

VERÓNICA KEI LEN CHIN

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REPARAÇÃO ÓSSEA INDUZIDA  
POR OSSO BOVINO DESMINERALIZADO, EM DEFEITOS  
BICORTICAIS NA MANDÍBULA DE RATOS, COM OU SEM  
MEMBRANAS DE COLÁGENO CÁLCICAS**

São Paulo

2004

**Verónica Kei Len Chin**

**Avaliação histológica da reparação óssea induzida por osso bovino desmineralizado, em defeitos bicorticais na mandíbula de ratos, com ou sem membranas de colágeno cálcicas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Maxilo-Faciais

Orientador: Prof. Dr. Josué Lourenço Santiago

São Paulo

2004

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Chin VKL. Avaliação histológica da reparação óssea induzida por osso bovino desmineralizado, em defeitos bicorticais na mandíbula de ratos, com ou sem membranas de colágeno cálcicas [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

São Paulo, 04/10/2004

### Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico:

À Força que criou a vida, pois creio na sua existência para explicar o inexplicável.

Ao meu pai *Tai Can* e minha mãe *Gut Kheu*, pois com muitas renúncias e sacrifícios, devem agora compartilhar as conquistas de seus filhos.

Ao meu irmão Daniel, amigo das brincadeiras de todas as horas.

Meu sucesso, minha devoção, meu amor...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço com honra:

Ao Professor Doutor Josué Lourenço Santiago pela importante lição de vida: “ninguém está aqui para ensinar, mas para aprender”.

Meu eterno respeito

Agradeço especialmente:

Às minhas amigas, colegas de graduação e mestrado, que sem os valiosos auxílios, este trabalho não teria sido possível: Adriana Matuchita Viana e Mayra Tamada Morlin,

Meu grande agradecimento

Ao Professor Doutor Antonio Carlos de Campos que abriu as portas da Disciplina de Cirurgia,

E ao Professor Doutor Carlos Gregori (*In memoriam*) com sabedoria guiou nossas vidas acadêmicas,

Meu reconhecimento de vossa  
dedicação ao ensino

Ao Professor Doutor Romualdo Rossa (*In memoriam*) pela doação de parte do material de pesquisa e pelo exemplo de pesquisador em busca do conhecimento,

Ao Professor Doutor Ney Soares de Araújo pela avaliação das lâminas histopatológicas do experimento,

Aos Professores Doutores José Basile Neto, José Luiz Piratininga, Marcos Vianna Gayotto, Maria Cristina Zindel Deboni, Maria da Graça Naclério-Homem e Marina Cleio Palo, pelos constantes ensinamentos,

Sinceros agradecimentos

Agradeço com carinho:

Aos amigos Dowglas Magalhães, Elza Maria Rocha Villanova e Aline Thaís pela divertida companhia.

Aos professores do departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais pela formação durante o curso de mestrado.

Agradeço de coração:

A Maria Aparecida Conceição, Maria Aparecida Andrade, Natália da Conceição Afonso, Ângela de Andrade, Roseli de Andrade e Carlos de Falco Júnior pelo constante apoio.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia Bucal da FOU SP, Elisa dos Santos, Patrícia Leonel Galdino e Edna Todai, pelo auxílio durante o processamento histológico.

Aos colegas do mestrado por dividirem suas experiências e adicionarem à minha.

Aos colegas do Serviço de Documentação Odontológica, onde aprendi a base para qualquer carreira científica, pela solicitude e simpatia no atendimento.

Àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e elaboração deste trabalho,

Muito Obrigada.

*"A morte do homem começa no instante em que ele desiste de aprender."*

*Albino Teixeira*



Chin VKL. Avaliação histológica da reparação óssea induzida por osso bovino desmineralizado, em defeitos bicorticais na mandíbula de ratos, com ou sem membranas de colágeno cálcicas [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

## RESUMO

O emprego do osso desmineralizado (OD), sobretudo de origem bovina, tem sido extensivamente avaliado em modelos experimentais; no entanto, há dúvidas se a quantidade de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) seria suficiente para induzir à reparação óssea. A associação com membranas, além de evitar o encapsulamento das partículas de OD, também poderia prevenir a dissolução precoce das poucas BMPs presentes no OD. O objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação histológica da reparação óssea induzida por OD em defeitos criados na mandíbula de ratos, e o efeito da utilização de membranas reabsorvíveis de colágeno impregnadas com sais de cálcio. O estudo envolveu 25 ratos Wistar, nos quais discos de OD foram utilizados no preenchimento de defeitos bicorticais na região de ângulo de mandíbula; no lado esquerdo, a face lingual e vestibular foi recoberta com membranas. Os animais foram divididos em grupos de cinco indivíduos cada e, então sacrificados depois de três, 10, 20, 30 e 60 dias pós-operatórios. A análise histológica revelou que nos primeiros 20 dias, houve intensa proliferação óssea nas duas extremidades, tanto na face vestibular quanto lingual, sendo provável também que a proliferação tenha ocorrido em toda margem do defeito circular. No entanto, aos 30 dias, houve uma inversão do quadro histopatológico: a resposta inflamatória até então moderada, cedeu lugar para um intenso infiltrado inflamatório envolvendo o OD, com ausência total da membrana, reduzindo a intensidade no grupo de 60 dias, que apresentou remanescentes de reação de corpo estranho em torno do OD, sem ocorrer preenchimento do defeito por osso neoformado. Pelos resultados observados, pode-se concluir que há presença de BMPs, responsável pela grande proliferação inicial, mas em quantidade insuficiente para conduzir à reparação total do defeito ósseo; a apresentação física em lâmina do OD, a partir do qual os discos foram preparados, parece ter dificultado a reabsorção da matriz óssea remanescente, provocando uma reação de corpo estranho. Por fim, a membrana de colágeno cálcica teve pouco efeito na proliferação óssea, gerando infiltrado

inflamatório moderado ao seu redor.

Palavras-Chave: Regeneração óssea; Transplante ósseo – Reabilitação; Curativos biológicos; Mandíbula; Ratos

Chin VKL. Histological evaluation of bone healing induced by demineralized bovine bone, in bicortical defects of rat mandibles, with or without calcic collagen membranes [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

## **ABSTRACT**

The use of demineralized bone (DB), in special from bovine source, has been evaluated extensively in experimental models; however, doubts exist if there is sufficient quantity of bone morphogenetic proteins (BMP) to induce the bone repairing. The combination of membranes avoids the encapsulating of DB particles and also it could prevent the early dissolution of the few BMPs present in the DB. The aim of this study was to carry out a histological evaluation of the bone repairing induced by DB on defects created in the rat mandibles, and the effect of using resorbable collagen membranes impregnated with calcium salts. The study involves 25 Wistar rats, in which DB discs were employed to fill bicortical defects in the region of mandibular angle; at the left side, membranes recovered the lingual and buccal side. The animals were divided into groups of five individuals each one and then killed after three, 10, 20, 30 and 60 postoperative days. Within first 20 days, the histological analysis revealed intense bone proliferation in the two bone ends, buccal as much lingual, and it is also probable the proliferation has occurred all around of the circular margin defect. However, from 30 days, there was an inversion in the histological findings: the inflammatory reaction until then moderate became an intense inflammatory infiltrate that was involving the DB, with total absence of the membrane, and then reducing the intensity at 60-days group, which presented remnants of foreign body reaction enveloping the DB, without new bone filling of the defect. From these results, it can conclude by the presence of BMPs, responsible by the great initial bone proliferation; the physical form of DB in sheets, of which discs were prepared, seemed to have prevented resorption of the remnant bone matrix and raised foreign body reaction. Finally, the calcium-collagen membrane had little effect in the bone proliferation, raising moderate inflammatory infiltrate around it.

Key-words: Bone regeneration; Bone transplantation – rehabilitation; Biological dressings; Mandible; Rats

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 4.1 – Defeito bicortical no ângulo da mandíbula .....37
- Figura 5.1 – Grupo de 3 dias, respectivamente, lado esquerdo e direito. OD, osso desmineralizado; MC, membrana cálcica; MD, mandíbula (aumento de 2,5x) .....41
- Figura 5.2 – Grupo de 10 dias, respectivamente, lado esquerdo e direito. OD, osso desmineralizado; ON, osso neoformado; MD, mandíbula (aumento de 2,5x) .....43
- Figura 5.3 – Grupo de 20 dias, respectivamente, lado esquerdo e direito. MC, membrana cálcica; OD, osso desmineralizado; ON, osso neoformado (aumento de 2,5x) .....45
- Figura 5.4 – Grupo de 30 dias, respectivamente, lado esquerdo e direito. OD, osso desmineralizado; ON, osso neoformado; II, infiltrado inflamatório (aumento de 2,5x) .....47
- Figura 5.5 – Grupo de 60 dias, respectivamente, lado esquerdo e direito. CO, coto ósseo; MD, mandíbula; II, infiltrado inflamatório (aumento de 2,5x) .....49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP      proteína óssea morfogenética

HA      hidroxiapatita

M      molar

µg      micrograma

µm      micrometro

µm<sup>2</sup>      micrometro quadrado

OD      osso desmineralizado

UI      unidade internacional

## SUMÁRIO

p.

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1 Potencial osteogênico do osso desmineralizado.....	16
2.2 Associação com membranas .....	27
<b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Material .....	33
4.2 Métodos.....	35
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O emprego do osso desmineralizado (OD) remonta a Senn (1889) que utilizou osso bovino, tratado com ácido muriático, para defeitos na calvária de cães. Contudo, durante mais de meio século após esse procedimento, os poucos relatos de sucessos e insucessos dividiram a opinião da literatura até que Urist (1965) observou formação de osso após implantar fragmentos de osso tratado com ácido clorídrico no tecido muscular de ratos.

A partir desta prova do potencial osteogênico, o OD, sobretudo de origem bovina e na forma liofilizada, tem sido extensivamente avaliado em modelos experimentais e clínicos, podendo-se até afirmar que é um dos materiais mais utilizados na reparação de defeitos ósseos maxilo-mandibulares na última década.

Os fatores responsáveis por esse fenômeno osteogênico foram identificados como proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) que, atualmente, constituem um grupo composto da BMP-2 à BMP-8, algumas das quais estruturalmente relacionadas à super-família do fator de crescimento tumoral beta. No entanto, poucas atuam na neoformação óssea, e quanto mais alta a dose, maior é a formação de osso e cartilagem (WOZNEY, 2002), o que vem lançando dúvidas se o OD possui quantidade suficiente para induzir à reparação óssea.

A forma química como o osso é processado para obtenção do material desmineralizado pode acarretar redução substancial no potencial osteoindutivo do

material (URIST; MIKULSKI, 1995; SAMPATH; REDDI, 1984). Além disso, estudos mostram que há uma faixa de tamanho em que as partículas apresentam a melhor resposta reparadora (GLOWACKI; ALTOBELLI; MULLIKEN, 1981; SYFTESTAD; URIST, 1979; ZHANG; POWERS; WOLFINBARGER, 1997).

A utilização de membranas, além de evitar o encapsulamento das partículas de OD, (MARDAS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002), também poderia prevenir a dissolução precoce das poucas BMPs presentes no osso (CHESMEL et al., 1998; SAITOH et al., 1994; SOLHEIM et al., 1992). No entanto, as membranas não-reabsorvíveis, que são as rotineiramente utilizadas, exigem uma segunda intervenção cirúrgica para a sua retirada, aumentando a morbidade. Neste contexto, somente Lim, Lee e Yeo (2000) avaliaram membranas reabsorvíveis de copolímero de polilactato-glicolato e OD na reparação de defeitos na calvária de ratos, encontrando resultados superiores às não-reabsorvíveis.

