, intimamente relacionadas com a calcificação inicial da cartilagem epifisária.

ELVES et al. (1982), demonstraram em ratos velhos, que administrando-se altas doses de indometacina, uma substância anti-inflamatória (inibidor de prostaglandinas), há evidências histológicas do aumento na fibrogênese e, simultaneamente, redução no processo de osteogênese e remodelação óssea.

BRIGHTON (1984), considera que além da vascularização e estabilidade, existem fatores morfogenéticos que influenciam no processo de cicatrização óssea. Dentre estes fatores merecem destaque: a presença da proteína morfogenética do osso (BMP- bone morphogenetic protein) e fatores que levariam a indução de células mesenquimais indiferenciadas tais como fatores biomecânicos, bioeletricidade (potencial elétrico do tecido ósseo remanescente), pressão de O<sub>2</sub> e outras substâncias químicas que podem influenciar o processo. O potencial elétrico na região causa a liberação de cAMP e fatores de crescimento, que regulam a

formação e a remodelação do osso. TGF- $\beta$  é bastante visível e se liga a receptores na superfície dos osteoblastos. A Prostaglandina E2 causa a inflamação necessária que resulta na migração de células e formação de vasos sanguíneos.

Para BURSTEIN & CANALIS (1985), há uma relação direta entre o grau de vascularização do periósteo e sua capacidade osteogênica. Avaliando a produção de osso em transplantes de periósteo de costelas, foi observado que a formação de osso se deu em primeiro lugar na base do retalho e diminuiu à medida que se dirigiu ao topo. Isto ocorreu devido a maior vascularização existente na base do retalho de periósteo quando comparada com seu topo.

Para WLODARSKI & REDDI (1986), a fosfatase alcalina é um importante fator que participa no processo de formação óssea. A fosfatase alcalina é uma enzima que aparece em membranas celulares e por isso pode ser utilizada como marcador de células osteocondutivas. O pico de atividade da fosfatase alcalina precede o processo de mineralização e células epiteliais com potencial osteoindutivo são ricas em fosfatase alcalina. Por outro lado, células desprovidas de potencial osteoindutor apresentam pouca quantidade da enzima.

Revisando a participação de prostaglandinas nos ossos "in vivo", NORRIDIN & SHU SHIH (1988), mostraram que prostaglandinas da série E, especialmente E1 e E2, têm grande atividade no metabolismo dos ossos. Elas estimulam a reabsorção óssea em associação com inflamação sendo também observado um aumento de prostaglandinas na presença de citocinas. Porém os autores relatam que as prostaglandinas podem também estimular a formação óssea, uma vez que além de osteoclastos, elas estimulam osteoblastos, dependendo da sua concentração. Baseado

nestas condições, o uso de inibidores de prostaglandinas deve ser limitado, pois certamente interferem no processo de reparo ósseo.

Ainda em 1988, TAKATO et al. estudaram experimentalmente o perióstio de tíbia e costelas e observaram que, quando transplantados, o perióstio tibial produz mais osso que o perióstio de costelas. Entretanto, ambos podem apresentar quantidade significativa de osso desde que recebam suprimento sangüíneo adequado. Segundo os autores, a capacidade osteogênica do perióstio depende principalmente de seu volume e da vascularização, porém, outros fatores como o estresse mecânico também interferem não sendo um pré-requisito para a formação de osso, mas sendo importante no processo de remodelação.

Em 1989, HULTH descreve que o processo de regeneração óssea não é simplesmente a formação de uma cicatriz, mas sim um processo onde se observa uma reconstituição tecidual total e dois fatores são fundamentais para este processo: o suprimento sangüíneo e a estabilidade. Com a fratura, osso e tecidos moles circunjacentes são injuriados; há hemorragia e mediadores químicos são liberados pelo agregado plaquetário que se forma e por outras células presentes na região. Dentre estes mediadores destacam-se o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e elevada quantidade de hialuronato, o qual promove a migração e a proliferação de células endoteliais e mesenquimais.

Ainda em 1989, SANDBERG et al. estudaram a produção de colágeno dos tipos I e II no reparo de uma fratura. Colágeno do tipo II foi detectado 5 dias após a fratura em um pequeno grupo de células que adquiriram fenótipo de condrócito mas também se detectou colágeno do tipo I, sugerindo que há alteração nos genes que

expressam colágeno. A localização dos primeiros condrócitos, adjacentes ao osso cortical, sugerem que são provenientes do periósteeo, a partir de células que sofreram diferenciação. No sétimo dia após a fratura a presença dos dois colágenos em condrócitos sugerem que mais crescimento ocorreu por diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e não pela proliferação de condrócitos diferenciados. A expansão continuou até o décimo quarto dia, até que a cartilagem fosse substituída por tecido ósseo. Isto se deu pela presença de osteoblastos, ativos na síntese de colágeno do tipo I.

DEREN et al. (1990), avaliaram a produção de fosfatase alcalina por células periostais em várias tensões de oxigênio in vitro. Para isso, foi desenvolvida uma cultura de células periostais. Foi observado que nas culturas submetidas a baixas tensões de oxigênio (5 a 9 %), próximas do nível capilar, a produção de fosfatase alcalina foi ótima quando comparada com culturas submetidas a tensões mais elevadas. Isto mostra que variações nas tensões de oxigênio na vizinhança do periósteeo são importantes na regulação do reparo do osso, sendo as células periostais altamente sensíveis a estas variações.

De acordo com CORNELL (1992), a regeneração de uma fratura compreende três eventos principais. O primeiro evento é o recrutamento de células osteoprogenitoras para o local da fratura; estas células são pré-osteoblastos que devidamente estimulados, tornam-se produtoras ósseas ativas. O segundo evento é a modulação que consiste na estimulação de células que ativam um processo fisiológico distinto; osteócitos e células periostais são ativados por outras células da região. Este processo é chamado de osteoindução, consistindo de fatores bioquímicos, mecânicos e biofísicos, como as BMP. O terceiro evento é a

osteocondução, no qual se forma um meio de suporte apropriado onde as células osteoprodutoras, uma vez ativadas passam a produzir osso.

YOSHIKAWA et al. (1992) avaliaram o potencial de algumas células em formar tecido ósseo. Os autores implantaram cerâmicas no tecido subcutâneo para avaliar formação óssea ectópica. Dois grupos foram utilizados, um onde só havia cerâmica e no outro, cerâmica associada a células de medula óssea. Os implantes foram removidos em intervalos de 1 a 8 semanas e analisados histologicamente. Fez-se também a dosagem da fosfatase alcalina, observando-se que sua atividade no grupo onde além da cerâmica havia células de medula, começou a aumentar em duas semanas, alcançou um pico em quatro semanas e, a partir daí, diminuiu gradualmente. Histologicamente, nos poros cerâmicos, osteoblastos foram detectados em duas semanas e formação de novo osso em três semanas. O processo de ossificação foi membranoso, não havendo formação prévia de cartilagem.

Revisando os efeitos das prostaglandinas no esqueleto, MILLER & MARKS (1994), mostraram que as prostaglandinas "E" podem promover a osteogênese em circunstâncias variáveis. A resposta osteogênica pode incluir estimulação da modulação óssea e remodelamento do osso. É bem claro que os efeitos das prostaglandinas estão relacionados com a dose; altas concentrações estão relacionadas com um aumento na reabsorção óssea e em doses menores com um estímulo na formação óssea.

Estudando a capacidade osteogênica do periósteo em enxertos livres, SANT'ANNA (1997) observou que o periósteo foi efetivo no reparo dos defeitos ósseos provocados em fibulas de ratos. A regeneração foi constatada duas semanas após ter sido realizada a fratura e novo osso produzido no local surgiu

principalmente através do mecanismo endocondral. Inicialmente formou-se tecido cartilaginoso que foi aos poucos sendo substituído por tecido ósseo, com formação de trabéculas de osso esponjoso imaturo que progressivamente foi sofrendo maturação e sendo convertido em osso compacto.

Em 1999, NYQUIST et al. realizaram um estudo para analisar os efeitos do etanol na massa óssea e na regeneração de fraturas. 42 ratos foram submetidos a uma cirurgia para fraturar a tíbia. Um grupo recebeu etanol na dieta (solução a 15 %) e outro grupo serviu como controle. Nos animais em que se fez o uso do etanol, observou-se uma menor densidade mineral óssea em relação ao grupo controle, porém, no processo de cicatrização, foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos analisados.

A função dos osteócitos, as células mais numerosas do osso, ainda não está muito esclarecida. NOBLE & REEVE (2000), estudaram a ação destas células, mostrando que elas modulam sinais surgidos na região. Os osteócitos parecem utilizar de sinalizadores moleculares que vão dirigir o aparecimento ou o desaparecimento de tecido ósseo na região. Apresentam na sua superfície, vários receptores para hormônios paratireóides, hormônios esteróides, prostaglandinas etc. que realizam suas funções modulando a atuação e outras células que participam do metabolismo do tecido ósseo.

### **Materiais adaptados em fraturas com defeitos ósseos**

DELBALSO & ADRIAN (1976), observaram os efeitos de um gel de colágeno usado em fraturas. Defeitos ósseos foram realizados nas tíbias direita e esquerda de porcos; o defeito direito foi preenchido com o gel de colágeno e o

esquerdo permaneceu vazio. Análises histológicas e bioquímicas realizadas no 7º e 14º dia após a cirurgia indicaram histologicamente, que o gel foi bem tolerado; no 7º dia, houve uma maior estimulação no processo de reparo no grupo tratado em relação ao grupo controle, o que não foi observado no 14º dia. A análise da fosfatase alcalina mostrou-se aumentada no 7º dia. Os autores concluem que embora o colágeno inicialmente estimule a formação óssea, ele acaba retardando o processo possivelmente porque o organismo reconhece o gel como elemento estranho ou então por ocorrer destruição de osteóide por células envolvidas no processo de degradação do gel.

GONGLOFF et al. (1985), analisaram tubos biodegradáveis de colágeno bovino associado com hidroxiapatita em ratos. Os resultados indicaram que os tubos de colágeno atuaram como uma barreira biodegradável que suportou as partículas de hidroxiapatita por 4 semanas, isolando de forma eficaz os tecidos moles e prevenindo a migração de partículas de hidroxiapatita.

BELL & BEIRNE (1988), analisaram os efeitos da hidroxiapatita e do fosfato tricálcio, isolados ou associados ao colágeno, em reparos de defeitos ósseos criados cirurgicamente na mandíbula de ratos. Através de exame microscópico realizado 4 e 12 semanas após a cirurgia, os resultados mostraram que o osso estava em contato direto com a periferia dos implantes, nos dois grupos analisados. Entretanto, na parte central do defeito, encontrou-se tecido fibroso conectivo contendo macrófagos e algumas células gigantes multinucleadas. Os autores concluíram que as duas substâncias utilizadas induziram a cicatrização óssea. Por ser biocompatível o colágeno não interferiu no processo, podendo então ser utilizado para evitar migração celular.

Para analisar a eficácia de membranas de colágeno em impedir a migração da aderência epitelial gengival e migração de células infiltrativas, BLUMENTHAL (1988), criou defeitos ósseos nas regiões interproximais em um espaço situado entre o incisivo lateral superior e os pré-molares. Análises histológica e histométrica realizadas entre 2 e 12 semanas determinaram as respostas de cicatrização. Para o autor, a membrana de colágeno utilizada foi eficiente em impedir a migração epitelial e de tecidos moles conectivos, favorecendo nova formação óssea.

Também em 1988 DEPORTER et al., analisaram a participação de colágeno fibrilar (Zyderm I) como material de enxerto em defeitos ósseos de 4 mm de diâmetro criados em calvária de ratos. Todos os defeitos foram analisados por 4 semanas. Observou-se que o colágeno estimulou de forma significativa a produção óssea, parecendo agir como osteocondutor, sendo incorporado dentro do novo osso. A concentração de colágeno também foi testada comparando-se as concentrações de 3,5% e 7,5%. Não houveram diferenças significativas entre as concentrações testadas mas notou-se uma tendência para a maior concentração utilizada. O autor concluiu que o colágeno fibrilar é uma substância bem tolerada pelo organismo, é osteocondutiva e estimulante da cicatrização óssea em defeitos de calvária de ratos.

VIALLE-PRESLES et al. (1989), avaliaram o destino biológico de implantes de colágeno bovino injetados subcutaneamente em ratos por um período de noventa dias. Utilizou-se técnicas de imunoperoxidase específica para vários tipos de colágeno, destacando colágenos do tipo I, III, IV e V e ainda para fibronectina e elastina. Com relação a ordem de deposição destas proteínas foi observado que a fibronectina foi encontrada ao redor do implante 24 horas após a injeção; após 7 dias, foram observados colágenos do tipo I e V. Já os tipos III e IV foram encontrados 30 dias após a injeção, sendo detectada grande migração fibroblástica.

GALGUT et al. (1991), estudaram histologicamente a resposta aos materiais de membrana que podem ser utilizados em RTG, inserindo-se estes materiais de forma subcutânea na superfície dorsal do rato. Os materiais utilizados incluíram membranas de politetrafluoretileno (e-EPTF ou Gore-Tex) e membranas de ácido poliláctico (biodegradável). Duas semanas após o implante, os animais foram sacrificados e o material coletado para análise histológica, avaliando-se os tecidos ao redor das membranas, o tipo de células nos infiltrados e o grau de absorção das membranas. As membranas de e-EPTF permitiram baixo crescimento epitelial e infiltrado com polimorfonucleares. As membranas de ácido poliláctico foram bastante absorvidas com infiltrado do tipo monocítico. De forma geral, os resultados mostram, que a cicatrização com diferentes membranas é complexa e variada. O material biodegradável é bem tolerado, sugerindo-se que seja mais indicado para RTG.

MINABE em 1991, revisou os processos biológicos envolvidos na regeneração tecidual guiada usando barreiras absorvíveis e não absorvíveis. As duas membranas apresentaram potencial clínico em promover a regeneração de tecido periodontal. Quanto à capacidade de prevenir a entrada de tecido mole nos defeitos, as membranas não absorvíveis foram mais eficientes, embora as absorvíveis também tenham mostrado esta capacidade.

Em 1992, ALBERIUS et al. estudaram a osteopromoção em enxertos ósseos experimentais usando técnica de membranas de 16 animais. Defeitos ósseos foram realizados na mandíbula no crânio e um fragmento de fíbula foi utilizado como enxerto. Os enxertos onde não se utilizou membranas, apresentaram-se com absorção em algumas áreas, com regiões acelulares circundados por uma cápsula fibrosa. Uma deposição óssea mínima foi observada nas margens do defeito. Nos

enxertos cobertos com membrana, observou-se em todos os defeitos osso trabecular com uma linha de osteoblastos, poucos osteoclastos em lacunas de reabsorção, sendo estas bastante modestas. Vascularização primitiva estava presente e não se observou formação de cartilagem. Estes resultados foram similares nos dois ossos estudados.

SANDBERG et al. (1993), analisaram o potencial osteopromotor de membranas bioabsorvíveis em mandíbulas de ratos, comparando com membranas não absorvíveis de politetrafluoretileno (Gore Tex). Três membranas absorvíveis foram utilizadas, todas derivadas do ácido poliláctico ou poliglicólico, variando o tempo de absorção (8-12 semanas, 20 semanas, e 40 semanas). Análises histológicas foram realizadas da primeira a décima segunda semana e mostraram que as membranas absorvíveis foram bem toleradas pelos tecidos, causando apenas uma leve reação inflamatória ao longo da superfície da membrana. Com relação ao reparo ósseo, não foram encontradas diferenças significativas entre as 4 membranas utilizadas, mostrando que as membranas absorvíveis são uma alternativa para se evitar o inconveniente de um segundo tempo operatório, necessário quando se usa membranas não-absorvíveis.

Na área da cirurgia craniomaxilofacial ou da ortopedia, um enxerto ósseo ou um substituto ósseo é necessário para reconstruir ou assistir a cicatrização em deformidades ósseas congênitas ou no reparo de deformidades devido a traumas. Segundo AABOE et al. (1995), que fizeram uma revisão sobre a cicatrização de defeitos ósseos, o enxerto ósseo autógeno é o de escolha, entretanto seu uso é problemático devido à morbidade do local doador e à reabsorção descontrolada. Respostas imunes e o risco de contaminação do material autógeno tornam seu uso questionável. A cicatrização e a degradação de materiais aloplásticos são inconsistentes com subsequente restrição quanto ao seu uso. O método mais

indicado é a utilização da proteína morfogenética do osso combinada com materiais de membrana, uma vez que neste caso temos a associação de um material osteoindutor com um material que funciona como uma barreira, impedindo a entrada de tecidos moles na região.

MILLER et al. (1996) estudaram histomorfometricamente duas membranas bioabsorvíveis disponíveis comercialmente, uma de colágeno e outra de ácido poliláctico. Foram utilizados 16 coelhos onde se implantou fragmentos de membranas em mucosa alveolar na região dos incisivos. As observações indicaram que as membranas de colágeno causaram uma severa inflamação e foram reabsorvidas dentro de duas semanas. As barreiras de ácido poliláctico produziram um infiltrado inflamatório moderado e não estavam totalmente absorvidas em 12 semanas. Estes resultados mostram que a durabilidade das barreiras de ácido poliláctico é mais adequada para RTG que as membranas de colágeno.

Ainda em 1996, PIATELLI et al. avaliaram a possibilidade de regeneração óssea em implantes com membranas absorvíveis (Guidor) e membranas não absorvíveis (e-EPTF) inseridos em tíbias de coelhos. As análises foram feitas 6, 9 e 12 semanas após a cirurgia. A quantidade de osso formada ao redor dos implantes cobertos com as membranas foi aproximadamente a mesma, nos dois tipos utilizados, destacando-se o grupo onde se fez o implante de membranas não absorvíveis. É sugerido que as membranas absorvíveis de ácido poliláctico devem ser utilizadas nas terapias de regeneração guiada, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas quando comparadas com as membranas não absorvíveis.

MAO et al. (1997), realizaram um estudo para comparar a eficácia da regeneração tecidual guiada ao redor de implantes colocados em alvéolos dentais, imediatamente após a exodontia, usando membranas absorvíveis e não absorvíveis. Quatro implantes foram considerados como controle, não recebendo membranas, quatro implantes receberam membranas de e-PTFE, cinco implantes receberam membranas de colágeno e cinco receberam membranas de poliglactina 910. Após 14 semanas, os animais foram sacrificados para avaliações histológicas e histomorfométricas. A média de ganho de peso ósseo foi de 2,1 mg para o grupo controle, 3,3 mg para o grupo com membranas de e-PTFE, 3,8 mg para membranas de colágeno e 1,3 mg para membranas de poliglactina 910. Estes resultados indicam que as membranas de e-PTFE e as membranas de colágeno propiciam melhores resultados para regeneração tecidual guiada ao redor de implantes colocados imediatamente após extração dental.

Em 1997, PARODI et al. realizaram um estudo para confirmar histologicamente que nova aderência epitelial foi obtida através do princípio de regeneração tecidual guiada, utilizando barreiras absorvíveis. Um fragmento de membrana de colágeno (Paroguide) foi posicionado de forma a cobrir o defeito ósseo de um paciente com periodontite adulta crônica generalizada.. Após 5 meses, histologicamente observou-se que a membrana foi completamente reabsorvida e não havia sinais clínicos de inflamação mostrando biocompatibilidade da membrana com os tecidos circunjacentes. Observou-se também presença de nova aderência epitelial, novo ligamento periodontal e novo tecido ósseo na região, mostrando que a membrana utilizada foi satisfatória para estimular a regeneração tecidual.

SCHLEGEL et al. (1997), fizeram uma avaliação pré-clínica e clínica de membranas de colágeno da marca Bio-Gide®. Para a avaliação pré-clínica, foram

utilizados 7 coelhos nos quais as membranas foram implantadas abaixo da pele; como controle, injetou-se colágeno solúvel intradermicamente. Na avaliação da resposta imune, usou-se o método ELISA, que indica imunoreatividade contra Bio-Gide. Nenhuma resposta imune foi detectada em nenhum dos animais. A avaliação clínica foi feita em pacientes com indicação de ressecção radicular bilateral na área de molares. Após a cirurgia, a membrana foi utilizada em apenas um dos dois lados. Através do método ELISA, não se detectou reação imune contra Bio-Gide. Radiograficamente, observou-se melhor cicatrização nos lados onde se implantou as membranas de colágeno.

