Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

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

MARCELA BRITTO DE PAIVA

Efeitos das membranas de látex natural e/ou colágeno na regeneração óssea guiada em tíbias de ratos

Ribeirão Preto – SP

2018

MARCELA BRITTO DE PAIVA

Efeitos das membranas de látex natural e/ou colágeno na regeneração óssea guiada em tíbias de ratos

Versão Original

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Ribeirão Preto – SP

2018

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

Paiva, Marcela Britto de.
Efeitos das membranas de látex natural e/ou colágeno na regeneração óssea guiada em tíbias de ratos. Ribeirão Preto, 2018.
p. 135: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Orientador: Shimano, Antônio Carlos.

1. Regeneração óssea. 2. Látex 3. Defeito ósseo. 4. Colágeno. 5. Ratos.

Esta dissertação foi redigida de acordo com as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: Documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT) 3ª edição

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PAIVA, Marcela Britto de

Título: Efeitos das membranas de látex natural e/ou colágeno na regeneração óssea guiada em tíbias de ratos

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

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico este trabalho,

À **Deus**,

pelo dom da vida, por ter sempre me conduzido para o melhor caminho, protegendo e atendendo minhas preces. Por me dar sempre mais do que pedia. Por seu infinito amor, bondade e sabedoria.

À minha mãe, **Maria Aparecida de Britto**,

que sempre foi meu exemplo de luta, determinação e esperança. Por ter sempre acreditado em mim e na minha capacidade e por ter sido meu alicerce em todos os momentos. Muito obrigada pelo seu amor, carinho e cuidados.

Ao meu pai, **José Aparecido de Paiva**,

pela vida, amor e incentivo.

Ao meu noivo, **Evandro Rodrigues Thereza,**

por todo apoio, carinho, amor e paciência. Por ser meu motivo para sempre voltar. Por ser meu porto seguro.

Não foi fácil acompanhar toda essa fase de distância, queixas, medos e incertezas. Mas você esteve sempre ali me incentivando e acreditando em mim, muito mais do que eu mesma. Muito obrigada por confiar nas minhas decisões.

À minha irmã, **Cristiane de Paiva Guilherme**,

pelo amor, apoio e incentivo.

Aos meus **familiares,**

pelo apoio e incentivo, em especial as avós **Aurora Vieira de Britto** e **Nair Maieru Rodrigues** por todas as orações.

Agradecimentos

Agradeço à **Deus**, por permitir esta conquista.

Aos **anjos e santos,** que sempre me protegeram e atenderam.

As pessoas maravilhosas que Deus colocou em minha vida e fizeram este mestrado ser possível:

Ao meu orientador, professor. Dr. **Antônio Carlos Shimano**, por ter aceitado me orientar, por ser um exemplo de profissional, ético e responsável. Pelo convívio diário, e toda a troca de experiência pessoal e profissional, que foi extremamente importante para minha evolução. Além de tudo, pela amizade e carinho com todos os alunos. Me sinto lisonjeada em fazer parte do seu grupo.

Ao professor Dr. **Rondinelli Donizetti Herculano**, da UNESP de Araraquara-SP, pela parceria, por ter acreditado em meu potencial, sempre me incentivando, contribuindo para que eu não desistisse de ingressar no mestrado. E após o ingresso, com todo o apoio e participação em todos os momentos de dúvida, sempre atendendo meus chamados. Possuo grande admiração por ti.

Ao professor Dr. **José Batista Volpon**, por ter permitido o acesso ao laboratório de Bioengenharia. Pela disposição e simpatia.

Ao coordenador do Programa de Pós graduação, professor Dr. **Marcello Henrique Nogueira-Barbosa** pela disposição e gentileza.

Ao professor Dr. **Rodrigo Okubo** por ter me mostrado a possibilidade de realizar a pós-graduação na USP, me abrindo os caminhos para ter os primeiros contatos na Universidade.

À **Brígida Batista Brancaleon**, pela gentileza em me acolher e me apresentar ao programa de pós-graduação. Por compartilhar comigo sua casa, experiências no mestrado, e em Ribeirão Preto. Pelos ensinamentos e pela amizade que foi construída nestes anos.

A **Aline Azevedo** pela disposição em ajudar neste projeto e em outras questões relacionadas à pós-graduação. Questões estas que mostram sua amizade. Pelo interesse e preocupação pessoal. Muito obrigada.

A **Jéssica Suzuki Yamanaka e Ana Clara de Oliveira** pelo convívio diário, ensinamentos, troca de experiências e principalmente pela amizade construída.

A **Gabriela Rezende Yanagihara** pelos ensinamentos, toda ajuda quando necessitei e pela amizade, que espero ver crescer além da pesquisa e pós graduação.

A **Bruna Leonel Carlos** pela ajuda na delimitação das cirurgias, apoio nos momentos que precisei e amizade.

A **Ana Paula Macedo** pelo carinho, atenção e por estar prontamente disponível em ajudar, ensinar e participar de todas as fases deste projeto.

A **Mariana Maloste Butezloff** pelo convívio e disposição em ajudar com as análises de microtomografia.

Aos pós-graduandos **Carla, Patrícia, Yara, Suelen, Leonardo e Rodrigo Romero** pelo convívio e amizade.

Aos alunos de iniciação científica **Márcio Saito**, **Larissa Rosa** e **Amanda Soler**, pela ajuda nos dias de cirurgia, que com certeza contribuíram para o crescimento de vocês.

Ao amigo **Francisco Mazzocato** pela paciência em ensinar, disposição em prontamente ajudar, e pelos momentos de descontração, risadas e amizade sincera.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP, **Ismar Ribeiro** e **Maria Teresinha Moraes** pela amizade e convívio.

A **Rita Cossalter,** secretária do programa de Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, por sua disposição em ajudar com todas as questões relacionadas à pós-graduação. Pelo convívio, amizade e pelo sorriso sincero de todos os dias.

Ao professor **Dr. João Paulo Madergan Issa,** pela disponibilidade em utilizarmos os equipamentos e o Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-SP, para as análises histológicas. Bem como, agradeço pelas sugestões nesta dissertação.

Ao **Dimitrios Leonardo Pitol** e ao **Túlio R.V. de Paula Lopes,** técnicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-SP, pela ajuda oferecida para as análises histológicas.

A **Junia Ramos** técnica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-SP, pela imensa ajuda oferecida a mim nas análises histológicas. Por sua disposição e carinho.

A **Luana Elis Sabino,** estagiária da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara-SP, pela ajuda no escaneamento e reconstrução das imagens de Microtomografia. Meu muito obrigada.

A minha amiga **Cléa Souza** e pela amizade, amor e incentivo. Você é muito importante para mim.

Ao amigo Cônego **João Antônio Darcie** pela confiança, interesse, amizade e momentos de descontração nestes dois anos de convívio pessoal.

Agradeço à **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado, e a FMRP, por intermédio do Programa **PAE** pela bolsa no estágio em docência.

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado!

Aos **ratos**, animais experimentais, que sempre foram tratados por mim com muito carinho e profundo respeito, cujas vidas foram sacrificadas em benefício de novos conhecimentos, essenciais para a ciência.

Art. 3º "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

"Não se limite a pensar em realizar algo.

Tenha convicção que conseguirá realizá-lo."

Masaharu Taniguchi

Resumo

Resumo

PAIVA, M. B. **Efeitos das membranas de látex natural e/ou colágeno na regeneração óssea guiada em tíbias de ratos**. 2018. 135 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A não-união óssea devido a condições pós-traumáticas ou patologias apresentam grandes desafios para a prática ortopédica, onde a necessidade de analisar novos biomateriais que auxiliem no processo da regeneração, tem levado vários pesquisadores a estudarem a membrana do látex natural (LN) e colágeno (COL) como formas de tratamento através da regeneração óssea guiada. O uso do LN têm mostrado promissores resultados em aplicações biomédicas, apresentando características como biocompatibilidade, crescimento ósseo e estímulo natural à angiogênese. Estudos que utilizam as membranas de colágeno para a mesma finalidade também observaram bons resultados em relação à biocompatibilidade, função hemostática, poder de auxiliar na cicatrização de feridas, capacidade de estimular a adesão celular e quimiotaxia. Porém, possuem alto poder de se degradar antes de completar o período final de tratamento. Desta forma, a utilização de membranas contendo estes dois componentes pode auxiliar no processo de neoformação óssea através da regeneração óssea guiada (ROG), e o LN pode funcionar como matriz para a liberação controlada do colágeno no defeito. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da membrana mista, composta por LN/COL, no processo de reparação óssea em defeitos de tíbia de ratos. Para tanto, foram utilizados quarenta (40) ratos machos da raça *Rattus norvegicus albinus*, da variedade *Wistar*, com cinco semanas de idade e peso médio de 300 g. Foi realizado um defeito ósseo bilateralmente nas tíbias de todos os animais, que foram divididos em 4 grupos (n=10), sendo: grupo controle (C); e tratados: grupo látex natural (LN); grupo látex natural/colágeno (LN/COL) e grupo colágeno (COL). O tempo de tratamento foi de 42 dias e a eutanásia dos animais foi realizada por overdose de anestésico (ketamina/xilazina). Após a eutanásia, as tíbias de cada animal foram dissecadas e limpas das partes moles, e armazenadas de acordo com protocolo de cada análise. Foram realizadas análise de microtomografia computadorizada (micro CT), densitometria, ensaio mecânico, histologia, e reação de polimerização em cadeia quantitativo (RT-qPCR). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS® (Versão 20.0, IBM®, Armonk, EUA) e foi adotado nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para testar se os dados apresentavam ou não

distribuição normal. A comparação entre os grupos (dados paramétricos) foi realizada através do teste ANOVA com pós-teste de Tukey. Os dados não-paramétricos foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis. Foram demonstradas diferenças estatísticas no BV entre os grupos LN e CON ($p<0,008$); BV/TV do grupo LN/COL comparado ao CON ($p<0,016$) e ao LN ($p<0,016$); na neoformação óssea entre CON e COL ($p< 0,002$); e na força máxima quando comparado o grupo COL com CON ($p<0,050$) e ($p<0,001$). Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos na análise da DMO ($p=0,669$), colágeno ($p=0,224$), rigidez relativa ($p=0,461$), RANK L ($p=0,121$), OC ($p=0,066$) e OPG (0,287), porém, todas as membranas utilizadas demonstraram valores superiores ao grupo CON. Sendo assim podemos concluir que as membranas utilizadas como tratamento apresentaram eficácia na reparação óssea de tíbia de ratos, no entanto, as membranas de COL e LN/COL demonstraram resultados mais significativos no período analisado.

Palavras–chave: Regeneração óssea; Látex; Defeito ósseo; Colágeno; Ratos

Abstract

Abstract

PAIVA, M. B. **Effects of natural latex and/or collagen membranes on guided bone regeneration in rat tibiae.** 2018. 135 p. Dissertation (Master degree) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2018.

The non-union of bone due to post-traumatic conditions or pathologies presents major challenges for orthopedic practice, where the need to analyze new biomaterials that aid in the regeneration process, has led several researchers to study the natural latex (LN) membrane and collagen (COL) as forms of treatment through guided bone regeneration. The use of LN has shown promising results in biomedical applications, presenting characteristics such as biocompatibility, bone growth and natural stimulation to angiogenesis. Studies that use collagen membranes for the same purpose have also observed good results in relation to biocompatibility, hemostatic function, the power to aid wound healing, the ability to stimulate cell adhesion and chemotaxis. However, they have a high capacity to degrade before completing the final treatment period. Thus, the use of membranes containing these two components can aid in the bone neoformation process through guided bone regeneration (ROG), and the LN can function as a matrix for the controlled release of the collagen in the defect. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the mixed membrane, composed of LN / COL, in the process of bone repair in rat tibia defects. For this purpose, forty (40) male Rattus norvegicus albinus rats of the Wistar variety, with five weeks of age and average weight of 300 g were used. A bone defect was performed bilaterally in the tibiae of all the animals, which were divided into 4 groups (n = 10), being: control group (C); and treated: natural latex group (LN); natural latex / collagen group (LN / COL) and collagen group (COL). The treatment time was 42 days and euthanasia of the animals was performed by anesthetic overdose (ketamine / xylazine). After euthanasia, the tibia from each animal were dissected and cleaned from the soft tissues, and stored according to each analysis protocol. Computed microtomography (micro CT), densitometry, mechanical assay, histology, and quantitative polymerization (RT-qPCR) were performed. Statistical analysis of the data was performed using the SPSS® program (Version 20.0, IBM®, Armonk, USA) and a significance level of 5% was adopted ($p \leq 0.05$). The Shapiro-Wilk test was used to test whether or not the data presented normal distribution. The comparison between the groups (parametric data) was performed through the ANOVA test with Tukey post-test. Non-parametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Statistical differences in BV

were found between the LN and CON groups ($p < 0.008$); BV / TV of the LN / COL group compared to the CON ($p < 0.016$) and the LN ($p < 0.016$); in the bone neoformation between CON and COL ($p < 0.002$); and maximal strength when compared to the COL group with CON ($p < 0.050$) and ($p < 0.001$). The results showed that there was no significant difference between groups in the analysis of BMD ($p = 0.669$), collagen ($p = 0.224$), relative rigidity ($p = 0.461$), RANK L (p = and OPG (0.287), however, all the membranes used showed higher values than the CON group. Thus, it can be concluded that the membranes used as treatment showed efficacy in rat tibia repair, however, the COL and LN / COL membranes showed more significant results in the analyzed period.

Keywords: Bone Regeneration; Latex; Bone Defect; Collagen; Rat.

Listas

Lista de Figuras

Figura 1: Representa a posição da membrana oclusiva após a realização do defeito ósseo e reposicionamento do músculo. 50
Figura 2: Representa a estrutura molecular do látex natural 51
Figura 3: Representa e fórmula e estrutura molecular do colágeno 53
Figura 4: Mostra membranas de LN (A), LN/COL(B) e COL(C). 69
Figura 5: Apresenta a sequência de produção da membrana de LN. A) Látex líquido depositado em placa Petri; 70
Figura 6: Distribuição dos animais por grupos CON; LN; LN/COL e COL. 70
Figura 7: Etapas do procedimento cirúrgico para realização do defeito ósseo e tratamento: A) Tricotomia e incisão na pele; B) Exposição da face medial da tíbia; C) Broca trefina utilizada para a realização do defeito sob irrigação constante de solução fisiológica estéril; D) defeito ósseo; E) Aplicação da membrana sobre o defeito; F) Sutura do músculo e da pele. 72
Figura 8: Desenho esquemático que ilustra as regiões de pigmentação de porfirina. As regiões numeradas em 0 são as sem depósito de porfirina e 4 para a máxima quantidade de porfirina. 73
Figura 9: Imagem das tíbias na análise de DMO. 75
Figura 10: Transposição da escala real para a imagem escaneada do software do equipamento. 75
Figura 11: Imagem representa o posicionamento de uma tíbia de rato durante o ensaio de flexão em três pontos 76
Figura 12: Etapas da análise do colágeno total por área total nos defeitos ósseos. 78
Figura 13: Etapas do procedimento de análise do defeito ósseo em lâminas coradas com tricrômio de Masson. 78
Figura 14: Gráfico da morfologia da tíbia direita quanto ao comprimento 85
Figura 15: Gráfico da morfologia da tíbia esquerda quanto ao comprimento. 86
Figura 16: Gráfico da DMO dos quatro grupos estudados. 86
Figura 17: Gráfico demonstra resultado da força máxima das tíbias em todos os grupos. 87
Figura 18: Representa a rigidez relativa dos grupos estudados. 88
Figura 19: Análise qualitativa comparando os quatro grupos estudados para a presença de colágeno na região do defeito em aumentos de 5x (1ª coluna) e 10x (2ª coluna). 89
Figura 20: Representa o resultado obtido na análise de colágeno total. 90

Figura 21: Fotomicrografias da análise da neoformação óssea em aumento de 50x (1ª coluna) e 100x (2ª coluna). 91
Figura 22: Gráfico representa o resultado obtido na análise de neoformação óssea. 92
Figura 23: Demonstra graficamente os resultados da BV entre os grupos. 93
Figura 24: Gráfico representa a BV/TV entre os grupos. 94
Figura 25: a) Imagens 3D a partir do µ-CT contendo os defeitos ósseos. b) Vista em plano sagital definida para análise. 94

Lista de tabelas

Tabela 1 : Ciclo de conversão de RNA para cDNA demonstrados em temperatura e tempo. 80

Tabela 2: Representa a sequência dos iniciadores utilizados neste estudo. 81

Tabela 3: Representa a mediana e intervalo de confiança dos genes analisados para RANK L; OC e OPG. 95

Lista de abreviações

Col.Ar	Área de colágeno
Tb.Ar	Área de osso trabecular
Ct	Threshold cycle
DXA	Absormetria de Dupla Emissão de Raios-X
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ROG	Reparação Óssea Guiada
RANKL	Ligante do fator nuclear Kappa β
RANK	Receptor ativador do fator nuclear β
OPG	Osteoprotegerina
BMPs	Proteinas morfogenéticas ósseas
OC	Osteocalcina
TNF α	Fator de necrose tumoral α
IL	Interleucina
CaP	Fosfato de Cálcio
SNC	Sistema Nervoso Central
MSCs	Células-Tronco Mesenquimais
EPCs	Células Progenitoras endoteliais
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
COM	Grupo controle
LN	Látex Natural
LN/COL	Látex Natural/Colágeno
COL	Colágeno
ROI	Região de interesse do objeto
DMO	Densitometria Mineral Óssea
c1	Comprimento da tíbia na escala real
c2	Comprimento da tíbia escaneada pelo densitômetro
p1	Posição do defeito na escala real

p2	Posição do defeito escaneado pelo densitômetro
EDTA	Ácido etienodiamino tetra-acético
PBS	Solução tampão de fosfato de salina
BV	Volume ósseo
BV/TV	Volume ósseo/Volume total
RT qPCR	Reação de Polimerização em Cadeia quantitativo
Micro CT	Microtomografia computadorizada
n	Número de animais por grupo
RNA	Ácido ribonucleico
cDNA	DNA complementar
PLA/PGA	Ácido Polilático/Ácido Poliglicólico
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
pH	Potencial Hidrogeniônico
N	Newton
N/mm	Newton/milímetro