A utilização de um OD em lâmina, que facilita sobremaneira a manipulação, e das membranas reabsorvíveis de colágeno, ainda não foram avaliados em um modelo de defeito com paredes apenas em tecido ósseo. Portanto, o intuito deste trabalho é avaliar a reparação óssea induzida por OD em defeitos bicorticais na mandíbula de ratos, e o efeito da utilização de membranas de colágeno impregnadas com sais de cálcio.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Potencial osteogênico do osso desmineralizado

Urist (1965) observou osteogênese a partir de um fragmento ósseo desmineralizado com ácido clorídrico implantado no músculo reto abdominal de diferentes animais. Essa “auto-indução” em tecido ectópico foi atribuída a histiócitos, localizados nas criptas de reabsorção da matriz óssea, que produziriam agentes quimiotrópicos de células do tecido conjuntivo perivascular, induzindo-as a diferenciarem em células osteoprogenitoras.

Syftestad e Urist (1979) verificaram que a pulverização da matriz óssea reduzia a atividade osteogênica do OD. A implantação em ratos com OD homólogo partículas menores que  $44\ \mu\text{m}^3$  de tamanho resultou apenas em inflamação crônica do tecido conjuntivo, sem formação de cartilagem ou osso. A formação de osso foi mais freqüente com as partículas entre  $44\text{-}75\ \mu\text{m}^3$ , enquanto o aumento máximo no peso de tecido calcificado, de 40%, foi encontrado nas partículas de  $250\ \mu\text{m}^3$ .

Mulliken e Glowacki (1980) implantaram osso homólogo fresco, homólogo liofilizado e desmineralizado nos defeitos criados na calvária de ratos. Reparação óssea pobre foi observada nos defeitos preenchidos com osso liofilizado; naqueles em foram utilizados osso homólogo fresco e OD, houve reparação rápida com

formação de cartilagem e osso.

Glowacki, Altobelli e Mulliken (1981) compararam a reparação óssea induzida por osso mineralizado e desmineralizado nos defeitos de crânios de ratos. Avaliações histomorfométricas mostraram que o osso mineralizado foi completamente reabsorvido sem gerar resposta óssea reparadora; com o OD houve formação inicial de cartilagem, e as menores partículas de osso (<75 µm) induziram a maior neoformação de osso.

Sampath e Reddi (1983) encontraram que a atividade da matriz óssea bovina foi muito fraca para induzir a formação de osso quando implantada no subcutâneo de ratos, enquanto a matriz humana e a simia não geravam resposta. O extrato do OD, com 4M de guanidina-ácido clorídrico, também não mostrou atividade osteogênica. Somente a reconstituição espécie-específica, ou seja, OD misturado ao respectivo extrato, implantado na mesma espécie animal, induzia formação de osso. Levantaram assim, a hipótese de que os componentes indutivos estivessem presentes no extrato.

Sampath e Reddi (1984) investigaram a distribuição das BMPs na matriz óssea mineralizada e desmineralizada. Por meio de extrações seqüenciais com 4M de guanidina-ácido clorídrico e ácido etilenodiaminotetracético, e análise com eletroforese, encontraram que 25% das BMPs estavam ligadas à fase mineral removida pelo ácido; 15% solubilizavam na extração com os ácidos; e o restante encontra-se associado à matriz de colágeno. Os resultados revelaram que 40% das BMPs poderiam ser extraídas antes e durante a desmineralização.

Aspenberg, Kälébo e Albrektsson (1988) encontraram pouca formação de osso após implantarem câmaras de titânio, contendo OD, no tecido muscular próximo à tíbia de coelhos. Microradiografias revelaram que o volume de osso nas

câmaras experimentais foi 65% menor que nas câmaras vazias, apresentando também grande reabsorção do OD.

Resultados semelhantes ao estudo anterior foram novamente observados por Aspenberg, Lohmander e Thorngren (1988), em macacos com OD preparado a partir de suas fíbulas e em ratos com OD homólogo, quando implantado no tecido muscular. Pela mensuração do conteúdo de cálcio, verificaram que não houve captação pelo OD autólogo em macacos, enquanto aumento de 20% foi encontrado na matriz homóloga em ratos, colocando em dúvida a função indutora do OD.

Mais uma vez, a influência da espécie na formação ectópica de osso foi investigada por Aspenberg, Thorngren e Lohmander (1988) em ratos e coelhos. OD de ambas as espécies foram implantados nesses animais e em ratos atímicos. Pela mensuração da captação de cálcio, encontraram seu aumento nos ratos atímicos, no OD autólogo implantado em ratos normais, e em menor proporção no OD de coelho em ratos normais. Nos coelhos, o conteúdo de cálcio do OD homólogo aumentou e depois diminuiu, enquanto com o OD heterólogo não houve captação.

Guglielmotti et al. (1990) implantaram OD homólogo em alvéolos de ratos após a extração dos molares inferiores, e compararam ao lado controle sem preenchimento. Encontraram diferença significativa no volume total de osso alveolar que foi maior com o OD; entretanto, apenas o terço apical apresentou expressiva formação óssea.

Pela captação de cálcio<sup>45</sup> e tecnécio<sup>99m</sup>, De Bie et al. (1991) encontraram reparação óssea nos ratos, cujos defeitos de calvária foram preenchidos com OD homólogo. Comparada aos controles, a captação dos elementos radioativos nos defeitos experimentais foi significativamente maior, com pico de atividade na quinta semana de estudo.

Hollinger et al. (1991) compararam quatro derivados de osso homólogo na reparação de defeitos de calvária em ratos. Encontraram que o OD apresentou a maior radiopacidade e volume de osso neoformado. O osso homólogo, em que os antígenos foram removidos, e a matriz óssea regeneradora, duas formas de OD, apresentaram radiopacidade incompatível com o volume de osso formado.

Aspenberg, Wang e Thorngren (1992) implantaram OD homólogo, suplementado ou não com BMP, em tecido muscular de macacos. Observaram que no OD com BMP, houve neoformação óssea, porém o volume foi bem menor que o original implantado, sem haver diferenças nas doses de BMP empregadas. Por outro lado, o OD sem a proteína estava envolvido por tecido fibroso e apresentava poucas células ósseas.

Hagen et al. (1992) realizaram observações a longo-prazo da interface tecido conjuntivo/OD implantado no tecido subcutâneo e nos defeitos cranianos de ratos. No tecido mole, observaram que houve neoformação óssea, inclusive com medula óssea, porém, toda a interface consistia de partículas de OD. No crânio, os defeitos estavam reparados com tecido ósseo acelular, sem apresentar estrutura lamelar, e com poucos remanescentes de OD.

Isaksson e Alberius (1992) compararam a capacidade regeneradora do OD de origem endocondral e intramembranoso. Em defeitos de calvária de coelhos, além de implantarem o OD, também utilizaram osso autólogo na proporção de um quarto da área do defeito, além de deixarem alguns defeitos sem preenchimento. Observaram que a melhor resposta foi obtida com o OD, independente da origem embriológica, enquanto os defeitos controles apresentavam projeções esparsas de osso a partir das margens do defeito.

Lorente, Song e Donoff (1992) estudaram a reparação de defeitos ósseos na

mandíbula de ratos irradiados, preenchidos ou não com OD, também irradiado ou não. O OD irradiado foi preparado a partir de ossos longos de ratos vivos irradiados. Verificaram que o OD não-irradiado promoveu mais de 50% de reparação óssea em metade dos animais não-irradiados e em menor número de animais irradiados. Quando OD irradiado foi utilizado, a quantidade osso neoformado foi bem menor.

Pinholt et al. (1992) investigaram se osso ou dentina desmineralizados e osso implantados sob periosteio promoveriam aumento do rebordo alveolar em cabras. Os resultados da análise histológica revelaram que o material, em grande parte inerte, encontrava-se separado do osso subjacente por tecido conjuntivo fibroso. Em alguns locais, o osso hospedeiro apresentava-se superficialmente reabsorvido quando uma fina cápsula conjuntiva envolvia as partículas de OD.

Solheim et al. (1992) testaram um compósito de poliortoéster reabsorvível como veículo para o OD na reparação de defeitos da calvária de ratos. Apesar da neoformação óssea, quando comparada à ocorrida nos defeitos controles ou que receberam apenas o compósito, ter sido superior nos defeitos preenchidos com OD associado ou não ao compósito, este provocou uma leve inflamação com monócitos e algumas células gigantes que desapareceram com a reabsorção do material.

Em defeitos de calvária de coelhos, Lindholm, Gao e Lindholm (1993) estudaram o efeito de grânulos de hidroxiapatita (HA) no potencial osteogênico do osso desmineralizado e as respostas doses-dependente. Os resultados mostraram formação inicial de cartilagem e osso remodelado preenchendo quase totalmente o defeito no final do período de estudo com as doses menores, 20-30mg, mas não com a dose de 40mg. Nos defeitos preenchidos com a mistura de OD e HA, houve menor formação de osso e grande quantidade de tecido fibroso.

Becker, Becker e Caffesse (1994) compararam o OD com o autólogo no

preenchimento de alvéolos de dentes recém-extraídos de pacientes voluntários. Biópsias do osso revelaram a presença de partículas desvitalizadas de OD, sem evidência de formação de osso ou remodelamento, achados esses, opostos aos observados com o osso autólogo.

Dupoirieux et al. (1994) implantaram OD, esterilizado em óxido de etileno ou autoclavado por 1h a 80°C, ou coral em defeitos circulares no osso nasal de ratos. Nos defeitos preenchidos com OD esterilizado no gás, metade dos animais apresentou regeneração óssea completa, enquanto a outra metade apenas exibiam ossificação marginal; com o osso autoclavado não houve formação de osso, estando os defeitos preenchidos com substância amorfa; e com o coral, houve crescimento ósseo a partir das margens, sem ocorrer completa substituição por osso.

Marden et al. (1994) compararam matriz óssea de colágeno insolúvel embebida com duas doses de BMP-2 recombinante humana – 2,2µg e 6,5µg – e OD, em defeitos de calvária de ratos. Avaliações de radiomorfometria e histomorfometria formação de cartilagem e remineralização com a BMP-2, especialmente com a dose mais alta, sendo que ambas exibiram formação de osso mais expressiva em relação ao OD.

Saitoh et al. (1994) avaliaram a utilização do ácido polilactato como veículo para partículas de 1-1,5mm<sup>2</sup> de OD homólogo, implantadas no tecido subcutâneo de ratos. Observaram formação de cartilagem, substituída de forma gradual por osso e, comparado aos controles com OD apenas, houve maior infiltrado inflamatório principalmente torno do veículo.

Becker et al. (1995) testaram o potencial osteogênico de quatro produtos comerciais de OD no tecido muscular de ratos atímicos. A porcentagem de osso neoformado, que não foi visível radiograficamente, variou de 7,7% a 21,6%

dispersas em ilhotas de matriz óssea e osteócitos. Em contrapartida, a porcentagem de partículas desvitalizadas do OD variou de 78,4% a 92,5%.

A reconstrução óssea de defeitos congênitos no crânio de pacientes infantis com OD foi relatada por Moss et al. (1995). Lâminas de OD foram recortadas e adaptadas para reparar o crânio de crianças com média de idade de 3,9 anos, a maioria com problema de sinostose. Radiografias de acompanhamento mostraram regularização no contorno craniano, porém, estimaram que a substituição por osso natural seria um processo lento.