Analisando os efeitos no aumento ósseo de membranas de barreira, absorvíveis e não-absorvíveis, ITO et al. (1998), utilizaram coelhos nos quais, um parafuso de titânio era inserido na calvária de cada lado da linha média. O parafuso de um os lados foi coberto com uma membrana de politetrafluoretileno (Gore-tex – não-absorvível) e do outro lado, coberto com uma membrana de ácido poliláctico (absorvível). Após 6 meses, os animais foram sacrificados e análise histológica foi realizada. Estatisticamente, uma maior quantidade de novo osso foi observada no lado em que se utilizou a membrana não-absorvível, porém, com relação à mineralização do osso, não foram observadas diferenças. Os autores sugerem que membranas não-absorvíveis devem ser utilizadas quando se pretende obter maior volume e peso ósseo.

LUNDGREN et al. (1998), avaliaram a atuação de membranas de barreira sobre defeitos preparados em áreas desdentadas da maxila em 22 coelhos. Foram utilizadas membranas de e-EPTF sobre os defeitos, associadas ou não com titânio. Análises histológica e morfométrica foram realizadas após 4 semanas após a cirurgia. Observou-se que a quantidade de osso formado foi a mesma nos dois

grupos testados, concluindo que estas membranas atuam simplesmente como barreiras que evitam a entrada de tecidos moles nos defeitos ósseos existentes.

ZAHEDI et al. (1998), avaliaram o potencial de membranas de colágeno do tipo I na cicatrização de defeitos ósseos mandibulares. Utilizaram 25 ratos Wistar, nos quais se fazia exposição bilateral dos ramos mandibulares e, criava-se cirurgicamente em ambos os lados, um defeito ósseo de 5 mm de diâmetro. Em um dos lados, o defeito foi coberto com a membrana e, em seguida, se fazia a reposição dos tecidos moles; no lado oposto, os tecidos foram simplesmente reposicionados e a ferida fechada. Os ratos foram sacrificados 7, 15, 30 e 90 dias após a cirurgia. Nos estágios iniciais, não foram observadas diferenças entre os dois lados, porém após 30 dias, o lado com a membrana estava completamente fechado com novo osso; no lado controle, pequenas quantidades de novo osso foram observadas, situando-se apenas nas bordas da lesão. Os autores constataram que, além da boa biocompatibilidade apresentada pela membrana, ela mostrou boa resistência mecânica, atuando como um meio para realização de cirurgias onde se faz regeneração óssea guiada.

Em um estudo sobre cicatrização de fraturas, CHAKKALAKAL et al. (1999) realizaram um defeito de 2 mm de comprimento na região média da fíbula de ratos e colocaram um tubo de matriz óssea desmineralizada no local da fratura. Condroblastos e osteoblastos originados a partir do periósteo foram encontrados nas proximidades da junção enxerto-fíbula e infiltrando a matriz. Assim, nas duas primeiras semanas, a matriz assumiu um papel de ponte entre os dois fragmentos de osso. Da sexta a oitava semana, a maior parte da matriz foi convertida em osso com um máximo de atividade osteoblástica e mínima ossificação endocondral. A formação do calo medular só foi observada após três semanas.

Em 1999, MATTSON et al., avaliaram o uso de duas membranas absorvíveis na correção de defeitos ósseos interproximais; membranas de colágeno bovino do tipo I e membranas de ácido poliláctico. Treze pacientes receberam, através de cirurgia periodontal adequada, as membranas em defeitos, resultando numa diminuição da sua profundidade e ganho no processo de regeneração no seu interior. As duas membranas utilizadas não apresentaram complicações, podendo, satisfatoriamente, serem usadas no tratamento de defeitos ósseos que comprometerem o periodonto.

CAIAZZA et al. em 2000, avaliaram membranas de colágeno em fêmures de coelhos através da análise do tecido ósseo que era formado ao redor de implante intra-medular colocado nos animais após a fratura do osso. Para isso, dois grupos de animais foram utilizados; em um dos grupos, apenas o implante era colocado; no outro, o implante era cercado pela membrana isolando-o dos tecidos moles circunjacentes. Seis dias após a cirurgia, os animais foram sacrificados e constatou-se, através de microscopia eletrônica, que os implantes que continham a membrana apresentavam maior quantidade de osso ao seu redor, enquanto no grupo controle, menor quantidade de osso foi observada.

Em virtude da sua boa biocompatibilidade e capacidade de cicatrização, as membranas de colágeno têm sido muito utilizadas na Medicina e na Odontologia. Fazendo uma revisão sobre a utilização destas membranas, BUNYARATAVEJ & WANG (2001), observaram que na regeneração tecidual guiada, as membranas de colágeno são comparadas as membranas não absorvíveis, inclusive com as membranas de EPTF-e que são, dentre as não absorvíveis, as que oferecem melhores

resultados. Porém recomenda-se que mais avaliações clínicas sejam realizadas para sua utilização na prática médica.

Com o objetivo de comparar a eficácia de membranas absorvíveis e não-absorvíveis, DUPOIRIEUX et al. (2001), realizaram um estudo em ratos divididos em grupos de 10 animais da seguinte maneira: grupo 1, onde se usou membranas de politetrafluoretileno (Gore Tex); grupo 2, onde se usou membranas de poliglactina (Vicryl); e grupo 3, onde se usou membranas de colágeno (extraído de casca de ovo). No crânio de todos os animais foram criados defeitos bilaterais com 6 mm de largura, adaptando-se as membranas nos defeitos do lado direito. Os animais foram sacrificados 60 dias após a cirurgia e análises histológicas e radiográficas realizadas. No grupo 1, uma cicatrização óssea parcial foi observada em 7 dos 10 animais. Nos outros 3, a cicatrização foi total. No grupo 2, não houve cicatrização ou foi mínima em 7 dos animais e, nos outros 3 animais, ela foi parcial. Finalmente no grupo 3, não se observou cicatrização ou ela foi mínima em 9 dos 10 animais analisados; cicatrização parcial foi encontrada somente em 1 animal. Esses resultados sugerem que somente as membranas não-absorvíveis são favoráveis e que a estrutura da membrana é mais importante que sua composição.

Em 2001, OWENS & YUKNA, estudaram o tempo de reabsorção de membranas de colágeno fixadas no palato duro de cachorros. Três marcas de membrana foram analisadas e permaneceram por 1, 2, 3 ou 4 meses na boca dos animais. Através de análise histológica observou-se que 1 mês após o implante, havia uma degradação que variou de leve a moderada em todas as membranas; após 2 meses, todas as membranas apresentavam degradação variando de moderada a severa, com exceção das membranas derivadas de colágeno humano, que apresentavam-se levemente degradada. Após 3 meses de implantação, todas as

membranas apresentavam degradação severa ou eram dificilmente identificadas. Quatro meses após a cirurgia, as membranas encontravam-se severamente degradadas ou estavam totalmente ausentes. Com a perfuração gradativa das membranas, a penetração de vasos sanguíneos variou de leve a moderada enquanto reação inflamatória foi observada somente em duas amostras. Estes resultados mostram que a aplicação de membranas a base de colágeno são bastante satisfatórios, pois permanecem tempo suficiente para evitar a penetração de tecidos circunjacentes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para verificar a influência de uma membrana de colágeno associada a extrato etanólico de própolis (EEP) a 10% na reparação de fraturas com perda de substância óssea, foram utilizados 60 ratos albinos Wistar, do sexo feminino, com idade média de 50 dias. Em todos os animais, foi realizado o seguinte procedimento cirúrgico nos membros posteriores: ressecção de um fragmento de 3,5 milímetros da diáfise da fíbula ao nível da união do terço proximal com o terço médio. No membro posterior esquerdo, no local da falha óssea, foi implantado um fragmento de membrana de colágeno da marca Protape (Pro-line). No membro posterior direito, foi realizado somente a ressecção do fragmento ósseo.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais, contendo cada grupo, 20 ratas, nos quais foram realizados os seguintes procedimentos:

**Grupo 1:** Perna esquerda - ressecção óssea com implantação da membrana de colágeno embebida com EEP a 10 %;

Perna direita - somente ressecção óssea.

**Grupo 2:** Perna esquerda - ressecção óssea com implantação da membrana de colágeno embebida em álcool a 80%;

Perna direita - somente ressecção óssea.

**Grupo 3:** Perna esquerda - ressecção óssea com implantação da membrana de colágeno embebida em solução fisiológica;

Perna direita - somente ressecção óssea.

Dez animais de cada grupo foram sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia. No momento do sacrifício, o animal foi anestesiado para se proceder à coleta de sangue utilizado na dosagem sérica da enzima fosfatase alcalina, cujos níveis acham-

se aumentados em situações onde existe trauma ósseo, uma vez que ela participa do processo de cicatrização óssea. Após a coleta do sangue, o ventrículo esquerdo foi injetado com 30 ml. de paraformoldeído para a fixação dos tecidos por perfusão. Após o sacrifício, os membros posteriores, esquerdo e direito foram isolados e colocados na mesma solução fixadora por mais 24 horas, para se completar o processo de fixação.

A seguir, as fíbulas foram radiografadas utilizando-se películas periapicais com tempo de exposição aos raios x de 0,8 segundos. As fíbulas foram então dissecadas e descalcificadas em solução de ácido fórmico e citrato de sódio 20% (1:1). Após a descalcificação os ossos foram desidratados e incluídos em blocos de parafina. Posteriormente foram realizados cortes longitudinais, semi-seriados, com 7 micrômetros de espessura, da fibula inteira. Esses cortes foram corados em hematoxilina e eosina (HE).

Em todos os animais tornou-se necessário manter um pouco de tecido muscular adjacente à fibula para se evitar a perda do material existente no local da perda óssea durante o processamento histológico.

### **Origem da própolis**

As amostras de própolis bruta (tiras de própolis) foram coletadas por raspagem das paredes internas das colméias de abelhas *Apis mellifera*, na região sul do Estado de Minas Gerais (Brasil), na cidade de Pouso Alegre.

### **Preparação do extrato etanólico de própolis (EEP) 10%**

Na extração da própolis, 10 gramas de própolis bruta foram trituradas em liquidificador, homogeneizadas e peneiradas. Esta própolis em pó, pesada em balança analítica, foi transferida para um Backer onde foi adicionado inicialmente, 50 ml de etanol a 80%. Esta mistura foi colocada em banho de água termostaticada a 70° C., por 35 minutos. A literatura prescreve um tempo de 30 minutos, porém os 5 minutos extras foram necessários para que houvesse um equilíbrio das temperaturas entre a água e a solução de própolis. Após este tempo, a solução foi centrifugada a 8800 rpm x g, por 10 minutos a 20° C. Em seguida adicionou-se mais 50 ml de etanol ao restante da própolis bruta, levando novamente em banho de água termostaticada por mais 35 minutos e, novamente, à centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante obtido, que é o extrato etanólico de própolis a 10% utilizado, foi armazenado em um frasco âmbar, para se evitar a interferência da luz em alguns constituintes fotossensíveis da própolis.

### **Método de administração do EEP a 10 %**

A administração do EEP a 10% no local da perda óssea foi feita através de um fragmento de membrana de colágeno da marca Protape (Pro-Line) embebido com o extrato. Esta membrana é muito utilizada na Periodontia, em intervenções onde se realiza a chamada regeneração tecidual guiada, em que sua função é evitar a entrada de tecidos moles, impedindo o crescimento do osso. O fragmento da membrana utilizado media, aproximadamente, 7 x 5 mm (figura 9) e, antes de ser inserido no local da perda óssea, foi embebido, com o auxílio de uma micropipeta, em 15 µl do EEP a 10% (grupo I). Este fragmento permaneceu 5 minutos sobre uma placa de vidro para a evaporação do álcool contido no extrato.

Nos outros dois grupos analisados, a membrana foi embebida em 15  $\mu$ l de etanol a 80 % (grupo II) e em 15  $\mu$ l de solução fisiológica (grupo III), antes de serem implantados na região da falha óssea.

### **Coleta do sangue e método utilizado na análise enzimática**

A fosfatase alcalina por ser uma enzima que participa do processo de regeneração do osso, está geralmente aumentada quando existe trauma ósseo. A coleta do sangue para sua análise foi realizada antes do sacrifício dos animais. Após a anestesia, procedeu-se a abertura do tórax para exposição do coração. Com auxílio de uma agulha pediátrica acoplada em tubo vacutiner siliconizado, retirava-se aproximadamente 7 ml de sangue do átrio direito (figuras 1, 2 e 3). Para se proceder a análise da fosfatase alcalina, utilizou-se do método de Roy modificado (método cinético colorimétrico - ANALISA DIAGNÓSTICA LTDA), através do qual, a fosfatase alcalina do soro hidrolisa o substrato de timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína e fosfato inorgânico. Pela adição de álcali, a ação enzimática é inibida e a timolftaleína adquire cor azul, cuja absorbância é medida fotometricamente.



**Figura 1- Tórax exposto para coleta de sangue**



**Figura 2- cavidade torácica aberta para exposição do coração (seta)**

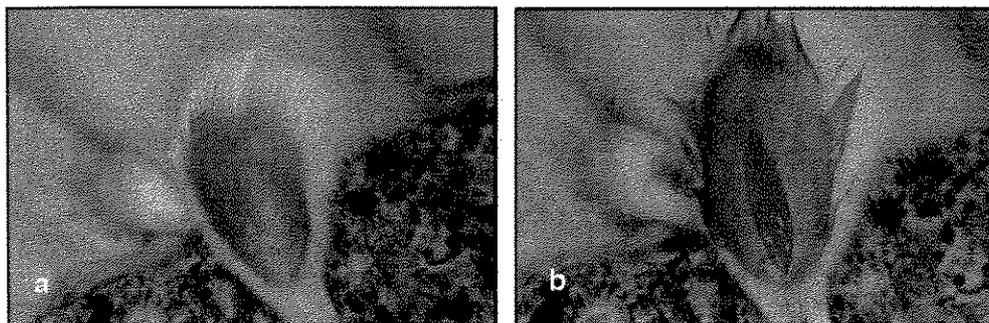


**Figura 3- Coleta de sangue do átrio direito**

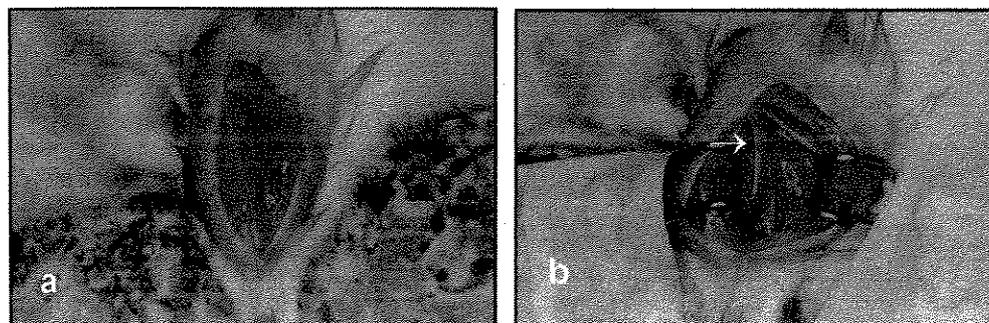
### **Técnica cirúrgica para remoção do fragmento das fibulas e realização do implante da membrana de colágeno**

Para a remoção dos fragmentos da fibula, os animais foram anestesiados através de injeção intra-peritoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar<sup>2</sup> - 50 mg/ml) e cloridrato de tiazina (Rompum<sup>2</sup> - 2 g/ 100ml), 1:1, na dose de 0,25 ml/ 100g de peso. Em seguida, no local da cirurgia, foi realizada a tricotomia e a assepsia com PVPI (figura 4a). Foi feita uma incisão na face lateral da perna do animal (figura 4b) utilizando-se de cabo de bisturi número 3 e lâmina número 11. Os tecidos subcutâneos foram afastados para a visualização do plano fascial. A fâscia muscular foi incisada e os músculos cuidadosamente afastados para a exposição da fibula (figura 5). Ao nível da união do terço proximal com o terço médio da diáfise, foi retirado um fragmento de 3,5 milímetros de osso (figura 6a e 10), medido com o auxílio de régua endodôntica milimetrada (figura 9). A secção da fibula foi realizada cuidadosamente com um alicate de cutícula, com a preocupação de traumatizar o mínimo possível e evitar, sobretudo, lascar a extremidade seccionada. Desta forma, restaram sempre dois fragmentos ou cotos de osso, um proximal e outro distal, sendo que este último compreendia uma parte do terço médio e o terço distal da diáfise da fibula (figura 10). Após a ressecção, a membrana de colágeno embebida no EEP a 10 % (grupo I), ou em etanol a 80 % (grupo II) ou em solução fisiológica (grupo III) foi implantada no local da falha óssea entre as extremidades dos fragmentos proximal e distal (figura 6b), enrolada sobre si mesma e fixada com fio de sutura de poliglactina 910 (vicryl) 6.0 em cada extremidade. Assim, a membrana de colágeno envolveu as duas extremidades dos cotos e formou-se um tubo no local onde foi retirado o fragmento de osso (figuras 7a e 7b).

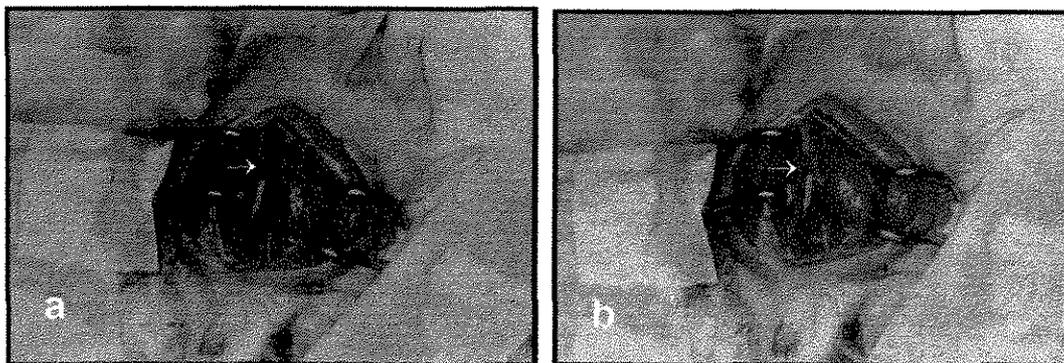
Todo este procedimento cirúrgico foi realizado sob irrigação com solução fisiológica para evitar a necrose dos tecidos no local. Os músculos, fáscia e tecidos subcutâneos foram então reposicionados e a pele era suturada (figuras 8a e 8b).



**Figura 4-** Tricotomia (a) e incisão (b) da face lateral da perna esquerda.



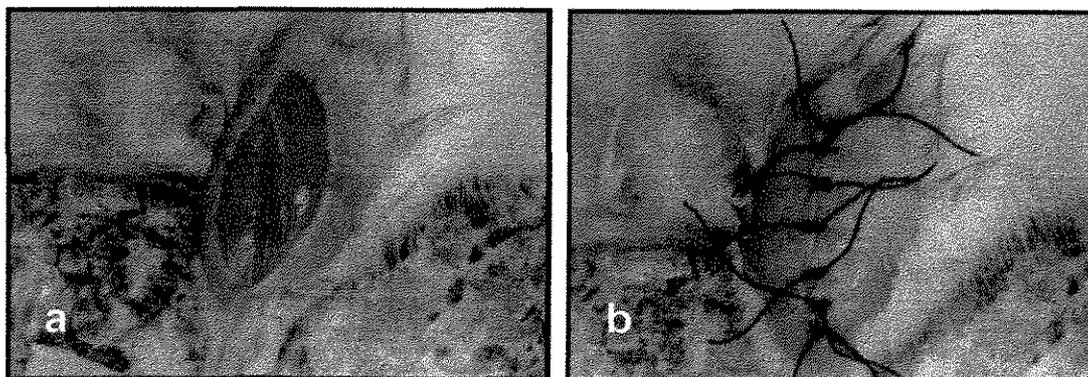
**Figura 5-** Afastamento do tecido muscular (a) e exposição da fíbula (b- seta).