Lista de unidades

mm	milímetro
g	gramas
xg	força
ºC	grau Celsius
mg	miligrama
kg	quilograma
cm	centímetro
rpm	rotações por minuto
cm^2	centímetro quadrado
N	Newton
min	minuto
mm^2	milímetro quadrado
µm	micrometro
$µm^2$	micrometro quadrado
$µm^3$	micrometro cúbico
kcal	quilocaloria
GPa	gigapascal
Mmol	milimolar
v/v	volume/volume
mL	mililitro
kD	kilodalton
µL	microlitro
L	litro
Ng	nanograma

Lista de símbolos

%	porcentagem
±	mais ou menos
®	marca registrada
©	direito autoral
/	intervalo entre dois números

Sumário

Sumário

1 INTRODUÇÃO 45

1.1 Tecido ósseo e ossificação 45

1.2 Remodelação Óssea 47

1.3 Reparação Óssea 48

1.4 Regeneração Óssea Guiada 49

1.5 Defeito ósseo 50

1.6 Látex Natural 51

1.7 Colágeno 53

1.8 Látex Natural/Colágeno 55

2 HIPÓTESES 59

3 OBJETIVOS 63

3.1 Objetivo geral: 63

3.2 Objetivos específicos: 63

4 MATERIAIS E MÉTODOS 67

4.1 Ética experimental 67

4.2 Animais experimentais 67

4.2.1 Alojamento e alimentação 67

4.3 Preparação das membranas 68

4.4 Grupos experimentais 70

4.5 Procedimento cirúrgico 71

4.6 Eutanásia, preparo e descarte 72

4.7 Teste Amostral 72

4.8 Análises 73

4.8.1 Análise clínica dos animais 73

4.8.2 Análise macroscópica 73

4.8.3 Micro CT *73*

4.8.4 Densidade Mineral Óssea *74*

4.8.5 Análise Mecânica *75*

4.8.6 Análise Histológica *76*

4.8.7 Quantificação de neoformação óssea *78*

4.8.8 RT-qPCR *79*

4.9 Análise estatística **82**

5 RESULTADOS **85**

5.1 Comprimento das tíbias **85**

5.2 Densidade Mineral Óssea **86**

5.3 Força Máxima **87**

5.4 Rigidez Relativa **87**

5.5 Colágeno total **88**

Na análise quantitativa do colágeno (Figura 19) sobre a presença de luz polarizada, não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,224). ***89***

5.6 Neoformação óssea **90**

5.7 Micro CT **92**

5.7.1 Volume Ósseo (BV) *92*

5.7.2 Volume Ósseo/Volume Total *93*

5.8 RT-qPCR **95**

6 DISCUSSÃO **99**

7 CONCLUSÕES **111**

8 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS **115**

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO **119**

REFERÊNCIAS **123**

ANEXOS **131**

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A restauração de falhas ósseas decorrentes de condições pós-traumáticas ou patológicas continua sendo um dos maiores desafios na prática ortopédica, de modo que, além da dificuldade de consolidação e dos riscos de fraturas, os gastos anuais com os tratamentos são preocupantes (BUZA; EINHORN, 2016). Razão pela qual, estudos relacionados à consolidação óssea, cada vez ganham mais destaque na ortopedia, tendo como foco principal diminuir o tempo de consolidação de fraturas devido ao crescente número de acidentes automobilísticos (MARSELL; EINHORN, 2011).

Para atender esta alta demanda, somente nos Estados Unidos, por exemplo, são realizados anualmente, mais de 250.000 enxertos ósseos, gerando grandes despesas financeiras para a saúde pública (MARSELL; EINHORN, 2011).

A tíbia é o osso longo mais comumente fraturado. Apesar dessa estrutura não ser protagonista de muitos estudos científicos, ela está associada a uma grande incidência de retardo na consolidação e não-união óssea (CROCI et al., 2003).

O sucesso no reparo ósseo quer seja de um defeito ósseo, quer seja de uma fratura, é alcançado quando o tecido ósseo é capaz de reestabelecer suas funções fisiológicas e suas propriedades mecânicas. Sendo assim, conforme o calo formado progride nas fases da consolidação, ocorre também um aumento na força e rigidez da estrutura óssea (AUGAT et al., 2014). Portanto, quando a consolidação óssea é inadequada, as consequências podem ser devastadoras, que vão desde uma alteração estética a uma importante perda da função ou do membro (BUZA; EINHORN, 2016).

Diante desta situação, centros de pesquisa em todo o mundo buscam métodos alternativos para solucionar estes problemas. Um desses métodos é a Regeneração Óssea Guiada (ROG), uma técnica de baixo custo que pode ser utilizada para favorecer a formação óssea e o reparo ósseo, utilizando uma membrana biocompatível como barreira física contra a invasão local de tecidos não osteogênicos e que protege o coágulo sanguíneo (GRUBER; STADLINGER;TERHEYDEN, 2016).

1.1 *Tecido ósseo e ossificação*

O tecido ósseo é metabolicamente ativo e composto por células, matriz óssea e membranas conjuntivas responsáveis por formar a estrutura esquelética e exercer importantes

funções ao organismo, como: sustentação corporal, proteção de órgãos internos e da medula óssea, armazenamento de cálcio e fosfato, participação na homeostase mineral e na hematopoese, e locomoção, juntamente com o sistema muscular (FLORENCIO-SILVA, 2015).

Os ossos podem ser classificados e divididos em longos, curtos e chatos. Nesta revisão, serão abordados, principalmente, os ossos longos, que apresentam sua estrutura interna dividida por três subcamadas: epífise, metáfise e diáfise (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

As epífises (proximal e distal) correspondem a extremidades do osso que se articulam com outros ossos, garantindo a absorção da maior parte das forças mecânicas exercidas pelo corpo, fatores externos e ação da gravidade. Esta região é constituída internamente por osso denominado esponjoso ou trabecular e externamente por osso cortical (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Abaixo da epífise proximal encontra-se a região conhecida como placa de crescimento. Esta região é responsável por fazer com que o osso possa crescer e atingir o tamanho ideal na fase adulta. Ao final desta fase a placa de crescimento é chamada metáfise (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

A diáfise corresponde ao corpo do osso, é composta por osso denominado compacto ou cortical, devido a maior aproximação das células ósseas, tornando essa região mais rígida e garantindo sustentação das epífises (TORTORA; DERRICKSON, 2012). Seu interior é constituído por um canal onde se aloja a medula óssea, que é responsável pelas funções imunológica e metabólica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A sua estrutura externa é envolvida por uma membrana de tecido conjuntivo que o protege, denominada, periósteo. Sendo este composto por células osteogênicas capazes de auxiliar nos processos de formação e reparo ósseo (FLORENCIO-SILVA, 2015). E sua estrutura interna é constituída por uma matriz orgânica, formada por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), colágeno e proteoglicanos. E por uma matriz inorgânica composta por fosfato de cálcio e água. O fosfato de cálcio interage com o hidróxido de cálcio transformando-se em hidroxiapatita. A partir desta transformação, outros materiais inorgânicos vão se incorporando, como: o carbonato de cálcio, sódio, magnésio e fluoreto (CONSTANTINESCU, 2002).

A matriz inorgânica garante alta rigidez ao osso, porém, é frágil e propensa a fratura. Portanto, se faz necessária sua junção com uma matriz orgânica, que garanta elasticidade,

tornando assim, o osso, um órgão com alta resistência mecânica (cerca de 18 GPa) (MORAES et al., 2012).

1.2 *Remodelação Óssea*

O osso está em constante formação e reabsorção, este equilibrado fenômeno acontece de forma natural e é conhecido como processo de remodelação, onde um processo de manutenção da homeostase se dá pela constante substituição de osso antigo por osso novo (PAIVA et al., 2016). Este processo permite a renovação de 5 a 15% da massa óssea total por ano (MORAES et al., 2012), harmonicamente, e por toda a vida, mas pode ser alterado se houver desequilíbrio entre eles (MORAES et al., 2012).

Para que ocorra a remodelação óssea é necessária a atuação de quatro tipos de células ósseas: os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e as células osteoprogenitoras (ANDIA; CERRI, 2015), através de um processo comandado por duas destas células que atuam em constante equilíbrio entre absorção e deposição óssea: os osteoclastos e os osteoblastos (FLORENCIO-SILVA, 2015).

A remodelação óssea acontece em conjuntos pequenos de células que são chamadas “unidades multicelulares básicas”, e consiste na reabsorção de certa quantidade de ossos pelos osteoclastos, e posteriormente, na formação de matriz osteóide pelos osteoblastos (AMADEI et al., 2006).

Os osteoclastos são derivados de células hematopoiéticas (TEITELBAUM, 2012), e são responsáveis por absorver osso velho, na mesma proporção que osso novo é formado, tornando este ciclo equilibrado (CHUNG et al., 2016). Em doenças onde ocorre falha na deposição de osso, como na osteoporose, esta proporção provoca alterações no ciclo (CHUNG et al., 2016).

No entanto, para que ocorra a deposição óssea, ou seja, a síntese de matriz óssea, é necessária a atuação dos osteoblastos, células osteoprogenitoras do esqueleto adulto originadas pelas células-tronco mesenquimais (MSCs). Os osteoblastos estão localizados na camada celular do periósteo, e possuem grande habilidade de formar osso e cartilagem (PAPACHRONI et al., 2009). Além disso, os osteoblastos são responsáveis pela deposição de osso através do aumento da secreção de osteóide e inibição da ação dos osteoclastos (CHUNG et al., 2016), fazendo com que ocorra a cristalização da hidroxiapatita, possibilitando que esse osso atinja a sua maturidade, quando passa a ser nomeado osteócito.

1.3 *Reparação Óssea*

Mesmo sendo conhecido por sua alta rigidez, o osso pode estar propenso a lesões em sua estrutura, isso ocorre, por exemplo, nas fraturas, sendo necessário que ele passe por um processo de reparação óssea (MARSELL; EINHORN, 2011).

Após a ocorrência de um trauma, além do osso, ocorre também lesão do periósteo, vasos sanguíneos e medula óssea, e todas estas estruturas necessitam de reparos. Imediatamente inicia-se a formação de um hematoma que é composto por células progenitoras endoteliais (EPCs) - células sanguíneas e da medula óssea (ALMUBARAK et al., 2016). Essas células possuem a capacidade de se diferenciar em células osteogênicas contribuindo tanto para a neovascularização quanto para a formação óssea durante a cicatrização (LEE et al., 2008). Nesta fase inicial, é fundamental uma secreção rápida e bem regulada de moléculas pró-inflamatórias como as citocinas (ANDRADE et al., 2011) necessária para que ocorra o processo de cicatrização, a partir da coagulação do hematoma ao redor das extremidades da fratura, e dentro da medula óssea, formando um calo ósseo inicial na região da ferida (AMADEI et al., 2006; QUEIROZ, 2008 ; ANDRADE et al., 2011).

A resposta inflamatória inicia seu pico já nas primeiras 24 horas após a lesão e perdura por sete dias, voltando a atuar e desenvolver um papel importante no final da reparação (CHO et al., 2002).

Este evento provoca o aumento da síntese da matriz extracelular, estimulando a formação de novos vasos sanguíneos que irão nutrir o osso que está sendo formado (OKUNO et al., 2016).

A reparação óssea é um processo complexo e envolve a expressão de vários genes (MARSELL; EINHORN, 2011).

Dois fatores reguladores são importantes na osteoclastogênese: ligante do receptor ativador do núcleo do fator kappa B (RANK L) e a osteoprogesterina (OPG). Eles são membros da superfamília TNF-α, e o aumento de suas expressões ocorre após a fase inicial da lesão, e durante o período de reabsorção da cartilagem mineralizada (GERSTENFELD et al., 2003). Na fase de formação óssea secundária e reparação óssea, é possível observar a presença de RANKL e OPG, porém, em menor quantidade. No entanto, devido a seu papel fundamental, ainda devem ser analisados nesta fase (GERSTENFELD et al., 2003; COLNOT, 2009).

No entanto, quando decide-se estudar as influências que interferem na reparação óssea deve-se observar outras sinalizações além da expressão gênica, como por exemplo, alterações relacionadas à fatores mecânicos. Estes dados podem ser avaliados através da ação de forças aplicadas no local da lesão (CLAES, 2011).

Se o movimento exercido no local lesionado for moderado, o que ocorre principalmente em ossos longos e curtos, uma cicatrização óssea endocondral e intramembranosa é estimulada de forma indireta sendo caracterizada pelo surgimento de um calo intermediário antes da formação do calo ósseo definitivo (QUEIROZ, 2008).

O local da fratura não recebe estabilização ou passa por redução anatômica, sendo exposto a micro movimentos funcionais que são benéficos para sua reparação. Contudo, deve-se ter cuidado, pois o excesso de movimento ou carga no local lesionado pode desencadear um atraso na cicatrização óssea ou até interferir na sua consolidação (GREEN et al., 2005).

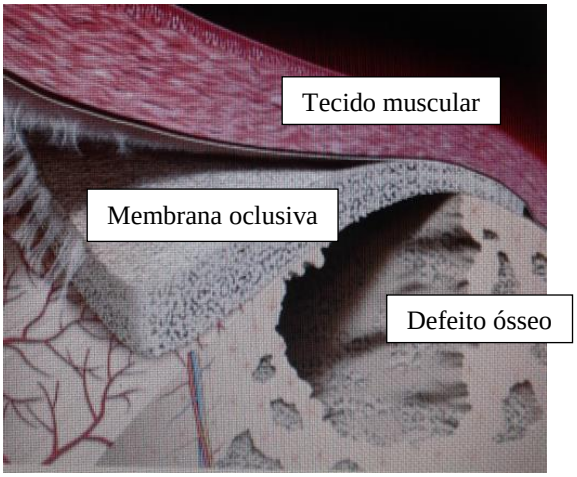
Se a região da lesão for estabilizada, através de placas e parafuso, o movimento será mínimo, e a reparação será de forma direta, sem a presença de calo ósseo (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012).

1.4 *Regeneração Óssea Guiada*

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) é uma modalidade terapêutica utilizada com finalidade reconstrutiva, onde uma membrana oclusiva é utilizada como barreira para selar o espaço do defeito ósseo. Essa membrana é colocada abaixo da musculatura (Figura 1) e funciona como uma barreira para separar células reparativas de proliferação lenta, de células de proliferação rápida, permitindo a reparação adequada da área lesionada (KARANCSI; BRATU, 2016).

A ROG é uma técnica que vem sendo utilizada e reconhecida por sua eficácia em diversos estudos científicos, demonstrando resultados promissores, principalmente em ossos chatos (MORAES et al., 2012).

Figura 1: Representa a posição da membrana oclusiva após a realização do defeito ósseo e reposicionamento do músculo.



Fonte: ELGALI et al., (2017).

Apesar da ROG ser amplamente utilizada na prática clínica em reconstruções maxilofaciais, (ELGALI et al., 2017) poucas pesquisas tem sido realizadas com o intuito de analisar os efeitos da técnica em ossos longos (TURRI et al., 2016), evidenciando, portanto, a necessidade de estudos adicionais que comprovem a eficácia de novos biomateriais que atuem na reparação do tecido ósseo e suas aplicabilidades no esqueleto apendicular.

Este método evita a migração dos fibroblastos para as camadas internas da lesão e impede a criação de tecidos fibrosos não osteogênicos (MRUE et al., 2004), proporcionando melhor qualidade na consolidação (através de organização de suas fibras de colágeno), além de favorecer a proliferação celular e cicatrização adequada (MARTINS et al., 2010).

Para auxiliar na ROG, são utilizados materiais com capacidade osteogênica, porém, para que o potencial do material seja considerado real, o defeito sem tratamento deve expressar má qualidade óssea neoformada ou complicações no seu completo reparo (PRADO et al., 2006).

1.5 *Defeito ósseo*

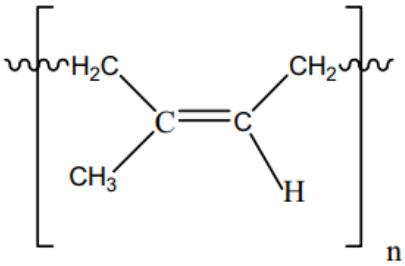
No modelo experimental de defeito ósseo é possível reproduzir alterações equivalentes às encontradas em seres humanos, sendo que, quando se utiliza animais como ratos, esses defeitos não devem ultrapassar o tamanho de 3,5mm em tíbias e 5mm em calvária (PRADO et al., 2006; ERENO et al, 2010). No entanto, uma variedade de análises podem ser reproduzidas neste modelo animal, com relevância significativa para melhorar técnicas e avanços na prevenção e tratamentos de reparação óssea (PRADO et al., 2006).

Os defeitos ósseos são realizados por meio de um procedimento cirúrgico com auxílio de equipamento específico capaz de romper uma cortical óssea até alcançar a medula óssea, ou seja, não ultrapassam as duas corticais (ERENO et al., 2010).

1.6 *Látex Natural*

O Látex Natural (LN) extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, é um sistema polidisperso sendo uma forma natural de poli-isopreno Cis (Figura 2), constituído por moléculas de borracha, não-borracha (proteínas, lipídios, carboidratos e açúcar) e água (FERREIRA et al., 2009). É uma substância que há anos é aplicada na indústria geral, como composto para fabricação de diversos materiais como luvas, balões e preservativos (BORGES et al., 2017).

Figura 2: Representa a estrutura molecular do látex natural



Legenda: Monómero de poliisopreno Cis
Fonte: FERREIRA et al., (2009)

Recentemente, várias aplicações biomédicas estão sendo propostas para o LN, considerando seus efeitos benéficos já observados na cicatrização de feridas. Estudos em tribos indígenas demonstraram que a membrana de LN possui características que favorecem a proliferação e cicatrização tecidual (BARROS et al., 2017). Adicionalmente, pesquisas que envolvem a utilização do LN na promoção da osteogênese na ROG da calvária e cura de alvéolos dentários evidenciam ausência de reações alérgicas, rejeição ou formação de tecido fibroso (BALABANIAN et al., 2006; ERENO et a., 2010).

Devido ao seu grande potencial de estimular a angiogênese, adesão celular e formação de matriz extracelular, o LN apresenta outras vantagens como elasticidade, flexibilidade, resistência mecânica, e principalmente, baixo custo de aquisição (MIRANDA et al., 2017). O LN possui características únicas para o processo de reparo ósseo, pois, devido às suas propriedades osteoindutoras (MOURA et al., 2014; TURRI et al., 2016), é capaz de

influenciar na formação de novo osso, a partir da diferenciação de células osteoprogenitoras, originadas de MSCs (BALABANIAN et al., 2006; ERENO et a., 2010).