Redondo et al. (1995) avaliaram os efeitos da adição de grânulos de HA no potencial osteogênico do OD. Defeitos no ramo ascendente de ratos foram preenchidos com OD, dos quais no lado esquerdo, os grânulos foram colocados sobre a face lingual e vestibular. Verificaram que com a HA, o número de células mesenquimais formadas foi significativamente menor, sugerindo inibição da osteocondução.

Salzer et al. (1995) testaram lâminas perfuradas de OD homólogo, de origem endocondral ou intramembranosa, na reparação de defeitos cranianos de cães. Nos defeitos sem preenchimento, não houve reparação óssea; em relação aos controles preenchidos com osso homólogo, o OD apresentou maior volume de osso, contudo, estatisticamente a área de osso vital foi menor e a porcentagem de partículas desvitalizadas maior. Não encontraram diferenças embriológicas no potencial osteogênico do OD.

Shigeyama et al. (1995) analisaram a atividade biológica de um OD comercial e de outro preparado a partir de osso fresco. A análise química revelou entre outras substâncias, a presença de BMP-2, 4 e 7 no osso comercial, no entanto, elas estavam presentes em maior concentração no OD recém-preparado. Em culturas de

células, todos os extratos promoveram a adesão celular, mas não a migração das células. Estes resultados sugerem que o OD comercial tem capacidade de influenciar o comportamento celular *in vivo*, mas parte de sua atividade biológica é perdida durante o processamento do osso.

Urist e Mikulski (1995) observaram que a remoção de lipídeos da matriz óssea reduzia o potencial osteogênico. Implantados no tecido muscular de ratos, 100% do OD e 90% da matriz óssea gelatinizada induziram formação de osso ectópico, com cortical e medular, enquanto somente 20-25% do OD ou da matriz gelatinizada, isentos de lipídeos, foram reabsorvidos e substituídos por osso neoformado.

Schwartz et al. (1996) investigaram a capacidade osteogênica dos ODs disponíveis no mercado, implantados no tecido muscular e subcutâneo de ratos atímicos. Encontraram diferenças no tempo de formação óssea, ou mesmo ausência desta, e quanto ao tamanho da partícula, não houve correlação com a capacidade osteoindutiva, sugerindo grande variabilidade na eficácia e eficiência dos ODs comercializados.

Zhang, Powers e Wolfinbarger Jr (1997) avaliaram a influência do tamanho das partículas do OD humano e a idade dos doadores na osteoindutividade do material. Implantadas no músculo dorsal de ratos atímicos, as partículas de 500-710 µm apresentaram a maior deposição de cálcio, ainda que houvesse um grupo implantado com partículas maiores (710-850 µm), e a redução do tamanho da partícula determinou uma diminuição do conteúdo inicial de cálcio. Com relação à idade do doador, a osteoindução do OD de gênero feminino entre 31 e 40 anos, e de gênero masculino entre 41 e 50 anos foi significativamente maior que das outras faixas etárias, sem haver diferenças entre os gêneros.



Buser et al. (1998) compararam o osso autólogo, esponja de colágeno, OD homólogo, fosfato tricálcico e HA, no preenchimento de defeitos na mandíbula de porco em miniatura e recobertos com membrana de politetrafluoretileno. O osso homólogo apresentou o melhor desempenho, seguido do fosfato tricálcico, enquanto o OD e a HA tiveram os resultados menos favoráveis, devido à presença de remanescentes do material e à ossificação irregular.

Chesmel et al. (1998) estudaram a influência da apresentação física do OD humano e de rato na reparação óssea de defeitos craniano de ratos atímicos. As partículas de OD de rato misturadas com glicerol, uma “massa” feita de fibras de OD humano e glicerol, e lâminas flexíveis de fibras de OD humano, contendo ou não glicerol, apresentaram quantidades similares de osso neoformado, maiores do que aquelas obtidas nos defeitos preenchidos com osso autólogo. As partículas de OD humano misturadas com glicerol tiveram desempenho inferior, porém melhor que os defeitos preenchidos apenas com sangue.

Hosokawa et al. (1999) avaliaram a indução óssea do OD implantado sobre o osso frontal de ratos, tendo como controle a HA. Clinicamente, verificaram redução de 80% do volume inicial, tornando-se não-detectável no final do estudo. No entanto, a análise histológica revelou osteogênese com o OD, enquanto uma densa malha de tecido granulomatoso envolvia as partículas de HA, com pouca ou nenhuma formação de osso.

Wang e Glimcher (1999) compararam o grau de osteogênese da matriz do OD homólogo com o bovino, ambos implantados em tecido subcutâneo e em defeitos na calvária de ratos. Observaram que o osso homólogo no sítio ectópico formou inicialmente cartilagem e promoveu diferenciação de osteoblastos nos defeitos ósseos, evoluindo para formação de osso, porém, em maior quantidade na

calvária. Por outro lado, o osso bovino, apesar de ter induzido algumas células cartilaginosas no tecido subcutâneo, foi totalmente reabsorvido, enquanto nos defeitos ósseos induziu formação de osso em grau muito menor que o homólogo.

von Arx et al. (2001) observaram que a utilização de membrana de politetrafluoretileno preservou a largura e a altura do rebordo alveolar, apenas com o osso autólogo em defeitos na mandíbula de cães. Com OD e partículas de fosfato tricálcico, a neoformação óssea foi pobre e houve encapsulamento de grande parte do material, com redução da largura do rebordo e altura da crista.

Clokie et al. (2002) testaram sulfato de cálcio, OD e cimentos de fosfato de cálcio na reparação de defeitos cranianos em coelhos. Encontraram 87,1% de osso neoformado envolvendo as partículas de OD, enquanto nos defeitos controles (vazios) ou preenchidos pelos compostos de cálcio, houve somente formação de tecido fibroso, apesar de radiograficamente se apresentarem radiopacos.

Garcia e Albergaria-Barbosa (2002) analisaram a capacidade de regeneração do osso humano desmineralizado e liofilizado em defeitos de calvária de coelhos. Inicialmente, houve presença de tecido conjuntivo com intensa reação inflamatória evoluindo para um discreto infiltrado, com osso neoformado envolvendo as partículas de OD. Nos defeitos sem preenchimento, houve presença de tecido conjuntivo denso envolvendo ilhotas de osso neoformado próximo aos cotos ósseos.

Fu et al. (2003) examinaram a osteogênese sob influência da ciclosporina-A misturada ao osso humano desmineralizado em defeitos bicorticais da mandíbula de ratos. Por meio de microfotografias, a maior quantidade de osso neoformado foi encontrada nos defeitos preenchidos com OD, misturado ou não à ciclosporina-A, quando comparados aos defeitos preenchidos apenas com óleo mineral contendo o imunossupressor, com significativa redução de partículas residuais de OD no grupo

da ciclosporina-A.

Mardas et al. (2003b) verificaram que a desnaturação protéica, ou seja, o aquecimento do OD em água destilada entre 70°C a 90°C, diminuiu significativamente o potencial osteogênico do material, quando implantado sob cápsulas apostas ao ramo mandibular de ratos. Enquanto o lado controle apresentava um volume de 46,7% de preenchimento por osso neoformado, o lado experimental mostrou apenas 19,1%.

Sanada et al. (2003) avaliaram a reação tecidual aos blocos de 5x12mm de OD bovino esponjoso acelular, implantado em tecido muscular de ratos. Radiograficamente, não se observou mineralização do OD e a análise histológica mostrou inicialmente um processo inflamatório agudo, caracterizado pela presença de neutrófilos, reabsorção do coágulo e angiogênese. Posteriormente, houve reabsorção da matriz por células mononucleadas, com raras células gigantes e substituição por tecido conjuntivo fibroso, com pequenos fragmentos de matriz envoltos por tecido conjuntivo, sem haver osteogênese.

Blum et al. (2004) mediram os níveis de BMP-2, BMP-4, fator de crescimento semelhante à insulina 1 e fator de crescimento transformador alfa 1 presentes no OD procedentes de dois bancos de ossos, e correlacionou-os com o potencial osteogênico no músculo de ratos atímicos. Verificaram que os níveis de proteínas foram variáveis, mas os de BMP-2 estavam fortemente correlacionados com a formação de osso em sítio ectópico e aos níveis do fator de crescimento transformador.

Moghadam et al. (2004) avaliaram a regeneração óssea de defeitos na calvária de coelhos, preenchidos com gel de OD ou compostos inorgânicos. Verificaram que o OD foi superior e o acréscimo de hidróxido de cálcio não melhorou

a regeneração óssea. Com relação à aplicação de forma isolada do hidróxido de cálcio e os dois cimentos de fosfato de cálcio disponíveis comercialmente, os resultados foram inferiores e similares ao controle sem preenchimento.

## **2.2 Papel das membranas**

Kaban e Glowacki (1981) avaliaram a reparação óssea de defeitos na mandíbula de ratos com pó de OD, com ou sem filtro Millipore®, fragmentos de osso liofilizado e osso mineralizado. Avaliações histológicas e a análise da captação de cálcio<sup>45</sup> revelaram que a formação de osso foi mais rápida e completa com o OD, independente da utilização da barreira; com os outros materiais, a formação de osso foi menor.

Kleinschmidt et al. (1993) avaliaram um sistema 'multi-fásico' de implantação de OD, em que discos de ácido de polilactato-glicolato foram utilizados tal como membranas na regeneração óssea guiada. Defeitos de calvária de coelhos foram preenchidos com OD e ou discos do polímero. Inicialmente, a formação de osso foi quase duas vezes maior pelo sistema 'multi-fásico' em relação à implantação de apenas OD. Contudo, no final do período de estudo, não houve diferença significativa entre a utilização do sistema, osso apenas ou discos do polímero apenas, apresentando importantes diferenças no contorno externo.

Brugnami et al. (1996) trataram alvéolos de dentes recém-extraídos de pacientes com OD homólogo e aposição de membranas de politetrafluoretileno. A análise histológica do osso removido para a colocação de implantes revelou que

ainda havia remanescentes de partículas depois de um ano, incorporadas em tecido osteóide e osso lamelar. A porção medular apresentava grau médio de fibrose, sem sinais de reação inflamatória, tendo sido observado poucos osteoclastos.

Rossa et al. (1996) compararam a reação tecidual no tecido subcutâneo de ratos após implantação de membrana cálcica biológica, de ácido polilactato-glicolato e óssea. Na avaliação histológica, observou-se que as membranas foram envolvidas por tecido de granulação, com moderado infiltrado inflamatório de células neutrofílicas e eosinofílicas envolvendo a membrana cálcica, sendo escasso com a membrana polimérica e intenso com a membrana óssea. Células macrofágicas e células gigantes tipo corpo estranho apresentaram-se em quantidade decrescente para membrana cálcica, polimérica e óssea. A membrana de ácido polilactato-glicolato foi mais biodegradável que a cálcica, enquanto a óssea não mostrou alteração na sua estrutura.

Rossa, Gomes e Nogueira (1997) descreveram a produção e as características químicas da membrana de colágeno cálcica. A membrana é produzida pelas bactérias *Saccharomyces cerevisiae*, em meio de cultura contendo sais de cálcio, a 25°C, durante 10 dias. A membrana lembra uma folha de papel transparente-esbranquiçado, de superfície lisa e brilhante, e consistência rígida. Na microscopia óptica, apresenta-se como um feixe eosinofílico, denso e acelular constituído por fibras delicadas entrelaçadas, com espessura de aproximadamente 120µm. Pela análise química, a membrana apresenta grande quantidade de colágeno, é insolúvel, e a técnica de absorção atômica revela presença de sais de cálcio, magnésio, sódio e potássio.

