



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Caio Rodrigo Pacheco Lopes

Orientador(a): Prof^o Dr^o José Ricardo de Albergaria Barbosa

Ano de Conclusão do Curso: 2004



TCC 152

Caio Rodrigo Pacheco Lopes

***ANÁLISE HISTOLÓGICA DA EFETIVIDADE DAS
MEMBRANAS DE COLÁGENO E DE MAMONA
NO TRATAMENTO DE DEFITOS ÓSSEOS EM
TÍBIAS DE RATO***

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião – Dentista.

Orientador: Prof^o Dr^o José Ricardo de Albergaria Barbosa

Piracicaba

2004

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA**

SUMÁRIO

<i>Resumo</i>	01
1. <i>Introdução</i>	02
2. <i>Objetivo</i>	11
3. <i>Materiais e Métodos</i>	11
<i>Animais e Anestesia</i>	
<i>Membranas</i>	
<i>Membrana reabsorvível de colágeno</i>	
<i>Membrana reabsorvível de mamona</i>	
<i>Procedimento Cirúrgico</i>	
<i>Método Histológico</i>	
<i>Análise Histológica</i>	
4. <i>Resultados</i>	15
<i>Período de 07 dias pós-operatório</i>	
<i>Grupo de controle</i>	
<i>Grupo</i>	
5. <i>Discussão</i>	22
6. <i>Conclusões</i>	28
7. <i>Referências Bibliográficas</i>	29

ANÁLISE HISTOLÓGICA DA EFETIVIDADE DAS MEMBRANAS DE COLÁGENO E DE MAMONA NO TRATAMENTO DE DEFITOS ÓSSEOS EM TÍBIAS DE RATO

Caio Rodrigo Pacheco Lopes

Prof^o Dr^o José Ricardo de Albergaria Barbosa (Orientador)

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo analisar comparativamente a ação de dois tipos de membranas reabsorvíveis (colágeno e polímero de mamona) sobre o processo de reparo ósseo em tíbias de ratos, que serão sedados e anestesiados para confecção de defeitos ósseos em suas tíbias sendo a tíbia esquerda grupo experimental (colágeno e polímero de mamona) e a tíbia direita o grupo controle sendo cada animal o seu próprio controle. Visto que a regeneração tecidual guiada (R.T.G.) vem sendo pesquisada por vários autores e, que tem demonstrado uma boa resposta biológica das membranas reabsorvíveis. A membrana de colágeno tem demonstrado bons resultados e a membrana de mamona ainda está sendo pesquisada. Histologicamente tanto o grupo controle quanto os experimentais apresentaram um aumento na neoformação óssea ao longo do tempo.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo possui alta capacidade de reparação espontânea quando lesionado, repondo, depois de um breve intervalo de tempo, toda a porção perdida (TAGA et al., 1997). No entanto, em alguns casos de defeitos ósseos, às vezes extensos, que não têm a capacidade de repararem-se espontaneamente, há a necessidade dos profissionais utilizarem diversas técnicas cirúrgicas na tentativa de reparação da deficiência (RESTREPO et al., 1998).

Os defeitos ósseos, normalmente, são resultantes de traumatismos, infecções, tumores e outras patologias, ou mesmo pela perda precoce dos elementos dentários (FIORELLINI & NEVINS, 1996). Estas deficiências ósseas sempre se constituíram em problemas de difícil solução em cirurgia buco-maxilo-facial (FIORELLI & NEVINS, 1996; SIGURDSSON et al., 1996; TAGA et al., 1997; RESTREPO et al.³¹, 1998).

Atualmente não existe um material ideal, pois ossos autógeno, liofilizado e desmineralizado e os biomateriais apresentam vantagens e desvantagens.

Os enxertos ósseos aparecem como a primeira opção para a maioria dos casos, qualquer que seja o tipo, autógeno ou homogêneo. Os autógenos têm as desvantagens de sua fonte não ser inesgotável e sua obtenção exigir uma abordagem cirúrgica da zona doadora, com todos os riscos inerentes a uma cirurgia, tais como: perda excessiva de sangue, pneumotórax, infecção

da ferida, dor, parestesia, cicatrizes e dificuldades de movimentação (YAMAMOTO et al., 1993).

Já os bancos de ossos homogêneos são disponíveis apenas nos grandes centros. Além do que as técnicas especializadas de preparo, usualmente requerem equipamentos, operações e manutenção complexos, nem sempre ao alcance da maioria dos cirurgiões (IGNÁCIO et al., 1996).

Apesar das dificuldades de obtenção e manipulação, os enxertos ósseos são rotineiramente utilizados para restaurar defeitos ósseos. Entretanto, um problema comum, porém bastante significativo, que é a perda progressiva do volume do enxerto devido à reabsorção, tem provocado reparações ósseas deficientes destes defeitos. A origem embriológica do tecido ósseo parece exercer um papel decisivo no grau de sucesso do enxerto. ALBERIUS, DAHLIN & LINDE (1992) analisaram o potencial da associação de membranas a enxertos ósseos endocondral e membranoso, em defeitos preparados em mandíbulas de ratos e, enxerto ósseo membranoso em calvária. Os resultados foram analisados macroscópica e histologicamente após o período pós-operatório de 12 semanas. As membranas possibilitaram deposição óssea em todos os defeitos. O osso intramembranoso incorporou-se as margens dos defeitos e, o enxerto endocondral apresentou-se coberto por uma fina cápsula de tecido conjuntivo. Os enxertos geralmente reabsorvem substancialmente, mas os enxertos cobertos com a membrana apresentaram-se mais ativos e exibindo uma menor perda do volume. Os resultados desse trabalho confirmaram o

efeito osteopromotor da técnica da membrana, ao mesmo tempo em que a qualidade de osso necessária pode ser reduzida usando este método.

Em 1976, MELCHER observou que os insucessos nos tratamentos de defeitos ósseos, ocasionados por doença periodontal, poderiam ser devidos a invasão dos defeitos por tecidos com pequeno potencial de regeneração.

GOTTLOW et al. (1986) verificaram que as células provenientes do ligamento periodontal têm potencial para formar nova inserção, caso seja dado a essas células a oportunidade de povoar a ferida cirúrgica antes da penetração do tecido epitelial, protegendo o primeiro através de uma barreira mecânica.

A partir de então, uma série de experimentos passou a ser feitos, estudando a possibilidade da aplicação do princípio da regeneração tecidual guiada sobre a regeneração óssea.

Na última década, muitos trabalhos foram realizados com a finalidade de excluir células teciduais não desejáveis da ferida cirúrgica, através da utilização de uma barreira mecânica. Este princípio biológico foi desenvolvido para regenerar tecidos periodontais destruídos por processos inflamatórios, e foi designada "regeneração tecidual guiada" (R.T.G.). Ele baseia-se na hipótese de que as membranas biológicas impedem a participação das células do epitélio bucal e do tecido conjuntivo na cicatrização da ferida, deixando que as células do ligamento periodontal tenham prioridade.

O primeiro relato ocorreu em 1956, quando CAMPBELL e BASSET utilizaram clinicamente filtros de acetato de celulose para propiciar a

regeneração de nervos e tendões. No ano seguinte, MURRAY, HOLDEN & ROSCHLAU (1957) observaram neoformação óssea em cavidades onde o coágulo sangüíneo foi protegido por um material plástico. Essa formação óssea se deu cerca de seis milímetros acima do nível do tecido ósseo circundante.

HURLEY et al (1959) também demonstraram o uso de filtros de acetato de celulose na fusão de vértebras de animais. Estes filtros propiciaram a reparação óssea através da exclusão de células do tecido conjuntivo do defeito cirúrgico.

Em 1964, BOYNE publicou um artigo sobre a implantação de filtros de celulose em defeitos cirúrgicos criados pela exodontia dos dentes anteriores da maxila e mandíbula de doze cães. A avaliação histológica demonstrou que os defeitos cirúrgicos foram completamente preenchidos por osso neoformado, proporcionando completa regeneração da cortical vestibular. Os defeitos controle exibiram uma reparação óssea menor quando comparados com os defeitos protegidos pelas membranas.

Para PONTORIERO et al. (1988) e LEKOVIC et al. (1989) as membranas não reabsorvíveis de politetraflouroetileno expandido (PTFE-e) proporcionam vantagens clínicas significantes no tratamento de defeitos ósseos quando comparadas ao tratamento convencional. Entretanto, quando membranas não reabsorvíveis são utilizadas, há a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para a sua remoção, o que limita a praticidade de seu uso na rotina clínica.

DAHLIN et al (1988) realizaram um trabalho, onde foram confeccionados bilateralmente, defeitos ósseos circulares de aproximadamente cinco milímetros de diâmetro na região de ramo mandibular de 30 ratos. De um lado os defeitos foram cobertos, tanto por vestibular como por lingual, com a membrana de politetrafluoroetileno (GORE-tex^{® 01}). Do lado contra lateral, os defeitos testes foram protegidos somente pelo retalho. Macroscopicamente, os defeitos teste demonstraram preenchimento ósseo. Na análise histológica metade dos defeitos exibiu reparação óssea completa após tre semanas, enquanto que outra metade só apresentou reparação tecidual depois de seis semanas. Não foi observado neoformação óssea nos defeitos controle, mesmo após o período máximo de observação. Encontrou-se presença de tecido mole no interior dos defeitos, o que provavelmente inibiu a proliferação de células osteogênicas.

Novamente, DAHLIN et al. (1990) prepararam defeitos transósseos na região cortical de incisivos laterais superiores em seis macacos. Do lado teste, os defeitos foram cobertos, tanto por vestibular como por palatino, com uma membrana de politetrafluoroetileno expandido (PTFE-e) e, do outro lado nenhuma membrana foi colocada. A análise histológica realizada três meses depois revelou que os defeitos protegidos com a membrana apresentaram reparação óssea quase completa. Já no lado controle nenhum defeito tinha sido preenchido por osso, exibindo uma grande quantidade de tecido fibroso.

Em 1992, HÄMMERLE et al. Produziram defeitos ósseos em calvária de coelhos para avaliar o efeito da membrana na regeneração óssea. De um

⁰¹ W.L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ, USA

lado os defeitos testes foram cobertos com uma membrana de politetrafluoroetileno expandido (PTFE-e), e os defeitos controle recobertos apenas com o retalho mucoperiosteal. Após o período de 12 semanas, verificou-se que radiograficamente os defeitos testes apresentaram maior radiopacidade, enquanto que as áreas correspondentes aos defeitos controles exibiram radiolucidez. Os resultados histológicos mostraram a formação de uma camada de tecido ósseo nos defeitos testes. Nos defeitos controles, a neoformação óssea esteve restrita às margens e o restante foi preenchido com tecido conjuntivo denso.

PINEDA et al. (1996) tentaram estabelecer se o tamanho dos poros das membranas exercia alguma influência na formação óssea de defeitos contínuos. Membranas de ácido polilático com poros de vários tamanhos, microporos, poros de tamanho médio (10-20um), foram implantadas para cobrir defeitos ósseos de 10 mm de extensão. Radiografias pós-operatórias revelaram a formação de um hematoma dentro do defeito ósseo. Após duas semanas, o hematoma tinha sido reabsorvido e uma neoformação óssea pode ser observada. Em quatro semanas, o osso neoformado crescia centriptamente das extremidades dos fragmentos. A regeneração óssea ocorreu na maioria dos casos independentemente do tamanho do poro da membrana. Entretanto, houve algumas diferenças na intensidade do processo de regeneração, com formação óssea mais intensa nos defeitos cobertos com as membranas de microporos.

Após o surgimento da regeneração tecidual guiada (R.T.G), as barreiras não reabsorvíveis foram inicialmente utilizadas, no entanto, como

estas necessitam de um procedimento cirúrgico subsequente de 4 a 6 semanas para sua remoção, surgiram investigações para se estudar a eficácia de membranas reabsorvíveis. Estas, por não necessitarem de um posterior procedimento de reentrada cirúrgica, representam um benefício para o paciente, além de eliminar um possível trauma sobre os tecidos localizados na área de reparação, que pode ocorrer no ato da remoção da barreira, o que poderia perturbar o processo de regeneração (REYNOLDS & BROWERS, 1996).

LUNDGREN et al. (1992) testaram se uma membrana biodegradável poderia ser utilizada na reparação de defeitos ósseos em calvárias de coelhos, aplicado o princípio da regeneração tecidual guiada (R.T.G.). em cada um dos animais foram confeccionados dois defeitos circulares de oito milímetros de diâmetro no meio dos ossos frontal e parietal. No animal 1, um dos defeitos foi coberto somente com retalho mucoperiosteal, sem a colocação da membrana (controle). O outro defeito (teste 1) foi protegido, nas superfícies interna e externa, como uma membrana biodegradável, não porosa, de ácido polilático (diâmetro – 10 mm e espessura – 0,2 mm). No animal 2, ambos os defeitos (testes 2 e 3), tiveram suas superfícies interna e externa cobertas por um material mais rígido (copolímero de ácido láctico e carbonato de trimetileno). Seis meses depois os animais foram sacrificados e as peças analisadas histologicamente. O defeito controle estava essencialmente ocupado por tecido mole, em contato direto com o tecido da duramáter. Nos defeitos testes havia uma ponte contínua de osso estendendo-se de uma extremidade a outra do defeitos. Todavia, no defeito

teste 1, o osso neoformado não atingiu a mesma espessura do osso circundante, ao contrario dos demais defeitos testes.

