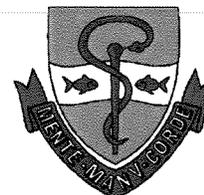


UNICAMP



JOSÉ RODRIGUES LAUREANO FILHO

CIRURGIÃO-DENTISTA

COMPARAÇÃO ENTRE A MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA E A
POLIURETANA DERIVADA DO ÓLEO DA MAMONA SOBRE O
PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA. ESTUDO HISTOLÓGICO
E HISTOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE COELHOS.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Doutor em Clínica
Odontológica - Área de Cirurgia.

Piracicaba – SP
2001

i

TEB81700E



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CIRCULANTE

UNIDADE DC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
L 373 c
V. Ex.
TOMBO BC/ 46206
PROC. 16-392101
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 13/09/01
N.º CPD

CM00159504-9

JOSÉ RODRIGUES LAUREANO FILHO

CIRURGIÃO-DENTISTA

COMPARAÇÃO ENTRE A MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA E A POLIURETANA DERIVADA DO ÓLEO DA MAMONA SOBRE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA. ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE COELHOS.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica - Área de Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa

Banca examinadora: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro

Prof. Dr. Luis Augusto Passeri

Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira

Faculdade de Odontologia de Piracicaba /Unicamp

Piracicaba – SP
2001

iii

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG. 21 / 08 / 2001

Assinatura do Orientador

Ficha Catalográfica

L373c

Laureano Filho, José Rodrigues.

Comparação entre a matriz óssea desmineralizada e a poliuretano derivada do óleo da mamona sobre o processo de regeneração óssea. Estudo histológico e histométrico em calvária de coelhos. / José Rodrigues Laureano Filho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001. xv, 106p. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa.

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

1. Ossos – Regeneração. 2. Indução. 3. Resinas. 4. Microscopia ótica. I. Barbosa, José Ricardo de Albergaria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 29 de Junho de 2001, considerou o candidato JOSÉ RODRIGUES LAUREANO FILHO aprovado.

1. Prof. Dr. JOSE RICARDO DE ALBERGARIA BARBOSA

2. Prof. Dr. ADALBERTO LUIZ ROSA

3. Prof. Dr. ROBERTO HENRIQUE BARBEIRO

4. Prof. Dr. LUIS AUGUSTO PASSERI

5. Prof. Dr. ROGER WILLIAM FERNANDES MOREIRA

DEDICATÓRIA

**A DEUS, por me possibilitar chegar até aqui com saúde,
alegria e vontade de vencer.**

**Aos meus pais, Laureano e Laís, pela amor e dedicação
destinado aos seus filhos em todos os momentos. Dedico este
trabalho por serem os responsáveis pela minha maior formação:
o caráter.**

AGRADECIMENTOS

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (Fapesp) pela bolsa concedida para realização deste Trabalho.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA /Unicamp por possibilitar realização deste Curso de Pós-Graduação;

Ao **Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DE ALBERGARIA BARBOSA**, pela orientação, estímulo e amizade, primordiais na execução desta Tese;

Ao **Prof. Dr. LUIS AUGUSTO PASSERI**, pela oportunidade e pelos ensinamentos nestes quatro anos em Piracicaba;

Aos Professores **Drs. RENATO MAZZONETTO, MÁRCIO DE MORAES e ROGER WILLIAM FERNANDES MOREIRA**, pela amizade e ensinamentos valiosos transmitidos em todo o decorrer do curso;

Aos Professores **PEDRO DUARTE NOVAES, ENILSON ANTONIO SALLUM e RALF GOBBO LIZA**, pela contribuição para a melhoria deste trabalho no exame de qualificação;

À **PROF^a. DR^a. ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY**,
pelo incentivo, apoio e amizade durante todo o período do Curso de Pós-Graduação;

À **MARIA APARECIDA SANTIAGO VARELA e IVANI
ODAS DEMETRIO**, pela ajuda na análise histológica deste trabalho;

A **ROBERTO NATALINO RICARTE e KARINA
GORTTADELLO ZECCHIN**, pela disponibilidade e colaboração na análise
histométrica deste trabalho;

A **MARCELO CORRÊA ALVES**, pela ajuda na análise estatística
deste trabalho;

Ao **Prof. EMANUEL DIAS DE OLIVEIRA E SILVA**, por agir como um
pai para mim no âmbito da Cirurgia Bucomaxilofacial;

Aos **PROFESSORES DO CURSO DE ODONTOLOGIA
DA UFPE**, pela contribuição no aprendizado durante a Graduação;

Aos **PROFESSORES DA DISCIPLINA DE CIRURGIA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE
PERNAMBUCO FOP/UPE**, pela amizade e apoio na realização deste Curso
de Pós-Graduação;

Aos meus amigos e companheiros do curso de pós graduação:
ALEXANDRE, DINHO, EIDER, LUISÃO, ROBSON, ADRIANO,
ALESSANDRO, ALEYSSON, LILIANE e SANDRA pela família
formada durante o convívio em Piracicaba;

As funcionárias **EDILAINE, MAÍRA,** e **SUELI** e ao estagiário
DANIEL, pela ajuda no nosso trabalho diário no Centro Cirúrgico da FOP.

Aos meus amigos de apartamento **BRUNO, PAULO e ROBSON,**
pela excelente convivência ao longo deste período e pela forte amizade que hoje
temos.

Aos meus irmãos **FRED, GERMANA e EDUARDO,** pela união,
amizade e companheirismo, razão de orgulho para mim;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste
trabalho, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

<u>Capítulos</u>	<u>Páginas</u>
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 - INTRODUÇÃO	5
2 - REVISÃO DA LITERATURA	13
3 - PROPOSIÇÃO	45
4 - METODOLOGIA	47
5 – RESULTADOS	57
6 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	77
7 – CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE	105

RESUMO

O presente estudo destinou-se a analisar histológica e histometricamente o efeito de uma matriz óssea desmineralizada de origem humana e de uma resina poliuretana derivada do óleo da mamona, sobre o processo de regeneração óssea.

Para isto foram utilizado a calvária de 24 coelhos, onde foram preparadas duas cavidades ósseas cirúrgicas, sendo uma do lado direito e a outra do lado esquerdo da sutura parietal. Estes animais foram divididos em dois grupos. No primeiro a cavidade experimental (lado direito) foi preenchida com a matriz óssea desmineralizada de origem humana, enquanto no segundo esta foi preenchida com a poliuretana derivada do óleo da mamona. As cavidades de controle foram preenchidas apenas com o sangue do animal. Os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 04, 07 e 15 semanas. A análise das amostras sob microscopia óptica revelou que a neoformação óssea foi favorecida tanto no grupo do Osso Desmineralizado quanto no grupo do Polímero de Mamona em relação ao grupo controle. Em ambos os grupos observou-se reabsorção de todo material no último período de observação. A análise estatística, realizada com base nos dados da histometria, mostrou uma maior neoformação óssea dos grupos Polímero de Mamona e Osso Desmineralizado em relação ao controle, não havendo diferença estatística quando da comparação entre os grupos.

Unitermos: matriz óssea desmineralizada, regeneração óssea, osseocondução, polímero de mamona.

ABSTRACT

The aim of this study was to histologically and histometrically evaluate the effect of a human demineralized bone matrix and a polyurethane resin derived from the Castor Bean oil on the bone regeneration process. For this, calvarias of 24 rabbits were submitted to two surgical bone defects, one on the right and the other on the left side of the parietal suture. The animals were divided into two groups. In the first group, the experimental defect (right side) was treated with a human demineralized bone matrix, while the experimental defect, in the other group, was treated with the polyurethane resin derived from the Castor Bean oil. The control defect was filled with the animal's own blood. The animals were killed after a subsequent period of 4, 7, and 15 weeks. A histologic analysis of the specimens under light microscopy revealed that the bone regeneration was favored in both the demineralized bone group and the Castor Bean polymer group, in relation to the control group. In addition, resorption of the material was observed completely at the end of the last observation period for both experimental groups. A statistic analysis based on histometric data showed greater bone regeneration for the polymer castor bean group and the demineralized bone group, in relation to the control. There was no statistical difference between the experimental groups.

Keywords: demineralized bone matrix, bone regeneration, osteoconduction, castor bean polymer.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo possui uma alta capacidade de regeneração espontânea quando lesionado, repondo, depois de um breve intervalo de tempo, toda a porção perdida (TAGA *et al.*, 1997). No entanto, em alguns casos de defeitos ósseos, às vezes extensos, que não têm a capacidade de se reparem espontaneamente, há a necessidade do uso de diversas técnicas cirúrgicas na tentativa da regeneração óssea (RESTREPO *et al.*, 1998).

Normalmente, estes defeitos são resultantes de traumatismos, infecções, tumores e outras patologias adquiridas ou mesmo congênitas. Na odontologia, ainda podemos acrescentar a perda precoce dos elementos dentários (DAHLIN, 1996; FIORELLINI & NEVINS, 1996). Estes defeitos ósseos sempre se constituíram problemas de difícil solução (FIORELLINI & NEVINS, 1996; SIGURDSSON *et al.*, 1996; TAGA *et al.*, 1997; RESTREPO *et al.*, 1998) e desafiantes para a comunidade cirúrgica e ortopédica (DAHLIN, 1996).

Para utilização clínica, o substituto ósseo ideal deverá ser biocompatível, ter boas propriedades mecânicas e demonstrar osseoindução, ou pelo menos osseocondução (DUPOIRIEUX *et al.*, 1994). Independente do substituto ósseo a ser utilizado, este deverá promover a neoformação óssea, de acordo com BUCKLEY(1994), por três mecanismos isoladamente ou em associação: osseocondução, osseoindução e regeneração tecidual guiada. GARBIN & GARBIN(1994) definiram osseocondução como o processo onde, o osso cresce por aposição a partir de um tecido ósseo já existente, e osseoindução quando ocorre formação de osso a partir de diferenciações e alterações celulares. A regeneração tecidual guiada consiste, segundo DAHLIN (1996),

na exclusão de células não desejáveis por meio de uma barreira artificial, impedindo que o tecido conjuntivo, por meio do periósteo, ocupe a área. Permitindo, assim, a regeneração da região.

Atualmente não existe um material ideal, pois os ossos autógeno, liofilizado e desmineralizado e os biomateriais apresentam vantagens e desvantagens (BOYNE, 1973). Os enxertos ósseos aparecem como a melhor opção para a maioria dos casos, qualquer que seja o tipo, autógeno ou homogêneo (ELLIS & SINN, 1993). Os autógenos têm as desvantagens de sua fonte não ser inesgotável e sua obtenção exigir uma abordagem cirúrgica da zona doadora, com todos os riscos inerentes a uma cirurgia, tais como: perda excessiva de sangue, pneumotórax, infecção da ferida, dor, parestesia, cicatrizes e dificuldade de movimentação (YAMAMOTO *et al.*, 1993). Porém, é o que apresenta maior poder osteogênico e, quando disponível, provavelmente é o material de escolha (BOYNE, 1973; DUPOIRIEUX *et al.*, 1994).

Os ossos homogêneos requerem equipamentos, técnicas especializadas de preparo. Este fato dificulta a sua disponibilidade a maioria dos cirurgiões (IGNÁCIO *et al.*, 1996). A utilização do enxerto ósseo na reconstrução de tecidos perdidos é muito antiga, tendo como marco os relatos de SENN (1889), que observou que o enxerto desmineralizado de tíbia de boi, em defeitos cirúrgicos na calvária de cães, ajudaria na neoformação óssea. Contudo, o entendimento da indução da formação óssea só foi possível a partir dos estudos de URIST, em 1965, que avaliou a neoformação do tecido ósseo a partir de enxertos de diferentes preparações de osso congelado, seco e desmineralizado em bolsas intramusculares de diversos animais. Baseado nos resultados destes trabalhos, houve o aumento do interesse de avaliar ou testar diferentes tipos de materiais que poderiam atuar como substitutos ósseos

(SHIGEYAMA *et al.*, 1995). YAMAMOTO *et al.*, em 1993, relacionaram à existência de propriedades osteogênicas nos materiais artificiais ou sintéticos indicados na substituição do tecido ósseo, à obtenção de êxito.

Nos anos 80, a única forma de se obter sucesso na restauração de um defeito ósseo dos maxilares era a utilização do enxerto de osso autógeno, geralmente retirado da crista ilíaca ou costela (FRAME, 1980). Apesar de o osso autógeno ser o melhor material para o enxerto ósseo (ARMES *et al.*, 1981; DRURY & YUKNA, 1991; FRAME, 1980; GLOWACKI *et al.*, 1981; PIATTELLI *et al.*, 1996), têm sido propostos para evitar a morbidade do sítio do doador e aumento do tempo operatório (DUPOIRIEUX *et al.*, 1994).

O tratamento das lesões ósseas com partículas de matriz liofilizada de origem humana é uma alternativa na terapia da regeneração periodontal, combinadas ou não com membranas (DUPOIRIEUX *et al.*, 1994), no preenchimento de defeitos ósseos adjacentes a implantes dentários (SHANAMAN, 1992).

Os enxertos ósseos liofilizados e desmineralizados promovem a regeneração nos defeitos ósseos e por induzir e/ou conduzir a neoformação óssea, e apresentam um baixo poder antigênico, já que a própria liofilização diminui a antigenicidade (FREEMAN & TURNBULL, 1977). Porém, o tamanho de suas partículas limita a quantidade de aposição coronal do osso disponível em defeitos horizontais e qualquer pressão leve do tecido pode deslocar o material enxertado (SHIGEYAMA *et al.*, 1995). O seu alto custo, a dificuldade de obtenção de osso humano viável em quantidade, associado à proibição em vários países da comercialização de produtos de tecidos humanos, e a possibilidade de transmissão de doenças, limitam seu uso (TAGA *et al.*, 1997). Em virtude destas dificuldades, a ciência busca materiais e/ou técnicas que

venham a possibilitar a formação do osso a partir de um substrato ósseo preexistente, ou a osseoindução por células de outros tecidos (BALHSI & MAGID, 1995).

As proteínas ósseas morfogenéticas são substâncias que induzem a formação óssea. Elas são produzidas por clonagem de genes de moléculas de proteínas ósseas existentes no corpo humano, como a BMP-1, BMP-2 e BMP-3 e Osteogenin (BOYNE *et al.*, 1997). Diferentes tipos da proteína óssea morfogenética recombinante de humano foram desenvolvidas, mas o tipo que tem mostrado melhores resultados na neoformação óssea é o rhBMP-2 (HOWELL *et al.*, 1995; NEVINS *et al.*, 1996; SIGURDSSON *et al.*, 1996; BOYNE *et al.*, 1997). TAKAHASHI (2000) afirma que o rhBMP-2 apresenta a capacidade de promover a neoformação óssea em sítio heterotópico, consequência da indução da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e condroblastos. Vários estudos foram realizados para avaliar a osseoindução e osseocondução da rhBMP-2 em diversas áreas da odontologia e medicina, como em levantamento do seio maxilar (BOYNE *et al.*, 1997; NEVINS *et al.*, 1996), na regeneração periodontal (SIGURDSSON *et al.*, 1996), na reconstrução mandibular (TORIUMI *et al.*, 1991), na utilização de implantes endósseos (HOWELL *et al.*, 1995), no tratamento do traumatismo ortopédico e na fusão espinal (FIORELLINI & NEVINS, 1996). Todos esses estudos mostraram bons resultados na neoformação óssea. COCHRAN *et al.*, em 2000, observaram resultados satisfatórios da rhBMP-2 em esponja absorvível de colágeno quando utilizados em alvéolos e rebordos atróficos de humanos, após um acompanhamento de três anos.

Outra forma de induzir a neoformação óssea é a utilização de plasma enriquecido de plaquetas que, por possuir fatores de crescimento, é uma ferramenta

capaz de uma neoformação óssea em maior quantidade e melhor qualidade quando utilizado (MARX *et al.*, 1998).

Em virtude da limitação e desvantagens para a obtenção do osso autógeno e, por outro lado, da dificuldade de preparação dos ossos liofilizados e obtenção das proteínas ósseas morfogenéticas, surge a necessidade de métodos alternativos, dentre os quais estão os biomateriais (IGNÁCIO *et al.*, 1996). Os biomateriais são materiais sintéticos desenvolvidos para uso biológico, através de estudos nas áreas da química, da biologia, da engenharia, da medicina e da odontologia (CARVALHO *et al.*, 1997a). Mais especificamente, a classe odontológica tem tido nos últimos anos uma preocupação constante na busca de novos materiais biocompatíveis e inócuos aos organismos, voltados para a reconstrução e regeneração de defeitos ósseos, e que promovam leitos viáveis para receber implantes, pinos, redes metálicas, placas, parafusos e outros (ROBERTS *et al.*, 1984; SCHIMITT-FOURNIE *et al.*, 1989).

De acordo com IGNÁCIO *et al.*, em 1996, o material ideal deve ser biocompatível, não tóxico, não carcinogênico, estável química e biologicamente, o mais parecido possível com o tecido vivo, de modo que o organismo o reconheça como parte de sua estrutura e não como corpo estranho agressor, que estimule a regeneração tecidual normal, além de versátil e de baixo custo.

Dentre os biomateriais empregados na áreas médica e odontológica destacam-se os metais, as cerâmicas e os polímeros (IGNÁCIO *et al.*, 1997). Com relação aos polímeros, existe uma grande variedade com sua utilização comprovada cientificamente e indicação precisa no ser humano como o polimetilmetacrilato, o politetrafluoretileno, o polietileno, o poliéster e o silicone (OHARA *et al.*, 1995).

Em 1984, o grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo desenvolveu uma resina poliuretana de origem vegetal extraída do óleo da mamona (*Ricinus comunis*). As resinas poliuretanas vegetais são produtos substitutivos alternativos de polióis e pré-polímeros sintetizados a partir de moléculas derivadas de ácidos graxos vegetais (OHARA *et al.*, 1995; IGNÁCIO *et al.*, 1997). Os polímeros poliuretanos possuem como vantagens a processabilidade, flexibilidade de formulação, ausência de emissão de irritantes ou vapores tóxicos (OTA, 1989), além da biocompatibilidade (OTA, 1989; BAKKER *et al.*, 1990; OHARA *et al.*, 1995). HENNING *et al.* (1989) observaram a biocalcificação *in vivo* e *in vitro* das resinas poliuretanas.

O polímero poliuretano da mamona mostrou-se biocompatível (OHARA *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1996; TEÓFILO *et al.*, 1996; VILARINHO *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 1997). Os diversos tipos de polímero do *Ricinus comunis*, têm sido utilizados como detergente intracanal (FERREIRA *et al.*, 1996), como material de reconstrução óssea (OHARA *et al.*, 1995), como cimento de preenchimento em defeitos ósseos (IGNÁCIO, 1996). Além de sua utilização na regeneração óssea guiada através das membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis, pinos de fixação das membranas e substitutos ósseos (CHIERICI, 2000).

TEÓFILO *et al.*, 1996 observaram a osseointegração deste polímero e OLIVEIRA *et al.*, 1995, relataram a reabsorção e a substituição do polímero por tecido ósseo. De acordo com IGNÁCIO *et al.*, em 1997, esta formação de osso ocorre em virtude da propriedade de osseocondução que o material apresenta.

Embora, a regeneração óssea seja um assunto bem pesquisado na área de saúde, a efetividade dos biopolímeros em promover osseocondução e osseoindução é bastante questionável.

REVISÃO DE LITERATURA

URIST(1965) descreveu uma “nova teoria” de formação óssea e a intitulou de autoindução. Este processo que consiste na formação do tecido ósseo a partir de células mesenquimais indiferenciadas, que só foi elucidado pelo autor após 70 experimentos com matriz óssea acelular desvitalizada e descalcificada em quase 300 animais, demonstrando evidências a favor da teoria da osseoindução. As matrizes ósseas desmineralizadas em diferentes tipos de ácido, foram implantadas em 250 bolsas intramusculares de 250 coelhos, 20 ratos, 10 camundongos, 5 cobaias. Estas, ainda foram colocadas em defeitos ósseos na ulna de 10 coelhos, na vértebra lombar de 3 cães, e em deformidades esqueléticas de 21 humanos. As matrizes ósseas implantadas foram avaliadas através de análises radiográficas e histológicas. Os resultados mostram que a neoformação óssea foi iniciada em torno de 4 a 6 semanas após o implante das matrizes. A partir de 8 a 16 semanas era observado osso neoformado a partir do tecido conjuntivo, associado à vascularização, calcificação e reposição de cartilagem tipicamente de ossificação endocondral. As células osteogênicas haviam se derivado de células pluripotentes proliferadas do sítio receptor e não do enxerto. Quando desmineralizada em HCl, a matriz óssea mostrou ser um excelente substituto para o enxerto ósseo.

Em 1972, REDDI & HUGGINS descreveram o pregeneração de matriz óssea desmineralizada de osso parietal e de ossos longos de ratos adultos, e demonstraram a transformação de fibroblastos em osteoblastos, em sítio heterotópico, a partir do enxerto desta matriz em bolsas subcutâneas no abdome, tórax e púbis de ratos jovens.

O exame histológico demonstrou uma ossificação endocondral indiferentemente da origem embriológica do osso utilizado para a obtenção da matriz óssea desmineralizada. Entretanto, observou-se uma maior formação de cartilagem na matriz de osso femural, em relação à quantidade formada a partir da matriz de osso parietal. A transformação celular ocorreu exclusivamente no centro do enxerto onde a espessura apresentava-se maior. A mudança do fenótipo de fibroblastos para osteoblastos foi considerada uma transformação estável.

FRAME(1980) afirmou que o animal ideal para estudar diferentes materiais substitutos ósseos para os defeitos maxilares deveria apresentar os seguintes requisitos: a) ser barato, disponível, fácil de manipular e anestésiar; b) possuir um sítio doador com adequado volume ósseo, que permita a remoção de uma quantidade padronizada e suficiente de osso, que não possibilite regeneração espontânea ou risco de fratura; o local a ser utilizado deve possuir duas corticais e uma medular; o leito a ser testado deve ser similar, embriologicamente e fisiologicamente, aos maxilares; c) permitir avaliação e preservação do comportamento do implante, histologicamente e radiograficamente. O autor acredita que a calota craniana de coelhos apresenta a maioria destas características, principalmente por que possui uma origem intramembranosa e é composto de placas corticais separadas por uma medular, além de apresentar um padrão de regeneração similar aos maxilares.

Para determinar o tamanho ideal do defeito ósseo na calota craniana de coelhos que possibilite estudos sobre regeneração óssea, FRAME (1980) produziu 16 defeitos ósseos bicorticais na abóbada craniana de 16 coelhos *New Zealand* divididos em quatro grupos de acordo com o diâmetro da trefina utilizada (5, 10, 15 e 20mm). Os animais foram sacrificados após 24 semanas e as calotas cranianas removidas. Estas

foram avaliadas radiologicamente e histologicamente. Os resultados mostram evidências de regeneração espontânea nas cavidades confeccionadas com as trefinas de 5 e 10 mm após 24 semanas.

Com o objetivo de quantificar a osteogênese induzida pelo osso particulado desmineralizado, GLOWACKI *et al.*, em 1981 avaliaram enxertos ósseos homogêneos mineralizados ou desmineralizados, com partículas de tamanho comparável. Para isto, cavidades ósseas de 4mm foram realizadas em calvária de ratos e preenchidas com osso homogêneo particulado, osso particulado desmineralizado, cinza de osso, osso inorgânico, hidroxiapatita, ou foram deixadas vazias (controle). As cavidades do grupo controle permaneceram preenchidas por tecido fibroso mesmo após 6 meses. Quando se utilizou osso particulado desmineralizado, todas as cavidades iniciaram a regeneração óssea após 2 semanas. Os melhores resultados ocorreram com as partículas menores, provavelmente em função de apresentarem uma maior área de superfície e induzirem mais formação óssea. Quando se utilizou osso particulado mineralizado, apenas uma cavidade mostrou evidência de regeneração óssea após 6 semanas. Os outros materiais apresentaram reabsorção gradual e estavam rodeados por células multinucleadas. Os autores concluíram que este tipo de modelo pode ser útil para o estudo do ciclo de vida de células envolvidas na síntese ou na reabsorção óssea, assim como os efeitos de hormônios e drogas neste processo.

