

VALÉRIA ABRANTES PINHEIRO CARVALHO

**EFEITOS DA MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA
HOMÓGENA SOBRE A REPARAÇÃO ÓSSEA EM
MANDÍBULA DE COELHOS -
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba
da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Biologia e Patologia Buco Dental.

**PIRACICABA
2001**

i

UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

VALÉRIA ABRANTES PINHEIRO CARVALHO

**EFEITOS DA MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA
HOMÓGENA SOBRE A REPARAÇÃO ÓSSEA EM
MANDÍBULA DE COELHOS –
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Orientadora: Profa Dra Darcy de Oliveira Tosello

Co-Orientadora: Profa Dra Mônica Fernandes Gomes

Banca Examinadora:

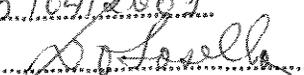
Profa Dra Darcy de Oliveira Tosello

Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a resolução CCPG 036/83.

CPG, 25.1041.2001

.....

.....
Assinatura do Orientador

**PIRACICABA
2001**

Ficha Catalográfica

C253e Carvalho, Valéria Abrantes Pinheiro.
Efeitos da matriz dentinária desmineralizada homogênea sobre a reparação óssea em mandíbula de coelhos – análise histomorfométrica. / Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
xxviii, 97p. : il.

Orientadores : Prof^a Dr^a Darcy de Oliveira Tosello,
Prof^a Dr^a Mônica Fernandes Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Dentina. 2. Ossos – Regeneração. I. Tosello, Darcy de Oliveira. II. Gomes, Mônica Fernandes. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 25 de Janeiro de 2001, considerou a candidata VALERIA ABRANTES PINHEIRO CARVALHO aprovada.

1. Profa. Dra. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO

2. Prof. Dr. MIGUEL ANGEL CASTILLO SALGADO

3. Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROppo

“O amor se descobre através da prática de amar e não das palavras.”

Richard Bach

Dedico este trabalho às minhas filhas Lívia e Júlia, razão maior de minha existência, tradução mais simples e sólida do amor puro e verdadeiro.

E ao meu marido Roberto, pela compreensão em meus momentos de ausência e colaboração constante na conquista de mais este objetivo em nossas vidas.

Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A DEUS,

Grandes foram as lutas, maiores as vitórias!

Sempre estiveste comigo!

Muitas vezes pensei que este momento nunca chegaria, queria recuar ou parar, no entanto, Tu estavas presente, na alegria e na tristeza, fazendo da derrota uma vitória, da fraqueza uma força...

Com a Tua ajuda, venci!

A emoção é forte, pois sei que não cheguei ao final, mas ao início de uma longa caminhada...

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, na pessoa do Exmo. Sr. Diretor Antônio Wilson Sallun, pela oportunidade e apoio técnico-científico na realização deste Curso de Pós-Graduação.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, - Campus de São José dos Campos, na pessoa da Exma. Sra. Diretora Maria Amélia Máximo de Araújo, por tornar viável meu aperfeiçoamento acadêmico, através do intercâmbio interinstitucional.

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, na pessoa do Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado, responsável pela disciplina de Histologia e Embriologia, por viabilizar meu licenciamento parcial das atividades como docente para frequentar o curso de Pós-Graduação.

“Quando alguém evolui, evolui tudo que está a sua volta.”

Richard Bach

À orientadora e amiga Professora Doutora Darcy de Oliveira Tosello, coordenadora do Curso de Pós-Graduação de Biologia e Patologia Buco-Dental (FOP-UNICAMP)

Pela confiança em mim depositada, que me permitiu o ingresso, nesta faculdade, como aluna de pós-graduação.

Pelo exemplo de valores morais cultivados em todas as circunstâncias, me incentivando a cultivar a sinceridade e lealdade em minhas atitudes.

Pela boa vontade, atenção, carinho e dedicação com que sempre me atendeu no decorrer deste trabalho, pela firmeza e segurança nos conhecimentos transmitidos e pela humildade que me ensinou a ter na busca do conhecimento científico.

Por me ouvir e encorajar sempre, me contaminando com seu eterno otimismo nos momentos difíceis...

Por me ensinar que a vida com alegria e amor pode ser bem mais bonita e melhor de se viver...

Por fazer parte de minha vida me brindando com sua amizade e experiência de vida de maneira tão alegre, construtiva e carinhosa.

Pelo exemplo de responsabilidade, trabalho e competência em suas atribuições na carreira acadêmica.

Por me ensinar o exato sentido da palavra compreensão!

Com toda admiração e respeito.

*“Aprender é descobrir aquilo que você já sabe.
Fazer é demonstrar que você o sabe.
Ensinar é lembrar aos outros que eles sabem tanto quanto você.
Somos todos aprendizes, fazedores, professores...”*

Richard Bach

Ao Professor Doutor Miguel Angel Castillo Salgado, responsável pela disciplina de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP.

Por exemplificar o sentido das palavras: segurança e trabalho; para alcançar meus objetivos profissionais.

Por me iniciar e incentivar, sempre, a prosseguir com afinho e dedicação na carreira acadêmica.

Pelo exemplo de dedicação e de convicção em suas idéias, e por seu amor pela carreira que abraçou.

Pela atenção com que sempre me acolheu nos momentos de incertezas...

Pela convivência diária que tanto me fez crescer...

E, sobretudo, pelos momentos difíceis, onde aprendemos a aparar as arestas, olhar para dentro de nós mesmos e construir, pouco a pouco, o verdadeiro respeito e amizade!

Meu sincero e leal reconhecimento.

“A fé é uma conquista difícil, que exige combates diários para ser mantida”

Paulo Coelho

À co-orientadora e amiga,

Professora Doutora Mônica Fernandes Gomes, da disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP.

Pelo exemplo de trabalho, coragem e determinação na busca do aperfeiçoamento profissional.

Pela ajuda incomensurável e presença constante na realização deste trabalho.

Pela colaboração profícua na idealização desta pesquisa.

Por me estimular constantemente a seguir sempre em frente, apesar dos obstáculos do caminho...

Pela fé e confiança em Deus que sempre demonstrou e me ensinou a cultivar...

Pela convivência intensa e alegre desde o início de minha carreira acadêmica, me fazendo reconhecer a importância da ajuda mútua.

Por, muitas vezes, me alertar sobre a necessidade de aceitar, humildemente, nossos equívocos, tomando-os como ferramentas das quais Deus se utiliza para mostrar o caminho!

Meu profundo e sincero agradecimento.

Aos meus amados pais Wanda Simões Martins Pinheiro e João Carlos Abrantes Pinheiro, responsáveis pela minha formação moral e profissional, pela confiança em mim depositada e pelo exemplo de fé, trabalho e determinação.

Minha eterna gratidão!

Ao meu querido irmão Marcelo Abrantes Pinheiro, querida cunhada Anabel Chieregatto Pinheiro e meu amado sobrinho João Pedro pelo carinho e alegria com que me acolheram em seu lar e pelo incentivo constante nesta jornada.

Com todo meu amor!

Ao meu querido cunhado Alexandre de Azevedo, Professor Doutor responsável pela disciplina de Embriologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, pela sua grandeza de caráter e inestimável estímulo ao início de minha carreira acadêmica.

Com todo meu carinho!

À amiga Suzana Tomazella Henrdl, pelas palavras de estímulo e apoio em minha jornada acadêmica.

Com carinho!

À amiga Denise Foster de la Fuente, pelo apoio constante e presença leal e amiga em todos aos momentos.

Com amizade!

Ao amigo Marco Mammoli, pelo apoio sincero, pela amizade, e pelas opiniões pertinentes e sensatas ao meu engrandecimento pessoal e profissional.

Minha estima e admiração!

Aos meus colegas da Pós-Graduação, em especial à Luciana Barros Sant'Anna, pela convivência amigável, pelos momentos partilhados e experiências vividas ao longo desta jornada.

À Professora Titular Laurelúcia de Ourives Lunardi, da disciplina de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pelo elevado espírito de dedicação a pesquisa, por todos os ensinamentos éticos e morais, pela amizade e, sobretudo, pela confiança em mim depositada.

Que Deus a abençoe!

Ao Professor Doutor Frab Norberto Bóscolo, da disciplina de Radiologia e Vice-Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, por disponibilizar os meios necessários à realização da análise radiográfica deste experimento.

Ao Professor Emérito Luis Carlos Junqueira, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela atenção e colaboração dispensadas, transmitindo conhecimentos científicos de inestimável valor e decisivos para a realização deste trabalho.

Com respeito e admiração.

Ao Professor Doutor José Merzel, da disciplina de Histologia da FOP - UNICAMP, pela valiosa colaboração científica na realização deste trabalho

À Professora Doutora Gláucia M. Bovi Ambrosano, da disciplina de Estatística da FOP - UNICAMP, pela gentil colaboração nas análises estatísticas desta pesquisa.

À Professora Doutora Rosilene Fernandes da Rocha, da disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pela amizade e incentivo constante no desenvolvimento deste trabalho.

Ao técnico de laboratório, Sr. Walter Cruz da disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pela eficiente colaboração nas fases laboratoriais deste trabalho.

Meu sincero reconhecimento!

Aos técnicos Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Lourival Jacob, do Biotério da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, pela preciosa colaboração no trato com os animais utilizados nesta pesquisa.

Aos meus alunos do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de S. José dos Campos - UNESP, por representarem um estímulo constante ao meu aperfeiçoamento profissional e um desafio a superar para o aprimoramento de minhas aptidões como educadora.

Aos animais experimentais, cujas vidas foram sacrificadas em benefício do progresso da ciência, agradeço o sacrifício maior, com a certeza de não ter sido em vão.

Que Deus os guarde!

“Um semeador saiu a semear a sua semente e, quando semeava, caiu alguma junto do caminho, e foi pisada, e as aves do céu a comeram;

E outra caiu sobre a pedra e, nascida, secou-se, pois que não tinha umidade;

E outra caiu entre espinhos e crescendo com elas os espinhos a sufocaram;

E outra caiu em terra boa, e, nascida produziu fruto, a cento por um. Dizendo ele estas coisas, clamava: Quem tem ouvidos para ouvir, ouça.”

Lc. 8:5-8

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	1
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
3. PROPOSIÇÃO	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Animais	35
4.2. Preparação da MDDH	36
4.3. Preparo do animal, confecção do defeito ósseo cirúrgico e implantação da MDDH.	37
4.4. Período Experimental	40
4.5. Análise Macroscópica	40
4.6. Análise Radiográfica	40
4.7. Análise Histomorfológica	41
4.8. Análise Histomorfométrica	43

5. RESULTADOS	45
5.1. Análise Macroscópica	46
5.2. Análise Radiográfica	50
5.3. Análise Histomorfológica	53
5.4. Análise Histomorfométrica	72
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO	97

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Desenho esquemático do defeito ósseo cirúrgico em mandíbula de coelho dos grupos controle e tratado** 35
- Figura 2 - Procedimento cirúrgico: (A) tricotomia e assepsia; (B) incisões da pele e musculatura e exposição da tábua óssea vestibular; (C) confecção do defeito ósseo e remoção da cortical; (D) defeito ósseo; (E) MDDH na periferia do defeito; (F) sutura dos músculos mastigatórios e do tecido subcutâneo.** 39
- Figura 3 - Campo microscópico utilizado na contagem histomorfométrica, destacando em contraste as fibras colágenas da matriz óssea neoformada. Aumento original de 100x. PICROSIRIUS (sirius red).** 42
- Figura 4 - Desenho esquemático do defeito ósseo confeccionado na mandíbula de coelho** 45
- Figura 5 - Fotos das hemimandíbulas de coelhos, mostrando a reparação óssea dos defeitos cirúrgicos (setas). (A) grupo controle – 30 dias; (B) grupo tratado – 30 dias; (C) grupo controle – 60 dias;**

(D) grupo tratado 60 dias; (E) grupo controle – 90 dias; (F) grupo tratado – 90 dias.

49

Figura 6 - Radiografias das hemimandíbulas de coelhos, mostrando a reparação óssea dos defeitos cirúrgicos (setas): (A) grupo controle - 30 dias; (B) grupo tratado - 30 dias; (C) grupo controle – 60 dias; (D) grupo tratado – 60 dias; (E) grupo controle - 90 dias; (F) grupo tratado – 90 dias.

52

Figura 7 - Período de 30 dias - (A) Grupo Controle; (B) Grupo Tratado. Aumento original de 25x. HE.

55

Figura 8 - Período de 30 dias - (A) Grupo Controle; (B) Grupo Tratado. Aumento original de 100x. HE.

56

Figura 9 - 30 dias - (A) Grupo Controle; (B) Grupo Tratado. Aumento original de 200x. HE.

57

Figura 10 - Período de 30 dias. (A) Grupo Tratado com aumento original de 100x HE; (B) Grupo Tratado com aumento original de 200x. HE.

58

Figura 11 – Período de 30 dias. (A) Grupo Tratado com aumento original de 100x HE; (B) Grupo Tratado com aumento original de 200x. HE.

59

Figura 12 –	Período de 30 dias. (A) Grupo tratado com aumento original de 100x. HE; (B) Grupo tratado com aumento original de 200x. HE.	60
Figura 13 -	Período de 30 dias. Grupo Tratado Aumento original de 200x. HE.	61
Figura 14 -	Período de 60 dias (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado. Aumento original de 25x. HE.	64
Figura 15 -	-Período de 60 dias (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado. Aumento original de 100x. HE.	65
Figura 16 -	Período de 60 dias (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado. Aumento original de 200x. HE.	66
Figura 17 -	Período de 90 dias (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado. Aumento original de 25x. HE.	69
Figura 18 -	Período de 90 dias (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado. Aumento original de 100x. HE.	70
Figura 19-	Período de 90 dias (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado Aumento original de 200x. HE.	71
Figura 20 -	Densidade de volume de matriz óssea neoformada nos grupos controle e tratado nos períodos considerados.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de Variância considerando os fatores: Tratamento e Tempo.	73
Tabela 2 - Média e desvio padrão das densidades de volume dos fatores: Tratamento e Período de Observação e aplicação do Teste de Tukey* (5%)	74

ANEXO

Tabela 3 - Densidade de Volume de Matriz Óssea Neoformada em todos os campos histológicos medidos aleatoriamente	97
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

aFGF	Fator de crescimento fibroblástico ácido.
ANOVA	Análise de Variância.
BMP	Proteína morfogenética óssea.
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico.
CDPM	Proteína morfogenética derivada da cartilagem.
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto.
GDF	Fator de crescimento e diferenciação.
IGF	Fator de crescimento insulínico.
kDa	Kilo Dalton.
MDDA	Matriz Dentinária Desmineralizada Autóloga.
MDDH	Matriz Dentinária Desmineralizada Homóloga.
NCP	Proteína não colágena.
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta.
ROG	Regeneração óssea guiada.
TGF-β	Fator de crescimento beta-transformador.
Vvi	Densidade de volume.

RESUMO

Muitas pesquisas têm sido realizadas para acelerar a resposta de reparação óssea utilizando-se como material osteoindutor a matriz dentinária desmineralizada autógena (MDDA), devido à sua maior compatibilidade imunológica. A matriz dentinária tem demonstrado grande potencial osteogênico, caracterizando uma heteroindução tecidual. Embora a MDDA tenha sido amplamente testada em enxertos ósseos, poucos trabalhos sobre a aplicação da matriz dentinária desmineralizada homogênea (MDDH) em enxertos ósseos foram descritos, até o momento, na literatura. O objetivo deste estudo foi de analisar os efeitos da MDDH na reparação óssea. Foram utilizados, neste trabalho, 18 coelhos adultos jovens divididos em dois grupos de 9 animais cada. Nos animais dos grupos controle e tratado foram realizados defeitos cirúrgicos de 5 mm de diâmetro na tábua óssea vestibular direita da mandíbula, entre o segundo e terceiro molar. No grupo experimental foram colocadas, na periferia do defeito ósseo, fatias de MDDH de 8 μ m de espessura preparadas segundo a técnica de CATANZARO-GUIMARÃES et al¹². (1986). Os animais foram sacrificados após os períodos de 30, 60 e 90 dias de observação para retirada das hemimandíbulas. Estas foram submetidas à análise macroscópica, radiográfica e, posteriormente, desmineralizadas em EDTA para obtenção dos cortes histológicos corados com HE e Picrosírius. Estes foram submetidos à análise histomorfológica e

histomorfométrica para a quantificação da matriz óssea neoformada. Após análise estatística (ANOVA e Teste de Tukey - $p < 0.05$) verificou-se que a média de formação de matriz óssea foi maior e estatisticamente significativa no grupo experimental. Concluiu-se que a MDDH atua como material osteoindutor e osteocondutor na reparação óssea, promovendo a neoformação de tecido ósseo de maneira mais rápida e em maior volume nos períodos observados.

A B S T R A C T

Several researches have been accomplished in order to accelerate the response of bone repair, using the autogenous demineralized dentine matrix (ADDM) as an osteoinductor material, considering its immunological compatibility. The demineralized dentine has demonstrated a great osteogenic potential, characterizing a tissue heteroinduction. Although ADDM was largely tested in bone grafts, there are not many evidences of researches which applies the homogenous demineralized dentine matrix (HDDM) in bone grafts. For these reasons, it was proposed a study of the HDDM effectiveness as an osteoinductor material. In this study 18 experimental animals (young adult rabbits) were divided into two groups with 9 animals each. In the control group it was made surgical defects of 5 mm diameter on the vestibular side of the mandibule, corresponding to the second and third molars. In the experimental group, HDDM slices, 8 μ m thick, were positioned peripherically in the bone defect. They were prepared according to CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹² (1986). These animals were sacrificed after 30, 60 and 90 days after the surgery. The hemimandibules were taken off and submitted to macroscopic and radiographic analyses. Subsequently, they were demineralized in EDTA and histological cuts were obtained and stained in HE and Picrosirius. The hystomorphologic and hystomorphometric analysis were done with the objective of measuring the volume of bone matrix neoformed. After statistical analysis (ANOVA

and Tukey Test- $p < 0.05$) it was verified that the average of bone matrix regeneration was higher and statistically significant in the experimental group. It was concluded that HDDM induces not only a faster bone repair, but also a higher volume of bone tissue in the observed periods.

1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado composto por partes mineral e orgânica, perfeitamente organizado para desempenhar, dentre outros, o papel de estrutura de sustentação do corpo. A fase mineral do esqueleto ósseo contribui com cerca de dois terços de seu peso, o terço restante é matriz orgânica, constituindo-se principalmente de colágeno do tipo I e quantidades pequenas de outras proteínas não colágenas.

Dois tipos principais de células são encontrados no tecido ósseo: o osteoblasto e o osteoclasto, principais agentes da modificação da matriz óssea. O osteoblasto produz a matriz que se mineraliza de uma maneira bem regulada. Esta matriz mineralizada pode ser removida pela ação do osteoclasto, quando ativado.

A formação do tecido ósseo tem sido considerada como a mais alta etapa na evolução dos tecidos de suporte. O tecido ósseo difere dos demais tecidos não só na sua estrutura físicoquímica como também na sua extraordinária capacidade de remodelação e de reparação durante todo o período pós-fetal. Os ossos estão constantemente sofrendo remodelação, um processo complexo que envolve reabsorção numa superfície em particular seguida por uma fase de neoformação óssea. Em adultos normais, há um equilíbrio entre a quantidade de matriz óssea reabsorvida pelos osteoclastos e a quantidade de matriz formada pelos osteoblastos, pois o processo de neoformação garante uma quantidade

equivalente de matriz óssea deixada após a fase anterior de reabsorção (FROST¹⁶, 1964). Esta habilidade inata do tecido ósseo de remodelação e regeneração ao longo da vida tem sido atribuída tanto à proliferação de células osteoprogenitoras quanto à indução da proliferação e diferenciação de células mesenquimais (CORMACK¹³, 1991). Qual destes dois mecanismos, na verdade, responde pelas atividades de regeneração e remodelação óssea induzida, permanece ainda um assunto controverso.

A finalização da reabsorção e o início da neoformação óssea em lacunas de reabsorção ocorrem através de um mecanismo de aposição (PARFITT⁴³, 1982). A natureza detalhada da ativação e do mecanismo de aposição de tecido ósseo é ainda desconhecida, embora alguns fatores de crescimento e proteinases, tais como o fator de crescimento beta-transformador (TGF- β), fator de crescimento insulínico I e II (IGF I e II), e ativadores do plasminogênio tenham sido propostos (MARTIN³², 1994; MUNDY³⁵, 1984).

A regeneração óssea guiada (ROG) é atualmente um dos campos de maior crescimento na Odontologia e Medicina. Muitas pesquisas têm sido realizadas para acelerar a resposta de reparação óssea em cirurgias utilizando-se como material osteoindutor a matriz óssea desmineralizada autógena (URIST⁵⁶, 1965; ALPER et al.¹, 1989; BESSHO et al.⁴, 1992), a matriz dentinária autógena desmineralizada (CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹², 1986; BESSHO et al.⁵, 1990; CATANZARO-GUIMARÃES¹¹, 1993; GONÇALVES¹⁹, 1997; GOMES¹⁸, 1998) e ainda alguns fatores de crescimento ósseo (BECKER et al.³, 1992). O

referido processo é baseado no aumento da proliferação osteoblástica e da síntese de matriz óssea. Segundo CATANZARO-GUIMARÃES¹¹ (1993) todo o processo é controlado por complexas interações moleculares, mensagens celulares de curta e longa extensão influenciando a proliferação, a diferenciação, a quimiotaxia, e subseqüentemente, a velocidade e duração do trabalho das células de linhagem osteoblástica e osteoclástica.