LOPES (1999) avaliou a efetividade da membrana reabsorvíveis de colágeno (Biomend[®]) e da membrana não reabsorvível de celulose (Gengiflex[®]) no tratamento de defeitos ósseos tipo fenestração em tíbias de cães, onde concluiu que as membranas foram efetivas em promover a regeneração ósseas nos períodos pós-operatórios de três e oito semanas; que os defeitos protegidos com a membrana de colágeno (Biomend[®]) mostraram um volume de tecido ósseo neoformado estatisticamente superior aos defeitos tratados com a membrana de celulose (Gengiflex[®]) e também em relação aos defeitos controles no período de três semanas.

PEREIRA (1999) avaliou a diferença entre o uso de membranas não reabsorvíveis (Gore-tex[®]) e reabsorvíveis (Atrisorb[®]) em defeitos periodontais cirurgicamente criados em cães. Desta pesquisa o autor concluiu que as membranas reabsorvíveis (Atrisorb[®]) e a não reabsorvível (Gore-tex[®]) são igualmente efetivas em limitar a progressão apical do epitélio juncional e promover nova inserção em defeitos tipo deiscência em cães e, que a membrana reabsorvível (Atrisorb[®]) promove maior área de regeneração óssea em defeitos tipo deiscência em cães, quando comparadas à membrana não reabsorvível (Gore-tex[®]).

Em 1984, o grupo de Química analítica e Tecnologia de Polímeros da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo desenvolveu uma resina poliuretana extraída da óleo da mamona (*Ricinus*

comunis da classe dicotiledônea, da origem geraniácea e família das *Euforbaceaes*) (Projeto PADCT).

Os polímeros poliuretanos possuem como vantagens a processabilidade, flexibilidade de formulação, excelentes propriedades estruturais, ausência de emissão de irritantes ou vapores tóxicos (OTA27, 1989), além da bicompatibilidade (OTA27, 1989; BAKKER et al. 5, 1990; OHARA et al. 25, 1995). HENNING et al. 19 (1989), observaram, inclusive, a biocalcificação *in vivo* e *in vitro* das resinas poliuretanas. O polímero poliuretano da mamona, com relação à biocompatibilidade, mostrou excelentes resultados (OHARA et al.25, 1995; TEIXERA et al. 1996; TEÓFILO et al.40, 1996; VILARINHO et al.43, 1996; COSTA et al.11, 1997; CARVALHO et al.9, 1997). Os diversos tipos de polímero do *Ricinus comunis*, têm sido utilizados como detergente intracanal (FERREIRA et al., 1996), como material de reconstrução ósseo (OHARA et al., 1995), como cimento de preenchimento de falha óssea (IGNÁCIO, 1995), além de sua utilização, através de diferentes produtos, na regeneração óssea guiada, como membranas reabsorvíveis (CHIERICI, 1998).

Embora a regeneração tecidual guiada seja atualmente um dos assuntos mais pesquisados dentro da odontologia, existe ainda na literatura uma certa escassez de trabalhos comparando a eficiência entre si dos vários tipos de membrana reabsorvíveis no tratamento de defeitos ósseos.

O **objetivo** deste trabalho será o de analisar através de avaliação histológica, em tíbias de ratos, a efetividade das membranas reabsorvíveis de colágeno e de mamona no tratamento de defeitos ósseos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e anestesia

Serão utilizados para esta pesquisa 18 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, com idade aproximada de 90 dias e pesando em média 170 gramas. Os animais serão divididos aleatoriamente em dois grupos, com períodos de sacrifício de 7, 14 e 21 dias, e mantidos durante o período experimental com alimentação sólida⁽⁰²⁾ e água *ad libitum*.

Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais serão anestesiados através da inalação de éter sulfúrico e submetidos à tricotomia da região a ser operada.

Membranas

Neste experimento utilizamos dois tipos de membranas reabsorvíveis, uma de colágeno e outra de mamona.

Membranas reabsorvíveis de colágeno

A membrana de colágeno que utilizamos será a BioMend[®] (03), que é uma matriz não friável, fabricada a partir do tendão flexor bovino. Sob

⁰² Ração Granulada – Purina S.A.

⁰³ Calcitek[®] - A company of Sulzer médica

microscopia eletrônica, em corte transversal, ela tem a forma de uma superfície plana, condensada e de aspecto texturizado. Ela é semi-oclusiva, com poros de 0,004 μm .

Membrana reabsorvível de mamona

A membrana de mamona (AUG-EX[®] ⁽⁰⁴⁾) é na realidade um poliéster, formado por três moléculas do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-oléico, ou C₁₈H₃₄O₃), cada uma com um grupo hidroxila no carbono 12. Os grupos hidroxila do ácido ricinoléico reagem com os grupos isocianato do pré-polímero difenilmetatandiisocianato para formar as poliuretanas. As resinas poliuretanas vegetais são produtos substitutivos alternativos de polióis e pré-polímeros sintetizados a partir de moléculas derivadas de ácidos graxos vegetais.

Procedimento cirúrgico

Após anestesia e tricotomia da área seguida de antessepsia da região ventral das tíbias esquerda e direita com solução alcoólica de iodo a 10%⁽⁰⁵⁾, e posterior isolamento da área através da colocação de campos estéreis, serão realizadas bilateralmente, com uma lâmina intercambiável nº 15⁽⁰⁶⁾, montada em cabo de bisturi nº 3, uma incisão na pele e tecido subcutâneo de aproximadamente 2 cm de comprimento, na região correspondente à face medial da tíbia em seu terço proximal. Por meio de divulsão romba, o tecido

⁰⁴ AUG-EX - Poliquil

⁰⁵ Povidine Tintura. Microshield – Johnson & Johnson

⁰⁶ Beckton-Dickison. Industrias Cirúrgicas Ltda

muscular subjacente será afastado, expondo-se o perióstio que também será incisado para dar início às confecções dos defeitos ósseos.

Para realização destes defeitos utilizaremos um motor elétrico⁽⁰⁷⁾ com controle de torque, velocidade e irrigação, além de um contra-ângulo redutor 16:1⁽⁰⁸⁾ acoplado a esse motor. A velocidade de trabalho foi de aproximadamente 1000 rotações por minuto (rpm), com um toque de 36 Ncm e abundante irrigação externa com solução salina de cloreto de sódio a 0,9%⁽⁰⁹⁾, controlada por bomba peristáltica.

Em cada tíbia será confeccionado um defeito ósseo, sendo que na tíbia direita o defeito será utilizado como controle e, na tíbia esquerda serão colocadas as membranas de colágeno (grupo I) e a de mamona (grupo II). Assim sendo, cada animal será controle de si mesmo.

Após o término da confecção dos defeitos, estes serão irrigados para remover esvírolas ósseas que podem vir a interferir na reparação do tecido ósseo.

Logo após a irrigação, as membranas serão posicionadas de forma a cobrir toda a área do defeito, estendendo-se cerca de 2mm sobre as margens ósseas.

A ferida cirúrgica será novamente irrigada e inspecionada para evitar acúmulo de restos ósseos oriundos das perfurações. Os tecidos serão reposicionados e suturados por planos com fio de sutura mononylon 4-0⁽¹⁰⁾.

⁰⁷ BLM 300 – VK Driller Equipamentos Eléctricos Ltda

⁰⁸ NSK E 16R. Nakanishi Dental MFG. CO - Japan

⁰⁹ Glicolabor – Industria Farmacéutica

¹⁰ Ethicon – Johnson & Johnson Produtos profissionais Ltda

Todos os animais receberão Penicilina Benzatina⁽¹¹⁾, em dose única de 1 ml, via intramuscular, imediatamente após o procedimento cirúrgico.

Método Histológico

Após o sacrifício por inalação excessiva de éter sulfúrico, serão obtidos fragmentos ósseos das tíbias contendo os defeitos cirúrgicos, por seccionamento transversal do osso broca tronco-cônico 702 montada em alta rotação sob abundante irrigação com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%. As osteotomias serão realizadas distando cerca de mm de cada lado da área operada. As peças serão fixadas em solução de formol a 4% durante 48 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, serão lavadas em água corrente por 24 horas e descalcificadas em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% em parte iguais (MORSE, 1945). Ao final deste processo, cada fragmento de tibia será seccionado longitudinalmente ao defeito ósseo, com o corte passando pelo meio da área do defeito. Após a divisão das peças ao meio, procederemos a tramitação laboratorial de rotina, com lavagem em água corrente, desidratação em solução de álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em parafina.

Cortes semi-seriados, com 6 μ m de espessura serão feitos longitudinalmente à região dos defeitos ósseos, e em seguida corados com hematoxilina-eosina, e tricrômio de Mallory para análise em microscopia de luz.

¹¹ Laboratórios Wyeth Ltda

Análise Histológica

Na análise histológica descritiva, será avaliada a intensidade da reação inflamatória bem como a seqüência de eventos que envolverão a reparação óssea dos defeitos, tais como: necrose, hemorragia, atividade osteoclástica, presença de tecido conjuntivo, aposição de tecido ósseo neoformado, enfim, o padrão da regeneração óssea.

RESULTADOS

Período de 07 dias pós-operatórios

Grupo Controle

A cavidade se encontrava preenchida por tecido conjuntivo frouxo circundando as trabéculas ósseas neoformadas. Ainda era possível observar uma discreta reação inflamatória.

Notamos neoformação óssea junto ao defeito ósseo criado cirurgicamente, porém ainda era possível observar uma grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo com tendência a invaginação e impedindo que houvesse uma união entre o osso neoformado e o osso pré-existente (figuras 1 e 2).

O limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente é facilmente observado, e caracterizado pela presença de duas corticais bem nítidas. Ainda no limite da cavidade, o osso pré-existente apresenta áreas de

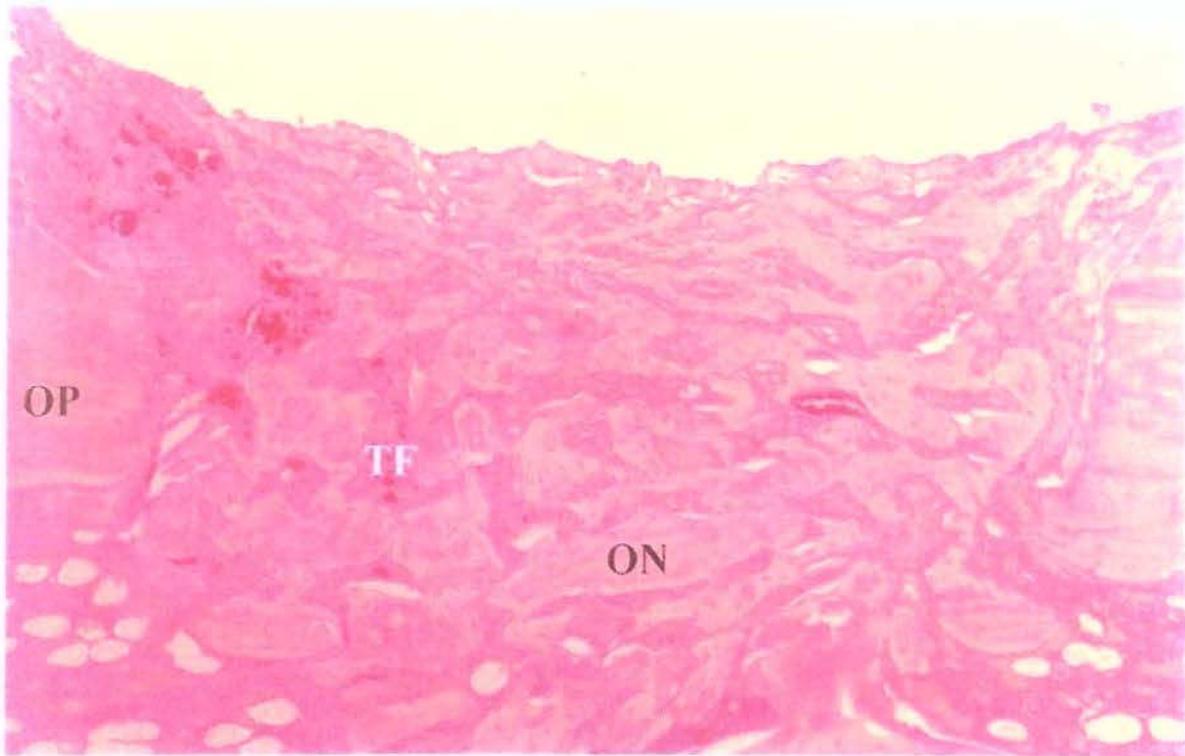


Fig. 1 - Controle - 7 dias pós-op. - Observamos a presença de tecido conjuntivo frouxo (TF) circundando trabéculas ósseas neoformadas (ON). O limite entre osso pré-existente (OP) e osso neoformado (ON) ainda é nítido.