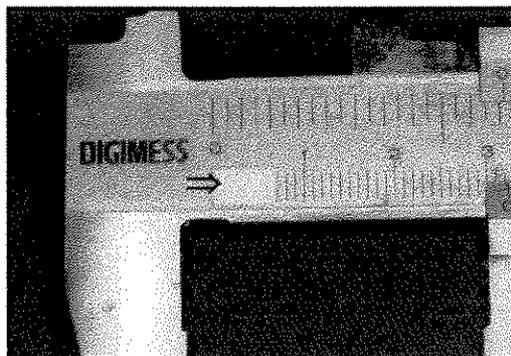
**Figura 6-** Defeito ósseo de 3,5 mm entre os terços proximal e médio da diáfise (a)- seta; e adaptação da membrana no defeito ósseo (b)- seta.



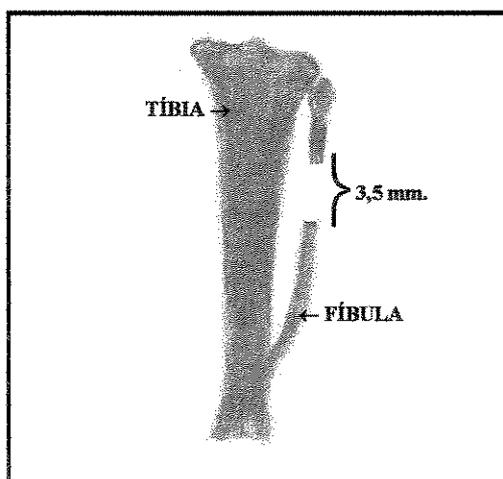
**Figura 7-** Notar a membrana fixada ao coto proximal (a)- seta; membrana fixada nos cotos proximal e distal formando um tubo (b)- seta.



**Figura 8-** Reposição de tecido muscular (a); sutura (b)



**Figura 9-** fragmento da membrana de colágeno com 7 x 5 mm. de área (seta).



**Figura 10-** Representação esquemática da região da diáfise da fibula onde foi retirado 3,5 mm. de osso.

A fibula direita, onde não se realizou o implante da membrana de colágeno, mas apenas a ressecção de um fragmento de osso, com as mesmas dimensões, serviu como controle para verificar se ocorria ou não a regeneração espontânea das fíbula quando ocorre a remoção de um fragmento ósseo na extensão padronizada.

## RESULTADOS

As amostras obtidas neste estudo foram submetidas a análises radiográficas, bioquímica e histológica. Bioquimicamente se analisou a presença da enzima fosfatase alcalina no sangue dos animais.

Não foram feitas análises macroscópicas das amostras com o objetivo de se evitar qualquer dano ao material e preservá-lo para o processamento histológico. Tornou-se também conveniente, deixar uma certa quantidade de músculo fixado ao osso na região onde foi criado o defeito ósseo.

Os resultados radiográficos foram avaliados considerando-se a reconstituição total ou parcial das fíbulas esquerdas (tratadas com a membrana) e direitas (não tratadas com a membrana). Avaliou-se também se houve um crescimento ou reabsorção dos cotos proximal e distal nas amostras que não apresentaram regeneração total das fíbulas. Como o defeito ósseo criado foi de 3,0 a 3,5 mm de comprimento, optamos por considerar regeneradas as fíbulas cujas radiografias apresentavam na sua diáfise, uma falha de 1 mm.

## ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Os dados numéricos das análises radiográficas de todos os animais estão representados na tabela I. Os valores permitem observar que a taxa de regeneração das fíbulas tratadas ou não com a membrana de colágeno, foi bastante baixa, sendo neste último grupo ainda mais baixa. A figura 11 mostra o aspecto radiográfico de uma fibula regenerada e de uma fibula não regenerada 28 dias após a cirurgia.

## **ANIMAIS SACRIFICADOS 14 DIAS APÓS A CIRURGIA**

### **GRUPO I (membrana de colágeno associada a EEP 10%)**

Das 10 fíbulas esquerdas analisadas neste grupo, duas apresentaram regeneração total. Nas outras 08 fíbulas não regeneradas, observou-se um crescimento do coto proximal e, com relação ao coto distal, não foram observadas alterações radiográficas marcantes. Quanto as 10 fíbulas direitas (sem membrana) analisadas neste grupo, nenhuma delas apresentou regeneração total. Com exceção de uma fíbula, todas elas apresentaram um leve crescimento do coto proximal. Porém, com relação ao coto distal, em 08 fíbulas observou-se que havia sinais de reabsorção óssea, enquanto que para as outras duas, nada ocorreu nesta região do osso. Os valores numéricos podem ser visualizados na tabela 2.

### **GRUPO II (membrana de colágeno associada a etanol 80 %)**

Dos 10 animais analisados neste grupo, 2 apresentaram suas fíbulas esquerdas totalmente regeneradas, 1 animal apresentou a fíbula direita regenerada e em outro animal, as fíbulas direita e esquerda estavam totalmente regeneradas. Assim obtivemos neste grupo, a regeneração total de 3 fíbulas esquerdas e 2 fíbulas direitas (sem membrana). Nas outras 7 fíbulas esquerdas, pôde-se observar que houve crescimento do coto proximal e nenhuma alteração visível no coto distal. Das 8 fíbulas direitas não regeneradas, 4 apresentaram um crescimento no coto proximal enquanto as outras 4 não mostraram nenhuma alteração. O coto distal por sua vez apresentou sinais de reabsorção em 7 fíbulas e na remanescente, nada ocorreu. Os valores numéricos podem visualizados na tabela 3.

### **GRUPO III (membrana de colágeno associada à solução fisiológica)**

Dos 10 animais analisados neste grupo, 2 apresentaram regeneração total das fíbulas direita e esquerda. Nas 8 fíbulas esquerdas não regeneradas, todas apresentavam um crescimento no coto proximal e nenhum sinal de reabsorção foi visualizado no coto distal. Nas 8 fíbulas direitas não regeneradas, 5 apresentaram sinal de crescimento ósseo no coto proximal enquanto as demais não sofreram nenhuma alteração neste coto. Já o coto distal mostrou-se reabsorvido em 6 das 8 fíbulas sendo que nas 2 remanescentes, nenhuma alteração foi observada. Os valores numéricos podem ser visualizados na tabela 4.

### **ANIMAIS SACRIFICADOS 28 DIAS APÓS A CIRURGIA**

#### **GRUPO I (membrana de colágeno associada a EEP 10%)**

Dos 10 animais analisados neste grupo, dois apresentaram regeneração total em suas fíbulas esquerdas. Nas 8 fíbulas esquerdas não regeneradas foi constatado um crescimento do coto proximal e com exceção de 2 animais, nenhuma alteração foi observada no coto distal. Das 10 fíbulas direitas utilizadas neste grupo, nenhuma apresentou regeneração total. O coto proximal apresentou crescimento em todas elas, enquanto o coto distal mostrou-se reabsorvido em 7 animais. Os valores numéricos podem ser visualizados na tabela 2.

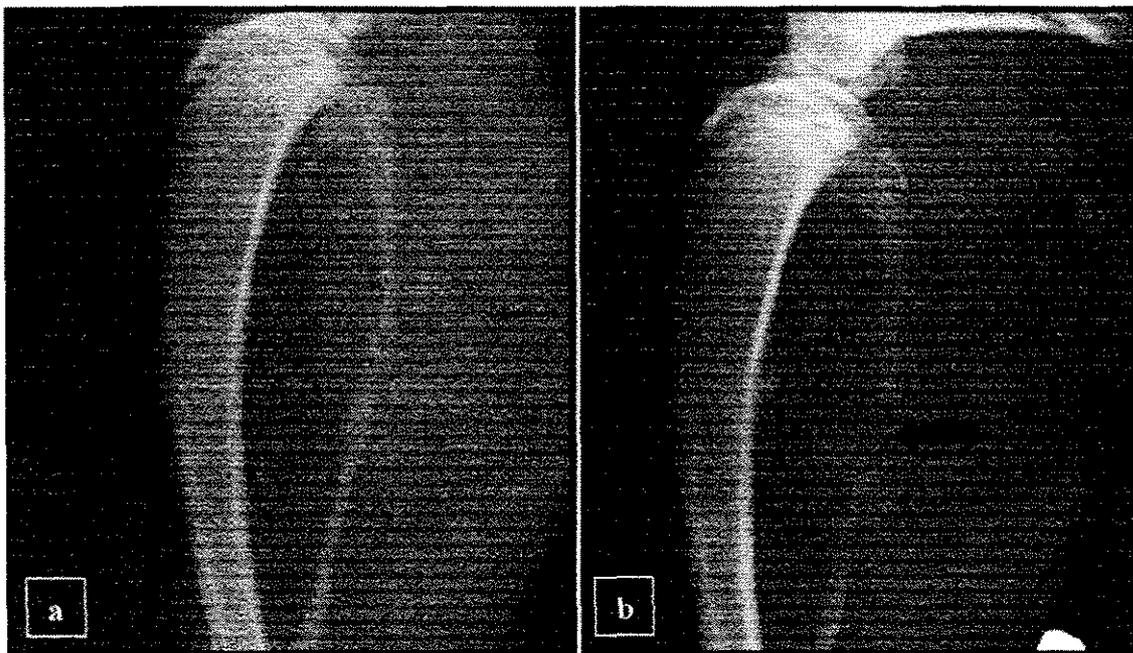
#### **GRUPO II (membrana de colágeno associada a etanol 80 %)**

Apenas 1 fibula esquerda apresentou-se totalmente regenerada nos 10 animais utilizados neste grupo. Para as fíbulas esquerdas não regeneradas, o coto

proximal cresceu em 8 delas; em uma fíbula, não foram observados sinais de crescimento ósseo, nem sinais de reabsorção. O coto distal em 4 fíbulas esquerdas apresentou-se levemente reabsorvido porém nas outras 5 fíbulas nada ocorreu. Quanto às fíbulas direitas, nenhuma mostrou-se totalmente regenerada. O coto proximal mostrou sinal de crescimento em todas as fíbulas enquanto o coto distal foi parcialmente reabsorvido em todos os ossos. Os valores numéricos podem ser visualizados na tabela 3.

### **GRUPO III (membrana de colágeno associada à solução fisiológica)**

Das 10 fíbulas esquerdas utilizadas nesse grupo, 4 apresentaram regeneração total. Nas demais fíbulas esquerdas, um crescimento do coto proximal foi observado enquanto que no coto distal nenhuma alteração foi observada com exceção de 2 animais, onde o coto distal estava levemente reabsorvido. Com relação às fíbulas direitas, nenhuma das 10 apresentou-se totalmente regenerada. Porém em todas elas se observou que o coto proximal estava levemente aumentado de tamanho enquanto que em 8 fíbulas havia reabsorção parcial no coto distal e nas outras duas, o coto distal não apresentava nenhuma alteração. Os valores numéricos podem visualizados na tabela 3.



**Figura 11-** Aspecto radiográfico de uma fibula totalmente regenerada radiograficamente (a) e de uma fibula não regenerada (b), 28 dias após a realização da cirurgia, de uma animal pertencente ao grupo I (membrana de colágeno + EEP 10%); seta indica defeito ósseo.

**Tabela 1-** Resultado numérico da análise radiográfica dos animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia

	<b>14 Dias</b>				<b>28 dias</b>			
	Fíbula esquerda		Fíbula direita		Fíbula esquerda		Fíbula direita	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Regeneradas	<b>7</b>	<b>23,33</b>	<b>4</b>	<b>13,33</b>	<b>7</b>	<b>23,33</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Não regeneradas	23	76,66	26	86,66	23	76,66	30	100
Total	30	99,999	30	99,999	30	99,999	30	100

**Tabela 2-** Resultado numérico da análise radiográfica dos animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia, tratados com membrana de colágeno associada a própolis (grupo I).

	14 Dias		28 Dias	
	Fibulas esquerdas	Fibulas direitas	Fibulas esquerdas	Fibulas direitas
Regeneradas	2 (20%)	0	2 (20%)	0
Ñ regeneradas	8 (80%)	10 (100%)	8 (80%)	10 (100%)
Total	10	10	10	10

**Tabela 3-** Resultado numérico da análise radiográfica dos animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia, tratados com membrana de colágeno associada a etanol 80 % (grupo II).

	14 Dias		28 Dias	
	Fibulas esquerdas	Fibulas direitas	Fibulas esquerdas	Fibulas direitas
Regeneradas	3 (30%)	2 (20%)	1 (10%)	0
Ñ regeneradas	7 (70%)	8 (80%)	9 (90%)	10 (100%)
Total	10	10	10	10

**Tabela 4-** Resultado numérico da análise radiográfica dos animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia, tratados com membrana de colágeno associada à solução fisiológica (grupo III).

	14 Dias		28 Dias	
	Fibulas esquerdas	Fibulas direitas	Fibulas esquerdas	Fibulas direitas
Regeneradas	2 (20%)	2 (20%)	4 (40%)	0
Ñ regeneradas	8 (80%)	8 (80%)	6 (60%)	10 (100%)
Total	10	10	10	10

## ANÁLISE BIOQUÍMICA

Esta análise consistiu em verificar a dosagem sérica da enzima fosfatase alcalina presente nos animais submetidos ao experimento. Os valores obtidos pelos testes de fotolorimetria são mostrados nas tabelas 5 e 6. Os dados constantes nestas tabelas foram submetidos à análise estatística aplicando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) considerando-se como variáveis o material que foi introduzido no defeito ósseo (membrana de colágeno + EEP 10 %; membrana de colágeno + etanol 80 %; e membrana de colágeno + solução fisiológica) e o tempo gasto até o sacrifício dos animais (14 dias e 28 dias). Optou-se por utilizar nível de significância de 5 % (0,05).

Os valores de referência para se proceder à comparação foram obtidos a partir do sangue de 10 animais sadios que não foram submetidos a qualquer tipo de intervenção. Para a coleta de sangue destes animais foram utilizados os mesmos procedimentos aplicados na obtenção de sangue dos animais experimentais. Os valores obtidos foram enquadrados dentro do seguinte intervalo:

**REFERÊNCIA  $\Rightarrow$  23,51  $\rightarrow$  45,97**

Quando os valores encontravam-se além deste intervalo ( $> 45,97$ ) admitia-se que os níveis séricos da enzima fosfatase alcalina estavam elevados.

De acordo com as tabelas 5 e 6, pode-se observar que a enzima encontra-se mais ativa nas fases iniciais do processo de consolidação de fratura, reduzindo gradativamente sua atividade, já que a média das dosagens obtidas aos 14 dias foi maior que os 28 dias após a cirurgia.

**\* Comparação dos valores da fosfatase alcalina entre os animais sacrificados 14 dias após a cirurgia.**

Os dados numéricos obtidos podem ser visualizados através da tabela 7. Quando se comparou os resultados entre os grupos I e II, temos que  $T_{\epsilon} < T^*$ , conseqüentemente, as diferenças encontradas entre as médias dos dois grupos não apresentam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5 %. Estes mesmos resultados foram encontrados quando se fez comparação entre as médias dos grupos II e III e entre as médias dos grupos I e III, não havendo diferenças estatisticamente significativas.

Neste grupo, 15 animais apresentaram os valores acima do intervalo de referência ( 7 animais no grupo I; 6 animais no grupo II; e 2 animais no grupo III), sugerindo-se o aumento da atividade enzimática nas fases mais iniciais no processo de consolidação de uma fratura.

**\* Comparação dos valores da fosfatase alcalina entre os animais sacrificados 28 dias após a cirurgia**

Os dados numéricos obtidos podem ser visualizados através da tabela 8. Quando se fez a comparação entre os grupos I e II, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, pois temos que  $T_{\epsilon} < T^*$ . Estes mesmos resultados foram encontrados quando a comparação foi realizada entre os grupos II e III e entre os grupos I e III, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas.

**\* Comparação entre os grupos de animais sacrificados 14 dias e 28 dias após a cirurgia**

Dos 30 animais que foram sacrificados 14 dias após a cirurgia, os valores brutos da fosfatase alcalina foram mais elevados em relação aos valores dos animais que foram sacrificados 28 dias após a cirurgia. Isto permite sugerir que existe um diminuição da atividade da enzima que parece estar relacionada diretamente com o tempo.

Quando se fez uma comparação das médias obtidas no grupo I entre os animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia, temos que  $T_e > T^*$ ; logo, isto mostra que as diferenças nas médias são estatisticamente significativas, sugerindo-se que o EEP a 10 % estimulou um aumento na atividade da fosfatase alcalina. Porém, quando a comparação foi realizada entre os grupos II e III, entre animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, sugerindo-se que o etanol a 80 % e a solução fisiológica não interferem na atividade enzimática (tabela 9).

**Tabela 5-** Valores da fosfatase alcalina (14 dias)

<b>GRUPO I</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>
40,16	<b>54,23</b>	44,26
40,6	<b>59,21</b>	39,18
<b>56,57</b>	30,63	44,08
45,76	31,37	29,38
<b>56,02</b>	36,27	<b>75,61</b>
<b>53,87</b>	<b>57,39</b>	<b>56,47</b>
<b>53,26</b>	<b>63,82</b>	33,52
<b>47,35</b>	33,97	41,02
<b>60,44</b>	<b>50,14</b>	32,79
<b>55,44</b>	<b>60,58</b>	38,67
509,47	477,61	434,98

**Tabela 6-** Valores da fosfatase alcalina (28 dias)

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
36,43	30,71	<b>19,57</b>
<b>51,57</b>	<b>53,93</b>	34,99
36,21	<b>47,42</b>	30,6
30,45	31,51	36,96
32,98	<b>53,2</b>	44,41
28,82	<b>20,08</b>	31,22
<b>46,9</b>	28,14	31,37
<b>46,98</b>	<b>48,36</b>	43,77
<b>54,48</b>	43,62	<b>55,14</b>
364,82	356,97	328,03

**Tabela 7-** Comparação dos valores da fosfatase alcalina em animais com 14 dias pós-cirurgia

	I e II	II e III	I e III
Fe	<b>3,547306</b>	<b>1,0533</b>	<b>3,736405</b>
F*	2,19	2,19	2,19
S <sup>2</sup>	112,3727	179,9945	117,0457
Te	<b>0,672</b>	<b>0,7105</b>	<b>1,5395</b>
T*	1,734	1,734	1,734

\* Nível de significância de 5% (0,05)

**Tabela 8-** Comparação dos valores da fosfatase alcalina em animais com 28 dias pós-cirurgia

	I e II	II e III	I e III
Fe	<b>1,6457</b>	<b>1,4283</b>	<b>1,1522</b>
F*	2,35	2,35	2,35
S <sup>2</sup>	120,6896	127,6334	98,17733
Te	<b>0,17957</b>	<b>0,60461</b>	<b>0,8756</b>
T*	1,746	1,746	1,746

\* Nível de significância de 5% (0,05)

**Tabela 9-** Comparação dos valores da fosfatase alcalina entre os grupos com 14 e 28 dias pós-cirúrgico

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Fe	<b>1,845943</b>	<b>1,1676</b>	<b>1,75671</b>
F*	2,23	2,23	2,23
S <sup>2</sup>	69,09902	163,4741	147,2339
Te	<b>2,7261</b>	<b>1,3785</b>	<b>1,2647</b>
T*	1,74	1,74	1,74

## **ANÁLISE HISTOLÓGICA**

### **Animais sacrificados 14 dias após a cirurgia**

Dos trinta animais sacrificados 14 dias após a cirurgia, quinze tiveram suas fíbulas direitas e esquerdas processadas para a análise histológica, sendo cinco animais de cada grupo. Entretanto, as fíbulas que radiograficamente apresentavam-se regeneradas (sete fíbulas esquerdas e quatro fíbulas direitas) não foram submetidas à análise histológica.

#### **1- Animais do grupo I**

Dos dez animais utilizados neste grupo, cinco tiveram suas fíbulas esquerdas e direitas processadas para a análise histológica, desde que não apresentassem regeneração óssea radiográfica.

#### **\* Aspecto Histológico das Fíbulas Esquerdas (Membrana de Colágeno Associada à própolis).**

Pela análise histológica pode-se observar que a membrana de colágeno implantada ainda não estava totalmente reabsorvida, porém em várias regiões, haviam pequenas perfurações que indicavam sinais de absorção. Pode-se observar também que a membrana foi eficiente em impedir a entrada de tecidos moles, especialmente tecido muscular, para o interior do defeito ósseo (figura 12). Não se observou sinal de reação inflamatória aguda, pois uma pequena quantidade de células comuns à resposta inflamatória foram encontradas na região, provavelmente

para reabsorver a membrana implantada. Este resultado indica que a membrana de colágeno utilizada neste estudo foi muito bem tolerada pelos tecidos.