A utilização de enxerto de osso homogêneo desmineralizado foi avaliada clinicamente por MULLIKEN *et al.* (1981) em 44 pacientes com deformidades craniomaxilofaciais congênitas ou adquiridas. Três meses após a cirurgia, trinta e uma, das trinta e cinco regiões que podiam ser avaliadas clinicamente, estavam reparadas. No exame radiográfico, três das dezenove regiões avaliadas estavam reparadas antes

de três meses. Outras onze regiões estavam reparadas após seis meses; as outras cinco regiões não estavam reparadas radiograficamente após seis meses, mas estavam estáveis ao exame físico. O índice de infecção foi comparável com os índices encontrados para enxerto autógeno. A reabsorção ocorreu em quatro pacientes, um que recebeu enxerto particulado, e três que receberam enxerto córtico-medular. A biópsia obtida de quatro pacientes demonstrou ossificação endocondral. A partir destes resultados concluiu-se que o uso deste tipo de enxerto diminui o tempo de cirurgia, o tempo de recuperação e a permanência no hospital pois evita a remoção de enxerto autógeno.

A regeneração óssea em ulna de coelhos foi estudado por BOLANDER & BALIAN, em 1986, onde defeitos segmentares foram preenchidos com matriz óssea desmineralizada, matriz associada à proteínas ósseas morfogenéticas, e osso autógeno da crista ilíaca. Nenhum defeito do grupo controle apresentou regeneração óssea. Por outro lado, todos os defeitos que receberam enxerto apresentaram regeneração óssea. Nos testes biomecânicos, as ulnas que receberam matriz óssea desmineralizada e osso autógeno apresentaram-se menos resistentes que as ulnas sem defeito, mesmo após 12 semanas de pós-operatório. Entretanto, a resistência das ulnas com enxerto de matriz óssea desmineralizada e com enxerto autógeno foi similar. O grupo que se apresentou mais resistente entre os grupos que receberam enxerto foi a associação de matriz óssea desmineralizada e proteínas ósseas. A matriz óssea desmineralizada pode ser uma alternativa viável para os enxertos autógenos. A associação com proteínas ósseas morfogenéticas tornou este tipo de enxerto mais atrativo ainda.

Com objetivo de determinar o defeito ósseo ideal para o estudo de substituto ósseo SCHIMITZ & HOLLINGER(1986) ressaltaram a necessidade da utilização de um

defeito ósseo de tamanho suficiente para que não ocorra regeneração espontânea durante o tempo de vida do animal, conhecido como defeito crítico. Além disto, estudaram estes defeitos confeccionados na calvária e na mandíbula de animais de laboratório (ratos, coelhos, cães e macacos), na tentativa de determinar um melhor protocolo de pesquisa para o estudo de materiais que possam influenciar na regeneração óssea dos maxilares. Baseados em pesquisas anteriores, os autores determinaram um protocolo para testar novos materiais que estimulem esta regeneração óssea. As pesquisas devem ser iniciadas em calvárias de ratos com defeitos com 8mm de diâmetro. Estes animais são baratos e podem ser adquiridos em grande quantidade; pequena quantidade de material é necessário; além de que, materiais particulados e gelatinosos podem ser implantados sem perda do material neste tipo de defeito. Os estudos devem continuar em defeitos de 15mm de diâmetro em calota craniana de coelhos. Este tipo de defeito permite avaliar o comportamento do implante com relação a habilidade de adaptar-se ao defeito. As pesquisas são finalizadas em defeitos de descontinuidade em mandíbulas de cães ou de primatas não humanos. Este defeito possibilita a avaliação de materiais de formação óssea numa área funcional como a mandíbula; permite a comparação da taxa de regeneração do material e o osso esponjoso medular particulado; e, por fim, analisar o material no local onde, eventualmente, será utilizado em humanos.

Depois de vários anos de estudo, e tendo realizado diversos experimentos em cães analisando a biologia dos enxertos ósseos corticais, medulares, autógenos e homogêneos, GOLDBERG & STEVENSON (1987), publicaram um trabalho descrevendo a sequência de eventos biológicos e o destino destes enxertos ósseos. Um enxerto ósseo de qualquer natureza, até a sua incorporação final, passa por diferentes fases

que são didaticamente divididas em inflamação, revascularização, osseoindução, osseocondução, e finalmente remodelação para formar uma estrutura biológica e mecanicamente viável. O osso autógeno medular foi o enxerto mais apropriado para diversas situações, pois o mesmo apresentou a melhor combinação entre estas fases. A sua primeira vantagem é ausência de antigenicidade e conseqüentemente pequena inflamação. A menor densidade do osso medular em relação ao autógeno cortical facilitou a revascularização. A maior área de superfície e o maior número de células osteogênicas aumentaram o seu potencial de osseoindução e osseocondução. Todos estes fatores permitiram uma remodelação em tempo menor e tornaram o enxerto autógeno medular a estrutura mais eficiente na reconstrução de defeitos ósseos.

MARINAK *et al.*, em 1989, testaram a osseoindução de matrizes ósseas desmineralizadas, de origem humana, preparadas por dois métodos diferentes, em sítio heterotópico de ratos. No grupo I, o osso humano particulado foi desmineralizado pelo protocolo descrito por REDDI & HUGGINS, em 1972, enquanto no grupo II a desmineralização foi realizada com o método descrito por URIST (1965). No grupo III utilizou-se osso mineralizado e o grupo IV recebeu hidroxiapatita. Todos os grupos receberam volumes semelhantes de material na região ventral e torácica. Os resultados, da análise espectrofotométrica, indicaram a descalcificação das duas preparações. A percentagem de área de neoformação óssea foi estatisticamente maior no grupo I que no grupo II. Entretanto, a formação óssea em ambos os grupos foi menor que 5% do volume total do enxerto. Isto significa que é escassa a indução de formação óssea pelo osso desmineralizado preparado nos dois tipos de métodos. O osso mineralizado e a hidroxiapatita não induziram a formação óssea extraesquelética. O protocolo descrito por REDDI & HUGGINS, em 1972 ofereceu vantagens em relação ao

de URIST (1965), em função da facilidade de regeneração e do maior potencial de osseoindução.

Existem evidências que sugerem um maior poder osseointutor das matrizes ósseas desmineralizadas obtidas de animais jovens. Com o intuito de determinar as possíveis implicações clínicas deste fato na utilização destes materiais como enxertos ósseos, JERGESEN *et al.*, em 1991, avaliaram o efeito da idade do animal doador na capacidade de indução de formação de cartilagem e tecido ósseo pelo osso desmineralizado particulado. Três grupos de ratos doadores de idades diferentes foram utilizados neste estudo. A matriz óssea desmineralizada foi preparada e implantada na região torácica de ratos. A indução óssea diminuiu com o aumento da idade do receptor. O mecanismo responsável por este fato é desconhecido. O osso desmineralizado particulado de animais velhos mostrou-se mais osseointutivo, o que vai contrapor-se a afirmativa de matrizes mais jovens são mais osseointutivas. Quando utilizou-se osso desmineralizado de animais doadores de oito meses em animais receptores de um mês houve a maior quantidade de osseoindução.

O processo de formação óssea pode ocorrer tanto através de ossificação endocondral, quando um arcabouço de cartilagem hialina é substituído pelo tecido ósseo, quanto através de ossificação intramembranosa, onde o tecido ósseo substitui o tecido conjuntivo sem formação de cartilagem. ISAKSSON & ALBERIUS, em 1992, realizaram um estudo com o objetivo de diferenciar o comportamento dos enxertos ósseos de origem embriológica distinta. O grupo I teve as cavidades preenchidas com matriz óssea desmineralizada de calvária. No grupo II as cavidades foram preenchidas com matriz óssea desmineralizada de tibia. O início da regeneração óssea foi bastante similar entre os grupos. Nas cavidades do grupo controle houve uma aposição óssea

limitada à periferia. Após 15 semanas as cavidades controle estavam parcialmente reparadas com osso irregular. O grupo que recebeu osso autógeno teve a cavidade totalmente coberta, com revitalização de alguns fragmentos incompleta. Os grupos que receberam matriz óssea apresentaram as cavidades recobertas com osso imaturo, trabecular e com largos espaços medulares. O grupo controle mostrava regeneração marginal mínima e após 15 semanas havia zonas periféricas de deposição óssea. O grupo de enxerto autógeno mostrava fragmentos mineralizados distintos com fusão restrita e após 15 semanas mostrava uma aparência granular assim como o grupo de matriz endocondral, já o grupo de matriz de osso intramembranoso apresentava uma imagem homogênea similar ao osso adjacente. A capacidade osseointegrativa da matriz óssea desmineralizada foi demonstrada claramente em ambas origens, em função de ter acelerado significativamente o processo de regeneração em relação aos grupos controle e de enxerto mineralizado. A matriz de osso intramembranoso demonstrou ser levemente melhor na regeneração inicial, apesar de a densidade trabecular entre os dois grupos parecer similar, isto levanta a hipótese de que existem variações na composição de agentes osteogênicos estruturais locais.

SMETANA Jr *et al.*, em 1992, avaliaram as propriedades biológicas, biodegradação e atuação na regeneração de defeitos ósseos, do polímero sintético p(HEMA), ou seja, poli (2-hidroxi-eti metacrilato), puro ou associado a colágeno, em relação ao enxerto de matriz óssea desmineralizada. Os materiais foram testados em cães e cobaias, mas não houve diferenças de biocompatibilidade nos dois grupos de animais. O p(HEMA) inibiu a regeneração óssea em todas áreas de implantação. A associação de p(HEMA) e colágeno não desenvolveu reação do tipo corpo estranho, pois não estava rodeado por tecido fibroso. Além disso, a mineralização ao redor deste

implante sugeriu um processo de regeneração óssea. A região periférica da matriz óssea desmineralizada foi reabsorvida e substituída pelo osso neoformado. Os resultados sugeriram que uma pequena quantidade de colágeno foi capaz de mudar as propriedades biológicas do composto de polímeros. O estudo deste composto pode levar ao desenvolvimento de novos materiais para implantes.

O osso desmineralizado particulado apresenta difícil aplicação em relação ao fato de as partículas se dispersarem no decorrer da cirurgia e do pós-operatório. A utilização de algum veículo que não interfira na osseoindução poderia ser útil nestes casos. Desta forma, em 1992, SOLHEIM *et al.*, avaliaram, através de radiografias e método histológico, a regeneração óssea em cavidades ósseas cirúrgicas na calvária de ratos após seu preenchimento com um poli-orto-éster biocompatível, osso desmineralizado, ou uma associação destes materiais. Todas as cavidades preenchidas com osso desmineralizado ou com sua associação ao poli-orto-éster apresentaram osseoindução em 2 ou 3 semanas, e neoformação óssea em toda cavidade após 4 semanas, sem diferença significativa entre os grupos. Nenhuma cavidade do grupo controle ou do grupo de poli-orto-éster apresentou neoformação óssea durante o período de observação. As cavidades que foram preenchidas com poli-orto-éster ou sua associação com osso desmineralizado apresentaram sinais leves de inflamação no período de 2 semanas, com presença de monócitos e algumas células gigantes. Já as cavidades do grupo controle e as que foram preenchidas apenas com osso desmineralizado apresentaram sinais mais suaves de inflamação sem presença de células gigantes. A neoformação óssea ocorreu em todas as regiões e não de forma centrípeta, o que aliado à presença de cartilagem na segunda semana sugere a presença de osseoindução. O composto testado neste estudo foi tecnicamente mais

fácil de ser utilizado que o osso desmineralizado sozinho, pois podia ser adaptado à cavidade mantendo o contorno, e apesar disso não interferiu na osseoindução nem causou inflamação significativa.

De acordo com PETIT & RIPAMONTI, em 1994, a regeneração de cavidades ósseas em calvária de mamíferos adultos é impossibilitado mais pela intrusão de tecidos não osteogênicos que impedem a deposição óssea a partir das margens das cavidades do que pela escassez de capacidade regenerativa da área. Desta forma, os autores aplicaram a estratégia da regeneração tecidual guiada em cavidades ósseas cirúrgicas de tamanho crítico na calvária de babuínos adultos no intuito de avaliar se a segregação tecidual facilitaria a regeneração óssea neste tipo de experimento. Os resultados deste estudo indicaram que os ossos membranosos da calvária de primatas adultos apresentam potencial para regeneração em grandes defeitos. A maior razão para não ocorrer regeneração é a intrusão de células não osteogênicas. Apesar de ter ocorrido deposição óssea nas cavidades protegidas com a barreira, o tratamento mais efetivo foi o preenchimento da cavidade com matriz óssea desmineralizada.

Preocupados com a possível ação deletéria de alguns métodos de esterilização em enxertos ósseos, DUPOIRIEUX *et al.*, em 1994, estudaram o efeito da esterilização através de óxido de etileno e de autoclave em discos de matriz óssea desmineralizada, e implantes de coralina natural porosa, que foram utilizados no preenchimento de cavidades ósseas cirúrgicas na calvária de ratos adultos. Não houve formação óssea no grupo controle onde as cavidades foram preenchidas apenas por sangue do animal demonstrando que apresentavam tamanho crítico, e não podiam se reparar espontaneamente. A esterilização em autoclave prejudicou a revascularização dos enxertos desmineralizados, diferentemente dos enxertos esterilizados em óxido de

etileno que apresentaram uma integração perfeita com o leito receptor e regeneração óssea completo em 50% das amostras. Os resultados com os implantes de coralina foram desapontadores, pois apresentaram com mobilidade duas vezes maior que os enxertos de matriz óssea desmineralizada esterilizados em óxido de etileno. Este estudo confirmou que a esterilização através de óxido de etileno não promove efeitos adversos na matriz óssea desmineralizada, preservando seu potencial osteogênico, e demonstrou que este tipo de enxerto é mais favorável ao regeneração óssea quando comparado aos corais.

Com objetivo de avaliar o potencial osseoindução, BECKER *et al.*(1995) compararam o enxerto de osso autógeno e osso desmineralizado congelado e seco, associado a membrana, em defeitos peimplantares realizados em mandíbulas de cães. Estes defeitos foram divididos em quatro grupos: controle, membrana, osso autógeno e membrana, osso desmineralizado e membrana. Após 12 semanas os cães foram sacrificados e as regiões periimplantares foram avaliadas clinicamente e histologicamente. Os resultados mostraram uma neoformação óssea no grupo controle de 37% do defeito, quando foi utilizado apenas membrana foi de 80%, osso autógeno associado a membrana formou 95% do defeito periimplantar e, quando utilizou-se membrana com osso desmineralizado congelado e seco a neoformação foi de 75%.

ZAMBONIN & GRANO(1995) realizaram um estudo *in vitro* com objetivo de identificar e analisar, através de parâmetros específicos, a atividade osteoblástica frente a três diferentes biomateriais. Nesta pesquisa foram comparados duas hidroxiapatitas (Ceros 80 e Ostilit) e uma matriz óssea demineralizada de origem bovina. Estes materiais foram expostos a uma pregeneração de células osteoblásticas humanas removidas de uma exostose de um paciente com 10 anos de idade. Os resultados

mostraram efeitos similares das hidroxiapatitas testadas. Ambas retardaram o crescimento da célula osteoblástica, porém sem levar nenhum dano à célula. As duas ainda estimularam a síntese de colágeno. A matriz óssea desmineralizada de origem bovina apresentou melhores resultados que as duas anteriores, promovendo um aumento na proliferação osteoblástica e na síntese de colágeno. Segundo os autores estes resultados credenciam esta matriz óssea desmineralizada de origem bovina para o preenchimento de cavidades cirúrgicas com o intuito de regeneração óssea.

Segundo BARBOSA & LIMA, em 1996, o osso humano desmineralizado a ser utilizado em procedimentos cirúrgicos odontológicos deve proceder somente de bancos de tecidos credenciados pela Associação Americana de Bancos de Tecidos que é supervisionada pela Food and Drug e Administration(FDA). Assim, a possibilidade de transferência de agentes infecciosos através do enxerto torna-se desprezível.

PIATELLI *et al.*(1996) avaliaram a regeneração óssea de enxertos homogêneos no tratamento de defeitos ósseos associados a implantes em humanos, comparando, através de análises histológica e histométrica, o enxerto ósseo desmineralizado congelado e seco e o enxerto ósseo mineralizado congelado e seco. Para isto, 8 pacientes foram divididos em dois grupos. No primeiro grupo foi utilizado o enxerto ósseo desmineralizado congelado e seco e no segundo, o enxerto ósseo mineralizado congelado e seco. Ambos foram colocados ao redor de implantes e cobertos por membrana. Após 6 meses, na reabertura, uma pequena quantidade óssea ao redor do implante foi colhida e processada para avaliação histológica. Os resultados mostraram um processo lento de reabsorção óssea, no enxerto mineralizado e uma reabsorção mais visível no desmineralizado. As partículas do enxerto mineralizado apresentaram-se envolvidas por osso neoformado, enquanto que, no desmineralizado, as partículas

foram envolvidas por tecido conectivo celular composto principalmente por fibras colágenas. No enxerto mineralizado as lacunas osteocíticas estavam preenchidas por osteócitos e em algumas áreas sistemas de Havers com capilares centrais foram encontrados. No desmineralizado, na maior parte, as lacunas osteocíticas estavam vazias. Ambos Os enxertos não mostraram efeitos de osseoindução, e o enxerto mineralizado mostrou maior poder de osseocondução.

RABIE & LIE KEN JIE, em 1996, estudaram a integração de enxertos ósseos autógenos de origem endocondral na presença e na ausência de matriz óssea desmineralizada. Para isto, os autores realizaram defeitos ósseos de 5X10mm na calvária de coelhos, que foram preenchidas com enxerto autógeno removido da tíbia, matriz óssea desmineralizada, uma composição de enxerto e matriz, e no grupo de controle negativo a cavidade foi deixada vazia. Osteossíntese com fio de aço foi realizada nos grupos que receberam enxerto autógeno. No grupo que recebeu apenas enxerto autógeno, focos de cartilagem foram observadas demonstrando o início da integração com as bordas de osso pré-existente. Quando a cavidade foi preenchida apenas com matriz óssea desmineralizada a análise histológica demonstrou ossificação endocondral e reabsorção das partículas originais. No grupo que recebeu tanto enxerto quanto matriz óssea desmineralizada foi observado neovascularização, neoformação óssea unindo o enxerto ao osso pré-existente. As cavidades que foram deixadas vazias estavam preenchidas apenas com tecido conjuntivo fibroso. Os resultados sugerem que em grandes defeitos ósseos a matriz óssea desmineralizada particulada pode melhorar a integração de enxertos ósseos.

A atividade osseointutiva de enxertos homogêneos de osso desmineralizado e liofilizado, disponíveis no comércio e produzidos por diferentes bancos de tecidos,

assim como de diferentes lotes do mesmo banco de tecidos, foi avaliada por SCHWARTZ *et al.*, em 1996. O propósito do trabalho era testar a hipótese de que a variabilidade de resultados clínicos poderia estar tanto em função das diferenças nas técnicas de processamento, quanto nas características dos doadores de enxerto. Para isto, 14 amostras de enxertos foram obtidos de seis diferentes bancos de ossos na mesma forma que seriam distribuídos para utilização clínica. As partículas de enxerto dos diferentes doadores foram colocadas em três camundongos por um período de 4 semanas. Os resultados demonstraram que as partículas utilizadas neste estudo apresentaram uma grande variedade na sua habilidade de promover osseointegração. Em um dos bancos um lote de enxerto foi capaz de induzir a formação óssea enquanto outro lote não demonstrou o mesmo. Isto sugere que alguns destes enxertos funcionam apenas como osseointegrador e que a marcante variabilidade entre amostras do mesmo banco de tecidos pode explicar os diferentes resultados encontrados na literatura quando se utiliza o mesmo enxerto.

LA FONTAINE & PINTO, em 1997, revisaram a literatura referente ao osso desmineralizado e liofilizado objetivando esclarecer algumas controvérsias relacionadas ao seu uso na odontologia. As indicações para se utilizar o osso desmineralizado vão desde o preenchimento de defeitos intra-ósseos, lesões de furca, e tratamento de lesões periapicais até o recobrimento de roscas de implantes expostas, fechamento de comunicações buco-sinusais e o levantamento do seio maxilar. Contudo, além da controvérsia em relação ao potencial de osseointegração do osso desmineralizado, existem idéias pré-concebidas em relação ao material como a possibilidade de transmissão de doenças, antigenicidade, heterogeneidade, protocolo de esterilização e regeneração do material. Apesar da controvérsia existente em relação a estes

assuntos o osso desmineralizado e liofilizado ainda representa uma alternativa nas situações em que o osso autógeno não está disponível, enquanto outros materiais com maior potencial de osseoindução estão sendo testados. A eficácia deste enxerto ósseo está bastante evidente na literatura e o sucesso do tratamento está relacionado a uma técnica precisa, material adequado e de origem confiável.

TAGA *et al.*, em 1997, avaliaram o potencial osteogênico de uma matriz óssea liofilizada de origem bovina (osseobond). Para isto foram confeccionadas defeitos ósseos em calvárias de 12 cobaias (*cavia porcellus*) com trefinas de 8mm de diâmetro. Estas cavidades eram parte preenchidas com o osso liofilizado, e parte com sangue do próprio animal. As cobaias foram divididas em 3 grupos de sacrifícios (1, 3 e 6 meses). A análise histológica indicou que: a) todos os defeitos ósseos preenchidos somente com coágulo sangüíneo estavam totalmente abertos e continham tecido conjuntivo fibroso; e b) nos defeitos ósseos preenchidos com a matriz óssea liofilizada, as partículas foram reabsorvidas, em quase sua totalidade já após 3 meses. Aos 6 meses o espaço da lesão estava totalmente ocupado por tecido ósseo em estado avançado de organização; em um caso desse grupo, permaneceu uma pequena abertura lateral. Resultados que permitiriam os autores concluírem que a matriz óssea liofilizada bovina tem a capacidade de estimular a formação de tecido ósseo em sítio ortotópico de cobaias.

RESTREPO *et al.*, (1998) avaliaram o potencial da matriz de osso bovino desmineralizado e liofilizado na regeneração de cavidades ósseas de 3X2mm de extensão provocadas em tibia de ratos, que foram recobertas com uma barreira biológica reabsorvível de osso bovino liofilizado. No grupo controle os defeitos ósseos foram preenchidos apenas com o coágulo sangüíneo do próprio animal. A análise

histológica dos grupos controle e de estudo após 7 dias demonstrou o início da neoformação óssea nas bordas da cavidade. Nos grupos controle de 10, 20 e 40 dias o processo de neoformação óssea permaneceu uniforme e o preenchimento da cavidade ocorreu a partir do período de 20 dias. A quantidade de tecido ósseo formado aumentou a medida em que o período para sacrifício tornou-se maior. Ao final do experimento o espaço mostrou-se com aspecto de normalidade compatível com remodelação do tecido ósseo neoformado. No grupo experimental de 7 dias, o interior da loja cirúrgica apresentou partículas de tecido amorfo lembrando osso desvitalizado com focos de reabsorção na sua superfície. No grupo experimental de 10 dias não foi notado a presença de reabsorção das partículas. As partículas de osso desvitalizado tornaram-se menores e em pequena quantidade. A neoformação óssea ocorreu em direção centrípeta preenchendo toda a cavidade após 40 dias, sem ultrapassar seu limite externo. Os autores concluíram que esta matriz de osso bovino é de fácil manuseio, reabsorvível, biocompatível, e favorece a regeneração de lesões ósseas.

GARCIA (1999) analisou histologicamente o efeito de dois tipos de matrizes ósseas desmineralizadas, sobre o processo de regeneração óssea em calvária de coelhos. Foram utilizados dezoito coelhos e em cada calvária foram preparadas duas cavidades ósseas cirúrgicas, sendo uma ao lado direito e a outra ao lado esquerdo da sutura parietal. Os animais foram divididos em dois grupos. No grupo I a cavidade experimental foi preenchida com uma matriz óssea desmineralizada de origem bovina, enquanto no grupo II a cavidade experimental foi preenchida com uma matriz óssea desmineralizada de origem humana. As cavidades de controle foram preenchidas apenas com o sangue do animal. Os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 03, 07, e 15 semanas.

A análise microscópica revelou que a neoformação óssea foi favorecida tanto no grupo I quanto no grupo II em relação ao grupo controle. No grupo I as partículas foram reabsorvidas mais rapidamente que no grupo II. Nos grupos I, II e controle a regeneração óssea foi melhor nos períodos de sacrifício mais longos.