Alguns autores afirmam que a proliferação celular é iniciada por um fator estimulador local, a proteína morfogenética óssea (BMP), (URIST & STRATES⁵⁷, 1971) As proteínas estruturais, tal como os colágenos, também poderiam estar envolvidos, uma vez que o colágeno do tipo I e seus fragmentos causam o mesmo efeito (MUNDY et al.³⁶, 1982). Segundo BRUDER et al.⁶ (1994) a proliferação de tecido mole no defeito ósseo inibe o tecido potencialmente osteogênico "in situ" a formar tecido ósseo. Assim também, ALPER et al.¹ (1989) e RABIE et al.⁴⁶ (1996) afirmam que os enxertos ósseos podem agir como barreira física, prevenindo o crescimento do tecido não ósseo circunjacente para o interior do defeito e favorecendo, desta maneira, a reparação óssea por células específicas osteogênicas.

O uso de matriz dentinária desmineralizada por CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹² (1986), resultou em osteoindução observada no tecido muscular do abdômen, no tecido conjuntivo subcutâneo, em alvéolos dentários e em defeitos ósseos em animais experimentais. Esses autores destacam ainda que, nessas áreas, a matriz dentinária sempre induziu à neoformação óssea ao invés de formação de dentina, realizando, portanto, uma heteroindução tecidual.

Estes autores descrevem que nos defeitos ósseos, a matriz dentinária sofre reabsorção enquanto está havendo neoformação de tecido ósseo na região de implantação. O tecido ósseo neoformado cresce por extensão e proliferação do tecido osteogênico derivado do endóstio e da medula óssea, mas ele pode surgir também da diferenciação das células mesenquimais adjacentes.

Embora a matriz dentinária desmineralizada autógena tenha sido amplamente empregada experimentalmente em enxertos ósseos variados, poucos trabalhos sobre o uso de matriz dentinária desmineralizada homogênea em enxertos ósseos foram referenciados até o presente momento. BANG² (1972) comparou o grau de antigenicidade da matriz dentinária desmineralizada xenogênica com o da matriz dentinária desmineralizada homogênea. Neste estudo, notou-se o alto grau de antigenicidade do implante xenogênico, sem a presença de osteoindução, enquanto que a matriz dentinária homogênea provocava discreta reação imunológica, evidenciando ainda, certo potencial osteoindutor.

Diante dos estudos já referidos na literatura sobre a atividade osteoindutora da matriz dentinária desmineralizada autógena (MDDA) e da matriz dentinária desmineralizada homogênea (MDDH), a avaliação da atividade osteoindutora da matriz dentinária desmineralizada homogênea em defeitos ósseos cirúrgicos em mandíbulas de coelhos reveste-se da maior importância, tendo em vista que a origem embriológica e a atividade funcional das estruturas mencionadas são de grande interesse, mormente na área odontológica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A formação óssea resulta de uma complexa cascata de ocorrências que envolvem a proliferação de células mesenquimais primitivas, diferenciação em células precursoras osteoblásticas (osteoprogenitora, pré-osteoblasto), maturação dos osteoblastos, formação de matriz e, finalmente, mineralização (ERICKSEN et al.¹⁴, 1984).

A atração quimiotática inicial dos precursores dos osteoblastos é, provavelmente, mediada por fatores locais produzidos durante o processo de reabsorção. Tem sido demonstrado que o osso em reabsorção produz fatores quimiotáticos para células com características osteoblásticas *in vitro* (MUNDY et al.³⁶, 1982). Um mediador que pode ser responsável por este efeito é o TGF- β (fator beta transformador), uma vez que o TGF- β ativo é liberado pelas culturas ósseas em reabsorção (PFEILSCHIFTER et al.^{44,45}, 1990, 1990a).

A segunda ocorrência envolvida na fase de formação do fenômeno de aposição é a proliferação dos precursores dos osteoblastos. Provavelmente eles são mediados pelos fatores de crescimento liberados do osso durante o processo de reabsorção. Há vários fatores que representam os fatores autócrinos e parácrinos. Os fatores de crescimento são definidos como agentes que aumentam a replicação celular, como também podem induzir à diferenciação celular. Os fatores de crescimento mais conhecidos são os polipeptídeos. Estes são sintetizados por uma variedade de células. Em determinadas situações, os fatores

de crescimento podem agir como agentes sistêmicos, mas geralmente eles agem como agentes reguladores locais. Entre eles estão os membros da superfamília do TGF- β e vários outros fatores de crescimento que são seqüestrados da matriz óssea e estimulam a proliferação do osteoblasto, incluindo o IGF-I e II (fatores de crescimento insulínico I e II), fatores de crescimento do fibroblasto (FGF) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). O interessante é que estes fatores de crescimento podem desempenhar um papel mais sutil na formação óssea uma vez que eles recentemente mostraram que evitam a apoptose osteoblástica *in vitro* (HILL et al.²⁵, 1997).

A terceira ocorrência na fase de formação é a diferenciação do precursor do osteoblasto numa célula madura. Vários dos fatores de crescimento ósseo-derivados podem causar o surgimento de marcadores dos fenótipos dos osteoblastos diferenciados incluindo a expressão da atividade da fosfatase alcalina, colágeno do tipo I e osteocalcina. Os mais proeminentes destes fatores são o IGF-I e a proteína morfogenética óssea (BMP-2), este último membro da superfamília do TGF- β dos polipeptídeos. As lacunas de reabsorção óssea geralmente são completamente reparadas embora não se saiba como isto seja alcançado (MASSAGUE³³, 1985; ROBERTS et al.⁵⁰, 1985).

É provável que as complicadas interações entre estes fatores liberados localmente de forma ativa, como uma consequência do processo de reabsorção, sejam responsáveis pela formação cuidadosamente coordenada do osso novo que ocorre nestes locais (LEWIS et al.³⁰, 1993).

A remodelação óssea é regulada por hormônios sistêmicos e por fatores locais que afetam as células da linhagem dos osteoclastos e osteoblastos e exercem seus efeitos sobre a replicação de células não diferenciadas, o recrutamento de células e a função diferenciada das células (CABALIS¹⁰, 1983). A matriz óssea é uma rica fonte de fatores de crescimento, como o fator de crescimento insulínico I e II, fator de crescimento transformador β (TGF- β -I e TGF- β -II), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico ácido e básico (aFGF e bFGF) e proteína morfogenética óssea (BMP). Segundo BUSCH et al.⁷ (1996) a produção destes fatores de crescimento pode ser regulada por hormônios sistêmicos e estresse mecânico local. O produto final da remodelação é a manutenção de uma matriz óssea mineralizada e do componente orgânico maior desta matriz, o colágeno tipo I.

Os fatores locais são sintetizados por células esqueléticas e incluem fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas. Os fatores de crescimento são polipeptídeos que regulam a replicação e função diferenciada das células. Os fatores de crescimento possuem efeitos sobre as células da mesma classe (fatores autócrinos) ou sobre as células de outras classes dentro do tecido (fatores parácrinos). A presença de fatores locais não é particularidade do sistema esquelético, pois os tecidos não esqueléticos também sintetizam e respondem aos fatores autócrinos e parácrinos. Os fatores de crescimento também estão presentes na circulação e podem agir como reguladores sistêmicos do metabolismo esquelético, mas os fatores produzidos localmente possuem funções

mais diretas e importantes no crescimento celular. Os fatores de crescimento podem desempenhar um papel fundamental na aposição da formação óssea com a reabsorção óssea e, possivelmente, na patofisiologia das disfunções ósseas (HILL et al.²⁴, 1998)

Por meio de técnicas moleculares, identificou-se uma família de proteínas morfogenéticas estruturalmente relacionadas, contendo seqüências de aminoácidos homólogas às proteínas do fator de crescimento transformador beta (TGF- β). A BMP é um produto do metabolismo dos osteoblastos, odontoblastos e de várias células tumorais. Esta é armazenada na forma de concentrados no osso, dentina e em células neoplásticas do osteossarcoma e de certos tumores odontogênicos, tais como: fibroma cementificante, cementoblastoma benigno, dentinoma, fibroma odontogênico e odontoma (URIST & STRATES⁵⁷, 1971; RAVAL et al.⁴⁷, 1996; GAO et al.¹⁷, 1997).

A BMP tem função de regular a diferenciação do tecido cartilaginoso e ósseo *in vivo*. Esta proteína apresenta vários papéis durante o desenvolvimento embrionário e durante a organogênese, incluindo a esqueletogênese e o desenvolvimento crânio-facial e dos tecidos dentários. Durante a reabsorção óssea, os osteoclastos degradam a matriz óssea, propiciando a liberação da BMP. Após a sua liberação nos tecidos, esta induz à diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos. Possui ainda ação quimiotática e mitogênica, bem como aumentam a síntese de matriz óssea (URIST & STRATES⁵⁷, 1971; BESSHO et al.^{5,4}, 1990,1992)

A análise de identificação das BMPs permite sua divisão em várias subfamílias. O exame da seqüência de aminoácidos das proteínas morfogenéticas demonstrou que as proteínas BMP-2 e BMP-4 são constituintes do subgrupo mais relacionado na literatura. Estas proteínas apresentam 86% da seqüência de aminoácidos idênticas entre si e 33-35% idênticas à seqüência do TGF- β .

O segundo subgrupo, formado por BMP-5, BMP-6 (Vgr), BMP-7 (OP-1) e BMP-8 (OP-2), exhibe cerca de 73-83% de aminoácidos similares entre si, e são provavelmente homólogos do gene Vgr/60. A BMP-6 humana apresenta 91% da seqüência de aminoácidos do Vgr-1, um peptídeo derivado da hibridação cruzada de aminoácidos do embrião de camundongo com Vgr-1, uma proteína envolvida com o desenvolvimento, localizada no hemisfério vegetal, em ovos de *Xenopus laevis*. Por esta razão, considera-se o Vgr-1 como homólogo, nos roedores, da BMP-6 humana. A BMP-7 diferencia-se das demais BMPs por não apresentar atividade morfogenética e não pertencer à família do TGF- β , sendo hoje considerada como uma procolágeno C-proteinase (RIPAMONTI & REDDI⁴⁹, 1994; ROSEN & THIES⁵¹, 1995; GONÇALVES¹⁹, 1997). Em estudos recentes realizados por HELDER et al.²³ (1998), onde estudaram a expressão ou a localização tecidual e função das BMP-7 (OP-1) durante o desenvolvimento dentário dos roedores, os autores verificaram que, nos tecidos dentários desenvolvidos, havia padrões de distribuição e expressão similares aos das proteínas dos demais grupos de BMP. A BMP-7 não era um fator de crescimento essencial para o desenvolvimento do

dente, possivelmente por causa do excesso funcional em relação aos outros grupos de BMPs ou fatores de crescimento relativo.

O terceiro subgrupo é formado apenas pela BMP-3, ou osteogenina, com 45% de seqüências idênticas ao BMP-2. Uma subfamília de proteínas similares a BMP, importantes na formação óssea, clonadas mais recentemente, foram denominadas de fator de crescimento e diferenciação 5 (GDF-5) ou proteínas morfogenéticas derivadas de cartilagem 1 (CDPM-1), GDF-6 ou CDMP-2 e GDF-7 ou BMP-12. Estas são homólogas em 80-86% entre si, e 46-57% idênticas às BMP-2 e até à BMP-8 (RIPAMONTI & REDDI⁴⁹, 1994; ROSEN & THIES⁵¹, 1995; GONÇALVES¹⁹, 1997).

A osteoindução tem sido descrita como um fenômeno de transformação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras ou osteoprecursoras e, desta maneira, o tecido ósseo neoformado pode desenvolver-se via ossificação intramembranosa. As células osteoprecursoras (osteogênicas), denominadas células osteoprecursoras determinadas e células osteoprecursoras induzíveis, segundo FRIEDSTEIN¹⁵ (1976) podem também ser encontradas em vários tecidos conjuntivos. As células osteoprecursoras determinadas encontram-se em tecidos diretamente relacionados ao tecido ósseo, tais como medula óssea e camada profunda perióstio e endóstio. Estas células reagem à indução diretamente com proliferação e diferenciação em osteoblastos. As células osteoprecursoras induzíveis podem ser encontradas em tecidos distantes do tecido ósseo, sendo abundantes no tecido conjuntivo subcutâneo, no tecido muscular esquelético, baço e fígado. Entretanto, em contato com um indutor adequado, como a proteína

morfogenética óssea, estas células diferenciam-se em condroblastos e/ou osteoblastos resultando na produção ectópica de cartilagem e tecido ósseo imitando a ossificação endocondral (GONÇALVES¹⁹, 1997). Sua reação ao estímulo indutor da proteína morfogenética óssea (BMP) é mais complexa e imita a formação óssea endocondral (REDDI⁴⁸, 1981). Após a implantação subcutânea de matriz óssea desmineralizada em ratos, observa-se a diferenciação de células mesenquimais em 3 a 4 dias após a implantação. No período de 5 a 8 dias, desenvolve-se cartilagem que subsequente se mineraliza. Em seguida, por volta do décimo primeiro dia nota-se reabsorção da cartilagem, e neoformação óssea em substituição à cartilagem. A diferenciação intermediária da cartilagem, ou seja, a ossificação endocondral, é mandatória se a indução atua sobre células precursoras induzíveis (REDDI⁴⁸, 1981) nestes casos a resposta ocorre sempre pela neoformação óssea indireta ou heterotópica.

Recentemente, enxertos ósseos intramembranosos e endocondrais frescos foram usados em defeitos ósseos. Alguns estudos demonstraram que implantes de matriz óssea endocondral desmineralizada induzem a formação óssea via cartilagem, enquanto outros trabalhos mostraram que na ossificação intramembranosa o osso se forma sem que haja uma fase de cartilagem intermediária (ISAKSSON & ALBERIUS²⁷, 1992; RABIE et al.⁴⁶, 1996).

Os ossos com diferentes origens embrionárias quanto ao modelo de ossificação, podem apresentar características distintas em relação ao implante. Uma comparação da resposta biológica, com implante de fosfato octacálcio em defeitos cirúrgicos, em ossos de origem intramembranosa e endocondral foi

realizada por SASANO et al.⁵² (1995). Estes pesquisadores demonstraram haver indução da condrogênese e osteogênese com implante de fosfato octacálcio nos ossos longos (tíbia), mas somente osteogênese nos defeitos ósseos em ossos de origem intramembranosa (calvária).

A neoformação óssea devido à implantação de matriz óssea desmineralizada ou de proteína morfogenética óssea purificada, em defeitos ósseos cirúrgicos, tem sido bastante estudada. A atuação das proteínas morfogenéticas ósseas e de fatores de crescimento ósseo seria primeiramente local, atuando de forma coordenada e seqüencial. A proteína morfogenética óssea atua na proliferação e na diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas e o fator de crescimento ósseo estimulariam a produção da matriz óssea neste sistema estimulado, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (URIST & STRATES⁵⁷, 1971; BESSHO et al.⁴, 1992).

Quando substâncias osteoindutoras atuam sobre as células osteoprecursoras determinadas, a reação se dá pela neoformação óssea direta, ou ossificação intramembranosa, também conhecida por reação óssea ortotópica. Neste caso, a osteogênese é mais rápida, sendo o osso neoformado depositado diretamente sobre as superfícies ósseas preexistentes. Estudos demonstraram que a reparação óssea ocorre quando se utiliza a proteína morfogenética óssea purificada e/ou matriz óssea desmineralizada (CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹², 1986; BESSHO et al.⁴, 1992).

No contexto da regeneração óssea guiada, não está claro se as macromoléculas indutoras, que atuam nas células osteoprecursoras

predeterminadas, são as mesmas que atuam nas células osteoprecursoras induzíveis (BUSER et al.⁸, 1994). Sabe-se, contudo, que os eventos em cascata, que culminam com a formação óssea heterotópica envolvem: migração e proliferação de células mesenquimais precursoras induzíveis, condrogênese, mineralização de cartilagem, reabsorção, invasão por tecido conjuntivo vascular de cartilagem e neoformação óssea estimulada por membros da superfamília do fator de crescimento transformador beta (HÄMMERLE et al.^{21, 22}, 1992, 1995; BUSER et al.⁸, 1994; GONÇALVES¹⁹, 1997).

Investigações anteriores demonstraram que proteínas associadas à matriz óssea possuem propriedades quimiotáticas, mitogênicas e osteogênicas (URIST & STRATES⁵⁷, 1971; BESSHO^{5, 4}, 1990, 1992), o mesmo ocorrendo com a matriz dentinária (BESSHO⁵, 1990; CATANZARO-GUIMARÃES¹¹, 1993).

O potencial quimiotático e osteogênico da matriz óssea e dentinária está associado à proteína morfogenética óssea (BESSHO et al.⁵, 1990). A matriz óssea, a rigor, é a maior fonte de fatores de crescimento dentre os tecidos mineralizados. Alguns destes fatores de crescimento são produzidos pelos osteoblastos, como o fator de crescimento insulínico, o fator de crescimento transformador, o fator de crescimento fibroblástico e o fator de crescimento derivado das plaquetas. Entretanto outros fatores são produzidos por células relacionadas ao tecido ósseo, como a interleucina-1 e o fator necrótico tumoral, sintetizado pelos macrófagos. Além da proteína morfogenética óssea, a matriz dentinária também é rica nestes outros fatores de crescimento (BESSHO et al.^{5,4}, 1990, 1992; BUSER et al.⁸, 1994, TZIAFAS et al.⁵⁵, 1995; GONÇALVES¹⁹,

1997). Diante deste fato, verificou-se que vários trabalhos na literatura relatam a importância da matriz dentinária desmineralizada como material de implante osteoindutor (CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹², 1986; ALPER et al.¹, 1989).

Desde a década de 1960, com os estudos de URIST⁵⁶ (1965), implantes de dentina desmineralizada vêm sendo pesquisados em animais experimentais. Recentemente a dentina desmineralizada vem sendo utilizada em cirurgias de reconstrução óssea, cirurgias ortopédicas, cirurgias bucais e defeitos ósseos (URIST & STRATES⁵⁷, 1971; VEIS et al.⁵⁸, 1989; GONÇALVES¹⁹, 1997).

Em 1988, STRATES et al.⁵³ testaram a habilidade de animais velhos formarem novo tecido ósseo. Para a realização deste estudo, introduziram implantes de matriz óssea desmineralizada, de osso medular e de colágeno no músculo da parede do abdômen de coelhos velhos (16 meses de idade) e jovens (1 mês de idade). Os autores observaram que a formação de tecido ósseo ectópico nos animais velhos, induzido pelos implantes de matriz óssea desmineralizada e de medula óssea, continha menos cálcio e um baixo nível de fosfatase alcalina quando comparado com o tecido ósseo ectópico obtido nos animais jovens. Os implantes de colágeno aplicado tanto nos coelhos jovens quanto nos velhos não induziram formação óssea. Diante destes resultados, os autores puderam concluir que a neoformação óssea é reduzida com a idade.

A busca de características ideais de um material de implante osteoindutor constitui objeto de contínuo desafio das pesquisas em ciências biomédicas. Biocompatibilidade e estocagem sem perda da viabilidade, a facilidade de obtenção de material, a relação custo/benefício, e, principalmente, o

potencial osteoindutor tem sido parâmetro para os variados estudos sobre os materiais biológicos osteoindutores (CATANZARO-GUIMARÃES¹¹, 1993). A osteoindução tem sido observada com a utilização de materiais como a medula óssea hematopoiética, osso fresco esponjoso, osso fresco compacto, matriz óssea e dentinária desmineralizada, hidroxiapatita e outros; tanto em pesquisas experimentais quanto nas cirurgias reconstrutivas por perda de tecido ósseo, tais como: deformidades craniofaciais, politraumatismos, cirurgias ortopédicas e oncológicas, neurocirurgias e cirurgias corretivas do periodonto (YEOMANS & URIST⁶², 1967; BANG², 1972; KNUDSEN et al.²⁹, 1974; NORDENRAN et al.⁴², 1975; GOULD et al.²⁰, 1981; STRATES et al.⁵³, 1988; ALPER et al.¹, 1989; VEIS et al.⁵⁸, 1989; NADE³⁷, 1994; NAKASHIMA³⁸, 1994, TZIAFAS et al.⁵⁵, 1995).

Os enxertos ósseos mais usados são os autólogos, devido a sua maior compatibilidade imunológica e por apresentar melhores resultados em relação à regeneração óssea. Além do tecido ósseo, algumas partículas de dentina e de cimento têm sido usados para induzir a osteogênese em cirurgias ósseas, particularmente em cirurgias periodontais (CATANZARO-GUIMARÃES¹¹, 1993). Os enxertos ósseos mais comumente utilizados têm sido o osso esponjoso e especialmente em processos de reparo ósseo com grande perda tecidual, como nas correções de defeitos maxilo-faciais, em cirurgias ósseas oncológicas, em cirurgias corretivas do periodonto e no tratamento de perdas ósseas alveolares (CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹², 1986; GONÇALVES¹⁹, 1997).

BESSHO et al.^{5,4}, (1990, 1992), sugere para a regeneração óssea guiada, combinação de enxertos ósseos com matriz óssea desmineralizada. Os

autores acreditam que a função do enxerto ósseo seja induzir a neovascularização no interior do defeito, enquanto que as células mesenquimais indiferenciadas, da região perivascular dos novos vasos sanguíneos, seriam induzidas a se diferenciarem em osteoblastos pelas proteínas morfogenéticas ósseas da matriz óssea desmineralizada.

Estudos têm demonstrado a formação de tecido ósseo e cartilaginoso após a implantação de dentina desmineralizada na região intramuscular de animais experimentais. Este fenômeno ocorre devido à presença de um substrato osteoindutor na dentina (BANG², 1972; BUTLER et al.⁹, 1977; GOULD et al.²⁰, 1981; KAWAI & URIST²⁸, 1989).