Todos esses fatores comprovam a superioridade do LN quando comparado a outros materiais que também são utilizados na ROG, como, por exemplo, o colágeno (BUBALO et al., 2017), conhecido pela precoce degradação; o politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), que comprovadamente pode causar reações inflamatórias e, consequentemente, diminuição do osso neoformado no local do defeito ósseo (MOURA et al., 2014; FLORIANO et al., 2016) e as membranas de Ácido Poli-lático/Ácido Poli-glicólico (PLA/PGA), que também são absorvidas antes do período final de consolidação, apresentando neoformação óssea inferior ao desejado (SIMION, et al, 1997).

Deste modo, avaliar as características que diferem o LN de outros biomateriais é fundamental. Para isto, Mrué et al. (2000) realizaram estudo sobre as alterações histológicas decorrentes da implantação de uma membrana de LN no esôfago e parede abdominal de cães, observaram a presença de novos vasos sanguíneos formados no local estudado, além da adesão celular e formação de matriz extracelular, sem a formação de tecido fibrótico, o que foi favorável para o processo cicatricial.

Devido à escassez de informações sobre a biocompatibilidade das membranas de látex, Zimmermann et al. (2007), estudaram três diferentes membranas (látex centrifugado, látex não centrifugado e membrana comercial) implantadas na musculatura abdominal de cães. Após 45 dias a rejeição foi observada apenas nos animais que tiveram a membrana de látex não centrifugado implantada.

Da mesma forma, seu uso pôde ser comprovado através do estudo de Frade et al. (2004) que aplicou as membranas de LN centrifugado em lesões cutâneas, para o tratamento de úlceras diabéticas de membros inferiores maiores que 1 cm e originadas a mais de dois meses. Clinicamente, foi observada formação de tecido de granulação com diminuição do sintoma de dor. A nível histopatológico foi verificada a diferenciação do tecido cicatricial e áreas de neoangiogênese, com aumento do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (FRADE et al., 2004).

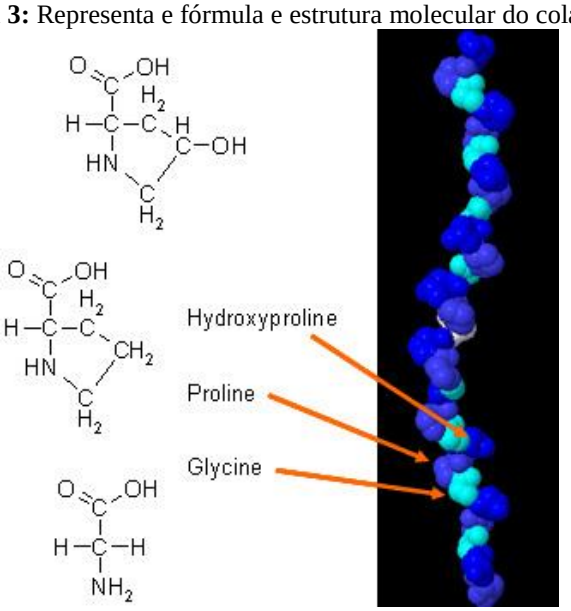
Avanços na experimentação celular e animal permitiram a evolução das pesquisas com o LN, possibilitando sua aplicação em humanos no tratamento de úlceras de pressão de pacientes diabéticos (SILVA et al, 2017). Entretanto, outros estudos experimentais com o LN atuando na ROG ainda são necessários, principalmente em ossos longos, pois, este tipo de pesquisa ainda não foi relatada na literatura, e informações sobre sua aplicação em outro tipo

de osso, diferentemente da calvária, devem ser esclarecidas, comprovando sua eficácia antes de serem iniciados testes clínicos deste tratamento na não-união óssea e atrasos de consolidação em humanos.

1.7 *Colágeno*

O colágeno (COL) é uma proteína fibrosa insolúvel, organizada em fibras resistentes que representam 30% das proteínas totais e 6% de todo peso humano (SCHWARZ et al., 2006). Cada molécula de colágeno é formada por três cadeias polipeptídicas, em torno de 1000 aminoácidos cada uma e apresentam formato de hélice composta por hidroxiprolina-prolina-glicina (Figura 3) (PARRY;SQUIRE, 2005). Classifica-se em mais de 20 tipos, que estão presentes em várias partes do corpo como a pele, ossos, cartilagem, e vasos sanguíneos.

Figura 3: Representa e fórmula e estrutura molecular do colágeno



Legenda: Formato de hélice composta por hidroxiprolina-prolina-glicina
Fonte: PARRY;SQUIRE (2005)

Estima-se que os colágenos tipo I, II e III estão presentes em 80-90% do corpo (BUBALO et al., 2017). Em combinação com sais de cálcio, o colágeno é responsável pela rigidez dos ossos, e em associação com a elastina, formam estruturas mais flexíveis presentes também nos ossos e pulmões (CHU, et al., 2017).

Os produtos comercializados à base de colágeno são compostos, principalmente, de colágeno tipo I e III, que são produzidos a partir de pele animal, tendões ou vísceras (KHOR, 1997).

O colágeno pode também ser comercializado na forma hidrolisada, através da quebra das proteínas em aminoácidos. Geralmente é utilizado na alimentação, como forma de suplementar sua ausência, sendo indicado para fortalecer as diferentes estruturas do corpo e para degeneração articular, ganho de massa, fortalecimento tissular e muscular (GUILLERMINET et al., 2012). Sua absorção ocorre no intestino, através da corrente sanguínea e sua ausência compromete a reparação óssea, pois aumenta a atividade dos condrócitos, e prejudica o crescimento e diferenciação de células osteoblásticas (GUILLERMINET et al., 2012). Apesar disso, sua eficácia ainda é questionada cientificamente.

Vários pesquisadores vêm analisando seus efeitos em procedimentos cirúrgicos experimentais como enxerto ósseo em implante dentário (KARANCSI; BRATU, 2016), como membrana na região subcutânea do dorso de ratos (SCHWARZ et al., 2006) e em feridas abertas de roedores (RHO et al., 2006).

Bubalo et al. (2017) relatam que as membranas à base de colágeno são utilizadas na prática clínica odontológica para aplicações relacionadas com a ROG de alvéolos dentários. No mercado comercial, podem ser observadas membranas de colágeno de diversas origens e espessuras. Portanto, estudos relacionados à sua efetividade são presentes na literatura.

As membranas confeccionadas a partir de colágeno apresentam várias propriedades vantajosas incluindo a biocompatibilidade, a função hemostática que permite uma estabilização precoce da lesão (SCHWARZ et al., 2006), possuem o poder de aumentar a espessura tecidual durante a cicatrização de feridas, além de capacidade de estimular a adesão celular e a quimiotaxia, tornando o colágeno um material ideal para o desenvolvimento de membranas (BUBALO et al., 2017).

No entanto, Schwarz et al., (2006) estudaram a aplicação de membranas de colágeno, e observaram uma rápida degradação após sua aplicação, resultando em uma baixa resistência da membrana, o que a torna suscetível ao colapso no defeito. Em um estudo realizado na Academia Médica Militar, da Universidade de Pristina-Kosovo (BUBALO et al., 2013), foi observado que os defeitos cobertos com membranas de colágeno reticuladas mostraram um melhor nível de vascularização em comparação com defeitos com membrana não reticulada ou com defeitos vazios.

Através do processo de reticulação da membrana por radiação ionizante, é possível alcançar um retardo no seu processo de degradação, no entanto, estudos com diferentes modelos de defeitos experimentais não obtiveram resultados positivos (BORNSTEIN, 2007;

CHU et al., 2017). Portanto, as informações resultantes da aplicação deste tipo de membrana ainda não estão totalmente esclarecidas.

1.8 *Látex Natural/Colágeno*

A utilização de membranas de COL e de LN, já são conhecidas na literatura atual, e a partir destes estudos, há inúmeras informações sobre suas aplicações, benefícios e limitações. No entanto, ainda são escassas as informações sobre o uso destes dois materiais em um único compósito. Dentre esses poucos trabalhos, destaca-se de Da Cruz et al. (2003), que estudou os efeitos piezoelétricos da interação destes dois materiais, e concluiu que a temperatura do colágeno é aumentada na presença do LN, resultando em diminuição da piezoeletricidade.

Um outro trabalho importante na área é o de Arlindo; Fuzari Jr e Malmonge (2006). Esses autores desenvolveram membranas de LN e colágeno hidrolisado por meio do método "*casting*", a partir de variação de proporções dos materiais, e posteriormente, analisaram os materiais utilizando as técnicas de calorimetria diferencial de varredura e espectroscopia, concluindo que o látex e o colágeno possuem interação compatível, e apresentam uma transição vítrea de – 61ºC independente da quantidade de colágeno adicionada.

Contudo, até o momento, não foram relatados estudos a partir da interação de Látex Natural/Colágeno (LN/COL) com aplicações *in vivo*, sendo que esta associação poderá agregar resultados positivos através da aplicação de uma membrana de colágeno hidrolisado associada ao LN para uso na ROG de tíbias de ratos.

Hipóteses

2 HIPÓTESES

H_0: As utilizações das membranas de LN; LN/COL e COL em defeitos ósseos nas tíbias de ratos, não apresentam diferença entre si quanto à reparação óssea.

H_1: As utilizações das membranas de LN; LN/COL e COL em defeitos ósseos nas tíbias de ratos, apresentam diferença entre si quanto à reparação óssea.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral:*

Avaliar o efeito da membrana de látex natural, de colágeno, e de látex natural associada ao colágeno no processo de reparação óssea em defeitos realizados na região metafisária de tíbias de ratos.

3.2 *Objetivos específicos:*

- Avaliar e comparar os efeitos de diferentes membranas quanto à morfologia, densidade mineral óssea, propriedades mecânicas, neoformação óssea, presença de colágeno, microarquitetura óssea e a expressão dos genes envolvidos no processo de reparação óssea.

Material e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Ética experimental*

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), através de número de protocolo 0084/2017 (ANEXO 1). Todos os procedimentos propostos estão de acordo com a Lei Número 11.794, de 08 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008) que regulamenta o uso de animais em pesquisa científica.

4.2 *Animais experimentais*

Foi realizado um estudo preliminar para definir a metodologia que seria empregada na realização do procedimento cirúrgico e um teste amostral para padronizar o número total de animais de acordo com as análises. Portanto, neste estudo foram utilizados 40 (quarenta) ratos machos da raça *Rattus norvegicus albinus*, da variedade *Wistar*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto, com 5 semanas de idade, pesando aproximadamente 300g, e ficaram alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP para a realização dos experimentos.

4.2.1 *Alojamento e alimentação*

Após a chegada ao biotério do Laboratório de Bioengenharia, os animais foram pesados, identificados, e mantidos em caixas coletivas de polipropileno forradas com maravalha (de 2 a 3 ratos por caixa), uma vez que esta espécie apresenta convivência coletiva.

Os animais foram mantidos em ambiente calmo e com condições normais controladas (22 ± 2°C, 55/60% de umidade e ciclo 12h claro/escuro), e sua alimentação foi à base de ração padrão para ratos e água à vontade.

Antecedendo o procedimento cirúrgico, os animais passaram por período de adaptação ao novo ambiente com duração de uma semana, sendo somente manipulados para pesagem e troca de maravalha.

4.3 *Preparação das membranas*

Antes do procedimento de implantação nos defeitos ósseos, as membranas de COL foram cortadas em discos de 6 cm x 4cm (base x altura) e reidratadas em solução salina fisiológica estéril, conforme instruções do fabricante.

Para as membranas que continham LN, foi utilizado o produto originado de uma mistura dos clones RRIM 600 e PB 235, já centrifugado e pronto para uso, fornecido pela empresa BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA-Brasil, e cedido pelo professor Dr. Rondinelli Donizetti Herculano, do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Com o objetivo de eliminar as proteínas de maior peso molecular, que estão relacionadas a reações alérgicas, o LN passa por processo de centrifugação à 8000g com adição de 0,5% de amônia, de forma a obter 60% de látex do conteúdo de borracha seca (BARROS et al., 2017), devido à separação de seus componentes em soro, proteínas e resíduos como cascas da árvore (BORGES et al., 2017).

A utilização da amônia se justifica por seus efeitos biocidas, pois, proporciona a sustentação do pH ligeiramente alcalino e mantém a estabilidade do látex (aniônico) (MIRANDA et al., 2017).

A União Internacional de Sociedades de Imunologia identificou as proteínas Hev b-1 à b-7 como alergênicas (ALLARCON et al., 2003), e Barros et al., (2017), demostraram que, no processo de centrifugação, 27% destas proteínas são removidas.

De acordo com Allarcon et al. (2003), as proteínas de 14 kD (Kilodalton) ou de 27 kD de tamanho, provavelmente estão relacionadas a reações alérgicas entre profissionais de saúde que utilizam luvas de látex diariamente.

É importante ressaltar também, que o LN utilizado neste estudo foi produzido sem vulcanizante, pois, neste processo, é adicionado o enxofre, e este material é considerado um dos maiores causadores de alergia (HERCULANO et al., 2009).

Posteriormente, a obtenção do LN, as membranas de LN e LN/COL foram produzidas no laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP seguindo a metodologia de Herculano et al. (2009) e Ereno et al. (2010) (Figura 4), adaptada para a adição de colágeno.

Figura 4: Mostra membranas de LN (A), LN/COL(B) e COL(C).

Fonte: Imagens A e B autoria própria. Imagem C disponibilizada pela GenDerm®, fabricante da membrana de colágeno.

O colágeno utilizado para confeccionar as membranas mistas (LN/COL), é derivado de osso e pele bovina, do tipo I, em pó, hidrolisado, sem incipientes, manipulado, e adquirido na empresa Hidrata Pharma Farmácia de Manipulação® (São José do Rio Pardo – SP, Brasil). O processo de fabricação se define em triturar o osso, que em seguida, é desengordurado embebendo em ácido para remover o cálcio, tratado e dissolvido em micro partículas para quebrar as ligações de colágeno, e finalmente, desidratado, resultando em aminoácidos (GUILLERMINET et al., 2012).

Para a produção das membranas foi adotado o método *"casting",* que consistiu em depositar soluções de LN, ou LN/COL em placa Petri com 6,0cm de diâmetro, formando uma fina camada de aproximadamente 0,50 mm de espessura (Figura 5). As soluções foram pipetadas nas placas com auxílio de pipeta da marca GILSON, modelo KD 52133, P1000 (100-1000µL), e permaneceram em secagem ar ambiente (com temperatura de 24ºC ± 2ºC) por 48 horas. As membranas de LN foram produzidas na proporção de 1,9 mL de LN e 1,25 mL de água destilada. As de LN/COL foram produzidas na proporção de 187,5mg de COL para 1,9mL de LN e 1,25mL de água destilada.

O COL foi previamente solubilizado em água destilada e misturado em agitador magnético por 3 minutos, para atingir sua dissolução. Em seguida foi acrescentado o LN com auxílio de pipeta, e misturado por mais 3 minutos.

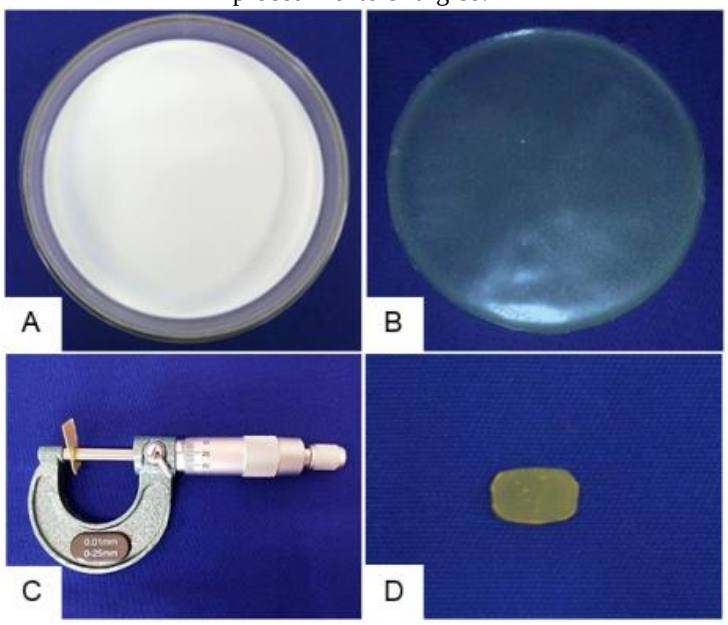
Após deposição nas placas e secagem (HERCULANO et al., 2009), as membranas foram cortadas e medida a espessura com micrômetro da marca Mitutoyo®.

Posteriormente, foram embaladas individualmente em material para autoclave, identificadas e enviadas à empresa ACECIL® para esterilização à óxido de etileno.

A terceira membrana utilizada foi adquirida comercialmente com o objetivo de comparar um produto já consagrado na prática clínica com as membranas desenvolvidas. Ela

é produzida a base de colágeno tipo I de origem óssea bovina, da marca GenDerm® Genius, fabricada pela Baumer S.A. (Mogi Mirin, SP, Brasil).

Figura 5: Apresenta a sequência de produção da membrana de LN. A) Látex líquido depositado em placa Petri; B) Membrana de LN pronta; C) Aferição da espessura da membrana; D) Membrana moldada para utilização no procedimento cirúrgico.

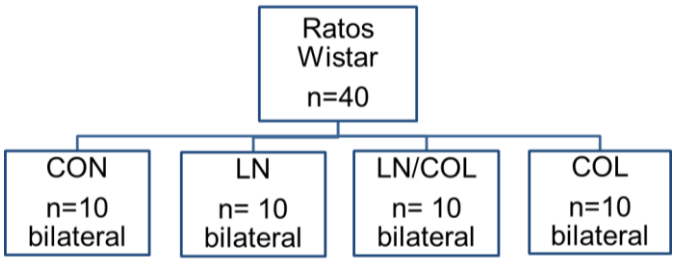


Fonte: Carlos (2017).