LEWANDROWSKI *et al.*, em 1999a, investigaram a viabilidade de aumentar a regeneração óssea através da utilização do polímero de polipropileno fumarínico como substituto ósseo. Este polímero foi testado isoladamente e associado a osso autógeno e homogêneo. Para este experimento foram confeccionados defeitos em tíbias de ratos. Estes animais foram divididos em seis grupos (9 por grupo): controle, polímero, autógeno, homogêneo, polímero + autógeno, polímero + homogêneo. Os animais foram sacrificados com 1 e 4 semanas após a cirurgia e as regiões implantadas foram preparadas para as análises histológicas e histométricas. Os resultados deste estudo mostraram que os defeitos sem preenchimento (controle) não repararam. Nos grupos experimentais, uma neoformação óssea reparando, quase que completamente, o defeito foi observado após 4 semanas, quando da utilização do osso autógeno. No grupo do polímero um gradual crescimento ósseo foi observado. Quando o polímero foi associado ao osso homogêneo houve um aumento da regeneração óssea. Sendo este maior quando foi utilizado o autógeno. Os dados permitem a conclusão de que este polímero pode ser utilizado para aumentar o volume de pequenas quantidades de enxertos ósseos.

No mesmo ano, LEWANDROWSKI *et al.*^b estudaram a osseocondução frente a associação de enxertos ósseos corticais e biopolímeros. O osso cortical foi testado isoladamente (controle) e associado, ao polímero de ácido polilático e poliglicólico e ao polímero de polipropileno fumarínico. Para esta pesquisa foram utilizados tíbias de 32

ratos. Os animais foram sacrificados em dois períodos (2 e 4 semanas) de pós-operatório. As análises histológica e histométrica mostraram uma quantidade significativamente maior de neoformação óssea quando um dos polímeros foi associado ao enxerto. Porém, não houve diferença estatística significativa quando foi comparado os grupos com polímeros entre si. No grupo da associação do osso cortical com o polímero de ácido polilático e poliglicólico, o material reabsorveu em 2 semanas. Já a formulação com o polímero de polipropileno fumarínico ainda estava presente no período de 4 semanas. Os autores concluíram que a associação enxerto – polímero é boa formulação para a regeneração em defeitos ósseos; e que o polímero de ácido polilático e poliglicólico apresentou melhor comportamento quando associado a enxerto ósseo cortical, que o polímero de polipropileno fumarínico.

DUGUY *et al.* (2000), revisando a regeneração óssea com o uso de substitutos ósseos, afirmaram que o uso de materiais osseocondutor (cerâmicas bioativas) é contra-indicado na regeneração de grandes defeitos. Isto ocorre em virtude do crescimento ósseo, neste tipo de material, ser limitado a periferia do implante. Por isto, os autores sugerem a combinação de uma matriz osseocondutora com materiais osseointutores, como os fatores de crescimento para se obter uma regeneração óssea completa. Dentre as substâncias osseointutoras, os autores dão especial atenção a proteína óssea morfogenética por sua grande eficácia.

KAWCAK *et al.*, em 2000, compararam a osseointução da matriz óssea desmineralizada com o enxerto autógeno de osso medular. Neste estudo foi utilizado 8 cavalos adultos, onde foram criados defeitos circulares de 19mm na cortical externa da sexta e da oitava vértebra. Os defeitos foram divididos de forma aleatória para os grupos controle, enxerto autógeno e osso desmineralizado. Após 56 dias as vértebras

foram removidas e a região dos defeitos foram avaliados através da densidade mineral óssea, do percentual de cálcio, da análise histológica e radiográfica. Os resultados mostraram um aumento no volume do osso neoformado no grupo tratado com osso autógeno em relação ao osso desmineralizado. O grupo do osso autógeno também apresentou maior percentual de cálcio. O osso desmineralizado não mostrou nenhum tipo reação inflamatória. A regeneração óssea no defeito não foi acelerada ou melhorada quando do uso do osso desmineralizado.

RABIE & CHAY(2000) demonstraram, através de caso clínico acompanhado por 5 anos, que a associação de enxerto autógeno e uma matriz óssea desmineralizada possibilitou a regeneração de tecido ósseo perdido por trauma, com conseqüente movimentação ortodôntica para a área enxertada.

O implante de materiais porosos que promovam a osseocondução é uma das alternativas quando há a necessidade de preenchimento de um defeito ósseo. Segundo VANDERSTEENHOVEN & SPECTOR, em 1983, o tecido ósseo cresce para dentro do material poroso produzindo uma união entre a prótese implantada e o osso adjacente, que conseqüentemente resulta em estabilidade da prótese. Este tipo de alternativa é questionada quando o potencial de neoformação óssea é limitado em função dos estados patológicos, ou situações onde a quantidade de células osteogênicas é inadequada. Uma possível solução para este tipo de problema é impregnar o material poroso a ser implantado com substâncias osseindutoras. Por isso, os autores realizaram um estudo, com objetivo de determinar se partículas de matriz óssea homogênea desmineralizada poderiam induzir a formação óssea em implantes porosos de polisulfona colocados em sítios extraósseos de ratos adultos. A análise histológica demonstrou que as células mesenquimais que infiltraram os poros do implante foram

induzidas pela matriz desmineralizada a se diferenciar em condroblastos e osteoblastos. A condrogênese no grupo da associação de matriz desmineralizada com implante de polisulfona foi seguida de ossificação e produção de medula óssea. A sequência histológica da osseoindução foi a mesma observada no grupo controle que havia recebido apenas a matriz desmineralizada. Isto significa que a resposta tecidual ao implante de polisulfona não inibiu a osseoindução. Entretanto, a ossificação iniciou-se e permaneceu próxima às partículas da matriz óssea desmineralizada sem se estender para os espaços do implante poroso de polisulfona. A quantidade de osso neoformado foi relacionada à quantidade de matriz desmineralizada que foi associada.

Em 1984, o grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo desenvolveu uma resina poliuretana extraída do óleo da mamona (*Ricinus comunis* da classe dicotiledônea, da ordem geraniácea e família das *Euforbaceaes*) O óleo de mamona é na realidade um poliéster, formado por três moléculas do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-oléico, ou $C_{18}H_{34}O_3$), cada uma com um grupo hidroxila no carbono 12, propício para a polimerização por meio de ligações uretana. Os grupos hidroxila do ácido ricinoléico reagem com os grupos isocianato do pré-polímero difenilmetatandiisocianato para formar as poliuretanas, como descrito no PROJETO PADCT (1984).

HOLLINGER & SCHMITZ (1987) estudaram um copolímero, formado de ácido láctico e poliglicólico, associado a um proteolípido como uma alternativa na substituição do tecido ósseo. Para isto, foi utilizado mandíbula 25 cães *Foxhound* adultos. Em cada lado da mandíbula foi removido um segmento de espessura total. De um lado foi deixado vazio e do outro preenchido com material. Em ambos os segmentos foram fixados de forma rígida. Após 4, 8, 12, 24 e 40 semanas os cães foram sacrificados e os

segmentos mandibulares preparados para histomorfometria. Esta avaliação revelou um aumento significativo da regeneração óssea no lado experimental em relação ao controle, após 40 semanas.

Para determinar o potencial osteogênico de um substituto ósseo formado da associação de um copolímero biodegradável e um osso desmineralizado, SCHMITZ & HOLLINGER (1988) utilizaram a calota craniana de 52 coelhos *New Zealand* brancos. Foi criado um defeito, de espessura total, na calvária de cada animal com uma trefina com 15mm de diâmetro. Em metade destes coelhos(26) esta cavidade foi preenchida com o copolímero, formado pelo ácido poliláctico e poliglicólico, associado ao osso desmineralizado congelado e seco. Na outra metade dos coelhos o defeito foi deixado vazio, como grupo controle. Os animais foram sacrificados 4, 8, 12, 16, 20 e 24 semanas após o procedimento cirúrgico. Ambos os grupos foram analisados nestes períodos através de avaliação clínica, radiográfica e histomorfométrica. Os resultados mostraram que quando comparado com o controle, o grupo do copolímero associado com ao osso desmineralizado congelado e seco apresentou um significativo aumento do volume do osso trabecular. Três defeitos apresentaram formação de uma ponte óssea em 8 semanas.

KLEINSCHMIDT *et al.*(1993) estudaram o efeito de um polímero, composto de ácido poliláctico e poliglicólico, e de uma matriz óssea desmineralizada, associados ou isolados, na regeneração de cavidades cirúrgicas realizadas na calvária de coelhos. Foram utilizados 48 coelhos da raça *New zealand*, divididos em 4 grupos de tratamento e 2 períodos de sacrifício (6 e 12 semanas). Este polímero apresentava um formato de disco e foi colocado de forma a evitar o colapso do tecido mole para dentro do defeito, tanto do lado da dura máter, quanto do periósteo. Após as avaliações radiográficas,

histológicas e histomorfométrica, os resultados mostraram que a associação dos discos de polímero e matriz, promoveram uma regeneração significativamente maior, do que os grupos onde foram utilizados separadamente, no período de 6 semanas. Após 12 semanas todos os grupos apresentaram uma quantidade de regeneração significativamente maior que no período inicial. Os grupos de estudo, disco de polímero, matriz óssea desmineralizada e a associação disco e matriz, apresentaram mais regeneração óssea que o grupo controle, entretanto, não houve diferença estatisticamente significante entre estes três grupos. Porém o osso neoformado no grupo da associação parecia ser mais maduro. O benefício da utilização destes discos evitando o colapso de tecidos para dentro da cavidade associado ao seu preenchimento com matriz óssea desmineralizada foi mais significante nas primeiras seis semanas. Isto pode ser relacionado à manutenção das partículas de matriz no interior da cavidade. O contorno se apresentou melhor no grupo onde se associou a matriz óssea aos discos de polímero. Desta forma, é viável a colocação de fatores que promovam a regeneração óssea entre duas barreiras biodegradáveis para o regeneração de segmentos da calvária.

OHARA *et al* (1995) estudaram experimentalmente a biocompatibilidade da resina de mamona (*Ricinus communis*), implantada no joelho de 15 coelhos adultos da raça *New Zealand*. Este polímero foi usado de duas formas, uma com cálcio, aplicado intra-ósseo, e uma outra em forma de gel intra-articular. Os coelhos foram divididos em três grupos de acordo com o tempo de sacrifício (3, 15 e 40 dias). O corpo de prova em forma de gel foi implantado dentro da articulação do joelho esquerdo e o calcificado, em forma de cilindro de 0,5cm, foi implantado no côndilo medial do mesmo joelho. Após os sacrifícios foram retirados, por laparotomia, o fígado, baço e rins para exame

histopatológico. As articulações dos coelhos sacrificados com 3 dias apresentaram sinovite e derrame sinovial estéril, porém este quadro não foi observado nos demais grupos. Nos períodos mais tardios não apresentou características de reação inflamatória tardia ou granulomatosa, do tipo corpo estranho. O cômulo medial, no grupo A, apresentou uma reação fibrosa ao redor do implante do tipo “pseudo-encistamento”, que nos Grupos B e C, evoluiu para uma neoformação óssea, preenchendo inclusive as lacunas internas dos corpos de prova. A ausência de alterações patológicas nas vísceras demonstraram a não toxicidade da resina de mamona. Os autores concluíram que o polímero poliuretano da mamona não é tóxico, não produz reação inflamatória tardia sinovial e, quando implantada no osso, produz reação fibrosa que evolui para neoformação óssea em coelhos.

OLIVEIRA *et al.*(1995) procuraram avaliar o comportamento da poliuretana derivada do óleo da mamona como material de preenchimento na regeneração óssea. Para isto realizaram um estudo experimental comparando este biomaterial com osso autógeno. Dez coelhos *New Zealand*, de ambos os sexos, pesando aproximadamente 3,5kg foram submetidos a um procedimento cirúrgico na calvária. Após a anestesia foi realizado uma incisão na linha parietal, descolamento exposição da região. Com motor elétrico com uma trefina de 5mm de diâmetro foram realizadas duas cavidades ósseas, removendo-se o osso até a dura-máter. Em um dos lados colocou-se a poliuretana derivada do óleo da mamona e no outro foi colocado osso autógeno triturado da própria região. O sacrifício dos animais foi realizado 40 dias após a cirurgia inicial. Após avaliação histológica os autores observaram ausência de reação inflamatória e formação parcial de tecido ósseo no grupo experimental (biomaterial) em contraste com

incorporação do enxerto de osso autógeno já em fase de remodelação no grupo controle.

Em 1996, FERREIRA *et al.* avaliaram a atividade microbiana de soluções irrigadoras em dentes com necrose pulpar. Os autores comparam “in vivo” a atividade microbiana das seguintes soluções irrigadoras: gel de papaína a 0,4% (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo), detergente de mamona a 10%(Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo) e hipoclorito de sódio a 5% (Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo) em dentes com polpa necrosada com ou sem lesão periapical. Após a abertura coronária sob condições assépticas, a câmara pulpar foi lavada com soro fisiológico estéril e com cone de papel absorvente foi realizada a primeira colheita. Foi realizado o pregeneração biomecânico utilizando as soluções irrigadoras em avaliação. Após 72 horas foi realizada a segunda colheita. As amostras foram semeadas em placas com os meios ágar mitis salivarius, ágar sacarose bacitracina – SB20 e ágar sangue, e incubadas em microaerofilia pelo sistema de chama de vela durante 48 horas a 37^o C. O número de unidades formadoras de colônias foi enumerado com microscópio estereoscópico sob luz refletida. Os resultados mostraram que o detergente de mamona a 10% e o hipoclorito de sódio a 0,5% apresentaram atividades antimicrobianas semelhantes na diminuição do número de anaeróbios, *S. Mutans* e estreptococos. No entanto o gel de papaína apresentou menor atividade sobre esse microorganismos, em comparação com as demais soluções.

TEXEIRA *et al.*(1996) acrescentaram carbonato de cálcio ao polímero de Mamona com o intuito de induzir o regeneração ósseo em mandíbulas de ratos. Para isto foram confeccionados defeitos críticos com fresas cilíndricas no corpo da

mandíbula de 40 ratos. Os animais foram sacrificados em quatro períodos diferentes (15, 25, 40 e 60 dias) após a cirurgia. As mandíbulas removidas, foram submetidas ao processamento histológico e coradas com hematoxilina e eosina. Na avaliação histológica foi observada ausência de células inflamatórias e a atividade das células osteogênicas promovendo neoformação óssea. Resultados que permitem que os autores afirmem que o polímero de mamona parece ser biocompatível, sem causar efeitos deletérios ao organismo e sem formar cápsula fibrosa.

No mesmo período, VILARINHO *et al.* Avaliaram a biocompatibilidade, a possível reação inflamatória e a indução de ossificação pela presença ou não de carbonato de cálcio, do implante de resina de poliuretana vegetal (*Ricinus communis*) na câmara anterior dos olhos de camundongos. Para este estudo foram utilizados 60 olhos de camundongos machos com 60 dias de idade, submetidos aos implantes de resina poliuretana vegetal de mamona acrescida ou não de carbonato de cálcio. Os animais foram sacrificados, os globos oculares removidos 7, 15 e 30 dias após o implante e preparados de forma rotineira para a avaliação microscópica. Os resultados histológicos mostraram que esta resina é bem tolerada pelos tecidos da câmara anterior do olho, havendo uma reação inflamatória no período inicial que diminuiu com nos demais períodos. A reação dos tecidos foi semelhante com ou sem o carbonato de cálcio e a presença de células multinucleadas pode propiciar a reabsorção do material que será muito lenta.

UEDA *et al.* (1996) compararam o osso autógeno e o polímero derivado do óleo da mamona em sítios ósseos ao lado de implantes de titânio. Foram utilizados 10 coelhos da raça *New Zealand*, onde dois implantes HT foram colocados na tíbia esquerda. No osso ao redor de cada implante, foram criados defeitos ósseos e

preenchidos, um com osso autógeno e o outro com o polímero de mamona. Após 40 dias os coelhos foram sacrificados e a avaliação histológica evidenciou substituição parcial do polímero de mamona por osso autógeno imaturo com ausência de reação inflamatória. No grupo do enxerto autógeno, ocorreu uma substituição com incorporação e posterior remodelação do tecido ósseo.

Em 1997a, CARVALHO *et al.* testaram a biocompatibilidade do polímero natural de poliuretano, feito a partir do óleo da mamona. Para isto foram implantados, imediatamente após a extração, cinco grânulos do polímero em alvéolos de incisivos direitos superiores de ratos. Os animais foram sacrificados 1, 2, 3 e 6 semanas após o procedimento inicial. O material foi descalcificado e processado para inclusão em parafina. Foram feitas seções longitudinais semi-seriadas de 7mm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina. Utilizou-se uma câmara clara para estimativa de fração de volume dos tecidos ósseos e conjuntivo em áreas teste contíguas aos implantes, por um método de contagem diferencial de pontos. Na avaliação histológica os autores observaram presença de grânulos do polímero no terço cervical do alvéolo, sem reação de corpo estranho e sem persistência da reação inflamatória inicial. A histometria permitiu observar osteogênese progressiva com diminuição da cápsula fibrosa ao redor dos implantes. Ao final da 6ª semana o alvéolo apresentava-se quase totalmente preenchido por tecido ósseo maduro, estabelecendo íntimo contato com os implantes remanescentes. Perante seus resultados, os autores sugerem que o material é biocompatível, sendo progressivamente osseointegrado no decorrer da regeneração.

CARVALHO *et al.*(1997b) observaram o comportamento do polímero de mamona quando implantados no alvéolo de ratos com relação a cronologia de regeneração alveolar. Cinco grânulos do polímero foram implantados no alvéolo dos

incisivos direitos superiores imediatamente após a extração. Os animais foram sacrificados após 1, 2, 3 e 6 semanas e as peças removidas, foram submetidas ao processo necessário para as avaliações histológica e histométrica. Após estas, foi possível afirmar que a presença do material provocou, uma discreta porém significativa, diminuição de 10 a 22%, na regeneração alveolar quando comparado com o grupo controle. Diferença esta só observada a partir da segunda semana.

No mesmo ano, COSTA *et al.* também testaram a biocompatibilidade do polímero de mamona, comparando-o com o cimento de óxido de zinco e eugenol no subcutâneo de ratos, com vistas a sua possível utilização com material forrador de cavidade dentária. Foram utilizados 20 ratos (*Rattus Norvegicus, Holtzman*) machos. Em cada rato, duas lojas cirúrgicas foram confeccionadas no dorso (lado direito e esquerdo), onde implantaram o polímero e o óxido de zinco. Decorridos 7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia, 5 animais de cada grupo foram sacrificados e removido o implante o tecido circunvizinho para regeneração para análise histológica. Os resultados mostraram que o polímero de mamona foi mais irritante que o óxido de zinco e eugenol em todos os períodos, porém sua reação inflamatória foi aceitável, com diminuição progressiva nos períodos mais tardios. Os autores concluíram que os materiais apresentaram aceitável biocompatibilidade.

Com objetivo de verificar a neoformação óssea e a integração do cimento derivado do polímero da mamona, IGNÁCIO *et al.*, em 1997, produziu defeitos ósseos em raios de 34 coelhos. Os animais utilizados tinham idade variando entre 8 a 10 semanas de vida, pesando aproximadamente 2,0kg. Estas falhas osteoperiosteais apresentavam 2,0cm comprimento, equivalendo a 30% do comprimento total do osso. Os defeitos foram preenchidos por um cilindro confeccionado com o cimento derivado

do polímero da mamona adicionado de carbonato de cálcio para aquisição de porosidade e radiodensidade. Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o tempo de sacrifício dos animais em relação ao procedimento cirúrgico (2, 4, 8 e 16 semanas). No grupo controle a falha óssea não foi preenchida com nenhum tipo de material. Os grupos foram submetidos a avaliação radiológica, macroscópica e microscópica.

Os resultados mostraram que no grupo controle todos os segmentos tiveram perda do alinhamento do membro (deslizamentos epifisários e fraturas). Ao contrário do que ocorreu nos grupos onde o defeito ósseo foi preenchido com o cilindro derivado do polímero da mamona, que apresentaram baixos índices de deslizamentos. Radiograficamente, nos animais em que foram implantados o cilindro houve, na quase totalidade dos casos, união sólida das interfaces cilindro-osso proximal e distal. O osso neoformado a partir das extremidades ósseas praticamente uniu-se na região central do enxerto nos períodos finais de estudo, visualizando-se, em alguns casos, a formação de uma cortical óssea delgada e esboço de um canal medular. Histologicamente não foi observada a presença de células gigantes e reação do tipo corpo estranho que pudesse indicar qualquer grau de toxicidade do material. O processo de neoformação óssea foi gradual, progressivo e organizado a partir das interfaces cilindro-osso proximal e distal em direção à região central do material. No grupo de 16 semanas as duas extremidades ósseas (distal e proximal) praticamente uniram-se na região central. Sobre este novo osso foi observado a formação de uma cortical fina e periósteo.

SILVA (1997) analisou o comportamento tecidual ósseo frente ao implante do polímero de mamona em raios de coelhos, através de radiografias convencionais padronizadas, utilizando critérios de radiopacidade pré-estabelecidos para estruturas

anatômicas presentes nas áreas de interesse das imagens, obtidas dos defeitos ósseos induzidos, controle (coágulo de sangue) e teste (polímero de mamona), nos períodos de 15, 30, 90 e 120 dias. Os resultados mostraram que ocorre evolução do processo de regeneração tecidual nos períodos de 15, 30 e 90 dias, e o seu retardo no período de 120 dias. Na interface osso-polímero ocorre intensificação de radiopacidade, entre os períodos iniciais (15 e 30 dias), intensidade similar observada no período de 120 dias. No período de 90 dias houve diminuição nos valores de radiopacidade, podendo estar relacionada às atividades metabólicas teciduais do leito receptor, frente ao polímero de mamona, no processo normal de substituição e regeneração tecidual.

Em 1998, CARVALHO *et al.*, com o intuito de melhor corrigir as fenestrações ósseas em implantodontia, estudaram o comportamento do polímero de mamona e da membrana de teflon na correção destes defeitos ósseos. Para isto, foram realizados implantes osseointegrados do sistema T.F. em tíbias de cães com os defeitos ósseos sendo confeccionados experimentalmente. Os animais foram divididos em dois grupos, onde em um foi colocado o polímero de mamona e no outro a membrana teflon. Decorridos 180 dias, os animais foram sacrificados e as tíbias foram preparadas e coradas com azul de toluidina para análise histológica. Esta avaliação permitiu que os autores afirmassem que ocorreu neoformação óssea e interface de osseointegração em ambos os grupos.

No mesmo ano, MAGRO FILHO *et al.* pesquisaram a reação tecidual do implante de polímero de mamona, manipulado no momento do ato operatório e previamente preparado (esterilizado em autoclave de óxido de etileno), em tíbias de ratos. Os animais foram sacrificados após 5, 15, 21 e 45 dias após a colocação dos implantes. Os resultados mostraram que houve um crescimento ósseo em íntimo

contato com o polímero de mamona. Nos períodos tardios, em algumas áreas não existiu crescimento ósseo no interior do polímero de mamona. O material previamente preparado foi mais bem aceito pelo organismo, e uma fina cápsula de tecido conjuntivo, sem reação inflamatória, envolveu a maioria do implantes.

KONIG Jr. *et al.*, em 1999, avaliaram a biocompatibilidade de uma resina poliuretana derivada da mamona (*Ricinus vulgaris*) inseridos no alvéolo de cães após a extração dos pré-molares. Os alvéolos foram preenchidos com a resina até o nível do osso alveolar, polimerizado e a mucosa alveolar suturada ocluindo completamente o alvéolo. Após 90 dias os cães foram sacrificados e os alvéolos foram preparados para avaliação histológica. Os resultados mostraram uma substituição da poliuretana por tecido ósseo e matriz osteóide, não foi observado nenhuma reação inflamatória. Estes dados credenciam o polímero da mamona como substituto ósseo.

CAVALIERI, em 2000, realizou um estudo comparativo das respostas teciduais após a implantação de polímero de mamona, cimento ósseo e resina acrílica termicamente ativada em defeitos ósseos cirúrgicos confeccionados nas tíbias de coelhos, mediante análises macroscópicas e microscópicas através de microscopia de luz. Para isto, foram utilizados nove coelhos adultos com peso médio de aproximadamente 4,0 kg, onde foram realizados dois defeitos em cada tíbia. Na tíbia direita foi colocado o polímero de mamona e o cimento ósseo, na tíbia esquerda, resina acrílica e coágulo sanguíneo (controle). Os coelhos foram sacrificados 30, 60 e 90 dias após a cirurgia, num total de três por período. As peças contendo os defeitos foram removidas, fixadas em formol a 10%, processadas e submetidas às análises macroscópica e microscópica. Os resultados mostraram que o polímero de mamona e o cimento ósseo apresentaram propriedades hemostáticas e maior estabilidade no defeito

ósseo. O polímero de mamona, a resina acrílica e o cimento ósseo apresentaram um discreto infiltrado inflamatório mononuclear com predominância de linfócitos no último período de avaliação. Esta reação inflamatória foi mais intensa no cimento ósseo, seguindo pela resina e pelo polímero de mamona. Todos os materiais avaliados apresentaram propriedades osseocondutoras. O polímero de mamona permitiu crescimento ósseo de tecido conjuntivo osteogênico no interior dos seus poros e fendas, bem como incorporou-se ao tecido ósseo, promovendo a sua boa estabilidade no local de implantação. Este polímero estava, lentamente, sendo substituído por tecido ósseo durante o processo de remodelação.