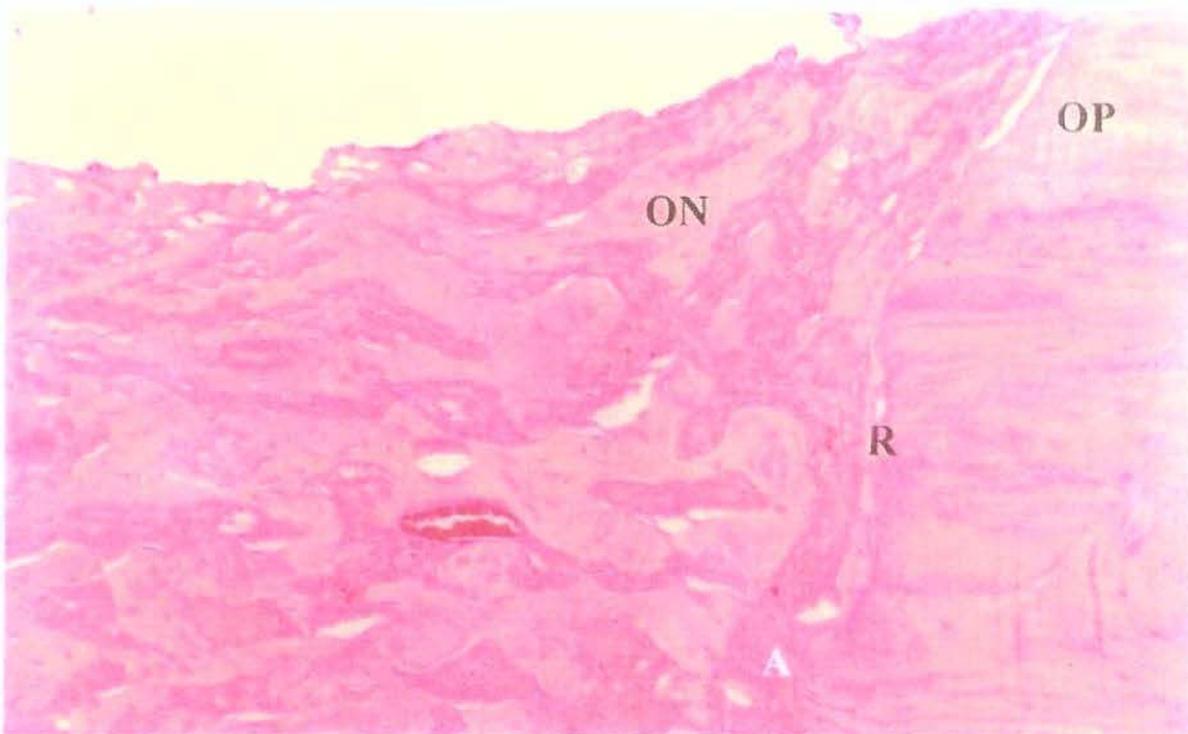


Fig. 2 - Controle - 8 dias pós-op. - O limite entre o osso pré-existente (OP) e o osso neoformado (ON) é nítido. Notamos áreas de reabsorção (R) e aposição de tecido ósseo (A).

remodelação e osso neoformado, sugerindo atividade ativa e progressiva (figura 2).

Grupo Colágeno

Os animais apresentaram um comportamento semelhante ao grupo controle, sendo facilmente possível à identificação da região limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente, na região periférica das amostras (figura 3). Notamos que o osso pré-existente é caracterizado pela presença de duas corticais ósseas bem nítidas, onde observamos áreas de reabsorção e aposição óssea, caracterizando atividade de remodelação das margens da cavidade (figura 4).

No interior da cavidade óssea cirúrgica observamos a presença de tecido conjuntivo frouxo e trabéculas ósseas neoformadas e uma discreta reação inflamatória.

A porção mais superior da cavidade apresentava-se coberta por uma camada de tecido conjuntivo denso, provavelmente originado a partir da membrana de colágeno que recobria a cavidade.

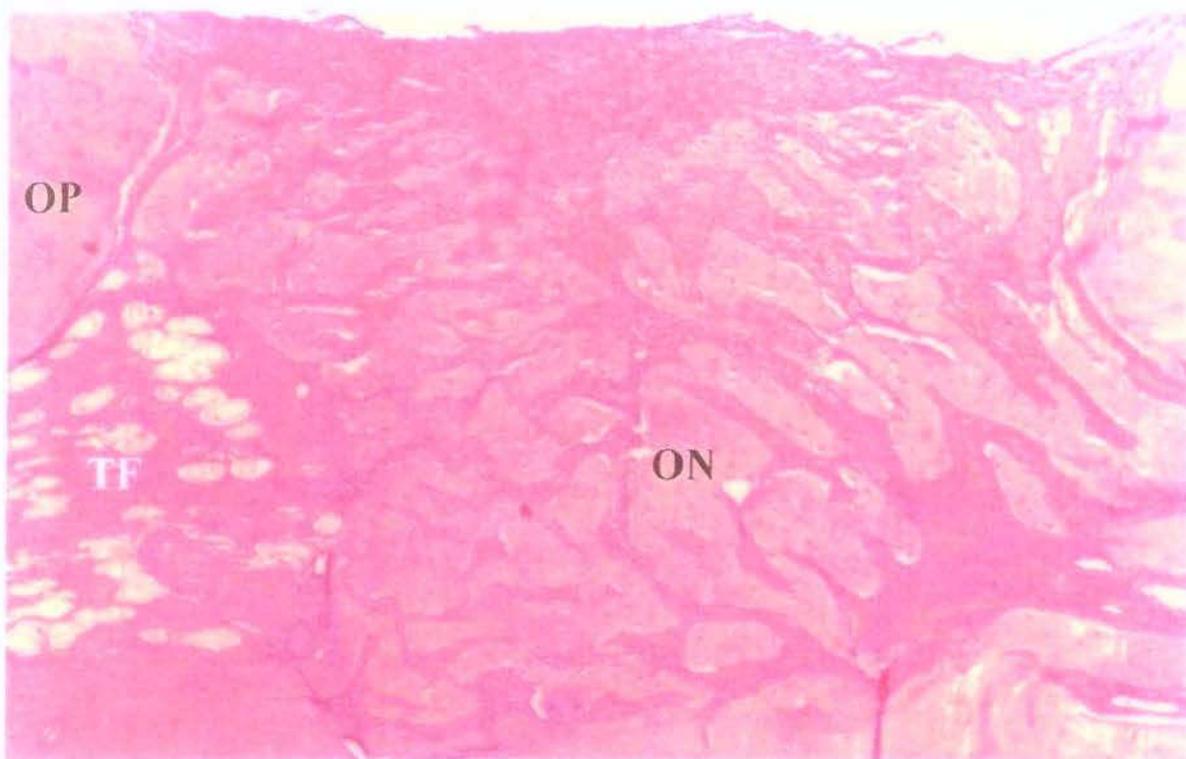


Fig. 3 – Colágeno – 7 dias pós-op. – Observamos a cavidade preenchida por trabéculas ósseas neoformada (ON) circundadas por tecido conjuntivo frouxo (TF). Notamos limite nítido entre osso pré-existente (OP) e osso neoformado (ON).

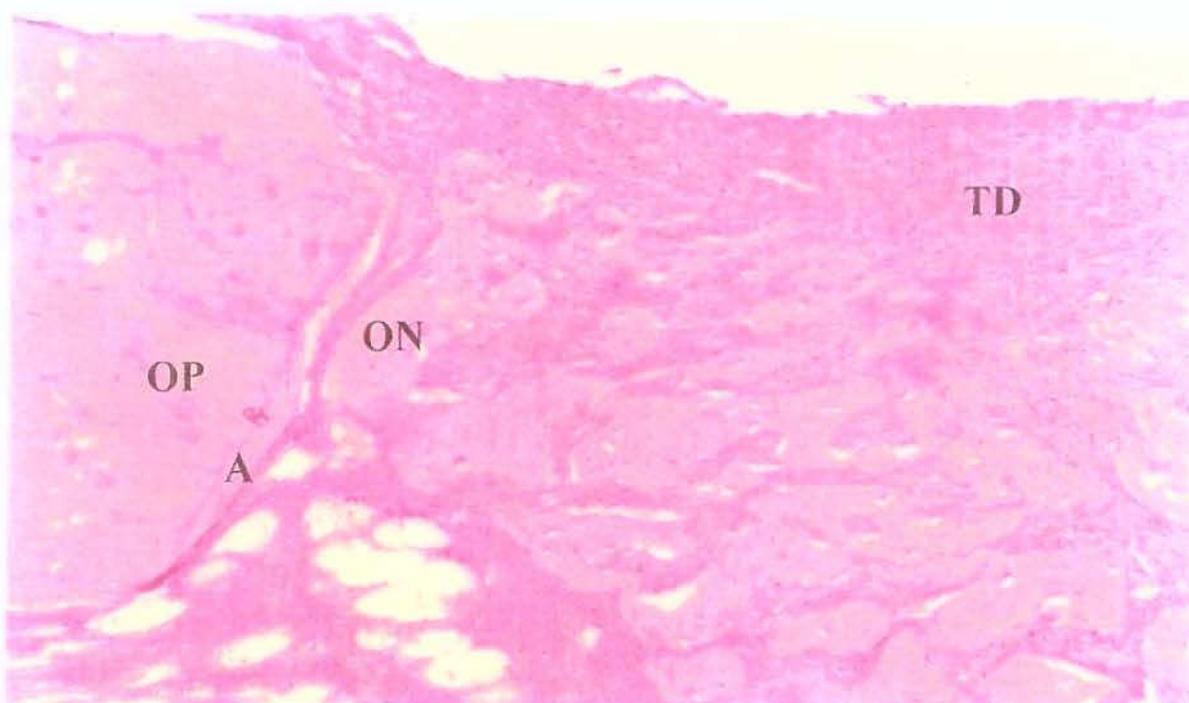


Fig. 4 -- Colágeno – 7 dias pós-op. – Na região limite entre osso pré-existente (OP) e osso neoformado (ON) podemos observar áreas de aposição de tecido ósseo (A). Na porção mais superior da cavidade notamos a presença de uma camada de tecido conjuntivo denso (TD).

Grupo Mamona

Na porção periférica, o limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente era facilmente identificado e caracterizado pela presença de duas corticais ósseas bem nítidas (figura 5). As margens deste tecido ósseo pré-existente apresentavam áreas de remodelação e neoformação óssea, sugerindo atividade remodeladora ativa (figura 6).

A cavidade óssea cirúrgica encontra-se preenchida por tecido osteóide circundado por tecido conjuntivo frouxo (figuras 5 e 6).

A porção mais superior da cavidade encontrava-se recoberta por uma camada de tecido ósseo neoformado, que por sua vez estava recoberto por uma delgada camada de tecido conjuntivo denso (figuras 5 e 6).