Landi (1998) relatou a utilização de colunas de cortical óssea e de OD, associado à membrana de politetrafluoretileno, para aumento do rebordo alveolar de

um paciente antes da colocação de implantes. Biópsias do osso neoformado revelaram tecido osteóide em processo de formação lamelar, com poucos espaços medulares, ao passo que as colunas de cortical óssea apresentavam-se desvitalizadas, mas em contato com o osso alveolar neoformado.

Smukler, Landi e Setayesh (1999) realizaram um estudo piloto em pacientes voluntários para avaliar a reparação óssea promovida pelo OD homólogo e membrana de politetrafluoretileno, em alvéolos de dentes recém-extraídos e rebordos alveolares reabsorvidos; nestes casos, colunas de OD foram utilizadas para criar uma projeção de 3mm de altura. Biópsias do osso neoformado não revelaram sinais de inflamação ou encapsulamento do material. No entanto, quando comparado ao dos sítios não-preenchidos, o volume de osso trabecular formado nos sítios experimentais foi semelhante, sugerindo um processo reparador por osteocondução.

Herculiani et al. (2000) estudaram o processo reparador de defeitos ósseos na calvária de cobaias, preenchidos com osso bovino desmineralizado e isolados com membrana de cortical óssea bovina liofilizada. Nos defeitos controles, preenchidos apenas com coágulo, não houve formação de osso, exibindo grande quantidade de tecido conjuntivo; nos defeitos recobertos apenas com a membrana, 52% da área da loja estavam preenchidos com osso neoformado, exibindo significativa proliferação óssea nas margens; e, em relação aos defeitos tratados com a associação dos materiais, o crescimento ósseo a partir das margens foi menor, mas o preenchimento atingiu 62%.

Lim, Lee e Yeo (2000) compararam a regeneração óssea dada pelo OD, associado à membrana reabsorvível ou não-reabsorvível. Em calvária de ratos, observaram que os defeitos preenchidos apenas com o osso exibiram maior

neoformação óssea inicial, seguido pela associação com membrana reabsorvível; em contrapartida, no final do experimento, houve inversão entre esses dois grupos. Com relação aos defeitos recobertos apenas com membrana, a não-reabsorvível apresentou o segundo melhor resultado, enquanto o desempenho da reabsorvível foi similar aos defeitos sem preenchimento.

Mardas, Kostopoulos e Karring (2002) estudaram o impacto da reparação óssea com OD e membranas de politetrafluoretileno no crescimento sutural do crânio de ratos. Observaram que os defeitos da calvária, realizados sobre as suturas, tratados apenas com membranas não repararam tal como os controles sem preenchimento. Naqueles em que somente OD foi utilizado, houve reparação completa ou parcial com osso e tecido conjuntivo; na associação com membranas, a reparação foi completa. Quanto ao crescimento craniano, no sentido sagital não houve alteração, assim como no sentido lateral nos defeitos controles ou com membranas; no entanto, nos defeitos com OD houve restrição significativa do crescimento no sentido lateral.

Mardas et al. (2003a) investigaram se a formação óssea pelo OD seria aumentada com membranas porosas. Na região de ramo em ratos, domos feitos com membranas de politetrafluoretileno, porosas ou não, foram preenchidos com osso homólogo liofilizado particulado. Verificaram que não houve diferença significativa no volume de osso formado, sugerindo que a participação de células mesenquimais indiferenciadas do tecido mole adjacente era desnecessária.

Mardas et al. (2003c) avaliaram a interação entre OD e o politetrafluoretileno utilizado na regeneração óssea guiada. Cápsulas de teflon contendo ou não o osso foram apostas sobre o ramo da mandíbula de ratos. Para ambos os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de osso neoformado,

embora este fosse mais denso no grupo com OD.

Zubillaga et al. (2003) descreveram redução na altura e largura do osso alveolar previamente aumentados com OD e membrana reabsorvível composta de ácido polilactato-glicolato e carbonato de trimetiletileno. Em pacientes submetidos à extração dentária, o OD e a membrana foram implantados para preservar o osso alveolar ou aumentar até que houvesse 6mm de largura e 3mm de altura. A largura do rebordo medido a partir de 3mm da crista revelou perda de 4,7-20% em ambos os sítios; medida a 5mm da crista, os sítios aumentados apresentaram perda de 83,3-92,3%, enquanto nos sítios preservados a perda foi de 12,9-18%. Com relação à altura, os sítios aumentados perderam entre 93,5-100% e os preservadas mostraram perda de 8,8-12%.

Stavropoulos et al. (2004) compararam a utilização de uma membrana de ácido poliglicolato e carbonato de trimetiletileno com a de colágeno na reparação de defeitos criados no rebordo alveolar de cães reparados com OD homólogo. Observaram presença de quantidade estatisticamente diferente de tecido mole sob as membranas e de reparação óssea, sendo o melhor resultado atribuído à membrana polimérica.



### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a reparação óssea induzida por discos de osso bovino desmineralizado e isento de lipídeos, no preenchimento de defeitos circulares bicorticais realizados na região de ângulo da mandíbula de ratos, investigando também o efeito das membranas de colágeno cálcicas no processo reparador.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Por envolver o uso de animais, antes do início do presente estudo, obteve-se a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, segundo Certificado do Protocolo 143/2002, emitido em 23 de maio de 2002 (Anexo A), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### 4.1 Material

- 25 (vinte e cinco) ratos fêmeas da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com média de idade de dois meses e peso aproximado de 120g;
- benzilpenicilina benzatina 1.200.000UI – (Eurofarma);
- brocas carbide esféricas cirúrgicas nº 8;
- campos descartáveis de polipropileno;
- cloridrato de cetamina (Dopalem – Agribands do Brasil);

- cloridrato de dihidroxitiazina (Rompum – Bayer);
- fios de sutura 5-0 (Mononylon – Brasuture);
- gazes estéreis;
- instrumental cirúrgico;
- lâminas de barbear para tricotomia;
- lâminas de bisturi nº 15 (Paramount Surgimed);
- luvas cirúrgicas estéreis (Madeitex; Sensitex – Mucambo);
- luvas de procedimento (Supermax – Embramac);
- máscaras (Descarpack);
- membranas de colágeno cálcicas\*;
- motor de baixa rotação (Bethil – Equipamentos Odontológicos);
- polivinilpirrolidona-iodo;
- lâminas de osso bovino de tenra idade, isento de toda porção mineral e lipídica\*;
- seringas estéreis descartáveis de 1ml com agulha (Plastipak – Becton Dickinson);
- soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9% – Aster Produtos Médicos Ltda);
- toucas.

---

\* material doado pelo Professor Doutor Romualdo Rossa (*In memoriam*), Disciplina de Prótese Buco-Maxilo-Facial, Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilo-Faciais, FOU SP.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 manuseio inicial dos animais

Como o local de procedência era diferente do local de estudo, houve a necessidade de um período de adaptação de pelo menos 15 dias antes que a etapa cirúrgica fosse realizada. Assim, os animais permaneceram do dia 11 de julho de 2002, data de entrada, a 5 de agosto de 2002, no Laboratório Experimental do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, onde o experimento foi conduzido posteriormente.

Durante o período de adaptação e o período pós-operatório, os animais receberam ração para roedores (Purina) e água *ad libitum*. As condições do Laboratório Experimental seguiram as normas propostas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal.

### 4.2.2 preparo do OD e da membrana de colágeno cálcica

O OD e a membrana foram preparados concomitante ao preparo pré-operatório dos animais.

A apresentação física em lâminas de 2mm de espessura exigiu que o osso

fosse recortado em círculos de aproximadamente 2,5mm de diâmetro por 1mm de espessura.

A membrana de colágeno cálcica também foi recortada de forma circular, porém com diâmetro de aproximadamente 5mm, a fim de que recobrisse o defeito circular com margem de sobra.

Ambos os materiais foram mantidos em soro fisiológico até o momento do uso.

#### 4.2.3 preparo pré-operatório dos animais

Os animais, pesados previamente, foram imobilizados manualmente, enquanto se injetava a dose correspondente de cloridrato de cetamina a 0,8ml/kg e de cloridrato de dihidroxitiazina a 0,1ml/kg, por via intraperitoneal, após anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodo da região ventral.

Com a manifestação do efeito anestésico, a região ventral submandibular recebeu tricotomia e anti-sepsia.

#### 4.2.4 procedimento cirúrgico

O acesso cirúrgico foi iniciado por uma incisão retilínea com bisturi ao longo da borda inferior do corpo da mandíbula; com tesoura de ponta, a divulsão foi

realizada para separar a derme, do tecido muscular subjacente.

Uma outra incisão foi realizada sobre o músculo masseter, apoiando a ponta da lâmina em tecido ósseo do corpo da mandíbula. A divulsão com espátula de Freer ocorreu em ambos os lados, vestibular e lingual, a fim de expor o osso do ângulo da mandíbula, destacando-se o periósteo.

O campo cirúrgico foi mantido com afastadores de Sean, enquanto a loja cirúrgica de 3mm de diâmetro (Figura 4.1) era criada com broca esférica, montada em peça de mão de motor de baixa rotação, sob irrigação com soro fisiológico.

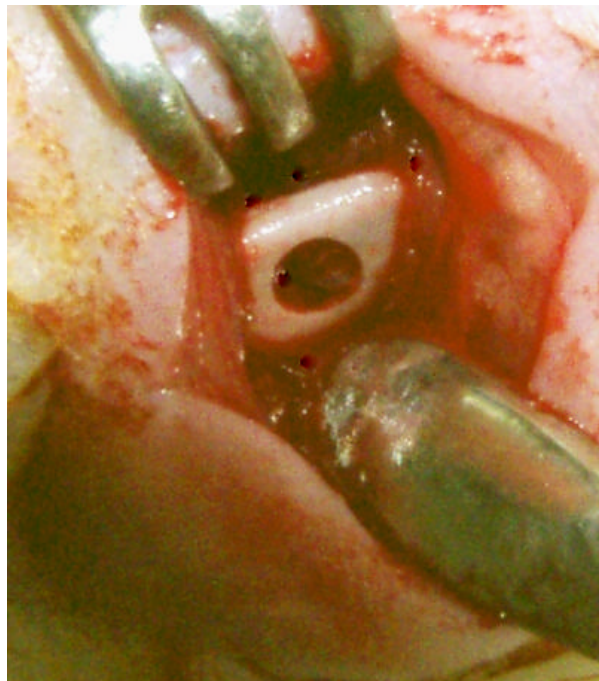


Figura 4.1 – Defeito bicortical no ângulo da mandíbula

Ambos os lados receberam o fragmento circular de OD, porém o lado direito recebeu, adicionalmente, as membranas recobrando o defeito por lingual e vestibular, excluindo assim o leito cirúrgico do contato do tecido mole. Devido à natureza semi-

rígida da membrana de colágeno cálcica, esta se adaptou à superfície relativamente plana da região de ângulo e ramo da mandíbula, tornando desnecessário qualquer tipo de fixação da mesma.

Após a colocação dos materiais, a massa muscular foi reposicionada e realizou-se somente a sutura do plano epidérmico. Logo após o término do procedimento, foi aplicada uma dose de 16.000UI de antibiótico no músculo femoral de cada animal.