GARCIA JUNIOR (2000) avaliou o processo de regeneração óssea em defeitos cirúrgicos realizados na parede anterior do seio maxilar após a colocação de implantes de polietileno de alta densidade (Medpor), polímero de mamona e matriz óssea bovina desmineralizada. Para este estudo foram utilizados 8 macacos pregos (*Cebus Apella*). As análises foram feitas após 145 dias de implantação, através de avaliações histológicas e histométricas, utilizando-se o método de microscopia óptica computadorizada (Imagelab 98). Os resultados mostraram que a regeneração óssea se estabeleceu em 77,24% da superfície de contato com a matriz óssea bovina, 41,31% com o Medpor e 28,24% do polímero de mamona. Houve prevalência de neoformação conjuntiva (58,5%) no grupo controle. O grupo do polímero de mamona apresentou uma intensa fibrose e moderada quantidade de infiltrado inflamatório crônico tardio.

PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo experimental foi a comparar histológica e histometricamente a matriz óssea desmineralizada de origem humana* e a poliuretana derivada do óleo da mamona**, frente ao processo de regeneração óssea em calvária de coelhos.

* **DEMBONE™** – Pacific Coast Tissue Bank

** **AUG-EX®** - Poliquil

METODOLOGIA

ANIMAIS E ANESTESIA

Foram utilizados no presente estudo 24 coelhos albinos da raça *New Zealand*, fêmeas, com idade variando entre 03 a 06 meses, e peso médio de 2,9kg. Os animais foram mantidos em gaiolas no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, durante o período experimental, com dieta sólida¹ e água à vontade, em temperatura ambiente. Estes animais foram divididos em dois grupos iguais (Grupo I e Grupo II).

Para anestesia geral foi utilizada atropina 1% na dose de 0,15ml/kg de peso, por via subcutânea, cinco minutos antes da anestesia propriamente dita para evitar a bradicardia provocada pelo anésteico. ketamina² e solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4-H-1,3-tiazin³ foram aplicados numa concentração de 0,5ml/Kg de peso, por via intramuscular profunda (MASSONE, 1994).

¹ Ração Sítios e Quintais® – Purina Nutrimentos

² Francotar® – Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda. – São Paulo

³ Rompum® – Bayer S.A - Saúde Animal

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos operatórios experimentais foram realizados no centro cirúrgico para coelhos do biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp, sob condições assépticas utilizando-se instrumental estéril e campos descartáveis, todos submetidos a esterilização por calor úmido utilizando-se autoclave, sob a pressão de 15 libras, temperatura de 121° Celsius por um tempo de 20 minutos. Após a tricotomia da calvária foi realizada a antissepsia com solução alcóolica de polivilpirrolidona iodo a 10%⁴ e posterior isolamento da área a ser operada com campos estéreis.

O procedimento cirúrgico foi dirigido através do protocolo descrito por ALBERIUS *et al.*(1989); ALBERIUS *et al.*(1990); ALBERIUS & JOHNELL(1991). Pele e subcutâneos foram seccionados através de uma incisão paramediana na calvária do coelho, estendendo do osso nasal até o frontal realizada com lâmina de bisturi⁵ n^o 15. O perióstio que recobre a região frontal e a sutura coronal foi incisado, elevado e rebatido lateralmente(Fig. 1-A). Duas cavidades ósseas circulares, foram produzidas na região parietal bilateralmente, utilizando-se uma broca trefina⁶ com 10 mm de diâmetro, acoplada num contra-ângulo redutor 16:1⁷, montada em baixa rotação (1500 rpm) num motor elétrico⁸ com o cuidado de não perfurar o seio sagital e/ou a dura-máter(Fig. 1-B e 1-C).

⁴ Hi – Odin – Halex e Istar Laboratórios- Ind. Brasileira

⁵ Feather Safety Razor C.D., Ltd Medical Division – Japan

⁶ Implantes – Biomateriais Dentoflex Instrumentos Cirúrgicos

⁷ NSK E 16R Nakanishi Dental MFG. C. O., Ltd-Japan

⁸ BLM 500 – VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda

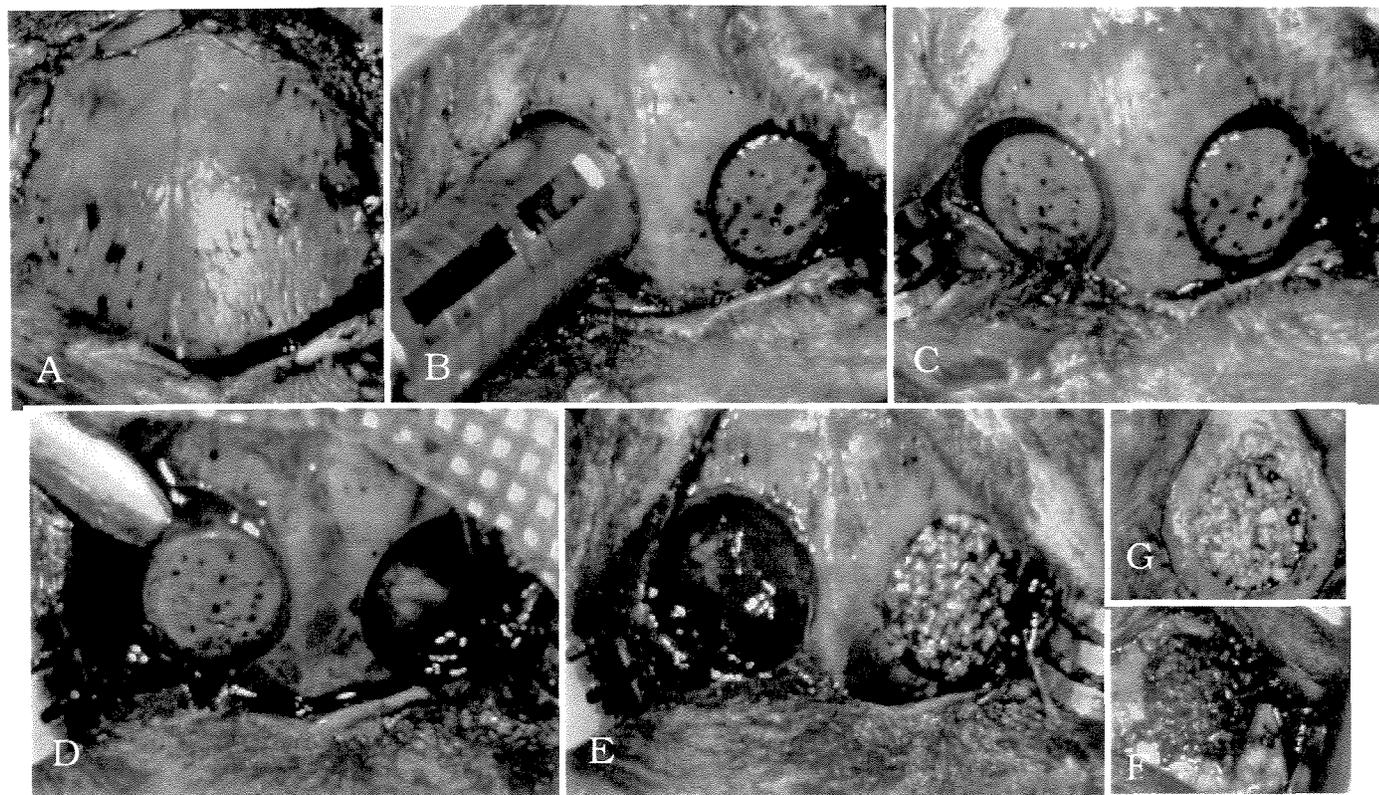


Fig. 1 A – Calvária descolada. B – Perfuração da cavidade com a trefina. C – As cavidades osteotomizadas. D – Remoção cuidadosa do tampão ósseo. E – Cavidade preenchida com sangue no lado esquerdo e com material testado no lado direito. F – Osso desmineralizado preenchendo uma cavidade. G – Polímero de mamona preenchendo uma cavidade.

Durante as perfurações ósseas, o procedimento foi realizado sob constante irrigação com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%⁹ evitando-se assim o superaquecimento ósseo. Após a realização das perfurações, o tampão ósseo confeccionado pela trefina foi delicadamente removido com o auxílio de um descolador (Fig. 1-D). Sempre a cavidade do lado direito foi preenchida pelo material e a do lado esquerdo deixada vazia (Fig. 1-E). As cavidades do osso parietal direito do Grupo I

⁹ Fresenius Laboratórios Ltda

foram preenchidas com AUG-EX^{®10} (Fig. 1-F). A cavidade do parietal direito dos coelhos do Grupo II foi preenchida com osso desmineralizado de origem humana¹¹ (Fig. 1-G), uma resina poliuretana extraída do óleo da mamona. As cavidades do lado esquerdo foram preenchidas por sangue, servindo como controle. Posteriormente o perióstio foi reposicionado e os planos superficiais suturados com fio de nylon número 4.0¹².

Todos os animais receberam Penicilina Benzatina¹³ em dose única de 0,1ml/kg, por via intramuscular, segundo as recomendações do fabricante. Em cada animal operado foi realizada aplicação tópica de solução alcóolica de polivilpirrolidona iodo a 10%⁴, como medida antisséptica local, no pós-operatório imediato. Os animais permaneciam em observação no período inicial da recuperação anestésica e, em seguida, eram levados para suas gaiolas e mantidos até o momento do sacrifício.

Os animais foram sacrificados nos períodos de 04, 07, e 15 semanas de pós-operatório, num total de quatro animais de cada grupo, por período de sacrifício. Foi utilizada uma superdose da mistura anestésica contendo Francotar² e Rompum³, para o sacrifício dos animais. Após isto, procedeu-se a remoção dos blocos ósseos contendo as cavidades ósseas.

¹⁰ AUG - EX[®]- Poliquil – Araraquara – São Paulo

¹¹ DEMBONE[™] – Pacific Coast Tissue Bank

¹² ETHICON[®] – Nylon4-0 . Johnson & Johnson – São José dos Campos/SP. – Brasil

¹³ FORT DODGE[®] Saúde Animal Ltda

MÉTODO HISTOLÓGICO

Estes blocos foram imersos em solução de formoldeído 10%¹⁴ em tampão fosfato por um período de 24 horas, lavados em água corrente durante 24 horas e descalcificados em solução de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (citrato de sódio) a 20%¹⁵ e HCOOH (ácido fórmico) a 50%¹⁶ em partes iguais (Morse, 1945), durante um período de 52 dias. Ao final deste processo, cada fragmento ósseo contendo o defeito foi seccionado ao meio dividindo-o em dois hemi-círculos, usando-se lâmina de barbear¹⁷. A partir desta fase procedeu-se a realização das etapas de processamento laboratorial. A seqüência realizada ocorreu inicialmente com lavagem das peças em água corrente, durante 5 horas, desidratação com álcool a 70%¹⁸ (12 horas), álcool a 80%¹⁹ (1 hora), álcool a 90%²⁰ (1 hora), álcool absoluto²¹ (1 hora), diafanização com $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$ (xilol)²² através de três trocas a cada 20 minutos, infiltração em parafina (paraplast)²³ (1 hora) em estufa a 70° Celsius realizando-se 3 trocas. Cortes seriados, com 6µm de espessura, foram realizados e em seguida corados pela Hematoxilina de Carazzi²⁴ e Eosina – Lison²⁵, para posterior visualização em microscópio óptico comum²⁶.

¹⁴ Polycienes, Inc. Warrington, P.A.

¹⁵ Sódio citrato (P.A.-A.C.S.) – Synth, Produtos para Laboratórios Ltda. Diadema – São Paulo

¹⁶ Ácido fórmico (P.A.) – Chemco, Industria e Comércio Ltda. Campinas – São Paulo

¹⁷ Lâmina de barbear – Gillett do Brasil

¹⁸ Álcool a 70% - Diamante's industrial

¹⁹ Álcool a 80% - Diamante's industrial

²⁰ Álcool a 90% - Diamante's industrial

²¹ Álcool absoluto (99,5%) - Diamante's industrial

²² Xilol (P.A.) – Chemco, industria e Comércio Ltda. Campinas – São Paulo

²³ Paraplast® plus – Labware – St. Louis - USA

²⁴ E.Merck.Ag. Damarsta dt - Germany

²⁵ E.Merck.Ag. Damarsta dt - Germany

²⁶ Carl Zeiss Products, Germany

MÉTODO HISTOMÉTRICO

Para a realização da análise histométrica linear foram utilizados um microscópio óptico²⁶ com objetiva para aumento de 40x, uma câmera de vídeo²⁷, um computador²⁸ e um programa de análise das imagens²⁹. Os cortes histológicos dos espécimes obtidos de animais de todos os grupos corados com H&E foram observados através do analisador de imagens Kontron Elektronik – KS 400 – 2.0, da Zeiss(Figura 5).

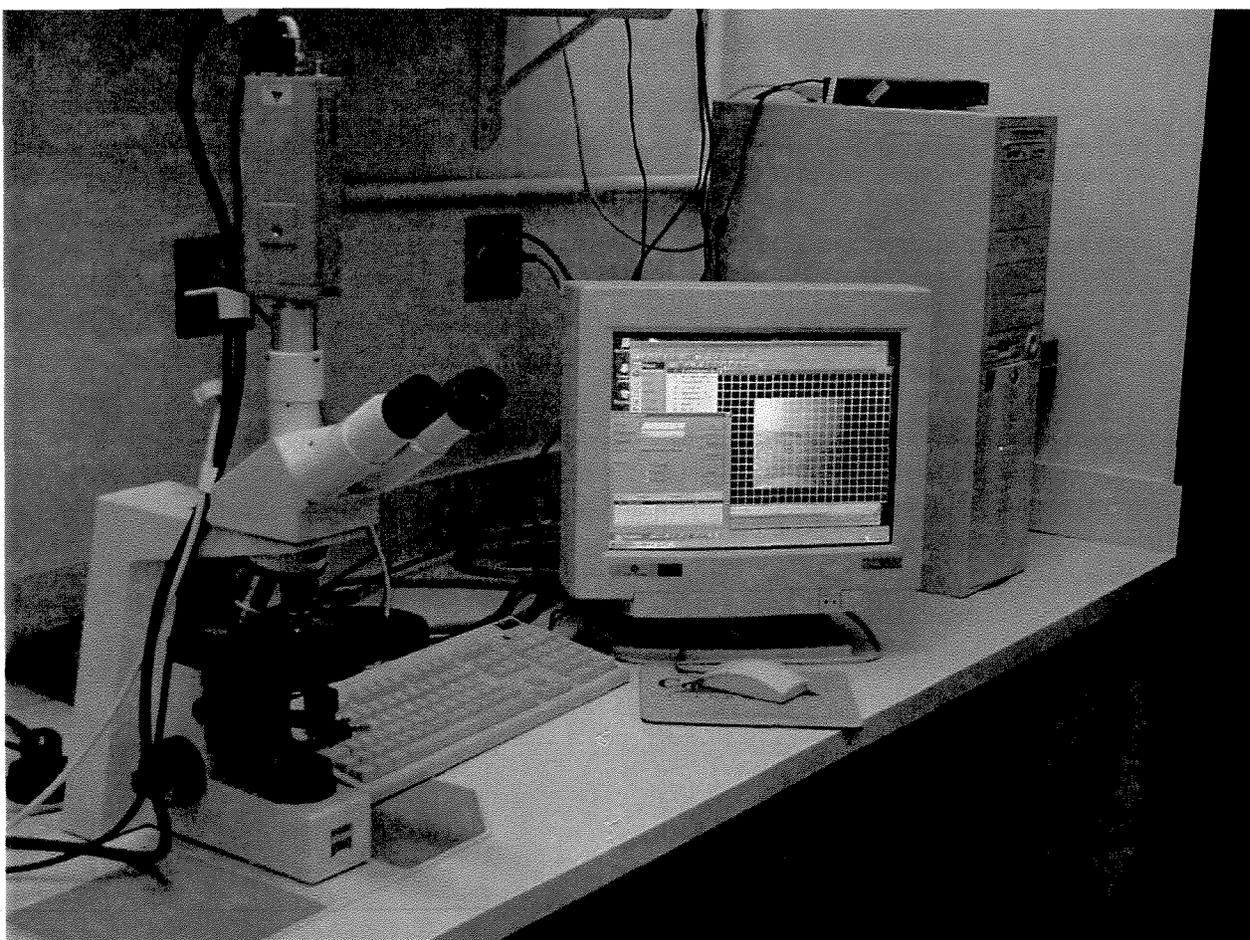


Fig. 2 - Microscópio óptico Carl Zeiss Products, Germany e computador Toshiba – Pentium 166 Mhz utilizado na análise histométrica.

²⁷ Sony - Hiper

²⁸ Toshiba – Pentium 166 Mhz

As imagens histológicas selecionadas foram capturadas pelo computador através da câmera de vídeo. Para que isto fosse possível, foi estabelecido uma “macro”, ou seja, um conjunto de funções que permite executar automaticamente a seleção das imagens, a definição das condições da morfometria e a execução da medida, através do analisador de imagens, de acordo com CALIARI (1997).

Cada lâmina histológica foi focalizada em objetiva de 1X, e a imagem foi captada pelo sistema e visualizada *on line* no *display*, que realizou a normalização e congelamento desta, podendo então ser devidamente mensurada. Sendo, então, sobreposto a elas um retículo de 100 pontos, também denominado grade de intersecções, onde cada ponto corresponde a $300 \times 300 \mu\text{m}$, o que equivale a $1,2\text{mm}^3$, portanto, o volume total do retículo era de 120mm^3 . O sistema empregado para análise histométrica foi por contagem de pontos manual que recaíam sobre o osso neoformado nas áreas de intersecção das linhas horizontais e verticais do retículo.

A avaliação dos dados se fez através do *data list*, uma lista de resultados morfométricos. Para cada campo mensurado essa lista de resultados era transferida para o *Microsoft Excel 2000*, formando o banco de dados de cada animal.

²⁹ KONTRON ELETRONIK – Imaging System KS 400

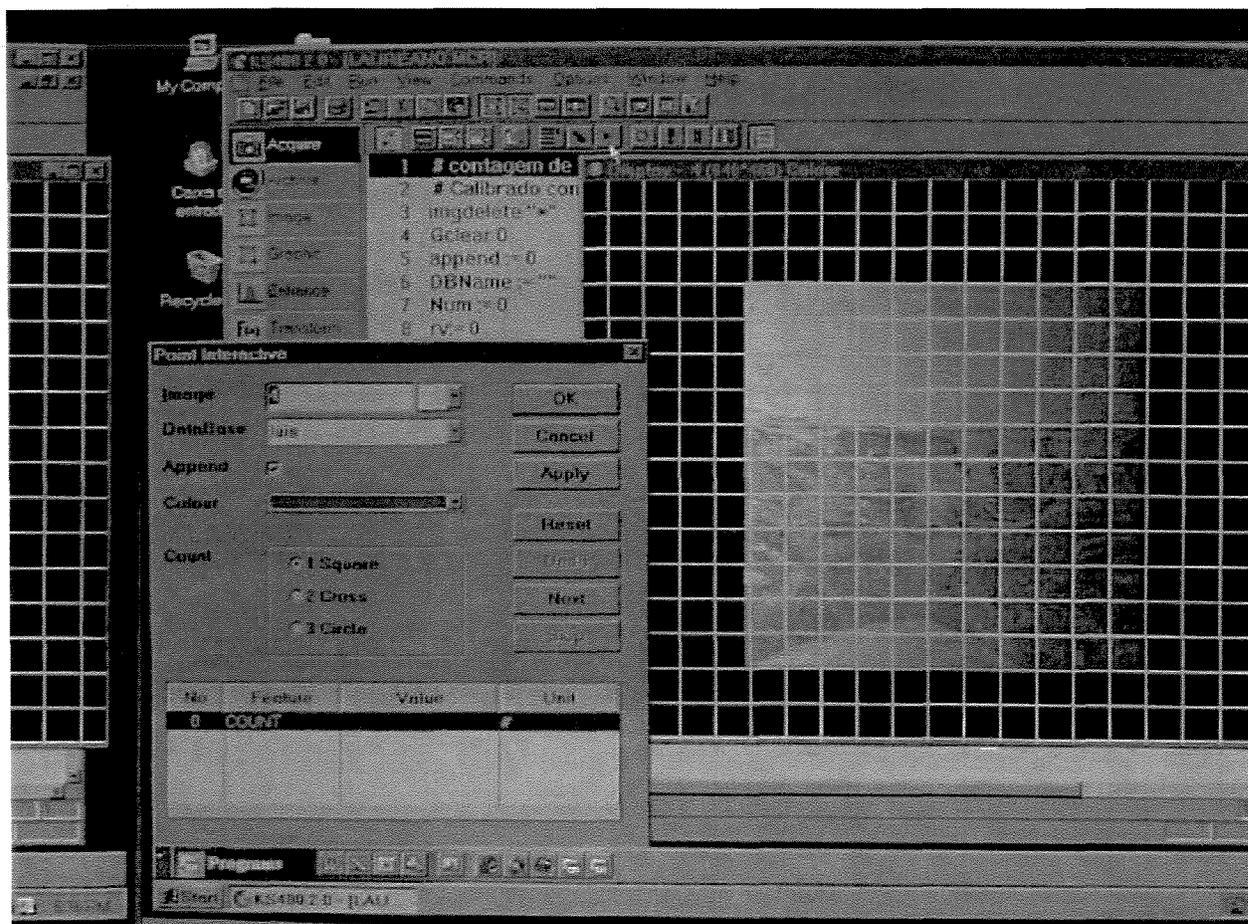


Figura 3 – Microscópio óptico Carl Zeiss Products, Germany e computador Toshiba – Pentium 166 Mhz utilizado na análise histométrica.

Para estabelecer o número de pontos a serem contados em cada grupo, nos três períodos pós-operatórios, com um sistema de 100 pontos, utilizou-se a fórmula proposta para erro padrão relativo:

$$EPR = \sqrt{\frac{(1 - V_v)}{n}}$$

EPR = erro padrão relativo

V_v = densidade de volume da estrutura em análise

n = número de pontos a serem contados

Para as nossas condições de trabalho a densidade de volume (V_v), ou seja a fração de volume ocupada por um objeto numa determinada estrutura foi igual a 100%. Em bioestatística é aceito o índice de significância α de 0,05 (probabilidade igual a 95%), por isso foi atribuído esse valor ao EPR. Dessa forma:

$$0,05 = \sqrt{\frac{(1 - 10)}{n}}$$

$$0,0025 = \frac{9}{n}$$

$$n=3600$$

$$n_{\text{corrigido}} = \frac{3600}{10} = 360$$

Escolheu-se aleatoriamente cinco lâminas de cada grupo, nos períodos de sacrifícios (4, 7 e 15 semanas). Todas as lâminas selecionadas continham cortes histológicos semi-seriados com 6 μ m de espessura. Foram analisados por toda

extensão do defeito, onde 360 pontos para cada grupo nos diferentes períodos de sacrifício. Na contagem de pontos, foi avaliado somente a presença de tecido ósseo neoformado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram obtidos em um ensaio planejado de acordo com o delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial dos fatores MATERIAL e TEMPO e, dos efeitos dos fatores MATERIAL com três níveis: *CONTROLE*, *DEMBONE* e *AUG-EX* e TEMPO com três níveis: 4, 7 e 15 semanas. Estes dados foram submetidos a um estudo de suposições para verificar a adequação dos dados, conseqüente a análise de variância e, posteriormente, submetidos a uma comparação de médias, através do teste de Tukey.