Não foram encontradas no centro do defeito ósseo, áreas de cartilagem, o que se deve esperar num processo de regeneração óssea de ossos longos. Em poucos animais, pequenas ilhas de tecido cartilaginoso foram observadas na região do coto proximal, mostrando, talvez, a tentativa de formação de um calo de cartilagem para a união dos dois fragmentos (figura 13). Observou-se pequena alteração na espessura do periósteo e também uma considerável proliferação celular proveniente da medula óssea. Estes dados permitem que se sugira uma alteração no processo normal de regeneração óssea onde existe a prévia formação de cartilagem e substituição por tecido ósseo (ossificação endocondral), uma vez que cartilagem não foi normalmente encontrada. Aparentemente, o tecido "cicatricial" que se forma, vai, aos poucos, sendo substituído por osso pela chegada de células mesenquimais indiferenciadas através de vasos sanguíneos neoformados, a partir do periósteo ou a partir da grande quantidade de células que chegam ao centro do defeito provenientes da medula óssea (figura 14).

Foram também observadas na região de cicatrização, áreas de intensa basofilia, provavelmente representando remanescentes da membrana de colágeno, rodeadas por células, cujo aspecto morfológico lembram muito osteoblastos ou células osteoprogenitoras. Nestas áreas basófilas parece estar ocorrendo deposição de novo tecido ósseo, utilizando os fragmentos de membrana como suporte (figura 15). Também foi possível observar na periferia da membrana, uma barreira de células apoiada sobre ela que certamente parece ter sido suficiente para impedir entrada de tecidos moles na área de regeneração (figura 16).

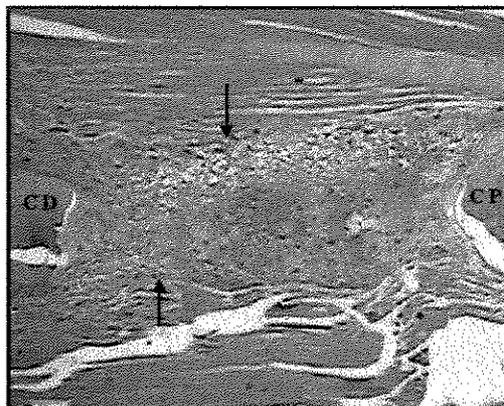
Os resultados radiográficos indicaram um crescimento do coto proximal e absorção do coto distal o que foi confirmado pela deposição de novo tecido ósseo na extremidade do coto proximal e sinais de reabsorção óssea no coto distal, pela visualização de osso necrótico e osteoclastos na região (figura 17).

### **Aspecto histológico das fíbulas direitas**

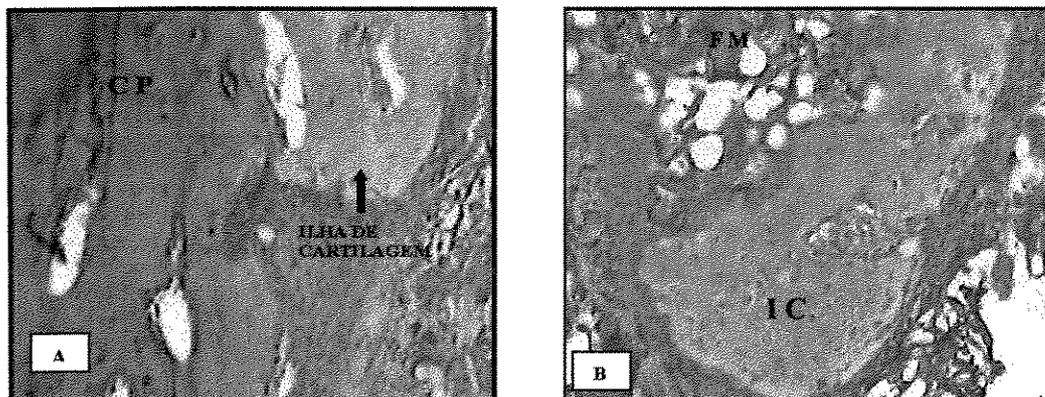
Nas fíbulas direitas somente a fratura foi realizada, não havendo a implantação de membrana de colágeno no defeito. Das dez fíbulas direitas utilizadas neste grupo, nenhuma apresentou regeneração radiográfica.

Nestas fíbulas, observava-se claramente que há uma grande invasão de tecido muscular na área correspondente ao defeito ósseo, o que muito provavelmente, impediu a regeneração óssea (figura 18). Na região correspondente ao coto proximal, observava-se proliferação celular, principalmente proveniente da medula óssea, provavelmente não evoluída pela presença do tecido muscular, que funcionava como uma barreira mecânica para as células da medula. Já no coto distal, vê-se áreas de osso necrótico, com presença de osteoclastos e reabsorção óssea

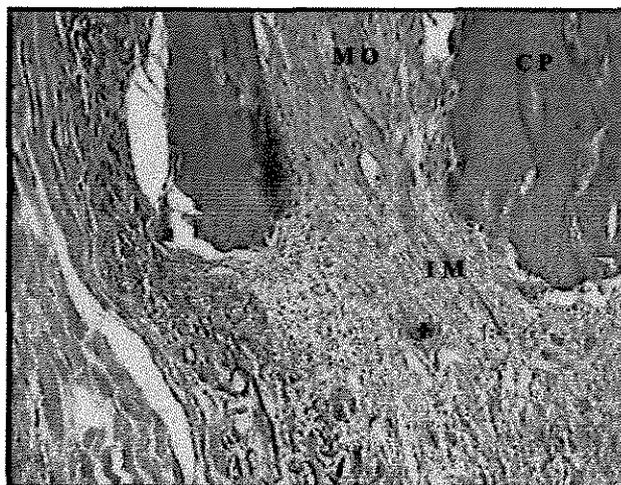
Estes resultados vêm confirmar a análise radiográfica que mostrou a não regeneração das fíbulas direitas com leve crescimento do coto proximal e reabsorção no coto distal.



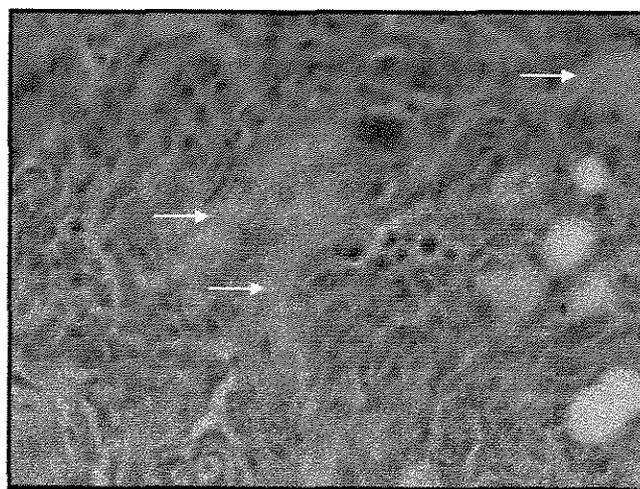
**Figura 12-** Aspecto histológico de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 %, de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. A porção à esquerda mostra o coto distal (CD), enquanto à direita vê-se o coto proximal (CP). As setas indicam as bordas da membrana mostrando sua eficiência em evitar a entrada de tecidos moles na região do defeito. Aumento de 20 x.



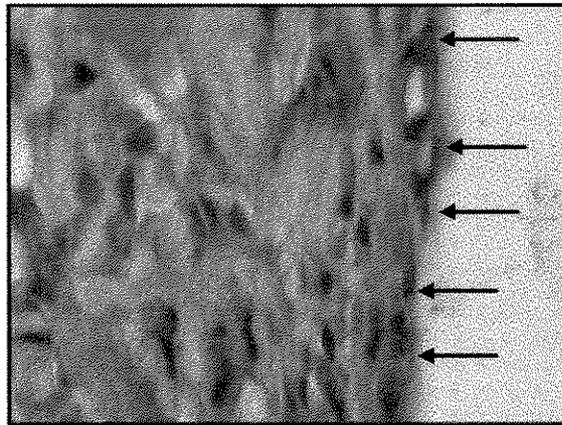
**Figura 13-** A- Aspecto histológico de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia mostrando coto proximal (CP) à esquerda. À direita do coto proximal, observa-se uma pequena ilha de cartilagem. Aumento de 80 x. B- Ilha de cartilagem em maior aumento (IC) e fragmentos da membrana em reabsorção (FM). Aumento de 150 x.



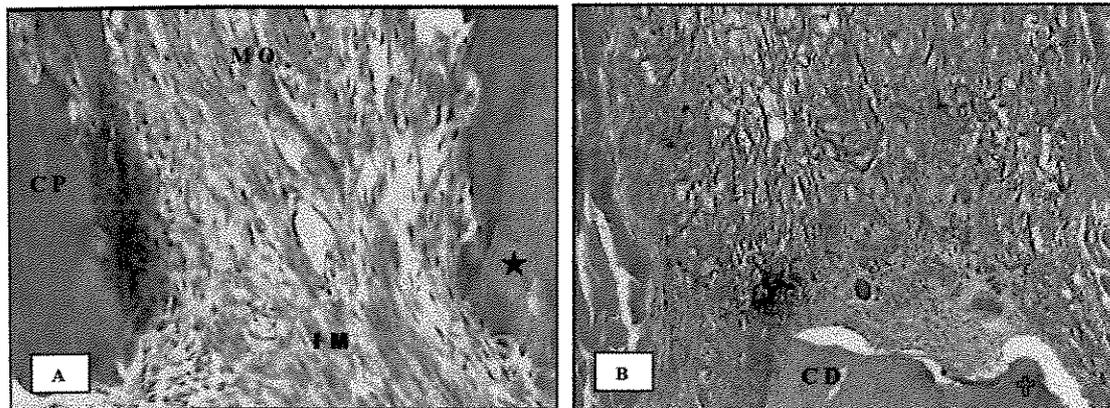
**Figura 14-** Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia; notar a proliferação celular proveniente da medula óssea (MO) para dentro da área de fratura (IM); (CP)- coto proximal; mais inferiormente, notar uma pequena ilha de osso necrótico (†). Aumento de 110 x.



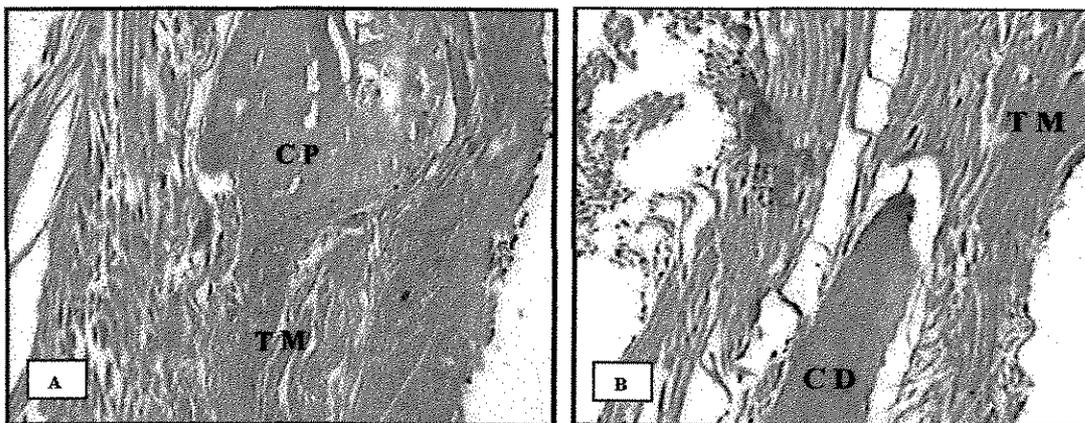
**Figura 15-** Áreas basófilas no centro do defeito (setas) indicando possíveis locais onde esteja ocorrendo deposição de tecido ósseo. Aumento de 850 x.



**Figura 16-** Barreira de células (setas) criada na periferia da membrana em uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10% de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. Aumento de 865 x.



**Figura 17-** Aspecto de uma fíbula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. **A-** região do coto proximal (CP); notar células da medula óssea (MO) invadindo o defeito ósseo (IM) e região de deposição de novo osso (★). Aumento de 140 x; **B-** Região do coto distal com sinais de reabsorção (⊕); aumento de 90 x.



**Figura 18-** Aspecto histológico de uma fibula direita de um animal do grupo I sacrificado 14 dias após a cirurgia. **A-** Extremidade do coto proximal (CP); tecido muscular (TM); aumento de 20 x; **B-** Extremidade do coto distal (CD); tecido muscular (TM). Aumento de 20 x.

## **2- Animais do grupo II**

Dos dez animais utilizados neste grupo, cinco tiveram suas fibulas esquerdas e direitas processadas para a análise histológica. As radiografias mostram que 3 animais apresentaram regeneração das fibulas esquerdas e duas das fibulas direitas. Estes animais não foram escolhidos para a análise histológica.

### **Aspecto histológico das fibulas esquerdas (membrana de colágeno associada a etanol a 80 %)**

A membrana de colágeno implantada apresentou-se perfurada em praticamente toda sua extensão, indicando sinais de reabsorção, porém sem sinais de reação inflamatória aguda na região. Um fato importante observado foi que a membrana associada ao etanol 80 % sofreu uma espécie de "encolhimento" para o interior do defeito ósseo tornando-se inadequada para barrar o tecido muscular adjacente (figura 19).

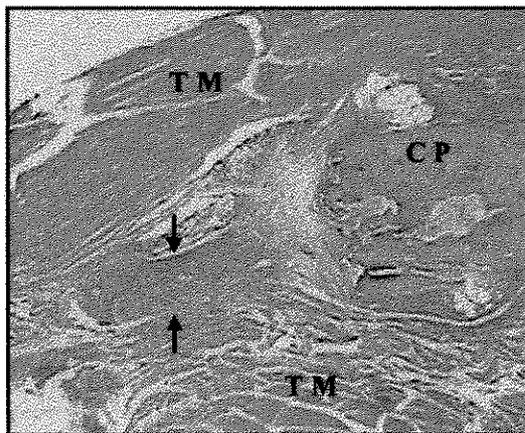
O tecido cartilaginoso encontrado, se restringiu a pequenas ilhas de cartilagem que apareceram, na maioria das vezes, em íntima relação com o coto proximal remanescente, o que provavelmente indicou uma tentativa de formação de um calo cartilaginoso com o objetivo de unir os dois cotos da fratura (figura 20).

No coto proximal, observa-se ainda uma pequena deposição de tecido ósseo, porém no coto distal existem áreas com osso necrótico e presença de alguns osteoclastos, indicando reabsorção óssea na região (figura 21). Estes resultados confirmam a análise radiográfica, mostrando que houve crescimento do coto

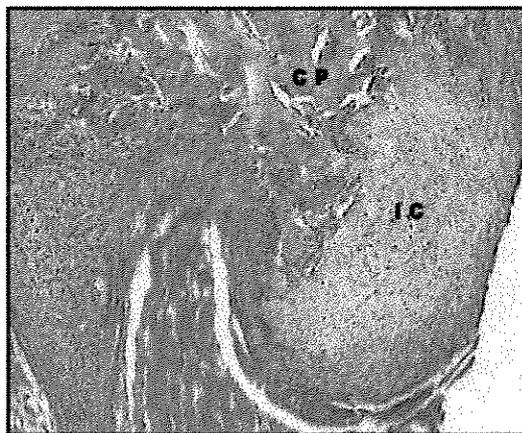
proximal e reabsorção do coto distal nas fibulas que não apresentaram regeneração total.

### **Aspecto histológico das fibulas direitas**

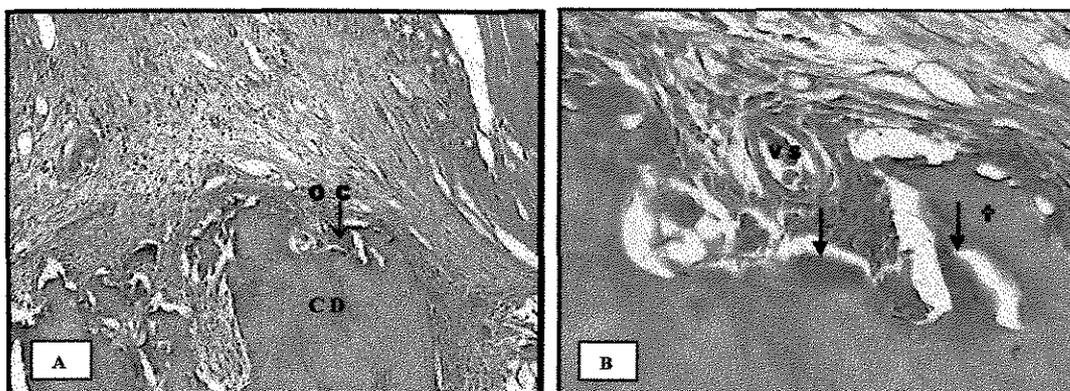
Como nas fibulas direitas do grupo I, houve um crescimento do coto proximal (figura 22), porém grande quantidade de tecido muscular invadiu a área correspondente ao defeito ósseo, impossibilitando assim, o crescimento do osso (figura 23). No coto distal eram visíveis áreas de osso necrótico (figura 23 B), sinais de reabsorção e a presença de osteoclastos. Estes resultados concordam com a análise radiográfica, onde se pode observar crescimento no coto proximal e reabsorção no coto distal na maioria das fibulas direitas. Também na extremidade do coto distal foi possível observar as células se propagando para o interior do defeito ósseo que estava invadido por tecido mole (figura 23 A e B).



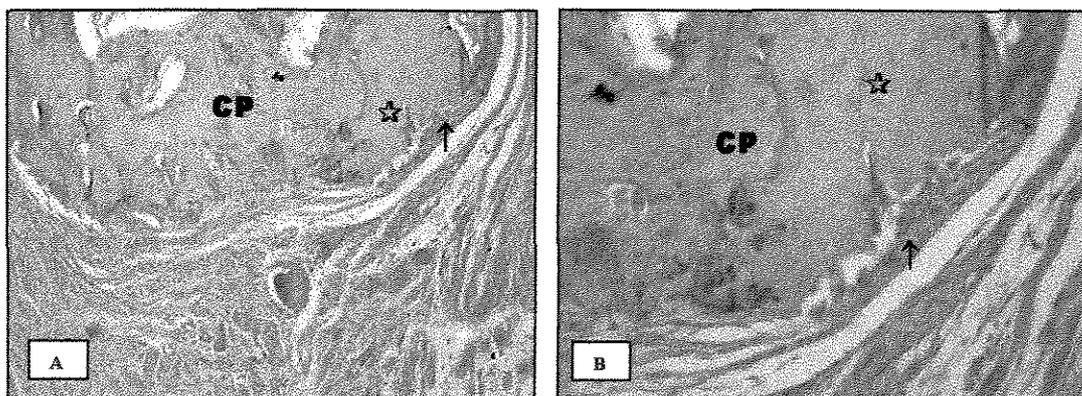
**Figura 19-** Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a etanol 80 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. As setas indicam "encolhimento" da membrana para o interior do defeito. (CP)- coto proximal; (TM)- tecido muscular. Aumento de 25 x.



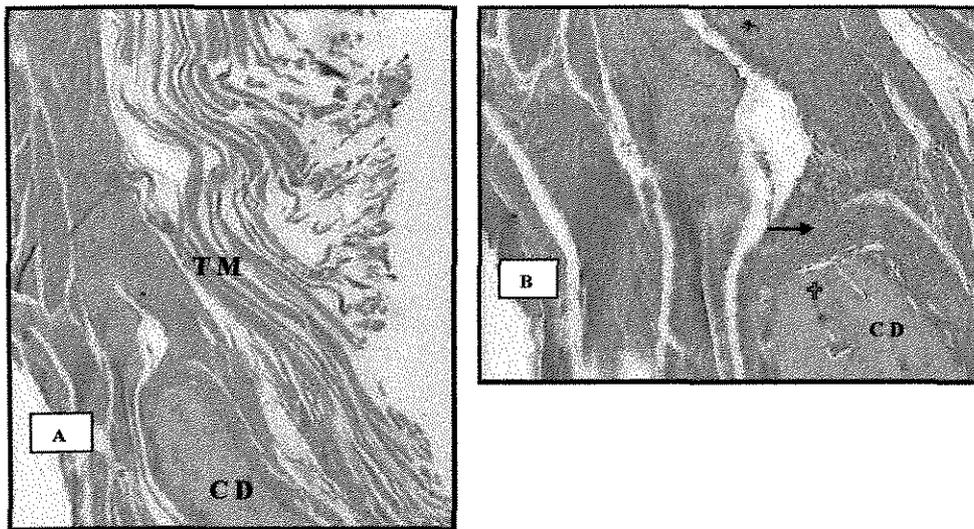
**Figura 20-** Áreas de cartilagem nas adjacências do coto proximal de uma fibula tratada com membrana de colágeno associada a álcool 80 % de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. (CP)- coto proximal; (IC)- ilha de cartilagem neoformada. Aumento de 115 x.