#### 4.2.5 períodos de estudo

Para avaliação das etapas da regeneração óssea, os períodos adotados neste estudo seguiram a cronologia estabelecida por Santiago (1999), excetuando o os grupos de 90 e 120 dias. Assim, os períodos estudados foram de três, 10, 20, 30 e 60 dias pós-operatórios.

#### 4.2.6 histórico pós-cirúrgico

A pesquisa transcorreu sem ocorrência de infecção, morte de animais ou qualquer outro incidente. Na tabela a seguir, são descritos os grupos e suas respectivas datas de cirurgia e sacrifício.

Tabela 4.1 – Grupos estabelecidos para estudo e as datas da cirurgia e sacrifício

<b>Grupo</b>	<b>Cirurgia</b>	<b>Sacrifício</b>
3 dias	14 ago 2002	17 ago 2002
10 dias	07 ago 2002	17 ago 2002
20 dias	06 set 2002	26 set 2002
30 dias	06 ago 2002	05 set 2002
60 dias	08 ago 2002	07 out 2002

Os animais foram sacrificados com uma dose letal de anestésico e as mandíbulas imediatamente removidas.

#### 4.2.6 preparo para o processamento histológico

As mandíbulas foram removidas inicialmente por divulsão da epiderme e das inserções musculares e, finalmente por desarticulação do osso, preservando-se a massa muscular em torno da região do ângulo. As peças foram imersas em formol a 10% para fixação, onde permaneceram no mínimo sete dias. A seguir, foram descalcificadas em ácido fórmico a 20% durante exatamente uma semana e então lavadas em água corrente por um dia, para remoção dos resíduos ácidos. Após a descalcificação, as mandíbulas foram então seccionadas ao meio, em lado direito e esquerdo, e incluídas em parafina.

Os cortes histológicos foram obtidos a 7µm de espessura, em plano dorsal, no sentido látero-lateral, iniciando de posterior para anterior, e corados com hematoxilina e eosina para microscopia óptica de luz.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Grupo de 3 dias

#### 5.1.1 lado esquerdo (Figura 5.1)

Há exsudato inflamatório, predominantemente de células inflamatórias mononucleares e neutrofílicas suportadas em uma rede de fibrina. Em uma das extremidades dos cotos ósseos está presente neoformação óssea com atividade osteoblástica e osteoclástica. A observação do espécime como um todo mostra um quadro inflamatório crônico e agudo moderado, envolvendo o OD e os fragmentos ósseos remanescentes, estendendo-se e infiltrando-se no tecido muscular adjacente, com presença de focos de neoformação óssea.

#### 5.1.2 lado direito (FIG 5.1)

Há presença de processo inflamatório agudo, com intenso infiltrado

neutrófilico e marcante exsudação envolvendo o OD e os cotos ósseos remanescentes. É possível observar neoformação óssea no osso remanescente.

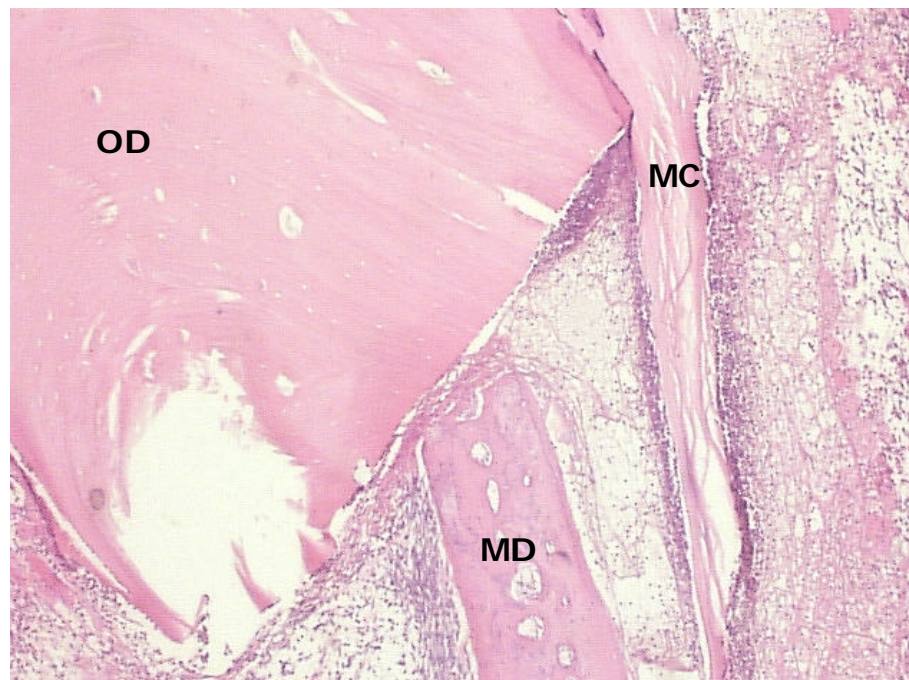


Figura 5.1 – Grupo de 3 dias, *superior* e *inferior*, respectivamente, lado esquerdo e direito. OD, osso desmineralizado; MC, membrana cálcica; MD, mandíbula (aumento de 2,5x)

## 5.2 Grupo de 10 dias

### 5.2.1 lado esquerdo (Figura 5.2)

Os espécimes mostram evolução e maturação da resposta inflamatória, com aparecimento de tecido conjuntivo fibroso bastante celularizado e discreto infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, esparso pelo todo.

O quadro histológico é dominado por neoformação óssea, presente nas duas extremidades do defeito ósseo e ao redor do OD, subjacente e internamente à membrana colocada. O tecido ósseo neoformado é constituído de trabéculas irregulares que se interconectam e aderem ao osso remanescente, dispondo-se ao redor do OD.

### 5.2.2 lado direito (Figura 5.2)

A resposta inflamatória presente é do tipo crônico fibroso, com pequeno número de células inflamatórias mononucleares envolvendo o OD e as extremidades dos fragmentos ósseos remanescentes. Neoformação óssea se faz presente ao redor dos cotos ósseos e focalmente em contacto com o OD.



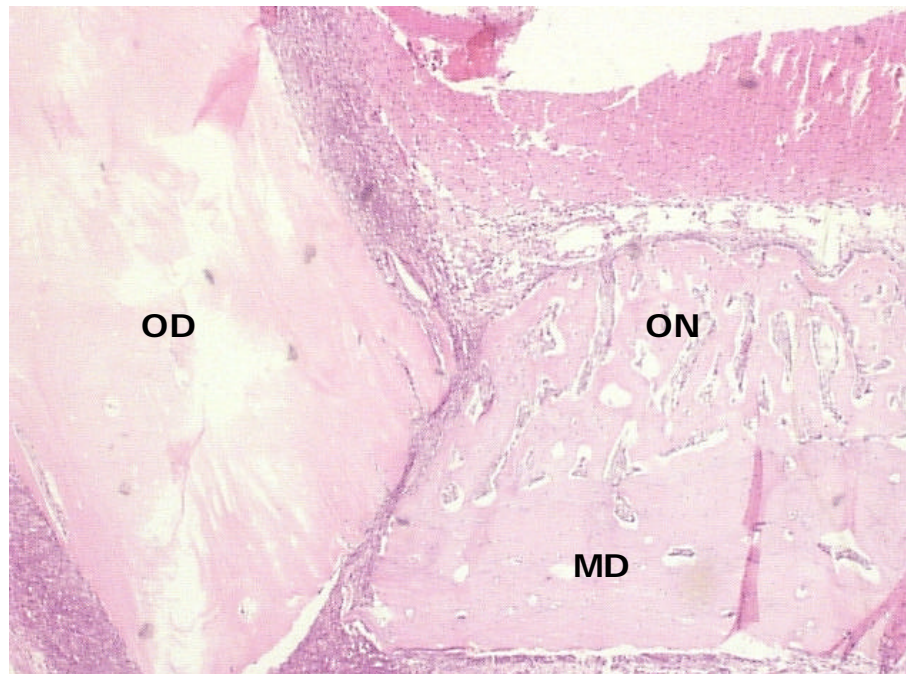
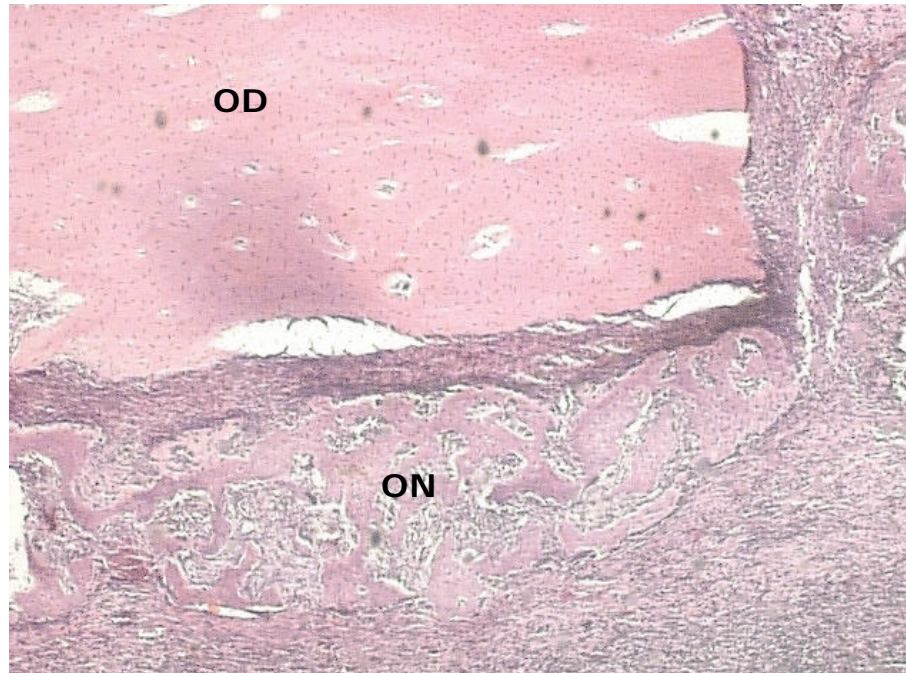


Figura 5.2 – Grupo de 10 dias, *superior* e *inferior*, respectivamente, lado esquerdo e direito. OD, osso desmineralizado; ON, osso neoformado; MD, mandíbula (aumento de 2,5x)

### 5.3 Grupo 20 dias

#### 5.3.1 lado esquerdo (Figura 5.3)

O quadro histológico do espécime examinado mostra quadro reparador com maturação discreta do tecido conjuntivo e presença de abscessos isolados envolvendo a membrana, de ambos os lados. A resposta óssea assemelha-se à observada no grupo de 10 dias, porém com maior evolução quantitativa.

#### 5.3.2 lado direito (Figura 5.3)

A resposta inflamatória assemelha-se a do grupo com membrana, mostrando fibrose e infiltrado inflamatório difuso discreto. Neoformação óssea está presente em especial junto aos cotos ósseos.