O reparo ósseo local, decorrente de lesões ósseas, fraturas, defeitos e/ou por inserção de implantes, é ativado pela liberação de fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas. Os fatores de crescimento abundantes na matriz óssea são produzidos por osteoblastos e são responsáveis pelo controle da formação óssea e pelo processo de reparação de modo geral. Em alguns estudos, os autores relataram ainda que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e proteína morfogenética óssea (BMP) foram isolados. Os autores observaram que na região do enxerto ósseo, havia ausência de sinal de rejeição e tiveram as maiores variações em condições de neoformação óssea. A maior quantidade de neoformação óssea foi notada apenas onde foram utilizados os fatores de crescimento.

O papel osteoindutor da dentina desmineralizada implantadas no tecido muscular, no tecido conjuntivo subcutâneo, na cavidade medular do fêmur, no

ligamento periodontal de ratos, quando comparados com o osso desmineralizado em cultura de células destes mesmos tecidos referidos *in vitro*, foi o trabalho proposto por INOUE et al.²⁶, (1989). Neste estudo, os autores observaram a ocorrência de osteoindução em todos os tecidos implantados e relataram haver indução da condrogênese *in vivo* por implante de dentina desmineralizada, ocorrendo mais rapidamente e em maior quantidade no tecido muscular, seguida do tecido conjuntivo subcutâneo, cavidade medular e por fim, num processo mais lento, no ligamento periodontal de ratos.

BUTLER et al.⁹ (1977) removeram os componentes solúveis presentes na matriz dentinária desmineralizada de rato sem prejudicar a atividade da BMP e caracterizou as proteínas não colágenas (NCP) que permaneceram na matriz insolúvel. Neste estudo, os autores verificaram que a matriz dentinária desmineralizada mostrava atividade da proteína morfogenética óssea, pois permitiu indução de cartilagem e osso quando implantadas na região intramuscular de ratos. Desde então, a atividade da BMP foi previamente atribuída às proteínas não colágenas do osso e da dentina e a natureza das NCP da dentina de ratos foram examinadas. Após o tratamento da matriz dentinária desmineralizada com colagenase bacteriana purificada, três NCP foram solubilizadas concomitantemente, com a digestão do colágeno da dentina para peptídeos menores. Das três proteínas separadas, duas das NCP eram ricas em aspartato, glutamato, glicina, serina e alanina e, desta forma, exibiam composições similares às das proteínas ácidas de outros tecidos conjuntivos. A terceira NCP mostrava composição de aminoácidos como aspartato e

fosfoproteínas ricas em serina, as quais encontravam-se principalmente na forma solúvel da dentina de rato. Os autores notaram que a atividade da BMP da dentina desmineralizada de rato, similar àquela encontrada no tecido ósseo, estava presente no tecido após remoção dos principais componentes solúveis.

Em estudos recentes, TZIAFAS et al.⁵⁵ (1995) demonstraram que componentes bioativos presentes na matriz dentinária desmineralizada tinham a capacidade de induzir à diferenciação das células ectomesenquimais em células semelhantes a odontoblastos na polpa dentária de molares de cães, promovendo a sua polarização ou a secreção de uma zona intermediária de matriz.

KAWAI & URIST²⁸ (1989) implantaram frações de proteínas não colágenas de dente descalcificado no músculo de camundongo. Estas frações protéicas foram extraídas de dentes bovinos em três diferentes estágios de evolução, germe dentário, dente não erupcionado e dente erupcionado. A atividade osteoindutora de cada fração protéica, dos respectivos elementos dentários, foi mensurada através da análise de imagem computadorizada, após a sua implantação. De 71% a 83% dos 41 implantes de fração protéica não colágena de dente descalcificado, induziram formação óssea. A quantidade de formação óssea foi maior quando se implantou fração de proteína não colágena, de dentes não erupcionados, quando comparada com a fração de proteína não colágena de dentes erupcionados. O tecido mole dentário, que não tinha atividade osteoindutora, era rico em uma proteína de 14 kDa. Proteínas de 15 a 28 kDa foram associadas com atividade de osteoindução. Diante dos resultados, os autores sugeriram que os dentes bovinos têm uma seleção de proteínas

osteointodoras comparáveis à proteína morfogenética óssea bovina.

Estudos preliminares sobre os efeitos de osteoindução da dentina desmineralizada homogéna, em tecido gengival humano, foi estudado por KNUDSEN et al.²⁹, em 1974. Nesta pesquisa, utilizou-se 15 espécimes de dentina homogéna, os quais foram implantados na gengiva de seis pacientes com doença periodontal, na faixa etária de 32 a 58 anos de idade. Em adição, um implante de dentina foi colocado no freio superior labial de oito pacientes. Estes permaneceram nas regiões referidas por 4 a 30 semanas e mostraram evidências de diferentes variações nos graus de reabsorção. Neste estudo, a dentina desmineralizada homogéna mostrou-se bem tolerada pelos tecidos. Em um dos casos, notava-se uma área semelhante a tecido duro neoforado, em íntimo contato com a matriz dentinária. Entretanto, não havia evidência de neoforinação óssea induzida pelo implante de dentina.

NORDENRAM et al.⁴² (1975) utilizaram matriz dentinária desmineralizada homogéna para reconstruir um defeito traumático no processo alveolar, na região dos incisivos superiores esquerdos. Os resultados obtidos foram satisfatórios, tanto ao nível estético quanto ao funcional.

GOULD et al.²⁰ (1981) sugerem a utilização de gelatina de matriz dentinária, como um material de enxerto universal em cirurgias periodontais. Os autores implantaram matriz dentinária desmineralizada homogéna em defeitos ósseos de tamanho crítico no osso parietal de ratos. Nesta pesquisa, foram empregados 20 ratos, divididos em dois grupos: tratado e controle. Após a confecção do defeito ósseo, no grupo tratado, implantou-se gel de matriz

dentinária desmineralizada homogênea no defeito ósseo do lado direito do osso parietal e, no grupo controle, realizou-se apenas a confecção do defeito ósseo no lado esquerdo do respectivo osso, e a cavidade foi preenchida por coágulo sanguíneo. Decorridos 2, 4, 8 e 10 semanas, os animais foram sacrificados e as peças cirúrgicas foram submetidas à análise microscópica. Com os resultados obtidos, puderam concluir que o processo de reparo ósseo foi completo em todos os grupos tratados, enquanto que, no grupo controle, o defeito foi reparado por cicatrização fibrosa. Os pesquisadores relatam que a gelatina de matriz dentinária homogênea parecia ter um forte potencial osteoindutor, podendo ser utilizada como um material de implante viável.

CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹² (1986) implantaram matriz dentinária autógena na forma de fatias e de partículas em defeitos experimentais na mandíbula de cães. Posteriormente, foram analisados em microscopia óptica, nos períodos de 15, 30 e 90 dias. No implante de matriz dentinária na forma de partículas, observou-se reabsorção e substituição das partículas por formação óssea e, no implante de matriz dentinária na forma de fatias, verificou-se a sua incorporação no osso neoformado. Segundo os autores, os implantes de matriz dentinária apresentavam algumas propriedades relevantes como: fácil manuseio, facilidade de obtenção, presença de potencial osteoindutor e biocompatibilidade.

Em 1993, CATANZARO-GUIMARÃES¹¹ afirma que a osteoindução seria controlada por complexas interações moleculares que atuariam sobre as células osteoprogenitoras derivadas das células mesenquimais, influenciando sua proliferação, migração, ancoragem e, subseqüentemente, a velocidade e duração

das células das linhagens osteoblásticas e clásticas. O implante de dentina desmineralizada, nas mais variadas formas ou apresentações (gel, partículas, fatias, etc.), produz trabéculas ósseas, cortical e medula óssea em quaisquer sítios de implantação. A BMP da dentina é lábil e as suas propriedades osteoindutoras estão firmemente associadas com a matriz colagênica.

Além da dentina desmineralizada induzir a formação óssea em áreas heterotópicas e ortotópicas, NAKASHIMA^{39,40,38} (1990, 1992, 1994) verificou a diferenciação de células ectomesenquimais da polpa dentária de cães, após a implantação de matriz dentinária desmineralizada ou da BMP parcialmente purificada. O autor sugere ainda que a matriz dentinária implantada, poderia promover uma superfície adequada para a fixação das células mesenquimais indiferenciadas, auxiliando na orientação celular, caracterizando a sua ação osteocondutora.

3. PROPOSIÇÃO

Pelo exposto, propôs-se a realização de um estudo para verificar os efeitos da matriz dentinária desmineralizada homogênea na reparação óssea de defeitos cirúrgicos em mandíbulas de coelhos por meio de análises macroscópica, radiográfica, histomorfológica e histomorfométrica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Para o presente trabalho, foram utilizados 18 coelhos brancos, adultos jovens (de 3 a 5 meses de vida) da raça *New Zealand*, com peso médio de 3,5 kg, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP. Estes foram divididos em dois grupos, sendo 9 animais para o grupo **controle** e 9 animais para o grupo **tratado**. Em ambos os grupos, foi confeccionado um defeito ósseo na região compreendida entre os segundos e terceiros molares inferiores direitos, sendo que no grupo tratado foram colocadas fatias de matriz dentinária desmineralizada homogênea (MDDH) contornando as paredes da loja cirúrgica.

Os referidos animais foram submetidos a um período de observação de um mês e mantidos em gaiolas individuais com dieta de ração balanceada e água *ad libitum*.

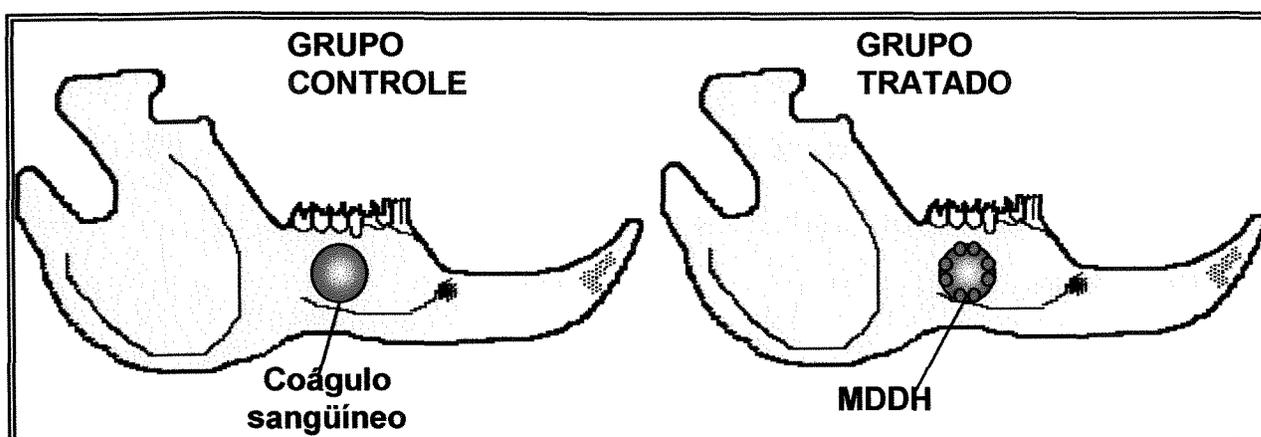


FIGURA 1 - Desenho esquemático do defeito ósseo cirúrgico em mandíbula de coelho dos grupos controle e tratado.

4.2. PREPARAÇÃO DA MDDH

A MDDH foi obtida dos incisivos centrais extraídos dos animais do grupo *controle*, alguns minutos antes do sacrifício dos mesmos. Para isto, os dentes foram despoldados por via retrógrada e os resíduos do ligamento periodontal removidos por raspagem da raiz. Após lavagem com soro fisiológico estéril (NaCl a 9%) a 2^oC, estes foram imersos em solução 0,6N de ácido clorídrico (Merck S.A. Indústrias Químicas) a 2^oC, até a sua completa desmineralização. Em seguida, os mesmos foram lavados em água destilada e corrente, sob constante agitação por aproximadamente 3 horas para remoção total do ácido. Esse material foi preparado na forma de fatias de aproximadamente 8µm de espessura, com o auxílio de um micrótomo de congelamento, modelo CTD – INTERNATIONAL-HARRIS CRYOSTAT – IEC. Estas fatias foram imersas em um recipiente fechado contendo álcool etílico 70% e gentamicina (Parker-Davis) numa concentração de 5ml/0,2sol e armazenadas a -15^oC por um período de 12 a 15 dias, até o momento de sua implantação, quando foram rigorosamente lavadas em soro fisiológico estéril abundante. A técnica de preparo da MDDH foi preconizada por CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹² (1986).

4.3. PREPARO DO ANIMAL, CONFECCÃO DO DEFEITO ÓSSEO CIRÚRGICO E IMPLANTAÇÃO DA MDDH .

Os animais receberam antibiótico Pentabiótico de uso veterinário para animais de pequeno porte (Fort Dodge) que consiste numa associação de benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, diidroestreptomicina e sulfato de estreptomicina, por via intramuscular 24 horas antes e 1 hora após o procedimento cirúrgico na dose de 0,1mg/kg, conforme indicado pelo fabricante.

A anestesia foi realizada por via intramuscular e as drogas utilizadas foram uma associação do pré-anestésico cloridrato de 2 - (2,6 - xilidino) - 5,6 - dihidro - 4H - 1,3 tiazina (Rompum - fr. 100ml/ Parker-Davis), com o anestésico geral cloridrato de cetamina (Ketamina - fr/amp. 10ml - Parke-Davis). As dosagens médias referenciais do pré-anestésico e anestésico geral foram 0,25mg/kg e 0,35mg/kg respectivamente. O pré-anestésico foi aplicado 15 minutos antes do anestésico. Após estes procedimentos, o animal experimental foi colocado em posição de decúbito lateral sobre uma mesa cirúrgica para a realização da tricotomia, assepsia com Polivinilpirrolidona-iodo / PVPI (Polvidine - Parke-Davis) e posicionamento do campo fenestrado. Em seguida, administrou-se a anestesia local cloridrato de prilocaína a 3% com felipressina 0,03 U.I., sol. injetável (Citanest – Merrell-Lepetit) para obtenção da vasoconstricção na região onde seria realizado o defeito ósseo.

Posteriormente, foi feita uma incisão na pele na região do corpo da mandíbula do lado direito do animal e sindesmotomia da musculatura mastigatória até expor a tábua óssea vestibular. Imediatamente após, confeccionou-se um defeito ósseo de forma circular, com 5mm de diâmetro, na região compreendida entre os segundos e terceiros molares, utilizando-se uma broca tipo Trefina, com irrigação constante de soro fisiológico estéril. A espessura do referido defeito correspondeu à da tábua óssea vestibular, atingindo superficialmente as raízes dentárias inferiores. Após a obtenção do defeito, no grupo tratado, foram colocadas fatias de MDDH nas paredes do defeito ósseo e, no grupo controle, o defeito ósseo foi apenas preenchido por coágulo sangüíneo. Em seguida, procedeu-se o posicionamento e sutura dos músculos mastigatórios e da pele, com fio de sutura absorvível Vycril (Johnson & Johnson 6-0) e fio de sutura montado (Johnson & Johnson com agulha seda 4-0) respectivamente (Fig. 2).



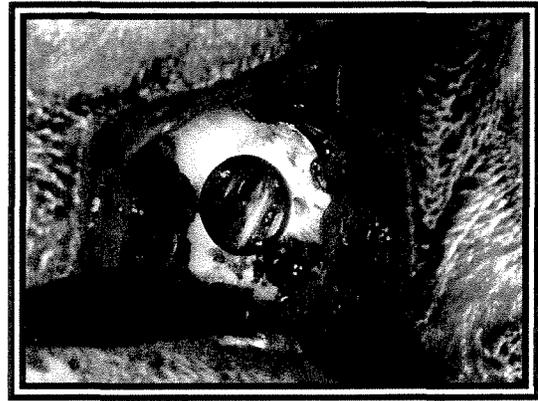
(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)

FIGURA 2 – Procedimento cirúrgico: (A) tricotomia e assepsia; (B) incisões da pele e musculatura e exposição da tábua óssea vestibular; (C) confecção do defeito ósseo e remoção da cortical; (D) defeito ósseo; (E) MDDH na periferia do defeito; (F) sutura dos músculos mastigatórios e do tecido subcutâneo.

4.4. PERÍODO EXPERIMENTAL

No final dos procedimentos cirúrgicos, bem como durante 3 dias consecutivos após a cirurgia, todos os animais receberam solução injetável de analgésico e antiinflamatório diclofenaco de sódio (Voltaren / Parker-Davis) por via intramuscular, na dosagem de 0,6mg/kg.

Decorridos 30, 60 e 90 dias, três animais de cada grupo foram sacrificados periodicamente por superdosagem de barbitúrico (Pentobarbital sódico – 60mg/kg).

4.5. ANÁLISE MACROSCÓPICA

As hemimandíbulas contendo o defeito ósseo foram removidas em bloco para a análise da região do defeito cirúrgico quanto aos aspectos macroscópicos de dimensão, consistência, coloração e forma. Estas observações foram registradas e fotografadas

4.6. ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Para obtenção das imagens radiográficas digitalizadas dos espécimes, utilizou-se o sensor tipo placa de imagem, sendo este exposto aos raios-X, com

2mAs e 70kVp. As hemimandíbulas foram colocadas individualmente sobre a placa de imagem, sendo esta posicionada horizontalmente. A distância foco-fragmento (dff) adotada foi de 40 cm e o tempo de exposição aos raios-X de 0,26 segundos. Imediatamente após a sensibilização da placa, esta foi digitalizada e as imagens obtidas foram interpretadas pelo programa DIGORA.

4.7. ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Para estudo histomorfológico, após a fixação das peças com formol a 10% por 72 horas, estas foram desmineralizadas em solução aquosa de EDTA 0,2M (Merck S.A. Industrias Químicas) segundo a técnica de WARSHAWSKY & MOORE⁶⁰ (1967), substituída a cada 48 horas e agitada três vezes ao dia, depois processadas e incluídas em parafina. Os cortes foram feitos com 6 μ m de espessura e as lâminas foram preparadas pelas técnicas histológicas rotineiras para coloração com hematoxilina-eosina e picrossírius (*sirius red*) (QEEL - Química Especializada Erich/Ltda) de acordo com MONTES & JUNQUEIRA³⁴ (1991). Em seguida, as lâminas foram analisadas pela microscopia de luz convencional para estudo histomorfológico e para análise histomorfométrica, pela microscopia de polarização (Fig. 3).

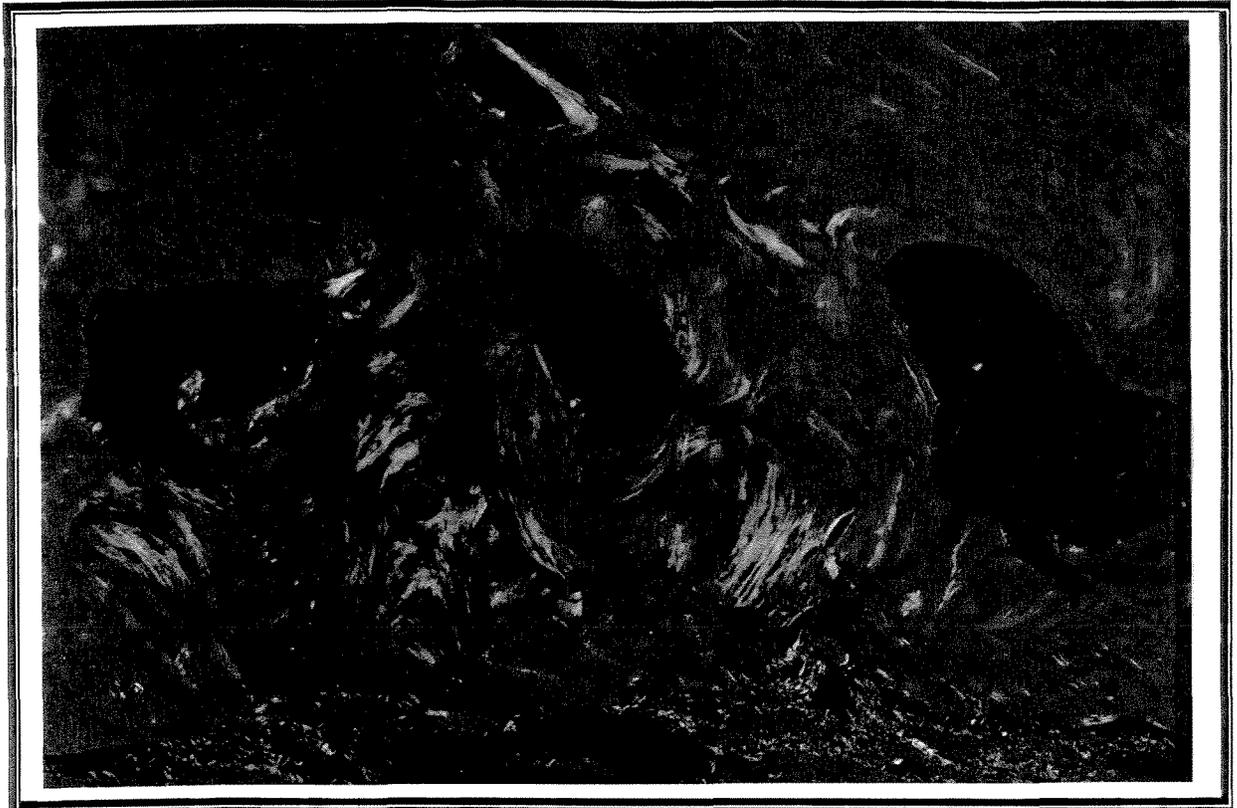


FIGURA 3 – Campo microscópico utilizado na contagem histomorfométrica, destacando em contraste as fibras colágenas da matriz óssea neoformada. Aumento original de 100x. PICROSIRIUS (*sirius red*).