**Figura 21-** A- Aspecto histológico do coto distal de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a etanol 80 % mostrando osteoclastos (OC) na sua superfície (aumento de 20 x); B- Coto distal em maior aumento; as setas indicam, osteoclastos reabsorvendo o osso; osso necrótico (✕); aumento 150 x.



**Figura 22-** Aspecto histológico de uma fibula direita de animal do grupo II sacrificado 14 dias após a cirurgia. A- coto proximal (CP) mostrando novo tecido ósseo depositado (☆);(aumento de 100 x). B- coto proximal (CP) em maior aumento mostrando o tecido recém-depositado (☆); aumento de 150 x. As setas indicam periósteeo .



**Figura 23-** Aspecto histológico de uma fíbula direita de um animal tratado com membrana de colágeno associada a etanol 80 %. A- coto distal (CD), mostrando tecido mole logo a sua frente; observar tecido muscular (TM); (aumento de 20 x). B- coto distal (CD) com células em sua extremidade tentando se propagar para o defeito ósseo (seta); observar osso necrótico (†); (aumento de 100 x).

### **3- Animais do grupo III**

Dos dez animais utilizados neste estudo, cinco tiveram suas fíbulas esquerdas e direitas processadas para a análise histológica. Duas fíbulas esquerdas e duas fíbulas direitas apresentaram-se radiograficamente regeneradas (20 %), sendo portanto excluídas desta análise.

#### **Aspecto histológico das fíbulas esquerdas (membrana de colágeno associada à solução fisiológica)**

Como no grupo I, a membrana de colágeno implantada na região do defeito ósseo, ainda não estava totalmente reabsorvida, porém em várias regiões, haviam pequenas perfurações que indicavam sinais de absorção (figuras 24 e 25). A membrana associada à solução fisiológica mostrou-se eficiente no sentido de impedir a entrada de tecidos moles, especialmente tecido muscular para o interior do defeito ósseo. Aparentemente, a membrana embebida em solução fisiológica foi a que melhor sustentou o tecido muscular ao redor do defeito ósseo (figura 24). Também não foram encontrados sinais de reação inflamatória aguda, mas apenas pequena quantidade de células comuns na resposta inflamatória eram encontradas na região, provavelmente com o objetivo de reabsorverem a membrana implantada. Também como nos animais do grupo I, uma barreira de células (figuras 15 e 16) pôde ser observada nas margens da membrana, o que provavelmente evitou a invasão do defeito ósseo pelos tecidos moles circunjacentes.

Pode-se observar que há um leve crescimento ósseo do coto proximal, pela presença de osso recém-depositado na sua extremidade (figura 25) e sinais de

reabsorção no coto distal, pela presença de osso necrótico e osteoclastos na região (figuras 26).

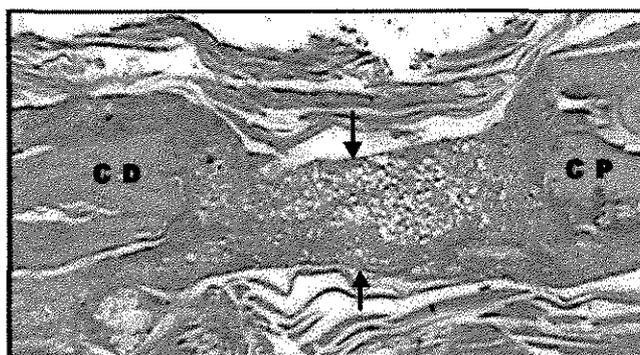
Não foram encontradas áreas de cartilagem na região do defeito ósseo, como foi observado nos animais dos demais grupos. Apenas em alguns animais, pequenas ilhas de tecido cartilaginoso foram observadas na região do coto proximal e no interior do defeito ósseo (figura 27). Enquanto o perióstio mostrou-se levemente alterado, uma grande proliferação celular proveniente da medula óssea foi observada. Estes dados também nos permitiu sugerir uma alteração no processo normal de regeneração óssea onde existe a prévia formação de cartilagem e substituição por tecido ósseo (ossificação endocondral), uma vez que cartilagem não foi normalmente encontrada.

Na região de cicatrização, como no grupo I, foram observadas áreas de intensa basofilia, provavelmente representando remanescentes da membrana de colágeno. Estas áreas estavam rodeadas por células cujo aspecto morfológico, lembravam muito osteoblastos ou células osteoprogenitoras, o que indica a deposição de tecido ósseo e a utilização dos fragmentos da membrana como suporte para a formação do novo osso (figura 28).

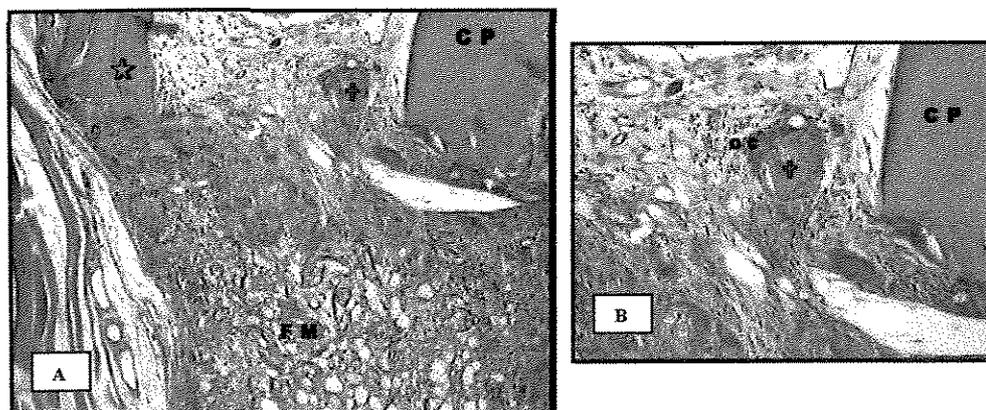
### **Aspecto histológico das fíbulas direitas**

Nestas fíbulas, observa-se claramente que há uma grande invasão de tecido muscular na área correspondente ao defeito ósseo, o que provavelmente, impediu a regeneração óssea (figura 29). Na região correspondente ao coto proximal, observa-se uma tentativa de proliferação celular (figura 30 A), principalmente proveniente da medula óssea, provavelmente não evoluída pela barreira formada pelo tecido

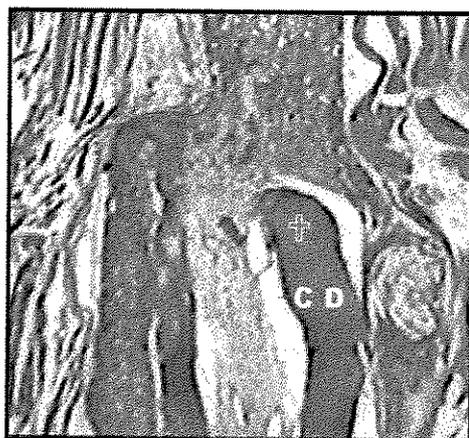
muscular (figura 30 B). Já no coto distal, vê-se áreas de osso necrótico (figura 30 B), com presença de osteoclastos e reabsorção. Estes resultados vêm confirmar a análise radiográfica. Em alguns animais foi possível se observar tecido cartilaginoso nos defeitos ósseos como tentativa de que ocorresse o processo de reparo (figura 30 B).



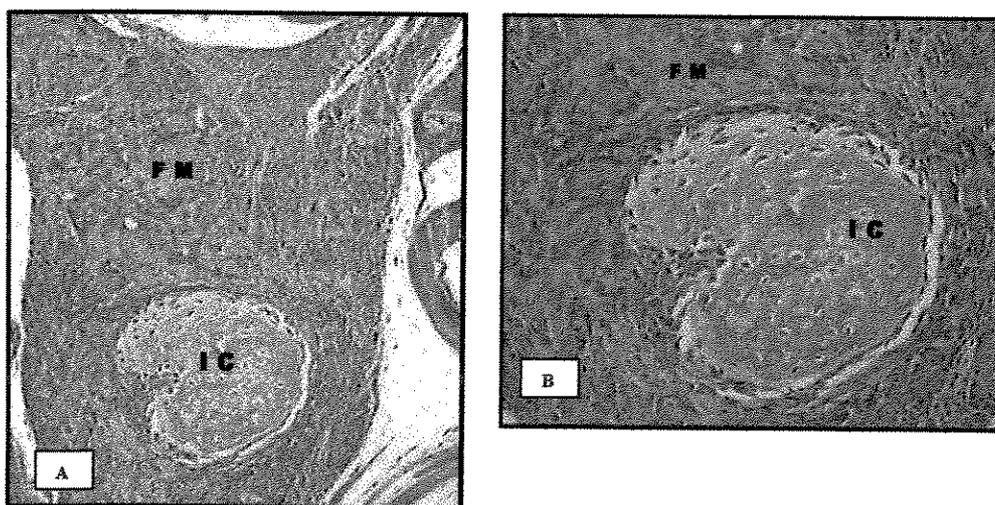
**Figura 24-** Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a solução fisiológica de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia, mostrando sua eficácia em evitar a entrada de tecido muscular no interior do defeito ósseo (setas); (CD)- coto distal; (CP)- coto proximal. (Aumento de 25 x).



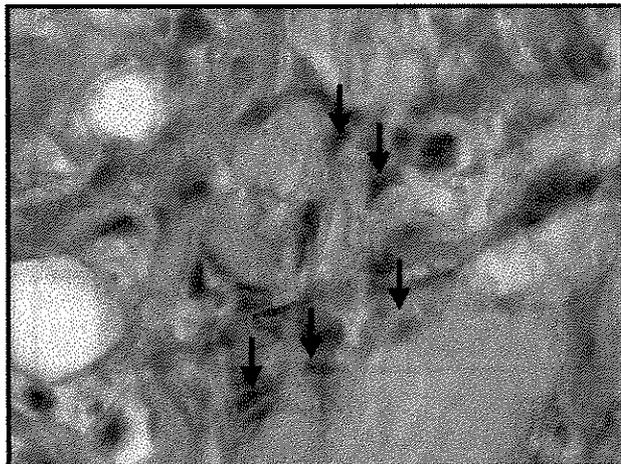
**Figura 25-** Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada à solução fisiológica, de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. A- Região do coto proximal (CP), mostrando a membrana começando a se fragmentar (FM) e uma ilha de osso necrótico (†) na região; observar osso recém-depositado em sua extremidade (☆); aumento de 85 x. B- Ilha de osso necrótico (†) em maior aumento; 120 x.



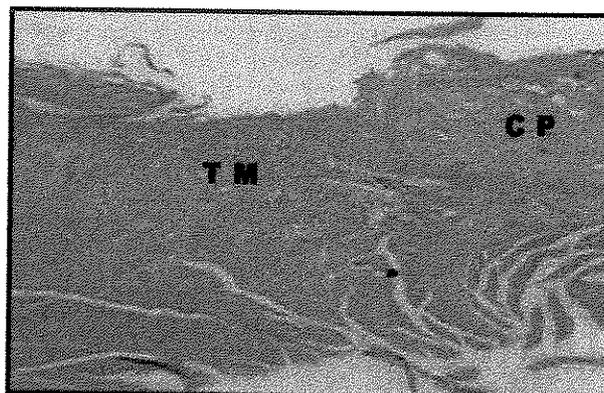
**Figura 26-** Região do coto distal (CD) de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a à solução fisiológica de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. Notar a presença de osso necrótico (†); aumento de 20 x.



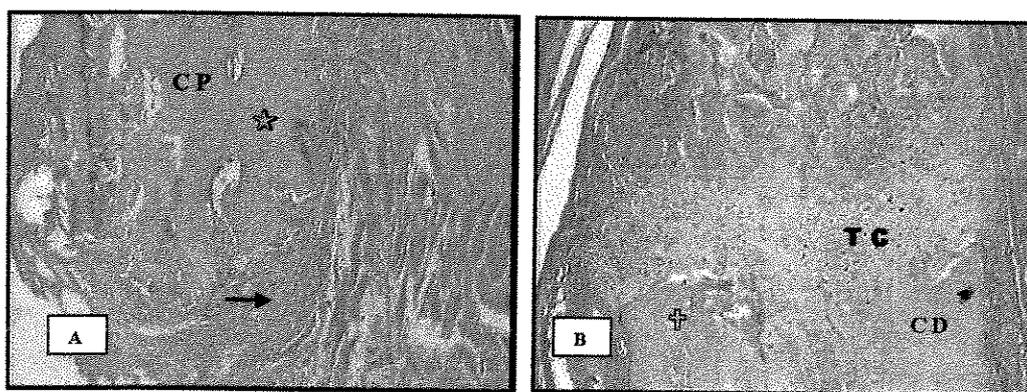
**Figura 27-** Centro do defeito ósseo de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada à solução fisiológica de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. A- Notar ilhas de cartilagem (IC) e fragmentos de membrana (FM) em reabsorção; (aumento de 60 x). B- Maior aumento da ilha de cartilagem (IC); (aumento de 115 x).



**Figura 28-** Interior do defeito ósseo de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada à solução fisiológica de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia. Observar áreas basófilas circundadas por células semelhantes a osteoblastos (setas). Aumento 1000 x.



**Figura 29-** Aspecto histológico de uma fibula direita de um animal do grupo III sacrificado 14 dias após a cirurgia. Observar a grande quantidade de tecido muscular (TM) no centro do defeito ósseo; (CP)- coto proximal. Aumento de 30 x.



**Figura 30-** Aspecto histológico de uma fibula direita de um animal do grupo III sacrificado 14 dias após a cirurgia. A- coto proximal (CP) com novo tecido ósseo depositado em sua extremidade (☆); observar uma pequena reação do periósteo (seta); aumento de 100 x. B- coto distal (CD) com osso necrótico à esquerda da figura (†); observar tecido cartilaginoso (TC) na tentativa de ocorrer o processo de regeneração. Aumento de 95 x.

## **Animais sacrificados 28 dias após a cirurgia**

Dos trinta animais sacrificados 28 dias após a cirurgia, quinze tiveram suas fíbulas direitas e esquerdas processadas para a análise histológica, sendo cinco animais de cada grupo. Entretanto, as fíbulas que radiograficamente apresentavam-se regeneradas (sete fíbulas esquerdas) não foram submetidas à análise histológica.

### **1- Animais do grupo I**

Dos dez animais utilizados neste grupo, cinco tiveram suas fíbulas esquerdas e direitas processadas para serem analisadas histologicamente, desde que não apresentassem regeneração visualizada pelas radiografias.

Apenas duas fíbulas esquerdas (20 %), apresentaram-se regeneradas radiograficamente, sendo, portanto, excluídas do processamento histológico, enquanto que nas fíbulas direitas não houve regeneração do osso.

### **Aspecto Histológico das Fíbulas esquerdas ( membrana de colágeno associada à própolis).**

A membrana de colágeno implantada não estava totalmente reabsorvida, pois pode-se observar áreas com resquícios dessa membrana. Pôde-se notar também que houve eficiência em impedir a entrada de tecidos moles, especialmente tecido muscular, para o interior do defeito ósseo (figura 31).

Houve um crescimento do coto proximal em direção ao distal ocorrendo, aparentemente, com grande participação de células provenientes da medula óssea e

uma participação mais reduzida do periósteo. Em alguns animais observou-se que o crescimento dos cotos de fratura não se fizeram na mesma direção, talvez devido a movimentação dos músculos inseridos no osso. Isto permite sugerir, que embora tenha ocorrido o crescimento ósseo, provavelmente não ocorrerá a união dos dois fragmentos, o proximal e o distal.

Como observado nos animais sacrificados 14 dias após a cirurgia, houve deposição de novo tecido ósseo no coto proximal (figura 32 A e B) e sinais de reabsorção óssea no coto distal (figura 32 C), estando de acordo com os resultados que foram obtidos radiograficamente.

Não foram encontradas no centro do defeito ósseo, grandes áreas de cartilagem. Foi observado também em alguns animais algumas ilhas de tecido ósseo, sem que tivesse formação prévia de cartilagem, podendo-se sugerir uma mudança no processo de ossificação nestes ossos.

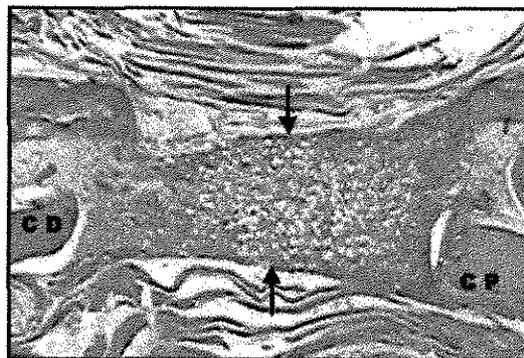
Foi possível observar na região do defeito, uma barreira periférica de células que se apoiavam na membrana e que, certamente, impediram a entrada de tecidos moles na área de regeneração (figura 33).

### **Aspecto histológico das fibulas direitas**

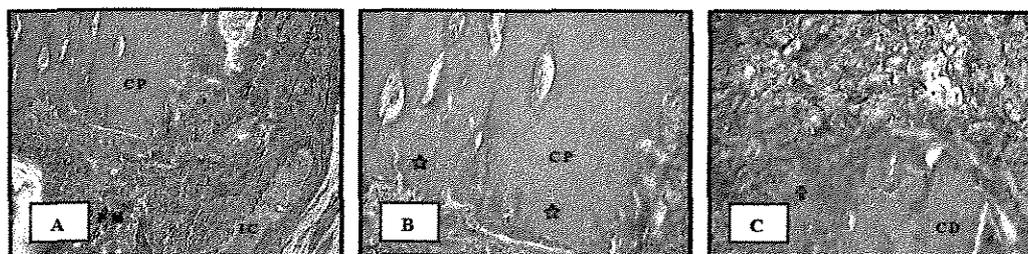
Nas fibulas direitas, onde somente se realizou a fratura, não havendo a implantação de membrana de colágeno, observa-se claramente que há uma grande invasão de tecido muscular na área correspondente ao defeito ósseo, o que provavelmente, impediu a regeneração óssea (figura 34). Na região correspondente ao coto proximal, observa-se a tentativa de proliferação celular, principalmente

proveniente da medula óssea, provavelmente não evoluída pela presença de uma barreira mecânica oferecida pelo tecido muscular, impedindo o crescimento do osso (figura 35 A). Já no coto distal, pode-se observar áreas de osso necrótico, com presença de alguns osteoclastos na região indicando o processo de reabsorção óssea. Em alguns animais foi possível observar a presença de pequenas ilhas de cartilagem na área de regeneração (figura 35 B).

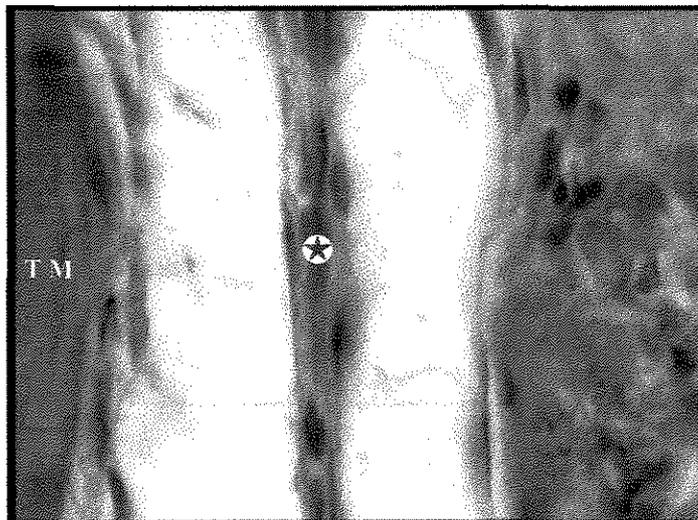
Estes resultados vêm confirmar a análise radiográfica que mostra a não regeneração de nenhuma fíbula direita e que na maioria delas, existe um leve crescimento do coto proximal e reabsorção do coto distal.