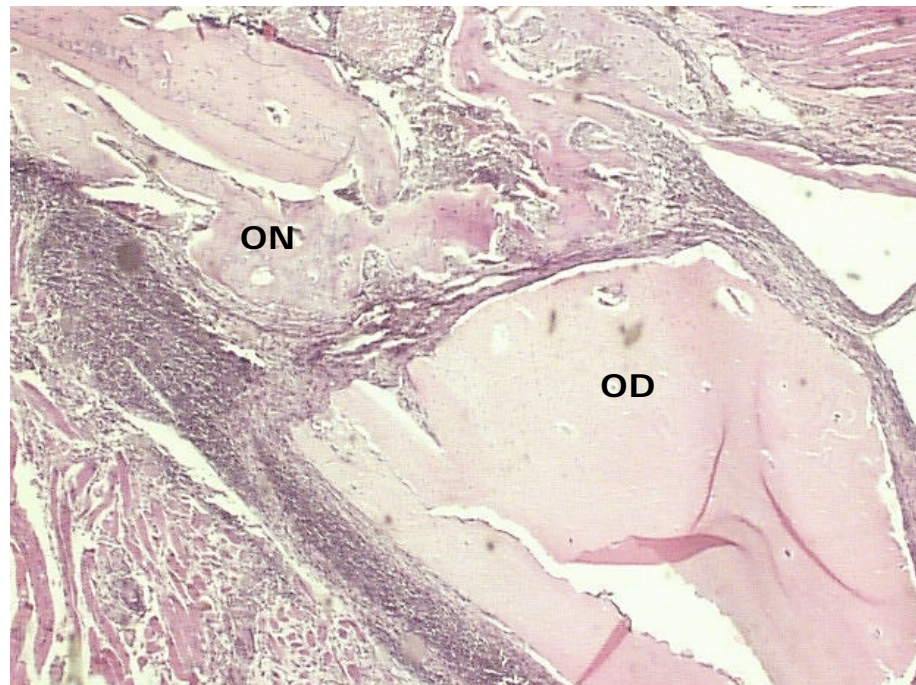
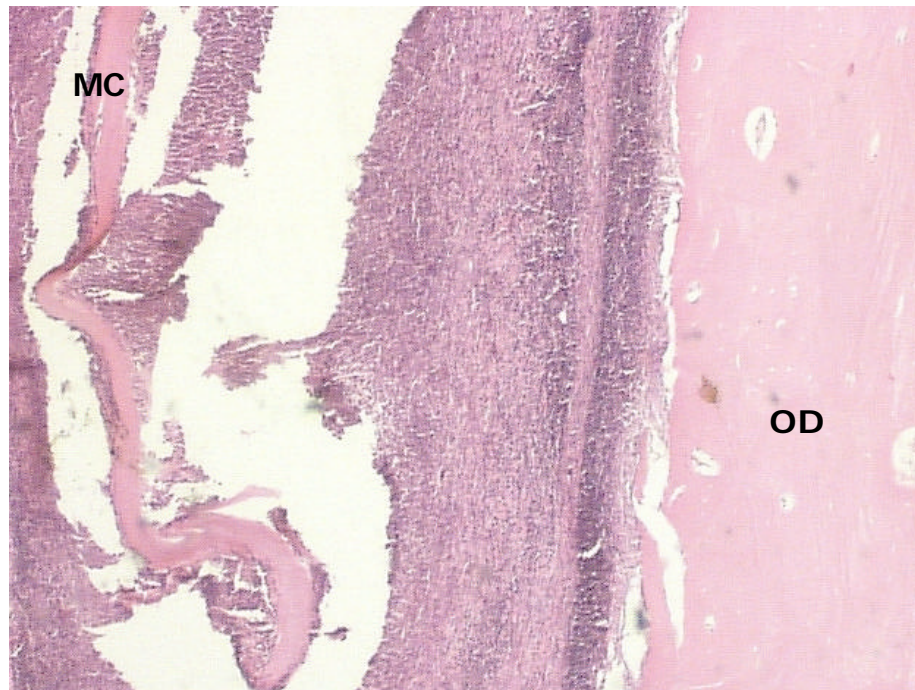


Figura 5.3 – Grupo de 20 dias, *superior* e *inferior*, respectivamente, lado esquerdo e direito. MC, membrana cálcica; OD, osso desmineralizado; ON, osso neoformado (aumento de 2,5x)

## 5.4 Grupo 30 dias

### 5.4.1 lado esquerdo (Figura 5.4)

Nesse tempo experimental não é mais patente a presença da membrana. A resposta inflamatória persiste com fibrose por vezes discreta e esparsas células inflamatórias envolvendo em especial o OD. Área focal de reação de corpo estranho é observada. Os dois fragmentos ósseos exibem neoformação óssea.

### 5.4.2 lado direito (Figura 5.4)

O OD presente entre os dois cotos ósseos aparece envolto por fibrose e há intenso infiltrado inflamatório mononuclear.



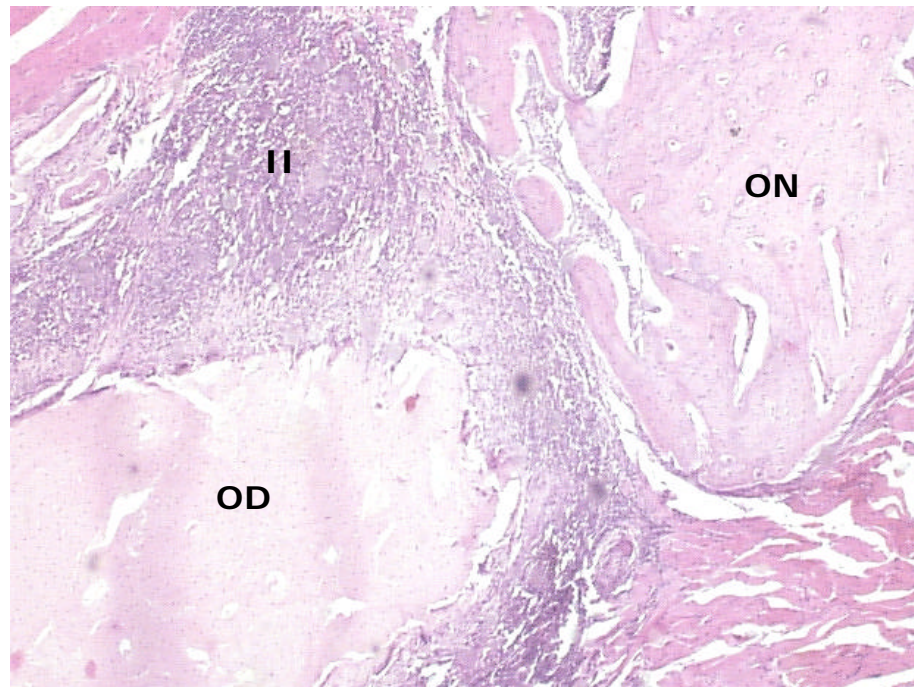


Figura 5.4 – Grupo de 30 dias, *superior* e *inferior*, respectivamente, lado esquerdo e direito. OD, osso desmineralizado; ON, osso neoformado; II, infiltrado inflamatório (aumento de 2,5x)



## 5.5 Grupo de 60 dias

### 5.5.1 lado esquerdo (Figura 5.5)

A membrana não mais é identificada no espécime e área de formação de corpo estranho pode ser observada. A resposta inflamatória é variável entre os espécimes examinados, com células inflamatórias mononucleares presentes. Os dois cotos ósseos não exibem continuidade, não sendo mais distinto o OD.

### 5.5.2 lado direito (Figura 5.5)

O quadro histológico assemelha-se ao observado no grupo de 30 dias, exibindo uma menor intensidade da resposta inflamatória.

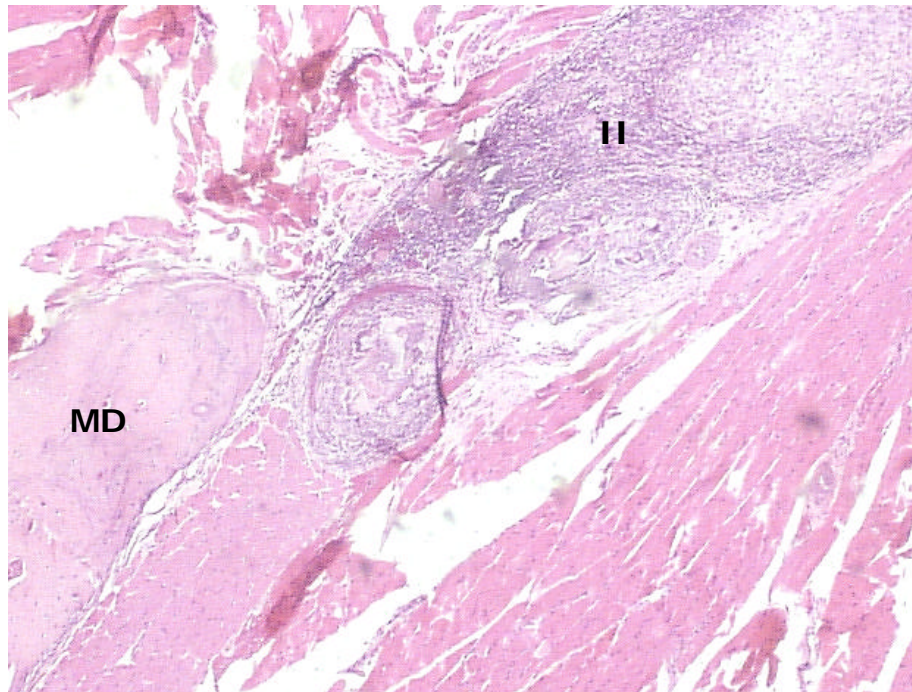
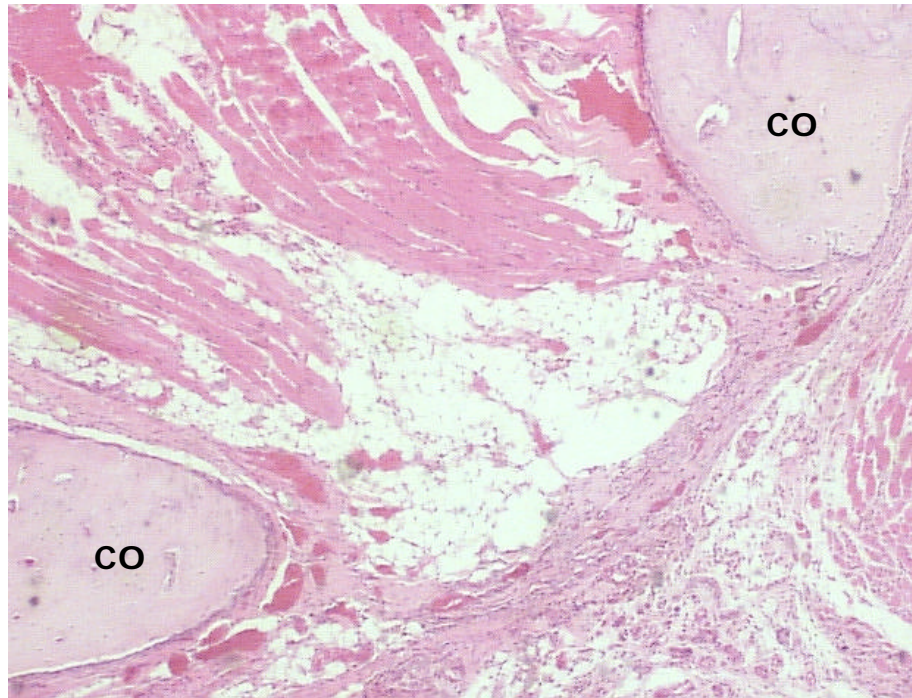


Figura 5.5 – Grupo de 60 dias, *superior* e *inferior*, respectivamente, lado esquerdo e direito. CO, coto ósseo; MD, mandíbula; II, infiltrado inflamatório (aumento de 2,5x)

## 6 DISCUSSÃO

Quando Urist, em 1965, descreveu que o osso desmineralizado de forma adequada poderia induzir a neoformação de osso quando implantando em sítio ectópico, criou-se um vasto campo de pesquisa sobre o tratamento químico ideal que preservasse ao máximo as BMPs no osso. Mesmo os dois processos básicos utilizados para a obtenção do material, a desmineralização e a remoção de gorduras, podem reduzir de forma significativa o conteúdo dos fatores de crescimento presentes no osso fresco.