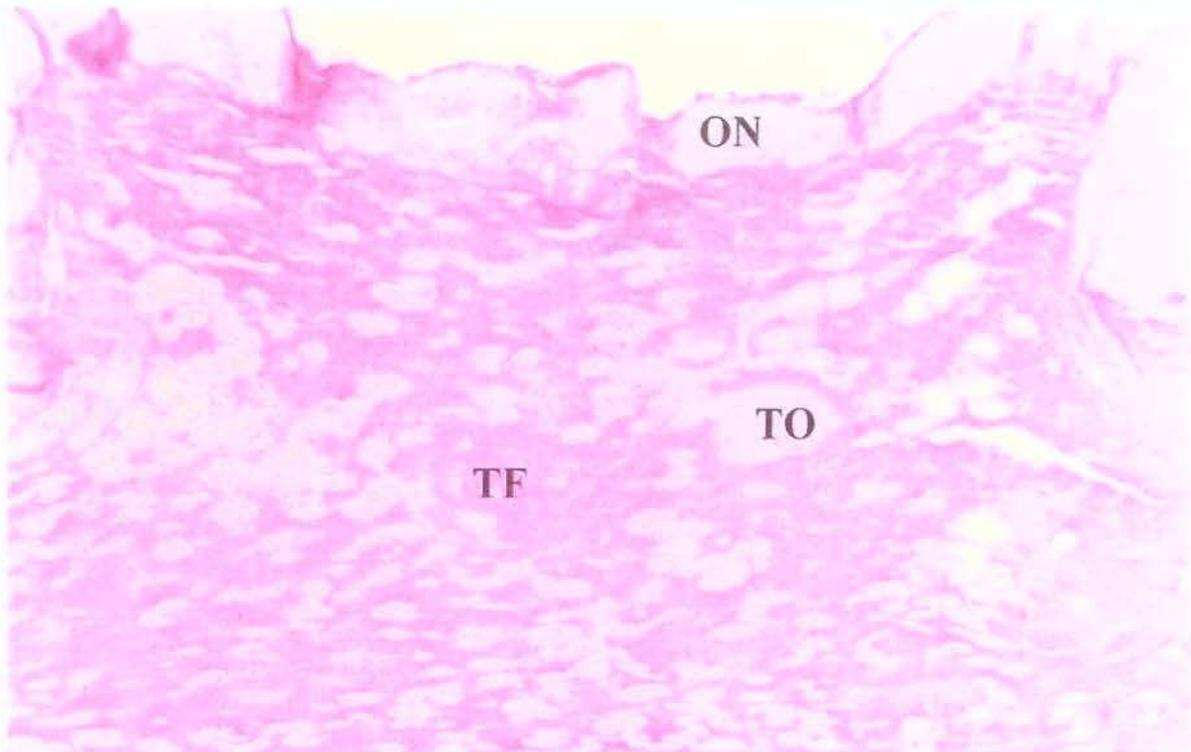


Fig. 5 – Mamona – 7 dias pós-op. – A cavidade cirúrgica se encontra preenchida por tecido osteóide (TO) circundado por tecido conjuntivo frouxo (TF). A porção mais superior da cavidade se encontra recoberta por tecido ósseo neoformado (ON)

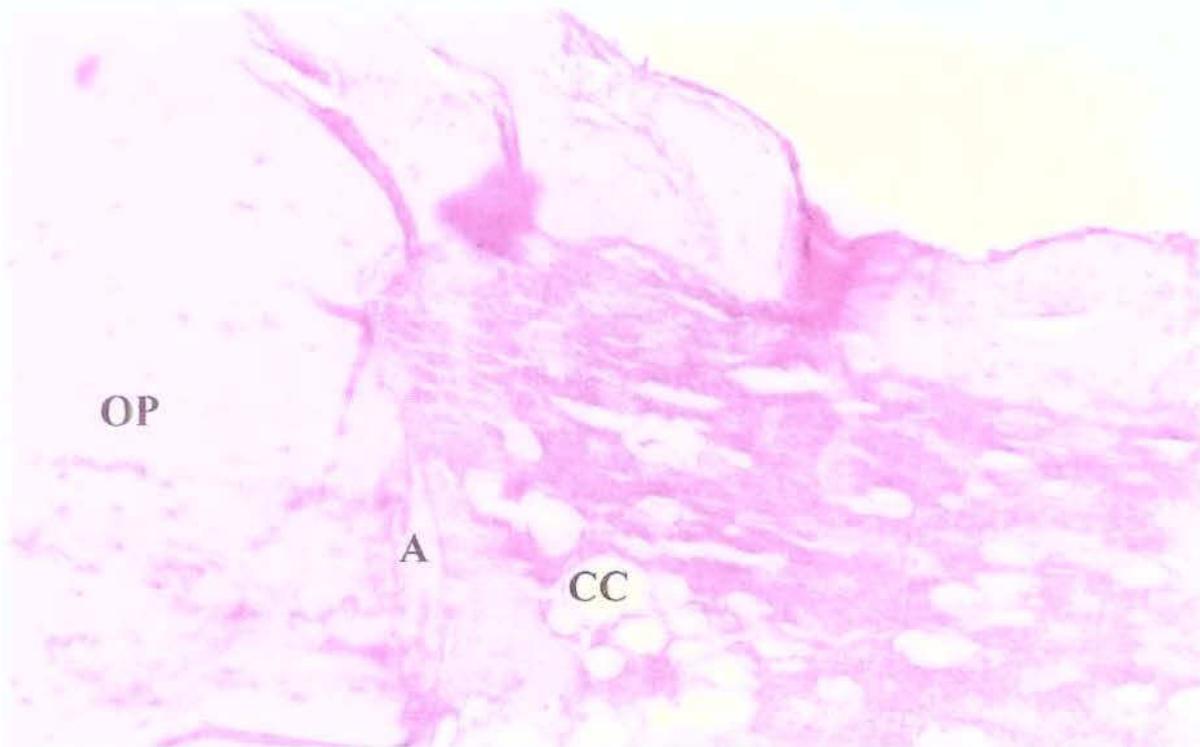


Fig. 6 – Mamona – 7 dias pós-op. – O limite entre a cavidade cirúrgica (CC) e o osso pré-existente (OP) ainda é nítido. Notamos áreas de aposição de tecido ósseo (A).

Período de 14 dias pós-operatório

Grupo Controle

As margens da cavidade óssea cirúrgica ainda eram possíveis de serem observadas e, eram caracterizadas pela presença de duas corticais ósseas pré-existente. |Nesta região notamos áreas de reabsorção e aposição óssea, sugerindo atividade remodeladora (figura 8).

O interior da cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchido por trabéculas ósseas neoformadas circundadas por tecido conjuntivo frouxo (figura 7).

A porção mais superior da cavidade encontra-se recoberta por uma camada de tecido conjuntivo fibroso (figuras 7 e 8).

Grupo Colágeno

A região limite entre o osso pré-existente e o osso neoformado ainda é possível de ser observado. Junto às margens da cavidade notamos áreas de remodelação e a presença da linha cimentante entre osso neoformado e osso pré-existente (figura 10).

A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por tecido ósseo neoformado circundado por tecido conjuntivo frouxo. Nesta fase o tecido ósseo neoformado apresentava-se com característica de tecido mais organizado e maduro, quando comparado ao período anterior (figura 9).

A porção mais superior da cavidade apresentava-se recoberta por uma camada de tecido conjuntivo denso (figuras 9 e 10).

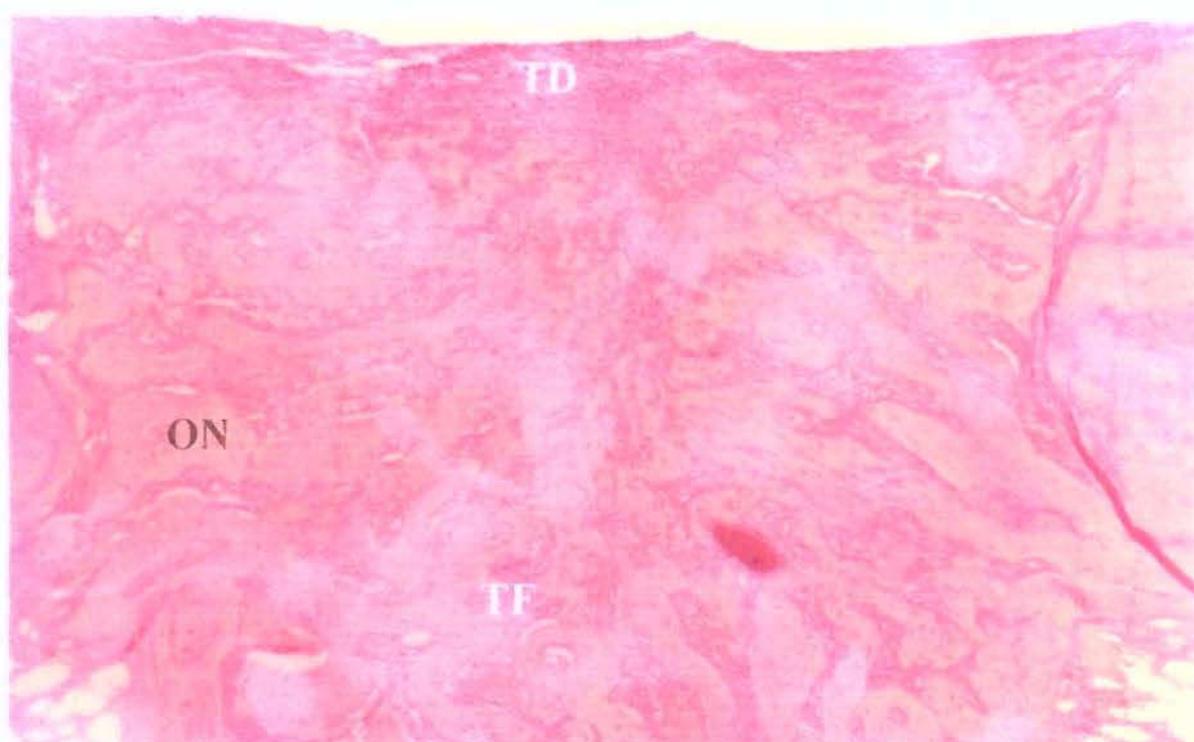


Fig. 7 – Controle – 14 dias pós-op. – A cavidade óssea cirúrgica encontra-se preenchida por trabéculas ósseas neoformadas (ON) circundadas por tecido conjuntivo frouxo (TF). Sua porção mais superior encontra-se recoberta por uma camada de tecido conjuntivo denso (TD).

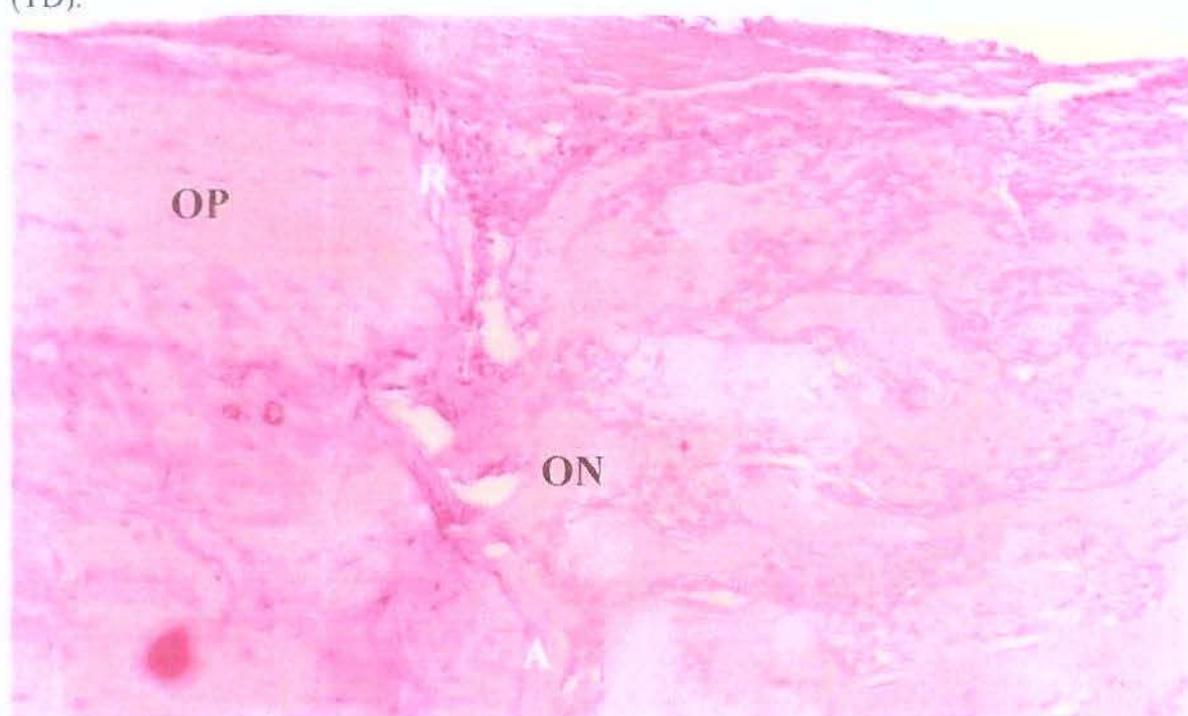


Fig. 8 – Controle – 14 dias pós-op. – O limite entre osso pré-existente (OP) e osso neoformado (ON) ainda é nítido. Notamos áreas de reabsorção (R) e aposição de tecido ósseo (A).