4.8. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para a realização da histomorfometria, utilizou-se o método estereológico, que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos por meio da geometria e da estatística (MANDARIM-DE-LACERDA³¹, 1995). A finalidade da aplicação deste método é estudar uma determinada amostra de cortes aleatórios e isotrópicos.

Considerando que o princípio experimental da estereologia está na casualização das amostras, a escolha das mesmas deve ser realizada por um método que elimine a ocorrência de vícios na amostragem, consistindo na aplicação de procedimentos de casualização em todas as fases do experimento, tais como: seleção aleatória dos animais, dos blocos histológicos, das lâminas, dos cortes histológicos presentes em cada lâmina e, principalmente, dos campos microscópicos a serem utilizados nas quantificações (TAGA & STIPP⁵⁴, 1994).

Neste estudo, utilizou-se o programa KS400 (Kontron Elektronik Germany), responsável pela elaboração de um sistema teste específico. O sistema selecionado consistiu num retículo composto por 54 quadriláteros, apresentando área de $10 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ cada um, e por 70 pontos que representavam a intersecção das linhas que compõem os quadrados. Este retículo é sobreposto às imagens dos campos histológicos, sendo estas analisadas num aumento original de 100x. As imagens obtidas são captadas por uma câmera de vídeo e

transferidas para um monitor de alta resolução.

O número mínimo de cortes histológicos para esta análise é obtido através do Método de Frequência Acumulada (WEIBEL⁶¹, 1979), que se caracteriza pela determinação empírica do número mínimo de observações para construir uma amostra adequada às medições. Baseado neste método, obtiveram-se nove cortes histológicos, com três campos microscópicos em cada corte, por animal. Esta técnica foi aplicada em ambos os grupos de estudo, com o propósito de quantificar a matriz óssea neoformada dentro dos períodos considerados.

Segundo o sistema, a contagem morfométrica é obtida através da quantificação do número de pontos que incidiram sobre a matriz óssea neoformada. Seus valores são transformados em densidade de volume que representa a fração de volume ocupada por um objeto numa determinada estrutura, expressa em porcentagem ou como fração da unidade (MANDARIM-DE-LACERDA³¹, 1995), segundo a fórmula:

$$\text{Densidade de volume (Vvi)} = \frac{\text{Pmo (n}^\circ \text{ de pontos sobre matriz óssea neoformada)}}{70 \text{ (n}^\circ \text{ total de pontos do sistema teste)}}$$

Os valores desta contagem são tabelados para análise estatística. Os resultados assim obtidos foram, neste caso, submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey (VIEIRA⁵⁹, 1999), com o nível mínimo de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

Para facilitar a descrição dos resultados obtidos nas análises macroscópica e radiográfica das peças dos grupos experimentais, os defeitos cirúrgicos, foram divididos em porções central e periférica (Fig. 4).

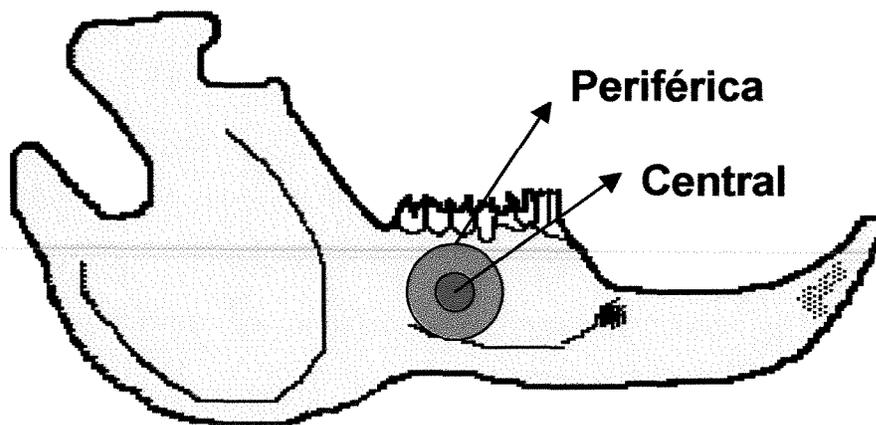


FIGURA 4 – Desenho esquemático do defeito ósseo confeccionado na mandíbula de coelho

5.1. ANÁLISE MACROSCÓPICA

Os espécimes foram estudados pela face vestibular após a dissecação e remoção da pele e tecidos subcutâneo e muscular. A região do defeito ósseo, localizado na hemimandíbula direita do animal, foi analisada quanto à sua coloração, quantidade de osso neoformado, consistência do tecido de preenchimento e grau de regularidade de sua superfície (Fig. 5).

5.1.1. PERÍODO DE 30 DIAS

A região onde foi confeccionado o defeito ósseo, nos animais do Grupo **controle** (Fig. 5A), apresentou-se distinguível devido à sua coloração acastanhada quando comparada com as áreas adjacentes. A cavidade foi preenchida por tecido mole e por osso. O tecido mole foi predominante sobre o osso neoformado. Ao toque, os limites e a porção central da região exibiram consistência dura e firme respectivamente, denotando a presença de uma fina camada óssea recobrindo a área do defeito, sendo esta quebradiça, sobretudo na região central. A superfície da porção periférica anterior apresentou rugosidades com pequenas áreas de depressões rasas dispostas de forma difusa e, nas porções central e periférica distal, notou-se uma superfície lisa e uniforme.

No grupo **tratado** (Fig. 5B), a região do defeito apresentou-se discretamente distinguível e sua coloração era compatível com a das áreas adjacentes. Todas as porções foram totalmente preenchidas com osso neoformado, caracterizando uma consistência dura ao toque. A superfície revelou discreta rugosidade nas porções periférica anterior e central, enquanto que na porção periférica distal sua superfície apresentou-se lisa. A área de reparação analisada revelou-se rica em canais vasculares. Em nenhuma das porções, verificaram-se áreas com depressão.

5.1.2. PERÍODO DE 60 DIAS

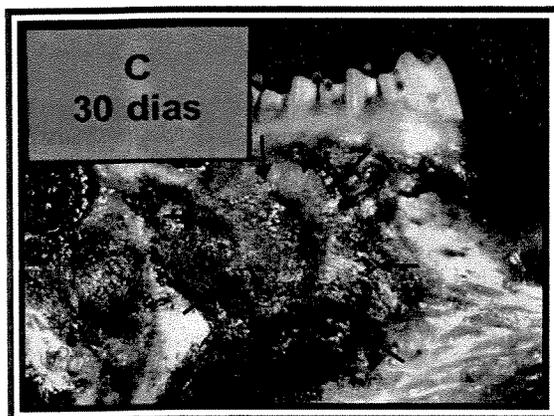
No grupo **controle** (Fig. 5C), a região do defeito ósseo cirúrgico foi distinguível, apresentando limites nítidos, sobretudo na periferia das porções anterior e central. Apresentou ainda, coloração levemente acastanhada em relação as áreas adjacentes. A região da cavidade, de consistência dura ao toque, evidenciou seu preenchimento por osso neoformado. Entretanto, evidenciaram-se áreas de consistência friável na porção periférica anterior. Em toda a extensão da área analisada verificou-se uma superfície rugosa com presença de traves ósseas de espessura variada e entrelaçadas.

No grupo *tratado* (Fig. 5D), a loja cirúrgica foi totalmente preenchida por osso neoformado. Nessa região, observou-se uma coloração compatível com o osso adjacente, sendo a consistência dura ao toque e a superfície irregular, apresentando canais vasculares de tamanhos variados.

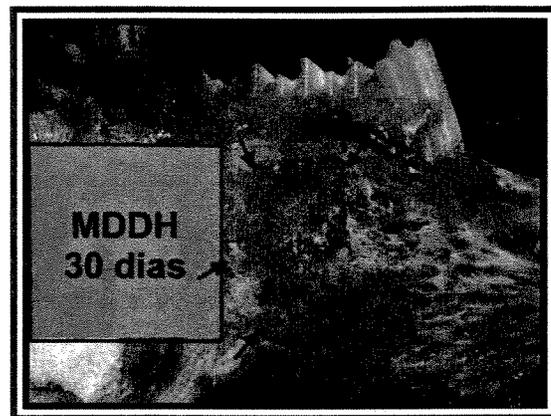
5.1.3. PERÍODO DE 90 DIAS

O grupo *controle* (Fig. 5E), na região analisada, apresentou limites poucos precisos em toda a sua periferia e coloração ligeiramente avermelhada em relação à superfície adjacente, sendo que houve preenchimento de toda a região da loja cirúrgica por tecido ósseo neoformado. A consistência ao toque revelou-se dura tanto na periferia quanto na porção central da região em questão. A rugosidade na superfície do defeito ósseo apresentou-se bastante acentuada, tanto na porção central quanto na periferia da mesma.

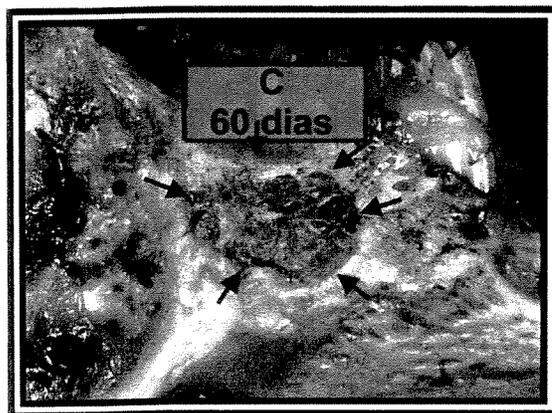
No grupo *tratado* (Fig. 5F), as peças apresentaram limites imprecisos da região correspondente à loja cirúrgica, com coloração compatível com a superfície adjacente, além de total preenchimento da mesma por tecido ósseo neoformado, bastante duro e resistente à pressão. Na maioria dos espécimes, a região apresentou-se convexa devido à formação de grande quantidade de tecido ósseo preenchendo o defeito cirúrgico. A superfície apresentou discreta rugosidade, restrita aos limites inferiores da região analisada.



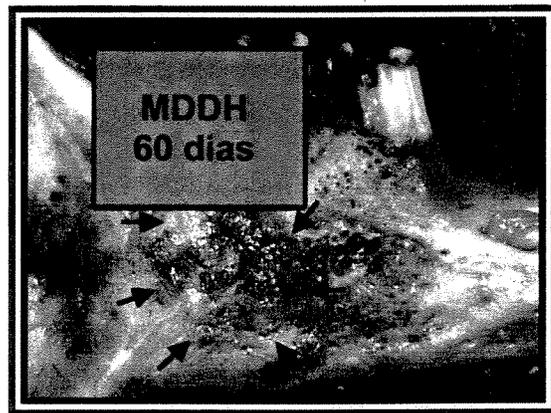
(A)



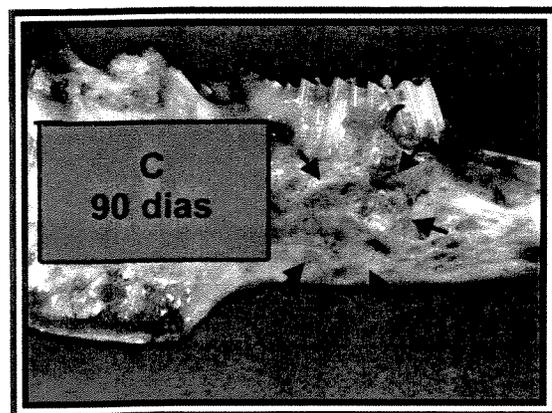
(B)



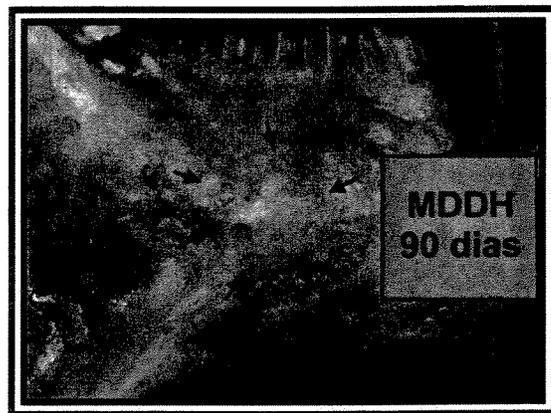
(C)



(D)



(E)



(F)

FIGURA 5 – Fotos das hemimandíbulas de coelhos, mostrando a reparação óssea dos defeitos cirúrgicos (setas). (A) grupo controle – 30 dias; (B) grupo tratado – 30 dias; (C) grupo controle – 60 dias; (D) grupo tratado 60 dias; (E) grupo controle – 90 dias; (F) grupo tratado – 90 dias.

5.2. ANÁLISE RADIOGRÁFICA

As imagens digitais obtidas das peças cirúrgicas foram analisadas e descritas de acordo com suas variações de densidade (Fig. 6).

5.2.1 PERÍODO DE 30 DIAS

No grupo *controle* (Fig. 6A), notou-se área radiolúcida de forma circular, limites regulares e localizada na região entre 2º e 3º molares inferiores. No grupo *tratado* (Fig. 6B), observou-se que a região, onde foi confeccionado o defeito, exibiu radiopacidade compatível com as áreas adjacentes.

5.2.2 PERÍODO DE 60 DIAS

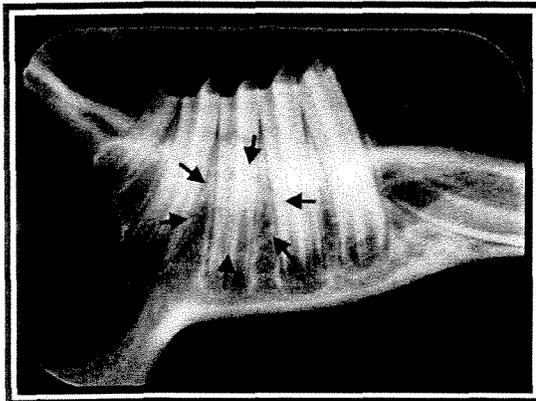
No grupo *controle* (Fig. 6C), verificou-se a presença de área discretamente radiolúcida, de forma circular, correspondente à região do defeito, entre os molares inferiores, apresentando limites indefinidos na porção periférica

superior e limites um pouco mais nítidos nas demais porções. No grupo *tratado* (Fig. 6D), observou-se que a região correspondente ao defeito, apresentou aspecto de normalidade, com grau de densidade radiográfica compatível com o do tecido ósseo adjacente.

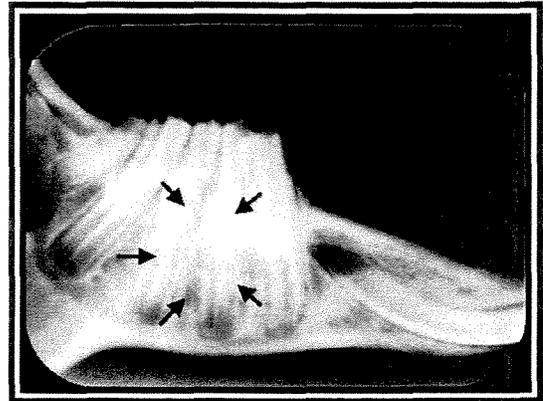
5.2.3 PERÍODO DE 90 DIAS

Em ambos os grupos experimentais, não foi possível delimitar a região do defeito ósseo. No grupo *controle* (Fig. 6E), notou-se que a radiotransparência foi semelhante à das áreas adjacentes, sendo compatível com trabeculado ósseo normal. Este aspecto foi, também, constatado no grupo *tratado* (Fig. 6F).

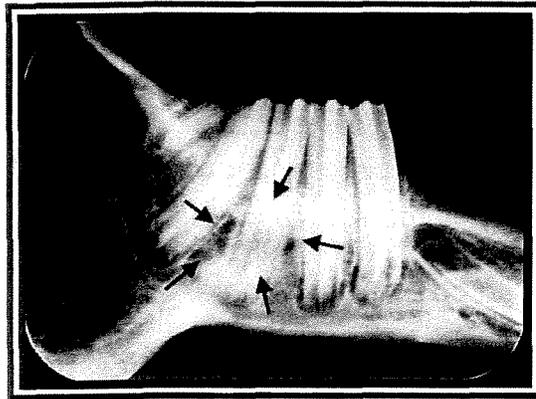
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



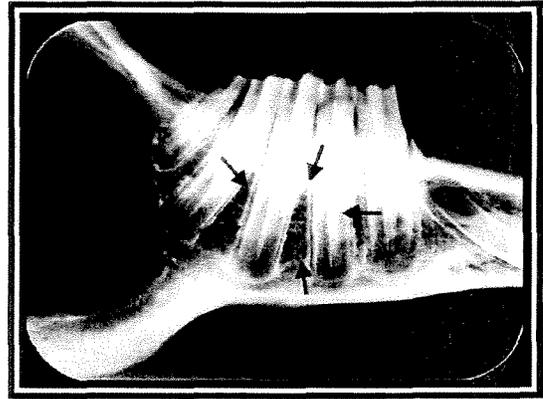
(A)



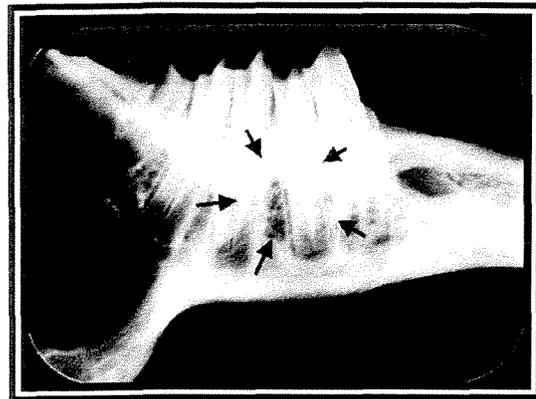
(B)



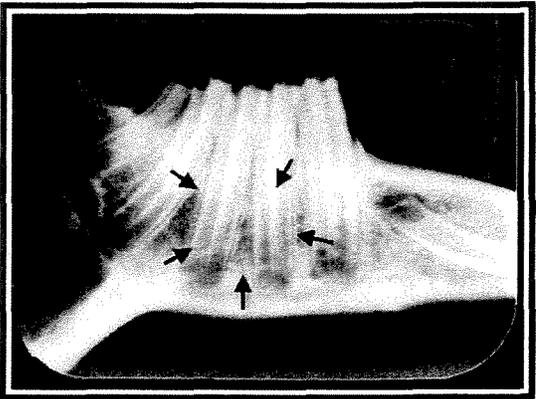
(C)



(D)



(E)



(F)

FIGURA 6 – Radiografias das hemimandíbulas de coelhos, mostrando a reparação óssea dos defeitos cirúrgicos (setas): (A) grupo controle - 30 dias; (B) grupo tratado - 30 dias; (C) grupo controle - 60 dias; (D) grupo tratado - 60 dias; (E) grupo controle - 90 dias; (F) grupo tratado - 90 dias.

5.3. ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Os resultados da análise histomorfológica se referem aos dois grupos, controle e tratado, analisados em conjunto dentro de cada período considerado no experimento.

5.3.1. PERÍODO DE 30 DIAS

No grupo *controle*, a loja cirúrgica apresentou-se preenchida por tecido conjuntivo osteogênico e por trabéculas ósseas. O tecido conjuntivo apresentou um discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares na base do defeito (Figs. 8A e 9A). Observou-se a formação de trabéculas ósseas, com maior intensidade, na periferia do defeito ósseo, estendendo-se para a região central do mesmo de maneira centrípeta (Fig. 7A). As trabéculas ósseas revelaram-se imaturas, com grande número de células, delicadas e irregulares (Fig. 8A). Na maioria dos cortes, observou-se a presença de uma lâmina contínua de tecido ósseo imaturo recobrando superficialmente o defeito ósseo em toda a sua extensão. Abaixo desta lâmina óssea, entretanto, a porção mais profunda e central do defeito apresentou grande quantidade de tecido conjuntivo osteogênico e esparsas trabéculas ósseas imaturas (Figs. 7A e 9A).

No grupo **tratado**, a região do defeito mostrou-se quase totalmente preenchida por tecido ósseo e, em determinadas áreas, por tecido conjuntivo osteogênico. As trabéculas ósseas apresentaram-se distribuídas por toda a extensão da região do defeito e em maior quantidade nas áreas limítrofes da loja óssea (Fig. 7B). A presença de fatias de MDDH foi constante em toda a extensão do defeito (Figs. 11A e 11B), sendo que estas foram observadas tanto incorporadas à matriz óssea neoformada (Figs. 10A e 10B) quanto fazendo parte do tecido conjuntivo osteogênico em algumas regiões (Figs. 12A, 12B e 13).

Quando observadas as regiões vizinhas às fatias de MDDH presentes no tecido conjuntivo osteogênico, notou-se a presença de moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares (Fig. 11A), além de grande quantidade de osteoblastos posicionados, preferencialmente, em torno das fatias de MDDH (Figs. 12A, 12B e 13).

Notou-se ainda, de forma bem característica, a disposição de matriz óssea neoformada sobre as fatias de MDDH (Figs. 11B, 12A e 12B), resultando na incorporação das mesmas ao tecido ósseo neoformado, como observado em áreas já preenchidas por trabéculas ósseas imaturas (Figs. 10A, 10B, 12A e 12B).

Foi evidente a presença de amplos canais de Havers (Fig. 8B) no tecido ósseo neoformado e a presença de osteoclastos (Figs. 9B e 10B). Nos limites do defeito, onde foram implantadas as fatias de MDDH, verificou-se maior quantidade de tecido ósseo neoformado, em relação à região central (Fig. 7B).