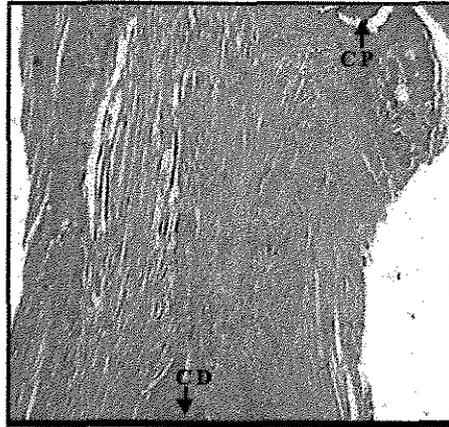
**Figura 31-** Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 %, de um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. (CP)- coto proximal; (CD)- coto distal; as setas indicam as bordas da membrana mostrando sua eficiência em suportar o tecido muscular circunjacente (Aumento de 30 x).



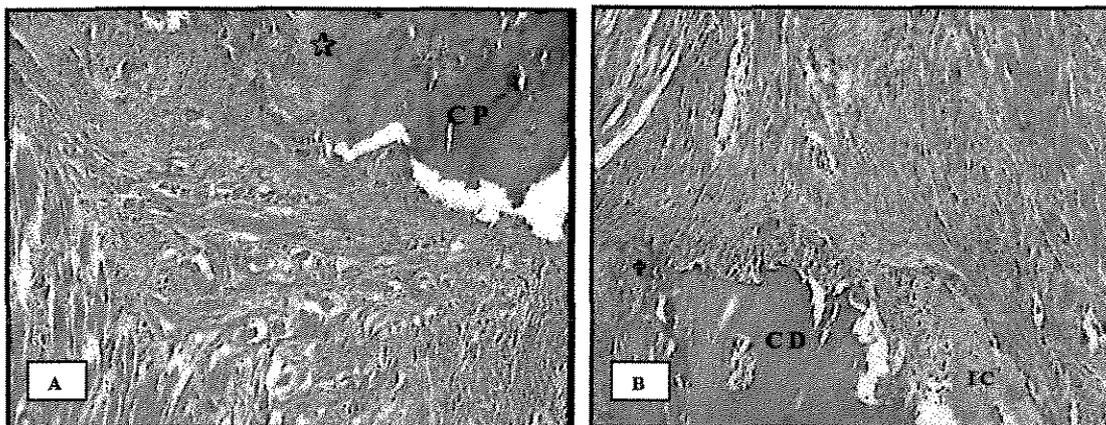
**Figura 32-** Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a EEP 10 % de um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. (CP)- coto proximal; (CD)- coto distal; **A-** região do coto proximal mostrando à direita da figura uma pequena ilha de cartilagem (IC) e ao centro, restos da membrana implantada (FM); aumento de 60 x. **B-** região do coto proximal com áreas de tecido ósseo recém-depositado (☆); aumento de 100 x. **C-** região do coto distal, observando-se à esquerda osso necrótico (†) e logo a frente do coto, osso sendo depositado (☆); aumento de 100 x.



**Figura 33-** Barreira de células criada ao redor da membrana de colágeno implantada em uma fibula esquerda associada a EEP 10% de um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia (à direita da figura) evitando a penetração de tecido muscular (TM). Aumento de 1000 x.



**Figura 34-** Aspecto histológico de uma fibula direita de um animal do grupo I sacrificado 28 dias após a cirurgia. (CP)- coto proximal; (CD)- coto distal. Observar a grande quantidade de tecido mole entre os fragmentos (aumento de 25 x).



**Figura 35-** Aspecto histológico de uma fibula direita de um animal do grupo I sacrificado 28 dias após a cirurgia. **A-** Região do coto proximal (CP); observar tecido ósseo depositado recentemente (☆); aumento de 90 x. **B-** Região do coto distal (CD); observar à direita da figura uma ilha de cartilagem (IC) associada ao coto e à esquerda área com osso necrótico (†); aumento de 85 x.

## **2- Animais do grupo II**

Dos dez animais utilizados neste grupo, apenas um (10 %) apresentou regeneração radiográfica da fibula esquerda e nenhuma fibula direita mostrou-se totalmente regenerada. Para a análise histológica, cinco animais tiveram suas fíbula esquerda e direita processadas.

### **Aspecto histológico das fíbula esquerda (membrana de colágeno associada a etanol 80%)**

Ainda é possível observar com 28 dias, remanescentes da membrana implantada. Como nos animais sacrificados 14 dias após a cirurgia, houve grande entrada de tecido muscular no defeito ósseo, mostrando que a associação de álcool a 80 % danifica e prejudica a função de barreira exercida pela membrana (figura 36).

Na região correspondente ao coto proximal uma pequena deposição de novo tecido ósseo pôde ser observada, principalmente com a participação de células provenientes da medula óssea, que foi prejudicada pela invasão do tecido muscular. Ainda se observava áreas de osso necrótico no coto distal e alguns osteoclastos reabsorvendo este tecido (figura 36 e 37).

Estes resultados mostram a ineficiência da membrana de colágeno associada a etanol 80 % em impedir a penetração de tecido mole no defeito ósseo.

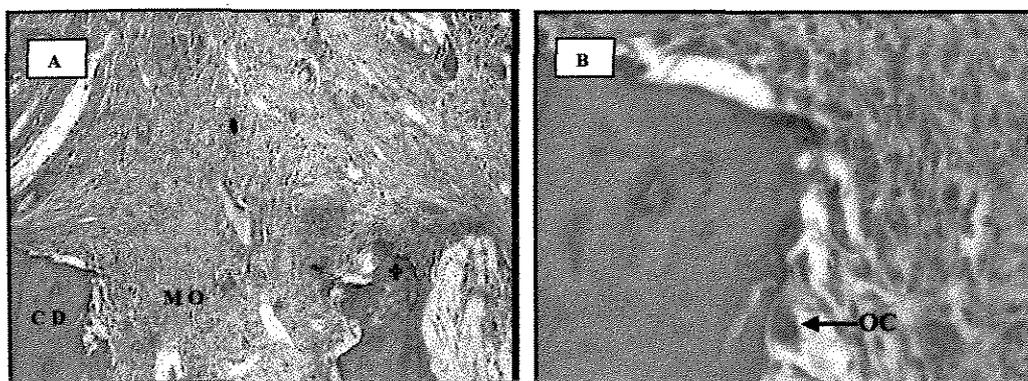
### **Aspecto histológico das fíbulas direitas**

Nestas fíbulas, observou-se claramente uma grande invasão de tecido muscular na área correspondente ao defeito ósseo o que, provavelmente, impediu a regeneração óssea. Na região correspondente ao coto proximal, observa-se a tentativa de proliferação celular com células provenientes do perióstio e da medula óssea e, provavelmente, não evoluída pela invasão de tecido muscular. Porém foi possível observar que há deposição de certa quantidade de tecido ósseo na região. No coto distal vê-se ainda áreas de osso necrótico e osteoclastos na região (figura 38).

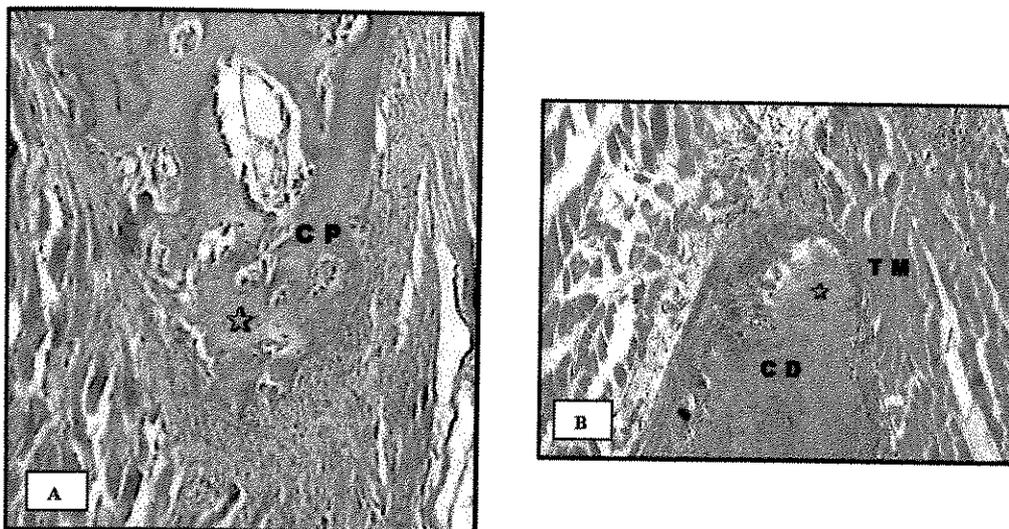
Estes resultados vêm confirmar a análise radiográfica que mostra a não regeneração das fíbulas direitas e que na maioria existe leve crescimento do coto proximal e reabsorção do coto distal.



**Figura 36-** Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a etanol 80 % em um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. Observar que a membrana (setas), foi pressionada pelo tecido muscular (TM); observar também uma pequena ilha de osso necrótico (†) e ao seu lado o fio de sutura (FS) em reabsorção; aumento de 25 x.



**Figura 37-** Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratada com membrana de colágeno associada a álcool 80 % em um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. Observar na região do coto distal (CD) osso necrótico (†) sendo reabsorvido por osteoclastos (MO) medula óssea; **A-** Aumento de 100 x. **B-** Aumento de 140 x.



**Figura 38-** Aspecto histológico de uma fíbula direita de um animal do grupo II. (CP)- coto proximal; (CD)- coto distal. A- observar na região correspondente ao coto proximal (CP), tecido ósseo recentemente depositado (☆); aumento de 85 x. B- observar também na extremidade do coto distal (CD), nova deposição de tecido ósseo (☆). Notar o tecido muscular invadindo a área do defeito ósseo; aumento de 95 x.

### **3- Animais do grupo III**

Dos dez animais utilizados neste grupo, cinco tiveram suas fibulas esquerdas e direitas processadas para a análise histológica. Neste grupo, 4 animais apresentaram regeneração das fibulas esquerdas, enquanto que nenhum deles apresentou regeneração das fibulas direitas.

#### **Aspecto histológico das fibulas esquerdas (membrana de colágeno associada à solução fisiológica)**

A membrana de colágeno implantada ainda não estava totalmente reabsorvida, porém uma barreira de células situada na sua periferia evitou a penetração de tecidos moles, especialmente tecido muscular, para o interior do defeito ósseo (figura 39).

Um crescimento do coto proximal em direção ao coto distal pôde ser observado, aparentemente com grande participação de células provenientes da medula óssea e uma menor participação do periósteo (figura 39).

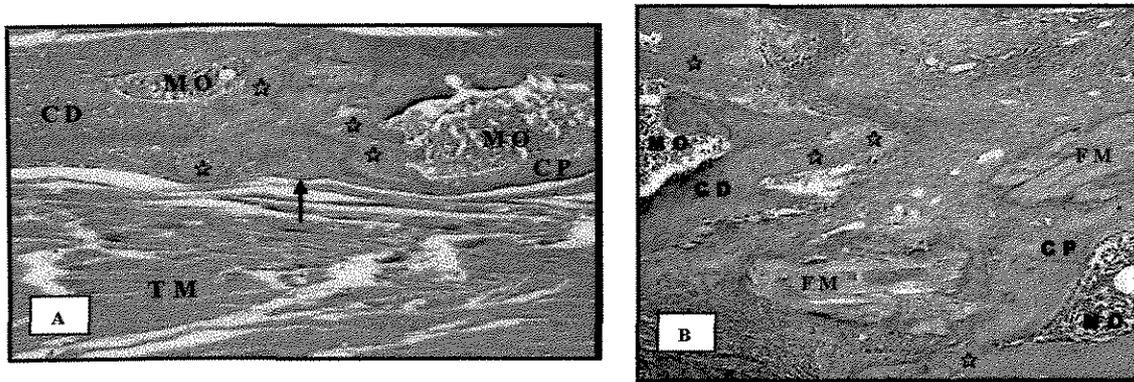
Não foram encontradas no centro do defeito ósseo, áreas de tecido cartilaginoso; porém em alguns animais, pequenas ilhas de tecido ósseo puderam ser visualizadas, sugerindo-se que o processo de ossificação está ocorrendo sem que haja formação prévia de cartilagem.

No centro do defeito, várias áreas basófilas foram observadas representando regiões onde, provavelmente, estaria ocorrendo aposição de tecido ósseo, utilizando como apoio, os remanescentes da membrana.

### **Aspecto histológico das fibulas direitas**

Nestas fibulas, observa-se claramente a invasão de tecido muscular na área correspondente ao defeito, o que impediu a regeneração óssea (figura 40). Na região correspondente ao coto proximal, observa-se a tentativa de proliferação celular, principalmente proveniente da medula óssea, provavelmente não evoluída pela barreira de tecido muscular. No coto distal, vê-se áreas de osso necrótico e a presença de alguns osteoclastos indicando o processo de reabsorção (figura 41).

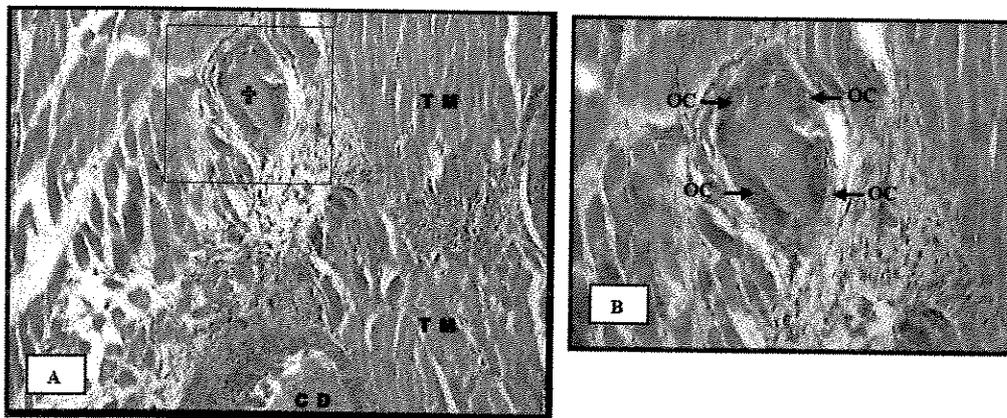
Estes resultados corroboram aqueles obtidos radiograficamente, que mostram a não regeneração das fibulas direitas e a existência de leve crescimento do coto proximal e reabsorção do coto distal.



**Figura 39-** Aspecto histológico de uma fibula esquerda tratado com membrana de colágeno associada a solução fisiológica de um animal sacrificado 28 dias após a cirurgia. **A-** Observar a eficiência da membrana (seta) em evitar a entrada de tecido muscular (TM) para dentro do defeito ósseo; observar também na região do coto proximal (CP), tecido ósseo imaturo (☆), provavelmente proveniente de células da medula óssea (MO). Notar ainda na região do coto distal (CD), a existência de tecido ósseo imaturo (☆). Aumento de 25 x. **B-** aumento de 110 x.



**Figura 40-** Aspecto histológico de uma fíbula direita de um animal do grupo III, sacrificado 28 dias após a fratura. Observar a grande quantidade de tecido muscular (TM) logo a frente do coto proximal (CP); (MO)- medula óssea. Aumento de 120 x.



**Figura 41-** Região do coto distal (CD) de uma fíbula direita de um animal do grupo III, sacrificado 28 dias após a fratura. A- observar a extremidade do coto distal rodeada por tecido muscular (TM) e uma ilha de osso necrótico (†); aumento de 100 x. B- ilha de osso necrótico sendo reabsorvida (†) por osteoclastos (OC); aumento de 130 x.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo para testar a capacidade de uma membrana de colágeno associada a EEP a 10 % em regenerar, mostraram que a taxa de regeneração das fibulas onde se implantou a membrana, foi mais elevada que as fibulas sem membrana de colágeno. Porém, a taxa de regeneração foi baixa e isto, provavelmente, pela grande extensão dos defeitos ósseos criados nas fibulas.

Vários autores têm demonstrado na literatura as diversas propriedades terapêuticas da própolis, destacando-se entre elas sua ação anti-inflamatória e antibiótica (BANKOVA et al., 1983; HAUSTEEN, 1983; DOBROWDSKI et al., 1991; MARCUCCI, 1995; MIZOERVA & CALDER, 1996). Em nosso experimento, não houve sinais de reação inflamatória em nenhum dos grupos estudados, entretanto, não podemos atribuir esta ausência de inflamação especificamente a própolis, pois somente em um grupo ela foi utilizada. Além disso, a concentração de própolis utilizada neste experimento foi muito pequena.

Além destas atividades, a própolis mostra-se com ação cicatrizante em vários tecidos. Para SCHELER et al. (1977), ela tem efeito de estimular ou acelerar o processo de regeneração em cartilagens articulares do acetábulo e da cabeça do fêmur. Nossa análise não foi capaz de revelar que a utilização de própolis tenha estimulado a produção de tecido cartilaginoso na região, pois este apareceu em pequena quantidade nas áreas de cicatrização e de forma proporcional nos três grupos de estudo utilizados no experimento, ou seja, grupo I (EEP 10 %), grupo II (etanol 80 %) e grupo III (solução fisiológica). Esta divergência de resultados pode ser devida a pequena quantidade de própolis utilizada em nosso experimento (15 µl) e as diferenças do meio em que a própolis foi administrada.

Em 1978, STOJOKO et al., analisaram a influência do EEP a 3% na regeneração de tecido ósseo. Foi observado que com a utilização desta substância, havia uma aceleração no processo de formação do osso, constatada por análises radiográficas. Nossos resultados não mostraram nenhum tipo de ação estimulante da própolis no processo de regeneração do tecido ósseo, o que provavelmente ocorreu pela pequena quantidade do material utilizado e ou pela extensão da perda óssea produzida. Nos trabalhos de STOJOKO, foram criados defeitos circulares na superfície do osso, sendo a perda de tecido ósseo bastante pequena e além disso, o processo de consolidação do osso é diferente em um defeito de forma circular, ocorrendo especialmente da região central do osso em direção as suas partes mais periféricas. Em nosso experimento, a acentuada perda óssea foi acompanhada também, pela perda de grande quantidade de perióstio, membrana conjuntiva que envolve perifericamente o osso, relacionando-se com sua nutrição e é fundamental para que haja o processo de consolidação de uma fratura (AXHOUSE, 1956; BASSET, 1962; HAM & COMARK, 1983; BURSTEIN & CANALIS, 1985).

Quando existe uma lesão periostal bastante extensa, ocorre uma diminuição na velocidade do processo de regeneração que tende a unir os dois cotos resultantes da fratura. Este retardo na regeneração ocorre em decorrência do trauma existente na região e/ou devido a grande quantidade de perióstio que foi perdida quando se produziu o defeito ósseo (MOCK, 1928; SATOH et al., 1983). Nossos resultados estão de acordo com estas afirmações, uma vez que, nos defeitos ósseos produzidos, houve grande perda de tecido ósseo e de perióstio (3,5 mm), dificultando ou até mesmo impedindo que ocorresse de forma satisfatória o processo de consolidação da fratura. Nossos resultados discordam dos obtidos por STOJOKO et al. (1978) que afirmam a existência de grande atividade osteogênica para o extrato etanólico de

própolis 3%. Porém nos estudos de STJOKO, não ocorreu perda de grande quantidade de periósteeo.

De acordo com MOCK (1928), o periósteeo é o tecido mais importante para promover a união dos dois cotos da fratura e o processo de regeneração do osso. Assim sendo, quando existe qualquer lesão que comprometa o periósteeo, será sempre necessário fazer sua substituição através de enxertos provenientes de outras regiões do corpo do animal. Para o autor, o ideal é que toda diáfise da região fraturada seja completamente envolvida pelo periósteeo para que o processo de regeneração da fratura possa ser favorecido. Como em nosso estudo o periósteeo foi removido juntamente com o tecido ósseo, o processo de consolidação foi alterado, retardando sua evolução ou contribuindo para que não houvesse a regeneração.