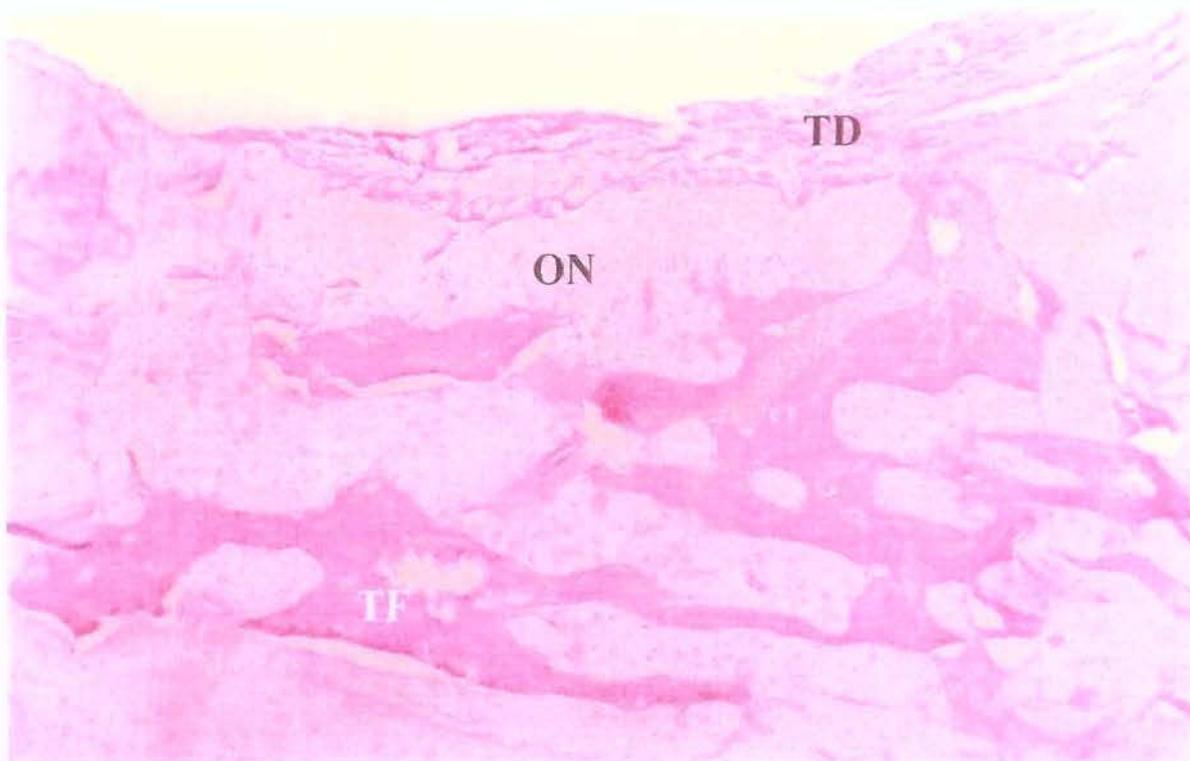


Fig. 9 – Colágeno – 14 dias pós-op. – A cavidade cirúrgica se encontra preenchida por tecido ósseo neoformado (ON) circundado por tecido conjuntivo frouxo (TF). Sua porção mais superior encontra-se recoberta por uma camada de tecido conjuntivo denso (TD).

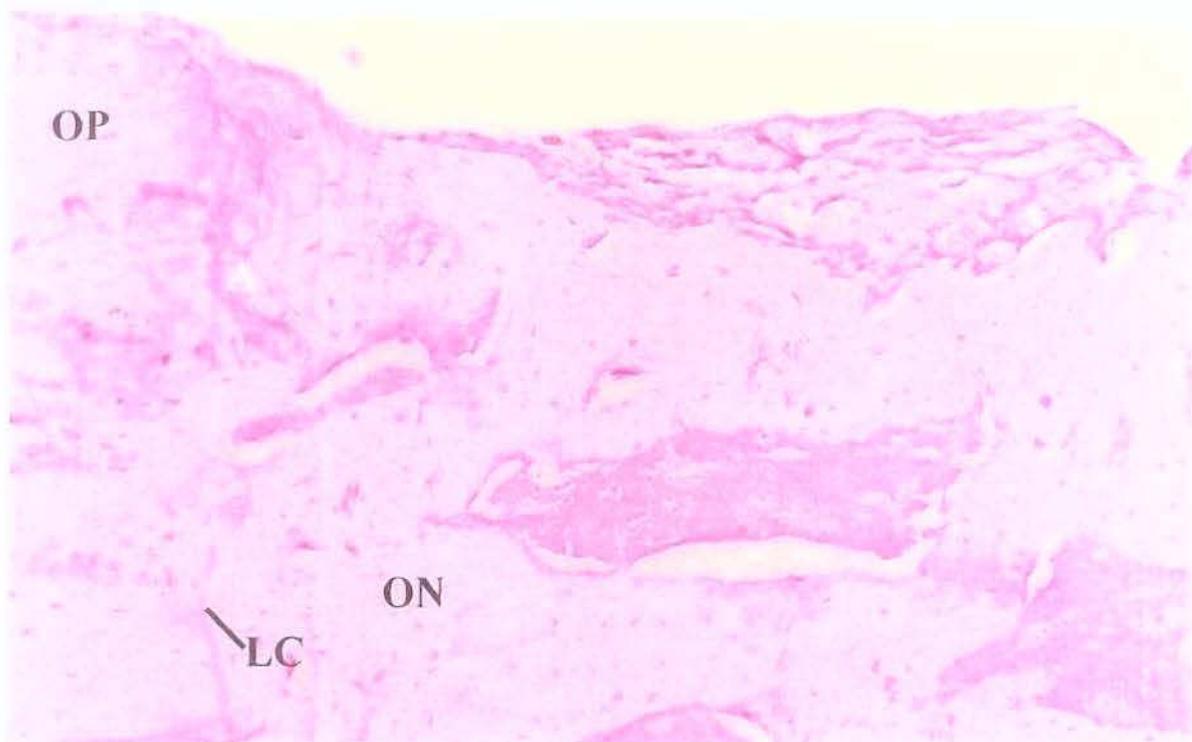


Fig. 10 – Colágeno – 14 dias pós-op. – A região limite entre osso pré-existente (OP) e osso neoformado (ON) é nítido. Notamos áreas de aposição de tecido ósseo (A) e a presença de linha cimentante (LC).

Grupo Mamona

Na porção periférica, o limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso preexistente era ainda passível de ser identificado e, caracterizado pela presença de duas corticais ósseas bem nítidas. Entre o tecido ósseo neoformado e o osso pré-existente observamos a presença de linha cimentante. As margens deste tecido ósseo preexistente apresentavam áreas de remodelação e neoformação óssea, caracterizando atividade remodeladora (figura 12).

A cavidade óssea cirúrgica encontra-se preenchida por tecido conjuntivo frouxo circundando trabéculas ósseas neoformadas e tecido osteóide (figura 11).

A porção mais superior da cavidade apresentava-se recoberta por tecido ósseo neoformado (figuras 11 e 12).

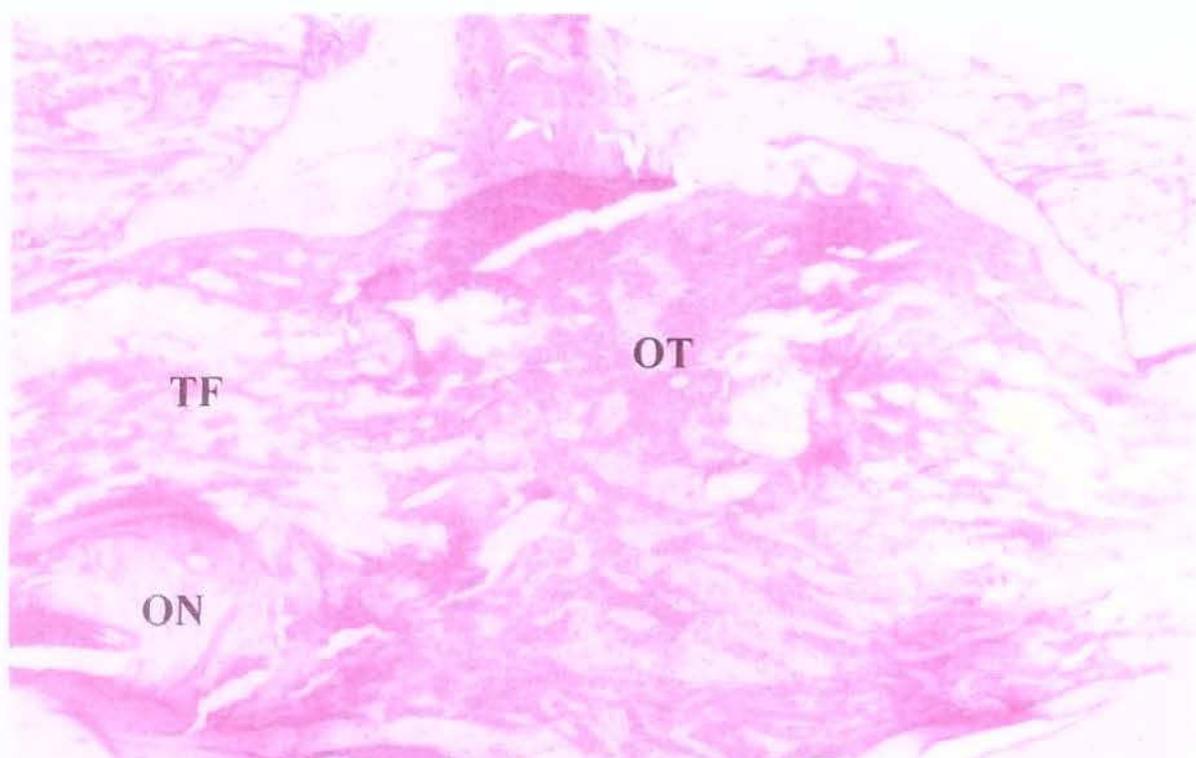


Fig. 11 – Mamona – 14 dias pós-op. – A cavidade cirúrgica encontra-se preenchida por tecido conjuntivo frouxo (TF) circundando trabéculas ósseas neoformadas (ON) e tecido osteóide (OT).

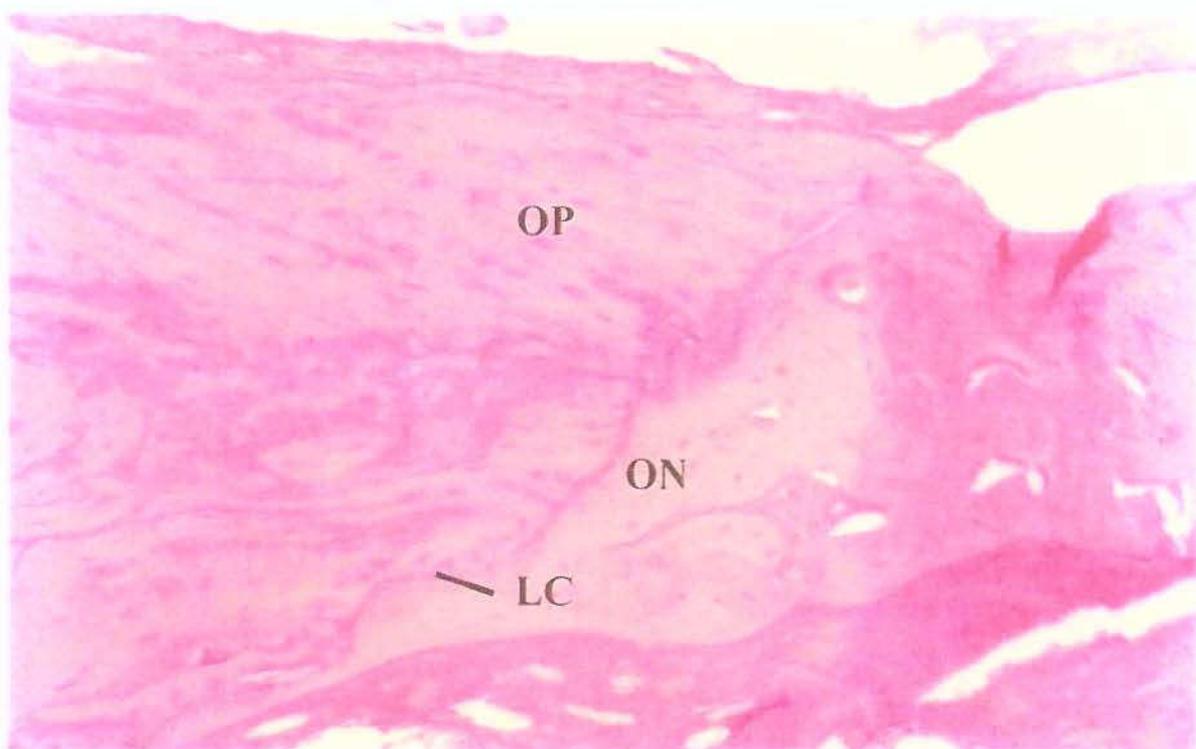


Fig. 12 – Mamona – 14 dias pós-op. – O limite entre osso pré-existente (OP) e osso neoformado (ON) é nítido. Notamos a presença da linha cimentante (LC) junto a este limite.

Período de 21 dias pós-operatório

Grupo Controle

O limite entre a margem da cavidade óssea cirúrgica e o osso preexistente podia ser identificado na porção periférica das amostras, onde era possível observar a presença da linha cimentante entre osso pré-existente e osso neoformado (figura 13). Partindo das margens da cavidade existiam áreas de remodelação e aposição óssea caracterizando uma atividade remodeladora (figura 14).