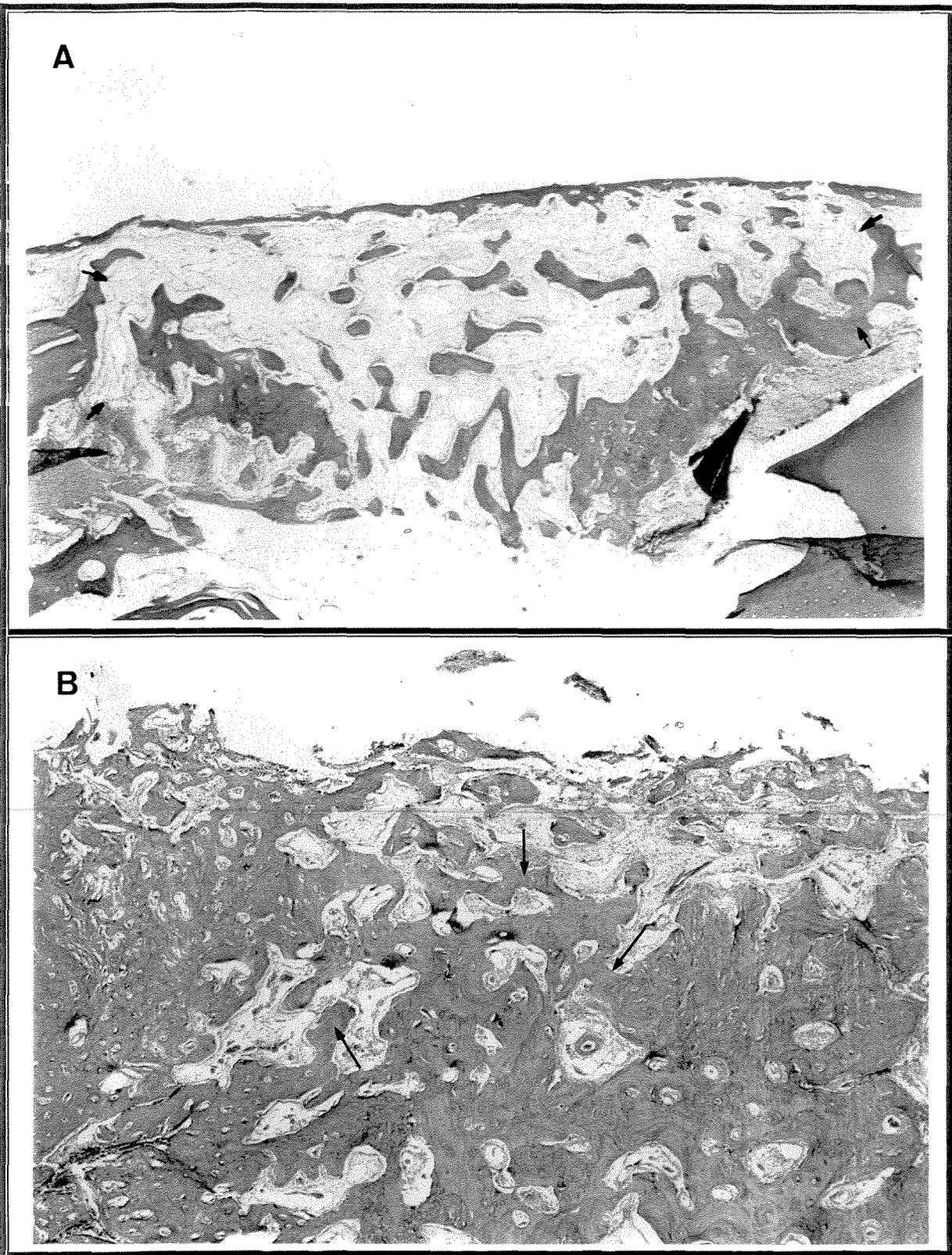


FIGURA 7 - (A) Grupo Controle - 30 dias. Trabeculado ósseo disperso na loja cirúrgica. Setas indicam os limites do defeito ósseo. **(B) Grupo Tratado - 30 dias.** Trabéculas ósseas neoformadas (setas) preenchendo quase totalmente a loja cirúrgica. Aumento original de 25x. HE.

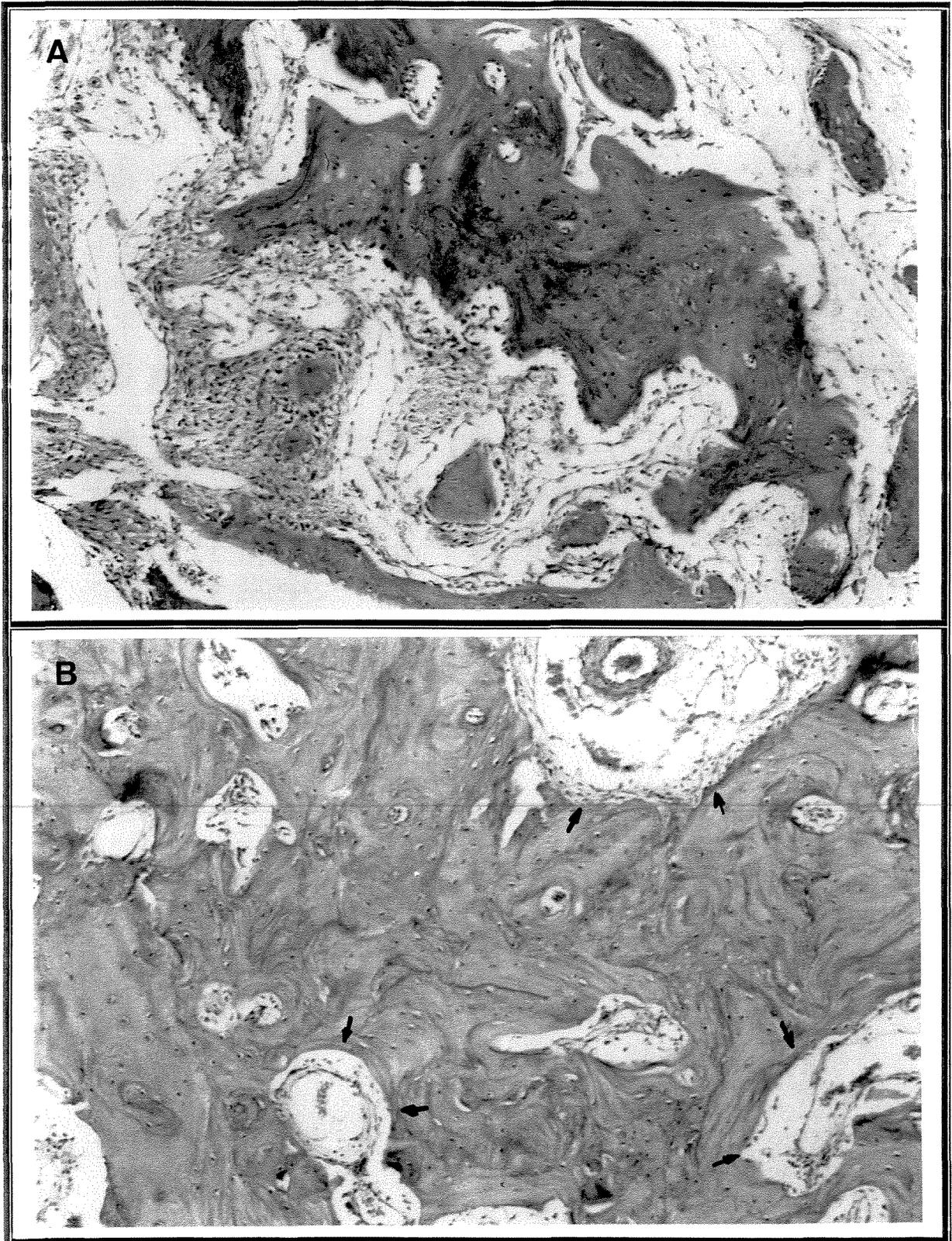


FIGURA 8 - (A) Grupo Controle - 30 dias. Trabéculas ósseas imaturas envolvidas por tecido conjuntivo osteogênico. **(B) Grupo Tratado - 30 dias.** Tecido ósseo neoformado. Trabéculas ósseas celularizadas. Amplos canais vasculares (setas). Aumento 100x. HE.

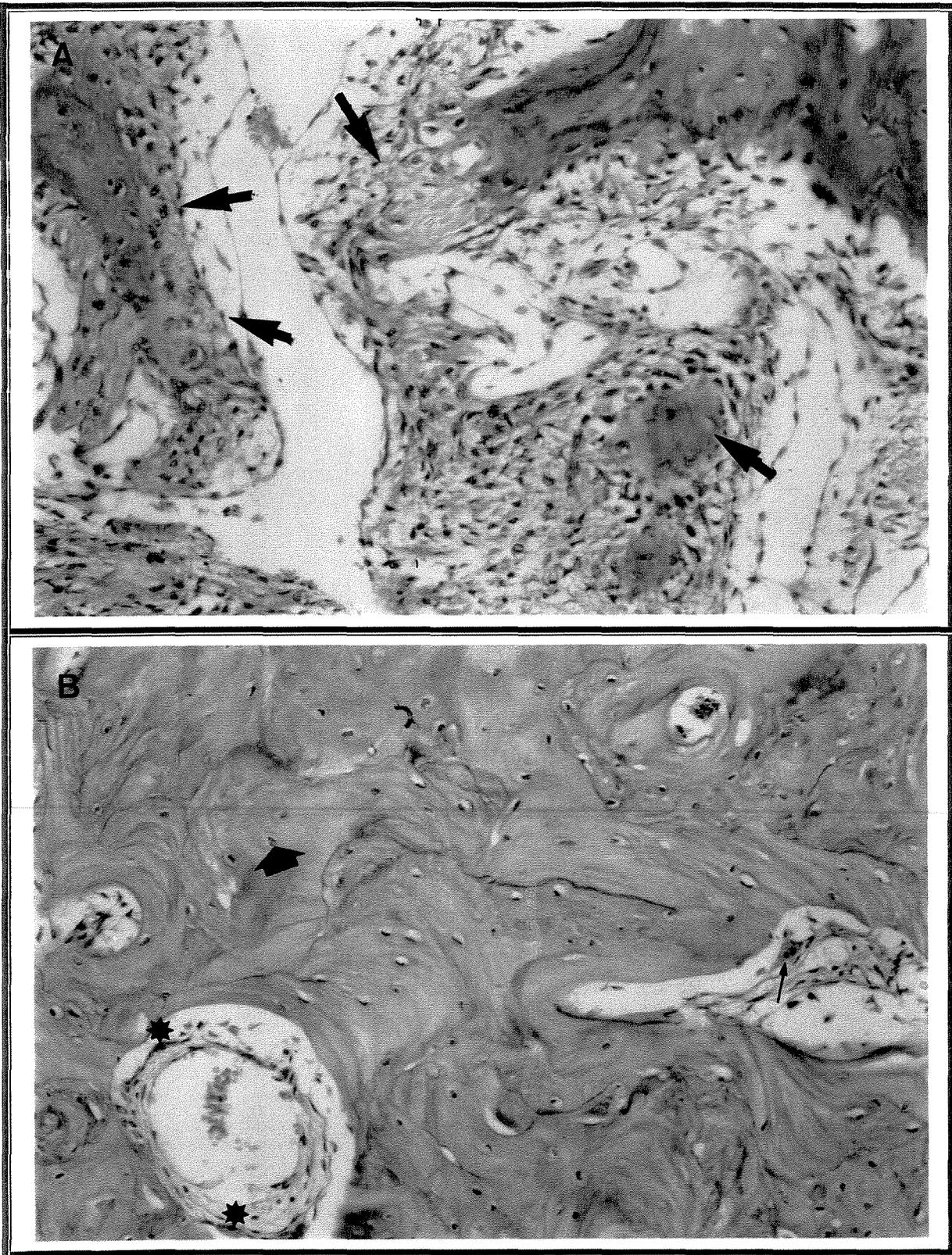


FIGURA 9 - (A) *Grupo Controle* - 30 dias. Setas indicam atividade osteogênica. (B) *Grupo Tratado* - 30 dias. Presença de tecido ósseo neoformado. Osteoclastos (seta), osteoblastos (asterisco) e osteócitos (cabeça de seta). Aumento original de 200x. HE.

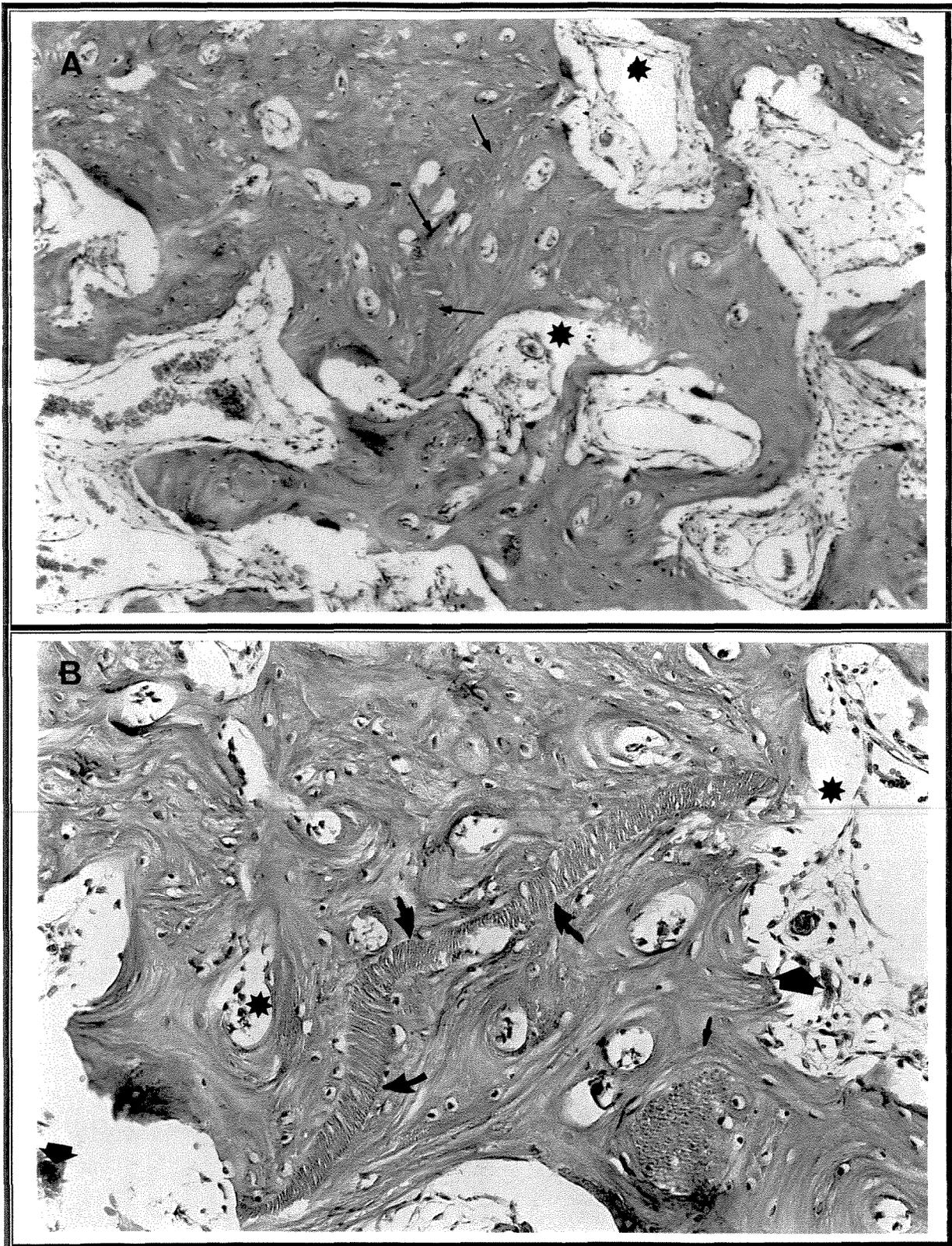


FIGURA 10 - *Grupo Tratado* - 30 dias (A) e (B). Fatias de MDDH incorporadas à matriz óssea neoformada (setas). Amplos canais vasculares (asterisco) e osteoclastos promovendo a remodelação do tecido ósseo imaturo (cabeça de seta). Aumento original de 100x (A) e 200x (B) HE.

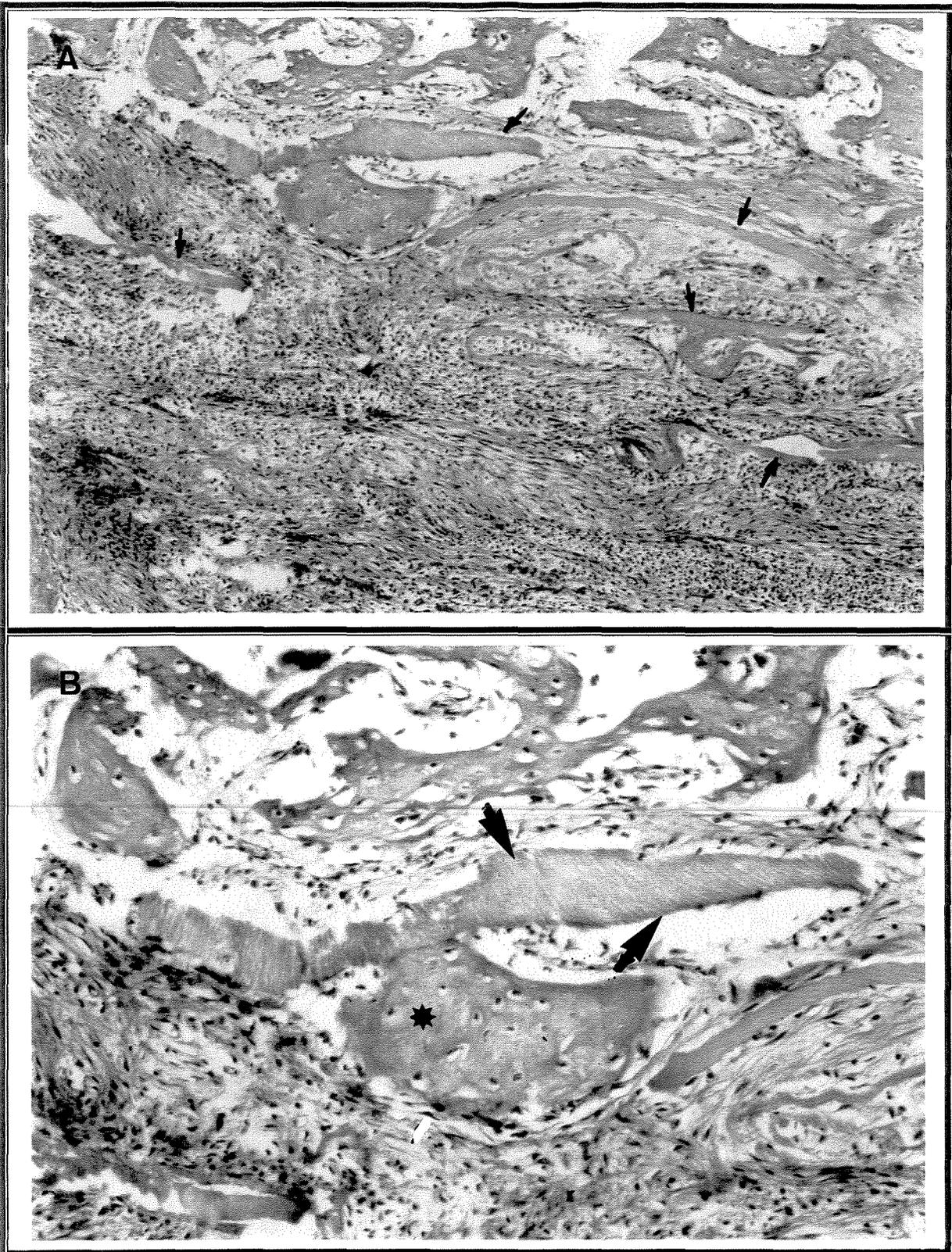


FIGURA 11 Grupo Tratado - 30 dias (A) e (B). Fatias de MDDH (setas). (A) Grande quantidade de células osteoprecursoras e moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares. (B) Tecido ósseo neoformado sobre fatia de MDDH (asterisco). Aumento original de 100x (A) e 200x (B). HE.