4.4 *Grupos experimentais*

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=10), Figura 6, sendo: grupo controle (CON) que não foi submetido à intervenção com nenhum tipo de membrana sobre os defeitos ósseos bilaterais; O grupo látex natural (LN), que foi submetido à intervenção com membranas de LN sobre os defeitos ósseos; grupo látex natural/colágeno (LN/COL) que foi submetido à intervenção com membrana de LN/COL sobre os defeitos ósseos, e grupo colágeno (COL), que foi submetido à intervenção com membranas de COL sobre os defeitos ósseos.

Figura 6: Distribuição dos animais por grupos CON; LN; LN/COL e COL.



4.5 *Procedimento cirúrgico*

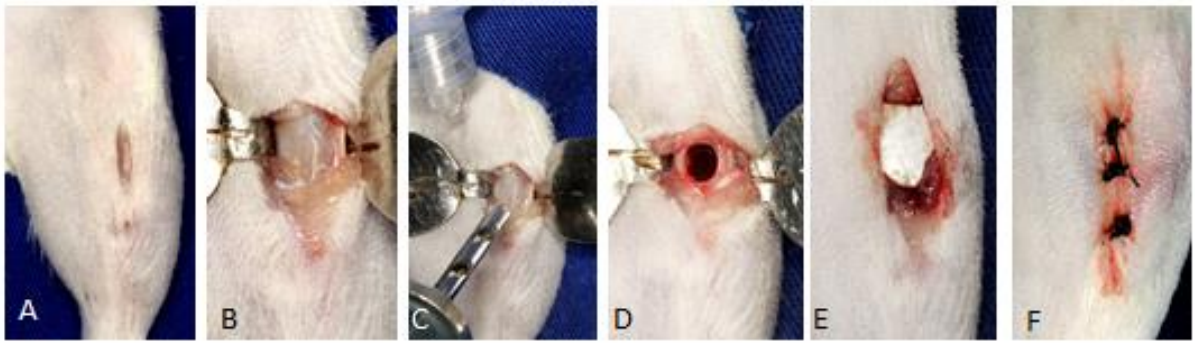
O procedimento cirúrgico (Figura 7) foi realizado bilateralmente em todos os grupos experimentais. A técnica foi baseada na metodologia de Prado et al. (2006). Os animais foram pesados e anestesiados com uma solução de 1,2 mL de ketamina (50 mg/kg) e 1,0 mL de xilazina (10 mg/kg), e aplicada 0,01mL/kg via intramuscular na região posterior da coxa. Após confirmação da anestesia, foi realizada administração 0,05 mL de pentabiótico em cada animal. Em seguida, foi feita tricotomia e a assepsia local dos membros pélvicos, e os animais foram encaminhados para a sala de cirurgia, onde foram posicionados em tríplice flexão do membro pélvico.

Foi localizada a articulação do joelho, e medido 1 cm a partir da articulação, com auxílio de escala metálica da marca *Trident*®. No terço médio da face proximal da tíbia, foi realizada uma incisão linear na pele e na musculatura de aproximadamente 1 cm, com lâmina de bisturi número 11, previamente montada em cabo de bisturi número 3.

A pele e os músculos foram afastados e um defeito ósseo foi realizado, com uma broca tipo trefina de 2,9 mm de diâmetro externo, acoplado a um micro motor elétrico (210/ 105L, Strong®, Korea) usado na odontologia, com aproximadamente 3000 rotações por minuto (rpm) e constante irrigação de solução fisiológica estéril de cloreto de sódio 0,9%, para evitar o superaquecimento do local.

Nos animais do grupo controle, foi realizado o defeito, porém, não houve intervenção de tratamento. Nos demais grupos foram posicionadas as membranas (LN, COL ou LN/COL), previamente esterilizadas e moldadas em tamanho adequado para cobrir a região do defeito. Após realizado o defeito e tratamento, todos os animais tiveram a musculatura suturada com fio absorvível de Vicryl 0,4 e a pele com fio não absorvível de Nylon 0,4. Uma dose de 0,2 mL de dipirona foi administrada via subcutânea logo após o procedimento cirúrgico e durante 3 dias, 2 vezes ao dia.

Figura 7: Etapas do procedimento cirúrgico para realização do defeito ósseo e tratamento: A) Tricotomia e incisão na pele; B) Exposição da face medial da tíbia; C) Broca trefina utilizada para a realização do defeito sob irrigação constante de solução fisiológica estéril; D) defeito ósseo; E) Aplicação da membrana sobre o defeito; F) Sutura do músculo e da pele.



Fonte: Arquivo pertencente ao estudo.

4.6 *Eutanásia, preparo e descarte*

Após o período experimental de 42 dias, os animais foram submetidos a eutanásia utilizando dose excessiva de anestésicos xilazina e ketamina (0,35 g/kg).

Posteriormente, foram dissecadas as tíbias direitas e esquerdas de cada animal, retirada das partes moles, identificadas e armazenadas até o dia das análises, obedecendo ao protocolo de cada análise a ser realizada. As tíbias direitas foram destinadas a análise de microtomografia computadorizada (Micro CT) (n=5), DMO (n=10) e ensaio mecânico (n=10). As tíbias esquerdas foram destinadas a histologia (n=5) e Reação de Polimerização em Cadeia quantitativo (RT-qPCR) (n=5).

As carcaças dos animais foram colocadas em saco plástico específico, identificadas e congeladas em freezer para posterior descarte e incineração no Biotério Central da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto.

4.7 *Teste Amostral*

Em estudo anterior de Yamanaka et al. (2017) foi avaliada a neoformação e verificado que o grupo controle apresentou desvio padrão de 3,08% e a diferença entre grupo experimental e grupo controle foi de 7,7%. Assim, considerando um poder 0,80 e a probabilidade de Erro Tipo I associada à hipótese nula de 0,05, chegou-se em um n=5 para as análise histológicas (neoformação óssea e colágeno). Também no estudo, foi verificado que o desvio padrão do grupo controle para força máxima foi de 6,6N e diferença entre grupo experimental e controle foi de 8,43N. Considerando um poder 0,80 e a probabilidade de Erro

Tipo I associada à hipótese nula de 0,05, chegou-se em um n=10 para esta análise mecânica e DMO. Para as análises de RT-qPCR e micro CT adotou-se n=5, número normalmente usado na literatura devido ao alto custo destas análises (BUTEZLOFF, 2018).

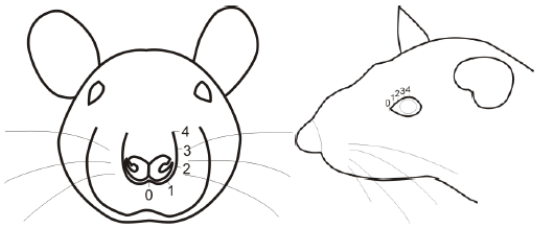
Para a realização do cálculo amostral foi utilizado o programa PS Power and Sample Size Calculations (Copyright © 1997-2009 by William D. Dupont and Walton D. Plummer).

4.8 *Análises*

4.8.1 *Análise clínica dos animais*

Durante todo o período experimental os animais foram analisados clinicamente, sendo observado a presença ou não de edema, inflamação, estresse através do aspecto geral dos animais, movimentação espontânea, sinais específicos na região periorbitária e focinho, condições da pelagem e massa corporal (Figura 8).

Figura 8: Desenho esquemático que ilustra as regiões de pigmentação de porfirina. As regiões numeradas em 0 são as sem depósito de porfirina e 4 para a máxima quantidade de porfirina.



Fonte: FALCAI, (2011).

4.8.2 *Análise macroscópica*

Antes das análises serem iniciadas, os ossos foram pesados em balança de precisão da marca Marte®, modelo AC-2000, com precisão de 0,01 g. O comprimento da tíbia foi medido com paquímetro digital da marca Mitutoyo® com precisão de 0,01 mm.

4.8.3 *Micro CT*

Após a eutanásia, as tíbias direitas foram retiradas, limpas e armazenadas em *freezer* da marca Electrolux® modelo FE 26, em temperatura de –20ºC. Para a análise de microtomografia computadorizada (micro CT), foi utilizado um aparelho de micro CT da

marca Bruker®, (SkyScan Bruker MicroCt Skycan, Kontich, Bélgica), pertencente a Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara.

Para analisar os parâmetros tridimensionais (3D) da região do defeito ósseo, as amostras foram escaneadas à 70 kVp e 357 µA, usando um filtro de alumínio de 1 mm, para otimizar o contraste, e um voxel cúbico de 18 um³. A análise seguiu os parâmetros de BV e BV/TV.

As reconstruções de imagens 3D foram feitas usando o *software* NRecon® (versão 1.6.9.8, Bruker®, Kontich, Bélgica), que forneceu secções transversais axiais das estruturas internas das amostras. A região de interesse foi delineada na metáfise proximal da tíbia, local do defeito ósseo.

A reconstrução foi manualmente selecionada e definida iniciando à 10 mm após o início da diáfise proximal por uma extensão de 3,0mm e o mesmo nível limiar foi utilizado em todas as amostras onde o defeito ósseo foi isoladamente demarcado. O *software* CTAn® (versão 1.13.11.0, Bruker®, Kontich, Bélgica) foi utilizado para determinar o nível de limiar ideal de binarização da imagem.

A arquitetura trabecular foi caracterizada pelo volume ósseo (BV) e pela fração do volume ósseo/volume total (BV/TV). A nomenclatura seguiu as recomendações da American *Society of Bone and Mineral Research* (BOUXSEIN et al, 2010). Foi utilizado o *software* CTVol® (versão 2.2.3.0, Bruker®, Kontich, Bélgica) para a obtenção das imagens em 3D.

4.8.4 *Densidade Mineral Óssea*

A análise da densidade mineral óssea (DMO) foi realizada no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, em aparelho modelo DPX-IQ da marca Lunar® (USA), com *software* DPX versão 4.7e, especial para pequenos animais e de alta resolução. Os ossos foram posicionados com a face medial da tíbia direcionada para cima, alinhados e submersos em um recipiente plástico contendo soro fisiológico a 2,0 cm de profundidade, onde foram adquiridas as imagens.

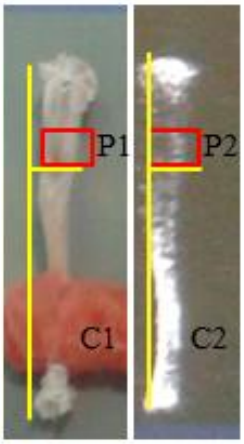
Para a realização das análises, foi utilizado o mesmo programa computacional e uma ferramenta especial de seleção para delimitar a região de interesse (ROI), que correspondente ao defeito ósseo (Figura 9). Para selecionar exatamente a região de estudo, os ossos foram mensurados com auxílio de um paquímetro, e por meio desta medida foi feita uma transposição da escala real para a imagem escaneada do *software* do equipamento (Figura 10),

em que: c1 é o comprimento da tíbia na escala real; p1 é a posição do defeito na escala real; c2 é o comprimento da tíbia imagem escaneada pelo densitômetro; p2 é a posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro. E a partir desta análise foi possível se obter o resultado de densidade mineral óssea (DMO) de cada amostra.

Figura 9: Imagem das tíbias na análise de DMO.

Fonte: Imagem pertencente ao estudo, disponibilizada pelo *software* DPX versão 4.7e.

Figura 10: Transposição da escala real para a imagem escaneada do software do equipamento.



Legenda: c1 é o comprimento da tíbia na escala real; p1 é a posição do defeito na escala real; c2 é o comprimento da tíbia imagem escaneada pelo densitômetro; p2 é a posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro.
Fonte: Arquivo pessoal.

4.8.5 *Análise Mecânica*

Posteriormente à densitometria óssea, os mesmos ossos foram submetidos ao ensaio mecânico de flexão em três pontos na máquina universal de ensaios EMIC® modelo DL10000N (São José dos Pinhais, Brasil), do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP.

Foi adotado o ensaio de flexão em três pontos, considerado de baixa velocidade e estático, onde a força é aplicada lentamente até o rompimento da amostra.

Para mensurar a força aplicada no ensaio, foi utilizada uma célula de carga com capacidade de 500 N com pré-carga de 5 N. O osso foi apoiado na base e na região que foi

realizado o defeito ósseo (Figura 11) com distância de 15 mm entre eles. A carga foi aplicada em sentido póstero-anterior da tíbia e adotada uma velocidade de aplicação da força de 5 mm/min. O *software* Tesc® foi utilizado para gerar um gráfico de carga *versus* deslocamento para cada ensaio. As propriedades mecânicas analisadas foram: força máxima (N) e rigidez relativa (N/mm).

Figura 11: Imagem representa o posicionamento de uma tíbia de rato durante o ensaio de flexão em três pontos.

Fonte: Própria autoria

4.8.6 *Análise Histológica*

Após a dissecação, as 5 tíbias esquerdas de cada grupo foram identificadas e imersas em formol 10% por 24 horas. Em seguida, foram colocadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% e água destilada, para a descalcificação, permanecendo por um período de 30 dias em temperatura ambiente, com troca da solução realizada a cada 2 dias.

Em seguida, as peças foram lavadas em água corrente *overnight* e desidratadas em série crescente de álcool, de 70% a 100%, permanecendo 1 hora em cada concentração. Os materiais foram então diafanizados em xilol, sendo realizadas 3 trocas com intervalos de 1 hora. Posteriormente, a parte inferior da tíbia (abaixo do defeito) foi cortada e descartada. Os blocos em parafina foram confeccionados de modo que a face medial da tíbia ficasse exposta para cortes. Foram realizados cortes no sentido longitudinal, sequenciais, de 5μm de espessura. Os fragmentos contendo a região do defeito foram capturados em lâminas de vidro com polilisina, onde cada lâmina conteve 4 cortes seriados.

Foram obtidas 18 lâminas de cada amostra e destas, 6 foram coradas pela técnica de *picro sirius red* (lâminas pares, 24 cortes), 12 pela técnica de tricrômio de *Masson* (lâminas impares, 48 cortes) buscando a identificação das estruturas para serem avaliadas no microscópico.

4.8.6.1 Quantificação de Colágeno

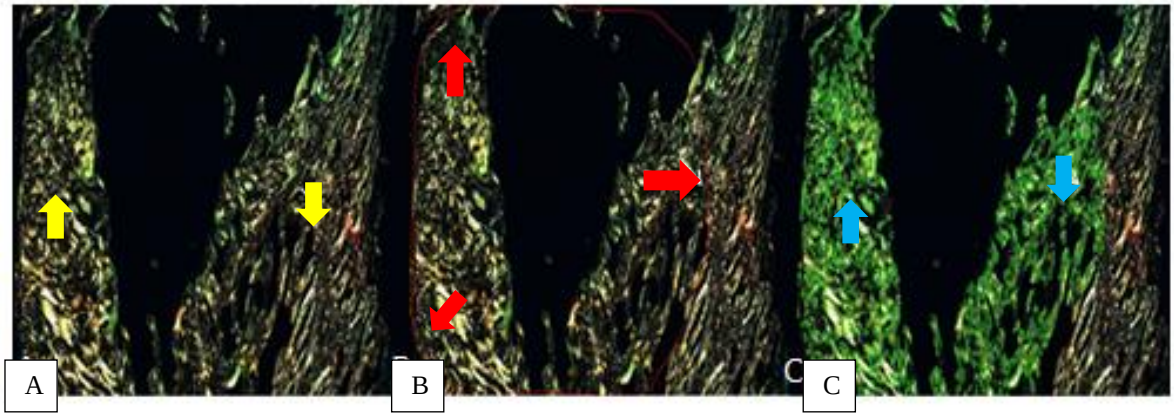
As lâminas pares foram coradas com a técnica de *picro sirius red* para quantificação do colágeno. Elas foram analisadas em microscópio óptico Axion lmager Z2® acoplado a uma câmera digital (Zeiss®) pertencentes ao Laboratório de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Este aparelho possui luz polarizada e através da birrefringência é possível observar as fibras colágenas. Nas cores amarelo e vermelho é possível identificar o colágeno tipo I (maduro) e em verde o colágeno tipo III (imaturo) (CURY et al., 2016).

A análise das fibras de colágeno foi feita em objetiva de 5x (vezes), somente na região do defeito ósseo, pelo programa Axiovision®, que capta as diferentes tonalidades e quantifica a área correspondente em µm² referentes às fibras sobre a luz polarizada. A área foi expressa pela razão da área de colágeno no defeito pela área total e apresentada em porcentagem de área (Col.Ar/Tt.Ar - %) (PARFITT et al., 1987).

Foram selecionados o 1º e o 3º corte de cada lâmina que foram então capturados para análise de colágeno.

A região de interesse foi demarcada e excluídas da quantificação as áreas fora do defeito (Figura 12). Este processo foi realizado nos dois cortes de cada lâmina que ao final da análise apresentou o valor correspondente, onde foi calculada a média destes dois valores de cada lâmina para a realização das análises estatísticas.

Figura 12: Etapas da análise do colágeno total por área total nos defeitos ósseos.

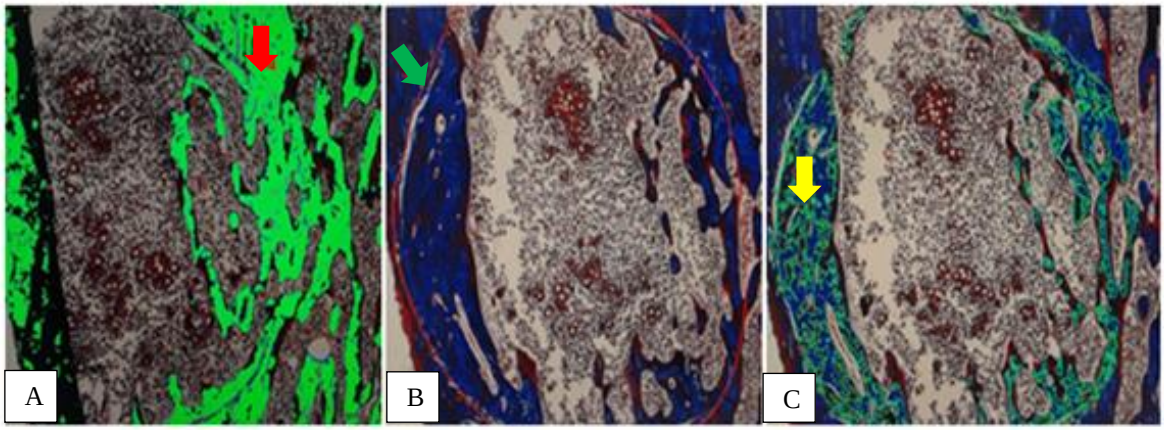


Legenda: A) Setas amarelas indicam as fibras de colágeno; B) Setas vermelhas indicam a delimitação da área de análise, representadas por um círculo vermelho; C) Setas azuis indica somente a área de interesse selecionada.
Fonte: Programa Axiovision®

4.8.7 *Quantificação de neoformação óssea*

As lâminas ímpares foram coradas com tricrômio de *Masson* para análise da neoformação óssea. Foram selecionados o 1º e o 3º corte de cada lâmina, que foram capturados para a realização da quantificação. A área de interesse foi expressa pela razão da área de osso pela área total (B.Ar/Tt.Ar-%), analisada através pelo programa Axiovision® em objetiva de 5x. As regiões contendo osso trabecular foram demarcadas em cor verde e em seguida somente a área de interesse foi selecionada e avaliada para obter-se a quantidade de osso trabecular neoformado (Figura 13). Após realização das análises, o resultado quantitativo dos 2 cortes de cada lâmina, foram tabelados e a média destes valores foi encaminhada para análise estatística.