Embora seja bastante evidente na literatura a importância do periósteeo no processo de consolidação de uma fratura, existem controvérsias quanto a sua capacidade osteogênica, que pode ser influenciada por vários fatores. Os resultados obtidos em nosso trabalho, puderam mostrar que até 28 dias após a criação do defeito ósseo não foi encontrado tecido ósseo preenchendo o defeito. Porém, no tecido de preenchimento existente na região do defeito, foram encontradas áreas basófilas que representavam possíveis áreas de deposição de tecido ósseo, pois estavam cercadas por células com grande semelhança morfológica de células osteogênicas. Estas áreas basófilas podem representar também remanescentes da membrana de colágeno servindo como pontos de apoio para que o tecido ósseo seja depositado. Embora não tenha ocorrido a formação de tecido ósseo, estas observações indicam que provavelmente, ela poderia ocorrer num período mais avançado, havendo assim, um retardo no processo de consolidação. Estes resultados tornam-se, de certa forma, conflitantes com aqueles obtidos por AXHAUSEN

(1909) e MOCK (1928), que afirmam que a presença do perióstio é fundamental para que haja formação de novo tecido ósseo. Porém, de acordo com DAVIS & HUNNICUTT (1915), MACEWEN (1912), LERICHE & POLICARD (1926), o perióstio não seria osteogênico, atuando apenas como suporte para o processo de ossificação e/ou servindo como uma membrana limitante para restringir a proliferação osteoblástica que ocorre na região.

Além da grande perda periostal, vários outros fatores podem ter contribuído para a pequena taxa no processo de regeneração óssea obtida em nosso experimento. Dentre estes fatores podem ser citados a grande probabilidade de entrada de tecidos moles circunjacentes para o interior do defeito ósseo, especialmente tecido muscular, constituindo uma obstrução mecânica que impediu o crescimento do osso (MINABE, 1991; ALBERIUS & LINDE, 1992; PIATELLI, et al., 1991), uma redução na vascularização da região provocando uma diminuição da velocidade do processo de consolidação da fratura (KING, 1976; TAKATO et al., 1986), redução na taxa de oxigênio na área da fratura e fatores biomecânicos envolvidos diretamente com o processo de regeneração, tais como as forças que recaem sobre a área da fratura, decorrentes de movimentos realizados pelo animal. A tentativa de se evitar a entrada de tecidos moles para o interior do defeito foi um dos objetivos deste estudo.

A tentativa de se evitar a entrada de tecidos moles para o interior do defeito ósseo, foi um dos objetivos deste estudo. Os demais fatores que podem interferir no processo de regeneração óssea, não foram estudados neste experimento.

A utilização de membranas de barreira tem como principal finalidade, evitar que os tecidos moles circunjacentes à fratura, penetrem para seu interior e, desta forma, impeçam a consolidação. Estas membranas são bastante utilizadas na prática

médica e amplamente descritas na literatura (MURRAY, 1957; MINABE, 1991; ALBERIUS, et al., 1992; LINDE, et al., 1993; PIATTELLI, et al., 1996; ITO, et al., 1998; MATTSON, et al., 1999; DUPOIRIEUX, et al., 2001).

A terapia de regeneração tecidual guiada tem sido muito utilizada na regeneração de tecidos periodontais e na regeneração óssea. É utilizada também para cobrir externamente implantes realizados em alvéolos dentais com exodontias recentes ou quando é necessário o enxerto ósseo para propiciar suporte adequado para estes implantes, evitando desta forma o crescimento ou invasão de tecidos moles na região (MURRAY, 1957; BLUMENTHAL, 1988; ALBERIUS, et al., 1992; AABOE, et al., 1995; PIATTELLI, et al., 1996).

Estas membranas utilizadas como barreira para prevenir a entrada de tecidos moles, podem ser constituídas por vários tipos de substâncias, sendo normalmente divididas em barreiras absorvíveis e não absorvíveis. De acordo com MINABE (1991) e DUPOIRIEUX et al. (2001), as membranas de barreira não absorvíveis propiciam melhores resultados em relação às absorvíveis, porém apresentam o único inconveniente de que é necessário uma nova etapa cirúrgica para que seja feita a sua remoção.

Nossa opção em utilizar membranas absorvíveis se deve ao fato de que a literatura nos mostra resultados bastante satisfatórios e semelhantes aos obtidos para as membranas não absorvíveis, com a vantagem de que não é necessário uma segunda intervenção cirúrgica (BLUMENTHAL, 1988; FIGUEREDO & FISCHER, 1998).

Nossos resultados mostram que a membrana de colágeno foi bastante eficaz em prevenir a entrada de tecidos moles para o interior do defeito ósseo, propiciando assim um "espaço livre" para que ocorra a regeneração do osso. A membrana foi eficaz quando associada ao EEP a 10% e solução fisiológica, porém sua função de barreira foi comprometida quando associada a etanol a 80 %. Podemos sugerir que, de alguma forma, a constituição da membrana foi influenciada pelas substâncias com as quais foi associada, o que interferiu na função executada pela membrana. Para DUPOIRIEX et al. (2001), a estrutura da membrana é mais importante que sua composição e qualquer fator que interfira na sua estrutura, pode também, interferir na sua função.

Nossos resultados permitem sugerir que o processo de regeneração óssea está ocorrendo, porém de forma mais lenta de que normalmente ocorreria, sendo estes resultados observados nos animais sacrificados 14 dias e 28 dias após a cirurgia. Isto provavelmente ocorreu pela grande extensão do defeito ósseo associada com a perda de grande quantidade de periósteo e, de alguma forma, a implantação da membrana de colágeno, embora tenha sido muito biocompatível e eficiente quando associada ao EEP 10% e à solução fisiológica, pode ter causado um efeito prejudicial, atrasando o processo de regeneração óssea. Estes dados nos permite sugerir que, provavelmente, se estes animais fossem mantidos vivos por um período de tempo mais prolongado, o processo de regeneração teria sido completado por um processo diferente daquele que normalmente deveria ter ocorrido (ossificação endocondral). Porém, quando se associou a membrana a etanol 80 %, ocorreu a entrada de tecido muscular no defeito ósseo, provavelmente porque o álcool alterou a estrutura da membrana. Sugerimos que, nestes animais, o processo de consolidação não teria sido completado, mesmo se fossem mantidos vivos por um tempo mais prolongado.

Várias são as substâncias que podem constituir as membranas absorvíveis. Dentre elas, destacam-se as membranas de ácido poliláctico, de poliglactina 910 e as membranas de colágeno (SANDBERG, et al., 1993; MILLER, et al., 1996; MAO, et al., 1997; BUNYARATAVEJ & WANG, 2000).

As membranas de colágeno são preferidas por vários pesquisadores, pelo fato de oferecerem ótima biocompatibilidade, proteger o coágulo sangüíneo entre os dois cotos da fratura, ter efeito hemostático e, principalmente, ter capacidade de segurar ou apoiar os tecidos moles circunjacentes ao defeito ósseo, sendo o colágeno ainda, uma proteína bastante comum no organismo humano (STEIN, et al., 1985; HYDER, et al., 1992; FIGUEREDO & FISCHER, 1998; BUNYARATAVEJ & WANG, 2001). Nossos resultados mostraram que a membrana de colágeno é bastante biocompatível e funcional quanto a sua função de barreira, pois não foi evidenciada reação inflamatória nos locais onde ela foi implantada; nem tão pouco, sinais que pudessem sugerir uma reação de rejeição contra o material. O que observamos foi a presença de células gigantes multinucleadas na região, com a função de reabsorver a membrana.

Embora a taxa de regeneração não tenha sido muito elevada, não houve invasão do defeito ósseo por tecido muscular, mas a formação de um tecido cicatricial unindo os dois cotos da fratura. Provavelmente, num período mais avançado, este tecido poderia ser substituído por osso, já que em alguns animais, foram encontradas ilhas de tecido ósseo no seu interior. Estes resultados não estão de acordo com DUPOIRIEUX et al. (2001), para os quais as membranas de colágeno não são eficientes em prevenir a entrada de tecidos moles para o interior de um defeito ósseo.

Outro fator de certa relevância, é o baixo custo que as membranas de colágeno apresentam em relação as demais membranas que funcionam como barreiras biológicas. Esta e as demais vantagens apresentadas, apoiam sua utilização como tratamento alternativo nas lesões em que existe fratura com perda de substância óssea e/ou quando se deseja utilizar do princípio de regeneração óssea guiada.

Uma outra vantagem apresentada pelas membranas colagenosas é que elas são facilmente manipuladas. Além disso, podemos lembrar que o colágeno é uma proteína encontrada fisiologicamente em praticamente todo nosso organismo, inclusive em grande quantidade no tecido ósseo, possuindo ação hemostática, como já referido e ação quimiotática para fibroblastos. Em nosso estudo, foi possível observar todas estas características relativas ao colágeno reforçando, desta forma, o que já vem sendo descrito na literatura por vários autores (DELBALSO & ADRIAN, 1976; SCHLEGEL et al., 1997; FIGUEREDO & FISCHER, 1998; BUNYARATAVEJ & WANG, 2001).

Nossos resultados também estão de acordo com os dados de OWENS & YUKNA (2001), que mostraram que as membranas de colágeno são lentamente absorvidas, podendo observar fragmentos destas membranas até 4 meses após sua implantação no organismo. Nos animais sacrificados 28 dias após a cirurgia, visualizava-se de forma bastante clara a membrana ainda sendo absorvida, porém desenvolvendo de forma satisfatória sua ação de barreira biológica.

CAIAZZA et al. (2000), avaliando membranas de colágeno em fêmures de coelhos, obtiveram resultados semelhantes aos nossos quanto a eficiência das membranas de colágeno. Os autores observaram que abaixo da membrana formou-se

uma cortical óssea mais espessa quando comparado com animais nos quais não foi realizado o implante da membrana e, além disso, maior quantidade de tecido mole foi encontrada na região correspondente ao defeito ósseo, nos animais que foram submetidos ao implante.

Nossos resultados radiográficos demonstraram que na maioria das fíbulas não regeneradas e tratadas ou não com a membrana de colágeno, foi observado um crescimento do coto proximal e leve reabsorção do coto distal, o que confirma os resultados obtidos por SANT'ANNA, 1997. Esta reabsorção no coto distal pode ser decorrente da secção do ramo descendente da artéria nutrícia, que segundo TRUETA (1963), é a principal fonte de irrigação para o osso, sendo responsável pela irrigação de 50 a 70 % do seu volume total. O crescimento do coto proximal observado nas radiografias pode ser atribuído ao fato de que as fíbulas de ratos nesta idade, apresentam somente cartilagem epifisária proximal, estando unidas diretamente à tíbia em sua extremidade distal. Pode ser também atribuído ao fato de que, como foi observado pela análise histológica, há uma proliferação de células na extremidade do coto proximal, células estas provenientes principalmente da medula óssea.

De acordo com McKIBBIN (1978), quando existe fratura em um osso longo, há uma grande proliferação celular proveniente do perióstio, de tecidos circunjacentes e a participação de células existentes na medula óssea. Dessa forma, as extremidades ósseas participam diretamente da atividade proliferativa, além disso ocorre necrose desta região aparecendo locais onde se observavam osteoplastos vazios. Estas observações também são feitas por HAM & CORMACK (1983), que explicam que as alterações ocorrem em decorrência da destruição de vasos sanguíneos intra-ósseos, isto é, os vasos haversianos são rompidos na linha de

fratura e a circulação interrompida até os locais onde ocorreria anastomoses com outros vasos haversianos. Assim, a circulação é interrompida por uma distância variavelmente curta, de cada lado da linha de fratura e o osso nesta região será necrosado.

Em nossos resultados foi possível observar osso necrótico nas extremidades dos dois cotos da fratura, especialmente no coto distal e principalmente nos animais sacrificados 14 dias após a cirurgia. Em alguns animais, ilhas de osso necrótico também podiam ser observadas no interior do defeito ósseo. Para McKIBBIN (1978), a remoção de osso necrótico da região de consolidação e a velocidade com que ele vai ser reabsorvido, dependem principalmente de fatores mecânicos. Se ocorrer a restauração da continuidade, o osso necrótico será reabsorvido de forma mais acelerada. Assim, nossos resultados confirmam as observações desse autor, pois 28 dias após a fratura, ainda era possível encontrar osso necrótico na região.

O processo de regeneração de fraturas de ossos longos se dá principalmente através do mecanismo endocondral, isto é, ocorre o aparecimento de grande quantidade de cartilagem que vai, gradativamente sendo substituída por tecido ósseo (NAJJAR & KAHN, 1977; McKIBBIN, 1978; HAM & CORMACK, 1983; CHAKKALAKAL et al., 1999). Nossos resultados mostram que pequena quantidade de cartilagem foi encontrada nos defeitos ósseos, tanto nos animais sacrificados 14 dias quanto naqueles que foram sacrificados 28 dias após a cirurgia, indicando um mecanismo de ossificação diferente do endocondral. Neste caso seria um processo de ossificação intramembranosa, onde células provenientes do perióstio e, principalmente da medula óssea, se diferenciam em células osteogênicas dando origem a novo tecido ósseo. Também através de novos vasos sanguíneos que aparecem na região da fratura, chegam células mesenquimais indiferenciadas,

convertendo-se em osteoblastos ou células osteogênicas (McKIBBIN, 1978; BRIGHTON, 1984; CORNELL & LANE, 1992).

Não se sabe ao certo, o processo através do qual existe a formação de cartilagem. Porém vários trabalhos têm mostrado que inicialmente existe a formação deste tecido que permanece provisoriamente sendo então substituído por osso. De acordo com BASSET (1962), quando existem altas concentrações de oxigênio ocorre a formação de osso de maneira direta; porém quando a concentração de oxigênio é baixa, há inicialmente, formação de cartilagem. Estas variações na concentração de oxigênio na área correspondente ao defeito ósseo, podem ser decorrentes da diminuição da vascularização existente na região, levando conseqüentemente a produção inicial de cartilagem (HAM, 1930 apud. BASSET, 1962). Nossos resultados mostram que, embora uma grande quantidade de tecido ósseo e periósteo tenham sido removidos, levando obviamente a uma redução na vascularização, não foi observada formação de grande quantidade de cartilagem na área de fratura.

HAM & CORMACK (1983), estabelecem que a quantidade de cartilagem formada no calo de fratura depende diretamente da velocidade de proliferação celular. Se esta proliferação é muito rápida, não existe formação de capilares sangüíneos de forma proporcional e, assim, ocorre a formação de um calo cartilaginoso.

Além do suprimento sangüíneo, vários outros fatores também poderiam interferir no processo de formação de cartilagem. Dentre eles destacam-se a movimentação dos cotos da fratura e a pressão exercida na região (NAJJAR & KAHN, 1977). Como a fíbula de rato está fixada na tíbia, tem-se que toda força que é direcionada aos membros posteriores do animal, recaem sobre este osso, deixando

a fibula praticamente isenta das forças de pressão que aparecem na região. Esta diminuição de forças, de acordo com os referidos autores, podem levar a uma diminuição na formação de cartilagem no defeito ósseo.

Vários estudos têm demonstrado que a fosfatase alcalina é uma enzima relacionada com o metabolismo do tecido ósseo, participando do seu processo de mineralização. Conseqüentemente, qualquer condição de perda de substância óssea, como em uma fratura, a quantidade de fosfatase alcalina presente no sangue e no local injuriado encontra-se elevada (JAFJE, 1976; CYBORON & WUTHIER, 1981; WLODARSKI & REDDI, 1986; YOSHIKAWA et al., 1992). Em nosso experimento, foi observado que no grupo de animais sacrificados 14 dias após a cirurgia, os valores obtidos para a enzima foram mais elevados quando foram comparados com os valores de referência. Estes valores acima do intervalo de referência são esperados nas fases iniciais do trauma pois é o período em que a participação da enzima torna-se mais necessária no processo de consolidação de fratura. Quando se comparou os animais sacrificados 14 e 28 dias após a cirurgia, observou-se que no grupo I (membrana de colágeno associada ao EEP 10%), os valores para a fosfatase alcalina foram mais elevados nos animais sacrificados 14 dias após a fratura. Nos grupos II (membrana de colágeno associada a etanol 80%) e III (membrana de colágeno associada à solução fisiológica) esta diferença não foi observada. Isto pode ser atribuído à presença do EEP 10 % nos animais do grupo I, estimulando, de alguma forma, uma elevação significativa na concentração da fosfatase alcalina nas fases iniciais do processo de consolidação.

É pretensão a realização de novos trabalhos com a finalidade de observar-se os efeitos do extrato etanólico de própolis no processo de reparo ósseo, alterando-se o tamanho e a forma dos defeitos ósseos e a forma de administração da própolis.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho, cujo objetivo foi testar o efeito barreira de uma membrana de colágeno associada a extrato etanólico de própolis a 10 % em defeitos ósseos criados em fíbulas de ratos, de acordo com a metodologia aplicada, nos permite concluir que:

- 1- A membrana de colágeno da marca "profile" foi eficiente em prevenir a entrada de tecidos moles circunjacentes ao defeito ósseo criado, quando associada ao EEP 10 %.
- 2- A associação da membrana de colágeno com etanol a 80 %, não teve eficiência em impedir a invasão de tecido muscular para o interior do defeito ósseo.
- 3- Quando se associou a membrana à solução fisiológica, os resultados foram bastante favoráveis, impedindo a entrada de tecido muscular na região da fratura.
- 4- A associação de EEP a 10 % não ocasionou alterações na taxa de regeneração do osso, comparando-se associações com etanol 80 % e solução fisiológica.
- 5- A implantação da membrana de colágeno parece modificar o mecanismo de produção do osso, não havendo a formação de um calo de cartilagem, como era de se esperar na regeneração de um osso longo.
- 6- A implantação de membranas de colágeno em defeitos criados em fíbulas de ratos parece ocasionar em um atraso no processo de consolidação da fratura.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AABOE, M.; PINHOLT, E.M.; HJØRTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **Br. J. oral Maxillofac. Surg.**, 33:312-318, 1995.

ALBERIUS, P.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Role of Osteopromotion in Experimental Bone Grafting to the Skull: A Study in Adult Rats Using a Membrane Technique. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 50:829-834, 1992.

AXHAUSEN, W. The osteogenetic Phases of Regeneration of Bone. A Histological and Experimental Study. **J. Bone Joint Surg.**, 38-A(3):593-600, jun., 1956.

BAHRAMI, S.; PLATE, J.; DREIER, R.; DUCHESNE, A.; WILLIAN, G-H.; BRUCKNER, P. Endochondral Ossification of Costal Cartilage is Arrested after Chondrocytes Have Reached Hypertrophic Stage of Late Differentiation. **Matrix Biology**, 19:707-715, 2001.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L.; A study on flavonoids of propolis. **Journal of Natural Products**. 46(4): 471-474, 1983.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. **J. Nat. Prod.**, 61:896-900, 1998.

BASSET, C.A.L. Currents concepts of bone formation. **J. Bone Jt. Surg.**, 44 A: 1217-1244, 1962.

BASSET, C.A.L. & HERRMANN, I. Influence of Oxygen Concentration and Mechanical Factors on Differentiation of Connective Tissues in vitro. **Nature**, 190: 460-461, 1961.

BECKER, J.; NEUKAM, F.W.; SCHLIEPHAKA, H. Restoration of the Lateral Sinus Waal Using a Collagen Type I Membrane for Guided Tissue Regeneration. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, 21: 243-246, 1992.

BECMEUR, F.; GEISS, S.; LAUSTRIAT, S.; BIENTZ, J.; MARCELLIN, L.; SAUVAGE, P. History of Teflon. **Eur. Urol.**, 17: 299-300, 1990.

BEEL, R.& BEIRNE, R. Effect of Hydroxylapatite, Tricalcium Phosphate and Collagen on the Healing of Defects in the Rat Mandible. **J Oral Maxillofac. Surg.**, 46:589-594, 1988.

BERNARD, G.W. Healing and Repair of Osseus Defects. **Dental Clinics of North America**, 35 (3):469-477, Jul., 1991.

BLUMENTHAL, N.M. The Use of Collagen Membranes to Guided Regeneration of New Connective Tissue Attachment in Dogs. **J. Periodontol.**, 59 (12):830-836, Dec., 1988.

BRIGHTON, C.T. Principles of Fracture Healing. Part I. The Biology of Fracture Repair. **Instr. Course Lect.**, 32:60, 1984.

BULCHOLZ, R.W.; CARLTON, A.; HOLMES, R.E. Hidroxyapatite and Tricalcium Phosphate Bone Graft Substitutes. **Orthop. Clin. North. Am.**, 18: 323, 1987.

BUNYARATAVEJ, P. & WANG, H.L. Collagen Membrane: a Review. **J. Periodontol.**, 72 (2): 215-229, Feb., 2001.

BURDOCK, G.A.; Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, 36: 347-363, 1998.