RESULTADOS

ANÁLISE HISTOLÓGICA

PERÍODO DE QUATRO SEMANAS

Grupo – Controle

Verificamos neoformação óssea junto ao defeito ósseo criado cirurgicamente. No entanto, notamos uma grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso com tendência a invaginação e impedindo que houvesse uma união entre o osso preexistente e o osso neoformado (figura 4). A porção periférica da cavidade óssea cirúrgica é facilmente identificada e apresenta o osso preexistente caracterizado pela presença de duas corticais bem nítidas e tecido medular constituído por tecido conjuntivo com rica celularidade e boa vascularização. Ainda no limite da cavidade, o osso preexistente apresenta áreas de remodelação e osso neoformado tendendo ao afilamento e, emitindo projeções em direção centrípeta, o que sugere atividade remodeladora ativa e progressiva, com presença de pequenas ilhotas de tecido ósseo (figura 5). Já o osso neoformado não apresenta a mesma organização, observando-se grande quantidade de lacunas e trabéculas, freqüentemente sem reação inflamatória. No interior da cavidade óssea cirúrgica observamos remanescentes do coágulo e tecido conjuntivo frouxo. A porção mais superior da cavidade apresenta-se coberta por uma delgada camada de tecido conjuntivo fibroso.

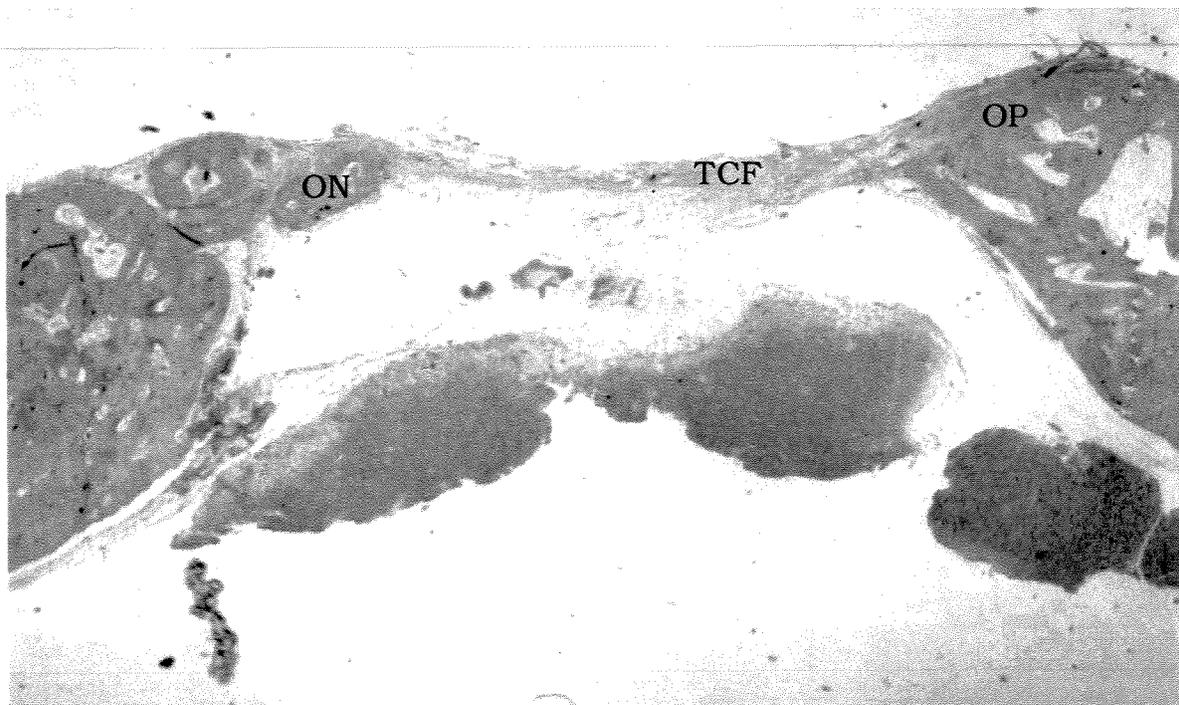


Figura 4 – Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar tecido conjuntivo fibroso(TCF) na maior parte do defeito. O ossoneoformado(ON) origina-se do osso pré-existente(OP) nas bordas da cavidade, e projeta-se em direção centrípeta. Grupo controle, 04 semanas. H.E. objetiva 1,0x.

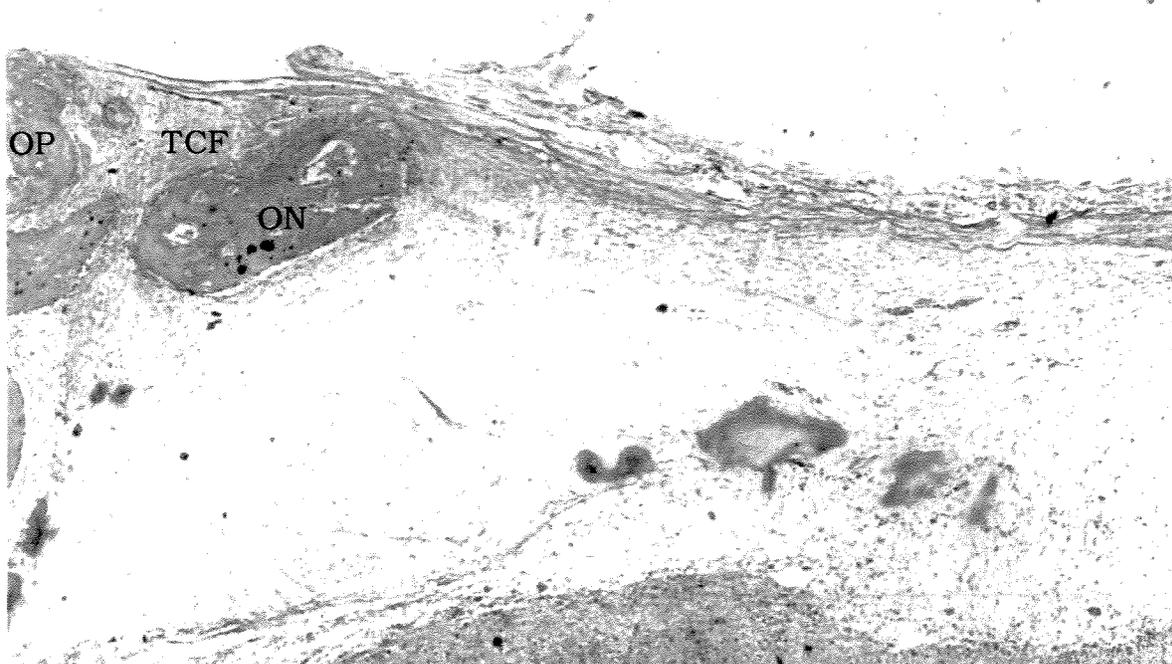


Figura 5 – Visão aproximada do limite da cavidade cirúrgica. Observa-se o tecido conjuntivo fibroso(TCF) impedindo a união entre osso pré-existente(OP) e o osso neoformado(ON). Grupo controle, 04 semanas. H.E. objetiva 4,0x.

PERÍODO DE QUATRO SEMANAS

Grupo I – Polímero de mamona

Na porção periférica, o limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso preexistente era facilmente identificado e, caracterizado pela presença de duas corticais bem nítidas (figura 6), tecido medular constituído por tecido conjuntivo com rica celularidade e boa vascularização. As margens deste tecido ósseo preexistente apresentavam áreas de remodelação e neoformação óssea tendendo ao afilamento e crescimento centrípeto.

A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por partículas do material de diversos tamanhos, circundadas por tecido conjuntivo fibroso (figura 7). Em algumas áreas havia presença de discreta reação inflamatória.

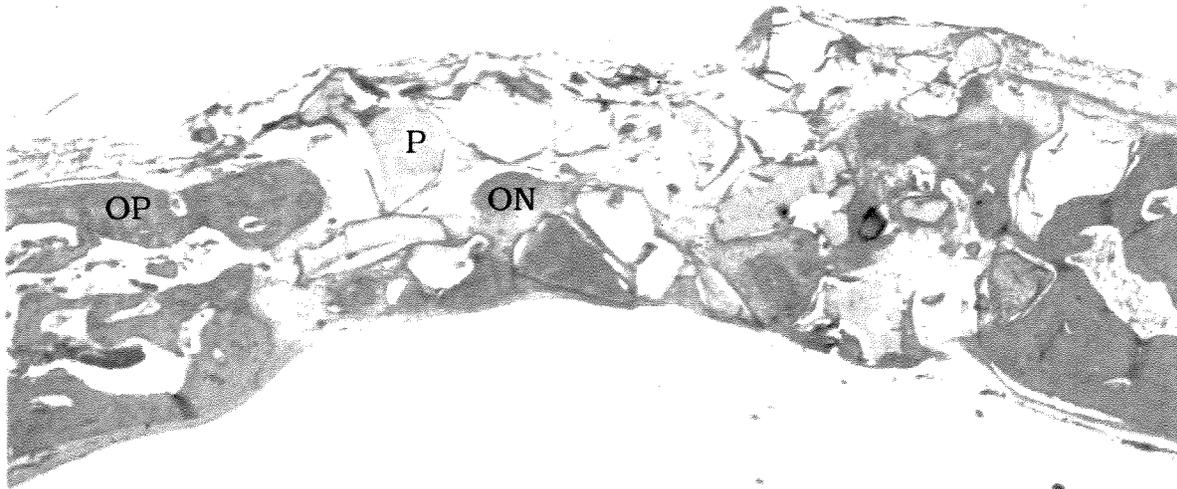


Figura 6 – Visão panorâmica da cavidade cirúrgica. Observa-se osso pré-existente(OP) na periferia. Osso neoformado(ON) e partículas(P) do material. Grupo polímero de mamona, 04 semanas. H.E. objetiva 1,0x.

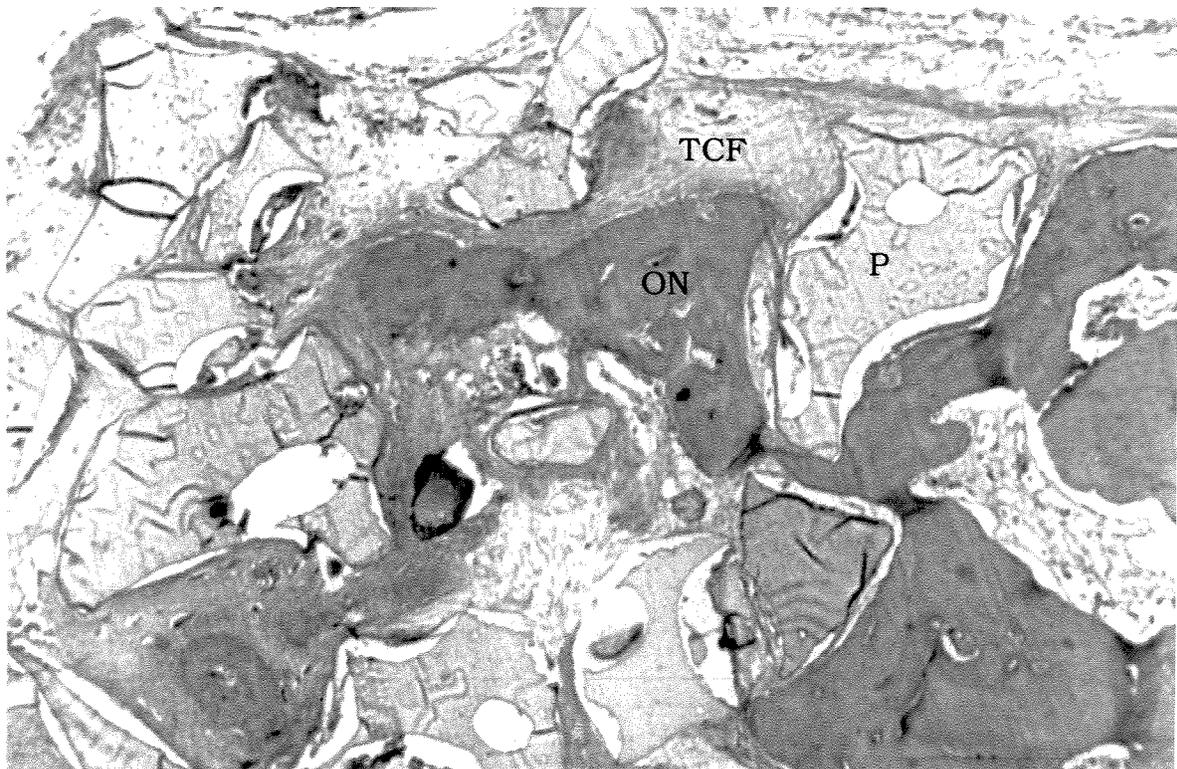


Figura 7 – Observar o tecido ósseo neoformado(ON) e as partículas(P) do material separados por tecido conjuntivo fibroso(TCF). Grupo polímero de mamona, 04 semanas. H.E. objetiva 4,0x.

PERÍODO DE QUATRO SEMANAS

Grupo II – Osso desmineralizado

Os animais apresentaram um comportamento semelhante ao grupo I, sendo facilmente possível a identificação da região limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso preexistente, na região periférica das amostras. Notamos que o osso preexistente era caracterizado pela presença de duas corticais bem nítidas (figura 8) e tecido medular constituído por tecido conjuntivo com rica celularidade e boa vascularização. Observamos áreas de reabsorção e aposição óssea tendendo ao afilamento e crescimento em direção centrípeta, promovendo a remodelação das margens da cavidade. Em algumas regiões havia a presença de tecido conjuntivo interposto entre o osso neoformado e o osso preexistente, impedindo a união dos bordos da cavidade.

Notamos a presença em toda a cavidade, de partículas do material de tamanhos diversos, circundadas por tecido conjuntivo fibroso (figura 8). Em algumas regiões, havia presença de processo inflamatório próximo das partículas.

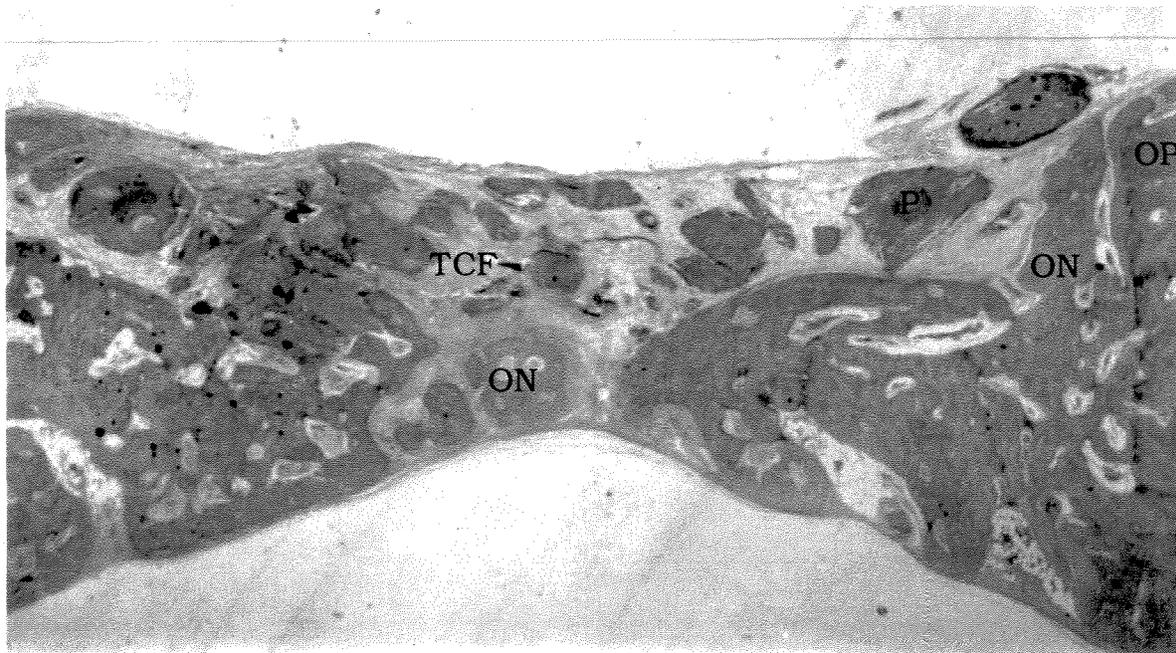


Figura 8 – Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observa-se a presença de osso pré-existente (OP), osso neoformado (ON) e partícula (P) em uma grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso (TCF). Grupo osso desmineralizado, 04 semanas. H.E. objetiva 1.0x.

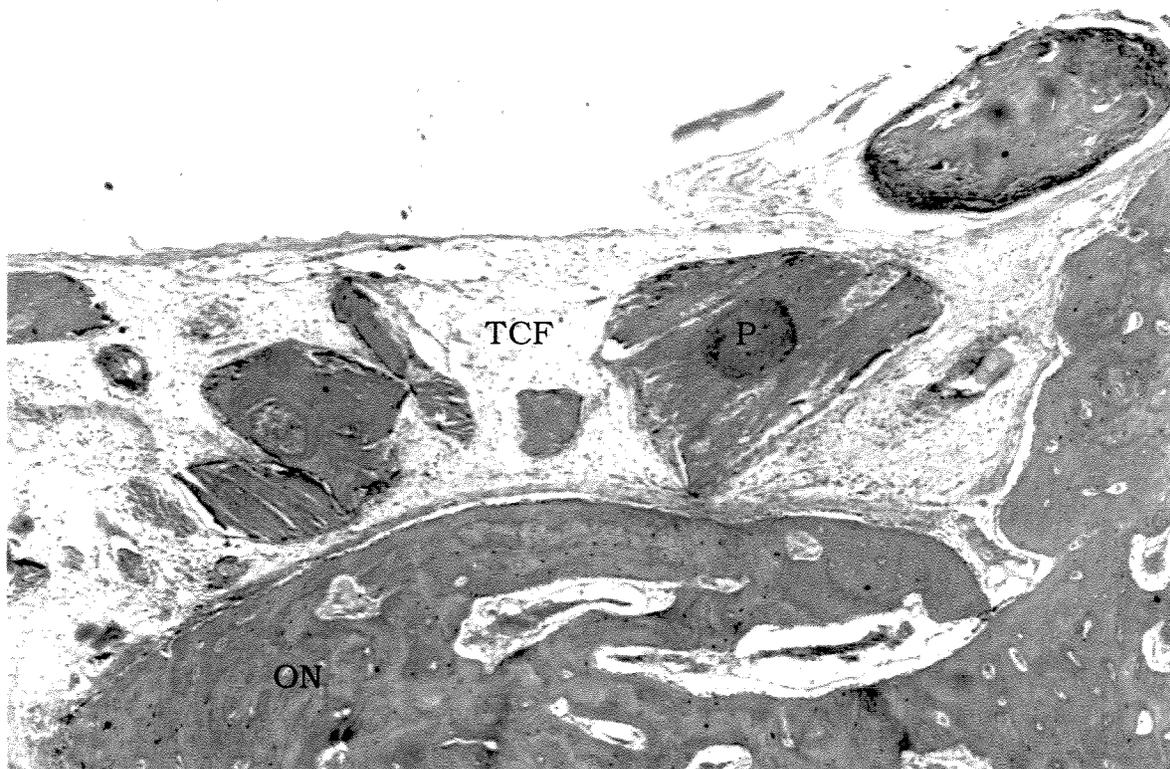


Figura 9 – Observar o tecido conjuntivo fibroso (TCF) separando osso neoformado (ON) das partículas (P) do material. Grupo osso desmineralizado, 04 semanas. H. E. objetiva 4,0x.

PERÍODO DE SETE SEMANAS

Grupo – Controle

A região limite entre o osso pré-existente e o osso neoformado era facilmente identificada, sendo que o osso pré-existente apresentava duas corticais nítidas e tecido medular constituído por tecido conjuntivo com boa celularidade e vascularização. Junto às margens da cavidade notamos áreas de remodelação do osso pré-existente e osso neoformado com suas bordas tendendo ao afilamento em direção ao centro da cavidade (figura 10). Em algumas áreas havia presença de tecido conjuntivo fibroso interposto entre o osso pré-existente e o osso neoformado.

A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por tecido conjuntivo (figura 11). Nas regiões próximas as margens da cavidade observamos tecido ósseo neoformado, apresentando aspecto mais organizado e maduro, quando comparado ao período anterior. Estas ilhotas estavam sempre circundadas por tecido conjuntivo fibroso.

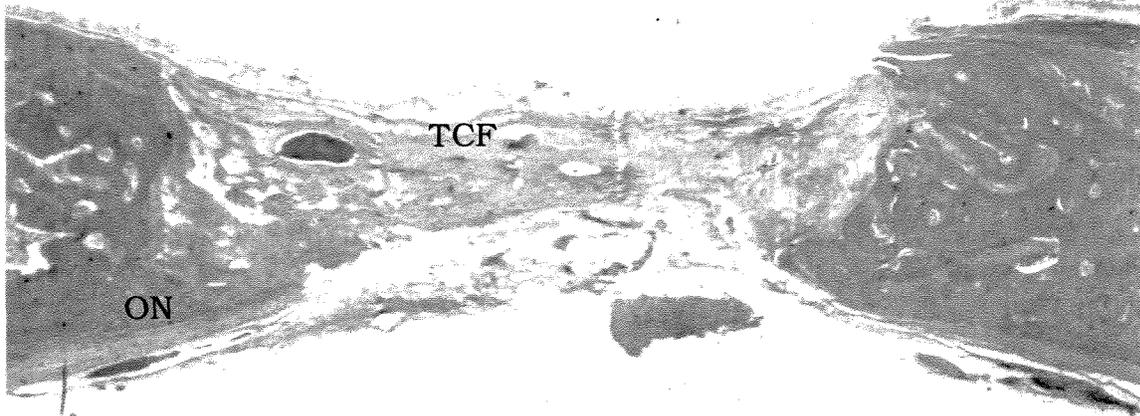


Figura 10 – Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar tecido conjuntivo fibroso (TCF) entre as projeções de osso neoformado (ON). Grupo controle, 07 semanas. H.E. objetiva 1,0x.

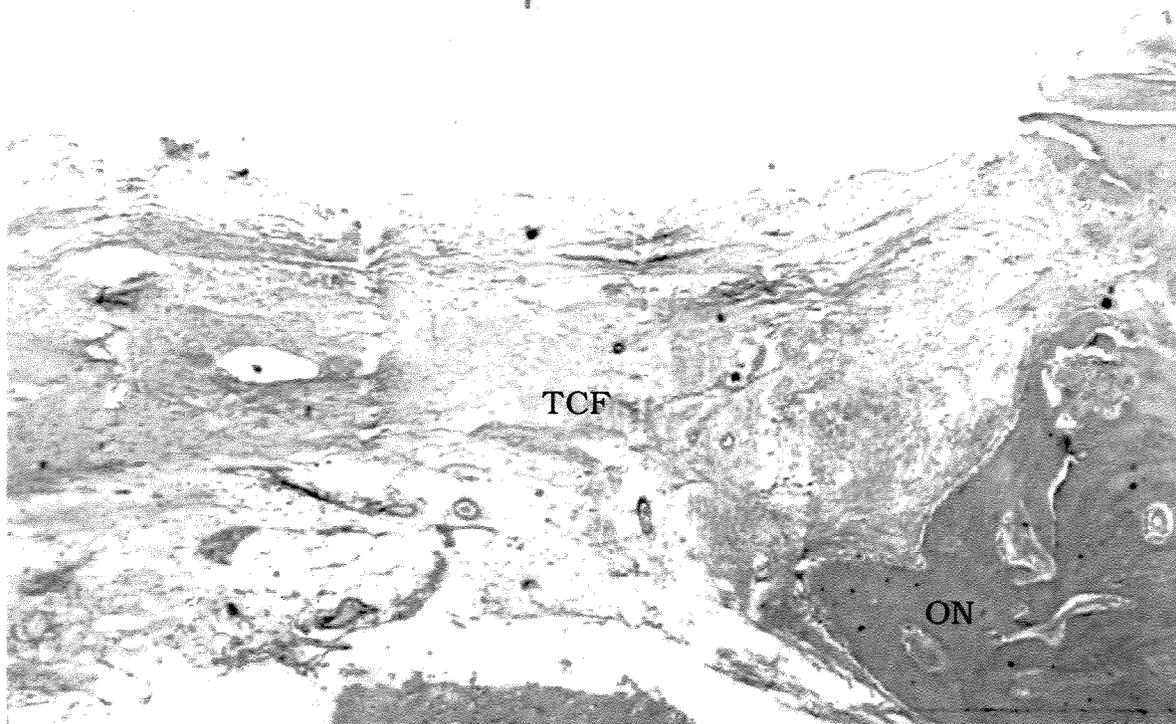


Figura 11 – Visão mais aproximada da limite da cavidade cirúrgica. Observar tecido conjuntivo fibroso (TCF) e osso neoformado (ON). Grupo controle, 07 semanas. H.E. objetiva 4,0x.