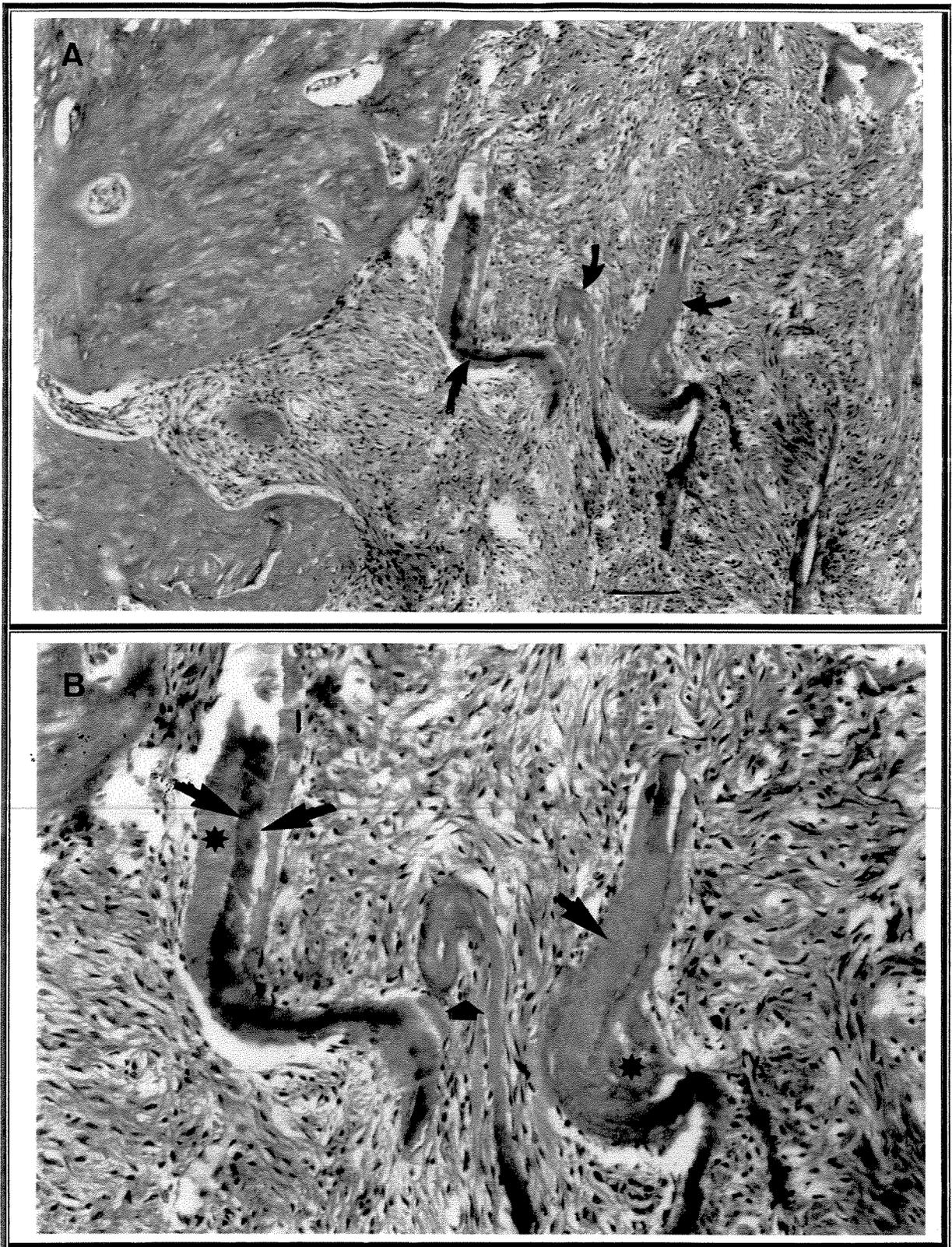


FIGURA 12 - *Grupo Tratado* - 30 dias **(A)** e **(B)**. Fatias de MDDH no tecido conjuntivo osteogênico (setas). Matriz óssea neoformada sendo depositada na superfície das fatias de MDDH (asterisco). Grande quantidade de osteoblastos (cabeça de seta). Aumento original de 100x **(A)** e 200x **(B)**. HE.

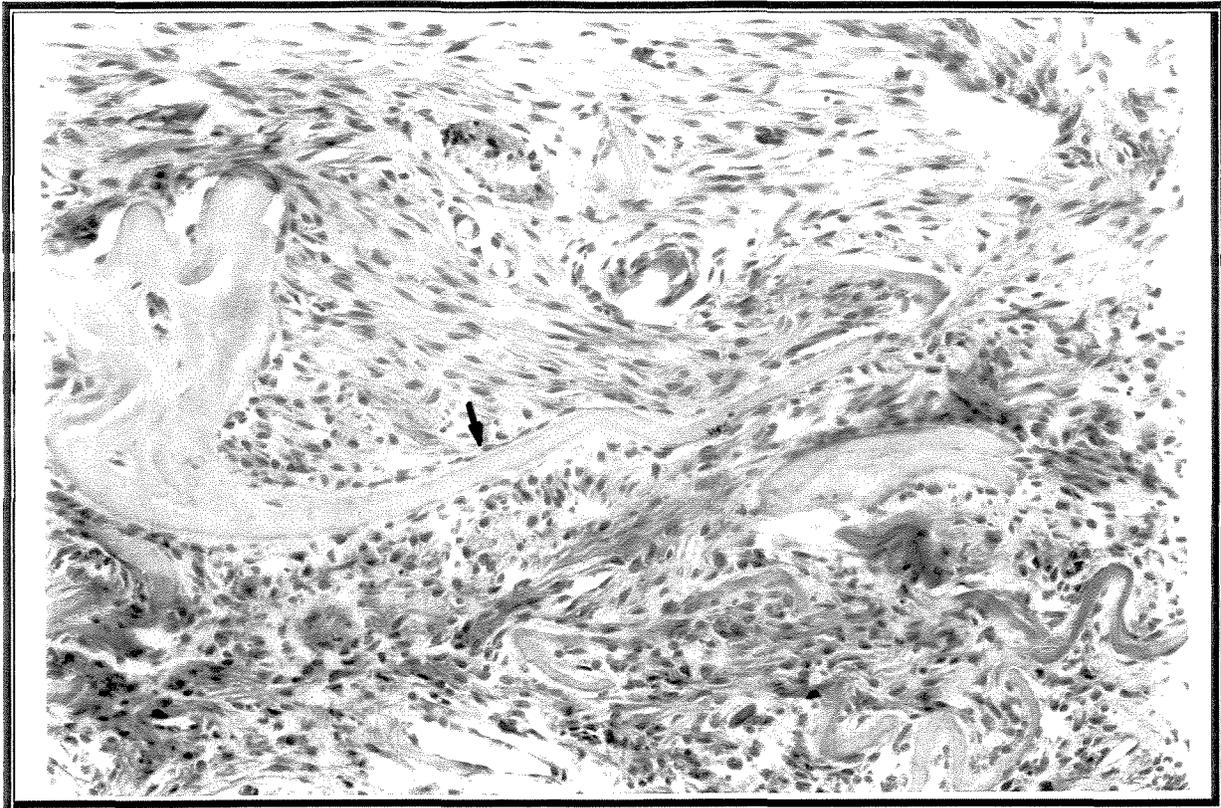


FIGURA 13 - *Grupo Tratado* - 30 dias. Células osteoprecursoras posicionadas na superfície das fatias de MDDH (setas), depositando matriz óssea neoformada sobre as mesmas. Intensa atividade osteogênica. Aumento original de 200x. HE.

5.3.2. PERÍODO DE 60 DIAS

No grupo *controle*, a região da loja cirúrgica não foi totalmente preenchida por trabéculas ósseas. Uma lâmina óssea contínua recobriu em extensão a porção superficial da região do defeito ósseo. Esta lâmina óssea apresentou-se constituída por tecido ósseo imaturo, bastante celularizado (Fig. 14A).

Abaixo desta porção óssea contínua denotou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo, com células osteoprogenitoras e pouca quantidade de fibras (Fig. 15A). Na base do defeito ósseo, ou seja, na porção relacionada às raízes dos dentes molares inferiores houve o preenchimento quase total da região por tecido ósseo também imaturo, bastante celularizado. Células clásticas foram evidenciadas nesta região, além de um tecido conjuntivo com grande quantidade de fibras e células osteogênicas (Figs. 15A e 16A). Observou-se o crescimento de tecido ósseo da porção basal e limites laterais do defeito em direção à porção central do mesmo, formando aparentemente uma ponte óssea em direção à porção central da região correspondente à loja cirúrgica (Fig. 14A).

No grupo *tratado*, a região do defeito ósseo apresentou grande quantidade de tecido ósseo constituído de trabéculas ósseas imaturas, bastante celularizadas com amplos canais de Havers, além de grandes espaços medulares. Na porção central da região correspondente à loja cirúrgica, notou-se a presença de tecido conjuntivo osteogênico, apresentando moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares (Fig. 15B). O crescimento ósseo se deu da região

dos limites do defeito em direção à porção central do mesmo (Fig. 14B). Incorporadas às trabéculas ósseas imaturas, as fatias de MDDH ficaram evidentes (Figs. 15B e 16B).

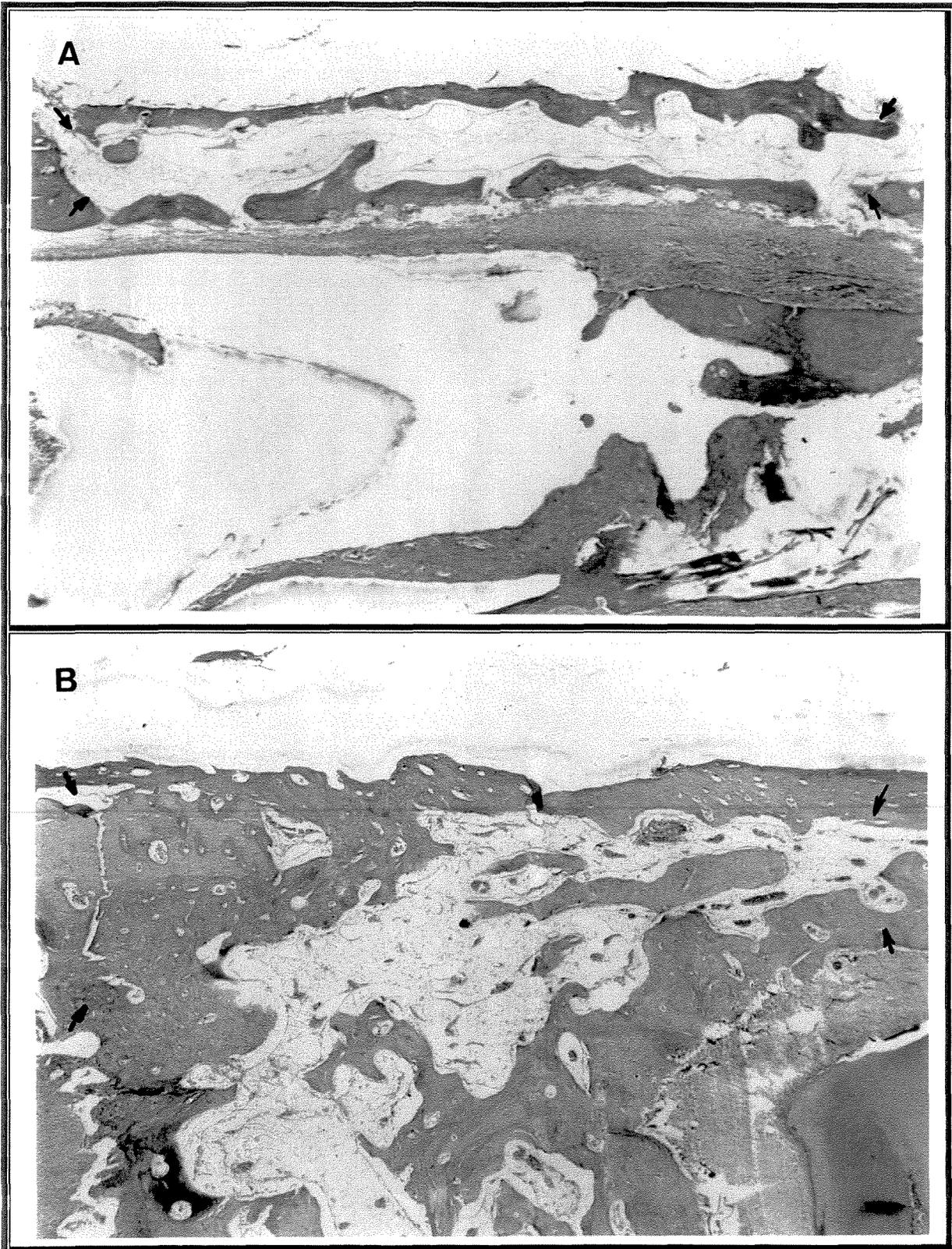


FIGURA 14 - (A) Grupo Controle --60 dias. Lâmina óssea recobrando a loja cirúrgica. Setas indicam os limites da loja óssea. **(B)** Grupo tratado - 60 dias. Trabeculado ósseo preenchendo a maior parte da loja cirúrgica, setas indicam limites do defeito ósseo. Aumento original de 25x (A) e (B).HE.

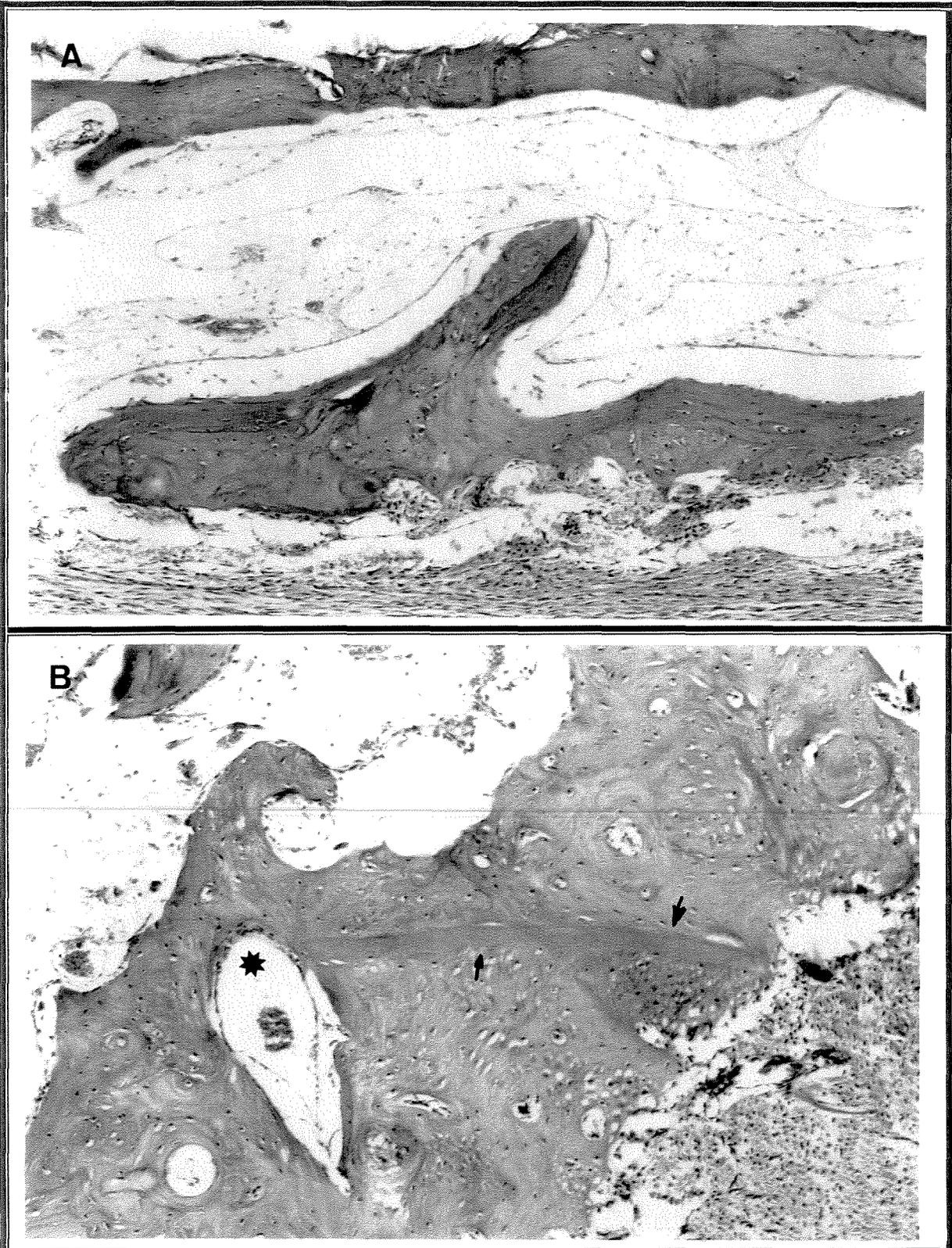


FIGURA 15 - (A) *Grupo controle* - 60 dias. Tecido ósseo preenchendo parcialmente a loja cirúrgica. (B) *Grupo tratado* - 60 dias. Tecido ósseo neoformado com amplos canais vasculares (asterisco) e fatias de MDDH incorporadas à matriz óssea (setas). Aumento original de 100x (A) e (B). HE.

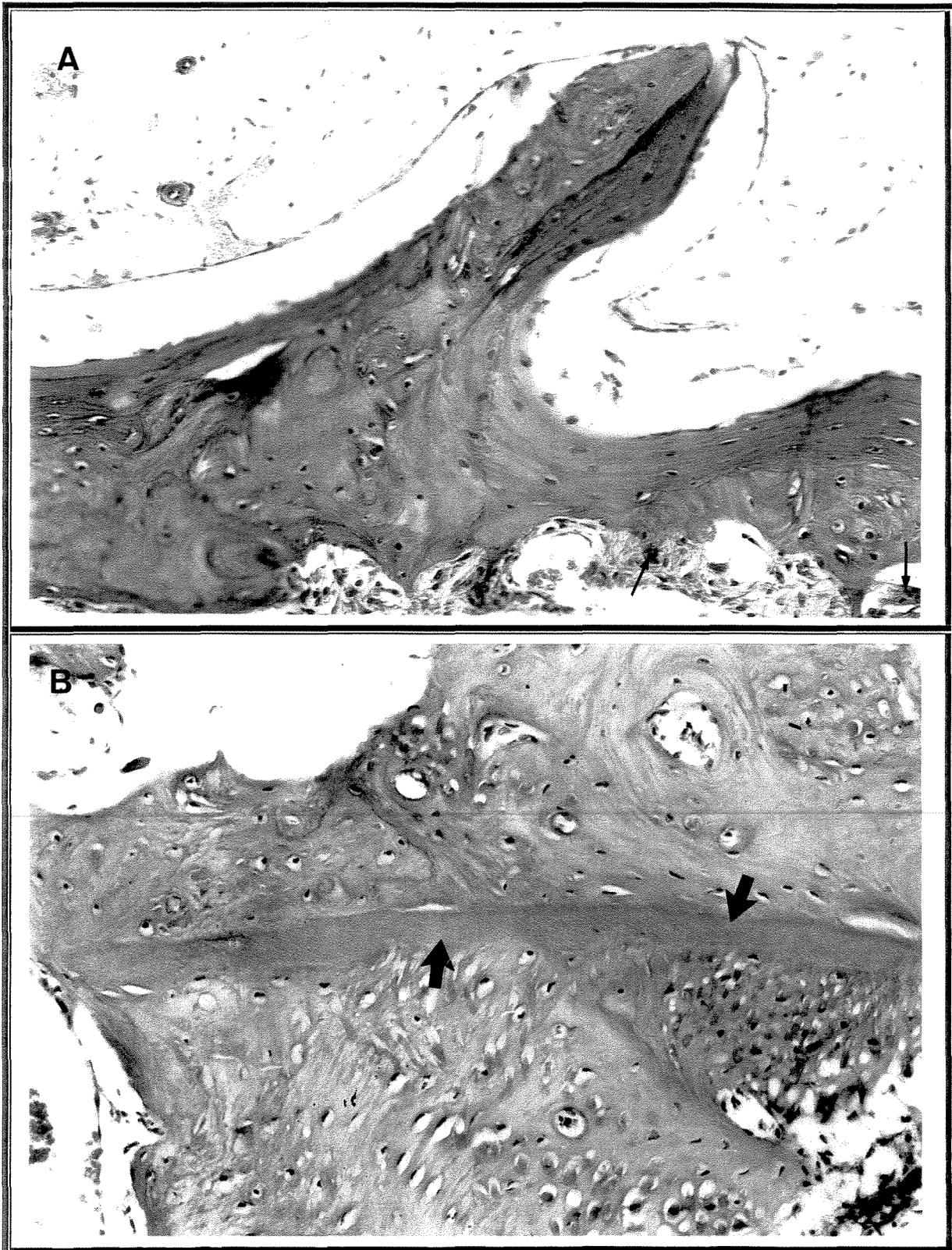


FIGURA 16 - (A) Grupo controle - 60 dias. Tecido ósseo imaturo. Osteoclastos promovem a remodelação da matriz óssea (setas). **(B) Grupo tratado - 60 dias.** Fatia de MDDH totalmente incorporada à matriz óssea neoformada (setas). Aumento original de 200x (A) e (B). HE.

5.3.3. PERÍODO DE 90 DIAS

No grupo *controle*, a região da loja cirúrgica não foi totalmente preenchida por tecido ósseo. Uma lâmina óssea contínua recobriu em extensão a porção superficial da região do defeito ósseo (Fig. 17A).

Esta lâmina óssea apresentou-se constituída por tecido ósseo com certo grau de organização. Abaixo desta porção óssea contínua observou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo, apresentando células osteogênicas e pouca quantidade de fibras. Na base do defeito ósseo, ou seja, na porção relacionada às raízes dos dentes molares inferiores o preenchimento da região por tecido ósseo foi quase total (Fig. 17A). Este apresentou-se, entretanto, ainda bastante celularizado. Observou-se a formação de trabéculas ósseas da porção basal e limites laterais do defeito em direção à porção central do mesmo, formando uma ponte óssea em direção à porção central da região correspondente à loja cirúrgica (Fig. 18A). Notou-se a presença de células clásticas, sobretudo na porção basal da loja cirúrgica (Fig. 19A).

No grupo *tratado*, a região do defeito ósseo apresentou maior quantidade de tecido ósseo em relação ao grupo controle, constituído de trabéculas imaturas, bastante celularizadas, apresentando amplos canais de Havers, além de grandes espaços medulares (Fig. 17B). Na porção central da região correspondente à loja cirúrgica, notou-se a presença de tecido conjuntivo osteogênico, apresentando pequena quantidade de células inflamatórias (Fig.

18B). O crescimento ósseo se deu da região dos limites do defeito em direção à porção central do mesmo. Na maioria dos cortes não foram observadas fatias de MDDH incorporadas ao tecido ósseo neoformado (Figs. 18B e 19B).