A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por tecido ósseo neoformado e algumas áreas de tecido conjuntivo denso. Este tecido ósseo apresentava-se com aspecto mais organizado e maduro quando comparados à períodos anteriores (figura 13).

A porção mais superior da cavidade ainda apresentava-se recoberta por uma camada de tecido conjuntivo denso (figuras 14 e 14).

Grupo Colágeno

Neste grupo ainda era possível observar o limite entre o osso pré-existente e o osso neoformado, pois havia a linha cimentante entre os dois ossos (figuras 15 e 16). Nesta região observamos áreas de remodelação óssea com reabsorção e aposição de tecido ósseo (figuras 15 e 16).

A cavidade encontrava-se preenchida por tecido ósseo neoformado de aspecto mais organizado e maduro quando comparado aos períodos anteriores. O tecido ósseo neoformado ocupava ocupavam a maior parte da cavidade óssea cirúrgica, porém, na região mais inferior da cavidade

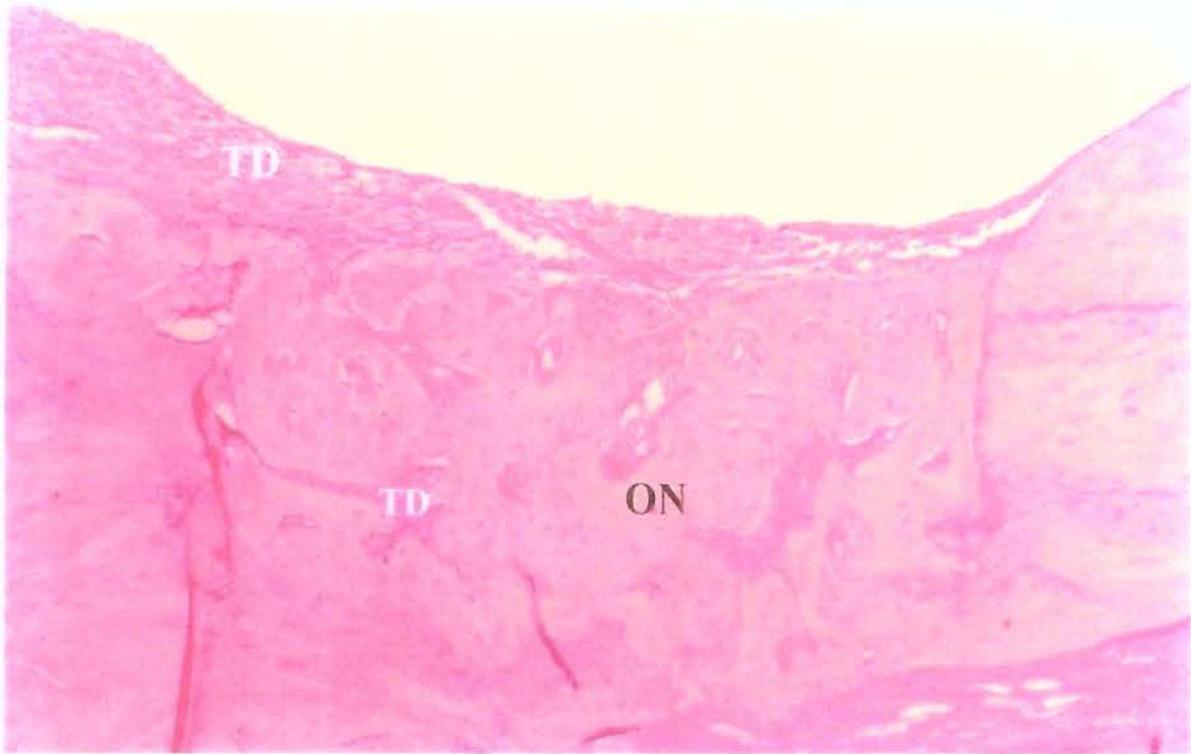


Fig. 13 – Controle – 21 dias pós-op. A cavidade cirúrgica encontra-se preenchido por tecido ósseo neoformado (ON) e algumas áreas de tecido conjuntivo denso (TD) . sua porção mais superior encontra-se recoberta por uma camada de tecido conjuntivo denso (TD)

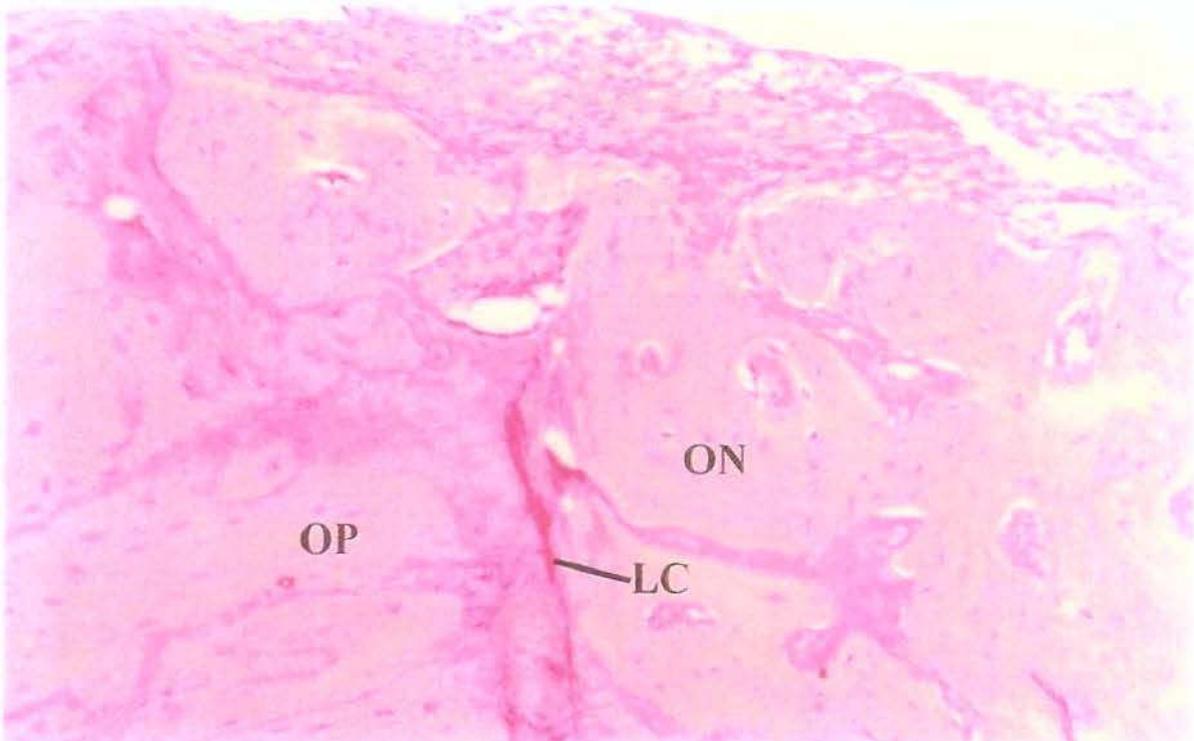


Fig. 14 – Controle – 21 dias pós-op. – O limite entre osso neoformado (ON) e osso pré-existente (OP) é nítido e, notamos a presença da linha cimentante (LC).

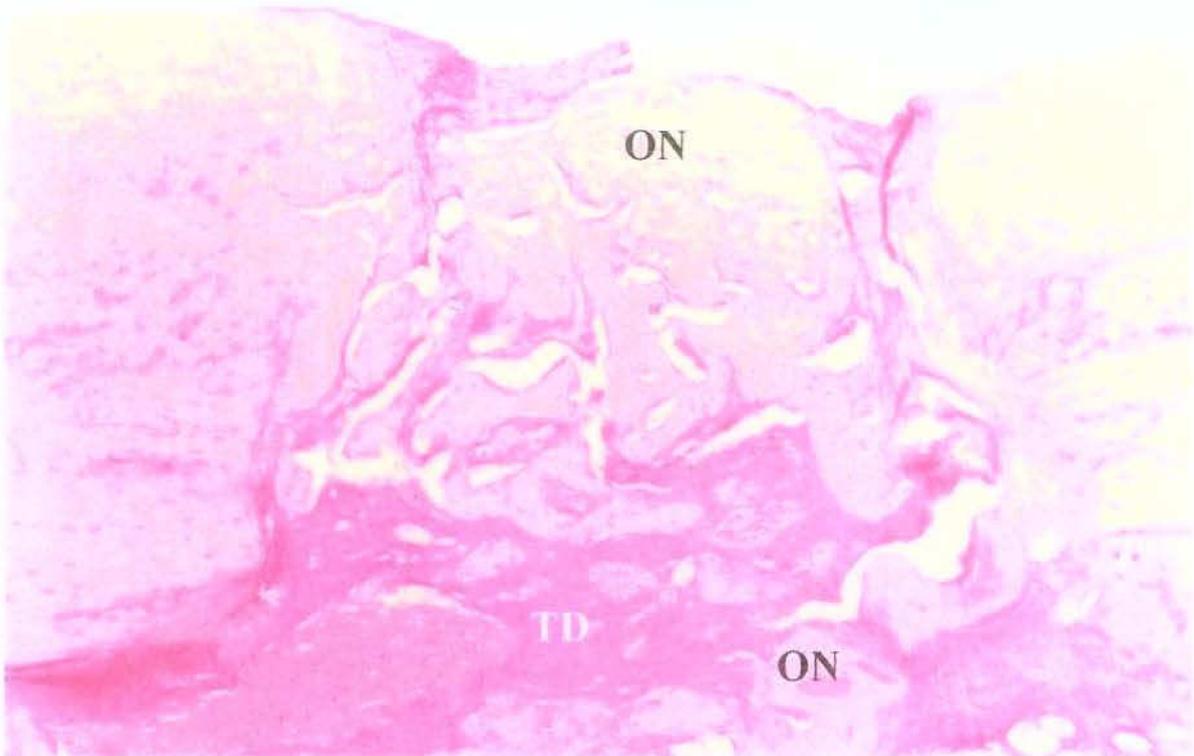


Fig. 15 – Colágeno – 21 dias pós-op. – A cavidade encontra-se preenchida por tecido ósseo neoformado (ON) . Na porção mais inferior da cavidade observamos a presença de tecido conjuntivo denso (TD) envolvendo trabéculas ósseas neoformadas (ON).

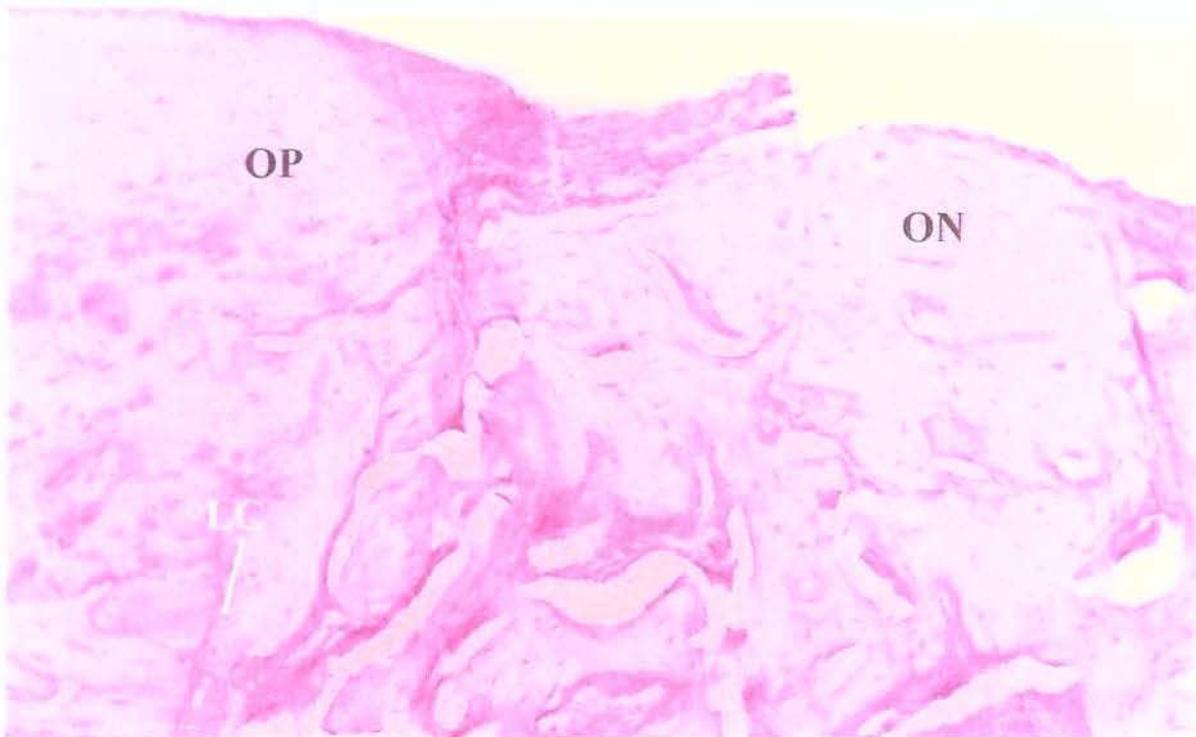


Fig. 16 – Colágeno – 21 dias pós-op. – O limite entre osso pré-existente (OP) e osso neoformado (ON) ainda é nítido. Notamos a presença da linha cimentante (LC)

observamos ainda a presença de tecido conjuntivo denso envolvendo algumas trabéculas ósseas neoformadas (figura 15).