PERÍODO DE SETE SEMANAS

Grupo I – Polímero de mamona

O limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso preexistente era facilmente identificado e, sendo caracterizado pela presença de duas corticais bem nítidas, tecido medular constituído por tecido conjuntivo com boa celularidade e vascularização. Na periferia deste tecido ósseo preexistente apresentavam áreas de remodelação e neoformação óssea tendendo ao afilamento e crescimento centrípeto (figura 12).

A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por partículas do material com sinais claros de processo de reabsorção intenso com algumas partículas quase que totalmente reabsorvidas e outras com apenas uma pequena parte reabsorvida. Estas partículas apresentavam-se circundadas por tecido conjuntivo fibroso e algumas vezes por tecido ósseo (figura 13).

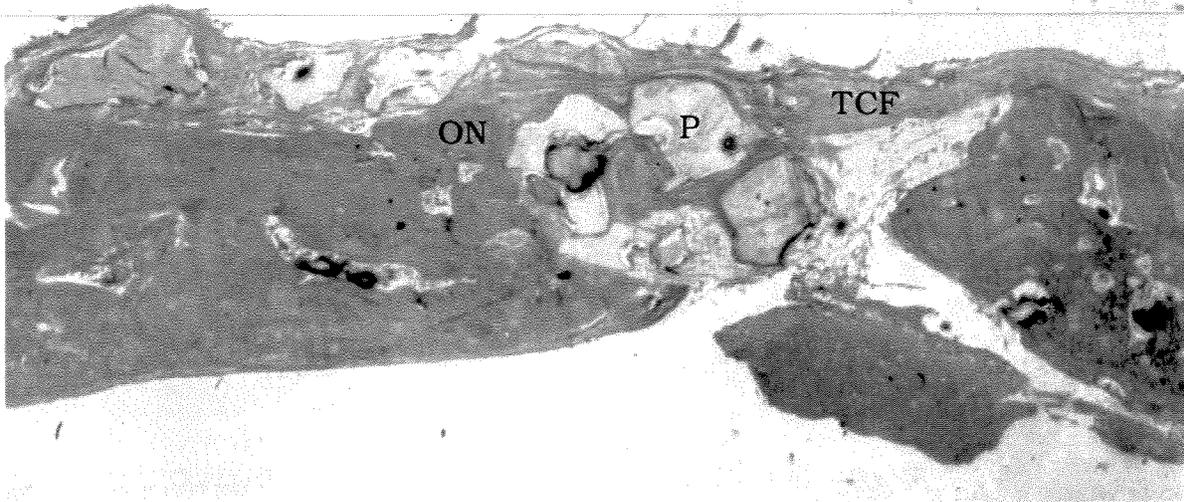


Figura 12 – Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar tecido conjuntivo fibroso (TCF), as partículas (P) do material e as projeções de osso neoformado (ON). Grupo polímero de mamona, 07 semanas. H.E. objetiva 1,0x.

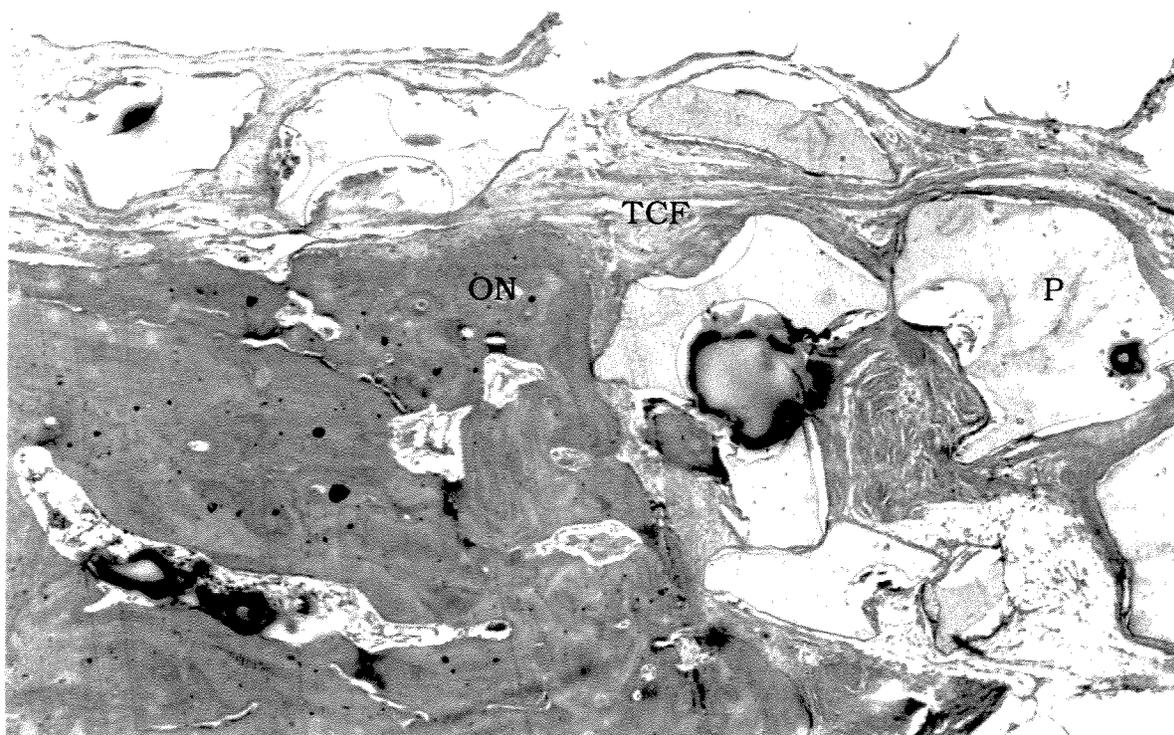


Figura 13 – Observar as partículas (P) do material, com sinais de reabsorção, separadas do osso neoformado (ON) por tecido conjuntivo fibroso (TCF). Grupo polímero de mamona. 07 semanas. H.E.4.0x.

PERÍODO DE SETE SEMANAS

Grupo II – Osso desmineralizado

As margens da cavidade óssea cirúrgica eram facilmente identificadas e apresentavam-se com duas corticais bem nítidas, tecido medular constituído por tecido conjuntivo com boa vascularização e celularidade. Observamos áreas de remodelação óssea junto ao osso pré-existente com remodelação e aposição de tecido ósseo neoformado em direção centrípeta (figura 14). Ainda era possível notar a presença de partículas do material, que se apresentava com coloração mais escura que o osso neoformado. Estas partículas preenchiam a cavidade óssea cirúrgica e se encontravam circundadas por tecido conjuntivo fibroso (figura 15). Observamos áreas sugestivas de aposição de tecido ósseo neoformado bem celularizado junto a estas partículas.

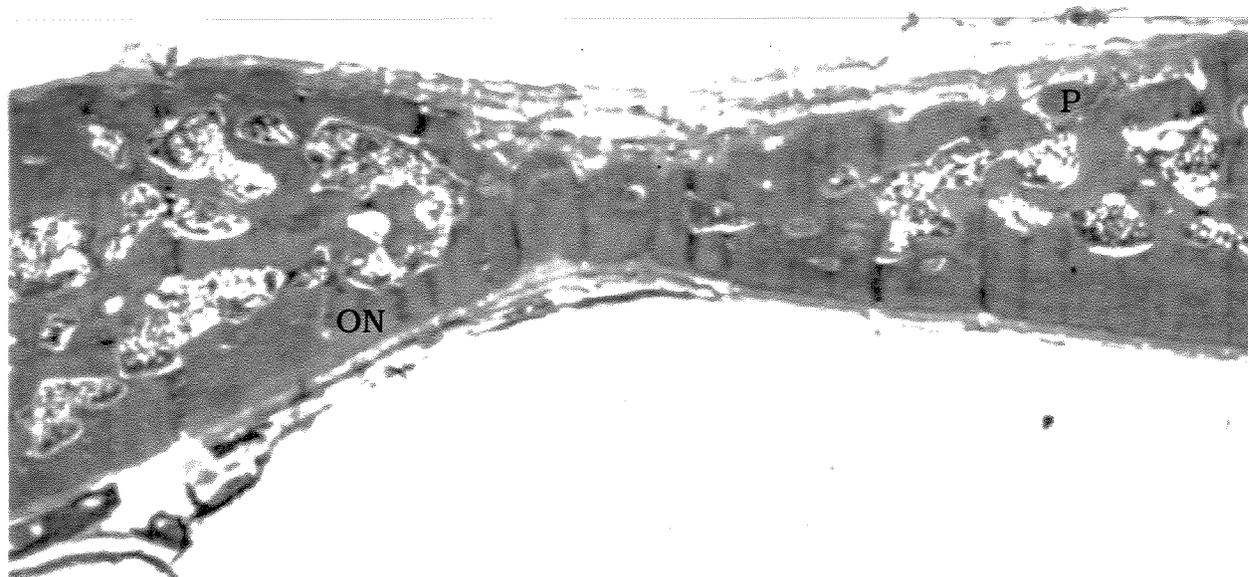


Figura 14 – Visão panorâmica da cavidade cirúrgica. Observar a presença de partículas (P) do material envolvido por osso neoformado (ON). Grupo osso desmineralizado, 07 semanas. H.E. objetiva 1,0x.

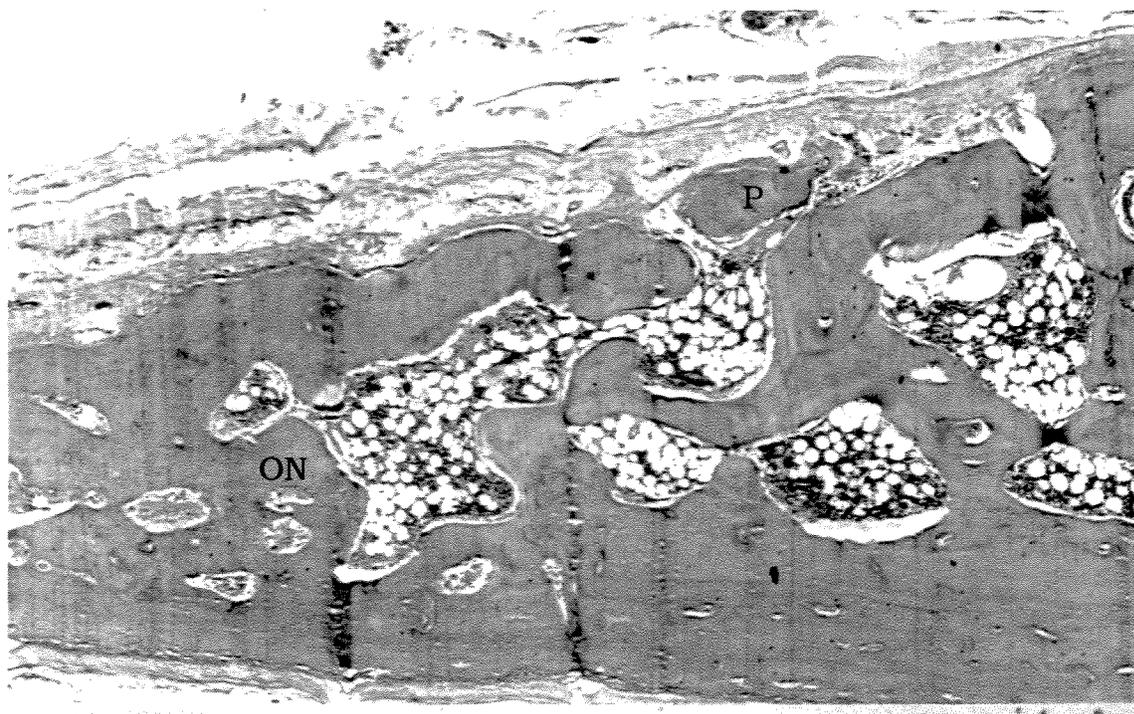


Figura 15 – Visão aproximada da relação do osso neoformado (ON) e partículas (P) do material. Grupo osso desmineralizado, 07 semanas. H.E. objetiva 4,0x.

PERÍODO DE QUINZE SEMANAS

Grupo – Controle

O limite entre a margem da cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente podia ser identificado na porção periférica das amostras, onde existiam duas corticais nítidas e tecido medular constituído por tecido conjuntivo com boa celularidade e vascularização, caracterizando o tecido ósseo pré-existente. Partindo das margens da cavidade existiam áreas de remodelação e aposição de osso neoformado que tendiam ao afilamento e, cresciam em direção centrípeta (figura 16).

Observamos na região mais central da cavidade óssea cirúrgica, grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso, porém, com maior quantidade de tecido ósseo neoformado (figura 17).

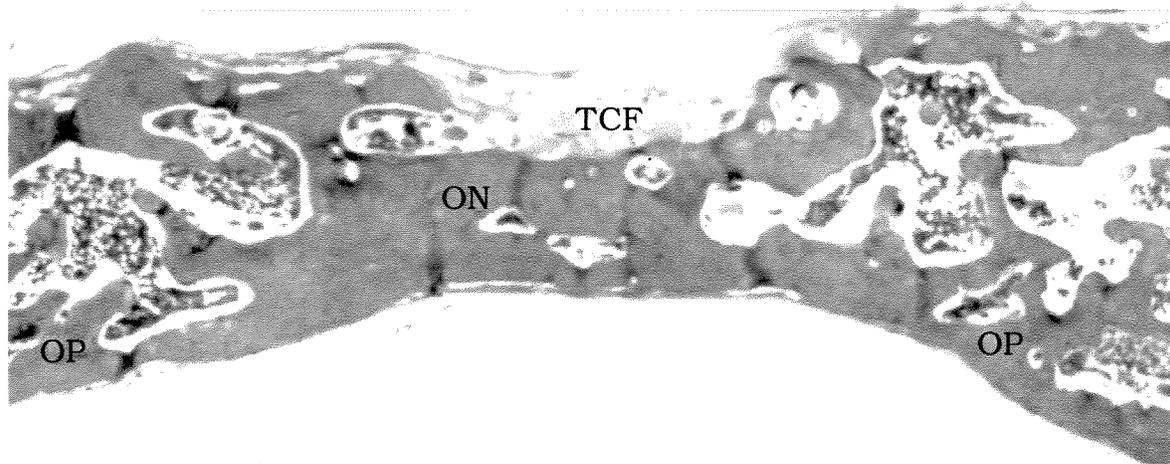


Figura 16 – Visão panorâmica da cavidade cirúrgica. Observar osso pré-existente (OP), osso neoformado (ON) e tecido conjuntivo fibroso (TCF) preenchendo a porção mais superior do defeito. Grupo controle, 15 semanas. H.E. objetiva 1,0x.

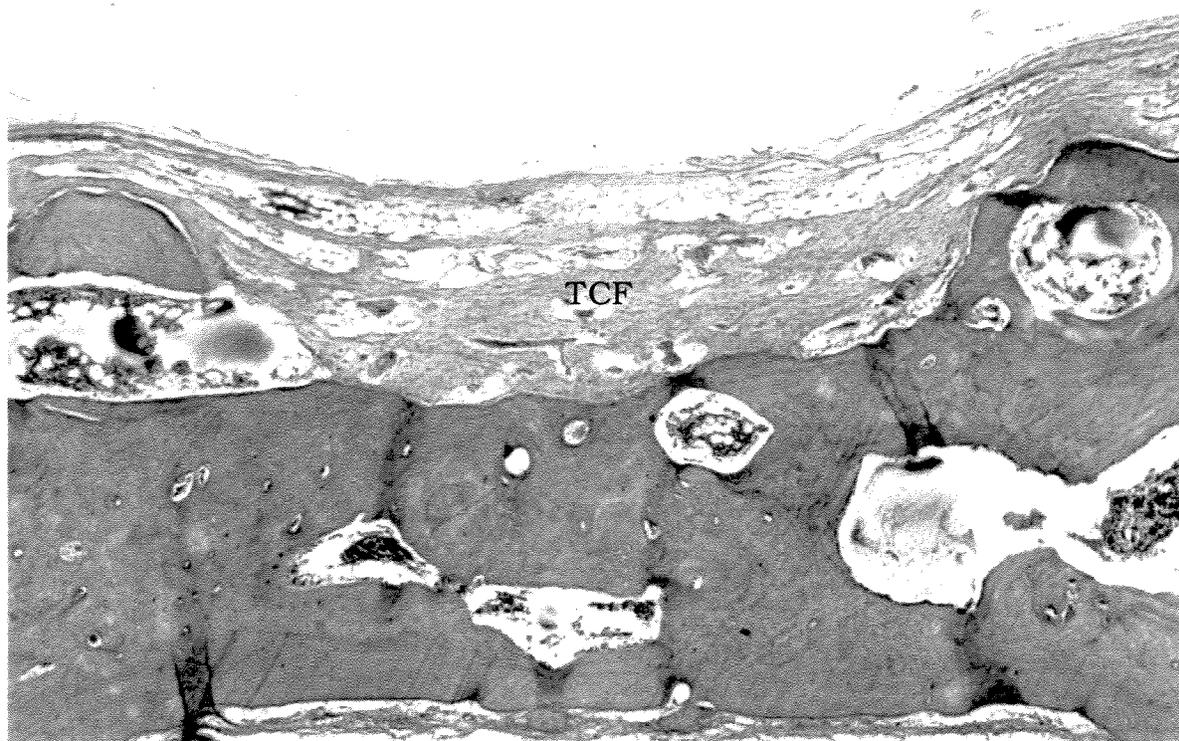


Figura 17 – Visão aproximada da penetração do tecido conjuntivo fibroso (TCF) no defeito cirúrgico. Grupo controle, 15 semanas. H.E. objetiva 4,0x.

PERÍODO DE QUINZE SEMANAS

Grupo I – Polímero de mamona

O limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso preexistente não apresenta-se definido em algumas áreas. Na periferia, o osso pré-existente era bem visualizado, caracterizado pela presença de duas corticais bem nítidas, tecido medular constituído por tecido conjuntivo com rica celularidade e vascularização (figura 18). As margens deste tecido ósseo apresentam-se unidas com áreas de remodelação e neoformação óssea. O tecido conjuntivo fibroso visualizado na porção mais superior do tecido com uma maior concentração na região mais central.

A cavidade óssea cirúrgica não apresentava mais partículas do material. Estas foram totalmente substituídas por tecido ósseo (figura 19).

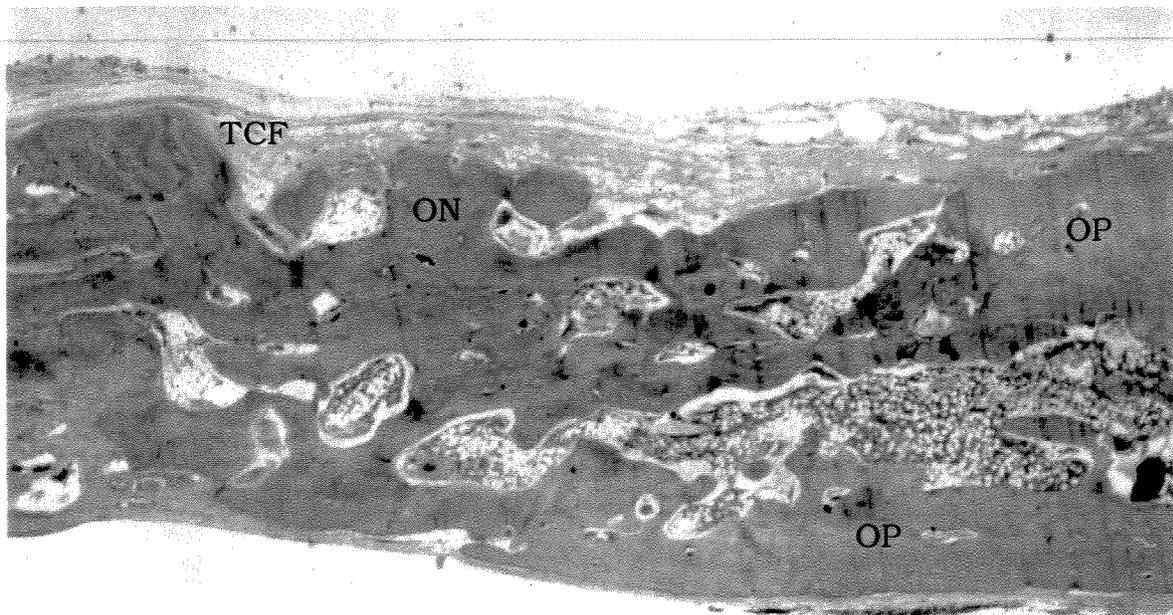


Figura 18 – Visão panorâmica da cavidade cirúrgica. Observar o osso pré-existente(OP) com duas corticais bem distintas, o osso neoformado(ON) e o tecido conjuntivo fibroso(TCF). Grupo polímero de mamona, 15 semanas. H.E. Objetiva 1,0x.

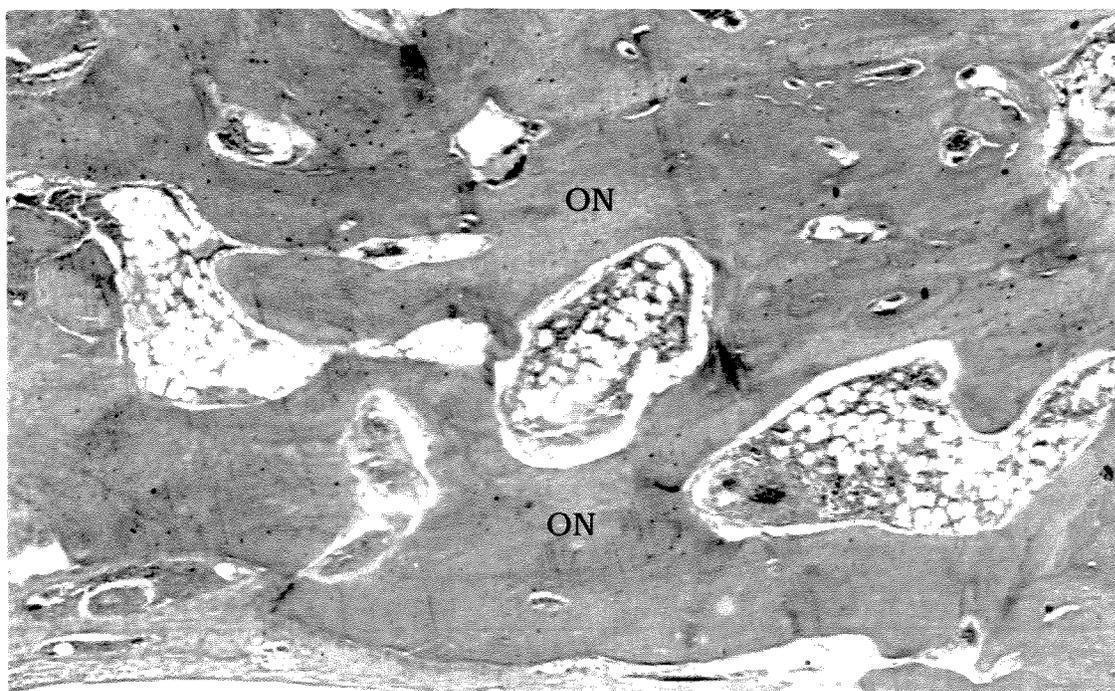


Figura 19 – Numa visão mais aproximada, observa a presença de tecido ósseo neoformado (ON) em fase avançada de organização. Grupo polímero de mamona, 15 semanas. H.E. objetiva 4,0x.

PERÍODO DE QUINZE SEMANAS

Grupo II – Osso desmineralizado

Neste grupo tornou-se mais difícil a individualização da região limite entre o osso pré-existente, o osso neoformado e o material enxertado. Entretanto, esta porção periférica da cavidade óssea cirúrgica apresentava tecido conjuntivo fibroso. As trabéculas do osso neoformado ocupavam a maior parte da cavidade óssea cirúrgica, porém, no centro, na porção mais superior, da cavidade observamos ainda a presença de tecido conjuntivo fibroso (figura 20).

As partículas do material foram totalmente reabsorvidas e substituídas por tecido ósseo (figura 21).