BURSTEIN, F.D. & CANALIS, R.F. Studies on the Osteogenic Potential of Vascularized Periosteum: Behavior of Periosteal Flaps Transferred Onto Soft Tissues. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, 93 (6): 731-735, 1985.

CAIAZZA, S.; COLANGELO, P.; BEDINI, R.; FORMISANO, G.; DEANGELIS, G.; BARRUCCI, S. Evaluation of Guided Bone Regeneration in Rabbit Femur Using Collagen Membranes. **Implant. Dent.**, 9 (3): 219-225, 2000.

CHAKKALAKAL, D.A.; STRATES, B.S.; MASHOOF, A.A.; GARVIN, K.L.; NOVAK, J.R.; FRITZ, E.D.; MOLLNER, T.J.; MCGUIRE, M.H. Repair of Segmental Bone Defects in the Rat: An Experimental Model of Human Fracture Healing. **Bone**, 25(3): 321-332, 1999.

CHASE, S.W. & HERNDON, C.H. The Fate of Autogenous and Homogenous bone grafts. A Historical Review. **J. Bone Jt. Surg.**, 37 A(4): 809-841, 1955.

COHEN, J. & LACROIX, P. Bone and cartilage Formation by Periosteum. Assay of Experimental Autogenous Grafts. **J. Bone Joint Surg.**, 37-A(4): 717-730, 1955.

CONN, J.; OYASU, R.; WELSH, H.; BEAL, J.M. Vicryl® (Polyglactin 910) Synthetic Absorbable Sutures. **Am. J. Surg.**, 128: 19-23, 1974.

- CORNELL, C.N. & LANE, J.M. Newest Factors in Fracture Healing. **Clin. Orthop.**, 277:297-311, 1992.
- CYBORON, G.W. & WUTHIER, R.E. Purification and Initial Characterization of intrinsic Membrane bound Alkaline Phosphatase from Chicken Epiphyseal Cartilage. **J. Biol. Chem.**, 256(14): 7262-7268, 1981.
- DAVIS, J.S. & HUNNICUTT, J.A. The Osteogenic Power of Periosteum: With a Note on Bone Transplantation. An Experimental Study. **Ann. Surg.**, 61:672-685, 1915.
- DELBALSO, A.M. & ADRIAN, J.C. Collagen Gel in Osseous Defects. A Preliminary Study. **Oral Surgery**, 42 (5):563-569, Nov., 1976.
- DEPORTER, D.A.; KOMORI, N.; HOWLEY, T.P.; SHIGA, A.; GHENT, A.; HANSEL, P.; PARISIEN, K. Reconstituted Bovine Skin Collagen Enhances Healing of Bone Wounds In He Rat Calvaria. **Calcif. Tissue Int.**, 42:321-325, 1988.
- DEREN, J.A.; KAPLAN, F.S.; BRIGHTON, C.T. Alkaline Phosphatase Production by Periostal Cells Ati Various Oxygen Tensions "in vitro". **Clin. Orthop.**, 252:307-312, 1990.
- DOBROWOLSKI, J.W.; JOHORA, S.B.; SHARMA, K.; SHAH, S.A.; NAQUI, S.A.H.; DANDIVA, P.C. Antibacterial, Antifungal, Antiamoebic, Antiinflammatory and Antipyreti Studies on Propolis Bee Products. **J. Ethnopharmacology**, 35:77-82, 1991.

DUPOIRIEUX, L.; POURQUIER, D.; PICOT, M.C.; NEVES, M. Comparative Study of Three Different membranes for Guided Bone Regeneration of Rat Cranial Defects. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, 30:58-62, 2001.

ELVES, M.W.; BAVLEY, I.; ROYLANCE, P.J. The Effect of Indomethacin upon experimental Fractures in the Rat. **Acta Orthop. Scand.**, 53:35-41, 1982.

FIGUEREDO, C.M.S. & FISCHER, R.G. Utilização de Membrana Reabsorvível de Colágeno no Tratamento de Defeitos Ósseos Angulares. Um Estudo em Cães Beagles. **Rev. Periodont.**, 7 (3):140-145, Set./Dez., 1998.

FLEISCHER, N.; DEWALL, H.; BLOOM, A. Regeneration of Lost Attachment Apparatus in the Dog Using Vicryl Absorbable Mesh (Polyglactin 910)®. **Int. J. Periodontics Rest. Dent.**, 2: 45-55, 1988.

GALGUT, P.; PITROLA, R.; WAITE, T.; DOYLE, C.; SMITH, R. Histological Evaluation of Bio-Degradable and Non-Degradable Membranes Placed Transcutaneously in Rats. **J. Clin. Periodontol.**, 18:581-586, 1991.

GONGLOFF, R.K.; WHITLOW, W.; MONTGOMERY, C.K. Use of Collagen Tubes for Implantation of Hydroxylapatite: An Experimental Study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 43:570-573, 1985.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The Composition and Plant Origins of Propolis: A Report of Work of Oxford. **Bee World**, 71:107-118, 1990.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a Review. **Bee World** 60(2):59-84,1979.

- HAM, A.W. & CORMACK, D.H. **Histologia**. 8 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983, p. 355-433.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.** 32:1141-1148, 1983.
- HUANG, H.F. & YOU, J.S. The Use of Chinese Herbal Medicine on Experimental Fracture Healing. **Am. J. Chin. Med.**, 25 (3-4):351-356, 1997.
- HULT, A. Current Concepts of Fracture Healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, 249:265-284, dec., 1989.
- HURLEY, L.A.; STINCHFIELD, F.E.; BASSET, A.L.; LYON, W.H. The Role of Soft Tissues in Osteogenesis. An Experimental of Canine Spine Fusions. **J. Bone Joint Surg.** 41-A(7):1243-1254, Oct, 1959.
- HYDER, P.R.; DOWELL, P.; SINGH, G.; DOLBY, A.E. Freeze-dried, Cross-Linked Bovine Type I Collagen: Analysis of Properties. **J. Periodontol.** 63 (3): 182-186, march, 1992.
- ISLA, M.I.; MORENO, M.I.N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Antioxidant Activity of Argentine Propolis Extracts. **J. Ethnopharm.**, 76:165-170, 2001.
- ITO, K.; NANBA, K.; MURAI, S. Effects of Bioabsorbable an Non-Resorbable Barrier Membranes of Bone Augmentation In Rabbit Calvaria. **J. Periodontol.** 69 (11):1229-1237, nov., 1998.

IVANOVSKA, N.D.; DINOV, V.B.; BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S. Immunomodulatory Action of Propolis. Influence of Water soluble Derivative on Complement Activity in vivo. **J. Ethnopharm.**, 47:145-147, 1995.

JAFFE, N.R. Alkaline Phosphatase Activity Characterization and Subcellular Distribution During Initial Skeletogenesis in the Prenatal Rat Limb. **Calcif. Tissue Int.** 50:184-188, 1976.

JAFFE, N.R.& JONHSON, E.M. Alterations in the Ontogeny and Specific activity of Phosphomonoestearases associated with Abnormal Chondrogenesis and Osteogenesis in the Limb of Fetuses from Folic Acid Deficient Pregnant Rats. **Teratology**, 8:33-50, 1973.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica.**, 9 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 122-124, 1999.

KING, K.F. Periosteal Pedicle Grafting in Dogs. **J. Bone Joint Surg.**, 58 B (1): 117-121, 1976.

KOO, M.H. & PARK, Y.K. Investigation of Flavonoid Aglycones in Propolis Collected by Two Different Varieties of Bees in the Same Region. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 61 (2): 367-369, 1997.

KYRIAKIDIS, S.M.; SOTIROVDIS, T.G.; EVANGELOPOULOS, A.E. Interaction of Flavonoids With Rabbit Muscle Phosphorylase Kinase. **Biochemica Biophys. Acta**, 871:121-129, 1986.

LAURELL, L.; FALK, H.; FORNELL, J.; JOHARD, G.; GOTTLOW, J. Clinical Use of a Bioresorbable Matrix Barrier In Guided Tissue Regeneration Therapy. Case Series. **J. Periodontol.**, 65:967-975, 1994.

LERICHE, R. & POLICARD, A. Some Fundamental Principles in the Patology of Bone. **Sur. Gynec. Obstet.**, 43:308, 1926.

LINDE, A.; THORÉN, C.; DAHLIN, C.; SANDBERG, E. Creation of New Bone by an Osteopromotive Membrane technique: An Experimental Study in Rats. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 51:892-897, 1993.

LUNDGREN, A.K.; SENNERBY, L.; LUNDGREN, D. Guided Jaw Bone Regeneration Using Experimental Rabbit Model. **Int. J. oral Maxillofac. Surg.**, 27:135-140, 1998.

MACEWEN, W. **The Growth of Bone.** Observations on Osteogenesis. The Experimental Inquiry into the Development and Reproduction of Diaphyseal Bone. Glasgow, James McLehose and Sons, 1912, apud BASSET, C.A.L.

MAGRO-FILHO, O.; PERRI DE CARVALHO, A.C.; MARTINS, A.L.; PELUCIO, P.R. Reações do Tecido Conjuntivo à Pomada de Confrei, Própolis e Mel. Estudo Histológico em Ratos. **Rev. Bras. Odontol.**, 44 (5):45-48, Set./Out., 1987.

MAGRO-FILHO, O & CARVALHO, A.C.P. Application of Propolis to Dental Sockets and Skin Wounds. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, 32:4-13, 1990.

MAGRO-FILHO, O. & CARVALHO, A.C.P. Topical Effect of Propolis in the Repair of Sulcoplasties by the Modified Kazanjian Technique Cytological and Clinical Evaluation. **J. Nihon. Univ. Sch. Dent.**, 36 (2):102-11, 1994.

MAO, C.; SATO, J.; MATSUURA, M.; SETO, K. Guided Tissue Regeneration Around Dental Implants in Immediate Extraction Sockets: Comparison of Resorbable and nonresorbable membranes. **Chin. Med. Sci. J.**, 12 (3): 170-174, Sep., 1997.

MARCUCCI, M.C. Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. **Apidologie**, 26:83-99, 1995.

MARKS, S.C. & POPOFF, S.N. Bone Cell Biology - The Regulation of Development, Structure, and Function in the Skeleton. **Am. J. Anat.**, 183 (1): 1-44 sep., 1988.

MATTSON, J.S.; GALLAGHER, S.J.; JABRO, M.H. The Use of 2 Bioabsorbable Barrier Membranes in the Treatment of Interproximal Intrabony Periodontal Defects. **J. Periodontol.**, 70 (5):510-517, may, 1999.

MAURER, P.K. & MCDONALDS, J.V. Vicryl® (Polyglactin 910) Mesh as a Dural Substitute. **J. Neurosurg.**, 63:448-452, 1985.

McKIBBIN, B. The Biology of Fracture Healing in Long Bones. **J. Bone Joint Surg.**, 60-B:156-172, 1978.

MILLER, N.; PLENAUD, J.; FOLIGUET, B.; MEMBRE, H.; AMBROSINI, P.; PLOMBAS, M. Resorption Rates of 2 Commercially Available Bioresorbable

- Membranes. A Histomorphometric Study in a Rabbit Model. **J. Clin. Periodontol.**, 23:1051-1059, 1996.
- MILLER, S.C. & MARKS, S.C. Effects of Prostaglandins on the Skeleton. **Clin. Plast. Surg.**, 21(3): 393-400, jul, 1994.
- MINABE, M. A Critical Review of The Biologic Rationale for Guided Tissue Regeneration. **J. Periodontol.**, 62:171-179, 1991.
- MIRZOEVA, O.K. & CALDER, P.C. The Effect of Propolis and Its Components on Eiconasoid Production Duringthe Inflammatory Response. **Prostaglandins Lewkotrienes and Essential Fatty Acids**, 55 (6):441-449, 1996.
- MOCK, H.E. Periosteal Transplants in the Repair of Delayed Union, Ununited Fractures, and Loss of Bone Substance. **Surg. Gynecol. Obstet.**, 46: 641-657, 1928.
- MUNDY, G.R.; BOYCE, B.; HUGHES, D.; WRIGHT, K.; BONEWALD, L.;DALLAS, S.; HARRIS, S.; GHOSH-CHOUDHURY, N.; CHEN,D.; DUNSTAN, C.; IZBICKA, E.; YONEDA, T. The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. **Bone**, 17 (2): 718-758 aug., 1995.
- MURRAY, G. HOLDE, R.; ROSCHLAU, W. Experimental and Clinical Study of New Growth of Bone in a Cavity. **Am. J. Surg.**, 93: 385-387, 1957.
- NAJJAR, T.A. & KAHN, D. Comparative Study of Healing and Remodeling in Various Bones. **J. Oral Surg.**, 35:375-379, May, 1977.

NOBLE, B.S. & REEVE, J. Osteocyte Function, Osteocyte Death and Bone Fracture Resistance. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 159:7-13, 2000.

NORRIDIN, R.W. & SHU SHIH, M. Systemic Effects of Prostaglandin E2 on Vertebral Remodeling in Beagles Used in a Healing Study. **Calcif. Tissue Int.**, 42: 363, 1988.

NYQUIST, F.; HALVORSEN, V.; MADSEN, J.E.; NORDSLETTEN, L.; OBRANT, K.J. Ethanol and its Effects on Fracture Healing and Bone Mass in Male Rats. **Acta Orthop. Scand.**, 70(2):212-216, 1999.

OWEN, M. The Origin of Bone Cells. **International Review of Cytology**, 28:213-238, 1970.

OWENS, K.W. & YUKNA, R.A. Collagen Membrane Resorption in Dogs: a Comparative Study. **Implant Dent.**, 10 (1): 49-58, 2001.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J.L. Comparison of the Flavonoid Aglycone Contents of *Apis mellifera* Propolis from Various Regions of Brazil. **Arq. Biol. Tecnol.**, 40 (1):97-106, Mar., 1997.

PARK, Y.K.; KOO, H.K.; SATO, H.H.; CONTADO, J.L. Estudo de Alguns Componentes da Própolis Coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arq. Biol. Tecnol.**, 38 (4):1253-1259, Dez., 1995.

PARODI, R.; CARUSI, G.; SANTARELLI, G.; NANNI, F.; PINGITORE, R.; BRUNEL, G. Guided Tissue Regeneration Employing a Collagen Membrane in a

- Human Periodontal Bone Defect: A Histologic Evaluation. **Int. J. Periodontics Rest. Dent.** 17(3):283-291, 1997.
- PIATTELLI, A.; SCARANO, A. RUSSO, P.; MATARASSO, S. Evaluation of Guided Bone Regeneration in Rabbit Tibia Using Bioresorbable and Non-Resorbable Membranes. **Biomaterials**, 17:791-796, 1996.
- PRITCHARD, J.J. Bone Healing. **The Scientific of Medicine Annual Reviews**, p. 286-301, 1963.
- ROBISON, R. The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. **Biochem. J.**, 17:286-293, 1923.
- SANDBERG, E.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Bone Regeneration by the Osteopromotion Technique Using Bioabsorbable Membranes: An Experimental Study in Rats. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 51: 1106-1114, 1993.
- SANDBERG, M.; ARO, H.; MULTIMÄKI, P.; AHO, H.; VUORIO, E. In Situ Localization of Collagen Production by Chondrocytes and Oteoblasts in fracture Callus. **J. Bone Joint Surg.**, 71-A (1): 69-77, Jan. 1989.
- SANT'ANNA, M.F. Capacidade Osteogênica de Enxertos Periostais Livres. Estudo Experimental em Ratos. **Tese apresentada a Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.** Botucatu, São Paulo 1997.
- SATOH, T.; TSUCHIYA, M.; HARI, K. A Vascularized Iliac Musculo-Periosteal Free Flap Transfer: A Case Report. **Br. J. Plast. Surg.**, 36:109-112, 1983.

SCHELLER, S.; STOJKO, A.; SZWARNOWIECKA, I.; TUSTANOWSKI, J.; OBUSKO, Z. Biological Properties and Clinical Application of Propolis. Investigation of the Influence of Ethanol Extracts of Propolis (EEP) on Cartilagenous Tissue Regeneration. **Arzneim.-Forsch. Drug Res.**, 27 II (11):2138-2140, 1977.

SCHELLER, S.; NOLEWAJKA, E.; PANASIEWICZ, M.; DZIEKANOWSKA, D.; TUSTANOWSKI, J.; STOJKO, A. Biological Properties and Clinical Application of Propolis. The Action of Ethanol Extract of Propolis (EEP) on Cells Cultured "in vitro". **Arzneim.-Forsch. Drug Res.** 27 II (8): 1547-1549, 1977.

SCHELLER, S.; SZAFIARSKI, J.; TUSTANOWSKI, J.; NOLEWAJKA, E.; STOJKO, A. Biological Properties and Clinical Application of Propolis. Some Physico-Chemical Properties of Propolis. **Arzneim.-Forsch. Drug Res.**, 27 I (4): 889-890, 1977.

SCHELLER, S.; ILEWICZ, L.; LUCIAK, M.; SKROBIDURSKA, D.; STOJKO, A. ; MATUGA, W. Biological Properties and Clinical Application of Propolis. Experimental Observation on the Influence of Ethanol Extract of Propolis (EEP) on Dental Pulp Regeneration. **Arzneim.-Forsch. Drug Res.**, 28 I (2): 289-291, 1978.

SCHLEGEL, A.K.; MÖHLER, H.; BUSCH, F., MEHL, A. Preclinical and Clinical Studies of a Collagen Membrane (Bio-Gide®). **Biomaterials**, 18:535-538, 1997.

STEIN, M.D.; SALKIN, L.M.; FREEDMAN, A.L.; GLUSHKOT, J. Collagen Sponje as a Topical Hemostatic Agent in Mucogingival Surgery. **J. Periodontol.** 56 (1): 35-38, Jan., 1985.

STOJKO, A.; SCHELLER, S.; SZWARNOWIECKA, I.; TUSTANOWSKI, J.; OSTACH, H.; OBUSKO, Z. Biological Properties and Clinical Application of Propolis. Experimental Observation on the Influence of Ethanol Extract of Propolis (EEP) on the Regeneration of Bone Tissue. **Arzneim.-Forsch. Drug Res.**, 28 I (1):35-37, 1978.

STRATES, B.S.; FIRSCHEIN, H.E.; URIST, M.R. Alkaline Phosphatase and Failure of Calcification Under the Influence of Diphosphanate. **Biochem. Biophys. Acta**, 244:121-124, 1971.

TAKATO, T.; HARI, K.; NAKATSUKA, T. Osteogenic Capacity of Vascularized Periosteum: Experimental Study Using Rib Periosteum in Rabbits. **Br. J. Plast. Surg.**, 41: 528-532, 1986.

TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Isolation and Identification of Compounds From Brazilian Propolis Which Enhance Macrophage Spreading and Mobility. **Biol. Pharm. Bull.**, 19 (7):966-970, 1996.

TRUETA, J. The Role of Vessels in Osteogenesis. **J. Bone Joint Surg.**, 43B (1): 402-418, 1963.

VIALLE-PRESLES, M.J.; HARTMANN, D.J.; FRANC, S.; HERBAGE, D. Immunohistochemical Study of the Biological Fate of a Subcutaneous Bovine Collagen Implant in Rat. **Histochemistry**, 91:177-184, 1989.

VOLPERT, R. & ELSTNER, E.F. Interactions of Different Extracts of Propolis With Leukocytes and Leukocyte Enzymes. **Arzneim.-Forsch. Drug Res.**, 46 I(1):47-51, 1996.

WLODARSKI, K.H. & REDDI, A.H. Alkaline Phosphatase as a Marker of Osteoinductive Cells. **Calif. Tissue Int.**, 39:382-385, 1986.

YOUNG, R.W. Cell Proliferation and Specialization During Endochondral Osteogenesis in Young Rats. **J. Cell Biol.**, 14: 357-370, 1962.

YOSHIKAWA, T.; OHGUSHI, H.; OKUMURA, M.; TAMAI, S.; DOHI, Y., MORIYAMA, T. Biochemical and Histological Sequences of Membranous Ossification in Ectopic Sites. **Calcif Tissue Int.**, 50:184-188, 1992.

ZAHEDI, S.; LEGRAND, R.; BRUNEL, G.; ALBERT, A., DEWÉ, W.; COUMANS, B.; BERNARD, J.P. Evaluation of a Diphenylphosphorylazide – Crosslinked Collagen Membrane for Guided Bone Regeneration in Mandibular Defects in Rats. **J. Periodontol.**, 69:1238-1246, 1998.