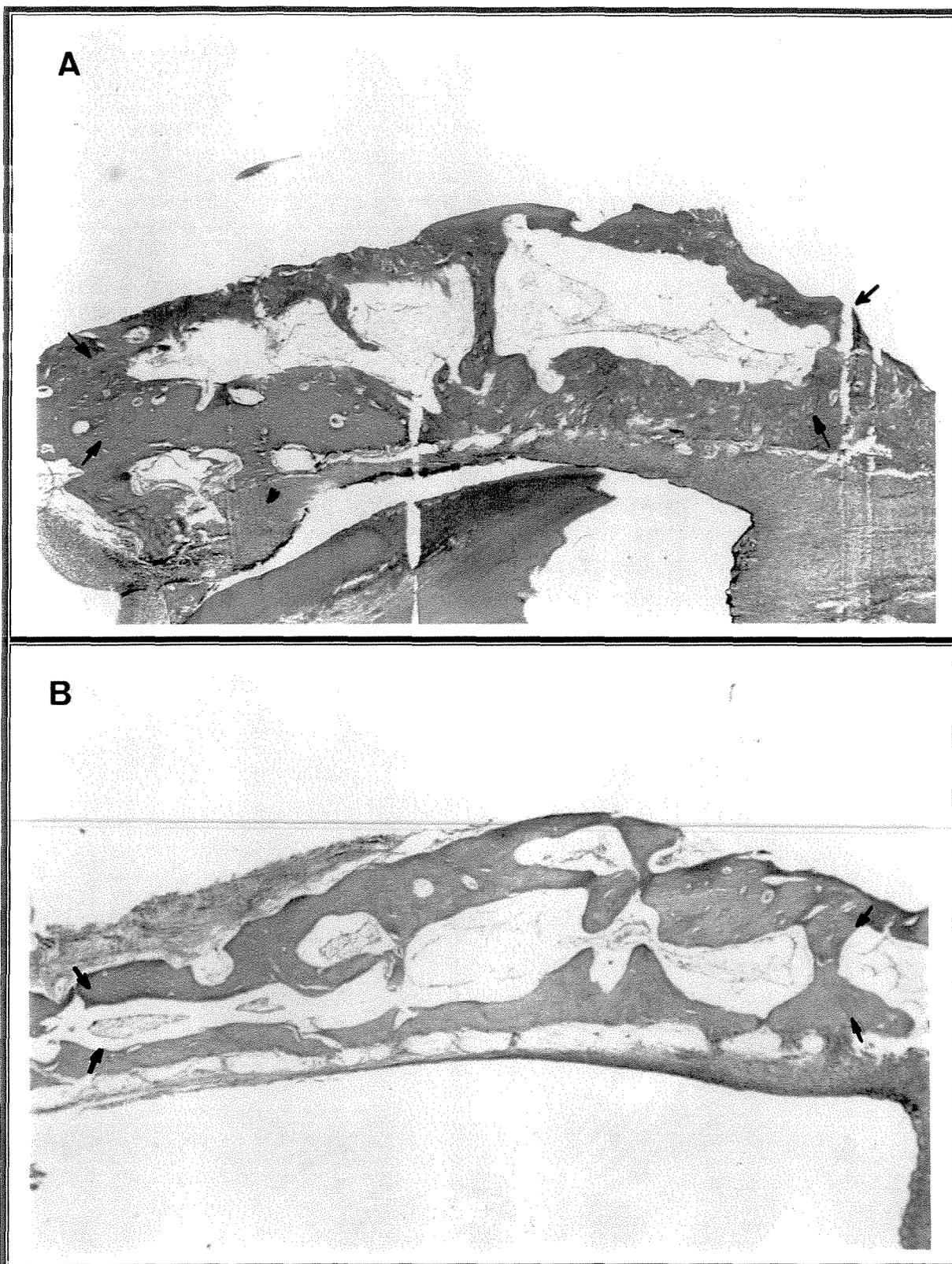


FIGURA 17 - (A) Grupo controle - 90 dias. Defeito parcialmente preenchido por tecido ósseo. Setas indicam os limites da loja cirúrgica. (B) Grupo tratado - 90 dias. Trabeculado ósseo preenchendo o defeito. Setas indicam os limites do defeito ósseo. Aumento original de 25x (A) e (B). HE.

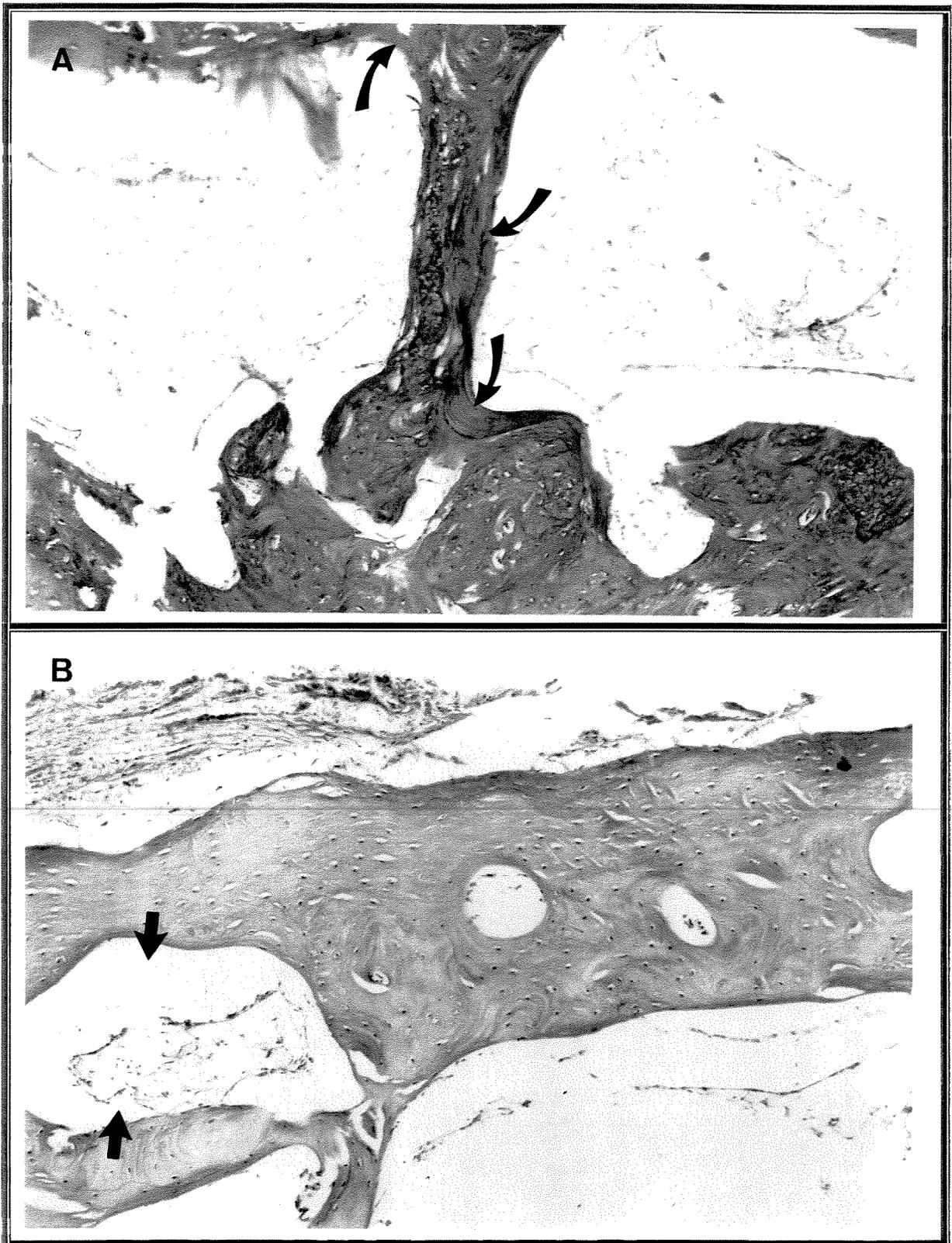


FIGURA 18 - (A) Grupo controle - 90 dias. Ponte de tecido ósseo ligando a base (seta) e superfície (seta) da loja cirúrgica. **(B)** Grupo tratado - 90 dias. Tecido ósseo ainda bastante celularizado e com ampla cavidade medular (seta). Aumento original de 100x **(A)** e **(B)**. HE.

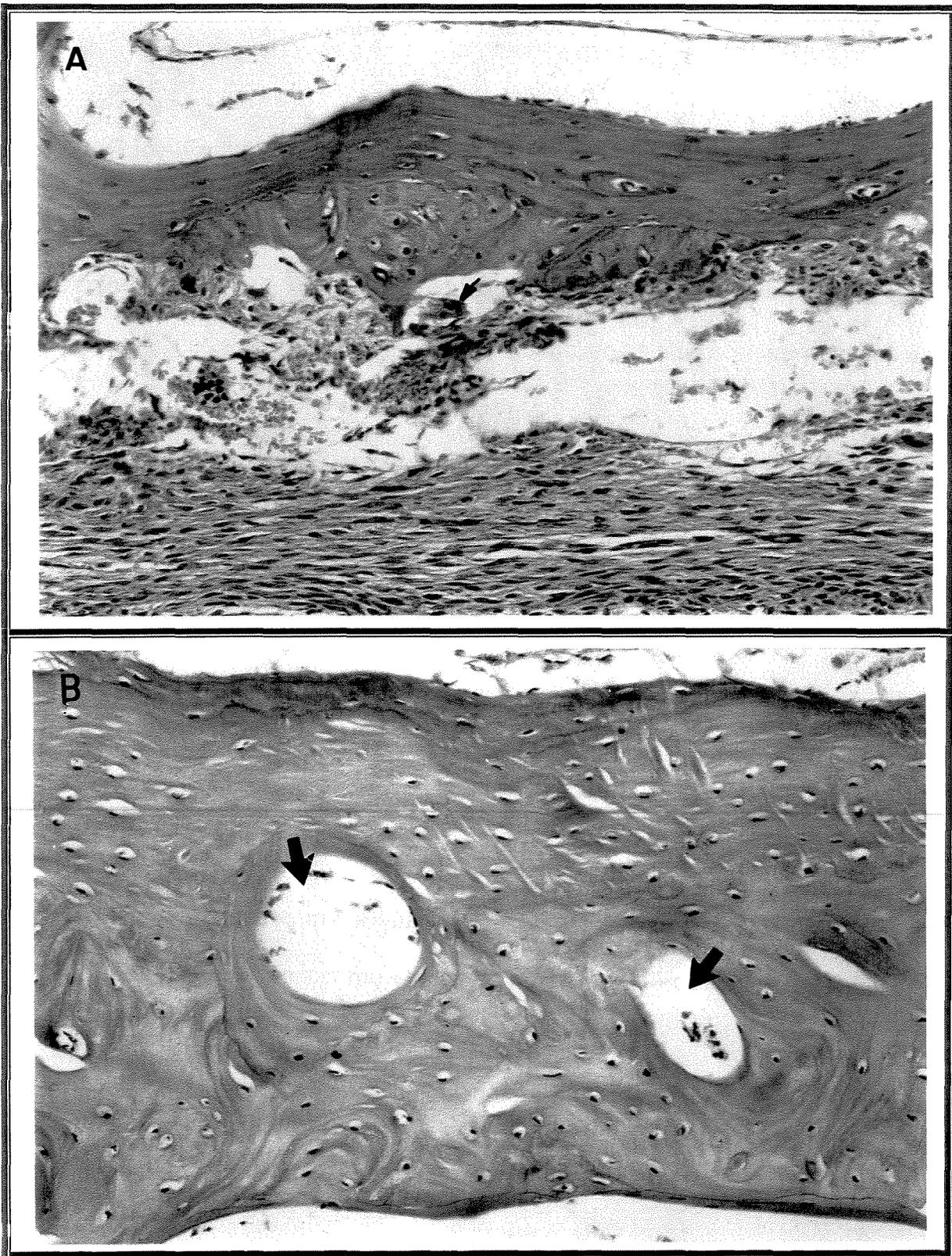


FIGURA 19 - (A) Grupo controle - 90 dias. Tecido ósseo neoformado em atividade de remodelação. Seta indica a presença de osteoclastos. **(B)** Grupo tratado - 90 dias. Tecido ósseo apresenta-se em organização. As setas indicam amplos canais de Havers. Aumento original de 200x **(A)** e **(B)**. HE.

5.4. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A análise histomorfométrica teve como finalidade mensurar a densidade de volume da matriz óssea neoformada nos defeitos ósseos dos grupos controle e tratado, bem como fornecer os dados necessários à análise estatística destas medições.

As densidades de volume de matriz óssea encontradas em cada um dos 27 campos microscópicos, para cada animal, avaliados individualmente foram expressas na Tab. 3 no ANEXO.

De acordo com os dados, referentes à análise de variância, apresentados na Tab. 1, a diferença estatística entre as densidades de volume de matriz óssea nos grupos experimentais foi significativa em todos os períodos de observação considerados, assim como as diferenças quantitativas entre os dois grupos analisados.

Os valores expressos na Tab. 1 relativos à progressão da síntese de tecido ósseo de acordo com o tempo, dentro de um mesmo grupo experimental, não foram significantes, revelando o equilíbrio no processo de neoformação óssea a partir de 30 dias de observação em ambos os grupos experimentais.

Tabela 1: Análise de Variância considerando os fatores: Tratamento e Tempo.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Controle / Tratado	2,868	1	2,868	76,756	1,258E-16	2,634	**
Períodos de Observação	0,125	2	0,063	1,673	0,189	3,025	
Tratamento x Tempo	0,279	2	0,139	3,732	2,501E-02	2,128	**
Entre Grupos	3,272	5	0,654	17,513	9,56E-14	2,272	
Resíduo	5,829	156	0,037				
Total	9,101	161					

** *Significante a 5%*

Após a realização da análise de variância (ANOVA), foram expressos, na Tab. 2, os valores das médias e desvio padrão das densidades de volume, calculados para cada grupo experimental nos diferentes períodos de observação. Baseados nestes valores, pode-se salientar que as médias de densidade de volume de matriz óssea, no grupo tratado, foram significativamente maiores em todos os períodos de observação.

Em seguida, aplicou-se o teste de TUKEY, com o objetivo de calcular a diferença mínima significativa entre duas médias ao nível de significância de 5%. Os resultados das diferenças foram representados na forma de letras maiúsculas e minúsculas (Tab. 2), revelando a diferença estatística significativa, em relação à quantidade de matriz óssea neoformada, com grande vantagem numérica para o grupo tratado.

Ainda na Tab. 2, deve-se ressaltar que a diferença estatisticamente significativa entre os períodos de tempo considerados, dentro de um mesmo grupo

experimental, ocorreu apenas no grupo controle entre os períodos de 60 e 90 dias de observação.

Tabela 2: Média e desvio padrão das densidades de volume dos fatores Tratamento e Períodos de Observação; aplicação do Teste de Tukey* (5%).

	CONTROLE		TRATADO (MDDH)	
	Média	Desvio-padrão	média	Desvio-padrão
30 dias	0,359 A B b	0,215	0,688 A a	0,216
60 dias	0,311 B b	0,191	0,632 A a	0,180
90 dias	0,462 A b	0,184	0,610 A a	0,170

* Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na vertical e minúscula na horizontal) diferem entre si.

Na Fig. 20, estão representados os valores das densidades de volume de matriz óssea neoformada dos grupos controle e tratado, nos períodos de observação determinados para este estudo.

A densidade de matriz revelou-se notadamente maior no grupo tratado, aos 30 dias de observação, bem como 60 e 90 dias após o implante da MDDH.

A Fig. 20 mostra ainda a uniformidade dos valores relativos à quantidade de matriz neoformada no decorrer dos períodos analisados, dentro de um mesmo grupo experimental, denotando-se o equilíbrio no processo de síntese óssea a partir dos 30 dias de observação.

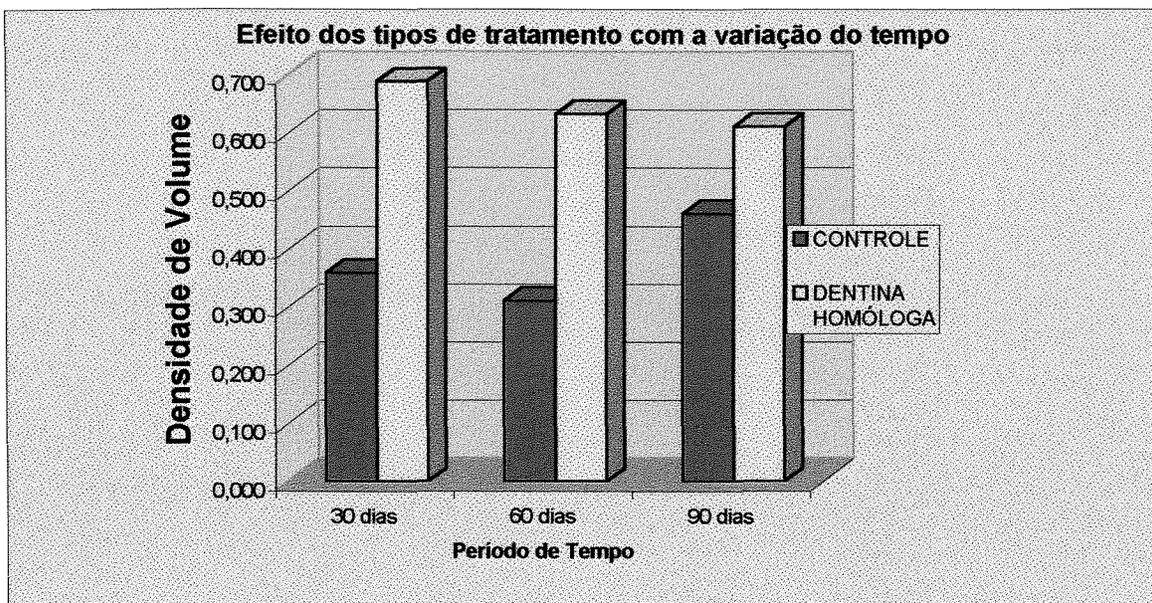


Figura 20 – Densidade de volume de **matriz óssea neoformada** nos grupos controle e tratado nos períodos considerados.

6. DISCUSSÃO

Inúmeros pesquisadores têm estudado diferentes tipos de materiais osteoindutores e/ou osteocondutores com o intuito de auxiliar positivamente no processo de reparo ósseo. Dentre os vários materiais encontrados na literatura, a aplicação de matriz dentinária desmineralizada autógena em defeitos ósseos tem mostrado excelentes resultados, uma vez que possui essas propriedades e por serem reabsorvidas na área hospedeira (CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹², 1986; CATANZARO-GUIMARÃES¹¹, 1993; GONÇALVES¹⁹, 1997; GOMES¹⁸, 1998.).

Por outro lado a osteoindução tem sido descrita como um fenômeno de transformação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras ou osteoprecursoras e, desta maneira, o tecido ósseo neoformado pode desenvolver-se via ossificação intramembranosa (FRIEDSTEIN¹⁵, 1976). A utilização da matriz dentinária desmineralizada homogênea (MDDH) como implante em defeitos ósseos, neste trabalho, mostrou uma intensa proliferação de células osteoprogenitoras no período de 30 dias, caracterizando um processo de ossificação intramembranosa (Figs. 11A, 11B, 12A, 12B e 13). Isto está em concordância com os achados de ISAKSSON & ALBERIUS²⁷ (1992), RABIE et al.⁴⁶ (1996) e SASANO et al.⁵² (1995) que evidenciaram que o processo de reparação óssea pode apresentar características semelhantes ao processo de formação embriogênica, diante do mesmo material de implante.

Também de acordo com CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹² (1986) e BESSHO et al.⁴ (1992), quando substâncias osteoindutoras atuam sobre as células osteoprecursoras determinadas, ou seja, células localizadas em tecidos diretamente relacionados ao tecido ósseo, a reação se dá pela neoformação óssea direta ou ortotópica por um processo de ossificação intramembranosa.

No contexto da regeneração óssea guiada, está claro que quando substâncias osteoindutoras atuam sobre as células osteoprecursoras determinadas, a reação se dá pela neoformação óssea direta. Vários estudos demonstraram que a reparação óssea ocorre com maior intensidade quando se utiliza a proteína morfogenética óssea (BMP) purificada e/ou matriz óssea ou dentinária desmineralizada (CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹², 1986; BESSHO et al.⁴, 1992; HELDER et al.²³, 1998; RIPAMONTI & REDDI⁴⁹, 1994; ROSEN & THIES⁵¹, 1995; GONÇALVES¹⁹, 1997; GOMES¹⁸, 1998; REDDI⁴⁸, 1981; URIST & STRATES⁵⁷, 1971; RAVAL et al.⁴⁷, 1996; GAO et al.¹⁷, 1997). A associação do potencial osteogênico à presença da proteína morfogenética óssea (BMP) na matriz dentinária pode ser atribuída à maior quantidade de matriz óssea neoformada, estatisticamente significativa, nos animais do grupo tratado em todos os períodos considerados (Fig. 20). A presença da MDDH como material de implante osteoindutor nos defeitos ósseos dos animais do grupo tratado, contendo macromoléculas indutoras tais como: fator de crescimento insulínico I e II, fator de crescimento transformador β (TGF β I e TGF β II), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e proteína

morfogenética óssea (BMP), foi comprovada anteriormente por BUSH et al.⁷ (1996), PFEILSCHIFER et al.^{44,45} (1990, 1990a), URIST & STRATES⁵⁷ (1971), RAVAL et al.⁴⁷ (1996), GAO et al.¹⁷(1997), BESSHO et al.^{5,4} (1990, 1992), ROSEN & THIES⁵¹, (1995). Isto permitiu-nos considerar que, nos animais tratados, a provável atividade osteogênica desses fatores protéicos, acima citados, foi de fundamental importância na reparação óssea do grupo tratado com MDDH.