Grupo Mamona

O limite entre o osso pré-existente e o osso neoformado ainda é possível de ser observado e, entre eles notamos a presença da linha cimentante (figura 18). As margens deste tecido ósseo apresentavam atividades de remodelação óssea com áreas de reabsorção e aposição de tecido ósseo (figuras 17 e 18).

A cavidade encontrava-se preenchida por tecido ósseo neoformado de aspecto mais organizado e maduro quando comparado aos períodos anteriores. O tecido ósseo neoformado ocupava ocupavam a porção mais superior da cavidade óssea cirúrgica, porém, na região mais inferior da cavidade observamos ainda a presença de tecido conjuntivo frouxo envolvendo algumas trabéculas ósseas neoformadas (figura 17).

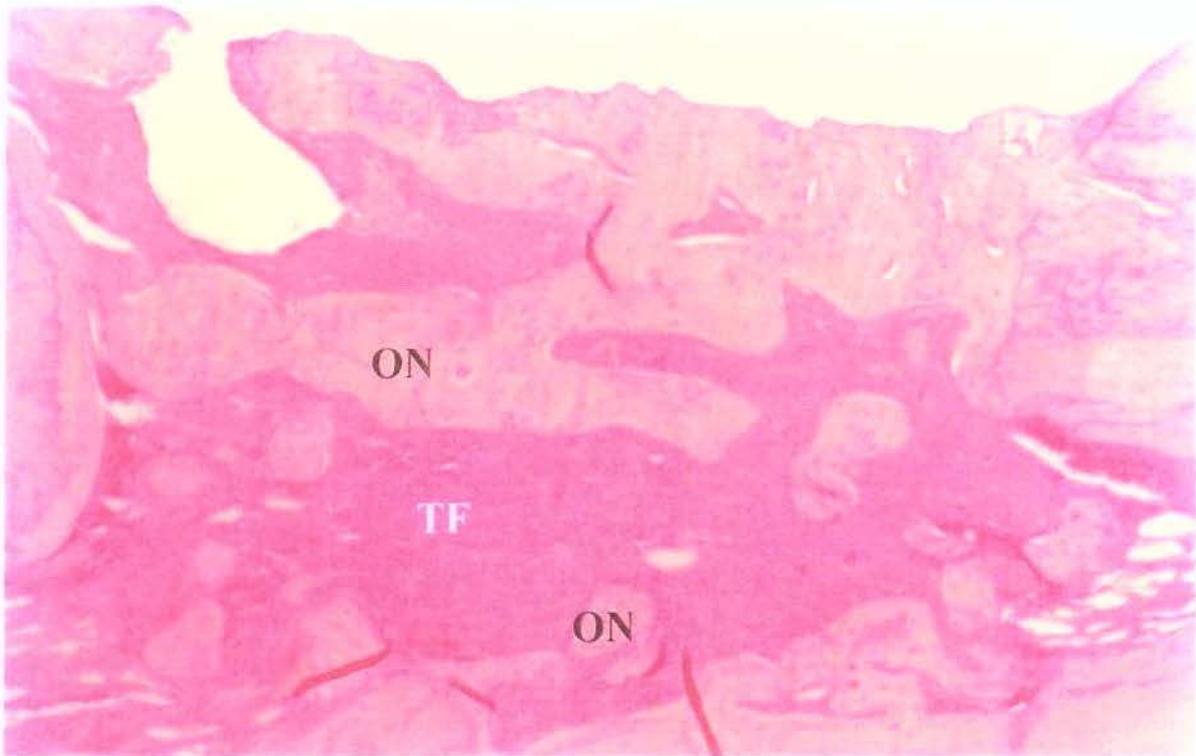


Fig. 17 – Mamona – 21 dias pós-op. – A cavidade encontra-se preenchida por tecido ósseo neoformado (ON), além de tecido conjuntivo frouxo (TF) circundando algumas trabéculas ósseas neoformadas (ON).

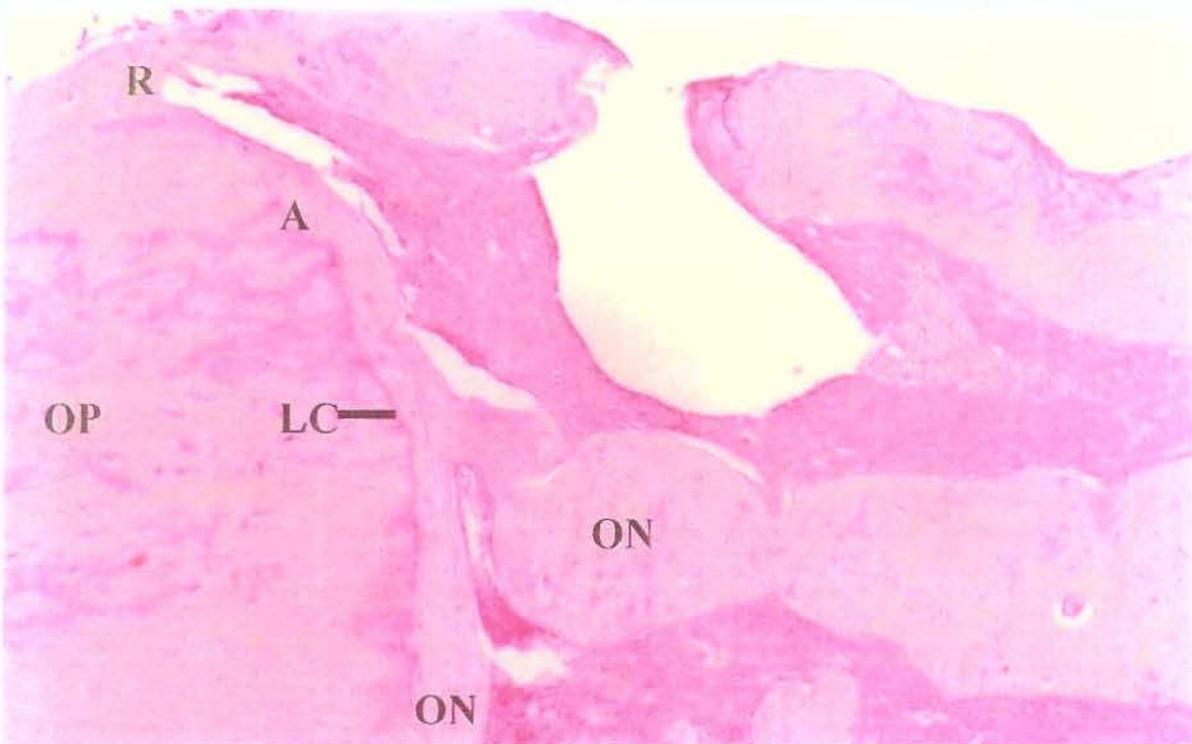


Fig. 18 – Mamona – 21 dias pós-op. – O limite entre o osso pré-existente (OP) e osso neoformado (ON) é nítido. Notamos áreas de reabsorção (R) e aposição de tecido ósseo (A) e, também podemos observar a presença de linha cimentante (LC).

DISCUSSÃO

Atualmente, existe um interesse muito grande no desenvolvimento de materiais que sejam capazes de auxiliar o reparo ósseo em casos de defeitos, principalmente em função do surgimento de tratamentos de paciente que apresentam grande áreas de perda de tecido ósseo.

No intuito de avaliar os diferentes materiais, que vêm sendo desenvolvidos para auxiliar o reparo ósseo, vários métodos de pesquisa são utilizados. Segundo FRAME, 1980, um modelo animal ideal para a pesquisa para estudo de reparação tecidual deve ser barato, de fácil disponibilidade e manuseio. Em nosso estudo utilizamos 18 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, com idade aproximada de 90 dias e pesando em média 170 gramas, por serem fáceis de serem adquiridos, uma vez que são reproduzidos pelo biotério central da Unicamp. Em cada animal fora preparadas duas cavidade ósseas, sendo uma em cada tibia. Estas cavidades são modelos de estudo bastante úteis no estudo do reparo ósseo. Este tipo de defeito ósseo é facilmente reproduzível, simples de ser realizado, rápido, seguro e não requer estabilização.

O tecido ósseo caracteriza-se por apresentar uma alta capacidade de reparação espontânea quando é lesionado. Contudo, dependendo da extensão da lesão, as capacidades naturais de reparo do tecido ósseo não são suficientes para restaurar a quantidade de tecido perdida. Um defeito ósseo pode ser considerado de tamanho crítico quando, ao longo da vida do animal, o reparo ósseo espontâneo não é capaz de preencher todo o defeito

com tecido ósseo neoformado (URIST, 1965; HOLLINGER *et al.*, 1961; TAGA, 1997). Apesar de não serem considerados defeitos ósseos críticos, as cavidades ósseas cirúrgicas realizadas neste estudo apresentavam um diâmetro que permitiu avaliar a capacidade de reparação óssea guiada pelas membranas utilizadas, e diferenciar os resultados encontrados entre os grupos controle, colágeno e mamona.

Durante a cirurgia para colocação das membranas, estas devem estender-se além das margens do defeito apoiando-se em tecido ósseo sadio em todas as direções. A utilização de dispositivos de fixação é necessária para o estabelecimento e manutenção de tecido de cobertura, sem prejuízo para o coágulo. A presença de micromovimentos tem sido relacionada a alterações na diferenciação celular, com indução de resposta fibroblástica (SIMION *et al.*, 1994).

Para BUSER *et al.* (1993) a utilização de fechamento primário do retalho sem o uso de dispositivo de fechamento primário do retalho sem o uso de dispositivo de fixação é possível, desde que o mesmo possua um desenho capaz de garantir suporte da barreira física sem tensão primária, e permitir imobilização da mesma.

FUGAZZATTO *et al.* (1997) afirmaram que a fixação da membrana após sua adaptação, se possível, é extremamente desejável, para garantir o espaço do defeito e auxiliar na estabilização inicial do coágulo. Por outro lado, neste mesmo trabalho, o autor observou que para os casos em que não utilizou fixação da membrana, conseguiu estabilidade da mesma através

de liberação passiva do retalho, colocação da membrana além dos limites do defeito, meticoloso reposicionamento e sutura.

Em nosso trabalho os defeitos dos grupos colágeno e mamona, foram recobertos pelas membranas reabsorvíveis respectivas com o intuito de compararmos o efeito unicamente destas membranas sobre o processo de reparo ósseo guiado. Não utilizamos dispositivos para fixação das mesmas, pois a estabilidade foi alcançada mediante reposicionamento passivo do retalho, sutura sem tensão e adaptação da membrana além das margens do defeito.

As membranas reabsorvíveis, necessitam de um segundo procedimento cirúrgico para a sua remoção.

HÜRZELER *et al.* (1998) relatam a existência de fatores que justificam o desenvolvimento de um material reabsorvível para ser aplicado na técnica da regeneração óssea guiada. Está bem documentado na literatura, que o descolamento de retalho mucoperiosteal, por si só, pode causar reabsorção do tecido ósseo subjacente (PFEIFER, 1965). Deste modo, a desnudação do osso imaturo, que ocorre no segundo estágio durante a remoção da membrana, deve ser evitado. Um outro fator a ser considerado, é que as membranas não reabsorvíveis freqüentemente estão relacionadas a exposição precoce, tornando-se rapidamente contaminadas. A contaminação bacteriana provoca uma reação inflamatória dos tecidos moles, exigindo a remoção da membrana ainda nos estágios iniciais da regeneração óssea. Muitos trabalhos demonstraram redução na quantidade de tecido ósseo neoformado quando a exposição precoce das membranas

ocorre (JOVANOVIC *et al.*, 1992; SIMION *et al.*, 1992; BECKER *et al.*, 1994).

Em nosso trabalho foi avaliado a regeneração óssea em defeitos ósseos produzidos cirurgicamente em tibia de ratos. Defeitos controles foram incluídos na pesquisa para assegurar que os resultados eram decorrentes do tratamento, ou seja, da utilização de membranas de colágeno e mamona, e não da capacidade de regeneração das lesões (BLUMENTHAL, 1988).