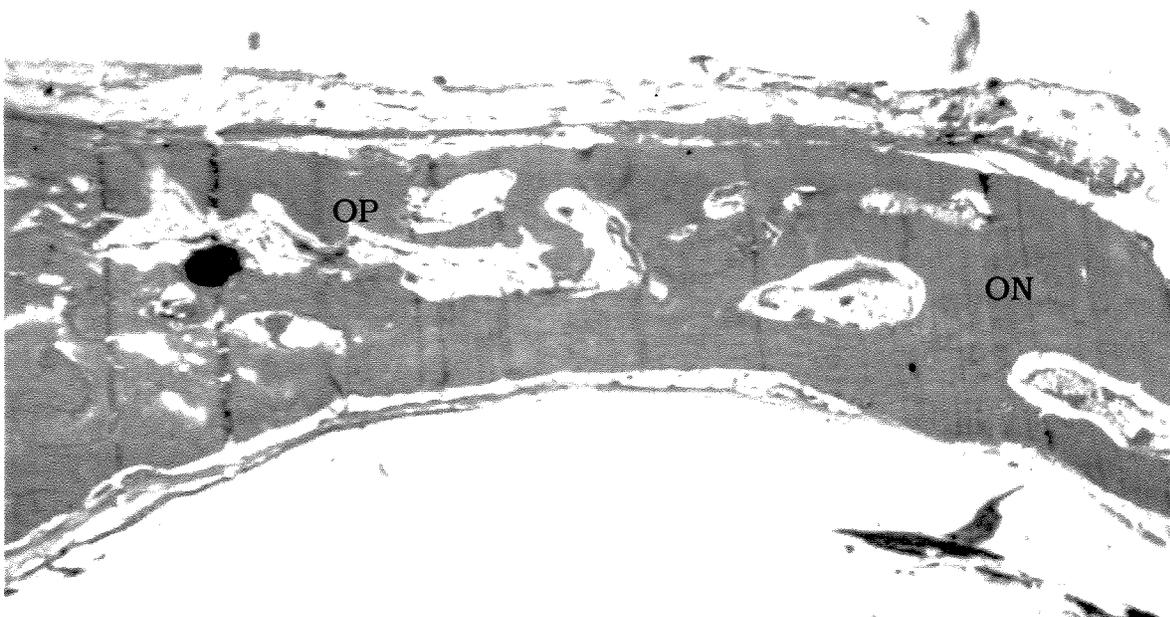


Figura 20 – Visão panorâmica da cavidade cirúrgica. Observar osso pré-existente (OP) e osso neoformado(ON) e difícil determinação entre estes. Grupo osso desmineralizado, 15 semanas. H.E. objetiva 1,0x.

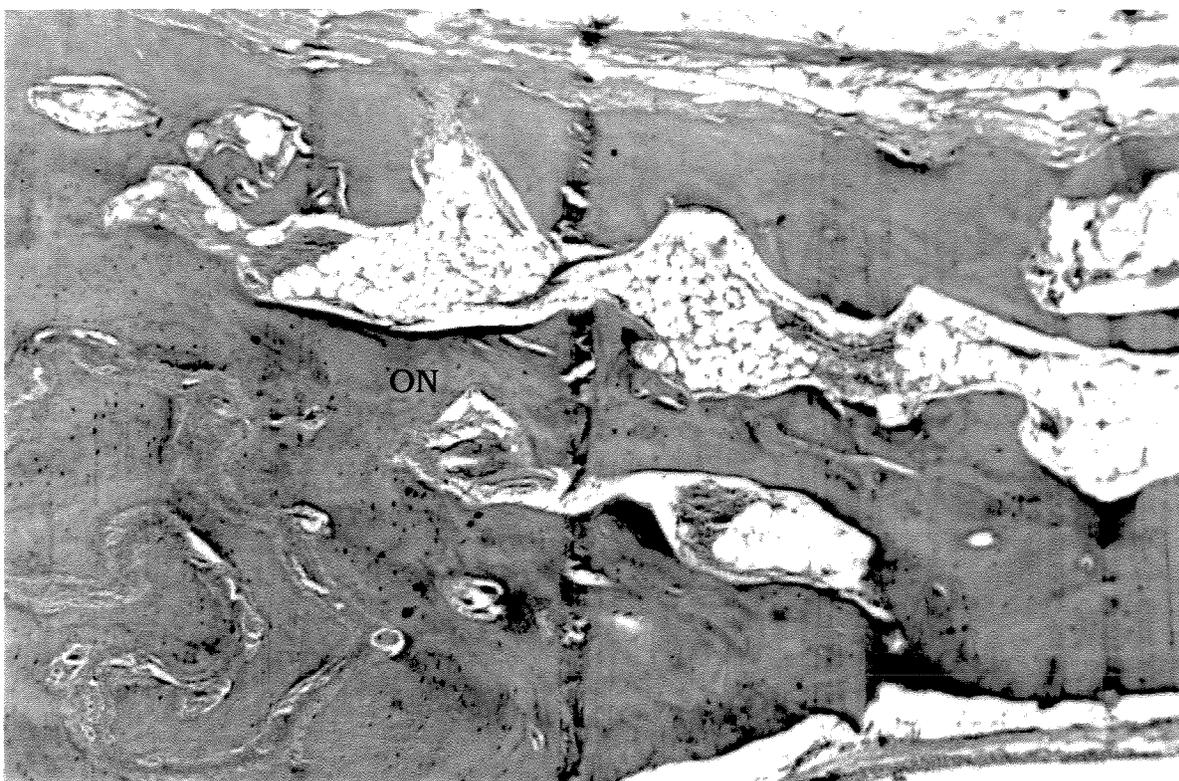


Figura 21 – Observar por osso neoformado(ON) em organização após completa substituição das partículas do material. Grupo osso desmineralizado, 15 semanas. H.E. objetiva 4,0x.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo das suposições revelou que nenhum dado foi violado e que a análise de variância foi executada sem a necessidade de correções nos dados.

Tabela 1. Quadro de análise de variância para estudo dos fatores tempo e materiais sobre a formação de osso.

Variável dependente: Formação de osso

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor F	Pr > F
MATERIAL	2	2898.92562230	1449.46281115	7.81	0.0014
TEMPO	2	650.03287658	325.01643829	1.75	0.1870
MATERIAL*TEMPO	4	1434.91624610	358.72906152	1.93	0.1244
Resíduo	39	7240.60820106	185.65662054		
Total Corrigido	47	11929.10185185			
	R-Square	C.V.	Root QMR	LSAL_COL Mean	
	0.393030	49.67303	13.62558698	27.43055556	

No quadro de análise de variância anterior, observa-se que somente há efeito significativo do material. Não há indícios para se afirmar que exista efeito significativo do tempo ou da interação entre os tempos e os materiais.

Através deste resultado, sabe-se que deve-se proceder a comparação de médias de materiais através do teste de Tukey.

Comparação de Médias de Materiais

Tabela 2. Médias e desvios padrão dos dados originais (não transformados) e resultado do teste de Tukey com nível de significância de 5% apresentando letras iguais ao lado de médias de materiais que não diferem significativamente entre si.

Material	Número de Observações	Média	Desvio Padrão
Aug-Ex	12	35,1667	18,0613
Dembone	12	34,2222	11,9893
Controle	24	19,1667	12,9563

Observa-se na Tabela 2 que há fortes indícios de que há diferença entre as médias verdadeiras do tratamento *controle* e dos outros dois. O gráfico 1 ilustra a comparação entre as médias de materiais.

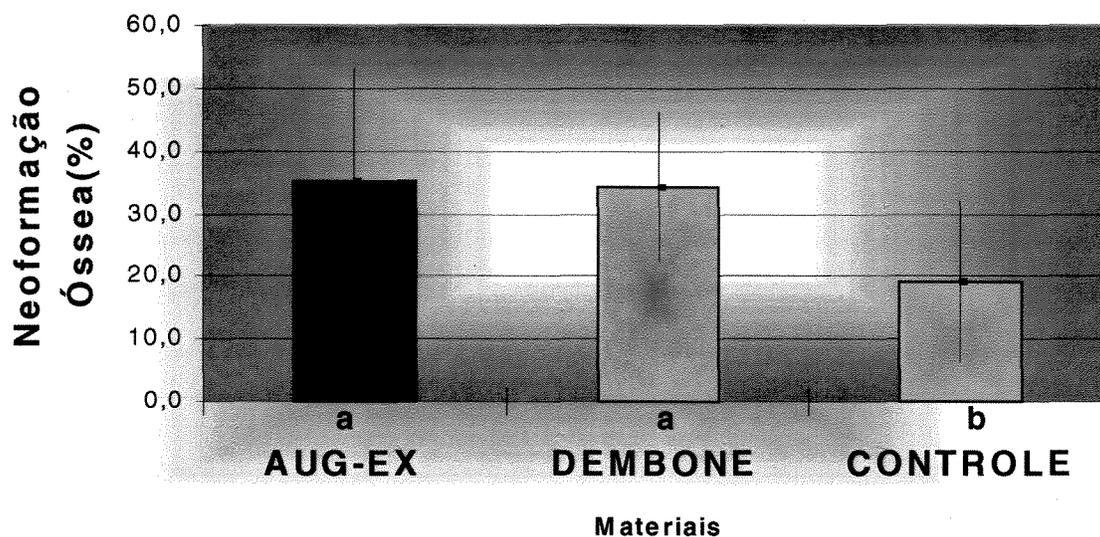


Gráfico 1. Comparação de médias formação de ossos dos materiais. Letras diferentes indicam existência de diferença estatística significativa entre materiais pelo teste de Tukey com nível de significância alfa de 5% ($\alpha=0,05$).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O interesse no estudo de materiais capazes de substituir o tecido ósseo tem aumentado nas profissões que compõem a área da saúde (IGNÁCIO *et al.*, 1996), principalmente na odontologia, onde o surgimento de tratamentos com os implantes osseointegrados e uma maior conscientização da importância da reconstrução óssea nos pacientes submetidos a procedimentos mutiladores, tem levado a necessidade de se repor o tecido ósseo perdido com maior frequência que anteriormente (BUCKLEY, 1994).

Os enxertos ósseos aparecem como a primeira opção por representarem uma solução mais biológica para o problema (IGNÁCIO *et al.*, 1996). Dentre estes, os melhores resultados são credenciados ao osso autógeno, e isto é justificado pela ausência de antigenicidade, mínima reação inflamatória, fácil revascularização, grande quantidade de células viáveis presente, e alto potencial de osseocondução e osseoindução (PIATELLI *et al.*, 1996; RABIE & LIE KEN JIE, 1996; RESTREPO *et al.*, 1998; KAWCAK *et al.*, 2000; RABIE & CHAY, 2000). Todavia, sua fonte não é inesgotável e sua obtenção exige abordagem cirúrgica da zona doadora, com todos os riscos inerentes a uma operação (YAMAMOTO *et al.*, 1993; IGNÁCIO *et al.*, 1996).

O uso de substitutos ósseos têm tido uma maior aceitação nos últimos anos, inicialmente, em virtude de uma melhora da variedade e utilidade destes materiais. Outro incentivo para os substitutos do tecido ósseo têm sido a sua utilização nos pequenos procedimentos de ganho ósseo, realizados em cirurgias pré-protéticas e para a colocação de implantes osseointegrados. Nestas situações estes materiais podem

evitar a remoção de osso autógeno ou complementar pequenos enxertos (BUCKLEY, 1994).

Dentre os substitutos ósseos derivados do tecido ósseo, optamos por utilizar nesta pesquisa o osso desmineralizado de origem humana por ser um dos mais utilizados na odontologia, por ser homogêneo (BARBOSA & LIMA, 1996), e um dos poucos, nesta categoria disponíveis comercialmente. Além de apresentar bons resultados reconhecidos cientificamente (MARINAK *et al.*, 1989; BARBOSA & LIMA, 1996; PIATELLI *et al.*, 1996; SCHWARTZ *et al.*, 1996; LA FONTAINE & PINTO, 1997; GARCIA, 1999; RABIE & CHAY, 2000). A discutível propriedade do osso desmineralizado de origem humana de promover a osseoindução é mais um dado importante para utilizarmos nesta pesquisa (PIATELLI *et al.*, 1996; SCHWARTZ *et al.*, 1996; LA FONTAINE & PINTO, 1997).

Uma outra categoria dos substitutos ósseos é a compostas pelos não derivados do tecido ósseo, como as cerâmicas (hidroxiapatita, tricálcio-fosfato), vidro bioativo, o sulfato de cálcio, os polímeros, dentre outros. Estes biomateriais são sintéticos desenvolvidos com objetivo de estimular e promover a regeneração óssea, evitando a utilização do enxerto ou mesmo minimizando seu uso (IGNÁCIO *et al.*, 1996). Nesta categoria destacamos os biopolímeros por apresentar, nos últimos anos, uma grande evolução científica (GARCIA JUNIOR, 2000). Dentre estes está a poliuretana derivada do óleo da mamona, que foi utilizada nesta pesquisa por ter seu desenvolvimento totalmente no âmbito nacional, de origem vegetal e por estas razões, de baixo custo (IGNÁCIO *et al.*, 1996). Ainda, por apresentar comprovação científica de biocompatibilidade (OHARA *et al.*, 1995; VILARINHO *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 1997a; COSTA *et al.*, 1997; SILVA, 1997; MAGRO FILHO *et al.*, 1998; KONIG Jr. *et*

al.,1999; CAVALIERI, 2000) e potencial de osseocondução (OHARA *et al.*,1995; OLIVEIRA *et al.*,1995; TEXEIRA *et al.*,1996; UEDA *et al.*,1996; CARVALHO *et al.*, 1997b; IGNÁCIO *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 1998; MAGRO FILHO *et al.*, 1998; KONIG Jr. *et al.*,1999; GARCIA JUNIOR, 2000).

No intuito de avaliar os diferentes materiais, que vem sendo desenvolvidos para auxiliar a regeneração óssea, vários métodos de pesquisa são utilizados. Segundo FRAME, 1980, um modelo animal ideal para a pesquisa de enxertos ósseos deve ser barato, de fácil disponibilidade e manuseio, e também apresentar uma região adequada com osso cortical e esponjoso que permita o preparo de cavidades ósseas de tamanho suficiente para a pesquisa. FRAME(1980) afirmou ser a calota craniana dos coelhos uma excelente região para estudos de substitutos ósseos com vistas a sua utilização nos maxilares. Isto é justificado pela similaridade existente entre abóbada craniana dos coelhos e os maxilares de humanos. Embriologicamente, ambos têm a mesma origem, intramembranosa (PAFF,1973). Morfologicamente, apresentam-se formados por duas corticais separadas por uma medular. E fisiologicamente, apresentam o mesmo padrão de regeneração (FRAME, 1980; SCHIMITZ & HOLINGER, 1986). KRAMER *et al.* (1968), estudando a regeneração óssea no crânio de coelhos, observou que o principal suprimento de células osteogênicas foi o tecido ósseo das margens do defeito. Fato que capacita a calvária de coelhos para estudos de substitutos ósseo, já que a interferência de periósteo é menor que em outras regiões do coelho ou mesmo em outros animais. Além de que, no caso específico, defeitos na calota permite a colocação dos materiais estudados, Osso desmineralizado e Polímero de mamona, que são disponíveis em grânulos, sem dispersão do material. Fato que poderia ocorrer em outras áreas como tibia ou mandíbula, por exemplo. Por outro lado, a confecção de

defeitos em mandíbulas de pequenos animais (camundongos, ratos, coelhos e cobaias) para o estudo da regeneração óssea não é indicado pela dificuldade de acesso cirúrgico (SCHIMITZ & HOLINGER, 1986).

As cavidades ósseas cirúrgicas na calvária de animais de laboratório são modelos de estudo bastante úteis no estudo da regeneração óssea. Este tipo de defeito ósseo é facilmente reproduzível, simples de ser realizado, rápido, seguro, e não requer estabilização (GARCIA, 1999). Nesta pesquisa foram confeccionadas cavidades de 10mm de diâmetro, tamanho inferior ao considerado crítico, de acordo com FRAME (1980). Este diâmetro utilizado para permitir que duas cavidades fossem confeccionadas na mesma calota. Os diversos períodos de sacrifício(4, 7 e 15 semanas) possibilitaram a avaliação da regeneração óssea em diversas etapas. Outra justificativa para o diâmetro utilizado é o objetivo principal do trabalho em comparar dois substitutos ósseos, e não, avaliar a regeneração óssea da calvária de coelhos perante a presença de um dos materiais estudados. Na literatura, encontramos pesquisas onde foram utilizados defeitos menores(KRAMER *et al.*, 1968; OLIVEIRA *et al.*, 1995; TAGA, 1998) ou de mesmo tamanho ou maiores (SCHIMITZ & HOLINGER, 1986; SCHIMITZ & HOLINGER, 1988; GARCIA, 1999), na calvária de coelhos, dos defeitos deste trabalho.

Os resultados demonstraram que mesmo ao final do maior período para sacrifício, 15 semanas após o preparo da cavidade, a regeneração óssea espontâneo não foi suficiente para promover a regeneração óssea completa entre as bordas das cavidades controle. Isto vem a corroborar com os resultados encontrados por outros autores quando a cavidade não recebe qualquer tratamento específico, a não ser irrigação e preenchimento com o sangue do próprio animal (GLOWACKI *et al.*, 1981; SCHIMITZ & HOLINGER, 1988; SOLHEIM *et al.*, 1992; DUPOIRIEUX *et al.*, 1994;

RABIE & LIE KEN SIE, 1996). Com isto, a regeneração óssea encontrado nas cavidades experimentais deste trabalho pode ser relacionado ao preenchimento das cavidades com matriz óssea desmineralizada e o polímero de mamona. Apesar de não serem consideradas defeitos ósseos críticos, as cavidades ósseas cirúrgicas realizadas neste estudo apresentavam um diâmetro que permitiu avaliar a capacidade de regeneração dos substitutos ósseos utilizados.

No intervalo de quatro semanas, período inicial de avaliação do nosso trabalho foi possível identificar a presença de partículas do material rodeadas por tecido conjuntivo fibroso no interior da cavidade óssea cirúrgica, tanto no grupo polímero de mamona, quanto no grupo osso desmineralizado. Resultados semelhantes são descritos para o Polímero de Mamona(OLIVEIRA *et al.*, 1995; UEDA *et al.*, 1996) e para Osso Desmineralizado de origem humana (URIST, 1965; TAGA *et al.*, 1997; GARCIA, 1999). Porém, é bem visível a diferença no tamanho das partículas, onde as do Polímero de Mamona são maiores que as do Osso Desmineralizado. Este fato já era observado na visualização macroscópica na cirurgia inicial. Em ambos os grupos havia uma camada de tecido conjuntivo entre o osso pré-existente e o osso neoformado característica natural desta fase da regeneração (URIST, 1965; GARCIA, 1999). Também em ambos os grupos foi observado a presença de um processo inflamatório próximo as partículas. Fato observado por TAGA *et al.*, em 1997, em relação ao osso desmineralizado. Com relação a esta reação inflamatória visível nestes grupos, observamos que ela foi maior no grupo Osso Desmineralizado. Os dois grupos experimentais apresentaram maior formação óssea, menor quantidade de tecido conjuntivo e uma menor reação inflamatória quando comparados ao grupo controle.

Estes dados mostram a influência favorável dos materiais estudados na regeneração óssea.

No período de sete semanas, em ambos os grupos, Polímero de Mamona e Osso Desmineralizado, observou-se partículas dos materiais envolvidos por tecido conjuntivo fibroso e osso. Fato que também foi observado por GARCIA (1999) em relação ao osso desmineralizado, e por UEDA *et al.*(1996), avaliando o polímero de mamona. No nosso estudo podemos afirmar que ocorreu uma maior reabsorção das partículas no grupo Osso Desmineralizado quando comparado com o grupo Polímero de Mamona. Uma maior neoformação óssea foi observado no grupo osso desmineralizado em relação ao Polímero de Mamona, inclusive com união das margens em alguns cortes histológicos. Como no período anterior, o grupo Controle caracterizou-se por uma maior quantidade de tecido conjuntivo fibroso em relação aos demais grupos.

Após quinze semanas uma formação quase que completa foi observada em todos os grupos. Com união total das margens nos grupos experimentais e união óssea no grupo Controle por afilamento do osso neoformado com deposição de tecido conjuntivo fibroso na porção mais superior do defeito. As partículas tanto no grupo Osso Desmineralizado como no Polímero de Mamona eram visíveis, apesar de em pequeno número e na maioria das vezes rodeadas de tecido ósseo neoformado.

Nos grupos Osso Desmineralizado e Polímero de Mamona, a neoformação óssea ocorreu principalmente a partir da periferia, das bordas do osso pré-existente, para o centro, diferente de multifocos de ossificação que é uma característica que ocorre no processo de osseoindução. As matrizes ósseas desmineralizadas utilizadas neste experimento parecem ter funcionado como arcabouço para a neoformação óssea.

Desta forma, achamos correto afirmar que a regeneração óssea nas cavidades experimentais destes grupos ocorreu em função da osseocondução. Por outro lado, no período de sete semanas encontramos, em algumas amostras do grupo Osso Desmineralizado, tecido ósseo neoformado no centro das cavidades circundado por tecido conjuntivo denso. Este tecido ósseo não estava diretamente em contato com as projeções de osso neoformado a partir das bordas da cavidade, sugerindo que a neoformação tenha ocorrido de forma multifocal. Além disso, algumas lacunas de reabsorção estavam presentes na superfície de partículas da matriz sugerindo atividade osteoclástica, e outras partículas apresentavam células semelhantes á osteoblastos sugerindo aposição de tecido ósseo neoformado, conforme descrito por URIST (1965), GLOWACKI *et al.* (1981) e MARINAK *et al.* (1989).

SHIGEYAMA *et al.* (1995) observaram, analisando proteínas ósseas morfogenéticas extraídas de enxertos ósseos obtidos comercialmente, uma menor habilidade na indução de proliferação celular, quando comparadas com as proteínas obtidas de osso humano fresco. Justificam este fato através da remoção dos fatores que atuam na promoção de proliferação celular ou pela alteração dos processos laboratoriais que podem alterar de alguma forma as atividades biológicas da matriz. Observação que contradiz as afirmações de URIST(1965) que acreditava que o processo de liofilização não poderia inibir a capacidade da matriz óssea desmineralizada em promover osseoindução.

SCHWARTZ *et al.*, em 1996, avaliaram a atividade osseoindutiva de matrizes ósseas desmineralizadas, obtidas de diferentes bancos de tecidos, e de diferentes lotes do mesmo banco de tecido. Os autores demonstraram uma grande variedade na

habilidade das matrizes em promover osseoindução, mesmo em lotes diferentes da matriz adquirida de um só banco de tecidos.

A possibilidade de osseoindução no grupo Polímero de Mamona não deve ser levado em conta, visto que, em nenhum momento foi observado focos de ossificação no centro da cavidade sem contato com as margens do defeito.

De forma geral, observamos, através da análise histológica, que os materiais testados influenciaram positivamente na neoformação óssea dos defeitos melhorando-a em qualidade e quantidade, quando comparado com o grupo Controle. Em ambos os grupos experimentais a osseodução foi a via responsável para a regeneração. O osso desmineralizado apresentou comportamento semelhante ao que encontramos em outros estudos (TAGA *et al.*, 1997; GARCIA, 1999). Estes resultados mostraram-se diferentes dos encontrados por GLOWACKI *et al.* (1981), onde 100% das cavidades preenchidas por uma matriz óssea desmineralizada, estavam completamente preenchidas pelo tecido ósseo neoformado após 2 semanas. Contudo, as cavidades ósseas cirúrgicas destes dois experimentos foram realizados na calvária de ratos e apresentavam apenas 4mm de diâmetro.

OLIVEIRA *et al.* (1995), TEXEIRA *et al.*(1996), UEDA *et al.*,(1996) e CARVALHO *et al.*(1997a) encontraram, em seus estudos com o polímero de mamona, resultados semelhantes ao desta pesquisa, neoformação óssea por osseodução e mínima reação inflamatória. Com relação a reabsorção, em nosso trabalho, o polímero de mamona praticamente foi reabsorvido ao final das quinze semanas. IGNÁCIO *et al.*, em 1997, após produzir defeitos ósseos e substituí-los por bastões de polímero de mamona em raios de 34 coelhos observou a substituição quase que completa do polímero por osso. No grupo de 16 semanas as duas extremidades ósseas(distal e

proximal) praticamente uniram-se na região central. Já OLIVEIRA *et al.*,1995; UEDA *et al.*,1996; CARVALHO *et al.*,1997b não observaram reabsorção total ou quase que total em seus estudos. Porém, OLIVEIRA *et al.*,1995 e UEDA *et al.*,1996, utilizaram tibia de coelho e só avaliaram até 40 dias. CARVALHO *et al.*,1997a fizeram a última análise com seis semanas do procedimento inicial. Todos com períodos de observação menores do que utilizamos.