O potencial quimiotático e osteogênico da matriz óssea e dentinária é relatado por vários trabalhos na literatura, denotando sua importância como material de implante osteoindutor (CATANZARO-GUIMARÃES et al.¹², 1986; ALPER et al.¹,1989). Neste estudo, nossos resultados mostraram que a MDDH em forma de fatias induziu a migração e a deposição de células osteogênicas, consideradas osteoblastos, sobre a superfície da matriz dentinária, levando à deposição de matriz óssea neoformada sobre as porções de MDDH implantadas (Figs. 12A, 12B e 13). Esta indução quimiotática sobre as células osteoprogenitoras ficou evidente através da análise qualitativa e quantitativa dos cortes histológicos, nos quais pudemos observar uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado na região periférica do defeito ósseo, justamente onde foram implantadas as fatias de MDDH (Figs. 7B e 14B). Através desta constatação, podemos inferir que a proliferação e migração dos osteoblastos em direção às fatias de matriz dentinária levou à neoformação de matriz óssea, em maior quantidade, na região onde as mesmas foram implantadas, baseados em observações semelhantes feitas por BESSHO et al.⁵ (1990).

Alguns autores acreditam, ainda, que a função do enxerto ósseo de matriz óssea desmineralizada, seja de induzir a neovascularização no interior do defeito, enquanto que as células mesenquimais indiferenciadas da região perivascular dos novos vasos sanguíneos, seriam induzidas a se diferenciarem em osteoblastos pelas proteínas morfogenéticas da matriz óssea desmineralizada (BESSHO et al.^{5,4}, 1990, 1992). Além disto, NAKASHIMA^{39,40,38} (1990, 1992, 1994) sugere que a matriz dentinária implantada, poderia promover uma superfície adequada para fixação das células mesenquimais indiferenciadas, auxiliando na orientação celular, caracterizando sua ação osteocondutora. No presente estudo as observações a respeito da neovascularização no interior do defeito ficaram evidentes no período de 30 dias, no grupo tratado, onde os defeitos ósseos apresentaram por meio das observações macroscópica e microscópica, amplos canais vasculares permeando o tecido ósseo neoformado, caracterizando uma intensa vascularização na região de reparação, juntamente com intensa proliferação de células osteoprecursoras no tecido conjuntivo osteogênico que preenchia, sobretudo, áreas centrais do defeito (Figs. 7B, 8B e 10A).

A ocorrência de grande quantidade de osteoblastos localizados sobre as fatias de MDDH, presentes nos achados microscópicos, no período de 30 dias no grupo experimental, vem corroborar os resultados de NAKASHIMA^{39,40,38} (1990, 1992, 1994) e CATANZARO-GUIMARÃES¹¹ (1993) que utilizaram matriz dentinária desmineralizada autógena (MDDA) sob as formas de gel, partículas e/ou fatias. Estes autores descrevem como consequência uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado no grupo onde a MDDA foi implantada na forma de

fatias, evidenciando sua atividade osteocondutora, além de sua ação osteoindutora. Isto seria devido à maior superfície de contato, oferecida pelas fatias de MDDH, com o tecido conjuntivo osteogênico da região, fornecendo um arcabouço ou substrato favorável à deposição de matriz óssea (Figs. 11B e 13).

A análise microscópica do grupo experimental, onde as fatias de MDDH foram implantadas na periferia dos defeitos ósseos, revelou a presença de moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares em todos os períodos estudados, denotando uma reação imunológica inexpressiva da MDDH (Figs. 10A e 11A). Desta maneira, a matriz dentinária desmineralizada homogênea mostrou excelente biocompatibilidade, apresentando alto nível de tolerância biológica pelos animais onde foi implantada, além de um potencial osteoindutor expressivo confirmado pela quantificação morfométrica da matriz óssea neoformada, estatisticamente significativa em todos os períodos de observação. De acordo com estudos realizados por BANG² (1972), o grau de antigenicidade da matriz dentinária homogênea foi muito pequeno em relação ao potencial antigênico da matriz dentinária xenógena, evidenciando ainda, o potencial osteoindutor da MDDH, antagônico à matriz dentinária xenogênica, a qual não induziu à neoformação óssea.

Não obstante os enxertos ósseos mais utilizados serem os autólogos, devido à sua maior compatibilidade imunológica, estudos preliminares do efeito da osteoindução da matriz dentinária desmineralizada homogênea, em tecido gengival humano, foram realizados por KNUDSEN et al.²⁹ (1974), os quais mostraram que a MDDH era bem tolerada pelos tecidos, além de apresentar quantidade notória

de tecido ósseo neoformado na área do enxerto. Estes dados reforçam os resultados deste trabalho, assim como as observações de NORDENRAM et al.⁴² (1975), que utilizaram a MDDH para reconstruir um defeito traumático no processo alveolar de um paciente, na região dos incisivos superiores, obtendo resultados satisfatórios tanto estético quanto funcional.

Os resultados das análises macroscópica (Figs. 5B, 5D e 5F), radiográfica (Figs. 6B, 6D e 6F) e microscópica dos grupos estudados mostraram o completo preenchimento da loja cirúrgica, no grupo tratado, por tecido ósseo neoformado em todos os períodos de observação após o enxerto, o que corrobora os resultados de GOULD et al.²⁰ (1981) que utilizaram a gelatina de MDDH em defeitos ósseos de tamanho crítico no osso parietal de ratos e puderam concluir que o processo de reparo foi completo em todos os grupos tratados.

A osteoindução segundo CATANZARO-GUIMARÃES¹¹ (1993), é controlada por complexas interações moleculares que atuam sobre as células osteoprogenitoras, influenciando sua proliferação, migração, ancoragem e, subseqüentemente, a velocidade e o tempo de vida das células das linhagens osteoblástica e osteoclástica. Ainda segundo MUNDY et al.³⁶ (1982), o tecido ósseo em reabsorção produz fatores quimiotáticos para células com características osteoblásticas. Estes fatos relatados na literatura são coincidentes com o intenso processo de remodelação óssea ocorrido nos defeitos ósseos em reparação, do grupo tratado, nos períodos de 30 dias após o implante de MDDH (Figs. 9B e 10B), mas sobretudo, após 60 dias de enxerto homólogo da matriz dentinária (Figs. 15B e 16B). Considerando que a remodelação óssea consiste

numa seqüência de eventos, na qual ocorre reabsorção seguida de aposição de matriz neoformada, conclui-se que a intensa atividade remodeladora nos períodos acima citados favoreceu o processo de reparo ósseo.

Além disto, URIST & STRATES⁵⁷ (1971) e BESSHO et al.^{5,4} (1990, 1992) constataram que, durante a reabsorção óssea, os osteoclastos degradam a matriz óssea, propiciando a liberação da BMP cuja principal função é induzir a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos, possuindo ainda ação quimiotática e mitogênica, aumentando a síntese de matriz óssea. A presença das fatias de MDDH, implantadas nos defeitos ósseos do grupo tratado, induziu a atividade reabsortiva das mesmas por células clásticas, observada principalmente nos primeiros 60 dias de implante (Fig. 11B). Este evento pode levar à conclusão que a reabsorção das fatias de MDDH provocou a liberação de macromoléculas osteoindutoras, em especial proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs).

Muitos parâmetros para os variados estudos sobre os materiais biológicos osteoindutores têm sido considerados. Dentre eles, a biocompatibilidade, estocagem sem perda da viabilidade, facilidade de obtenção do material e relação custo/benefício, importantes requisitos a serem preenchidos por materiais biológicos osteoindutores testados atualmente (YEOMANS & URIST⁶², 1967; BANG², 1972; KNUDSEN et al.²⁹, 1974; NORDENRAN et al.⁴², 1975; GOULD et al.²⁰, 1981; STRATES et al.⁵³, 1988; ALPER et al.¹, 1989; VEIS et al.⁵⁸, 1989; NADE³⁷, 1994; NAKASHIMA³⁸, 1994; TZIAFAS et al.⁵⁵, 1995; GOMES¹⁸, 1998).

Considerando as qualidades acima mencionadas, verificamos propriedades relevantes da matriz dentinária desmineralizada homogênea neste estudo, uma vez que se evidenciou significativo potencial osteoindutor e osteocondutor, além de sua imunocompatibilidade através de sua excelente tolerância biológica observada nos animais do grupo tratado pela ausência de reação expressiva de antigenicidade. Em adição a estas qualidades devemos ponderar seu fácil manuseio no momento da implantação, obtenção tecnicamente simples e possibilidade de armazenagem sem perda de viabilidade. Todas essas características favoráveis contribuem para a indicação da matriz dentinária homogênea como material de implante ósseo viável, com resultados extremamente positivos e grandes perspectivas de sucesso em sua aplicação nas mais variadas áreas das ciências biomédicas e sobretudo na Odontologia.

Estudos futuros com metodologia específica para a identificação das substâncias ativadoras do processo de osteoindução da MDDH poderão complementar os resultados obtidos nesta pesquisa, visando o esclarecimento necessário das diversas etapas envolvidas na atividade indutora do implante homólogo de matriz dentinária desmineralizada.

7. CONCLUSÕES

Em vista dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- O uso da MDDH leva à neoformação óssea de maneira mais rápida e em maior volume, evidenciada sobretudo, nos períodos iniciais.
- A média da formação de matriz óssea neoformada foi maior e estatisticamente significativa no grupo tratado.
- As fatias de MDDH ofereceram substrato adequado à fixação e à proliferação de células osteogênicas em sua superfície, confirmando a ação osteocondutora da matriz dentinária sob a forma de fatias.
- O implante homólogo de matriz dentinária, neste estudo, não provocou reação antigênica capaz de inibir sua atividade osteopromotora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALPER, G. *et al.* Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. **Am J Med Sci**, Philadelphia, v.298, n.6, p.371-376, 1989.
2. BANG, G. Induction of heterotopic bone formation by desmineralized dentin in guinea pig: antigenicity of the dentin matrix. **J Oral Path Med**, Copenhagen, v.1, p.172-185, 1972.
3. BECKER, W. *et al.* A comparison of e-PTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **J Periodontol**, Chicago, v.63, p.929-933, 1992.
4. BESSHO, K., TAGAWA, T., MURATA, M. Comparison of bone matrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. **J Oral Maxillofac Surg**, Orlando, v.50, p.496-501, 1992.
5. BESSHO, K., TAGAWA, T., MURATA, M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. **J Oral Maxillofac Surg**, Orlando, v.48, p.162-169, 1990.

* De acordo com a NBR 6023, de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com o "Medline".

6. BRUDER, S.P., FINK, D.J., CAPLAN, A. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J Cell Biochem**, New York, v.56, p.283-294, 1994.
7. BUSCH, O. *et al.* Guided tissue regeneration and local delivery of insulin like growth factor I by bioerodible polyorthoester membranes in rat calvarial defects. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.11, p.498-505, 1996.
8. BUSER, D., DAHLIN. C., SCHENK, R.K. **Guided bone regeneration in implant dentistry**. Berlin: Quintessence, 1994.
9. BUTLER, W.T. Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morfogenetic activity. **J Dent Res**, Washington, v.56, p.3, p.228-232, 1977.
10. CABALIS, E. The hormonal and local control of bone formation. **Endocr Rev**, Baltimore, v.4, p.62-77, 1983.
11. CATANZARO-GUIMARÃES, S.A. Possibility to reforce bone repair with decalcified dentin matrix. In: **JAHRBUCH Für Orale Implatologie**. Berlim: Quintessenz Verlags-GMBH , c1993. p.33-34.
12. CATANZARO-GUIMARÃES, S.A. *et al.* Osteogenic potencial of autogenic demineralized dentin implanted in bony defects in dog. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v.15, p.160-169, 1986.
13. CORMACK, D.H. Osso. In: HAM, A.W. **Ham histologia**. 9.ed. Rio de Janeiro: Lippincott, c1991. Cap.12, p.216-254.
14. ERICKSEN, E. *et al.* Trabecular bone remodeling and balance in primary

hyperparathyroidism. **Bone**, New York, v.7, p.213-221, 1986.

15. FRIEDENSTEIN, A.J. Precursor cells of mechanocytes. **Int Rev Cytol**, New York, v.47, p.327, 1976.
16. FROST, H.M. Dynamics of bone remodeling. *In*: FROST, H.M. (Ed.) **Bone biodynamics**. Boston: Little Brown, 1964. p.315-333.
17. GAO, Y.H., YANG, L.J., YAMAGUCHI, A. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein in odontogenic tumors. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.26, n.1, p.273-277, 1997.
18. GOMES, M.F. **Avaliação da atividade osteoindutora da matriz dentinária autógena desmineralizada em defeitos ósseos cirúrgicos obtidos por craniotomia e tratados pela técnica de regeneração óssea guiada**. Bauru, 1998. 139p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
19. GONÇALVES, E.A.L. **Estudo do processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos implantados com matriz dentinária desmineralizada autógena no osso radio de cães**. Bauru, 1997. 141p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
20. GOULD, T.R.L., WESTBURY, L., TILLMAN, J. Dentin matrix gelatin (DMG) as possible "universal" grafting material in periodontics. **J Periodontol**, Chicago, v.53, n.1, p.22-25, 1981.
21. HÄMMERLE, C.H.F., SCHMID, J., OLAH, A.J. Osseous healing of

experimentally created defects in the calvaria of rabbits using guided bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v.3, p.144, 1992.

22. _____. *et al.* Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. **J Oral Maxillofac Surg**, Orlando, v.53, p.167-174, 1995.
23. HELDER, M.N. *et al.* Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development. **J Dent Res**, Washington, v.77, n.4, p.545-554, 1998.
24. HILL, P.A. *et al.* Bone remodeling. **Br J Orthod**, Oxford, v.25, n.2, p.101-107, 1998.
25. _____. *et al.* Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. **Endocrinology**, Baltimore, v.138, p.3849-3858, 1997.
26. INOUE, T., DEPORTER, D.A., MELCHER, A.H. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. **J Dent Res**, Washington, v.65, n.1, p.12-22, 1989.
27. ISAKSSON, S., ALBERIUS, P. Comparison of regenerative capacity elicited by demineralized bone matrix of different embryonic origins. **J Craniomaxillofac Surg**, Stuttgart, v.20, p.73-80, 1992.
28. KAWAI, T., URIST, M.R. Bovine tooth-derived bone morphogenetic protein. **J Dent Res**, Washington, v.68, n.6, p.1069-1074, 1989.

29. KNUDSEN, G.E., BANG, G., KRISTOFFERSEN, T. Implanting of allogenic demineralized dentin in human gingival tissue. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.1, p.153-159, 1974.
30. LEWIS, D.B. *et al.* Osteoporosis induced in mice by overproduction of interleukin-4. **Proc Nat Acad Sci**, Washington, v.90, p.11618-11622, 1993.
31. MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: EdUERJ, 1995.
32. MARTIN, T.J. Mechanisms by which cells of osteoblast lineage control osteoclast formation and function. **J Cell Biochem**, New York, v.56, p.357-366, 1994.
33. MASSAGUE, J. Transforming growth factor beta modulates the high affinity receptors of epidermal growth factor alpha. **J Cell Biol**, New York, v.100, p.1508-1514, 1985.
34. MONTES, G.S., JUNQUEIRA, L.C.U. The use of picosirius-polarization for the study of biopathology of collagen. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, Supl.3, p.1-11, 1991.
35. MUNDY, G. Peptides and growth regulatory factors in bone. **Rheum Dis Clin North Am**, Philadelphia, v.20, p.577-588, 1984.
36. _____. *et al.* Unidirectional migration of osteosarcoma cells with osteoblast characteristics in reponse to products of bone reserption. **Calcif Tissue Int**, New York, v.34, p.542-546, 1982.
37. NADE, S. Stimulating osteogenesis. **Injury**, Bristol, v.25, p.577-583, 1994.

38. NAKASHIMA, M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.39, n.12, p.1085-1089, 1994.
39. _____. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.35, n.7, p.493-497, 1990.
40. NAKASHIMA, M. Mitogenic and dentin-inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.73, p.484-489, 1992.
41. _____. An ultrastructural study of the differentiation of mesenchymal cells in implants of allogeneic dentine matrix on the amputated dental pulp of the dog. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.35, n.4, p.277-281, 1994.
42. NORDENRAM, A., BANG, G. Reconstruction of the alveolar process by implantation of allogenic demineralized dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.40, n.1, p.48-50, 1975.
43. PARFITT, A.M. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. **Metab Bone Relat Res**, Elmsford, v.4, p.1-6, 1982.
44. PFEILSCHIFTER, J. *et al.* Characterization of latent transforming beta complex in bone. **J Bone Miner Res**, New York, v.5, p.49-58, 1990.

45. _____. *et al.* Chemiotatic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor beta. **J Bone Miner Res**, New York, v.5, p.825-830, 1990a.
46. RABIE, A.B.M. *et al.* The effect of demineralized bone matrix on the healing of intramembranous bone graft in rabbit skull defects. **J Dent Res**, Washington, v.74, n.4, p.1045-1051, 1996.
47. RAVAL, P. *et al.* Expression of bone morphogenetic proteins by osteoinductive and non-osteoinductive human osteosarcoma cells. **J Dent Res**, Washington, v.75, n.7, p.1518-1523, 1996.
48. REDDI, A.H. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. **Collagen Relat Res**, Stuttgart, v.1, p.209-266, 1981.
49. RIPAMONTI, U., REDDI, A.H. Periodontal regeneration: potencial role of bone morphogenetic proteins. **J Periodont Res**, Copenhagen, v.29, n.4, p.225-235, 1994.
50. ROBERTS, A.B. *et al.* Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. **Proc Nat Acad Sci**, Washington, v.82, p.119-123, 1985.
51. ROSEN, V., THIES, R.S. **The cellular and molecular basis of bone formation and repair**. Heidelberg: Springer, c1995.
52. SASANO, Y. *et al.* Subperiosteal implantation of octacalcium phosphate (OCP) stimulates both chondrogenesis and osteogenesis in the tibia but only osteogenesis in the parietal bone of a rat. **Anat Rec**, New York, v.242, n.1, p.40-46, May 1995.

53. STRATES, B.S., STOCK, A.J. CONNOLY, J.F. Skeletal repair in the aged: a preliminary study in rabbits. **Am J Med Sci**, Philadelphia, v.296, n.4, p.266-269, 1988.
54. TAGA, R., STIPP, A.C.M. **Manual prático de morfometria ao microscópio óptico**. Planejamento e desenvolvimento de um experimento. Bauru, 1994. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
55. TZIAFAS, D. *et al.* Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.40, n.10, p.883-893, 1995.
56. URIST M. Formation by autoinduction. **Science**, Washington, v.150, n.3698, p.893-899, 1965.
57. _____, STRATES, B.S. Bone morphogenetic protein. **J Dent Res**, Washington, v.50, n.6, p.1392-1406, 1971.
58. VEIS, A., SIRES, B., CLOHISY. A search for the osteogenic factor in dentin. Rat incisor dentin contains a factor stimulating rat muscle cells in vitro to incorporate sulfate into an altered proteoglycan. **Connective Tissue Res**, London, v.23, n.2-3, p.137-144, 1989.
59. VIEIRA, S. **Estatística experimental**. 2.ed. São Paulo: Atlas, 1999.
60. WARSHAWSKY, H., MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. **J Histochem Cytochem**, New York, v.15, n.9, p.542-549, Sept. 1967.

61. WEIBEL, E.R. **Stereological methods. Practical methods for biological morphometry.** London: Academic Press, 1979. v.1.
62. YEOMANS, J.D., URIST, M.R. Bone induction by descalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. **Arch Oral Biol,** Oxford, v.12, p.999-1008, 1967.

ANEXO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dados de um experimento fatorial 2x3

Comparação de 2 fatores: Tratamento e Períodos de observação.

Grupos : Controle (C) e Tratado (T).

Períodos : 30 , 60 e 90 dias

TABELA 3

Densidade de Volume de Matriz Óssea Neoformada em todos os campos histológicos medidos aleatoriamente (27 campos para cada animal)

C 30	C 60	C 90	T 30	T 60	T 90
0,000	0,481	0,444	0,630	0,870	0,889
0,019	0,389	0,500	0,426	0,333	0,852
0,278	0,241	0,111	0,685	0,778	0,574
0,222	0,074	0,537	0,759	0,778	0,722
0,019	0,259	0,704	0,463	0,352	0,778
0,241	0,296	0,074	0,722	0,667	0,463
0,019	0,185	0,519	0,407	0,481	0,704
0,463	0,019	0,407	0,056	0,333	0,704
0,296	0,259	0,333	0,370	0,630	0,537
0,296	0,130	0,593	0,907	0,759	0,667
0,185	0,574	0,593	0,870	0,630	0,611
0,630	0,519	0,333	0,870	0,593	0,444
0,574	0,278	0,130	0,870	0,667	0,630
0,315	0,870	0,537	0,833	0,870	0,500
0,241	0,259	0,593	0,889	0,389	0,796
0,352	0,630	0,296	0,704	0,759	0,519
0,111	0,241	0,241	0,704	0,907	0,648
0,352	0,333	0,444	0,463	0,778	0,759
0,574	0,407	0,500	0,889	0,537	0,852
0,556	0,111	0,704	0,704	0,500	0,574
0,685	0,296	0,463	0,815	0,426	0,389
0,685	0,259	0,444	0,907	0,667	0,278
0,537	0,148	0,463	0,796	0,556	0,333
0,593	0,111	0,870	0,778	0,889	0,722
0,519	0,204	0,574	0,963	0,426	0,389
0,537	0,519	0,593	0,556	0,778	0,407
0,407	0,315	0,463	0,537	0,722	0,741