Figura 13: Etapas do procedimento de análise do defeito ósseo em lâminas coradas com tricrômio de Masson.



A) Seta vermelha indica a marcação de osso trabecular; B) Seta verde indica a seleção da área de interesse; C) Seta amarela indica a quantificação da área de interesse.
Fonte: Programa Axiovision®

4.8.8 *RT-qPCR*

A técnica de Reação de Polimerização em Cadeia quantitativo (RT-qPCR) consiste na síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de pequenas quantidades de ácido ribonucléico (RNA) extraído das amostras (BUSTIN, 2000).

Para este estudo, 5 amostras de cada grupo (CON; LN;LN/COL e COL) foram utilizadas. Os ossos foram cortados nos sentidos sagital e transversal, com auxílio de um disco de carborundum de 2 cm de diâmetro e 0,2 mm de espessura, esterilizado, acoplado em um micro motor elétrico (210/ 105L, Strong®, Korea), delimitando somente a área do defeito ósseo que seria analisada. Os cortes mediram 3mm x 3mm.

Os preparos dos materiais foram realizados em condições apropriadas para não ocorrer desnaturação das proteínas e degradação de RNA, para isso, logo após os cortes, as amostras foram armazenadas em tubos plásticos esterilizados, contendo solução de RNAlater (Thermo Fischer®), para preservar a integridade do RNA, e foram alocados em freezer -70°C até o processamento das amostras.

Para o procedimento de trituração foi utilizado gral e pistilo de alumínio da marca Prolab® previamente esterilizados. E em uma bancada esterilizada foi colocada uma caixa de isopor pequena e adicionado nitrogênio líquido. O gral e pistilo foram colocados dentro da caixa para congelar.

O tubo com cada amostra foi colocado imediatamente em nitrogênio líquido, e em seguida, a amostra foi triturada, homogeneizada com Trizol (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia) e o RNA foi extraído seguindo as orientações do fabricante.

4.8.8.1 Extração de RNA

O processo de extração de RNA foi realizado em ambiente estéril “livre” de RNAase, para evitar sua degradação.

As amostras foram retiradas do freezer -70°C e transportadas em gelo triturado, em seguida, um volume de 1 mL de Tri reagente (Trizol) foi adicionado em cada amostra deixando agir por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Sigma®, St. Louis, Missouri) para separar as fases do material em RNA, DNA e proteína. Os tubos foram colocados em agitador específico (Vórtex) por 15 segundos, posteriormente incubados por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período os tubos foram centrifugados à 12.000

xg (Força) por 15 minutos à 4°C. Ao final deste período surgiram 3 fases: no fundo de cor avermelhada são as proteínas, na interface em fina camada de cor branca é o DNA, e na região superior encontra-se o RNA.

Com o auxílio de uma pipeta o RNA foi retirado e colocado em outro tubo identificado. Em seguida foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico, misturado manualmente e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foi centrifugado à 12.000 xg por 10 minutos à 4°C.

Após este período, os tubos foram retirados da centrifuga e o líquido (sobrenadante) foi desprezado. No fundo do tubo foi possível visualizar o *pellet*.

As amostras foram lavadas com 1 mL etanol (75%) e centrifugadas por 7 minutos à 12.000 xg à 4°C. Os *pellets* foram ressuspensos com 50 µL água milli Q estéril livre de RNAse e incubados à 55°C por 15 minutos. Finalmente as amostras foram novamente congeladas em freezer -70°C.

4.8.8.2 Quantificação de RNA

Para quantificação de RNA foi utilizando o programa e o aparelho Nanodrop 2000 da Thermo Scientific®. No aparelho, foi colocado 1,5 µL da amostra e feita a leitura de cada uma, e os valores foram dados em ng/µL.

4.8.8.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total usando *kit* de transcrição reversa de alta capacidade(*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*,Applied Biosystems®, USA).

Na análise foi utilizado 2 µg de RNA de cada amostra de acordo com as instruções do fabricante. O volume final de 10 µL foi submetido ao processo de conversão de RNA para cDNA utilizando um termociclador (Mastercycler®Pro, Eppendorf®), de acordo com a tabela 1:

Tabela 1 : Ciclo de conversão de RNA para cDNA demonstrados em temperatura e tempo.

	PASSO 1	**PASSO 2**	**PASSO 3**	**PASSO 4**
TEMPERATURA (ºC)	25	37	85	4
TEMPO (min)	10	120	5	Infinito

Finalmente as amostras foram armazenadas em *freezer* à temperatura – 20°C aguardando o inicio da reação de RT-qPCR.

4.8.8.4 Reação de RT- qPCR

A reação foi feita utilizando o *kit* Power SYBR® Green, PCR Master Mix (Applied Biosystems,Warrington-UK) com o objetivo de fornecer um método quantitativo e específico para análise da expressão gênica. No presente estudo, os genes utilizados foram: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (GAPDH) como controle endógeno, ligante do receptor ativador do núcleo do fator Kappa B (RANKL) e osteocalcina (OC), Osteoprogesterina (OPG). A sequência dos iniciadores está representados na tabela 2:

Tabela 2: Representa a sequência dos iniciadores utilizados neste estudo.

Iniciadores	*Forward*	*Reverse*
GAPDH	TGATGGGT GTGAACCACGAG	CCCTTCCA CGATGCCAAAGT
RANKL	TGGAAGGCTCATGGTTGGAT	CATTGATGGTGAGGTGTGCAA
OC	CATGAGGACCCTCTCTCTGC	ATAGATGCGCTTGTAGGCGT
OPG	GTTCTTGCACAGCTTCACCA	AAACAGCCCAGTGACCATTC

Os genes foram escolhidos devido ao seu envolvimento no processo de formação e reparação óssea. Foi realizado teste de eficiência de cada um dos iniciadores (tabela 2), no qual a eficiência de amplificação foi determinada a partir do *slope* da curva padrão de cada iniciador, sendo aceitos os valores entre -3,1 e -3,6.

A reação de amplificação foi realizada seguindo as orientação do fabricante em placas de 96 poços, com volume de final 25 uL, sendo que foram utilizados 900nM de GAPDH; 900 nM de RANK L; 300 nM de OC e 900 nM de OPG. Essas concentrações foram determinadas de acordo com os testes de eficiência de amplificação.

Após o preenchimento dos poços, as amostras foram incubadas durante 10 minutos à 95ºC e depois submetidas a 40 ciclos (95ºC por 15 segundos e 60ºC por 1 minuto) no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems ®).

A amplificação foi medida por fluorescência no *kit* SYBR Green®, durante a fase de alongamento. Todas as amostras foram corridas em duplicata e a média foi usada para realização das análises dos resultados.

4.8.8.5 Cálculo da Expressão Relativa do Gene

A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no valor de CT (*Cicle thresholdcycle* ou ciclo limiar) referente ao número de ciclos que a amplificação atinge o limiar exponencial da PCR, possibilitando a análise quantitativa do nível de expressão do fator avaliado em relação ao gene endógeno (GAPDH).

Os resultados foram analisados de acordo com o método ΔΔCt, cujo resultado representa a expressão relativa de mRNA expresso em unidades arbitrárias $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo:

$$\Delta Ct = Ct_{gene} - Ct_{gene\ referência}\ e$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{grupo} - \Delta Ct_{grupo\ controle}$$

4.9 *Análise estatística*

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS® (Versão 20.0, IBM®, Armonk, EUA) e foi adotado nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar se os dados apresentavam ou não distribuição normal. A comparação entre os grupos (dados paramétricos) foi realizada através do teste ANOVA com pós-teste de Tukey. Os dados não-paramétricos foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis.

Resultados

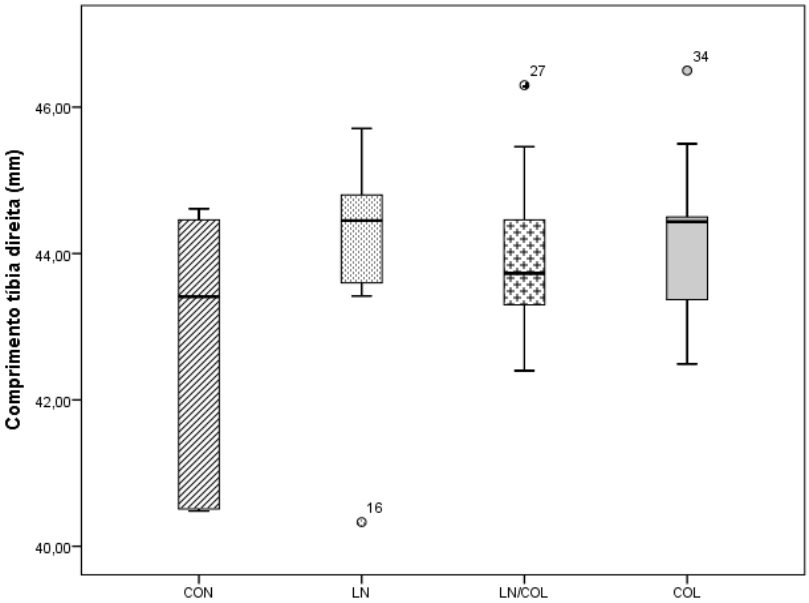
5 RESULTADOS

Não foram observados sinais clínicos de estresse, como porfirina na região periorbital e ocular, e ausência de fatores prejudicais ao pós operatório dos animais.

5.1 *Comprimento das tíbias*

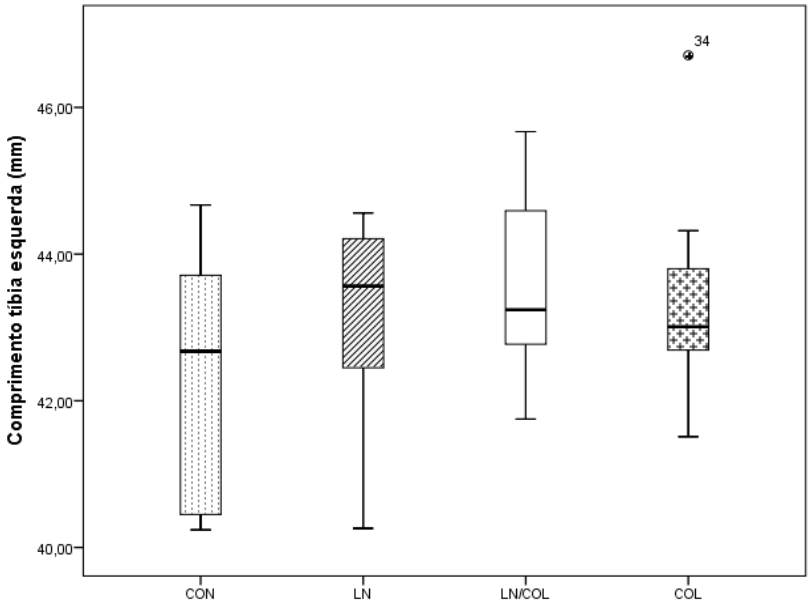
Através da análise macroscópica do comprimento das tíbias direitas e esquerdas foi possível verificar e constatar que os tratamentos utilizados não influenciaram significativamente para que houvesse diferença estatística significativa entre os grupos quanto ao comprimento da tíbia direita (p=0,078), Figura 14, e da tíbia esquerda (p=0,172), Figura 15.

Figura 14: Gráfico da morfologia da tíbia direita quanto ao comprimento



Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno

Figura 15: Gráfico da morfologia da tíbia esquerda quanto ao comprimento.

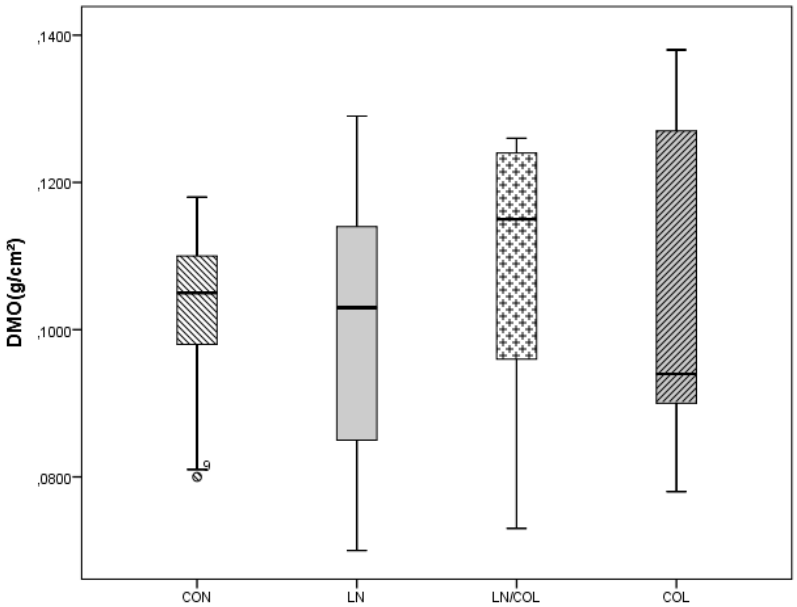


Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno

5.2 *Densidade Mineral Óssea*

Ao avaliar à DMO (Figuras 16) na região dos defeitos ósseos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p=0,669), ou seja, a quantidade de matriz mineral encontrada nos defeitos de todos os grupos foi semelhante, demonstrando que o tratamento a partir das membranas de LN; LN/COL e COL não influenciaram a reparação óssea no período analisado.

Figura 16: Gráfico da DMO dos quatro grupos estudados.



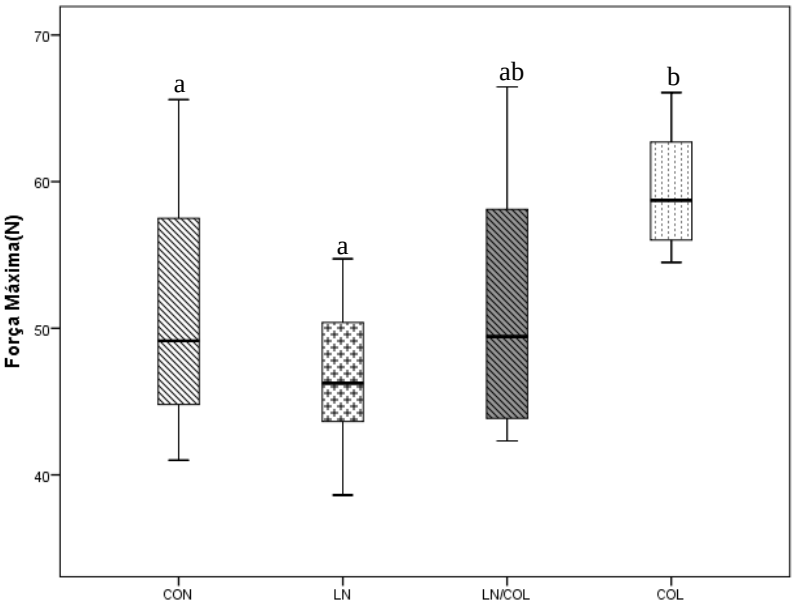
Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno

5.3 *Força Máxima*

Ao analisar a força máxima das tíbias foi possível observar diferença estatisticamente significativa (p=0,002) entre os grupos, em que o grupo COL apresentou maiores valores que o grupo CON (p<0,050) e o grupo LN (p<0,001). O grupo LN/COL não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados com os demais grupos, porém, apresentou valores intermediários.

Portanto, a presença do COL no tratamento foi influente nos resultados de força máxima do defeito ósseo (Figura 17).

Figura 17: Gráfico demonstra resultado da força máxima das tíbias em todos os grupos.

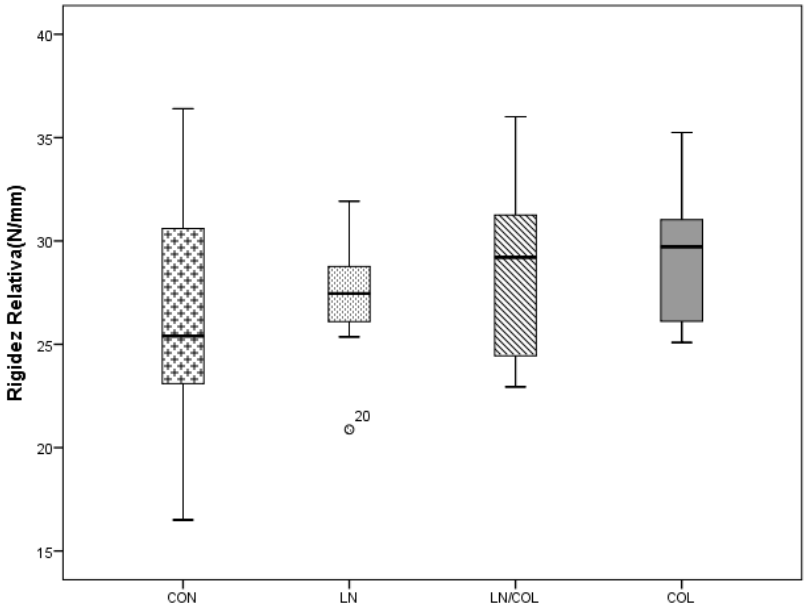


Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno. [ab] letras iguais indicam semelhança estatística p>0,05

5.4 *Rigidez Relativa*

Quando analisado o efeito da variável membrana na rigidez relativa dos grupos estudados (Figura 18) não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre nenhum grupo (p=0,461), portanto, as amostras apresentaram capacidade semelhante de se deformar frente a mesma carga aplicada no defeito ósseo.