Com o objetivo de proporcionar uma maior comparação entre os materiais de estudo utilizamos a análise histométrica. Visto que análise histométrica é capaz de quantificar a neoformação óssea(KLEINSCHMIDT *et al.*1993; SCHMITZ & HOLINGER, 1988; LEWANDROWSKY *et al.*,1999).

A análise estatística das medidas histométricas em relação ao volume de osso neoformado no interior dos defeitos revelou, através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle. Isto mostra a importância do preenchimento dos defeitos com tecido ósseo ou algum tipo substituto para uma regeneração óssea com maior quantidade.

Quando compararam-se as médias dos grupos experimentais entre si não houve diferença estatisticamente significativa. Apesar de, numericamente, o grupo Polímero de Mamona ter apresentado uma maior média que o Osso Desmineralizado. Frente a este resultado podemos supor que, talvez uma amostra maior ou a utilização de um número maior de avaliações neste intervalo de quinze semanas, possibilitaria uma diferença significativa.

Por fim, na regeneração óssea, o uso de substitutos ósseos osseocondutores é contra-indicado na regeneração de grandes defeitos. DUGUY *et al.*(2000) justificam

Isto em virtude do crescimento ósseo, neste tipo de material, ser limitado a periferia do implante. Por isto, VANDERSTEENHOVEN & SPECTOR, (1983) e LEWANDROWSKY *et al.*,(1999) sugerem a combinação de uma matriz osseocondutora com materiais osseoindutores, como os fatores de crescimento para se obter uma regeneração óssea completa.

CONCLUSÕES

Dentro do propósito deste estudo, e com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

1. A matriz óssea desmineralizada de origem humana foi reabsorvida mais rápida que a poliuretana derivada do polímero da mamona, conforme observado, na análise histológica, nos períodos de 4, 7 e 15 semanas.
2. Histologicamente, tanto o grupo controle quanto os grupos experimentais (I e II) apresentaram um aumento na neoformação óssea ao longo do tempo.
3. Na análise histométrica, os grupos experimentais apresentaram uma neoformação óssea estatisticamente maior que o grupo Controle.
4. Entre os grupos Osso Desmineralizado e Polímero de Mamona não houve diferença estatisticamente significativa quando observada a neoformação óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALBERIUS, P.; ISAKSSON, S.; KLINGE, B.; SJOGREN, S.; JONSSON, J. Regeneration of cranial suture and bone plate lesions in rabbits. **J Craniomaxillofac Surg.**, v.18, n.6, p.179 - 271, Aug., 1990.
2. ALBERIUS, P.; JOHNELL, O. Repair of intramembranous bone fractures and defects in rats. Immunolocalization of bone and cartilage proteins and proteoglycans. **J Craniomaxillofac Surg.**, v.19, n.1, p.15-20, Jan., 1991.
3. ALBERIUS, P.; KLINGE, B.; ISAKSSON, S. Management of craniotomy in young rabbits. **Lab Anim.**, v.23, n.1, p.70-72, 1989.
4. ARMES, J. R.; RYAN, D. E.; MAKI, K.A. The autogenous particulate cancellous bone marrow graft in alveolar clefts - A report of forty-one cases. **Oral Surg.**, v.51, n.6, p.588-591, Jun., 1981.
5. BAKKER, D.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; HESSENLING, S.C.; KOERTEN, H.K.; KUIJPERS, W.; GROTE, J.J. Biocompatibility of a polyester urethane, polypropilene oxide and polyester copolymer. a quantitative and qualitative study of three alloplastic three allopastic tympanic membrane materials in the rat middle ear. **J Biomed Mater Res.**, New York, v.24, n.4, p.489-515, Apr., 1990.

* De acordo com a NBR-6023, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de 2000. Abreviaturas dos periódicos de acordo com o "*Index Medicus*".

6. BALHSI, T. J.; MAGID, M. J. Mandibular rehabilitation: a case study using inferior cadaver graft. **Int J Oral Maxillofac Implant.**, Lombard, v.10, n.5, p.589-594, Sep.-Oct., 1995.
7. BARBOSA, E. P.; LIMA, J. H. C. Ossolofilizado – critérios para escolha com segurança. **Rev Bras Implantodont**, v.2, p.17-18, jan.-fev., 1996.
8. BECKER, W.; SCHENK, R.; HIGUCHI, K.; LEKHOLM, U.; BECKER, B. E. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: A study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, Lombard, v.10, n.2, p.143-154, Mar., 1995.
9. BOLANDER, M.E.; BALIAN, G. The use of demineralized bone matrix in the repair of Segmental defects. Aumentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. **J Bone Joint Surg**, Boston, v.68, n.8, p.1264-1274, Oct., 1986.
10. BOYNE, P. J. Induction of bone repair by various bone grafting materials. Hard tissue growth, repair and remineralizaion. **Ciba Found Symp** v.11, p.121, 1973.
11. BOYNE, P.J.; MARX, R.E.; NEVINS, M.; TRIPPLET, G.; LAZARO, E.; LILLY, L. C.; ALDER, M.; NUMMIKOSKI, P. A feasibility study evaluating rhBMP-2 / absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. **Int J Periodontics Rest Dent.**, v.17, n.1, p.11-25, Feb., 1997.

12. BUCKLEY, M. Bone Substitutes. In: **Selected Readings in Oral and Maxillofacial Surgery**, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, 1994. V. 4.
13. CALIARI, M. V.: Princípios de morfometria digital KS 300 para principiantes. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1997, 120p.
14. CARVALHO, P. S. P.; MORAES JUNIOR, E. F.; CAMARINI, E. T. Avaliação histológica de biomateriais em defeitos ósseos associado a implantes osseointegrados. In: REUNIÃO DA SBPqO, 15, 1998. São Pedro(SP). **Anais...** São Pedro(SP), 1998. p.83
15. CARVALHO, T. L.; ARAÚJO, C. A.; TEÓFILO, J. M.; BRENTGANI, L. G. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, Philadelphia, v.26, n.2, p.149-152, Apr., 1997.a
16. CARVALHO, T. L.; TEÓFILO, J. M.; ARAÚJO, C. A.; BRENTGANI, L. G. Chronology of alveolar healing following immediate implantation of ricinus communis polyurethane resin: histometric analysis in rats. **J Biomed Mater Res.**, New York, v.37, n.4, p.449-452, Dec., 1997.b
17. CAVALIERI, I. **Estudo do processo de reparação óssea entre os implantes de polímero de mamona, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo, em tibia de coelhos.** 2000. 108p. TESE (Mestrado) Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, São José dos Campos, 2000.
18. Chierici, G. 2000[comunicação pessoal]

19. COCHRAN, D. L.; JONES, A. A.; LILLY, L. C.; FIORELLINI, J. P.; HOWELL, H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. **J Periodontol.**, Chicago, v.71, n.8, p.1241-1257, Aug., 2000.
20. COSTA, C. A. S.; MARCANTONIO, R. A. C.; HEBLING, J.; TEIXEIRA, H. M.; KURAMAE, M. Biocompatibilidade do polímero de poliuretana vegetal derivada do óleo de mamona em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol. Avaliação histopatológica de implantes subcutâneos de ratos. **Odonto 2000** v.1: p.44, 1997.
21. DAHLIN, C. A origem científica da regeneração óssea guiada. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. **Regeneração óssea guiada na implantodontia**. São Paulo: Santos Editora, 1996. p.31-48.
22. DRURY, G.I.; YUKNA, R. A. Histologic evaluation of combining tetracycline and allogeneic freeze-dried bone on bone regeneration in experimental defects in baboons. **J Periodontol**, Chicago, v.62, n.11, p.652-658, Nov., 1991.
23. DUGUY, N.; PETITE, H.; ARNAUD, E. Biomaterials and osseous regeneration. **Ann Chir Plast Esthet**, v.45, n.3, p.364-376, Jun., 2000.
24. DUPOIRIEUX, L.; COSTES, V.; JAMMET, P.; SOUYRIS, F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, Philadelphia, v.23, n.6,pt.2, p.395-398, Dec., 1994.

25. ELLIS III, E; SINN, D. P. Use of homologous bone in maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg.**, Philadelphia, v.51, n.11, p.1181-1193, Nov., 1993.
26. FERREIRA, C. M.; BONIFÁCIO, K. C.; FRÖNER, I. C. Avaliação da atividade antimicrobiana de soluções irrigantes em dentes com necrose pulpar. In: REUNIÃO DA SBPqO, 13, 1996. São Pedro(SP). **Anais...** São Pedro(SP), 1996. p.118.
27. FIORELLINI, J. P.; NEVINS, M. Bone regeneration. Repair and regeneration of oral tissues: the molecular approach. **Postgrad Dent** v.3, n.2, p.3-8, Feb., 1996.
28. FRAME, J. H. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J Oral Surg**, v.38,n. , p.176-180, Mar. 1980.
29. FREEMAN, E.; TURNBULL, R. S. The value of osseous coagulum as a graft material. **J_Periodont Res** v.8, n.4, p.229-236, Apr., 1977.
30. GARBIN, C. M. ; GARBIN, N. M. **Enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada: Noções básicas.** São Paulo: , Pancast, 1994. 97p.
31. GARCIA JUNIOR, I. R. **Avaliação experimental de três diferentes tipos de implantes: polímero de Mamona, polietileno de alta densidade – Medpor e Matriz óssea bovina, no preenchimento de defeitos ósseos maxilares. Estudo histológico e histométrico em macacos.** 2000. 73p. Tese(Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Araçatuba(SP), 2000.

32. GARCIA, R. R. **Comparação de matrizes ósseas desmineralizadas sobre o processo de regeneração óssea. Estudo histológico em calvária de coelhos.**1999.126p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, Piracicaba(SP), 2000.
33. GETTER, L.; BHASKAR, S. N.; CUTRIGHT, D. E.; PEREZ, B.; BRADY, J. M.; DRISKELL, T. D.; O'HARA, M. S. Three biodegradable calcium phosphate slurry implants in bone. **J Oral Surg.**, v.30, n.5, p.263-268, May, 1972.
34. GLOWACKI, J.; ALTOBELLI, D.; MULLIKEN, J. B. Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. **Calcif Tissue Int.**, v.33, n.1, p. 71 -76, Jan., 1981.
35. GOLDBERG, V. M.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clin Orthop.**, Philadelphia, v.225, n.1, p.7-16, Dec., 1987.
36. HENNING, E.; JOHN, A.; ZARTNANACK, F.; LEMM, W.; BUCHERL, E.S.; WICK, G.; GERLACH, K. Biostability of polyurethane. *Exp Chir Transplant Kunstliche Organe* 22:204, 1989. Apud OHARA, G.H.; KOJIMA, K. E.; ROSSI, J. C.; TELLES, M.; SOARES, T. V. C.; SALOMÃO, C.; SANDA, M.: Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Ortop Bras** v.3, n.2, p.62-68, abr./jun., 1995.
37. HOLLINGER, J. O.; SCHMITZ, J. P. Restoration of bone discontinuities in dogs using a biodegradable implant. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v.45, n.7, Jul., p.594-600, 1987.

38. HOWELL, T. H.; BUSER, D.; FIORELLINI, J.; STICH, H. Effect of bone morphogenetic protein on bone healing around endosseous implants. A pilot study in beagles dogs. **J Dent Res.**, Washington, v.74, n.1, p.415-419, Jan., 1995.
39. IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; CHIERICI, G. Estudos sobre a aplicabilidade médica da poliuretana derivada da mamona. **Res Ortop**, v.2, n.1, p.10-15, mar., 1996.
40. IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; CHIERICI, G.: Uso da poliuretana derivada do óleo de mamona para preencher defeitos ósseos diafisário segmentares do rádio. Estudo experimental em coelhos. **Rev Bras Ortop**, v.32, n.1, p.815, 1997.
41. ISAKSSON, S.; ALBERIUS, P. Comparison of regenerative capacity elicited by demineralized bone matrix of different embryonic origins. **J Craniomaxillofac Surg.**, v.20, n.2, p.73-80, Feb./Mar., 1992.
42. JERGESEN, H. E.; CHUA, J.; KAO, R. T.; KABAN, L. B. Age effects on bone induction by demineralized bone powder. Related Research. **Clin. Orthop**, Philadelphia, v.268, n.4, p.253-259, Jul., 1991.
43. KAWCAK, C. E.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E.; PARK, R. D.; TURNER, A. S. Comparison of bone healing by demineralized bone matrix and autogenous cancellous bone in horses. **Vet Surg.**, v.29, n.3, p.218-226, May-Jun, 2000.

44. KLEINSCHMIDT, J. C.; MARDEN, L. J.; KENT, D.; QUIGLEY, N.; HOLLINGER, J. O. A multiphase system bone implant for regenerating the calvaria. **Plast Reconst Surg.**, Baltimore, v.91, n.4, p.581-588, Apr., 1993.
45. KONIG Jr., B; FORGER, S. E.; MASCARO, M. B.; BECK, T. J. Biocompatibility of the castor bean inserted into the alveolar bone of the dog. **Anat Anaz.**, v.181, n.6, p.581-584, Dec, 1999.
46. KRAMER, I. R.; KILLEY, H.C.; WRIGHT, H. C. A histological and radiological comparison of the healing of defects in the rabbit caviarium with or without implanted heterogenous anorganic bone. **Arch Oral Biol**, v.13, n.9, p.1095-1106, Sept., 1968.
47. LA FONTAINE, J.; PINTO, A. V. S. O que devemos saber sobre osso desmineralizado seco-congelado? **Rev APCD**, v.51, n.3, p.561-572, mar., 1997.
48. LEWANDROWSKI, K. U.; BONDRE, S.; GRESSER, J. D.; SILVA, A. E.; WISE, D. L.; TRANTOLO, D. J. Augmentation of osteoinduction with a biodegradable poly(propylene glycol-co-fumaric acid) bone graft extender. A histologic and histomorphometric study in rats. **Biomed Mater Eng.**, v.9, n.5/6, p.325-334, Aug., 1999.(a)
49. LEWANDROWSKI, K. U.; BONDRE, S.; GRESSER, J. D.; TOMFORD, W. W.; WISE, D. L.; TRANTOLO, D. J. Improved osteoconduction of cortical bone grafts by biodegradable foam coating. **Biomed Mater Eng.**, v.9, n.5/6, p.265-275, Aug., 1999.(b)

50. MAGRO FILHO, O. et al. Implante de polímero de mamona em cavidades cirúrgicas experimentais realizadas em tibia. Estudo histológico em ratos. **Rev Innovations Magazine**, v.2, n.2, p.10-14, Feb., 1998.
51. MARINAK, K. W.; MELLONIG, J. T.; TOWLE, H. J. The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. **J Periodont**, Chicago, v.60, n.1, p.12-18, Jan., 1989.
52. MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg**, v.85, n.6, p.638-646, Jun., 1998.
53. MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária. Farmacologia e técnicas** 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.105-110.
54. MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J.; KABAN, L. B.; FOLKMAN, J.; MURRAY, J. E. Use of demineralized allogenic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. **Ann Surg**, v.194, n.3, p.366-372, Sept., 1981.
55. NEVINS, M.; KIRKER-HEAD, C.; NEVINS, M.; WOZNEY, J. Á.; PALMER, R.; GRAHAM, D. Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Int J Period Rest Dent**, v.16, n.1, p.8-19, Feb., 1996.
56. OHARA, G. H.; KOJIMA, K. E.; ROSSI, J. C.; TELLES, M.; SOARES T. V. C.; SALOMÃO, C.; SANDA, M. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Ortop Bras**, v. 3, n.2, p.62-68, abr/jun, 1995.

57. OLIVEIRA, M. F.; UEDA, J. K.; REZENDE, D.; SCARSO FILHO, J. Estudo comparativo entre a reparação de um biomaterial baseado em poliuretana derivado do óleo de mamona e do osso autógeno implantados em sítios realizados na calvária de coelhos. In: Jornada acadêmica de Araraquara, 1995, Araraquara. **Anais...** Araraquara(SP), 1995, p.18.
58. OTA, K: Towards and ideal polyurethane graft for hemodialysis. **J Biomater Appl.**, v.4, n.2, p.141-157, Oct., 1989.
59. PAFF, G. H. **Anatomy of the head and neck.** Philadelphia. W. B. Saunders. 1973. 77p.
60. PETIT, J. C.; RIPAMONTI, U. Tissue segregation enhances calvarial osteogenesis in adult primates. **J Craniofac Surg.**, v.5, n.1, p.34-43, Feb., 1994.
61. PIATTELLI, A.; SCARANO, M.; CORIGLIANO, M.; PIATTELLI, M. Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. **Biomaterials.**, Oxford, v.17, n.11, p.1127-1131, Jun., 1996.
62. PROJETO PADCT – Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseados em poliuretanas derivadas do óleo da mamona. Edital SNM02194-04. São Carlos(SP): Departamento de Química e Física Molecular / Universidade de São Paulo, 1984.
63. RABIE, A. B. M.; LIE KEN JIE, R. K. P. Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bone matrix. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, Philadelphia, v.25, n.4, p.311-318, Aug., 1996.

64. RABIE, A. B.; CHAY, S. H. Clinical applications of composite intramembranous bone grafts. **Am J Orthod Dentofac Orthop** v.117, n.4, p.375-383, Apr., 2000.
65. REDDI, A. H.; HUGGINS, C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescents rats. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.69, n.6, p.1601-1605, Jun., 1972.
66. RESTREPO, L. L.; MARZOLA, C.; CONSOLARO, A.; COSTA PEREIRA, A. A.; TOLEDO FILHO, J. L.; ANDREO, J. C. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado "Osseobond[®]" e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado. **Rev Bras Implant**, v.4, p.8, 1998.
67. ROBERTS W. E.; SMITH, R. K.; ZILBERMAN, Y.; MOZSARY, P. G.; SMITH, R. S.: Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, Saint Louis, v.86, n.2, p.95-111, Aug., 1984.
68. SCHIMITT-FOURNIER, J. Á.; SERTL, G. O.; SKONDIA, V. The use of compatible orthopaedic polymer in the treatment of loose total hip protheses. **J Int Med Res**, v.17, n.3, p.254-261, May-Jun., 1989.
69. SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop**, Philadelphia, v.205, n.1, p.299-308, Apr., 1986.
70. SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. A preliminary study of the osteogenic potential of a biodegradable alloplastic-osteoinductive alloimplant. **Clin Orthop**, Philadelphia, v.237, n.7, p.245-255, Dec., 1988.

71. SCHWARTZ, Z.; MELLONIG, J. T.; CARNES JR, D. L.; DE LA FONTAINE, J.; COCHRAN, D. L.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. **J Periodontol**, Chicago, v.67, n.9, p.918-926, Sept., 1996 .
72. SCHWARTZ, Z; MELLONIG, J. T.; CARNES JR., D. L. et al Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. **J Periodontol** v.67,n.9, p.918-926, Sept., 1996.
73. SENN, N. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci*, v.98, p.219, 1889. Apud: MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J.; KABAN, L. B.; FOLKMAN, J.; MURRAY, J. E. Use of demineralized allogenic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. **Ann Surg**, v.194, n.3, p.366-372, Sept., 1981.
74. SHANAMAN, R. H. The use of guided tissue regeneration to facilitate ideal prosthetic placement or implants. **Int J Periodont Rest Dent**, v.12, n.4, p.256-265, Oct., 1992.
75. SHIGEYAMA, Y.; DÉRRICO, J. Á.; STONE, R; SOMERMAN, M. J. Commercially-prepared allograft material has biological activity in vitro. **J Periodontol**, Chicago, v.66, n.6, p.478-487, Jun., 1995.
76. SIGURDSSON, T. J. M.; NYGAARD, L.; TATAKIS, D. N.; FU, E.; TUREK, T. J.; JIN, L.; WOZNEY, J. M.; WIKESJÖ, U. M. E. Periodontal repair in dogs: Evaluation of rhBMP-2 carries. **Int J Periodont Rest Dent**, v.16, n.6, p.524-537, Dec., 1996.

77. SILVA, M. J. A. **Estudo radiográfico das imagens convencionais e digitalizadas do comportamento do tecido ósseo frente ao implante do polímero de mamona em coelhos.** 1997. 135p. Tese(Mestrado) – Faculdade de Odontologia / USP, Bauru(SP), 1997
78. SMETANA, K.; STOL, M.; KORBELÁR, P.; NOVAK, M.; ADAM, M. Implantation of p(HEMA)-collagen composite into bone. **Biomaterials**, Oxford, v.13, n.9, p.639-642, Sept., 1992.
79. SOLHEIM, E.; PINHOLT, E. M.; BANG, G.; SUDMANN, E. Regeneration of calvarial defects by a composite of bioerodible poliorthoester and demineralized bone in rats. **J Neurosurg**, v.76, n.2, p.275-279, Feb., 1992.
80. TAGA, R.; CESTARI, T.M.; SILVA, T.L.; STIPP, C.M. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. **Rev Bras Implant**, v.3, n.1, p.13-20, jan./fev. 1997.
81. TAKAHASHI, K. Bone morphogenetic protein. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v.116, n.4, p.232-240, Oct., 2000.
82. TEÓFILO, J. M.; ARAÚJO, C. A.; CARVALHO, T. L. L. Biocompatibilidade do polímero de *Ricinus communis* implantado no alvéolo de rato. . In: REUNIÃO DA SBPqO, 13, 1996, São Pedro(SP). **Anais...** São Pedro(SP), 1996, p.119.
83. TEXEIRA, H. M., VILARINHO, R. H., RAMALHO, L. T. O. Reação à resina de mamona no processo de reparo ósseo induzido no corpo da mandíbula. In: REUNIÃO DA SBPqO, 13, 1996, São Pedro(SP). **Anais...** São Pedro(SP), 1996, p.189.

84. TORIUMI, D. M.; KOTLER, H. S.; LUXENBERG, D. P.; HOLTROP, M. E.; WANG, E. A. Mandibular reconstruction with a recombinant human bone inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.117, n.10, p.1101-1112, Oct., 1991.
85. UEDA, J.K. et al. Implante de resina de poliuretana vegetal na câmara anterior do olho de camundongo. Estudo histológico In: REUNIÃO DA SBPqO, 13, 1996, São Pedro(SP). **Anais...** São Pedro(SP), 1996, p.122.
86. URIST, M. R. Bone: formation by autoinducing. **Science**, Washington, v.150, n.698, p.893-899, Nov., 1965.
87. VANDERSTEENHOVEN, J. J.; SPECTOR, M. Osteoinduction within porous polysulfone implants at extraosseous sites using demineralized allogenic bone matrix. **J Biomed Mater Res**, New York, v.17, n.5, p.793-806, Sept., 1983.
88. VILARINHO, R. H., HETEM, S., RAMALHO, L. T. O. Implante de resina de poliuretana vegetal na câmara anterior do olho de camundongo. Estudo histológico **Odonto 2000** v.1, n.00, p.25-29, mar., 1996.
89. YAMAMOTO, T. T.; KAWAKAMI, M.; SAKUDA, M. Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar clefts for testing bone-inductive agents. **J Oral Maxillofac Surg.**, Philadelphia, v.51, n.8, p.887-891, Aug., 1993.

90. ZAMBONIN, G., GRANO, M. Biomaterials in orthopaedic surgery: effects of different hydroxyapatites and demineralized bone matrix on proliferation rate and bone matrix synthesis by human osteoblast. **Biomaterials.**, Oxford, v.16, n.5, p.397-402, Mar., 1995.

APÊNDICE



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

708

Certificamos que o Protocolo nº 165, sobre Experimentação animal
de caráter científico, realizado em laboratório de pesquisa do
Departamento de Histologia e Embriologia do IB/UNICAMP
 sob a responsabilidade de Dr. Alberto de M. Souza Brito está de acordo
 com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de
 Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na
 Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 12/11/2001. Este
 certificado expira em 12/11/2002.

Campinas, 12 de Setembro de 2001

CERTIFICATE

We certify that the work described in the manuscript "....."
 ".....", is in agreement
 with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College for Animal
 Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of Biology/UNICAMP Ethics
 Committee for Animal Research (CEEA) on 12.11.2001, protocol nº 165. This certificate
 expires on 12.11.2002.

Alberto de M. Souza Brito
 Prof(a)/Dr(a) Alberto de M. Souza Brito
 Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Campinas 12/09/2001
Américo de Moraes L. Filho
 Prof(a) Dr(a)
 Secretário(a) - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
 INSTITUTO DE BIOLOGIA
 CENSO UNIVERSITÁRIO FERREIRO YAZ
 CEP 13081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE (019) 788.7116
 FAX (019) 309.3124