A composição química das membranas reabsorvíveis determina sua desintegração, resposta inflamatória, bem como longevidade da barreira no leito (LINDE *et al.*, 1993). A velocidade de reabsorção, assim como a integração e a antigenicidade das membranas de colágeno, podem ser controladas pelo grau de "cross-linking" ou reticulamento (MINABE *et al.*, 1989; CANCIAN *et al.*, 1992). Segundo o fabricante da membrana de colágeno analisada neste experimento, foram removidas as porções potencialmente antigênicas das moléculas durante o processo de fabricação, tornando o produto não imunogênico e lhe proporcionando uma alta biocompatibilidade.

Para estabelecer um efeito comparativo, analisou-se também uma membrana reabsorvível obtida da poliuretana derivada do óleo da mamona, que foi utilizada nesta pesquisa por ter seu desenvolvimento totalmente no âmbito nacional, de origem vegetal e por estas razões, ser de fácil obtenção e de baixo custo (IGNÁCIO *et al.*, 1996). Ainda, por apresentar comprovação científica de biocompatibilidade (OHARA *et al.*, 1995; VILARINHO *et al.*,

1996; CARVALHO *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 1997; KONIG Jr. *et al.*, 1999; CAVALIERI, 2000).

Os resultados histológicos do presente estudo demonstram claramente que nas cavidades cirúrgicas do grupo controle e do grupo colágeno ocorreu regeneração óssea muito semelhante nos três períodos pós-operatórios avaliados. Entretanto, a regeneração óssea do grupo mamona não se apresentou tão qualitativa quanto os dois grupos anteriores.

No período de 07 dias pós-operatórios do nosso trabalho, verificamos que os grupos controle e colágeno apresentaram uma cavidade óssea cirúrgica preenchida por trabéculas ósseas neoformadas circundadas por tecido conjuntivo frouxo. Entretanto a cavidade do grupo mamona apresenta-se preenchida por poucas trabéculas ósseas neoformadas e uma grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo. Acreditamos que este fato possa ter ocorrido em razão da provável invaginação da membrana de mamona em direção ao defeito, devido a pressão exercida pelos tecidos moles sobre esta membrana. Segundo LOPES (1999) tal fato parece ser uma causa comum de falha na regeneração óssea, quando se utiliza este tipo de membrana.

Em nosso trabalho, a análise histológica das amostras do período pós-operatórios de 14 dias demonstrou uma evolução no processo de regeneração óssea. As cavidades cirúrgicas recobertas com a membrana de colágeno apresentam um tecido ósseo neoformado com características mais maduras e mais bem organizado do que a dos animais do grupo controle e do grupo mamona. Entre este dois últimos grupos, as cavidade cirúrgicas do

grupo controle apresentaram um resultado melhor em termos de neoformação óssea das cavidades do grupo mamona.

A integração tecidual apresentada pela membrana de colágeno provavelmente está relacionada a suas propriedades biológicas. As fibras de colágeno são um excelente substrato para a adesão celular e servem como arcabouço temporário para o crescimento de tecido conjuntivo. Além disso, os produtos de degradação deste material propiciam maior desenvolvimento fibroblástico (GREENSTEIN & CATON, 1993).

Os resultados da análise histológica no período pós-operatório de 21 dias mostrou que as cavidades cirúrgicas dos grupos controle e colágeno apresentavam-se preenchidas por tecido ósseo neoformado, sendo que ainda era possível observar algumas poucas áreas de tecido conjuntivo. As cavidades cirúrgicas do grupo mamona embora apresentassem boa quantidade de tecido ósseo neoformado, ainda era possível observar uma quantidade razoável de tecido conjuntivo denso em seu interior. Acreditamos que este fato possa ter ocorrido em razão dos produtos de degradação deste material que possam ter penetrado no interior da cavidade, proporcionando um atraso no processo de regeneração óssea.

Diante dos resultados ficou evidente que as membranas de colágeno exerceram a função de barreira mecânica, impedindo que o tecido fibroso penetrasse no interior da cavidade óssea cirúrgica.

De acordo com GALCUT *et al.* (1991) a quantidade de formação óssea depende também da quantidade da membrana. Os melhores resultados obtidos com a membrana de colágeno, possivelmente estão

relacionadas às próprias características da membrana, como composição química, espessura, textura e porosidade. A proteção de defeitos ósseos com membrana biocompatível, facilita a migração de células com potencial osteogênico.

CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais deste trabalho e, com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

1. A membrana de colágeno foi efetiva em promover a regeneração óssea das cavidades ósseas cirúrgicas, nos períodos pós-operatórios de 7, 14 e 21 dias.
2. A membrana de polímero de mamona permitiu que ocorresse regeneração óssea das cavidades cirúrgicas, porém, não tão efetiva quanto ao que ocorreu nos grupos controle e colágeno.
3. Histologicamente, tanto o grupo controle quanto os grupos experimentais (colágeno e mamona) apresentaram um aumento na neoformação óssea ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERIUS, P.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adults rats using a membrane technique. *J. Oral Maxillofac. Surg*, 50: 829, 1992.
2. BAKKER, D.; *et alli* – Biocompatibility of a polyester urethane, polypropylene oxide and polyester copolymer. A quantitative and membrane materials in the rat middle ear. *J Biomed Mater Res*, 24: 489, 1990.
3. BECKER, W.; *et alli* – Localized ridge augmentation using absorbable pins and e_PTFE barrier membranes: a new surgical technique. Case reports. *Int J Periodontics Rest Dent*. 14(1): 49-61, 1994.
4. BLUMENTHAL, N.M. The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. *J Periodontol*, 59(12): 830-836, 1988.
5. BUSER, D. *et alLi*. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. I. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Rest Dent*. 13(1): 29-45, 1993.
6. CAMPBELL, J.B.; BASSET, C.A.L. The surgical application of mononuclear filters (Millipore) to bridge gaps in peripheral nerves and the prevent neuroma formation. *Surg Forum*, 7: 570, 1956.
7. CANCIAN, D.C.J. *et alli* Avaliação das membranas de colágeno com diferentes períodos de “cross-linkage”. Estudo histológico em subcutâneo de ratos. *Rev Odontol Unesp*, 21: 181-190, 1992.

8. CARVALHO, T.L.L.; *et alli* Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 26(2): 149-152, 1997.
9. CAVALIERI, I. *Estudo do processo de reparação ósseo entre os implantes de polímero de mamona, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo, em tibia de coelhos*. 2000. 180p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de odontologia de São José do Campos – Unesp – São José dos Campos.
10. COSTA, C.A.S.; *et alli* Biocompatibilidade do polímero de poliuretana vegetal derivada do óleo de mamona em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol. Avaliação histopatológica de implantes subcutâneos de ratos. *Odonto*, 2000, 1: 44, 1997.
11. DAHLIN, C. *et alli* Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*, 81: 672, 1988.
12. DAHLIN, C. *et alli* Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: na experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 4: 19, 1989.
13. FERREIRA, C.M.; BONIFÁCIO, K.C.; FRÖNER, I.C. Avaliação da atividade antimicrobiana de soluções irrigantes em dentes com necrose pulpar. *Anais da XIII Reunião Anual da SBPqO*, p. 118, Águas de São Pedro, 1996,
14. FIORELLINI, J.P.; NEVINS, M. Bone regeneration. Repair and regeneration of oral tissues: the molecular approach. *Postgrad Dent*, 3: 3, 1996.

15. FRAME, J.W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg*, 38: 176, 1980.
16. FUGAZZOTTO, P.A. *et alli* Guided bone regeneration around titanium implants. Report of treatment of 1,503 sites clinical reentries. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 17(3): 293-299, 1997.
17. GALGUT, P. *et alli* Histological evaluation of biodegradable and non-degradable membranes placed transcutaneously in rats. *J Clin Periodontol*, 18(8): 581-586, 1991.
18. GOTTLow, J. *et alli* New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*, 13: 604, 1986.
19. GREENSTEIN, G.; GATON, J.G. Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. *Periodontology 2000*, 1(1): 36-45, 1993.
20. HÄMMERLER, C.H.F. *et alli* Osseous healing of experimental created defects in the calvaria of rabbits using guided bone regeneration. A pilot study. *Clin Oral Implants Res*, 3: 144, 1992.
21. HENNING, E. *et alli* Biostability of polyurethane. *Exp Chir Transplant Kunstliche Organe*. 22:204, 1989.
22. HOLLINGEWR, J.O. *et alli* a comparison for four particules bone derivates. *Clin Orthop And Relat Research*, 267:255, 1991.
23. HÜRZELER, M.B. *et al.* Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided regeneration around exposed implant threads. *Inst J Maxillofac Surg*, 27: 315-320, 1998.

24. IGNÁCIO, H. *Utilização do cimento derivado do polímero da mamona no preenchimento de falha óssea. Estudo experimental em coelhos.* Ribeirão Preto(SP), 1995. 113 p. (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
25. IGNÁCIO, H. *et alli* Estudos sobre a aplicabilidade médica da poliuretana derivada da mamona. *Res Orthop* 2(1): 10-15, 1996.
26. JOVANOVIĆ, S.A. *et alli* Guided tissue regeneration around titanium dental implants. In: LANEY, W.R.; TOLMEN, D.E. *Tissue integration in oral orthopedic and maxillofacial reconstruction.* Quintessence, p. 208-215, 1992.
27. LINDE, A. *et alli* Creation of new bone by na osteopromotive membrane technique: an experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg*, 51(8): 892-897, 1993.
28. LOPES, M.C.A. *Avaliação da efetividade das membranas de colágeno e celulose no tratamento de defeitos ósseos tipo fenestração associados a implantes dentais. Análise histológica, histométrica e biomecânica em cães.* Piracicaba(SP), 1999. 141p. [Doutorado] Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
29. LUNDGREN, D. *et alli* Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *J Craniomaxillofac Surg*, 20(6): 257, 1992.
30. MLCHER, A.H. On the repair of potential periodontal tissues. *J Periodontol*, 47: 256, 1976.

31. MINABE, M. *et alli* Different cross-linked types of collagen implanted in rat palatal gingiva. *J Periodontol*, 60(1): 32-43, 1989.
32. OHARA, G.H. *et alli* Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. *Acta Ortp Bras*, 3(2): 62-68, 1995.
33. OTA, K. Towards and ideal polyurethane graft for hemodialysis. *J Biomater Appl*, 4:141, 1989.
34. PEREIRA, S.L.S. *Avaliação histológica e histométrica do uso de membranas não reabsorvíveis e reabsorvíveis em defeitos periodontais cirurgicamente criados em cães*. Piracicaba(SP), 1999, 85p. [Doutorado] Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
35. PFEIFER, J. The reaction of alveolar bone to flap procedures in man. *Int J Periodontics Rest Dent*, 3: 135-140, 1965.
36. PINEDA, L.M. *et alli* bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III Effect of ply (L-lactide) membranes pore size on the bone healing process in large defects. *J Biomed Mater Res*, 31: 385, 1996.
37. Projeto PADCT. Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseados em poliuretanas derivadas da mamona. *Edital SNMO2194-04*, Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos/USP, 1994.
38. RESTREPO, L.L. *et alli* Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado. *Rev Bras Implant*. 4: 8, 1998.

39. REYNOLDS, M.A.; BROWERS, G.M. Periodontal regeneration following surgical treatment. *Curr Op Period*, 3: 126-139, 1996.
40. SIGURDSSON, T.J. *et alli* Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carries. *Int J Periodont Rest Dent*, 16: 525, 1996.
41. SIMION, M. *et alli* Jawbone enlargement using immediate implant placement associated with a split-crest technique and guided regeneration. *Int J Periodont Rest Dent*, 12(6): 463-473, 1992.
42. SIMION, M. *et alli* Qualitative and quantitative comparative study on different filling materials used in bone tissue regeneration. A controlled clinical study. *Int J Periodont Rest Dent*, 14(3): 199-215, 1994.
43. TAGA, R. *et alli* Reparo do defeito ósseo em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. *Rev Bras Implant*, 3: 13, 1997.
44. TEIXEIRA, H.M.; VILARINHO, R.H.; RAMALHO, L.T.O. Reação à resina de mamona no processo de reparo ósseo induzido no corpo mandibular. *ANAIS da XIII Reunião anual da SBPqO*, p. 189, Águas de São Pedro(SP), 1996.
45. TEÓFILO, J.M.; ARAÚJO, C.A.C.A.; CARVALHO, T.L.L. Biocompatibilidade do polímero de *Ricinus communis* implantado no alvéolo de rato. *ANAIS da XIII Reunião anual da SBPqO*, p. 119, Águas de São Pedro(SP), 1996.
46. URIST, MR. Bone formation by autoinduction. *Science*, 150: 893, 1965.
47. VILARINHO, R.H. *et alli* Implante de resina de poliuretana vegetal na câmara anterior do olho de camundongo. Estudo histológico. *Odonto* 2000, 1: 25, 1996.

48. YAMAMOTTO, T.T.; KAWAKAMI, M.; SAKUDA, M. Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar clefts for testing bone-inductive agents. *J Oral Maxillofac Surg*, 51: 887, 1993.