Figura 18: Representa a rigidez relativa dos grupos estudados.

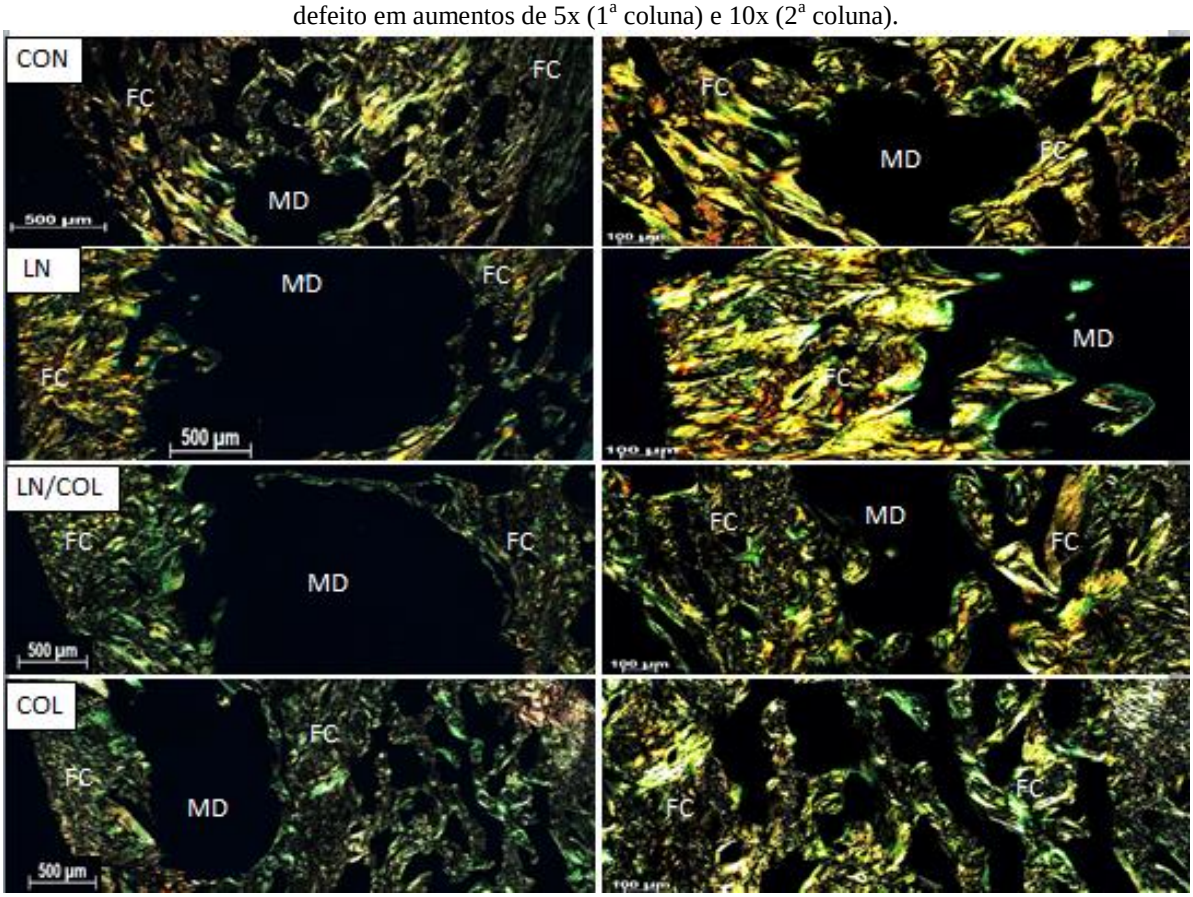


Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno

5.5 *Colágeno total*

Na análise qualitativa (Figura 19) foi possível verificar a presença de áreas de cor acastanhada e esverdeada nas extremidades e ao redor do defeito ósseo de todos os grupos, demonstrando a presença de colágeno.

Figura 19: Análise qualitativa comparando os quatro grupos estudados para a presença de colágeno na região do defeito em aumentos de 5x (1ª coluna) e 10x (2ª coluna).

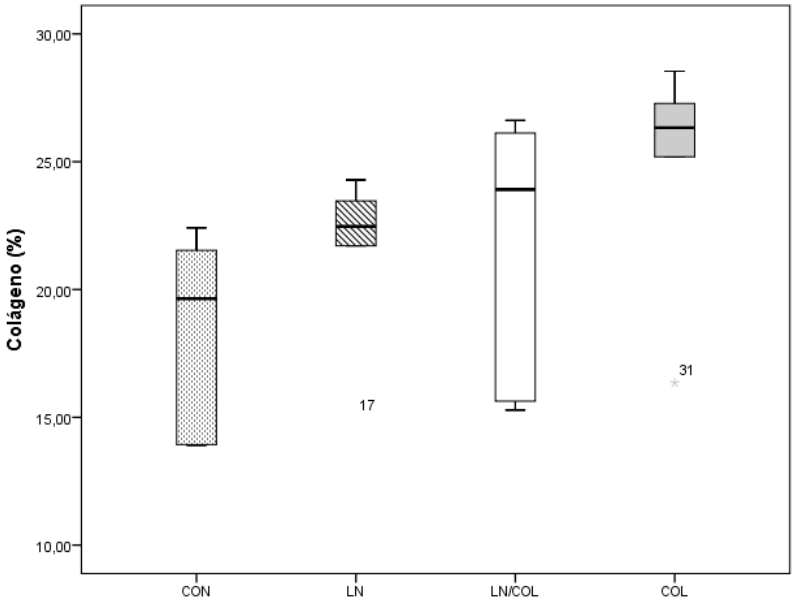


Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno**. FC** representa as fibras de colágeno e **MD** representa a região da medula óssea

Na análise quantitativa do colágeno (Figura 20) sobre a presença de luz polarizada, não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,224).

No entanto, os resultados obtidos indicam aumento de colágeno total nos grupos LN (+16,95%), LN/COL (+17,67%) e COL (+35,28) quando comparados ao grupo CON.

Figura 20: Representa o resultado obtido na análise de colágeno total.



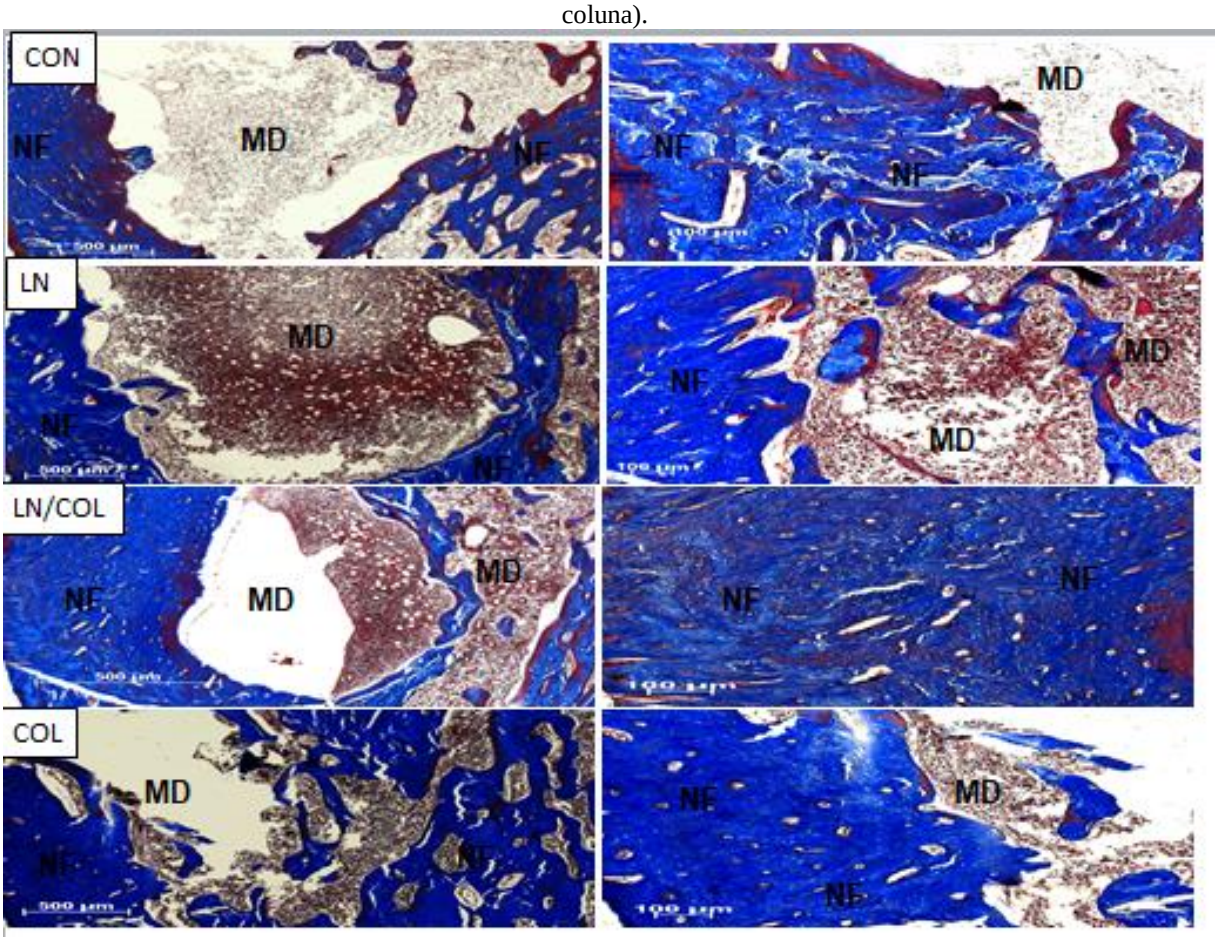
Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno

5.6 *Neoformação óssea*

Através das análises de neoformação óssea (Figura 21) foi possível verificar o fechamento linear dos defeitos ósseos em todos os grupos, formação de osso cortical e lamelar semelhante ao tecido ósseo ao redor, porém, em menor espessura. Além de tecido conjuntivo ao redor do defeito ósseo e vasos sanguíneos distribuídos por todos os seguimentos.

Houve dificuldade em visualizar as bordas dos defeitos ósseos em grande parte das lâminas tratadas com membrana de COL, consequentemente, devido à boa organização de suas estruturas.

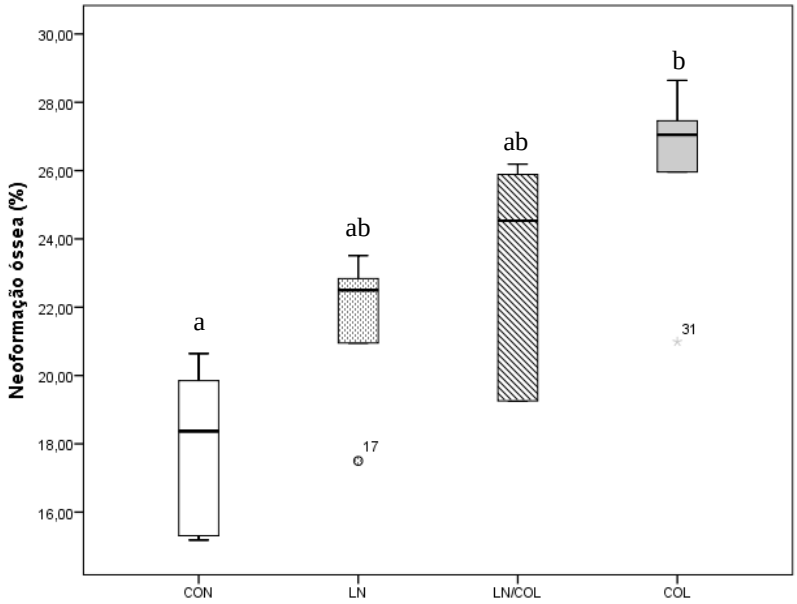
Figura 21: Fotomicrografias da análise da neoformação óssea em aumento de 50x (1ª coluna) e 100x (2ª coluna).



Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno. **NF** indica a neoformação óssea e **MD** região de medula óssea.

Os resultados da análise de neoformação óssea (Figura 22) demonstraram que há diferença significante entre os grupos (p=0,003), sendo que, o grupo CON apresentou menor neoformação óssea que o grupo COL (+45,61%, p< 0,002). Os demais grupos apresentaram valores intermediários LN (+20,68%, p<0,240) e LN/COL (+28,87%, p<0,053).

Figura 22: Gráfico representa o resultado obtido na análise de neoformação óssea.



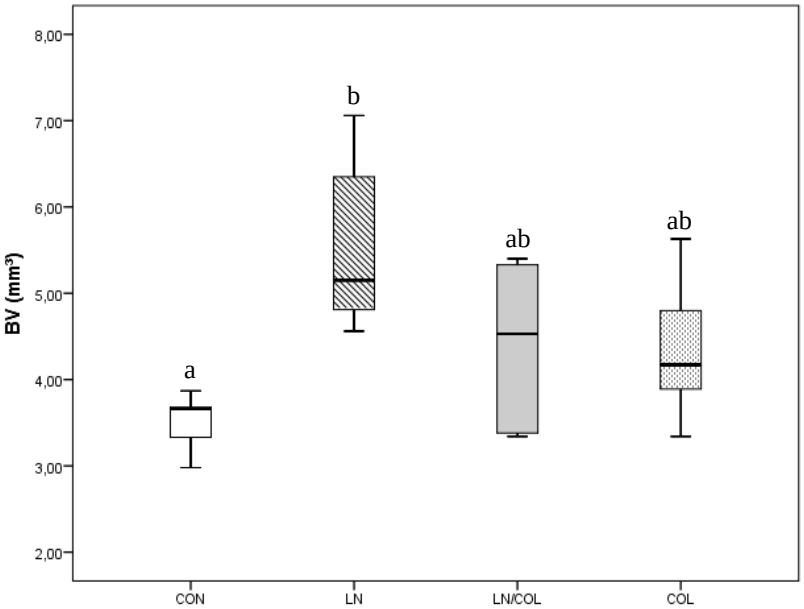
Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno**.** [ab] letras iguais indicam semelhança estatística p>0,05.

5.7 *Micro CT*

5.7.1 Volume Ósseo (BV)

A partir da técnica de Micro CT na análise do Volume Ósseo (BV) foi possível constatar que houve diferença estatística entre os grupos (p=0,015), em que o grupo LN apresentou em média 59,42% de volume ósseo que o grupo CON (p<0,008) (Figura 23). Todavia, as análises demonstraram valores intermediários para os grupos LN/COL e COL, com tendência a aumento do volume ósseo, respectivamente, em média 25,72% e 24,86% maior que o CON.

Figura 23: Demonstra graficamente os resultados da BV entre os grupos.



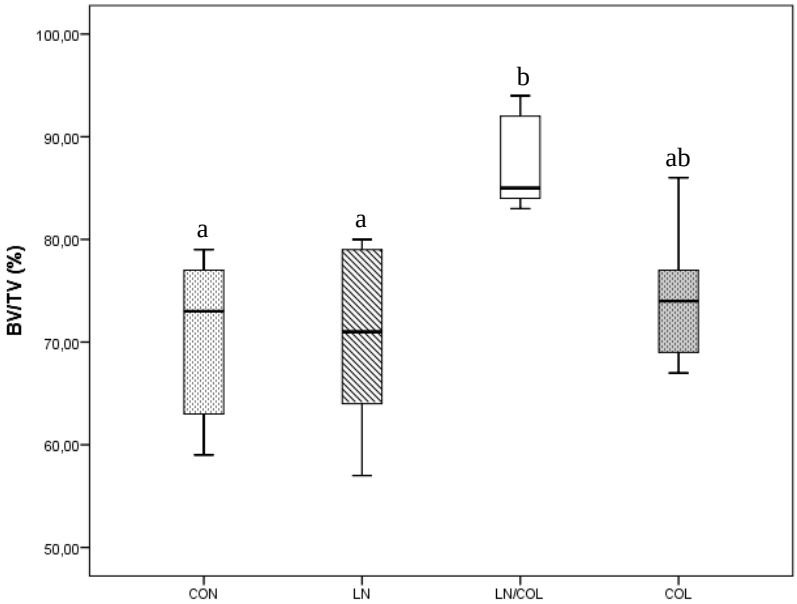
Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno. [ab] letras iguais indicam semelhança estatística p>0,05

5.7.2 Volume Ósseo/Volume Total

Ao analisar o Volume Ósseo/Volume Total (BV/TV) foi observada diferença significativa entre os grupos (p=0,010), em que o grupo LN/COL apresentou aumento em BV/TV (+24,79%) quando comparado com os grupos CON (p<0,016) e LN (p<0,016), o que pode ser observado na Figura 24.

Mesmo não demonstrando diferença significativa nesta análise, o grupo tratado por membrana de COL demonstrou uma tendência ao aumento, uma vez que, apresentou valores intermediários.

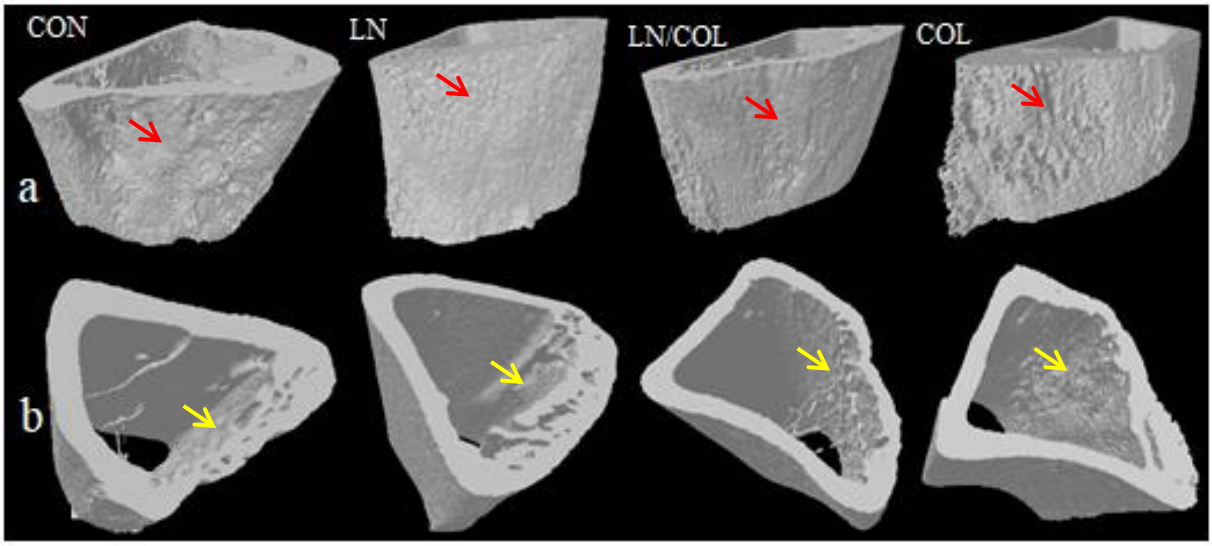
Figura 24: Gráfico representa a BV/TV entre os grupos.



Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno.[ab] letras iguais indicam semelhança estatística p>0,05

Na figura 25, é possível visualizar imagens 3D de todos os grupos, reconstruídas a partir do µ-CT. Qualitativamente é possível observar uma distinta microarquitetura óssea entre os grupos. Os grupos tratados com membranas apresentaram melhor organização das trabéculas e estrutura mais lisas. Somente em algumas amostras foi observada projeção de trabéculas para o interior do canal medular.

Figura 25: a) Imagens 3D a partir do µ-CT contendo os defeitos ósseos. b) Vista em plano sagital definida para análise.



Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno**.** Setas vermelhas e amarelas indicam região do defeito analisadas.

5.8 *RT-qPCR*

Os dados obtidos nas análises de RT-qPCR para RANKL, OC e OPG, não apresentaram distribuição normal, portanto, foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis. Através do teste realizado, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 3). No entanto, foi observado um aumento de expressão de RANK L(envolvido na reabsorção óssea) nos grupos tratados LN/COL e COL em relação ao CON e LN e menores valores de OC e OPG (envolvidos na formação) nos grupos tratados, exceto no grupo LN.

Tabela 3: Representa a mediana e intervalo de confiança dos genes analisados para RANK L; OC e OPG.

	RANK L	OC	OPG
CON	0,74 (-0,78; 4,36)	1,95(-0,00; 3,91)	0,88 (0,05; 2,49)
LN	0,61 (0,03; 1,19)	0,05(-0,11; 0,39)	1,13 (0,81; 1,45)
LN/COL	2,16 (0,22; 4,10)	0,10(-1,73; 3,87)	0,67 (0,27; 1,25)
COL	2,54 (0,26; 4,82)	1,05 (-0,90; 4,54)	0,11 (-0,26; 1,28)
p*	0,121	0,066	0,287

Legenda: Grupos: CON: controle; LN: tratado com látex natural; LN/COL: tratado com látex natural/colágeno e COL: tratado com colágeno. * Teste de Kruskal-Wallis

Discussão

6 DISCUSSÃO

As lesões ósseas e defeitos causados principalmente por traumas são geralmente mais fáceis de tratar em cirurgia ortopédica reconstrutiva utilizando enxertos ósseos ou sintéticos. No entanto, defeitos ósseos críticos como resultado de má consolidação, osteoporose, ou câncer, requerem tratamentos adicionais para a cura e reparação eficaz (PRADO et al., 2006).

A ROG, atualmente, é um dos principais meios de tratamento que favorecem a reparação óssea em estudos experimentais (KARANCSI; BRATU, 2016). Diante das inúmeras opções e oferta de biomateriais que apresentem capacidade de promover a reparação óssea, cada vez mais, se torna necessária, a realização de pesquisas que avaliem suas propriedades em diferentes formas de reparação e períodos observados.

Para avaliar o potencial osteogênico de biomateriais e fármacos em tíbia de ratos, segundo Prado et al. (2006), defeitos entre 2,0 mm à 3,5 mm, são considerados ideais. Por este motivo, neste estudo, optou-se por realizar o defeito de um tamanho seguro para o animal (2,9 mm), e que ao mesmo tempo, pudesse fornecer informações confiáveis, evitando áreas de cartilagem e de osso esponjoso. Pois, se tratando de animais de pequeno porte, como o rato, defeitos maiores que 3,5 mm na tíbia são passíveis de fratura, devido ao diâmetro desta região e o possível envolvimento da epífise (PRADO et al., 2006).

Esse achado serviu de inspiração para definição da metodologia escolhida neste estudo, como o tamanho de defeito ósseo de 2,9 mm de diâmetro externo, e o tempo experimental de 42 dias, com o intuito de assegurar que o defeito não alcançasse completa reparação.

Geralmente, em estudos experimentais os defeitos são realizados na calvária dos animais por assumirem grandes dimensões (4 mm), muitas vezes não se cicatrizam por reparação óssea, e sim, pela por substituição de tecido fibroso que inviabiliza o processo de reparo (SCHMITZ et al., 1990) devido a rápida proliferação e migração das células do tecido conjuntivo antes das células com potencial de osteogênese (MORAES et al., 2012).

No entanto, quando se trata de um osso que compõe o aparelho locomotor, como a tíbia, deve-se ter cautela, e relembrar, que o processo de reparação óssea nestes dois ossos ocorrem de formas distintas. Deve-se considerar que a reparação óssea em tíbia é semelhante a que ocorre na mandíbula, devido à tensão muscular e compressão pelo peso do corpo que ocorre na tíbia e tensão muscular e compressão pela mastigação que ocorre na mandíbula.

Portanto devido à ação de forças nestas regiões o reparo ósseo é naturalmente mais acelerado (PRADO et al., 2006).

Este estudo utilizou membranas de LN, COL e LN/COL que foram avaliadas e os resultados encontrados nesse estudo mostraram que a membrana de COL influenciou positivamente a reparação óssea, pois, o grupo tratado com ela obteve resultados superiores em relação à neoformação óssea quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (CON); diferença referente à força máxima quando comparado aos grupos CON e LN e semelhança ao grupo LN/COL. Porém, não demonstrou resultado expressivo em relação à presença de colágeno, BV e BV/TV referente aos demais grupos, mas podemos considerar através dos gráficos que os valores obtidos nestas análises foram maiores e melhores que do grupo não tratado (CON).

Apesar do resultado favorável da membrana de colágeno neste estudo, o fato deste biomaterial ser absorvível ainda é fonte de questionamentos. Assim como as membranas de colágeno são produzidas a partir de materiais biodegradáveis, como o poliuretano e a poliglactina, o tempo necessário para sua degradação depende das características de cada material, pH, temperatura local e espessura da membrana (SIMION, et al, 1997; FLORIANO et al.,2016). Portanto, a duração da barreira oclusiva em uma determinada região, não é controlada, bem como, pode interferir negativamente na reparação óssea.

Schwarz et al. (2006) observaram que membranas de colágeno, são as mais utilizadas na reparação óssea, mas se degradam rapidamente devido à atividade enzimática de macrófagos e leucócitos, resultando em uma baixa resistência do material, o que o torna suscetível ao colapso e desproteção do defeito. Este ponto foi levado em consideração neste estudo, pois, durante a dissecação das tíbias não foi possível visualizar a presença das membranas de colágeno no local, gerando questionamentos em relação a sua oclusão até o final do experimento. No entanto, como os animais tratados com a membrana de colágeno demonstraram resultados significativos, este questionamento nos leva a pensar que mesmo não sendo visível no final do período experimental, esta membrana pode ter tido melhor aderência ao defeito ósseo, o que é explicado pelos resultados encontrados.

Diferentemente dos resultados deste estudo, Von-Arx et al. (2005) utilizaram diferentes membranas reabsorvíveis em calvária de coelhos durante 2, 6, 12 e 28 semanas, e os resultados demonstraram problemas no desempenho das membranas e reações inflamatórias inadequadas.

Apesar do uso de membranas reabsorvíveis evitarem a necessidade de um novo procedimento cirúrgico para sua remoção, as possíveis complicações relacionadas ao seu uso, fazem com que as membranas não reabsorvíveis sejam levadas em consideração (BORGES et al., 2017).

Pensando em produzir uma membrana que não fosse reabsorvível, no entanto, que possuísse as características do colágeno, alguns estudos na literatura se propuseram a analisar a interação do látex natural com o colágeno. Até o momento não foram relatados estudos experimentais com esta membrana, por isso, os benefícios da interação do LN com o COL foram fonte de interesse deste estudo, para observar se suas características influenciavam na reparação óssea, proporcionando melhor qualidade ao osso neoformado.

Os resultados apontaram que a membrana de LN/COL diferiu da membrana LN e do grupo CON na análise de BV/TV; e semelhança ao grupo COL quando observada a força máxima do defeito. Indicando que a interação entre estes dois biomateriais foi favorável.

Devido à falta de pesquisas com a aplicação experimental desta membrana, não foi possível correlacionar os resultados a outros estudos.

Quanto à membrana de LN, no presente estudo, foi demonstrada influência nas variáveis BV quando comparado ao grupo CON, e força máxima quando comparada ao grupo COL, demonstrando melhora no processo de reparação óssea. No entanto, o LN não apresentou resultados significativos na neoformação óssea, colágeno e rigidez relativa de tíbias de ratos, diferentemente de Carlos (2017) que realizou estudo em defeitos ósseos após 14 e 28 dias. Neste estudo, o LN apresentou valores intermediários aos grupos COL e CON, que foram estatisticamente diferentes, o que indica uma melhora nos tratamentos com LN.

Como este estudo se propôs a verificar os efeitos das membranas na fase de remodelação, possívelmente a divergência dos resultados pode ter se dado pelo tempo experimental analisado. Pois, o presente estudo teve como objetivo analisar a fase tardia do reparo ósseo, para tanto, o momento adequado é considerado entre 4 e 6 semanas em ratos, dependendo da idade, da estirpe do animal e das condições biomecânicas de estabilização da fratura (HISTING et al., 2011).

Mesmo neste período tardio pode-se inferir que houve melhora da microarquitetura, ou seja, a mineralização do local foi melhor porque aumentou a quantidade de tecido mineralizado no processo de reparação.

Neste estudo também foi avaliada a DMO, para isto, o ideal é utilizar um aparelho de dupla emissão raios-x (DXA), baseado no princípio da quantidade de radiação atenuada em

relação ao tecido com a sua espessura e composição. Este método é considerado “padrão-ouro” para mensurar o conteúdo mineral ósseo. Esta técnica é capaz de mensurar a quantidade de cálcio presente nas regiões avaliadas possibilitando comparar a qualidade óssea de amostras distintas (VILLAREAL et al., 2016). O método é capaz de estabelecer diagnósticos de perda óssea, e em exames para prognóstico de fratura, entretanto, não avalia alterações microestruturais e metabólicas (JIANG; JIANG; DAI, 2007; DONNELLY, 2011). Sendo assim, se faz necessário à complementação com outros tipos de análise para constatar a qualidade do tecido ósseo.

Os resultados para DMO encontrados neste trabalho, nenhum grupo diferiu de maneira estatisticamente significativa, apresentando uma matriz óssea com alta atividade no grupo CON e nenhuma ação benéfica do LN e/ou COL na reparação óssea. Sendo assim, o tratamento com as membranas não influenciou em aumento e nem diminuição da DMO nos defeitos. Portanto, observando os resultados no grupo CON, pode-se inferir que os ossos recuperaram a DMO de maneira natural, ou seja, sem a necessidade de tratamento. Este fato pode ser explicado devido ao defeito não ser de tamanho crítico e os animais serem saudáveis.

Pode-se observar também a influência da descarga de peso fisiológica que ocorreu nas tíbias durante a fase experimental pós-cirúrgica, este fato pode ter conduzido à tensões hiperfisiológicas que podem ter acelerado os padrões de formação óssea na região avaliada (PAIVA et al., 2016).

Contrariando os resultados encontrados, Carlos (2017) encontraram diferença significativa comparando defeitos ósseos realizados no grupo controle com grupos tratados com membranas de LN 14 dias e 28 dias após tratamento. Mas, uma vez demonstrado que o fator tempo experimental pode ter tido influência, impossibilitou que diferenças fossem observadas aos 42 dias de tratamento, após a realização do defeito. Portanto, pode-se entender que os tratamentos propostos não demonstraram influência na DMO dos defeitos ósseos neste período.

Para avaliar estas e outras questões foi realizado à análise histológica, pois é conhecida por sua importância na avaliação da reparação de ossos que foram submetidos ou não a algum tipo de tratamento (PAIVA et al., 2016).

Através desta análise foi possível avaliar o tamanho do defeito ósseo e a distribuição tecidual na região (osso, cartilagem e tecido fibroso). Ao avaliar-se a neoformação óssea na região do defeito foi demonstrado que em defeitos ósseos de animais que não foram tratados com membranas oclusivas, a quantidade de osso neoformado foi menor, no entanto, a

quantidade de tecido conjuntivo no local estava aumentada, quando comparado com animais que foram tratados com membranas.

Histing et al. (2011) em análises histológicas em ossos de ratos, observaram menor quantidade de osso neoformado em 2 semanas pós defeito quando comparado com 6 semanas. Este fato pode ser explicado devido ao amadurecimento ósseo, favorecendo a reparação.

Almeida et al. (2000) em seu estudo, observaram o fechamento linear do defeito ósseo realizado em todos os grupos estudados após 30 dias, porém, os grupos que receberam tratamento com membrana oclusiva demonstraram maior organização e qualidade das estruturas. Assim como nesse estudo, em que, o defeito ósseo realizado foi identificado, no entanto, nos grupos tratados houve maior qualidade do reparo e início da fase de remodelação.

Para as análises do colágeno total encontrado no defeito, os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Este resultado pode estar associado ao período experimental avaliado neste estudo. Diferindo dos resultados de Carlos (2017) que observaram maior quantidade de fibras colágenas nos grupos avaliados após 4 semanas com ou sem tratamento com Látex natural (sem diferença significativa) e menor deposição destas fibras nos grupos avaliados com 2 semanas com ou sem tratamento.

Para tanto, complementar o estudo histológico o ensaio mecânico nos possibilita ter uma visão mais abrangente de aspectos relacionados à qualidade óssea e sua capacidade de resistência a fraturas (SHARIR; BARAK; SHAHAR, 2008), pois o tecido ósseo é capaz de realizar funções de sustentação esquelética e suporte de impactos devido a suas altas propriedades mecânicas (SILVA, 2002). O comportamento dos tecidos biológicos em resposta a uma carga mecânica pode ser analisado através de ensaio mecânico, onde a flexão, compressão, tração ou cisalhamento do material pode ser avaliado (SILVA, 2002).

A máquina de ensaio mecânico possui uma célula de carga com capacidade de medida da força variável de acordo com a proposta do estudo. Para o ensaio mecânico de flexão em três pontos, devem ser ajustadas a distância entre os apoios, o sentido e a velocidade de aplicação da força (HISTING et al., 2011).

Quando o material é submetido a uma tensão constante ele tende a sofrer deformação até a ruptura. A inclinação da curva tensão x deformação é denominada rigidez e representa a capacidade do material se deformar frente a determinada carga. A carga máxima que o modelo suporta até sua ruptura é chamada de força máxima e consiste na resistência do material (SHARIR; BARAK; SHAHAR, 2008; HISTING et al., 2011). Portanto, para

caracterizar a reparação óssea de forma biomecânica, foram analisadas a força máxima e a rigidez relativa.

No teste mecânico realizado neste estudo, foi possível diferenciar o comportamento mecânico das amostras que nos permitiu inferir que o grupo COL apresentou resultados estatísticamente maiores referente à força máxima quando comparado com os outros grupos tratados (LN e LN/COL) e controle. A resposta de cura diferentemente significativa para o tratamento com o COL pode ter ocorrido devido à via de ligação preferencial e recrutamento de células osteoprogenitoras que consequentemente estão mais presente nos defeitos tratados com este biomaterial (BUBALO et al., 2017).

O COL em contato direto com células hospedeiras direciona uma melhor resposta reparadora. Devido ao aumento da adesão celular e estímulo à cicatrização gerado quando é usado como membrana oclusiva (BUBALO et al., 2017). Contudo, pode-se inferir que o osso neoformado na região dos defeitos possui propriedades mecânicas suficientes para resistir aos esforços aos quais foi submetido, porém, os tratados com COL possuem maior resistência.

Quando analisada a rigidez relativa, não houve diferença significativa conforme esperado, visto que o defeito ósseo em todos os grupos já apresenta uma estrutura que possibilita a estabilidade biomecânica nesta fase da reparação, pois, já conseguiu restaurar completamente as propriedades biomecânicas de um osso normal.

Quando se observa o processo de cicatrização da fratura entende-se que o osso passa por uma segunda fase de reabsorção, que permite que o osso seja remodelado, se transformando em uma estrutura de osso lamelar com uma cavidade central medular (GERSTENFELD et al., 2003). Conforme ocorre a maturação óssea, tanto as qualidades funcionais como a integridade mecânica retornam às condições ósseas normais (PAIVA et al., 2016).

Segundo Udupa e Prasad (1963), o colágeno e a cartilagem são substituídos por osso novo entre a 5ª e 6ª semana de consolidação óssea, ou seja, a quantidade de minerais aumenta gradativamente em função do tempo.

Os resultados do presente trabalho contribuem com os encontrados por Paiva et al. (2016), quanto à DMO e rigidez relativa, pois, animais avaliados após 6 semanas de osteotomia apresentavam maiores valores se comparados aos grupos de 2 semanas.

Mesmo que o tecido ósseo apresente grande capacidade de reparação frente a lesões provocadas, este processo envolve a integração de várias células, fatores de crescimento e matriz extracelular que o torna dependente de um mecanismo molecular complexo através de

fatores locais e sistêmicos interagindo com vários tipos de células onde são conduzidas para o local da lesão através da circulação (Al-AQR et al., 2008). Portanto, para que ocorra a reparação óssea é necessário que ocorra a ação de genes responsáveis por estimular sua formação e reabsorção, como: RANKL e OPG, que formam uma importante via entre reabsorção de osso antigo e formação de osso novo. A manutenção da massa óssea é regulada pela produção balanceada de RANKL, e seu antagonista, osteoprotegerina (OPG) (BOYCE; XING, 2008).

Outro gene muito importante é a Osteocalcina (OC), pois, tem grande atuação na ligação do fosfato de cálcio (matriz inorgânica) com a matriz orgânica do osso, além de, auxiliar a regular a ação dos osteoclastos, e também ser um importante sinalizador que indica quando o osso atingiu a fase de reparação óssea (LI et al., 2016).

Os resultados desse estudo, para a análise de RT-qPCR demonstraram uma expressão relativa dos genes RANK L; OC e OPG nos defeitos ósseos analisados, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Este resultado demonstra que esses genes não foram influenciados pela ação das membranas de forma positiva ou negativa no período analisado, sendo possível inferir menor atuação do gene de remodelamento (OC), menor atuação dos genes de formação (OC e OPG) e maior no gene de reabsorção óssea (RANK L).

Estes resultados sugerem que no período analisado neste estudo, a reparação óssea já estava estabelecida devido aos baixos índices de formação, e ao fato dos ossos se encontrarem na fase normal de remodelação, através de maiores índices de reabsorção, com o objetivo de eliminar todo o tecido excessivo e reestabelecer a aparência do osso antigo ao redor do defeito.

Turri et al. (2016) também avaliaram a expressão de OPG e RANKL e encontraram redução de sua expressão aos 28 dias após realização de defeito ósseo em fêmur de ratos. No entanto, assim como em nesse estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Após este período, a expressão destes genes não foi novamente analisada.

Em contrapartida, analisaram também os efeitos da OC e concluíram que houve expressão de OC no início e final do estudo (6 e 28 dias), e este resultado sugere que ocorre um processo contínuo de formação e maturação óssea (TURRI et al., 2016), ressaltando a evidência que esta expressão é mais significativa em menores períodos.

A micro-CT pode fornecer informações adicionais sobre mineralização e microarquitetura óssea na região do defeito.

Através desta análise foi possível visualizar o fechamento do defeito ósseo em todos os grupos, no entanto, os grupos tratados com membranas apresentaram melhor organização das trabéculas e estrutura mais lisas. Somente em algumas amostras foi observada projeção de trabéculas para o interior do canal medular. Este fato geralmente ocorre em menores períodos de consolidação, portanto, esse estudo está de acordo com o esperado nesta fase da consolidação óssea.

Normalmente a atividade metabólica celular retorna ao seu nível basal após 6 semanas de cicatrização, devido à tendência dos parâmetros morfológicos ósseos diminuir com o tempo (FAOT et al.,2017), portanto, analisar tratamentos que atuem nesta fase nos fornecem informações importantes sobre a atuação na remodelação óssea.

Nesse estudo, os animais do grupo CON apresentaram menor volume de tecido ósseo quando comparado a todos os grupos tratados, porém, foi estatisticamente significa diferente apenas diante do grupo tratado com membrana de LN. Este resultado nos levou a crer que animais sem tratamento possuem menor quantidade e qualidade óssea, quando comparados aos animais tratados. E o LN, de alguma forma influenciou esses resultados demostrando sua efetividade.

Quando o BV é menor significa que a mineralização daquele local está prejudicada por algum motivo ou por algum atraso, reduzindo a quantidade de tecido mineralizado naquele processo de reparação. Consequentemente a microarquitetura óssea é alterada ou prejudicada, como foi observado por Yanagihara et al. (2017), que analisaram os ossos de ratas ovariectomizadas e tratadas com dieta hiperlipídica.

Nesse estudo, não houve atraso da consolidação do grupo CON, e sim aceleração dos grupos tratados com algum tipo de membrana, pois, todos apresentaram, mesmo que sem diferença estatística, aumento de BV comparado ao CON, portanto, consequentemente apresentaram maior mineralização no processo de regeneração.

Os tratamentos utilizados a partir de LN/COL e COL apresentaram valores percentuais maiores que o grupo CON, porém, a diferença não foi suficiente para apresentar estatística significante.

Em estudo realizado por McDonald et al. (2012) foi observado aumento nos valores de BV/TV em defeitos ósseos tratados com anticorpo esclerostina por 2 e 3 semanas.

Faot et al. (2017) também encontraram diferenças significativas nas variáveis BV e BV/TV em ROG em tibia de coelhos aos 28 dias pós tratamento com fibrina rica em plaquetas de leucócitos.

Os animais do grupo LN/COL apresentaram maior BV/TV quando comparados ao grupo LN e não tratado (CON), sugerindo uma melhora na qualidade e na neoformação óssea. Sendo assim, é possível que membranas produzidas a partir de LN/COL possam estimular a microarquitetura óssea devido à presença de seus componentes. O que não pôde ser observado nas membranas que só tinham LN, sugerindo que o COL foi um fator determinante.

O grupo COL não apresentou diferença significativa quando comparado aos demais grupos, no entanto, expressou grande semelhança com grupo LN/COL e maiores valores de BV/TV que o grupo CON. Esses resultados não nos permite afirmar que a membrana de COL não contribuiu com a consolidação óssea em outros períodos que antecederam a consolidação. Mas no período analisado neste estudo (42 dias), a utilização da membrana de COL não influenciou em maior porcentagem de BV/TV nos defeitos de maneira significativa, porém, o fator tempo o número limitado de amostras analisadas podem ter sido determinates.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

No presente estudo foram avaliados e comparados os efeitos das membranas de LN, LN/COL e COL e concluímos que as membranas utilizadas apresentaram melhores resultados na ROG de tíbia de ratos, no entanto, a membrana de COL influenciou de maneira mais significativa a neoformação óssea e força máxima, e a membrana de LN/COL influenciou as propriedades de microarquitetura óssea (BV/TV) no período analisado, confirmando a hipótese que as utilizações das membranas de LN; LN/COL e COL em defeitos ósseos nas tíbias de ratos, apresentam diferença entre si quanto à reparação óssea.

Sugestões para trabalhos futuros

8 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

1- Realizar estudo utilizando tempos de tratamento de 14 dias e 21 dias.
2- Modelos experimentais em defeitos críticos devem ser realizados para possibilitar maior compreensão destes resultados.
3- Avaliar a ROG através destas membranas na consolidação em ossos metabolicamente influenciados por alterações patológicas como diabetes e osteoporose.
4- Possivelmente, o número de amostras analisadas ou a quantidade de colágeno presente nas membranas não foram suficientes para expressar resultados mais fidedígnos, sugerindo que novos estudos devam ser realizados.

Limitações do estudo

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este estudo forneceu uma base para futuros trabalhos sobre o reparo ósseo em tíbia de ratos, no entanto, houve algumas limitações que devam ser expostas, como, o fato do defeito não ter sido crítico, o que proporcionaria a regeneração óssea. Verificamos que o modelo experimental de defeito ósseo com 2,9 mm de diâmetro externo não impede a reparação óssea através da regeneração óssea guiada em tíbia de ratos saudáveis, portanto, modelos experimentais em defeitos críticos devem ser realizados para possibilitar maior compreensão destes resultados.

A utilização de animais saudável em estudos com novos biomaterais pode ser limitante, devido a estes animais não apresentarem fatores que influênciem na reparação óssea, portanto, estudos futuros devem avaliar a ROG através destas membranas, na fase inicial de consolidação de defeitos ósseos, para verificar se ocorre influência da sua atuação no início da formação óssea, assim como, se a presença das membranas pode melhorar a consolidação em ossos metabolicamente influenciados por alterações patológicas como diabetes e osteoporose.

A escolha de um único período experimental para avaliar a reparação óssea em tíbia de ratos, pode, de certa forma, ter limitado a compreensão dos efeitos das membranas. Portanto, outros períodos experimentais devem ser estudados e comparados para melhor compreensão dos efeitos da membrana de LN/COL *in vivo* em todas as fases da consolidação óssea.

A quantidade de colágeno utilizada na membrana pode não ter sido suficiente para apresentar diferença estatísticamente significativa em algumas análises, portanto, novos estudos devem ser realizados com maior proporção de colágeno no compósito com látex natural.

A descarga de peso realizada pelos animais durante todo o período experimental pode ter influênciado a reparação de forma positiva ou negativa, e este fato não pôde ser controlado neste estudo.

Referências

REFERÊNCIAS

AI-AQR, Z. S. et al. Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis.**Journal of Dental Research**, v. 87, n.2, p.107-118, 2008.

ALLARCON, J. B. et al. Alergia ao látex. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, n. 1, p. 89–96, 2003.

ALMEIDA, J. D. et al.estudo da reaparação óssea em mendíbula de ratos.**Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos**, v.3, p.49-53, jan-jun,2000.

ALMUBARAK, S. et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. **Bone**, v. 83,p. 197–209, 2016.

AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.

ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L.C. Tecido ósseo : aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP,** v.35, n.2,p.191-98, 2006.

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

ARLINDO, E. P. S.; FUZARI JR, G. C.; MALMONGE, J. A. 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. n. 1, p. 6985–6996, 2006.

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

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

BARROS, N. R. et al. Natural rubber latex: Development and in vitro characterization of a future transdermal patch for enuresis treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66, n. 17, p. 871–876, 2017.

BORGES, F.A et al. Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided

bone regeneration. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 39, p. 1–10, 2017.

BORNSTEIN, M. M. et al. Effect of Two Bioabsorbable Barrier Membranes on Bone Regeneration of Standardized Defects in Calvarial Bone: A Comparative Histomorphometric Study in Pigs. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 8, p. 1289–1299, 2007.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of bone and mineral research**, v. 25, n. 7, p. 1468-86, 2010.

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

BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Dispõe das condições de criação e uso de animais para ensino e pesquisa científica.Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 de out. 2008. Capitulo IV, p. 1.

BUBALO, M. et al. The use of collagen membranes in guided tissue regeneration. **Vojnosanitetski pregled**,v. 74, n. 8, p. 1–6, 2017.

BUBALO M. **The impact of demineralized resorbable membrane of human and bovine origin, same and different thickness on ossification of bone defects** [dissertação].Kosovska Mitrovica: Faculty of Medicine, University of Pristina, Kosovska Mitrovica; 2013.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p.169-193, 2000.

BUTEZLOFF, M.M. **O uso do ultrassom de baixa intensidade, paratormônio ou alendronato de sódio na consolidação de fraturas do fêmur de ratos com lesão medular** Tese [Doutorado] - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2018.

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

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

CHO, H. H. et al. Overexpression of CXCR4 increases migration and proliferation ofhuman

adipose tissue cells. **Stem Cells Development**, v.15 , n. 6, p.853-864, 2006.

CHO, T. J.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Differential temporalexpression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.17, n. 3, p. 513-520, 2002.

CHU, C. et al. Collagen Membrane and Immune Response in Guided Bone Regeneration: Recent Progress and Perspectives. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, p.1-42, 2017.

CHUNG, H. et al. Anti-osteoporotic activity of harpagide by regulation of bone formation in osteoblast cell culture and ovariectomy-induced bone loss mouse models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 66–75, 2016.

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

COLNOT, C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 2, p. 274–82, 2009.

CROCI, A.T. et al. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.11, n. 4, p. 230-239, 2003.

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

DA CRUZ, A. G. B. et al. On the piezoelectricity of collagen/natural rubber blend films. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 6, p. 1267–1272, 2003.

DONNELLY, E. Methods for assessing bone quality: A review. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 8, p. 2128–2138, 2011.

EDGAR, C. M. et al. Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells. **Bone**, v. 40, p. 1389–1398, 2007.

ELGALI, I et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **European Journal Oral Science**, v.125p.315–337, 2017.

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

FAOT, F.The effect of L-PRF membranes on bone healing in rabbit tibiae bone defect: micro CT and biomarker results.**Scientific Reports**, v.7, n.46452, pp.1-9,2017.

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

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v.2015, p.1-17,2015.

FLORIANO, J. F. et al. Comparative study of bone tissue accelerated regeneration by latex membranes from Hevea brasiliensis and Hancornia speciosa. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 2, n. 4, p. 1-15, 2016.

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

GERSTENFELD, L. C. et al. Impaired Fracture Healing in the Absence of TNF α Signaling: The Role of TNF α in Endochondral Cartilage Resorption. **Journal of bone and mineral research**, v. 18, n.9,p.1584-1592, 2003.

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

GRUBER, R; STADLINGER, B; TERHEYDEN, H. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration: molecular and cellular mechanisms. **Clinical oral implants research**, v. 0, n., p. 1–8, 2016.

GUILLERMINET, F et al. Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice. **Osteoporosis International**, v. 23, n.7, p. 1909–1919, 2012.

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

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

ISSA, J. P. M. et al. Bone repair investigation using rhBMP-2 and angiogenic protein extracted from latex. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 2, p. 145–152, 2012.

JIANG, S.-D.; JIANG, L.-S.; DAI, L.-Y. Effects of spinal cord injury on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis and gene expression profiling in osteoblasts in young rats. **Osteoporosis international,** v. 18, n. 3, p. 339–349, 2007.

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

KARANCSI,O.L.;BRATU,E.A.ThePolytetrafluoroethylene (PTFE) and Collagen Membranes in Bone Grafting for Dental Implants. **Materiale plastice**, v.53, n. 3, p. 537–541, 2016.

KAYAL, R. A. et al. Diminished Bone Formation During Diabetic Fracture Healing Is Related to the Premature Resorption of Cartilage Associated With Increased Osteoclast Activity. **Journal of bone and mineral research**, v. 22, n. 4, p. 560–568, 2007.

KHOR, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. **Biomaterials**, v. 18, n. 2, p. 95–105, 1997.

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

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

MARTINS, R. et al. Estudo comparativo da resposta do tecido ósseo em técnica de regeneração tecidual guiada – avaliação macroscópia. Parte 1. **Dentistry in Science**, v. 1, n. 3, p. 224–230, 2010.

MCDONALD, M. M., et al. Inhibition of sclerostin by systemic treatment with sclerostin antibody enhances healing of proximal tibial defects in ovariectomized rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 10, p. 1541–1548, 2012.

MIRANDA, M. C. R. et al. Porosity effects of natural latex (Hevea brasiliensis) on release of compounds for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 28, n. 18, p. 2117–2130, 2017.

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

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

MRUÉ, F. et al. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials**

Research, v. 7, n. 2, p. 277–283, 2004.

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

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

OKUNO,Y et al. Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. **Blood Journal**,v. 117, n. 19, p. 5264–5273, 2011.

PAIVA, A. G. et al. Analysis of fracture healing in osteopenic bone caused by disuse: experimental study. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 3, p. 1-7, 2016.

PAPACHRONI, K. K. et al. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. **Trends in Molecular Medicine**, v.15, n. 5, p. 208-216, 2009.

PARFITT, A.M. et al. Bone Histomorphometry : Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. **Journal of bone and mineral research**, v. 2, n. 6, 1987.

PARRY,D.A.D.; SQUIRE, J.M. **Advances and Protein Chemistry: Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers**, United Kingdom, Academic Press, vol.70, pp. 1-525, 2005.

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

QUEIROZ, A. M. P. **O uso de membrana de látex natural como membrana oclusiva associada ao laser de baixa intensidade em regeneração óssea**. 2008. Dissertação (mestrado) - Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2008.

RHO, K. S. et al. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1452–1461, 2006.

SCHIMITZ, J. P. et al.Caracterization of rat calvarial nonunion defects.**Acta Anatomica**, v.138, p.185-192,1990.

SCHWARZ, F. et al. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: An immunohistochemical study in the rat. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 4, p. 403–409, 2006.

SHARIR, A.; BARAK, M. M.; SHAHAR, R. Whole bone mechanics and mechanical testing. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 8–17, 2008.

SILVA, et al. Biomembrana de látex natural para o tratamento de úlceras cutâneas 2017, Brasil, Patente: Previlégio de Inovação. Número do registro: BR102011702175,título: "Biomembrana de látex natural para o tratamento de úlceras cutâneas",Instituição de registro: INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial.Depósito:09/10/2017

SILVA, A.V. **Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato.** 2002. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2002.

SIMION, M. et al. Treatment of Dehiscences and Fenestrations Around Dental Implants Using Resorbable and Nonresorbable Membranes Associated With Bone Autografts: A Comparative Clinical Study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants,** vol. 12, n. 2, p1-16, 1997.

STREET, J. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 15, p. 9656–9661, 2002.

TEITELBAUM, S. L. Bone Resorption by Osteoclasts. **Science**, v. 289, p. 1504-1508, 2012.

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

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

UDUPA K.V.; PRASAD G.C.: Chemical and histochemical studies on the organic constituents in fracture repair in rats. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 45, p. 770-779, 1963.

VILLAREAL, D.T. Effect of Two-Year Caloric Restriction on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Non-Obese Younger Adults: A Randomized Clinical Trial. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 31, n. 1, p. 40–51, 2016.

VON-ARX, T. et al. Membrane Durability and Tissue Response of Different Bioresorbable Barrier Membranes : A Histologic Study in the Rabbit Calvarium. **The international journal of oral & maxillofacial implants**, v. 20, n. 6, p. 843-853, 2005.

WINCK-MAHL, C. Avaliação Radiográfica e Histomorfométrica da Mandíbula de Ratas Medicadas com Glicocorticóide e Bifosfonato Mandible´s Radiographic and Histomorphometric Assessment in Female Rats Medicated with. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 50, n. 1, p. 16–19, 2009.

YAMANAKA, J. S. et al. A high-fat diet can affect bone healing in growing rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, p. 1–9, 2017.

YANAGIHARA, G. R. et al. Influence of high-fat diet on bone tissue: An experimental study in growing rats. **The Journal of Nutrition, Health & Aging,** v.21, n.10, pp.1337-1343 (2017).

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

ANEXOS

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

FMRP
65 anos USP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado *"Efeito das membranas de Látex Natural e/ou Colágeno a regeneração óssea de tíbia de ratos"*, registrado com o número **084/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano,** envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de maio de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 104 ratos Wistar machos pesando 300g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/05/2017 a 30/01/2019.

We certify that the Protocol **nº 084/2017,** entitled "Effect of Natural Latex and / or Collagen membranes on bone regeneration of rat tibiae", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/29/2017. This prbtocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 104 male Wistar rats weighing 300g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 01/30/2019.

Ribeirão Preto, 29 de maio de 2017

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

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

DECLARAÇÃO

Declaramos que o adendo do Protocolo para Uso de Animais em Experimentação **nº 084/2017**, sobre o projeto intitulado *"Efeito das membranas de látex natural e/ou colágeno a regeneração óssea de tíbia de ratos"*, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** em reunião de 02 de agosto de 2017.

We declare that the addendum to the Protocol ***nº 084/2017***, entitled ***"Effect of Natural Latex and / or Collagen membranes on bone regeneration of rat tibiae"***, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/02/2017.

Ribeirão Preto, 02 de agosto de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente do CEUA-FMRP – USP.
em exercício