Cerca de 40% da atividade osteoindutiva está associada à fase mineral do osso removida pelos ácidos, e os outros 60% permanecem ligada à matriz de colágeno (SAMPATH; REDDI, 1984). No entanto, o extrato da desmineralização em si não induz a formação de osso e, quando misturada a sua matriz óssea, aumenta a capacidade osteoindutora desta (SAMPATH; REDDI, 1983).

Sobre a remoção de gorduras, etapa para a remoção da medula óssea e de restos celulares, há um decréscimo da atividade osteogênica, pois os lipídeos estão associados a proteínas não-colagenosas responsáveis pela recalcificação da matriz, fase posterior à indução pelas BMPs (HOLLINGER et al., 1991; URIST; MIKULSKI, 1995).

Outros processos físicos que têm sido utilizados para a esterilização do OD, também reduzem ou anulam a capacidade osteoindutora do mesmo, pela

denaturação das BMPs e do colágeno, como a irradiação (LORENTE et al., 1992) e a autoclavagem ou fervura (DUPOIRIEUX et al., 1994; MARDAS et al., 2003b). Por outro lado, o óxido de etileno não parece ter efeito deletério sobre os fatores de crescimento e a matriz (DUPOIRIEUX et al., 1994).

O presente estudo utilizou um OD preparado segundo o protocolo convencional de desmineralização seguida pela remoção de gorduras. Ao contrário dos produtos comercialmente disponíveis, o OD não foi particulado e nem liofilizado, apresentando-se na forma de uma lâmina flexível e imersa em uma solução de doxiciclina para sua esterilização.

Isto dispensa o uso de veículos para a compactação das partículas de OD nos defeitos ósseos, pois a HA e o fosfato tricálcico, comumente utilizados para ganhar volume ósseo, promovem encapsulamento do material implantado e inibição do efeito osteoindutivo das BMPs (von ARX et al., 2001; BUSER et al., 1998; LINDHOLM; GAO; LINDHOLM, 1993; REDONDO et al., 1995). Com relação aos poliméricos, em especial o ácido polilactato-glicolato e o poliortoéster, há uma reação inflamatória caracterizada por infiltração de macrófagos e células gigantes multinucleadas até a sua completa reabsorção (ROSSA et al., 1996; SAITOH et al., 1994; SOLHEIM et al., 1992).

A análise histológica dos espécimes deste trabalho revelou que nos primeiros 20 dias, houve intensa proliferação óssea nas duas extremidades, mais precisamente na face vestibular e lingual do ângulo da mandíbula. Apesar dos cortes terem sido no sentido látero-lateral, de posterior para anterior, é muito provável que a proliferação também tenha ocorrido em toda margem do defeito circular.

Aos 30 dias, há uma inversão do quadro histopatológico: a resposta inflamatória até então moderada, cede lugar para um intenso infiltrado inflamatório

envolvendo a membrana, com ausência total da membrana, reduzindo a intensidade no grupo de 60 dias, que apresenta apenas remanescentes de reação de corpo estranho em torno do OD, sem ocorrer preenchimento do defeito por osso neoformado.

A princípio, a intensa proliferação que ocorre nas margens do defeito pode ser atribuída à resposta proliferativa dos próprios cotos ósseos e também à indução da matriz óssea, como mostra a Figura 5.2, em que há osso neoformado junto à superfície do OD, mas não contíguo à margem do defeito. Esta grande atividade osteogênica está em acordo com outros trabalhos que relatam uma extensiva deposição de tecido osteóide (CLOKIE et al., 2002; GUGLIELMOTTI et al., 1990; HERCULIANI et al., 2000; HOLLINGER et al., 1991; ISAKSSON; ALBERIUS, 1992; KLEINSCHMIDT et al., 1993; SALYER et al., 1995; SYFTESTAD; URIST, 1979). Contudo, não foi observada a formação de cartilagem, encontrada em outros estudos (GLOWACKI; ALTOBELLI; MULLIKEN, 1981; HAGEN et al., 1992; KABAN; GLOWACKI, 1981; MULLIKEN; GLOWASCKI, 1980; SAITOH et al., 1994; SOLHEIM et al., 1992), o que pode ser atribuído ao processo de obtenção do OD (SCHWARTZ et al., 1996; SHIGEYAMA et al., 1995).

A mudança no decurso da reparação óssea total se deve à intensificação da resposta inflamatória gerada talvez pelo tamanho da matriz óssea remanescente. Uma vez consumidas as BMPs, o tecido osteóide deveria ter sido auto-suficiente para formar mais osso e preencher o defeito. No entanto, a presença da matriz pode ter funcionado como um obstáculo mecânico e imunogênico. Não há um consenso quanto ao tamanho ideal das partículas de OD, mas as dimensões variam entre 44-810 µm (CHESMEL et al., 1998; GLOWACKI; ALTOBELLI; MULLIKEN, 1981; GUGLIELMOTTI et al., 1990; SCHWARTZ et al., 1996; SYFTESTAD; URIST, 1979;

ZHANG; POWERS; WOLFINBARGER Jr, 1997).

A forma laminar aqui utilizada não deve ser no todo descartada, pois é fundamental nos grandes defeitos por questões práticas, podendo funcionar como material osteocondutor em um processo bastante lento de substituição por osso natural (CHESMEL et al., 1998; LANDI, 1998; MOSS et al., 1995; SALYER et al., 1995; SANADA et al., 2003).

Contudo, outros estudos também não encontraram capacidade osteoindutiva continuada do OD, mesmo na forma particulada (ASPENBERG; KÄLEBO; ALBREKTSSON, 1988; BECKER et al., 1995; PINHOLT et al., 1992). Entre as principais explicações, em especial ligadas ao doador, estão a espécie, por causa relação espécie-específica da atividade osteoindutora das BMPs, e a presença dos antígenos heterólogos.

A atividade das BMPs atinge o pico quando elas são implantadas em matriz óssea e hospedeiro homólogos, no qual o rato é o animal mais responsivo a esses fatores, independente de sua origem (SAMPATH; REDDI, 1983; ASPENBERG; THORNGREN; LOHMANDER, 1988; ASPENBERG; WANG; THORNGREN, 1992; De BIE et al., 1991; WANG; GLIMCHER, 1999). Em animais maiores, mesmo a implantação de OD autólogo, a resposta indutora é muito baixa (ASPENBERG; LOHMANDER; THORNGREN, 1988; ASPENBERG; THORNGREN; LOHMANDER, 1988). Isto conduz à questão imunogênica: se por um lado o processo de remoção das gorduras e, conseqüentemente, dos antígenos presentes na membrana lipídica celular, reduz a atividade osteoindutora, por outro, a adição de imunossupressor à matriz aumenta 40-50% de osso neoformado nas primeiras semanas (FU et al., 2003).

Neste estudo, partículas residuais de OD envolvidas em reação de corpo

estranho foram observadas em alguns espécimes, enquanto em outros foram totalmente reabsorvidas. Eventualmente, o processo inflamatório pode parar e as partículas permanecerem inclusas no tecido osteóide; apesar da remodelação, parte do osso neoformado não exibirá uma estrutura lamelar, característica do osso maduro, o que significa um processo de reparação óssea e não de regeneração, com perda de volume a longo-prazo (BECKER et al., 1995; BECKER; BECKER; CAFFESSE, 1994; BRUGNAMI et al., 1996; BUSER et al., 1998; GARCIA; ALBERGARIA-BARBOSA, 2002; HAGEN et al., 1992; HERCULIANI et al., 2000; HOSOKAWA et al., 1999; LANDI, 1998; SALYER et al., 1995; SMUKLER; LANDI; SETAYESH, 1999; ZUBILLAGA et al., 2003).

O OD possui níveis de BMPs correlacionados com o potencial osteogênico, sem haver diferença entre origem endocondral ou intramembranosa (BLUM et al., 2004; SALYER et al., 1995), e a adição de BMPs apresenta diferença significativa na quantidade de osso neoformado (ASPENBERG; WANG; THORNGREN, 1992; MARDEN et al., 1994). O acréscimo de outros materiais osteocondutivos, a exemplo da hidroxiapatita e do fosfato tricálcico, parece inibir a capacidade osteoindutiva dos fatores de crescimento, e portanto, tais associações não devem ser empregadas (MOGHADAM et al., 2004).

Por outro lado, existem divergências na associação de membranas e OD. Há relatos de que o volume de osso neoformado não é aumentado pela utilização de membranas não-reabsorvíveis (MARDAS et al., 2003c; MARDAS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002; SMUKLER; LANDI; SETAYESH, 1999), independente de possuírem poros ou não que permitam a migração de células mesenquimais, necessárias para a osteogênese, do tecido mole adjacente (KABAN; GLOWACKI, 1981; MARDAS et al., 2003a).

Por serem menos rígidas, as membranas reabsorvíveis não prescindem de meios para sua fixação, pois se moldam as superfícies onde são apostas, desde que sejam relativamente planas. Isto poderia sugerir a existência de micro-movimentações e resultar em maior formação de tecido conjuntivo do que aposição de osso sob a membrana. No entanto, há indícios de que estas micro-movimentações sejam benéficas para preservar osso em altura ou largura: o processo inflamatório inicial conduz à expansão de tecido sob a membrana e posteriormente, maior neoformação óssea (ZUBILLAGA et al., 2003).

Lim, Lee e Yeo (2000) observaram claramente que a partir da 5<sup>a</sup> semana de manutenção de uma membrana de Milipore, houve diminuição da osteogênese centrípeta, ao contrário do ocorrido com membranas que reabsorveram à medida que a formação óssea iniciou; por outro lado, isto poderia significar uma redução característica do processo, uma vez que a 5<sup>a</sup> semana corresponde ao pico de captação de cálcio (De BIE et al., 1991). Contudo, os poucos trabalhos que avaliam membranas reabsorvíveis, descrevem o emprego de compostos poliméricos que determinam reação inflamatória de natureza semelhante à encontrada neste estudo com as membranas de colágeno cálcicas (LIM; LEE; YEO, 2000; ROSSA et al., 1996; ROSSA; GOMES; NOGUEIRA, 1997; STAVROPOULOS et al., 2004), ou de cortical óssea, com longo-período de reabsorção (HERCULIANI et al., 2000). A incorporação de sais de cálcio e de outros metais na membrana de colágeno, produzida naturalmente e utilizada neste estudo, aumenta sua rigidez, evitando assim o colapso precoce de forma.

As membranas têm seu mérito ao evitar o encapsulamento do OD ou qualquer outro material que fosse implantado, além de promover maior lisura superficial (KLEINSCHMIDT et al., 1993), favorecendo uma futura reabilitação



protética.

Por fim, deve ser ressaltado que diferenças no processamento do osso devem ser consideradas na quantidade final de BMPs. É provável que neste estudo, a remoção das gorduras e de proteínas a elas associadas e o tamanho da partícula tenham contribuído negativamente para a eficácia do OD, hipóteses essas que deverão ser melhor investigadas posteriormente.

## 7 CONCLUSÕES

Pela grande proliferação óssea observada nas primeiras semanas, seguida por reação inflamatória até à reabsorção total do osso desmineralizado e da membrana de colágeno cálcica, pode-se concluir que existem proteínas ósseas morfogenéticas no osso desmineralizado, mas em quantidade insuficiente para conduzir à reparação total do defeito ósseo. Além disso, o osso desmineralizado na forma laminar parece ter dificultado a reabsorção da matriz óssea, provocando uma reação de corpo estranho. Por fim, a membrana de colágeno cálcica teve pouco efeito na proliferação óssea, gerando infiltrado inflamatório moderado ao seu redor.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Aspenberg P, Kalebo P, Albertsson T. Rapid bone healing delayed by bone matrix implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3(2):123-7.

Aspenberg P, Lohmander LS, Thorngren KG. Failure of bone induction by bone matrix in adult monkeys. *J Bone Joint Surg Br* 1988;70(4):625-7.

Aspenberg P, Thorngren KG, Lohmander LS. Rabbit bone matrix induces bone formation in the athymic rat. *Acta Orthop Scand* 1988;59(3):276-8.

Aspenberg P, Wang E, Thorngren KG. Bone morphogenetic protein induces bone in the squirrel monkey, but bone matrix does not. *Acta Orthop Scand* 1992;63(6):619-22.

Becker W, Becker BE, Caffesse R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol* 1994;65(12):1128-33.

Becker W, Urist MR, Tucker LM, Becker BE, Ochsenein C. Human demineralized freeze-dried bone: inadequate induced bone formation in athymic mice: a preliminary report. *J Periodontol* 1995;66(9):822-8.

Blum B, Moseley J, Miller L, Richelsoph K, Haggard W. Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics* 2004;27(1 Suppl):s161-5.

Brugnami F, Then PR, Moroi H, Leone CW. Histologic evaluation of human extraction sockets treated with demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA) and cell occlusive membrane. *J Periodontol* 1996;67(8):821-5.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane – protected bone defects: a comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(3):137-50.

Chesmel KD, Branger J, Wertheim H, Scarborough N. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;56(7):857-63.

Clokic CM, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GK. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2002;13(1):111-21.

De Bie AC, Thierens H, Dermaut LR, De Ridder L. The healing of cranial defects by demineralized osseous implants: a radiographic, histological and radioisotope-uptake study in rats. *J Biol Buccale* 1991;19(3):211-20.

Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994;23(6 Pt 2):395-8.

Fu E, Tseng YC, Shen EC, Hsieh YD, Chiang CY. Effects of low-dose cyclosporin on osteogenesis of human demineralized bone grafts in a surgically created mandibular defect in rats. *J Periodontol* 2003;74(8):1136-42.

Garcia RR, Albergaria-Barbosa JR. Capacidade de regeneração de um enxerto ósseo humano desmineralizado e liofilizado (Dembone) em calvária de coelhos: análise histológica. *Rev ABO Nac* 2002;10(1):18-22.

Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB. Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif Tissue Int* 1981;33(1):71-6.

Guglielmotti MB, Alonso C, Itoiz ME, Cabrini RL. Increased osteogenesis in alveolar wound healing elicited by demineralized bone powder. *J Oral Maxillofac Surg* 1990;48(5):487-90.

Hagen JW, Semmelink JM, Klein CP, Prah-Andersen B, Burger EH. Bone induction by demineralized bone particles: long-term observations of the implant-connective tissue interface. *J Biomed Mater Res* 1992;26(7):897-913.

Herculiani PP, Cestari TM, Taga EM, Taga R. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. *Rev Bras Implant* 2000;6(2):7-14.

Hollinger JO, Mark DE, Goco P, Quigley N, Desverreaux RW, Bach DE. A comparison of four particulate bone derivatives. *Clin Orthop* 1991;(267):255-63.

Hosokawa R, Kubo T, Wadamoto M, Sato Y, Kimoto T. Direct bone induction in the subperiosteal space of rat calvaria with demineralized bone allografts. *J Oral Implantol* 1999;25(1):30-4.

Isaksson S, Alberius P. Comparison of regenerative capacity elicited by demineralized bone matrix of different embryonic origins. *J Craniomaxillofac Surg* 1992;20(2):73-80.

Kaban LB, Glowacki J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. *J Dent Res* 1981;60(7):1356-64.

Kleinschmidt JC, Marden LJ, Kent D, Quigley N, Hollinger JO. A multiphase system bone implant for regenerating the calvaria. *Plast Reconstr Surg* 1993;91(4):581-8.

Landi L. Ridge augmentation using demineralized freeze-dried bone allograft with barrier membrane and cortical columns. *Compend Contin Educ Dent* 1998 Dec;19(12):1221-32.

Lim SC, Lee MJ, Yeo HH. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathol Int* 2000;50(8):594-602.

Lindholm TC, Gao TJ, Lindholm TS. Granular hydroxyapatite and allogeneic demineralized bone matrix in rabbit skull defect augmentation. *Ann Chir Gynaecol* 1993;207 Suppl:91-8.

Lorente CA, Song BZ, Donoff RB. Healing of bony defects in the irradiated and unirradiated rat mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50(12):1305-9.

Mardas N, Kostopoulos L, Karring T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *J Craniofac Surg* 2002;13(3):453-62.

Mardas N, Kostopoulos L, Stavropoulos A, Karring T. Evaluation of a cell-permeable barrier for guided tissue regeneration combined with demineralized bone matrix. *Clin Oral Implants Res* 2003a;14(6):812-8.

Mardas N, Kostopoulos L, Stavropoulos A, Karring T. Denaturation of demineralized bone matrix significantly reduces bone formation by guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 2003b;14(6):804-11.

Mardas N, Kostopoulos L, Stavropoulos A, Karring T. Osteogenesis by guided tissue regeneration and demineralized bone matrix. *J Clin Periodontol* 2003c;30(3):176-83.

Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res* 1994;28(10):1127-38.

Moghadam HG, Sandor GK, Holmes HH, Clokie CM. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(2):202-13.

Moss SD, Joganic E, Manwaring KH, Beals SP. Transplanted demineralized bone graft in cranial reconstructive surgery. *Pediatr Neurosurg* 1995;23(4):199-204.

Mulliken JB, Glowacki J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast Reconstr Surg* 1980;65(5):553-60.

Pinholt EM, Haanaes HR, Roervik M, Donath K, Bang G. Alveolar ridge augmentation by osteoinductive materials in goats. *Scand J Dent Res* 1992;100(6):361-5.

Redondo LM, Garcia Cantera JM, Verrier Hernandez A, Vaquero Puerta C. Effect of particulate porous hydroxyapatite on osteoinduction of demineralized bone autografts in experimental reconstruction of the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1995;24(6):445-8.

Rossa R, Gomes MF, Nogueira TO. Membrana biológica cálcica produzida pelo *Saccharomyces cerevisiae*. In: Anais da 14ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 1997 ago. 31-set. 3; Águas de São Pedro. São Paulo: SBPqO; 1997. p. 154, Res. 298.

Rossa R, Elmadjian G, Maia FAS, Gomes MF. Estudo comparativo de membranas biológicas no tecido subcutâneo de ratos. In: Anais da 13ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 1996 set. 1-4; Águas de São Pedro. São Paulo: SBPqO; 1996. p. 98, Res. 125.

Saitoh H, Takata T, Nikai H, Shintani H, Hyon SH, Ikada Y. Effect of polylactic acid on osteoinduction of demineralized bone: preliminary study of the usefulness of polylactic acid as a carrier of bone morphogenetic protein. *J Oral Rehabil* 1994;21(4):431-8.

Salyer KE, Bardach J, Squier CA, Gendler E, Kelly KM. Cranioplasty in the growing canine skull using demineralized perforated bone. *Plast Reconstr Surg* 1995;96(4):770-9.

Sampath TK, Reddi AH. Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80(21):6591-5.

Sampath TK, Reddi AH. Distribution of bone inductive proteins in mineralized and demineralized extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;119(3):949-54.

Sanada JT, Rodrigues JGR, Canova GC, Cestari TM, Taga EM, Taga R et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. *J Appl Oral Sci* 2003;11(3):209-15.

Santiago JL. Avaliações histológicas comparativas da reparação tecidual de feridas cirúrgicas praticadas na mandíbula de rata (*Rattus norvegicus albinus*) com e sem a presença de transplante de cartilagem xenóloga conservada em glicerina por noventa e seis meses [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL Jr, de la Fontaine J, Cochran DL, Dean DD et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol* 1996;67(9):918-26.

Senn N: On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci* 1889;98(3):219-43.

Shigeyama Y, D'Errico JA, Stone R, Somerman MJ. Commercially-prepared allograft material has biological activity in vitro. *J Periodontol* 1995;66(6):478-87.

Syftestad G, Urist MR. Degradation of bone matrix morphogenetic activity by pulverization. *Clin Orthop Relat Res* 1979;(141):281-5.

Smukler H, Landi L, Setayesh R. Histomorphometric evaluation of extraction sockets and deficient alveolar ridges treated with allograft and barrier membrane: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14(3):407-16.

Solheim E, Pinholt EM, Bang G, Sudmann E. Regeneration of calvarial defects by a composite of bioerodible polyorthoester and demineralized bone in rats. *J Neurosurg* 1992;76(2):275-9.

Stavropoulos F, Dahlin C, Ruskin JD, Johansson C. A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(4):435-42.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150(698):893-9.

Urist MR, Mikulski AJ. Endogenous lipids in matrix-induced bone morphogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1995;(313):120-8.

von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Buser D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application: a histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(3):260-9.

Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: I. Differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. *Calcif Tissue Int* 1999;65(2):156-65.

Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002;27(16 Suppl 1):S2-8.

Zhang M, Powers RM Jr, Wolfinbarger Jr L. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Periodontol* 1997;68(11):1085-92.



Zubillaga G, Von Hagen S, Simon BI, Deasy MJ. Changes in alveolar bone height and width following post-extraction ridge augmentation using a fixed bioabsorbable membrane and demineralized freeze-dried bone osteoinductive graft. *J Periodontol* 2003;74(7):965-75.

## **ANEXOS**

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética


**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

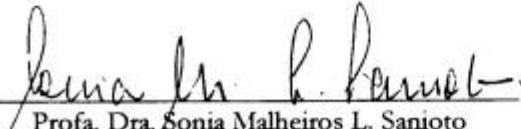
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (011) 3813-0900 – telefax : (55) (011) 3818-7438  
e-mail: [icbsedir@icb.usp.br](mailto:icbsedir@icb.usp.br)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 143/2002, sobre o projeto intitulado “**Avaliação do efeito da membrana de colágeno como barreira de proteção na reparação óssea induzida por proteína óssea morfogenética**”, sob a responsabilidade de **Josué Lourenço Santiago**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **21/05/2002**.

(We certify that the protocol nº 143/2002 about “*Evaluation of effect of the collagen membrane as a barrier protection in the bone repair induced by bone morphogenetic protein*” agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 21/05/2002 meeting.)

São Paulo, 23 de maio de 2002.

  
Prof. Dra. Sonia Malheiros L. Sanioto  
Coordenadora da CEEA

  
Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender  
Secretária da CEEA

Catálogo-na-Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Chin, Verónica Kei Len

Avaliação histológica da reparação óssea induzida por osso bovino desmineralizado, em defeitos bicorticais na mandíbula de ratos, com ou sem membranas de colágeno cálcicas / Verónica Kei Len Chin; orientador Josué Lourenço Santiago. -- São Paulo, 2004.

66p. : fig., tab., 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Maxilo-Faciais) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Regeneração óssea induzida      2. Membranas absorvíveis – Regeneração óssea

CDD 617.605  
BLACK D76

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 E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura:

E-mail: