



UNICAMP



ROBSON RODRIGUES GARCIA

CIRURGIÃO-DENTISTA

**COMPARAÇÃO DE MATRIZES ÓSSEAS DESMINERALIZADAS
SOBRE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA.
ESTUDO HISTOLÓGICO EM CALVÁRIA DE COELHOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba - Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção de
grau de Mestre em Clínica Odontológica na
Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Piracicaba - SP

1999

ROBSON RODRIGUES GARCIA

CIRURGIÃO-DENTISTA

COMPARAÇÃO DE MATRIZES ÓSSEAS DESMINERALIZADAS

SOBRE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA.

ESTUDO HISTOLÓGICO EM CALVÁRIA DE COELHOS.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas para a obtenção de grau de Mestre em Clínica Odontológica na Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

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

Banca Examinadora: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça

Prof. Dr. Luis Augusto Passeri

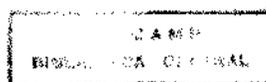
Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria-Barbosa

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/93

CCPG, 20/04/99
J. R. de Albergaria-Barbosa
Assinatura do Orientador

Piracicaba - SP

1999



15292166



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 22 de Fevereiro de 1999, considerou o candidato ROBSON RODRIGUES GARCIA aprovado.

1. Prof. Dr. JOSE RICARDO DE ALBERGARIA BARBOSA

2. Prof. Dr. ELISMAURO FRANCISCO DE MENDONÇA

3. Prof. Dr. LUIS AUGUSTO PASSERI

“Senhor, ao iniciar esta nova jornada,
peço a tua proteção.

Volta teus olhos para o caminho que ora vou trilhar,
estendendo a tua proteção sobre todos os meus
passos.”

DEDICO ESTE TRABALHO:

A **DEUS**, que sempre caminhou ao meu lado, e proporcionou-me as maiores riquezas de minha vida: meus pais **Florival** e **Nilse**, e minha irmã **Gabriella**, uma família maravilhosa.

À **Cristiane** por todo amor, compreensão, e confiança, dedicados ao nosso namoro mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa** pelo apoio e orientação neste trabalho com entusiasmo e paciência. Apenas algumas das qualidades de sua natureza humana.

Ao **Prof. Dr. Luis Augusto Passeri**, pela amizade, pela verdadeira preocupação com a nossa formação em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial, e a forma justa e sincera que nos ensinou a ser mestres.

Ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes** e ao **Prof. Dr. Renato Mazzonetto**, exemplos de conduta profissional e familiar, pelo notável interesse que vocês demonstram ao ensino universitário.

Ao **Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira** sou grato pela amizade, pelo crédito e incentivo constantes, fatores essenciais na minha formação científica e profissional.

À **Prof. Dra. Altair Del Bel Cury**, Coordenadora Geral da Pós-Graduação, pelo excelente trabalho que vem

sendo desenvolvido e a maneira carinhosa que nos recebeu nesta casa.

Ao **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes** pela orientação no laboratório de histologia, e a ajuda na documentação fotográfica dos resultados e na correção da dissertação.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques** pela ajuda com a correção deste trabalho no Exame Geral de Qualificação.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, em especial aos professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial: **Benedicto Latorraca, Hugo Alexandre de Souza, Paulo Barbosa de Andrade e Satiro Watanabe**. Meu respeito e minha gratidão pela amizade e pelas oportunidades como estagiário.

Aos meus amigos da pós graduação: **Alexandre, Cândida, Dinho, Edmur, Eider, José Flávio, Laureano, Luis e Marcelo**, pela união e companheirismo presentes nos

momentos difíceis e alegres do Curso. Minha sincera gratidão pelas coisas que me ensinaram ou que fizeram por mim.

Aos meus amigos **Bruno, Laureano e Paulo** pela convivência fraterna nestes dois anos distantes de nossas famílias.

Às funcionárias **Alda, Edilaine e Sueli**, pela ajuda no atendimento aos pacientes que procuram o Centro Cirúrgico da FOP.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa concedida em parte do período de realização deste trabalho através do processo nº 97/04123-5.

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

O desenvolvimento de materiais que possam induzir a neoformação de tecido ósseo perdido evita a necessidade de uma segunda cirurgia para obtenção de enxerto ósseo autógeno. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar histologicamente o efeito de dois tipos de matrizes ósseas desmineralizadas, sobre o processo de reparo ósseo em calvária de coelhos.

Foram utilizados dezoito coelhos e em cada calvária foram preparadas duas cavidades ósseas cirúrgicas, sendo uma do lado direito e a outra do lado esquerdo da sutura parietal. As cavidades do lado esquerdo foram utilizadas como controle e preenchidas apenas com sangue do animal. No grupo I, as cavidades do lado direito foram preenchidas com uma matriz óssea desmineralizada de origem bovina (OSSEOBOND®). No grupo II, as cavidades do lado direito foram preenchidas com uma matriz óssea desmineralizada de origem humana (DEMBONE™). Os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 3, 7 e 15 semanas.

A análise das amostras sob microscopia ótica revelou que no grupo I as partículas foram reabsorvidas mais rapidamente que no grupo II. Nos períodos de 7 e 15 semanas a neoformação óssea foi melhor nos grupos I e II em relação as cavidades de controle. Nos grupos I, II e nas cavidades controle a neoformação óssea foi melhor evidenciada após 15 semanas, apesar de não ter ocorrido regeneração óssea completa em nenhum dos grupos estudados.

ABSTRACT

The development of materials that can substitute lost bone tissue avoid the necessity of a second surgery to remove an autologous bone graft. Therefore, the aim of this study was to histologically analysis the effect of two different demineralized bone matrix on the bone regeneration process in rabbits skulls.

Eighteen rabbits were used, and on each calvaria two surgical bone defects were created, one on the right side and the other on the left side of the parietal suture. The cavities on the left side were used like control and filled just with the animal blood. In group I, the cavities on the right side were filled with a bovine demineralized bone matrix (Osseobond). In group II, the cavities on the right side were filled with a human demineralized bone matrix (Dembone). The animals were sacrificed in postoperative period of 3, 7, e 15 weeks.

Histologic analyses of the specimens on light microscope revealed that in group I the particles were reabsorbed faster than in group II, as seen after 3 and 7 weeks. After 7 and 15 weeks bone repair was better in group I and II, in contrast with control cavities. Group I, II and control cavities had better bone repair after 15 weeks despite, although there was not complete bone repair in none of the groups.

SUMÁRIO

	p.
LISTAS	1
<i>Abreviaturas</i>	3
<i>Tabela</i>	4
<i>Figuras</i>	4
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
3. PROPOSIÇÃO	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS	61
<i>4.1 Animais e Anestesia</i>	63
<i>4.2 Procedimento Cirúrgico</i>	63
<i>4.3 Método Histológico</i>	66
5. RESULTADOS	71
6. DISCUSSÃO	119
7. CONCLUSÕES	131
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135

LISTAS

LISTAS

Abreviaturas

AIDS = acquired immunodeficiency syndrome (síndrome da imunodeficiência adquirida)

Apud = em

BMP = bone morphogenetic protein (proteína óssea morfogenética)

Ca = cálcio

et al. = *et alii* (e outros)

EUA = Estados Unidos da América

Fig. = figura

FOP = Faculdade de Odontologia de Piracicaba

HCl = ácido clorídrico

HE = hematoxilina e eosina

HIV = human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)

HLA = human lymphocyte antigens

kg = quilograma

Ltda = limitada

ml = mililitro

mm = milímetro

µg = micrograma

µm = micrometro

Sr = estrôncio

TM = tricrômico de Mallory

Unicamp = Universidade Estadual de Campinas

Tabela

p.

Tabela 1. Distribuição dos animais por períodos para sacrifício. ----- 59

Figuras

p.

Fig. 1. Divisão das amostras para inclusão e corte. -----66

Fig. 2. Aspecto após incisão mediana e descolamento da calvária do animal. -----67

Fig. 3. Perfurações sendo realizadas com broca trefina montada em contra-ângulo de baixa rotação. -----67

Fig. 4. Cavidades ósseas cirúrgicas na calvária do animal. A cavidade do lado direito está preenchida com matriz óssea desmineralizada. A cavidade do lado esquerdo está sendo preenchida por coágulo. -----69

Fig. 5. Matrizes ósseas desmineralizadas utilizadas nos grupos I e II. -----69

- Fig. 6. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar a presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) revestindo a cavidade superiormente. Trabéculas de osso neoformado (ON) originando-se a partir do osso pré-existente (OP) nas bordas da cavidade. Pequena quantidade de partículas (P) da matriz em processo de reabsorção no centro.
Grupo I, 3 semanas. H.E. 2,5x. -----75
- Fig. 7. Observar partícula rodeada por tecido conjuntivo (TC) e células inflamatórias. Grupo I, 3 semanas. H.E. 10x. -----77
- Fig. 8. A presença de células semelhantes à osteoclastos (OC) sugere que a partícula (P) está em processo de reabsorção.
Grupo I, 3 semanas. H.E. 40x. -----77
- Fig. 9. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar a grande quantidade de partículas (P) envolvidas pelo tecido conjuntivo denso (TCD). Grupo II, 3 semanas. H.E. 2,5x. -----81
- Fig. 10. Observar o tecido conjuntivo (TC) e células inflamatórias próximo a partícula (P). A presença de células multinucleadas (seta) junto à superfície da partícula sugere processo de reabsorção. Grupo II, 3 semanas. H.E. 40x. -----83

Fig. 11. Observar a presença de osso neoformado (ON) junto à partícula (P) sugerindo atividade osteoblástica e aposição óssea na sua superfície. Grupo II, 3 semanas. H.E. 10x. -----83

Fig. 12. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar a fina camada de tecido conjuntivo denso (TCD) se organizando na região inferior da cavidade. O osso neoformado (ON) origina-se a partir do osso pré-existente (OP) nas bordas da cavidade e projeta-se em direção centrípeta. Cavidades controle, 3 semanas. T.M. 2,5x. -----87

Fig. 13. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar as projeções de tecido ósseo neoformado (ON) em direção centrípeta. A cavidade apresenta-se preenchida por tecido conjuntivo frouxo (TCF) bastante vascularizado e uma fina camada de tecido conjuntivo denso na região inferior. Grupo I, 7 semanas. H.E. 2,5x. -----91

Fig. 14. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar a presença de algumas partículas (P) em processo de reabsorção circundadas pelo tecido conjuntivo denso (TCD) que preenche a cavidade. Notar a presença de algumas ilhotas de tecido ósseo neoformado (ON) no centro da cavidade. Grupo II, 7 semanas. H.E. 2,5x. -----95

Fig. 15. Observar o tecido ósseo neoformado (ON) bastante celularizado próximo a partícula (P) quase totalmente reabsorvida. Grupo II, 7 semanas. H.E. 10x. -----97

Fig. 16. Observar tecido ósseo neoformado (ON) envolvendo partículas (P) reabsorvidas junto ao osso pré-existente (OP) da borda da cavidade. Grupo II, 7 semanas. H.E. 10x. -----97

Fig. 17. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar o tecido conjuntivo denso (TCD) entre as projeções de tecido ósseo neoformado (ON) em direção centrípeta. O limite entre o osso neoformado e o osso pré-existente (OP) é bastante nítido (seta). Cavidades controle, 7 semanas. T.M. 2,5x. -----101

Fig. 18. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar as projeções de tecido ósseo neoformado (ON) promovendo uma união entre as bordas do tecido ósseo pré-existente. O osso neoformado apresenta espessura menor que o osso pré-existente (setas). Grupo I, 15 semanas. H.E. 2,5x. -----105

Fig. 19. Notar a presença de tecido conjuntivo denso (setas) formando uma união fibrosa entre o tecido ósseo pré-existente (OP) e o tecido ósseo neoformado (ON). Grupo I, 15 semanas. T.M. 10x. -----107

Fig. 20. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. No centro da cavidade uma pequena quantidade de tecido conjuntivo denso (TCD) impede que as projeções de tecido ósseo neoformado (ON) se encontrem. Grupo II, 15 semanas.

H.E. 2,5x. -----111

Fig. 21. Observar partículas (P) em reabsorção próximas a uma ilha de tecido ósseo neoformado (ON) circundada pelo tecido conjuntivo denso (TCD). Grupo II, 15 semanas. H.E. 10x. -----113

Fig. 22. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar as projeções de ilhas de ósseo neoformado (ON) próximas às bordas da cavidade. A cavidade apresenta-se preenchida por tecido conjuntivo denso (TCD) bastante organizado.

Cavidades controle, 15 semanas. H.E. 2,5x. -----117

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A reconstrução óssea é um desafio diário para o cirurgião buco-maxilo-facial envolvido em traumatologia, patologia, cirurgias ortognáticas e pré-protéticas para a reconstrução de defeitos ósseos. A história de enxertos ósseos na reconstrução de tecido perdido por trauma, infecção, doença neoplásica ou degenerativa e anomalias congênitas é bastante antiga. Mais de um século se passou desde que SENN⁵⁴ (1889) relatou que o enxerto de osso desmineralizado de tibia de boi, em defeitos cirúrgicos na calvária de cães, poderia ajudar na neoformação óssea, pois o processo de desmineralização diminuiria a contaminação do enxerto (MULLIKEN & GLOWACKI³⁸, 1980). Entretanto, há pouco mais de três décadas entendeu-se a natureza deste fenômeno, a começar pela demonstração original de URIST⁶¹, em 1965, que analisou a neoformação óssea a partir do enxerto de diferentes preparações de osso desmineralizado e liofilizado em sítios heterotópicos, principalmente músculos, de diversos animais de laboratório demonstrando a formação de tecido ósseo.

O tecido ósseo é capaz de se reparar através de um processo normal de remodelação. O processo de reparo que ocorre por aposição sobre o osso do hospedeiro é denominado osseocondução. Na osseocondução as células osteogênicas do osso pré-existente são responsáveis pela neoformação óssea. Outro tipo de processo de neoformação óssea, chamado osseoindução, ocorre quando células mesenquimais indiferenciadas do hospedeiro são induzidas a se diferenciar em células osteogênicas. Estas células passam a formar tecido ósseo

mesmo quando este não existia originalmente naquele local. O conhecimento da possibilidade de uma matriz óssea desmineralizada ser capaz de induzir células mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos *in vivo*, resultou em tentativas de se utilizar esse material, obtido de doadores humanos, principalmente em defeitos ósseos onde o reparo espontâneo não ocorreria normalmente. (URIST⁶¹, 1965; REDDI & HUGGINS⁴⁶, 1972; GLOWACKI *et al.*²², 1981b).

Os trabalhos iniciais de URIST⁶¹ (1965) e REDDI & HUGGINS⁴⁶ (1972) demonstraram a evidência dos enxertos ósseos poderem ser utilizados com sucesso para auxiliar no reparo de defeitos ósseos. Além disso, estes trabalhos ajudaram a esclarecer os eventos que ocorrem durante a indução da neoformação pelo osso desmineralizado e liofilizado. Este fato causou um aumento no interesse de se avaliar diferentes tipos de materiais que possam atuar como indutores de neoformação óssea. Contudo, os materiais para enxerto ósseo que têm sido tentados nas décadas recentes não obtiveram sucesso, provavelmente em função da carência de propriedades osteogênicas e osseoindutoras (BOLANDER & BALIAN⁶, 1986).

O enxerto ósseo é classificado como autógeno quando o doador e o receptor são o mesmo indivíduo, ou seja, é removido do próprio paciente. Este tipo de enxerto tem se mostrado a melhor alternativa para as cirurgias faciais reconstrutivas, ortognáticas e de implantes osseointegrados. Na década de 80, o único método confiável para a reconstrução dos grandes defeitos ósseos dos maxilares utilizava enxerto ósseo autógeno, que geralmente era retirado da crista ilíaca (FRAME¹⁷, 1980). Quando a quantidade necessária de enxerto é pequena,

as regiões retromandibular, mento, e tuberosidade maxilar podem ser as áreas doadoras. Segundo GOLDBERG & STEVENSON²³ (1987), o osso autógeno medular é o melhor tipo de enxerto que existe pois causa pouca inflamação, apresenta revascularização mais rápida, maior potencial de osseoindução e osseocondução, e conseqüentemente uma remodelação em menor espaço de tempo. Apesar do osso autógeno permanecer como o melhor material para o enxerto ósseo (PIATTELLI *et al.*⁴², 1996), vários enxertos ósseos têm sido propostos para evitar a morbidade do sítio doador e aumento do tempo operatório (FRAME, 1980¹⁷; DUPOIRIEUX *et al.*¹⁴, 1994). A principal desvantagem do enxerto autógeno é a cirurgia adicional na área doadora do paciente, com possibilidade de causar excessiva perda sanguínea, pneumotórax, infecção da ferida, dor crônica, parestesia, cicatrizes, dificuldade de movimentação e desconforto adicional (GLOWACKI *et al.*²², 1981b; GRILLON *et al.*²⁴, 1984). Além disso, existe relato na literatura que demonstra o enxerto de osso medular fresco associado com reabsorção radicular (DRAGOO & SULLIVAN¹³, 1973).

Para uma larga aceitação clínica, o enxerto ósseo ideal deve ser biocompatível, ter boas propriedades mecânicas e demonstrar osseoindução ou, pelo menos, osseocondução (DUPOIRIEUX *et al.*¹⁴, 1994). O osso desmineralizado e liofilizado tem alguns destes requisitos, mas também apresenta desvantagens como a sua forma e o fato de ser homogêneo ou heterogêneo (BOWERS *et al.*⁷, 1991). O tamanho de suas partículas limita a quantidade de aposição coronal do osso disponível em defeitos horizontais. Qualquer pressão leve do tecido pode deslocar o material enxertado.

Os enxertos ósseos são classificados como homogêneos quando removidos de um doador que pertença à mesma espécie do receptor. O enxerto de osso homogêneo desmineralizado tem demonstrado ótimos resultados em cirurgia buco-maxilo-facial, implantodontia, e periodontia. Clinicamente, estes enxertos oferecem as vantagens de uma resposta rápida no reparo de defeitos ósseos e a habilidade de induzir uma apreciável neoformação óssea (FREEMAN & TURNBULL¹⁸, 1977; MELLONIG *et al.*³⁵, 1981a; MELLONIG *et al.*³⁶, 1981b; QUATTLEBAUM *et al.*⁴³, 1988; PIATTELLI *et al.*⁴², 1996; REYNOLDS & BOWERS⁷, 1996; LA FONTAINE & PINTO³², 1997; RADAELLI & RADAELLI⁴⁵, 1997).

Alguns fatores desfavoráveis como o alto custo, a dificuldade de obtenção de osso humano em quantidade viável, o risco de transmissão de doenças, e a proibição de comercialização de tecidos humanos em vários países, levaram a necessidade de se desenvolver uma matriz óssea desmineralizada de origem animal. Os enxertos heterogêneos são aqueles obtidos de um doador de espécie diferente do receptor, e quando passam pelos processos de desmineralização e liofilização, não têm demonstrado qualquer evidência de rejeição. Além disso, também são capazes de promover osseointegração e apresentar bons resultados (MULLIKEN & GLOWACKI³⁸, 1980; ALPER *et al.*², 1989; RADAELLI & RADAELLI⁴⁵, 1997; TAGA *et al.*⁵⁹, 1997).

A colocação de implantes em osso atrófico pode ser um dos maiores problemas na implantologia oral, pois o osso deve ser de comprimento, espessura e qualidade ideais para receber o implante. O enxerto de osso, homogêneo ou

heterógeno, desmineralizado e liofilizado tem sido utilizado associado à membranas para o preenchimento de defeitos ósseos adjacentes a implantes dentários (RUTHERFORD *et al.*⁴⁹, 1992; BECKER *et al.*⁵, 1996; PIATTELLI *et al.*⁴², 1996; LA FONTAINE & PINTO³², 1997).

Outro grande avanço na pesquisa do reparo ósseo é o isolamento de fatores da matriz óssea desmineralizada que poderiam induzir a formação óssea como o fator ósseo indutivo, e as proteínas ósseas morfogenéticas produzidas por genes clonados de moléculas ósseas, como a BMP-1, BMP-2A, BMP-2B e BMP-3 ou, Osteogenin (WOZNEY *et al.*⁶², 1988). Entretanto, alguns trabalhos sugerem que estes fatores devem ser combinados com um derivado de matriz óssea para iniciarem precocemente a cascata de diferenciação óssea, propiciando melhores resultados (BOWERS *et al.*⁷, 1991). Por isso, mais estudos ainda precisam ser realizados com o objetivo de estabelecer quais proteínas ou fatores são responsáveis pela atividade osseoindutiva do osso desmineralizado. Além disso, algumas destas proteínas, que têm a capacidade de promover a diferenciação celular, possibilitando a regeneração tecidual, podem ser alteradas durante o processamento do material (SHIGEYAMA *et al.*⁵⁶, 1995; SCHWARTZ *et al.*⁵¹, 1996).

As pesquisas em relação aos biomateriais para enxerto ósseo têm demonstrado resultados bastante promissores, no sentido de evitar uma segunda cirurgia para remoção de enxerto autógeno e conseqüentemente diminuir a morbidade, facilitar o procedimento e desenvolver um material que satisfaça todos os critérios de um enxerto ósseo ideal. Por outro lado, a literatura pertinente ao

tema ainda relata controvérsias em relação ao tipo de material que deve ser utilizado demonstrando, evidentemente, que este assunto não está completamente elucidado.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

URIST⁹¹, em 1965, após 70 experimentos com matriz óssea desvitalizada e descalcificada, demonstrou suas evidências a favor da teoria da osseoindução. Matrizes ósseas desmineralizadas em diferentes tipos de ácidos, foram implantadas em sítios heterotópicos, mais precisamente bolsas intramusculares de quase 300 animais, defeitos ósseos na ulna de 10 coelhos, vértebra lombar de 3 cães, e defeitos ósseos de deformidades esqueléticas de 21 humanos. Os efeitos destas matrizes ósseas desmineralizadas foram avaliados através de radiografia e histologia. Assim, o autor observou que o início do depósito de tecido ósseo neoformado ocorria por volta de 4 a 6 semanas após o enxerto das matrizes. Entre 8 e 16 semanas podia-se observar 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 mesenquimais indiferenciadas proliferadas do sítio receptor e não do enxerto. Desta forma, a matriz desmineralizada em HCl demonstrou ser um excelente material para o enxerto ósseo.

Em 1972, REDDI & HUGGINS⁴⁶ descreveram o preparo 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 no abdome, tórax e púbis de ratos. Este trabalho consistiu no enxerto de quantidades padronizadas de

matriz óssea em tecidos subcutâneos de ratos jovens, com o objetivo de se desenvolver um método reproduzível, rápido e quantitativo da transformação de fibroblastos em condroblastos e osteoblastos, e diferenciar as suas interrelações nas sequências biológicas. 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.

De acordo com FRAME¹⁷, em 1980, existia um grande interesse no desenvolvimento de materiais que pudessem auxiliar no reparo ósseo e apresentar os mesmos resultados dos enxertos autógenos. Entretanto, um problema persistente era encontrar um modelo animal adequado para a pesquisa destes materiais. Os animais grandes necessitam de maiores espaços, são mais caros para se manter e difíceis de se anestésiar. A calvária de coelhos tem sido bastante utilizada nestas pesquisas. Neste estudo, foram testadas histológica e radiologicamente cavidades ósseas de 5, 10, 15, e 20mm em períodos de 24 e 36 semanas. As cavidades de 5 e 10mm tiveram reparo ósseo espontâneo com fechamento completo após 24 semanas. As cavidades de 15 e 20mm não apresentaram diferença estatisticamente significativa na neoformação óssea em 24 ou 36 semanas. Desta forma, a cavidade óssea cirúrgica ideal em calvária de

coelho deve apresentar 15mm de diâmetro quando o maior período para sacrifício é 24 semanas.

O enxerto ósseo autógeno é a melhor opção para reconstruções, entretanto, apresenta desvantagens como a morbidade do sítio doador, a quantidade limitada disponível em crianças, o contorno irregular, e a quantidade imprevisível de reabsorção. MULLIKEN & GLOWACKI³⁶ (1980) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o potencial de osteogênese induzida dos enxertos ósseos desmineralizados na região crânio. No grupo I estas cavidades foram realizadas nos ossos parietais de ratos e preenchidas com enxertos em segmentos ou particulados, de osso fresco, de osso liofilizado mineralizado, ou de osso desmineralizado. No grupo II os enxertos foram realizados sobre o crânio ou ossos nasais, com osso desmineralizado particulado, ou formando uma ponte sobre o músculo temporal do zigoma até o frontal. As cavidades controle foram apenas irrigadas com solução de Ringer lactado e permaneceram vazias mesmo após 6 meses. As cavidades preenchidas com enxerto de osso fresco tiveram uma reparação rápida. Os enxertos liofilizados mineralizados falharam em reparar as cavidades ósseas que permaneceram preenchidas por tecido fibroso. Por outro lado, as cavidades preenchidas com discos de osso desmineralizado tiveram um rápido reparo ósseo. A sequência histológica de reparo ósseo por formação endocondral foi igual mesmo quando se utilizou enxerto de osso membranoso, ou de origem humana nos ratos. Houve formação óssea heterotópica na região fronto-nasal e uma ponte óssea foi construída do zigoma até o frontal no segundo grupo de ratos. Os autores concluíram que o fenômeno de osteogênese induzida

não é espécie específico pois mesmo quando o osso particulado desmineralizado originou-se de espécie diferente, houve indução de reparo ósseo em defeitos esqueléticos na região crânio-facial de ratos.

GLOWACKI *et al.*²¹, em 1981, realizaram um estudo com o objetivo de quantificar a osteogênese induzida pelo osso particulado desmineralizado. Neste estudo eles 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. As cavidades do grupo controle permaneceram preenchidas por tecido fibroso mesmo após 6 meses. Quando se utilizou osso particulado desmineralizado, todas as cavidades iniciaram o reparo ósseo 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 reparo ósseo 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.

GLOWACKI *et al.*²², em 1981, avaliaram clinicamente a aplicação dos princípios biológicos de osteogênese induzida em defeitos crânio-faciais de

humanos, congênitos ou adquiridos. Os resultados demonstraram que o osso homogêneo desmineralizado induz a osteogênese em humanos e pode ser aplicado com vantagens sobre os métodos convencionais. O fato de se acreditar em osseoindução ocorre em função de outros trabalhos experimentais demonstrarem este processo em sítios heterotópicos, os pacientes acompanhados por exames radiográficos demonstrarem reparo ósseo uniforme e de forma centrífuga, e a impossibilidade de ocorrer osseocondução em grandes sítios. Os autores observaram vantagens clínicas como o rápido reparo ósseo dos defeitos esqueléticos, a habilidade de induzir grandes quantidades de neoformação, a quantidade ilimitada de material, e o fato de evitar-se a remoção de enxerto autógeno. Entretanto, maior tempo de preservação é necessário para avaliar a reabsorção deste osso neoformado.

A utilização de enxerto de osso homogêneo desmineralizado foi avaliada clinicamente por MULLIKEN *et al.*³⁹ (1981) em 44 pacientes com deformidades crânio-maxilo-faciais congênitas ou adquiridas. Estes autores relataram como dificuldades nestes tratamentos a quantidade limitada de osso autógeno, principalmente em crianças, e a reabsorção do osso enxertado, quando utilizado para estabilizar segmentos mobilizados, aumentar o contorno ósseo, ou mesmo construir uma nova arquitetura esquelética. 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.

Em defeitos ósseos periodontais, as esquirolas de osso autógeno, o osso autógeno triturado, o osso homogêneo mineralizado e liofilizado, e o osso homogêneo desmineralizado e liofilizado, demonstraram ser potencialmente viáveis como enxertos. Por isso, MELLONIG *et al.*³⁶, em 1981, investigaram as habilidades de neoformação óssea destes enxertos em cavidades de 2,5mm na calvária de cobaias, comparando-as através da incorporação de um radionuclídeo chamado estrôncio-85. Os resultados do experimento sugeriram que o enxerto de osso homogêneo desmineralizado e liofilizado é um enxerto de alto potencial osteogênico. Isto deve estar relacionado ao componente químico da matriz óssea indicado como proteína óssea morfogenética. Não houve diferença entre o potencial osteogênico dos enxertos autógenos. Entretanto, estes enxertos demonstraram um potencial osteogênico significativamente menor que a matriz de osso autógeno desmineralizado.

Continuando a mesma linha de pesquisa, MELLONIG *et al.*³⁶, em 1981, compararam histologicamente a neoformação óssea induzida pelos seguintes enxertos: osso homogêneo desmineralizado e liofilizado, osso homogêneo

mineralizado e liofilizado, esquirolas de osso autógeno, e osso autógeno triturado. Para isto, os autores realizaram cavidades de 2,5mm na calvária de cobaias onde câmaras porosas de nylon não absorvível foram colocadas após seu preenchimento com um dos materiais de enxerto. Os resultados sugeriram que o osso homogêneo desmineralizado e liofilizado é um material de enxerto com alto potencial osteogênico. Os enxertos de esquirolas de osso autógeno e de osso triturado produziram a maior neoformação óssea após o osso desmineralizado, não havendo diferença entre o potencial osteogênico dos dois materiais. A neoformação óssea induzida pelo osso homogêneo mineralizado e liofilizado ocorreu em níveis bem menores que a induzida pelos outros enxertos.

Segundo EINHORN *et al.*¹⁵ (1984), a perda aguda de segmento de diáfise em ossos longos é um problema cirúrgico significativo. Estes autores estudaram o reparo de defeitos ósseos segmentares induzido por matriz óssea desmineralizada. Os objetivos eram estabelecer um modelo de estudo para o reparo de segmentos, induzir o reparo ósseo no defeito através do enxerto de uma matriz óssea desmineralizada, e medir as propriedades biomecânicas do osso induzido. Defeitos femurais de 6mm foram cirurgicamente realizados em ratos. As amostras foram avaliadas por exame físico, radiográfico e testes biomecânicos. Os testes biomecânicos indicaram que o osso neoformado apresentava 35% da resistência à torção e 65% da absorção de energia do osso normal, além de uma maior capacidade de deformação sob carga. O tratamento de defeitos segmentares com o enxerto de matriz óssea desmineralizada proporcionou uma

alta incidência de união através da osseoindução com propriedades equivalentes às aquelas observadas nos estágios iniciais do reparo de fraturas.

O reparo ósseo em ulna de coelhos foi estudado por BOLANDER & BALIAN⁶, 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 reparo ósseo, por outro lado todos os defeitos que receberam enxerto apresentaram reparo ósseo. Nos testes biomecânicos, as ulnas que receberam matriz óssea desmineralizada 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.

Desde a descoberta da osseoindução em sítio heterotópico através do enxerto de matriz óssea desmineralizada particulada, este material tem se tornado o modelo favorito para o estudo da indução de neoformação óssea. GENDLER²⁰, em 1986, avaliou uma matriz de osso em segmentos que receberam perfurações de 0,25mm sob alta rotação, e então, foram desmineralizados, e implantados no subcutâneo de ratos. Os resultados demonstraram que o mecanismo de ação deste tipo de enxerto parece ser similar ao de outras formas de matrizes

desmineralizadas. As células mesenquimais indiferenciadas, após o contato com a matriz, iniciaram a proliferação e mudaram seu fenótipo transformando-se em cartilagem que foi substituída pela osteogênese endocondral até a completa reabsorção da matriz e sua reposição por tecido ósseo neoformado.

Depois de vários anos de estudo, e tendo realizado diversos experimentos em cães analisando a biologia dos enxertos ósseos corticais, medulares, autógenos e homólogos, GOLDBERG & STEVENSON²³ (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 em relação ao osso 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.

Existe um certo receio com relação à antigenicidade dos enxertos de origem humana. Aparentemente, o processo de liofilização anula a antigenicidade

do enxerto ósseo cortical homogêneo. QUATTLEBAUM *et al.*⁴³, em 1988, realizaram um trabalho com o objetivo de determinar se anticorpos específicos anti-HLA poderiam ser detectados em 20 pacientes que receberam enxerto ósseo cortical homogêneo liofilizado, em dois procedimentos para tratamento de defeitos periodontais. Para isso, os enxertos foram obtidos de um doador que apresentava antígenos HLA. Todos os procedimentos de enxertos tiveram resultados clínicos, sem qualquer reação tecidual adversa. As amostras de soro colhidas dos pacientes após duas semanas, tanto do primeiro quanto do segundo procedimento, foram testadas e não demonstraram a presença de anticorpos específicos para HLA do doador. Isto significa que o sistema imune humoral dos pacientes não percebeu a presença do enxerto homogêneo, portanto, não foi capaz de responder com anticorpos. Os autores concluíram que o enxerto ósseo cortical homogêneo pode ser considerado um enxerto com ausência clínica de antigenicidade significativa, quando utilizado em defeitos periodontais.

O risco de transmissão de doenças infecciosas através de enxertos homogêneos é uma das desvantagens deste tipo de tratamento. Segundo BUCK *et al.*⁸, em 1989, os pacientes que apresentam anticorpos para HIV são facilmente excluídos dos programas de doação de órgãos, entretanto os portadores que ainda não desenvolveram a doença, e não apresentaram anticorpos representam risco. Estes autores avaliaram os cálculos de probabilidade envolvendo a idade dos doadores, o risco de serem portadores do vírus HIV e não terem desenvolvido anticorpos, o risco de falha dos testes laboratoriais e dos testes de necropsia, e levou-se em conta algumas considerações logísticas. Os autores concluíram que

quando a determinação de anticorpos é o único teste utilizado para examinar os doadores, o risco de se obter um enxerto homogêneo proveniente de um doador infectado por HIV pode ser de até 1 em 161 casos. Por outro lado, se os protocolos dos bancos de tecidos são seguidos rigidamente, e todas as técnicas laboratoriais são realizadas, o risco diminui para 1 em 1,67 milhões.

Com o objetivo de determinar se o vírus HIV reside no tecido ósseo, e ainda, se este vírus é capaz de resistir ao processo de congelamento, BUCK *et al.*⁹, em 1990, realizaram um estudo a partir de amostras de vários tecidos, inclusive fragmentos ósseos, de cinco pacientes HIV positivos removidas durante a necropsia. O processo de congelamento, apesar de diminuir a capacidade de se isolar o vírus das amostras infectadas, não evitou que o HIV fosse recuperado após a cultura apropriada. Desta forma, os processos de liofilização, utilizados nos bancos de tecidos, não são capazes de evitar uma possível transmissão quando utilizados isoladamente, mas quando todo o protocolo dos bancos de tecidos e todos os testes laboratoriais possíveis são utilizados, e ainda o osso homogêneo passar pelo processo de lavagem e liofilização o risco de transmissão do HIV é de 1 em 8 milhões.

MARX & CARLSON³⁴, em 1993, revisaram os casos de transmissão de AIDS através de enxertos homogêneos e encontraram falhas na seleção de doadores, na esterilização, ou catalogação incorreta do tecido doado. Quando as regras apropriadas para se evitar a transmissão do vírus são respeitadas os riscos tornam-se bastante pequenos. Deve haver uma seleção rigorosa dos doadores, vários testes para anticorpos e antígenos do HIV e estudos morfológicos dos

tecidos a serem doados. Os autores recomendam, ainda, que o cirurgião conheça o banco de tecidos e o seu protocolo para a seleção e exclusão de doadores, esterilização do tecido doado.

CARLSON *et al.*¹⁰, em 1995, revisaram a segurança dos enxertos ósseos homogêneos e os riscos de transmissão do vírus HIV por meio deste tipo de tratamento. Os autores recomendam que os cirurgiões buco-maxilo-faciais que utilizam enxertos ósseos homogêneos informem-se do protocolo de seleção, critérios de inclusão e exclusão dos doadores, além do tipo de processamento utilizado pelo banco de tecidos. Apesar de se acreditar que os enxertos são seguros, o profissional deve ter um consentimento do paciente que, sabendo do pequeno risco, permite o tratamento. Os bancos de tecidos devem ser controlados por organizações superiores, assegurar a esterilização do enxerto, e manter arquivos identificando o doador, e outras informações relacionadas ao enxerto. Os hospitais precisam identificar o paciente que recebeu o enxerto, o número do lote do enxerto, e o banco de tecidos responsável pelo processamento. E finalmente deveria ser estabelecido um registro nacional semelhante ao que existe para transplante de órgãos.

Segundo BARBOSA & LIMA⁴, em 1996, o osso humano desmineralizado e liofilizado foi um dos enxertos ósseos mais utilizados nos últimos 10 anos. Desta forma, o enxerto 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. Assim, a possibilidade de transferência de agentes infecciosos através do enxerto torna-se desprezível.

Tanto a osseoindução quanto a osseocondução, determinadas pelo enxerto de matriz óssea desmineralizada, podem ajudar na união de defeitos ósseos experimentais, que apresentam uma pobre capacidade de reparo. ASPENBERG *et al.*³, em 1988, avaliaram a influência desta matriz em defeitos que apresentavam condições altamente favoráveis de reparo. Para isto, 6 semanas antes do experimento os autores implantaram câmaras de remoção de amostras de osso, em tíbias de coelhos, que com o tempo eram preenchidas pelo tecido ósseo do animal. Aleatoriamente, algumas destas câmaras foram esvaziadas e receberam matriz óssea desmineralizada, obtida de coelhos doadores, cuja capacidade de osseoindução havia sido previamente testada em sítio heterotópico. As câmaras de controle não receberam qualquer tipo de preenchimento. Após 14 dias os conteúdos dos canais de crescimento ósseo foram removidos e analisados. As amostras do grupo controle apresentavam tecido ósseo com trabeculado regular em todas secções. O volume de osso no grupo de estudo era apenas 65% do volume encontrado no grupo controle apesar da matriz ter sido quase completamente reabsorvida. A matriz óssea desmineralizada não aumentou a quantidade de crescimento ósseo na câmara. Isto sugere que a matriz não deve ser utilizada para acelerar o reparo ósseo em circunstâncias favoráveis.

A possibilidade da utilização de materiais que facilitem o reparo de defeitos de ossos longos, como por exemplo fraturas com perda de substância,

vem sendo testada em diferentes modelos de estudo. ALPER *et al.*², em 1989, realizaram um estudo comparativo para avaliar o potencial osteogênico de pastas de fosfolípídeos, de hidroxiapatita, de matriz óssea desmineralizada, ou da combinação destes materiais, que eram colocados em defeitos ósseos críticos de ratos. Os resultados demonstraram 16% de aumento na formação óssea nos defeitos preenchidos com pastas de matriz óssea desmineralizada, sem diferença estatisticamente significante com relação ao tamanho da partícula, ou a diferença de origem da matriz. Os defeitos preenchidos com hidroxiapatita ou com hidroxiapatita associada à matriz óssea desmineralizada demonstraram valores menores em relação ao grupo controle e grupos onde utilizou-se matriz óssea desmineralizada. O fato da matriz óssea desmineralizada obtida de ratos *Simonsen Albinus* ser altamente indutiva em ratos *Long-Evans*, demonstra que as proteínas ósseas morfogenéticas não são espécie específicas em ratos. A matriz óssea desmineralizada induziu a formação óssea e promoveu união em defeitos ósseos que normalmente não seriam reparados. Por outro lado, a hidroxiapatita interferiu com a osteogênese, e neste estudo, não agiu nem mesmo como osseocondutor.

Em 1989, HOPP *et al.*²⁶ compararam a resistência mecânica em defeitos de ossos longos de coelhos, tratados com diferentes enxertos ósseos. Os defeitos, com 10mm de comprimento, foram criados bilateralmente, entre os terços médio e distal de ulnas de coelhos adultos, com serra oscilatória. Os melhores resultados de união foram encontrados no grupo onde o fragmento ósseo foi imediatamente reposicionado, seguido do grupo que recebeu apenas matriz óssea

desmineralizada, hidroxiapatita associada à matriz óssea desmineralizada, enxerto ósseo autógeno cortical, enxerto ósseo cortical homogêneo, grupo controle e por último hidroxiapatita. Todos os grupos foram estatisticamente mais resistentes que o grupo controle, com exceção da hidroxiapatita, isto demonstrou que este material não é atrativo para tratamento de defeitos segmentares, mas o grupo onde a hidroxiapatita foi associada à matriz óssea desmineralizada teve união e resistência à tração comparáveis aos do grupo onde a matriz foi utilizada isoladamente. Os resultados demonstraram ainda que a matriz óssea desmineralizada pode ser favoravelmente comparada tanto em união, quanto em resistência à tração aos enxertos autógenos corticais e pode ser utilizada com a mesma finalidade.

MARINAK *et al.*³³, em 1989, testaram a osseointegração 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 & HUGGINS⁴⁶, em 1972, enquanto no grupo II a desmineralização foi realizada com o método descrito por URIST⁶¹ (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 & HUGGINS⁴⁶, em 1972 ofereceu vantagens em relação ao de URIST⁶¹ (1965), em função da facilidade do preparo e do maior potencial de osseoindução.

Em 1990, PETTIS *et al.*⁴¹, avaliaram a reação tecidual da hidroxiapatita cerâmica isolada ou quando associada a matriz óssea desmineralizada em três diferentes sítios de ratos. Em bolsas subcutâneas da região ventral, foi avaliado a osseoindução dos materiais. A osseocondução foi avaliada nos implantes *onlay* supraperiostais de mandíbula. Outro implante *onlay* foi realizado na calvária dos ratos após a completa remoção do periósteo. Os resultados histológicos demonstraram que a hidroxiapatita cerâmica, não é um material osseoindutivo em sítio heterotópico, e foi capaz de promover apenas uma pequena formação óssea por osseocondução, quando utilizada como implante *onlay*. Por outro lado, os implantes *onlay* da associação de hidroxiapatita e osso desmineralizado estavam completamente preenchidos por osso, e o osso particulado desmineralizado foi capaz de induzir a formação óssea nas bolsas subcutâneas, mesmo quando associado à hidroxiapatita.

SHTEYER *et al.*⁵⁷, em 1990, realizaram um experimento com o propósito de estudar os efeitos do osso particulado e desmineralizado em células bastante diferenciadas de osteosarcoma de ratos, mantidas em cultura e muito parecidas com osteoblastos. Foram realizadas contagem de células, teste de incorporação de timidina tritiada, e de fosfatase alcalina após 1 a 7 dias. As células foram coradas histoquimicamente para detectar atividade de fosfatase

alcalina, formação de cartilagem e calcificação. Os resultados demonstraram que este modelo de estudo pode ser útil no controle de qualidade de enxertos ósseos desmineralizados avaliando a atividade osseoindutiva do osso particulado e desmineralizado, além disso é pouco honeroso e rápido de ser realizado. O aumento na taxa de proliferação celular e na atividade de fosfatase alcalina foram induzidas pelo osso desmineralizado.

GEBHART *et al.*¹⁹, em 1991, realizaram um estudo para testar a reação da matriz óssea desmineralizada colocada em defeitos ósseos segmentares femurais de ratos. Neste estudo foram comparadas os aspectos radiográficos e biomecânicos dos defeitos ósseos preenchidos com matriz, ou com matriz associada à osso medular. A matriz óssea desmineralizada associada ou não ao osso medular aumentou significativamente a neoformação óssea e a união radiográfica quando comparado ao grupo controle. A curto prazo a neoformação óssea era maior no grupo que recebeu osso medular, mas a partir de algum tempo não havia mais diferença. A dureza do osso neoformado no grupo de matriz óssea desmineralizada era marcadamente menor em relação ao grupo controle, entretanto não havia diferença significativa entre os grupos de matriz associado ou não ao osso medular.

O reparo em defeitos ósseos segmentares de cães adultos foi estudado por SCHWARZ *et al.*⁵², em 1991, após o enxerto de blocos de osso homogêneo esponjoso congelado, ou de matriz de osso homogêneo esponjoso desmineralizado. Paralelamente, o potencial osseoindutivo dos enxertos foi testado em bolsas intramusculares de ratos na forma particulada demonstrando

osseoindução em dois dos seis ratos testados, já o enxerto de osso congelado promoveu reação de corpo estranho. Um dos quatro cães que receberam blocos de matriz óssea apresentou uma ponte óssea no defeito. Os outros cães deste grupo apresentavam defeitos remanescentes de 12, 23, e 25mm de comprimento. No grupo que recebeu blocos de osso congelado as áreas de defeito estavam preenchidas com tecido conjuntivo. Os enxertos de matriz foram reabsorvidos, enquanto pequenos remanescentes de osso congelado foram encontrados dentro do osso neoformado próximo ao término dos defeitos. A osseocondução foi insuficiente em ambos os grupos e falhou em preencher os defeitos de 30mm no período de 16 semanas, com exceção de um animal no grupo de matriz óssea desmineralizada. A estrutura tridimensional do enxerto em bloco não melhorou a formação óssea em defeitos de diáfise de cães, independente do enxerto de osso homogêneo ser mineralizado ou desmineralizado, além de não ter apresentado capacidade osseointegrativa ou função osseointegradora.

Existem evidências das matrizes ósseas desmineralizadas obtidas de animais jovens serem mais osseointegrativas. Este fato pode ter implicações clínicas na utilização destes materiais como enxertos ósseos. JERGESEN *et al.*³⁰, em 1991, avaliaram o efeito da idade do animal doador na capacidade de indução de formação de cartilagem e osso 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 e o mecanismo responsável por isso é desconhecido. O osso desmineralizado

particulado de animais velhos mostrou-se mais osseoindutivo, e quando utilizou-se osso desmineralizado de animais doadores de oito meses em animais receptores de um mês houve a maior quantidade de osseoindução.

Em 1991, HOLLINGER *et al.*²⁶, verificaram a hipótese da superioridade de uma matriz óssea chamada regenerativa apresentar maior conteúdo de proteína óssea morfogenética. O experimento foi realizado em cavidades ósseas cirúrgicas de tamanho crítico na calvária de ratos com osso homogêneo de origem endocondral, e intramembranosa, autolizado, quimioesterilizado, e com extração de antígenos, em relação a matriz óssea regenerativa. A matriz óssea desmineralizada e o enxerto ósseo de origem endocondral pareceram induzir mais reparo ósseo do que a matriz óssea regenerativa e o enxerto de origem intramembranosa. A análise histomorfométrica demonstrou que todos os derivados de matriz óssea produziram grandes quantidades de volume ósseo comparadas com o grupo controle. A matriz óssea desmineralizada demonstrou um volume ósseo significativamente maior que a regenerativa e o enxerto ósseo de origem intramembranosa, que por sua vez demonstrou menor volume ósseo que de origem endocondral. A matriz óssea desmineralizada preparada da cortical de osso endocondral produziu as melhores médias histomorfométricas de reparo ósseo nos defeitos ósseos críticos padronizados. Apesar dos cuidados em se preservar maior conteúdo de proteína óssea morfogenética no preparo da matriz regenerativa, não houve aumento na sua capacidade regenerativa em relação à matriz óssea desmineralizada. Essencialmente, os quatro diferentes derivados de

osso particulado produziram a mesma quantidade de reparo ósseo nas cavidades ósseas críticas padronizadas em 8mm na calvária de ratos após 28 dias.

O processo de formação óssea ocorre 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. SCOTT & HIGHTOWER⁵³, em 1991, realizaram um estudo para testar a hipótese que matrizes orgânicas de osso intramembranoso e de osso endocondral apresentavam fatores indutores da formação óssea distintos. Neste estudo, foram realizados enxertos heterotópicos de matriz óssea desmineralizada de origem endocondral, intramembranosa, ou uma mistura em iguais proporções, em três sítios diferentes de ratos. Os resultados demonstraram que a matriz orgânica de osso endocondral induziu a formação óssea pela via endocondral. Já a matriz orgânica de osso intramembranoso não induziu a ossificação endocondral. Isto sugere que existem diferenças qualitativas entre as matrizes de diferentes origens e, desta forma, a utilização de enxertos homogêneos de origem intramembranosa deveria ser mais frequente, uma vez que a maioria dos defeitos ósseos crânio-faciais ocorrem em ossos de origem intramembranosa.

Seguindo a mesma linha de pesquisa anterior, ISAKSSON & ALBERIUS²⁷, 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

tíbia. O início do reparo ósseo 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 reparo marginal mínimo e após 15 semanas haviam 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 osseoindutiva da matriz óssea desmineralizada foi demonstrada claramente em ambas origens, em função de ter acelerado significativamente o processo de reparo em relação aos grupos controle e de enxerto mineralizado. A matriz de osso intramembranoso demonstrou ser levemente melhor no reparo inicial, apesar da densidade trabecular entre os dois grupos parecer similar, isto levanta a hipótese que existem variações na composição de agentes osteogênicos estruturais locais.

SALYER *et al.*⁵⁰, em 1995, realizaram um estudo em cavidades na calvária de cães em crescimento que objetivava comparar a neoformação do enxerto autógeno com aquela induzida por matrizes de osso perfurado e desmineralizado, e ainda, determinar se a matriz de osso intramembranoso tem

maior capacidade osseoindutiva em defeitos de crânio do que a matriz de osso endocondral. Os resultados indicaram que as matrizes de osso perfurado e desmineralizado possuem um grande potencial osteogênico independente da origem ser endocondral ou intramembranosa. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa na área de osso vital neoformado nas cavidades ósseas, após o enxerto com matrizes de osso perfurado e desmineralizado de origens embriológicas diferentes.

O osso desmineralizado particulado apresenta difícil aplicação em relação ao fato das 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.*⁵⁸, avaliaram, através de radiografias e método histológico, o reparo ósseo 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 a 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.

SHEN *et al.*⁵⁵, em 1993, estudaram o efeito da matriz óssea desmineralizada na estabilidade de implantes ortopédicos de liga de titânio com superfície rugosa colocados em defeitos ósseos do canal intramedular femoral de coelhos. No grupo de controle positivo os implantes foram colocados sob pressão, sem enxerto ósseo, por representar a situação ideal. Os outros grupos de coelhos tiveram o canal intramedular desgastado. Os implantes foram colocados e estabilizados com enxerto de osso autógeno, matriz óssea desmineralizada isolada, ou associada à adesivo de fibrina. O teste biomecânico consistiu de aplicação gradual de força até a remoção dos implantes. As amostras passaram também por avaliação histomorfométrica. Após quatro semanas a força de fixação no grupo controle era significativamente maior que nos grupos de estudo, mas não havia diferença significativa entre estes. Entretanto, após dezesseis semanas a diferença entre qualquer dos quatro grupos era insignificante. Em nenhum momento houve diferença entre os grupos de matriz óssea desmineralizada. Nos quatro grupos a quantidade de crescimento ósseo aumentou gradualmente com o tempo. A matriz óssea desmineralizada ainda estava em ossificação endocondral

após dezesseis semanas. O adesivo de fibrina associado à matriz óssea aparentemente não aumentou a força de fixação do implante. Os resultados sugeriram que a utilização de matriz óssea desmineralizada como material de preenchimento pode promover aos implantes metálicos ortopédicos de superfície rugosa uma fixação comparável à obtida na utilização de enxerto autógeno.

TAKANO-YAMAMOTO *et al.*⁶⁰, em 1993, desenvolveram um modelo experimental em fendas alveolares da pré-maxila de ratos com o objetivo de estudar o potencial osseoindutivo de uma matriz de osso homogêneo desmineralizado e liofilizado. Trinta e cinco ratos foram utilizados para análise histológica onde as amostras foram obtidas após 3, 5, 7, 14, 21, 35, e 60 dias. O grupo que não recebeu enxerto teve o defeito cicatrizado com tecido conjuntivo fibroso e a pequena neoformação óssea na periferia mesmo após 35 ou 60 dias. Por outro lado, os grupos de estudo demonstraram reparo ósseo formando uma ponte entre as margens do defeito a partir de 35 dias do enxerto. Outros quarenta e dois ratos foram destinados à mensuração da atividade de fosfatase alcalina. Por fim, a incorporação de Ca^{45} foi testada em dezoito ratos. Nos grupos controle não houve uma mudança significativa na atividade de fosfatase alcalina ou na incorporação de Ca^{45} , diferentemente dos grupos que receberam matriz de osso homogêneo desmineralizado e liofilizado, onde a atividade de fosfatase alcalina aumentou significativamente a partir do décimo dia, e a incorporação de Ca^{45} aumentou após quatorze dias do enxerto. Desta forma, os defeitos de 2mm na pré-maxila de ratos apresentaram um tamanho aceitável para testar materiais que auxiliem o reparo ósseo.

O reparo de cavidades ósseas cirúrgicas de 15mm foi avaliado na calvária de coelhos por KLEINSCHMIDT *et al.*³¹, em 1993, quando utilizaram dois discos de polímero, que evitavam o colapso dos tecidos moles, e matriz óssea desmineralizada, associados ou não. Após seis semanas a associação de discos de polímero e matriz demonstrou uma quantidade de reparo significativamente maior que os grupos onde se utilizou disco de polímero ou matriz separadamente. Após doze semanas todos os grupos apresentaram uma quantidade de reparo significativamente maior que o que apresentavam após seis semanas. Os grupos de estudo, disco de polímero, matriz óssea desmineralizada, e a associação disco e matriz, apresentaram mais reparo ósseo que o grupo controle, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre estes três grupos. Entretanto, o osso neoformado no grupo da associação parecia ser mais maduro. O benefício da utilização de discos de polímero evitando o colapso de tecidos para dentro da cavidade associado ao seu preenchimento com matriz óssea desmineralizada foi mais significativa nas primeiras seis semanas. Isto pode estar relacionado a 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 materiais que auxiliem o reparo ósseo entre duas barreiras biodegradáveis para o reparo de segmentos da calvária.

De acordo com PETIT & RIPAMONTI⁴⁰, em 1994, o reparo 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 o reparo ósseo 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 reparo 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.*¹⁴, 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 reparo ósseo 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 reparo ósseo quando comparado aos corais.

De acordo com JAZAYERI *et al.*²⁹, em 1994, a utilização de materiais inertes que promovam a osseocondução em defeitos ósseos, associados a matriz óssea desmineralizada, pode oferecer suporte estrutural e ajudar a prevenir o deslocamento da matriz até que ocorra o reparo ósseo. Estes pesquisadores avaliaram a associação de implantes como Polidioxanona, Geofam, Medpor, e Surgicel, com matriz óssea desmineralizada, onde o grupo controle recebia apenas a matriz, e demonstraram que apesar da porção central da cavidade apresentar tecido fibroso, a neoformação óssea era evidente em todas as amostras. Os testes biomecânicos não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos de Surgicel, Polidioxanona, Geofam, e grupo controle. A amostra de crânio intacto e o grupo de Medpor não apresentaram diferença entre si, contudo demonstraram uma resistência maior que os outros grupos e esta diferença era estatisticamente significativa. O Surgicel e o Geofam são materiais primariamente hemostáticos e neste estudo se mostraram inconsistentes, tendo o Geofam inibido o reparo ósseo. A utilização de matriz óssea não associada a implantes tem a vantagem de diminuir o tempo cirúrgico, além da ausência de um material que induz reação a corpo estranho, entretanto isto não é possível quando existe a necessidade de um suporte inicial.

Segundo FEIGHAN *et al.*¹⁶, em 1995, a matriz óssea desmineralizada apresenta fatores osseoindutivos que estimulam o preenchimento de defeitos ósseos. Entretanto, a utilização deste material na forma particulada nem sempre permite a manipulação com objetivo de manter um contorno ideal. Os autores testaram a osseoindução de uma matriz óssea desmineralizada associada a glicerol, ou seja, na forma de gel, em defeitos femurais de ratos. Foram avaliados o glicerol, a matriz óssea desmineralizada, cilindros cerâmicos, e associações entre estes materiais. O gel de matriz óssea desmineralizada associado ou não à cerâmica teve um efeito significativo na área total de osso formado em relação aos grupos de cerâmica isolada ou associada à glicerol e ao grupo de glicerol. Na ausência de cerâmica o efeito foi mais significativo ainda, ou seja, a presença da cerâmica foi associada à uma menor formação óssea. O glicerol isolado, associado a matriz óssea desmineralizada, ou ao cilindro cerâmico não impediu a revascularização nem provocou resposta inflamatória significativa. O gel de matriz óssea desmineralizada foi efetivo na indução de formação óssea.

Do ponto de vista clínico é extremamente importante saber a viabilidade dos variados enxertos ósseos encontrados no comércio. SHIGEYAMA *et al.*⁵⁶, em 1995, realizaram um estudo com o objetivo de estabelecer *in vitro* a atividade biológica dos extratos de proteína preparados a partir de enxertos ósseos obtidos comercialmente, e comparar com a atividade biológica de extratos similares originados do preparo de osso humano fresco. Os autores avaliaram a capacidade dos extratos de proteína promoverem aderência, proliferação e quimiotaxia de fibroblastos gengivais humanos. Os resultados demonstraram que as partículas do

osso desmineralizado, preparado para ser comercializado, apresentam proteínas que permaneciam retidas, e com capacidade de promover aderência celular semelhante à que foi demonstrada pelo extrato de proteínas de osso humano fresco. Entretanto, as proteínas do enxerto ósseo obtido comercialmente pareciam estar em menor concentração e apresentaram menos habilidade na promoção de proliferação celular. Uma das explicações para a menor quantidade de proteínas ósseas morfogenéticas no enxerto ósseo obtido comercialmente é que os fatores que promovem a proliferação celular são removidos ou alterados no preparo do enxerto com HCl. A atividade de quimiotaxia dos extratos de proteína foi determinada, entretanto nenhum dos extratos promoveu a migração celular. O enxerto obtido comercialmente continha colágeno tipo I, fibronectina, sialoproteína óssea, e proteína óssea morfogenética 2, 4, e 7. Concluiu-se que o enxerto obtido no comércio retem proteínas com capacidade de influenciar no comportamento celular *in vivo*. Entretanto, alguma atividade biológica é perdida em função dos processos que estes materiais sofrem.

A atividade osseoindutiva 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.*⁵¹, 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.

BECKER *et al.*⁵, em 1996, avaliaram histologicamente o tecido ósseo formado em regiões que haviam recebido enxerto de osso autógeno, matriz de osso desmineralizado e liofilizado, osso mineralizado e liofilizado, ou uma combinação de osso autógeno e matriz de osso desmineralizado associado a utilização de barreira biológica. As amostras foram obtidas na segunda fase cirúrgica, 4 a 13 meses após o enxerto. A matriz de osso desmineralizado e liofilizado utilizada no preenchimento de alvéolo após exodontia, ou no recobrimento de roscas de implantes não promoveu a formação óssea. A presença de partículas não vitais ocorreu independente do tipo de enxerto utilizado ou do uso de barreira. O osso mineralizado liofilizado promoveu uma reação inflamatória extensa com presença de macrófagos e células gigantes. Nenhum dos enxertos ósseos induziu a neoformação óssea e o osso encontrado se formou presumivelmente por osseointegração. O emprego de enxertos ósseos

no aumento de rebordo pode interferir com o processo normal de reparo ósseo e deve ser melhor questionado.

Segundo DODSON¹² (1996), o desenvolvimento de defeitos ósseos periodontais na distal de segundos molares é uma complicação que pode ocorrer após a remoção de terceiros molares inclusos. Assim, este autor estudou o uso de matriz óssea desmineralizada para a reconstrução de defeitos ósseos alveolares em quatorze pacientes com indicação de remoção bilateral dos terceiros molares inferiores inclusos. Após a remoção dos dentes inclusos, aleatoriamente um dos alvéolos foi preenchido com partículas de matriz óssea desmineralizada, enquanto o outro alvéolo foi preenchido apenas com o coágulo do paciente e funcionou como controle. Após seis meses houve uma diminuição estatisticamente significativa na média de perda de inserção no grupo de estudo. Os índices gengival e de placa dos grupos controle e de estudo não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Os resultados deste estudo sugerem que a matriz óssea desmineralizada pode diminuir a perda de inserção na distal do segundo molar inferior após a remoção dos terceiros molares inclusos adjacentes.

A colocação de implantes osseointegrados em regiões onde o rebordo alveolar apresenta-se atrófico é um desafio constante na implantodontia. Desta forma, é bastante comum a utilização de enxertos homogêneos com o objetivo de proporcionar reparo ósseo adjacente à implantes. PIATTELLI *et al.*⁴² (1996), avaliaram o processo de reparo ósseo através de análise histoquímica e microscópica em pacientes que haviam recebido enxerto ósseo homogêneo liofilizado desmineralizado ou mineralizado, no tratamento de defeitos ósseos

adjacentes à implantes de titânio. Do ponto de vista histoquímico, o processo de reabsorção do enxerto ósseo homogêneo mineralizado e liofilizado é muito escasso e não foi possível encontrar células positivas para fosfatase ácida, diferentemente do enxerto ósseo homogêneo desmineralizado e liofilizado. Nenhum dos enxertos demonstrou qualquer efeito osseoindutivo. As partículas de enxerto ósseo homogêneo desmineralizado e liofilizado tendem a ser rodeadas por tecido conjuntivo composto principalmente de fibras colágenas, enquanto que as partículas do enxerto ósseo homogêneo mineralizado e liofilizado, mesmo distantes do osso do hospedeiro estavam delimitadas ou envolvidas por osso neoformado.

RABIE & LIE KEN JIE⁴⁴, 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 críticos 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.

De acordo com REYNOLDS & BOWERS⁴⁸, em 1996, o osso desmineralizado e liofilizado é o enxerto homogêneo mais utilizado em periodontia. Desta forma, estes autores desenvolveram um estudo com o propósito de examinar histologicamente o destino deste enxerto quando utilizado no reparo de defeitos periodontais intraósseos, e comparar a quantidade de formação do novo periodonto de inserção. A avaliação histológica demonstrou a neoformação do periodonto de inserção incluindo osso, cimento e ligamento periodontal. A presença de partículas residuais do enxerto foi verificada em 72% dos defeitos ósseos, entretanto, aparentemente não havia diferença na natureza desta nova forma de inserção em relação ao grupo que não apresentou partículas residuais. Quando havia a presença de partículas residuais, em 6 meses elas pareciam amalgamadas dentro do osso neoformado. As respostas de reparo ósseo mais favoráveis foram aquelas associadas à presença das partículas de enxerto envolvidas pelo tecido ósseo neoformado.

LA FONTAINE & PINTO³², 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 osseoindução do osso desmineralizado, existem idéias pré-concebidas em relação ao material como a possibilidade de transmissão de doenças, antigenicidade, heterogeneidade, protocolo de esterilização e preparação 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.

Segundo RADAELLI & RADAELLI⁴⁵, em 1997, a utilização de enxertos ósseos é uma das maneiras de se obter regeneração periodontal. Estes autores revisaram a literatura em relação aos materiais para preenchimento de defeitos ósseos. Os trabalhos revisados demonstravam que quando foram indicados com os devidos critérios os enxertos ósseos autógenos e homólogos resultaram em reparo ósseo significativo. A matriz óssea desmineralizada e as concentrações de proteína óssea morfogenética são as únicas substâncias osseoindutivas. Os autores enfatizaram a necessidade da seleção de um banco de tecidos confiável que apresente de forma clara os métodos de seleção de doadores e de processamento da matriz óssea desmineralizada. Desta forma, a aplicação clínica de enxertos ósseos pode ser realizada com segurança quando houver indicação.

A capacidade regenerativa de diferentes formas de enxerto de osso autógeno foi avaliada por REDONDO *et al.*⁴⁷ (1997) em defeitos ósseos criados no

ramo mandibular de ratos *Wistar*. O fragmento ósseo removido era reposicionado imediatamente como enxerto tradicional, ou após 2 semanas quando era congelado em nitrogênio líquido, ou desmineralizado. O exame histopatológico das amostras de enxerto demonstrou que havia mais células mesenquimais, tanto na área medular quanto na área periférica, no grupo que recebeu enxerto ósseo desmineralizado. A capacidade regenerativa da matriz desmineralizada foi maior que a do próprio enxerto autógeno, o que pode ser explicado pela pequena quantidade de osso medular da mandíbula de ratos, que é bicortical, e portanto, apresenta poucas células osteogênicas. O enxerto congelado demonstrou uma tendência a se reabsorver.

A osseoindução ao redor de implantes osseointegrados imediatos, ou seja que foram colocados logo após a exodontia, poderia eliminar um segundo tempo cirúrgico e reduzir o tempo de tratamento neste tipo de reabilitação. Com esta preocupação, RUTHERFORD *et al.*⁴⁹, em 1992, se propuseram a estudar o efeito de uma proteína óssea morfogenética bovina na osseoindução ao redor de implantes dentários osseointegrados imediatos. Todos os incisivos superiores e inferiores, e os caninos inferiores de três macacos machos foram extraídos. Os alvéolos dos incisivos laterais superiores e dos incisivos centrais inferiores não foram utilizados. Os implantes osseointegrados foram colocados em alvéolos preenchidos por sangue, matriz óssea desmineralizada, ou matriz óssea associada à proteína óssea morfogenética bovina. A associação de matriz óssea desmineralizada e proteína óssea morfogenética bovina induziu a neoformação óssea na superfície dos implantes de titânio. Mas, quando a parede do alvéolo era

mais distante que 3mm a neoformação óssea foi menor. Os alvéolos não tratados ou preenchidos apenas com matriz óssea desmineralizada não indicaram evidência de neoformação óssea próximo aos implantes independentemente da distância entre a parede do alvéolo e o implante. A neoformação óssea era substancialmente maior nos alvéolos preenchidos com a associação de matriz e proteína morfogenética que nos preenchidos apenas com matriz ou deixados vazios. A pequena quantidade de osso neoformado quando a distância do implante à parede do alvéolo era maior que 3mm sugere mais a presença de osseocondução que osseoindução propriamente dita. Os padrões similares de formação óssea quando não se utilizou qualquer material ou se utilizou apenas a matriz óssea desmineralizada indica que este material não acelerou nem inibiu a neoformação óssea. A utilização de proteína óssea morfogenética pode ser um método eficiente como tratamento em uma variedade de defeitos e deformidades esqueléticas congênitas ou adquiridas.

ZAMBONIN & GRANO⁶³ (1995), pesquisaram os efeitos de duas hidroxiapatitas e uma matriz óssea bovina desmineralizada, na proliferação celular e na síntese de matriz óssea, em osteoblastos humanos. O objetivo do trabalho era identificar e analisar parâmetros específicos da atividade osteoblástica em resposta a estes três diferentes biomateriais. Os resultados indicaram que as duas hidroxiapatitas testadas induziram efeitos similares prevenindo a proliferação celular, enquanto aumentaram a síntese de matriz óssea pelos osteoblastos. A matriz óssea bovina desmineralizada causou um forte efeito estimulatório na proliferação de osteoblastos, e da mesma forma melhorou a síntese de matriz

óssea com resultados acima dos que foram encontrados nos dois grupos de hidroxiapatita. A matriz óssea bovina desmineralizada, aumentou bastante tanto a proliferação celular quanto a síntese de matriz óssea e por estas razões sua utilização como enxerto ósseo é apropriada. Por outro lado, as hidroxiapatitas evitaram a proliferação celular apesar de estimularem a síntese de matriz óssea, e por isso a sua utilização clínica é menos favorável.

Segundo TAGA *et al.*⁵⁹, em 1997, o alto custo, a dificuldade de obtenção de osso humano viável, e a proibição da comercialização de órgãos ou tecidos humanos em diversos países, foram responsáveis pelo desenvolvimento de produtos de origem bovina para a mesma utilidade. Estes autores realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a capacidade de estimulação de uma matriz de osso bovino desmineralizado e liofilizado no reparo ósseo de cavidades ósseas cirúrgicas críticas, de 8mm de diâmetro, na calvária de cobaias. Todas as cavidades ósseas que foram deixadas apenas com coágulo sanguíneo foram preenchidas por tecido conjuntivo fibroso de espessura menor que a margem óssea na periferia das lesões. Por outro lado, as cavidades anteriores que haviam sido preenchidas com a matriz bovina apresentavam-se quase totalmente ocupadas por tecido ósseo, com espessura menor que o osso pré-existente, no grupo sacrificado após 6 meses. Os autores concluíram que a matriz orgânica de osso bovino liofilizado é capaz de estimular o reparo ósseo em cavidades ósseas críticas no crânio de cobaias.

Recentemente, DE LAVALLE RESTREPO *et al.*¹¹, (1998) avaliaram o potencial da matriz de osso bovino desmineralizado e liofilizado no reparo 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 sanguíneo 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 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 o reparo de lesões ósseas.

A necessidade de se desenvolver um material que possa ser utilizado como enxerto ósseo, principalmente para evitar a remoção de enxerto autógeno, levou ao estudo e desenvolvimento de diferentes biomateriais. Entretanto, ainda não foi encontrado o biomaterial ideal para utilização como enxerto ósseo.

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

Frente ao observado, na revisão de literatura, nos propomos a avaliar histologicamente dois tipos de matrizes ósseas desmineralizadas uma de origem bovina e a outra de origem humana, sobre o processo de regeneração óssea em calvária de coelhos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e Anestesia

Neste estudo foram utilizados 18 coelhas albinas da raça Nova Zelândia, cuja idade variou de 4 a 6 meses, e o peso de 3,3 a 3,7 kg. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos e mantidos durante o período experimental com alimentação sólida* e água a vontade.

Como meio de indução de anestesia foi utilizado pentobarbital sódico†, injetado lentamente na veia auricular média na dosagem de 30 mg/kg de peso corporal, conforme recomendações do fabricante.

4.2 Procedimento Cirúrgico

A antissepsia foi realizada com solução alcoólica de polivinil pirrolidona‡ a 10% após a tricotomia da calvária, e o isolamento da área a ser operada foi conseguido através de aposição de campos descartáveis esterilizados.

O procedimento cirúrgico foi realizado conforme o protocolo descrito por ALBERIUS *et al.*¹ (1989) para craniotomia em coelhos. A pele e o tecido subcutâneo foram seccionados através de uma incisão mediana na calvária do animal, realizada com cabo de bisturi número 3, montado com lâmina

* Ração Sítios e Quintais para Coelhos. Purina Nutrimentos Ltda

† Hypnol 3% Fontoveter. Divisão Veterinária de Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

‡ Povidine Tintura. Microshield-Johnson & Johnson

intercambiável número 15[§]. O periósteo que recobre a calvária também foi incisado, descolado e o retalho foi afastado lateralmente (figura 2). Uma vez localizada a sutura sagital, duas cavidades ósseas circulares, foram produzidas, sendo uma do lado direito e a outra do lado esquerdo. Para a confecção das cavidades utilizou-se broca trefina^{**} com 10mm de diâmetro montada em contra-ângulo de baixa rotação, com o cuidado de não perfurar a duramater (figura 3).

As perfurações foram feitas sob constante irrigação externa com solução fisiológica de cloreto de sódio^{††} a 0,9%, realizada com seringas descartáveis, evitando-se assim um aquecimento excessivo do tecido ósseo. Após a realização das perfurações, os segmentos de osso parietal foram removidos em espessura total e a duramater foi exposta. As cavidades do lado esquerdo foram preenchidas apenas pelo sangue do animal e denominadas cavidades controle (figura 4). No grupo I, as cavidades ósseas cirúrgicas do lado direito foram preenchidas com matriz de osso bovino desmineralizado e liofilizado (OSSEOBOND[®])^{‡‡}. No grupo II as cavidades ósseas cirúrgicas do lado direito foram preenchidas com matriz óssea desmineralizada e liofilizada de origem humana (DEMBONE[™])^{§§}. As partículas dos materiais utilizados nos grupos I e II

[§] Feather Safety Razor Co., Ltda. Divisão Médica.

^{**} Implantes – Biomateriais Dentoflex Instrumentos Cirúrgicos

^{††} Glicolabor – Industria Farmacêutica

^{‡‡} Implantes – Biomateriais Dentoflex Instrumentos Cirúrgicos

^{§§} Pacific Coast Tissue Bank

(figura 5) foram aglutinadas em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% antes de serem levadas à cavidade óssea. Terminado o procedimento cirúrgico, o periósteo foi reposicionado e os planos superficiais suturados com fio de nylon 4-0 monofilamentado^{***}.

Todos os animais receberam uma associação antibiótica^{†††} em dose única de 1 ml, por via intramuscular profunda, imediatamente após o procedimento cirúrgico.

Os animais foram sacrificados com overdose endovenosa de pentobarbital sódico, nos períodos de 3, 7, e 15 semanas, com um total de 3 animais de cada grupo por período para sacrifício.

Tabela 1 – Distribuição dos animais por períodos para sacrifício

<i>Grupos</i>	<i>Nº de Animais</i>	<i>Períodos para Sacrifício</i>		
		<i>3 sem</i>	<i>7 sem</i>	<i>15 sem</i>
<i>Grupo I</i>	<i>9</i>	<i>3</i>	<i>3</i>	<i>3</i>
<i>Grupo II</i>	<i>9</i>	<i>3</i>	<i>3</i>	<i>3</i>
	<i>18</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>6</i>

^{***} Ethicon – Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda.

^{†††} Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte. Laboratórios Wyeth Ltda.

4.3 Método Histológico

As calvárias dos animais foram removidas através de osteotomia com broca tronco-cônica 701 montada em baixa rotação, acompanhada de irrigação com solução fisiológica de cloreto de sódio.

A fixação das amostras foi realizada em solução de formol a 4% durante 48 horas, em temperatura ambiente. Terminada a fixação as amostras foram lavadas em água corrente durante 24 horas e descalcificadas em solução de MORSE³⁷ (1945), a qual foi trocada a cada 48 horas por um período de 35 dias. Após a descalcificação as amostras foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em solução crescente de álcool etílico e diafanizadas em xilol seguindo-se a tramitação laboratorial de rotina.

As amostras foram divididas ao meio (figura 1) e as metades incluídas em parafina, de modo a fornecer cortes longitudinais do centro da cavidade óssea cirúrgica. Alguns dos cortes semi seriados com espessura de 7 μ m foram corados pela hematoxilina de Harris, e eosina aquosa a 1%, e outros foram corados pelo tricrômico de Mallory para análise em microscopia ótica.

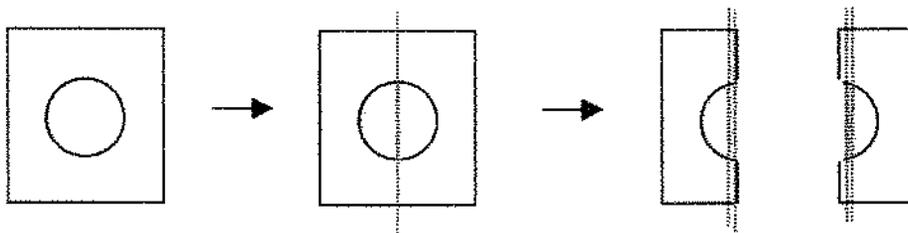


Figura 1 – Divisão das amostras para inclusão e corte

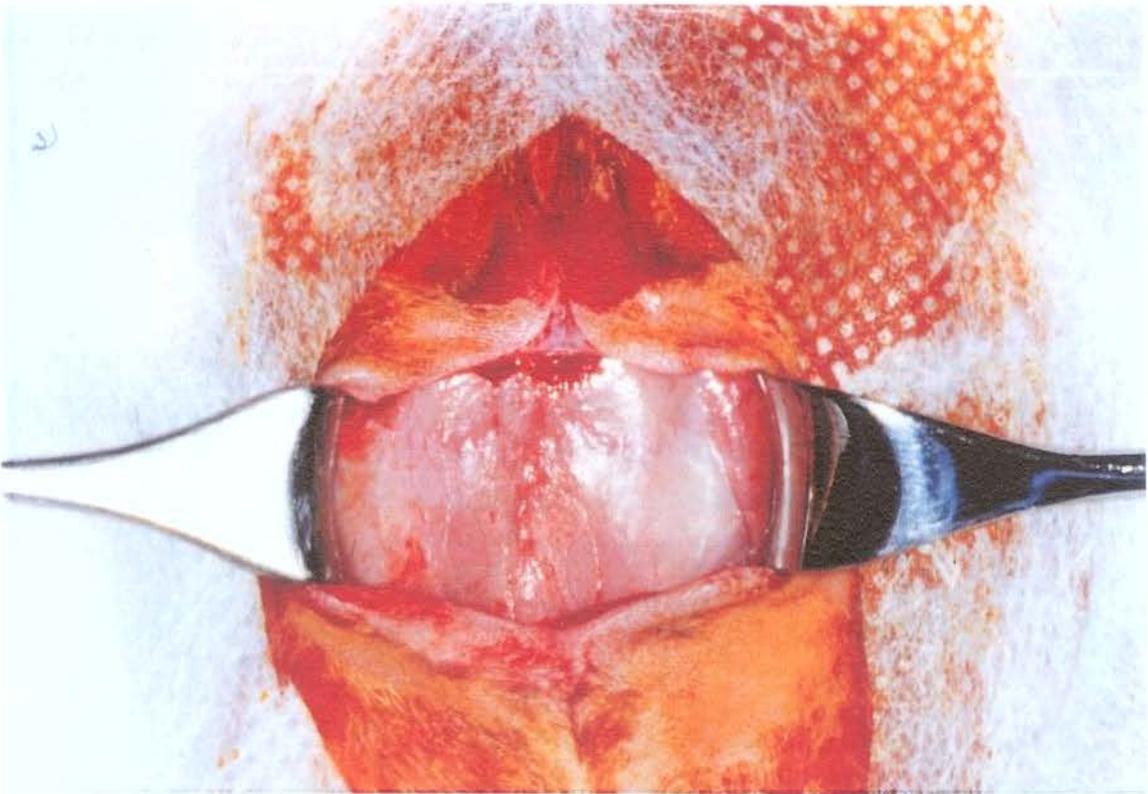


Fig. 2. Aspecto após aposição de campos esterilizados, incisão mediana e descolamento da calvária do animal.

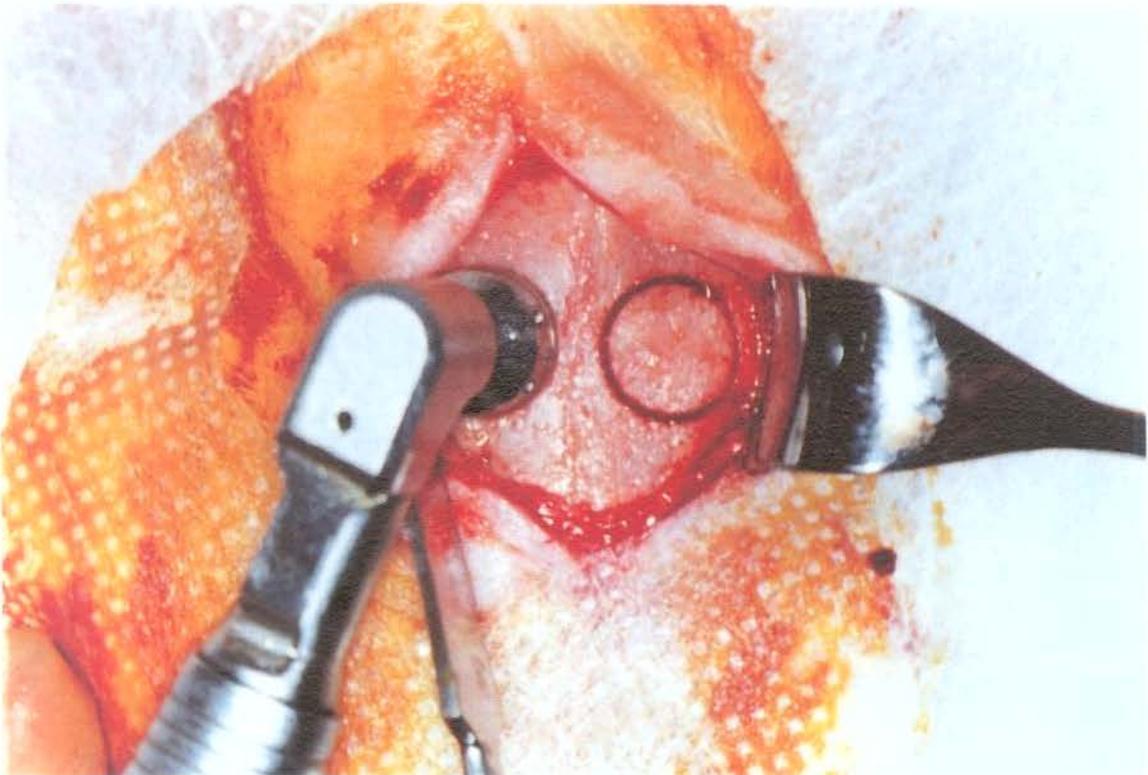


Fig. 3. Perfurações sendo realizadas com broca trefina montada em contra-ângulo de baixa rotação.

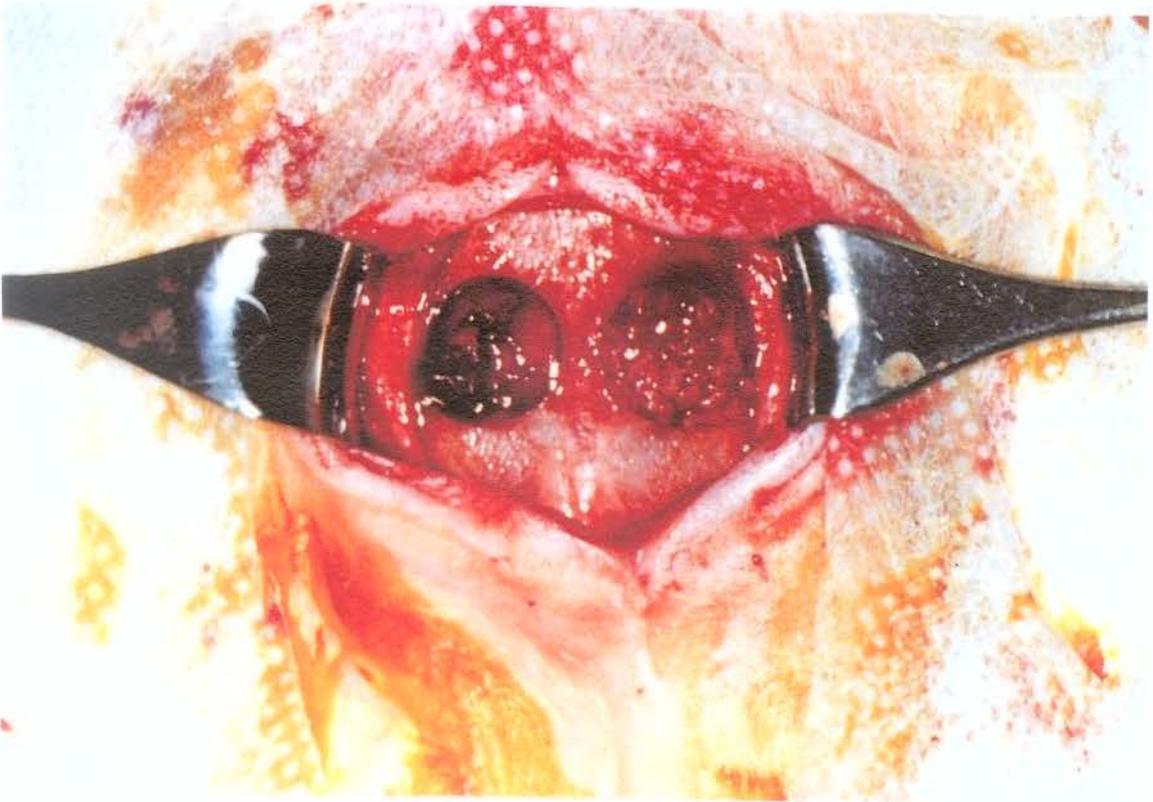


Fig. 4. Cavidades ósseas cirúrgicas na calvária do animal. A cavidade do lado direito está preenchida com matriz óssea desmineralizada. A cavidade do lado esquerdo está sendo preenchida por coágulo.

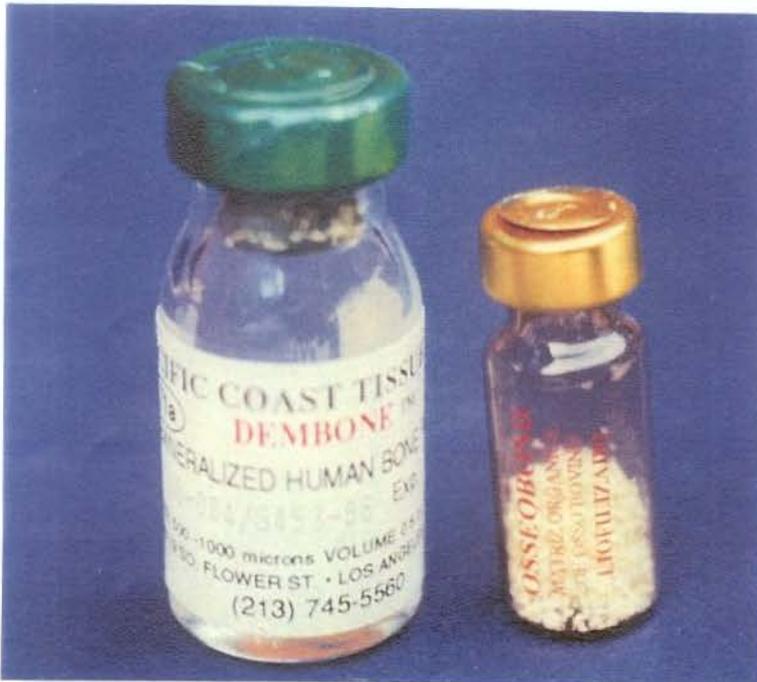


Fig. 5. Matrizes ósseas desmineralizadas utilizadas nos grupos I e II.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

PERÍODO DE TRÊS SEMANAS

Grupo I

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

A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por tecido conjuntivo frouxo com intensa reação inflamatória. Uma pequena quantidade de partículas do material estava circundada pelo tecido conjuntivo (figura 7) e aglomerados de células multinucleares semelhantes a osteoclastos (figura 8). Uma fina camada de tecido conjuntivo denso podia ser notada ocupando a parte mais superior da cavidade, em algumas regiões notava-se a presença de coágulo remanescente.



Fig. 6. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar a presença de tecido conjuntivo denso (TCD) revestindo a região superior da cavidade. Trabéculas de osso neoformado (ON) originando-se a partir do osso pré-existente (OP) nas bordas da cavidade. Pequena quantidade de partículas (P) da matriz em processo de reabsorção no centro da cavidade. Grupo I, 3 semanas. H.E. 2,5x.

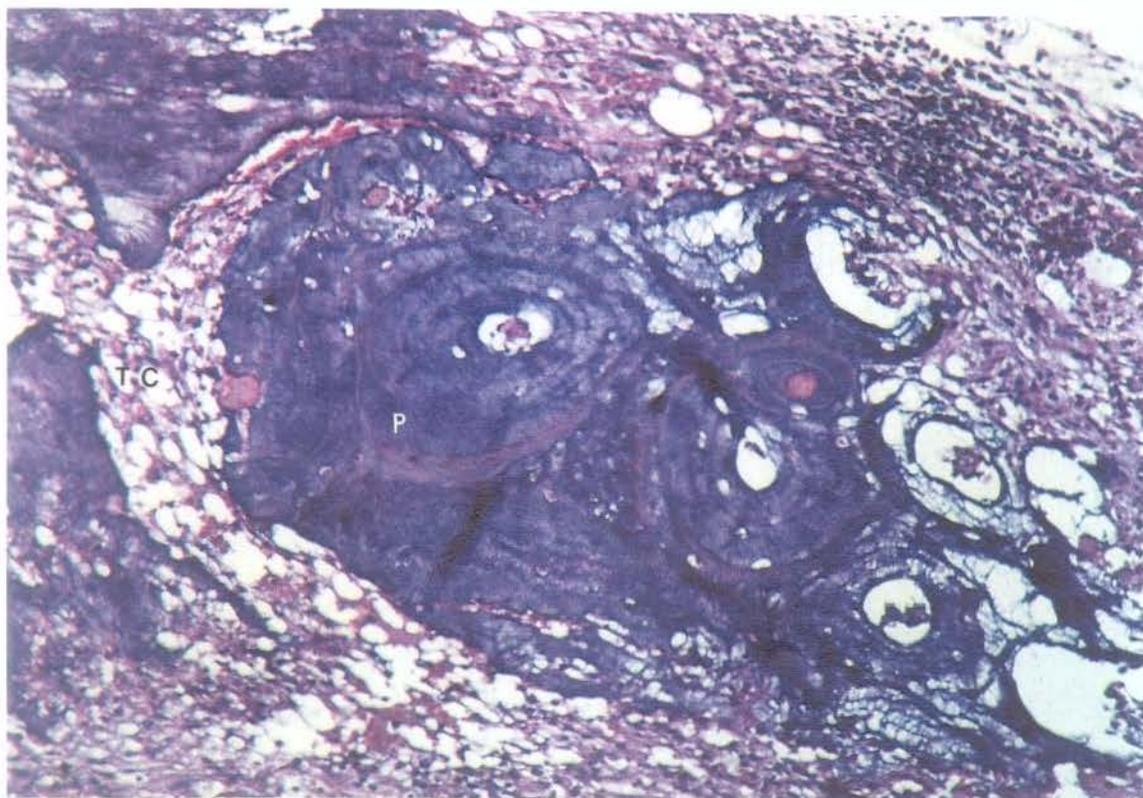


Fig. 7. Observar partícula rodeada por tecido conjuntivo (TC) e células inflamatórias. Grupo I, 3 semanas.

H.E. 10x

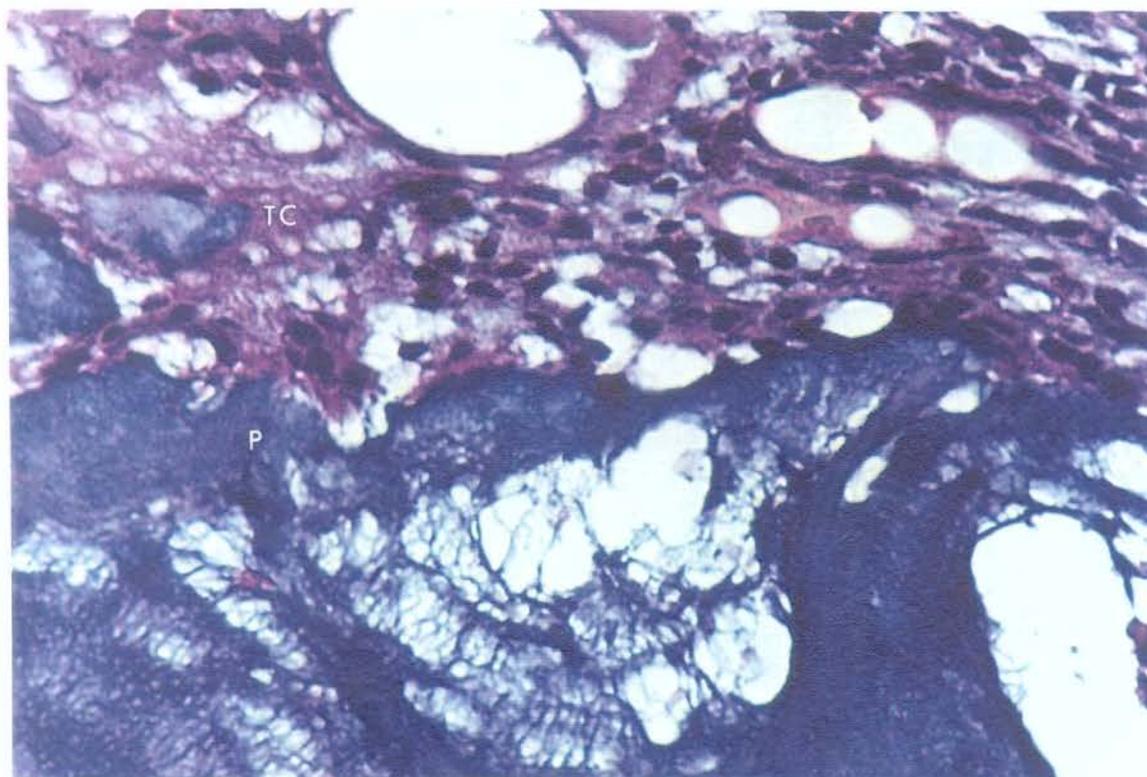


Fig. 8. A presença de células semelhantes à osteoclastos sugere que a partícula (P) está em processo de reabsorção. Grupo I, 3 semanas. H.E. 40x.

Grupo II

O limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente, na região periférica da amostra, podia ser facilmente identificado. A presença de duas corticais bem nítidas e tecido medular constituído por tecido adiposo com rica celularidade e vascularização caracterizavam este osso pré-existente. A remodelação das margens da cavidade ocorre com reabsorção e aposição óssea tendendo ao afilamento e crescimento em direção centrípeta. Algumas vezes existia tecido conjuntivo interposto entre o osso pré-existente e o neoformado.

Uma grande quantidade de partículas do material, apresentando variados tamanhos, estava presente em toda a cavidade. A maioria destas partículas encontrava-se circundada por tecido conjuntivo denso com intensa reação inflamatória e coágulo remanescente em alguns locais (figura 9). Algumas partículas demonstravam tecido conjuntivo vascularizado no seu interior e áreas de reabsorção com a presença de osteoclastos nas bordas (figura 10). Em uma das amostras a presença de células na superfície das partículas sugeria atividade osteoblástica com aposição de tecido ósseo neoformado (figura 11).

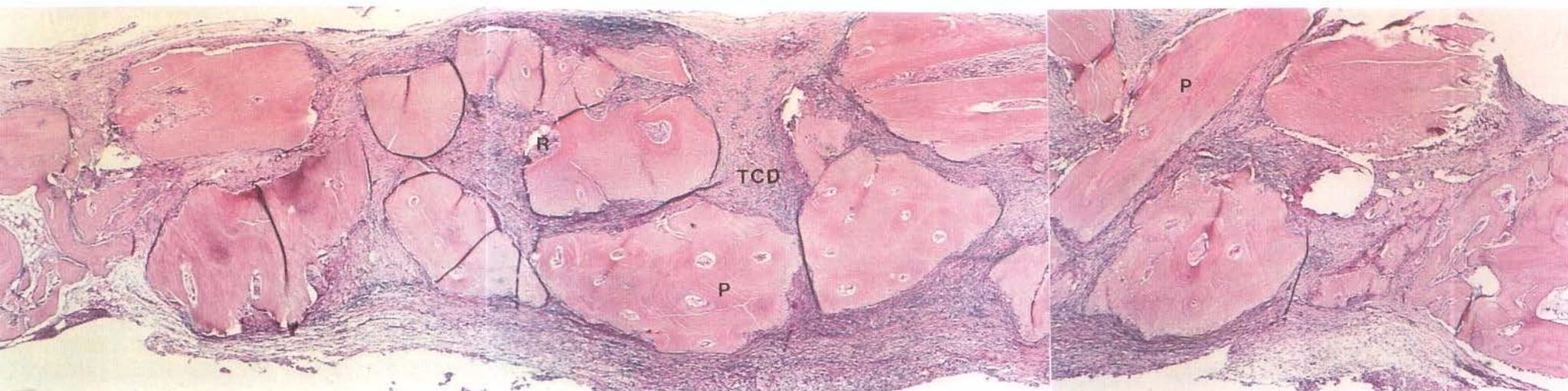


Fig. 9. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar a grande quantidade de partículas (P) envolvidas pelo tecido conjuntivo denso (TCD). As partículas apresentam áreas de reabsorção (R) preenchidas por tecido conjuntivo. Grupo II, 3 semanas. H.E. 2,5x.

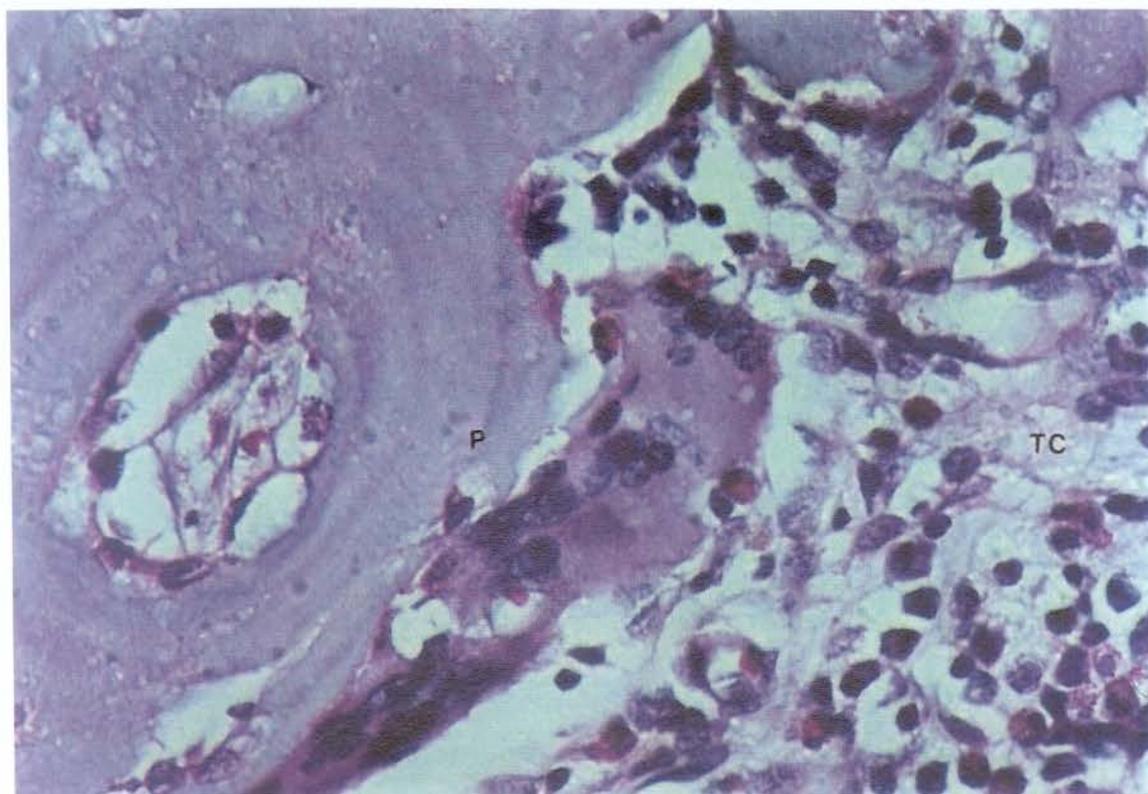


Fig. 10. Observar o tecido conjuntivo (TC), e células inflamatórias próximo a partícula (P). A presença de células multinucleadas junto à superfície da partícula sugere processo de reabsorção. Grupo II, 3 semanas. H.E. 40x.

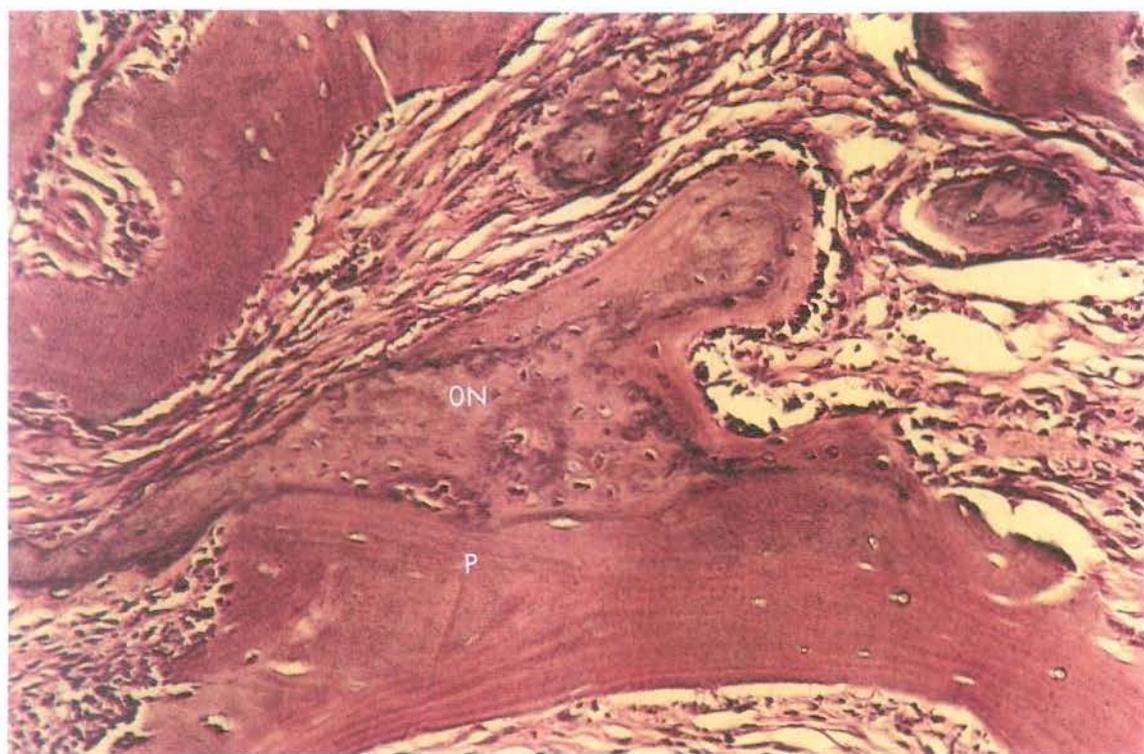


Fig. 11. Observar a presença de osso neoformado (ON) junto à partícula (P) sugerindo atividade osteoblástica e aposição óssea na sua superfície. Grupo II, 3 semanas. H.E. 10x.

Cavidades controle

A porção periférica da cavidade óssea cirúrgica é facilmente identificada e apresenta o osso pré-existente caracterizado pela presença de duas corticais bem nítidas e tecido medular constituído por tecido adiposo com rica celularidade e boa vascularização. Ainda no limite da cavidade, o osso pré-existente apresenta áreas de remodelação e osso neoformado tendendo ao afinamento, e emitindo projeções em direção centrípeta. Uma camada de tecido conjuntivo denso aparece algumas vezes como interposição entre o osso neoformado e o osso pré-existente.

No interior da cavidade óssea cirúrgica notamos remanescentes do coágulo, tecido conjuntivo frouxo, discreta reação inflamatória e alguns vasos. A região mais superior da cavidade apresenta uma fina camada de tecido conjuntivo denso (figura 12).



Fig. 12. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar a fina camada de tecido conjuntivo denso (TCD) se organizando na região superior da cavidade. O osso neoformado (ON) origina-se a partir do osso pré-existente (OP) nas bordas da cavidade, e projeta-se em direção centrípeta. Cavidades controle, 3 semanas. T.M. 2,5x.

PERÍODO DE SETE SEMANAS

Grupo I

Na porção periférica da amostra podia ser identificado o limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente, que caracterizava-se pela presença de duas corticais bem nítidas, tecido medular constituído por tecido adiposo bem celularizado e vascularizado. A partir do osso pré-existente existiam áreas de remodelação e neoformação óssea crescendo em direção centrípeta.

No interior da cavidade óssea cirúrgica notávamos a presença de tecido conjuntivo frouxo na região inferior, e áreas de tecido conjuntivo denso na região mediana. Uma fina camada de tecido conjuntivo denso podia ser notada revestindo a região superior da cavidade. Existia uma discreta reação inflamatória (figura 13). Apenas um dos animais apresentou ilhota sugestiva de tecido ósseo neoformado no interior do tecido conjuntivo denso no centro da cavidade.

Grupo II

A porção periférica da cavidade óssea cirúrgica era facilmente identificada, caracterizada pela presença do osso pré-existente com duas corticais bem nítidas, tecido medular constituído por tecido adiposo com rica celularidade e vascularização. Nesta região, observou-se também áreas de remodelação do osso pré-existente com reabsorção e aposição de tecido ósseo neoformado na direção centrípeta. Algumas vezes o tecido ósseo neoformado apresentava regiões mais escuras sugerindo que as partículas estão sendo envolvidas.

A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por partículas de material que são circundadas por um tecido conjuntivo bem organizado com pequena quantidade de células inflamatórias (figura 14). Algumas partículas apresentavam áreas de reabsorção ocupadas pelo tecido conjuntivo e osteoclastos na sua superfície. Também observamos áreas sugestivas de aposição de tecido ósseo neoformado bem celularizado junto a estas partículas reabsorvidas (figuras 15 e 16). A região inferior da cavidade apresentava uma fina camada de tecido conjuntivo denso.



Fig. 14. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar a presença de algumas partículas (P) em processo de reabsorção circundadas pelo tecido conjuntivo denso (TCD) que preenche a cavidade. Notar a presença de algumas ilhotas de tecido ósseo neoformado (ON) no centro da cavidade. Grupo II, 7 semanas. H.E. 2,5x.

Cavidades controle

A porção periférica da cavidade óssea cirúrgica era facilmente identificada, sendo que o osso pré-existente é caracterizado pela presença de duas corticais nítidas e tecido medular constituído por tecido adiposo com boa celularidade e vascularização. Ainda no limite da cavidade, o osso pré-existente apresentava áreas de remodelação e osso neoformado com suas bordas tendendo ao afilamento em direção ao centro da cavidade. Uma camada de tecido conjuntivo denso aparecia algumas vezes como interposição entre o osso neoformado e o osso pré-existente.

A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por tecido conjuntivo. O espaço inferior da cavidade apresentava uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo, e o espaço superior encontrava-se revestido por uma fina camada de tecido conjuntivo denso. Não havia a presença de células inflamatórias. Algumas vezes, observamos a presença de poucas ilhotas de tecido ósseo neoformado nas proximidades do osso pré-existente, que se apresentavam bem celularizadas e vascularizadas. Quando estas ilhotas apareciam, sempre estavam circundadas por uma fina camada de tecido conjuntivo denso (figura 17).



Fig. 17. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar o tecido conjuntivo denso (TCD) entre as projeções de tecido ósseo neoformado (ON) em direção centripeta. O limite entre o osso neoformado e o osso pré-existente (OP) é bastante nítido (seta). Cavidades controle, 7 semanas. T.M. 2,5x.

PERÍODO DE QUINZE SEMANAS

Grupo I

O tecido ósseo pré-existente caracterizava-se pela presença de duas corticais bem nítidas, tecido medular constituído por tecido adiposo bem celularizado e vascularizado. A neoformação óssea ocorreu a partir do osso pré-existente nas duas extremidades da cavidade, com crescimento em direção ao centro onde apresentava-se mais afilada e encontrava-se com ilhas de tecido ósseo neoformado (figura 18). Na porção periférica da amostra, já não era tão nítido o limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente, entretanto uma das amostras demonstrou uma união fibrosa entre o osso neoformado e as bordas do osso pré-existente (figura 19).

Uma ponte de tecido ósseo neoformado ocupava quase toda a extensão da cavidade, mas no centro ainda existia tecido conjuntivo denso bastante vascularizado, que além de circundar ilhas de osso neoformado, também ocupava a porção média e inferior da cavidade. As ilhas de tecido ósseo neoformado eram ricamente celularizadas, vascularizadas, e juntamente com o osso neoformado das margens da cavidade tendiam a formar uma ponte entre as bordas, e fechar completamente a cavidade. Apresentavam uma espessura menor que as bordas do osso pré-existente na periferia da cavidade.

Em uma das amostras o centro da cavidade estava preenchido por tecido conjuntivo denso que impedia a união entre as duas projeções de osso

neoformado a partir das margens da cavidade. A porção mais superior das cavidades estava ocupada por tecido conjuntivo frouxo.

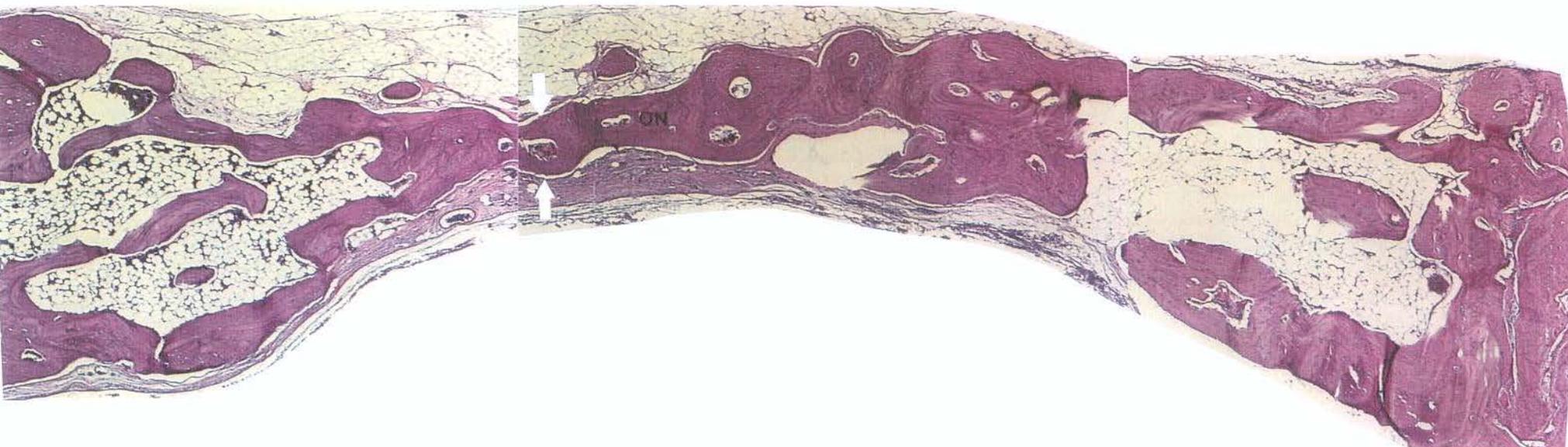


Fig. 18. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar as projeções de tecido ósseo neoformado (ON) promovendo uma união entre as bordas do tecido ósseo pré-existente. O osso neoformado apresenta espessura menor que o osso preexistente (setas). Grupo I, 15 semanas. H.E. 2,5x.

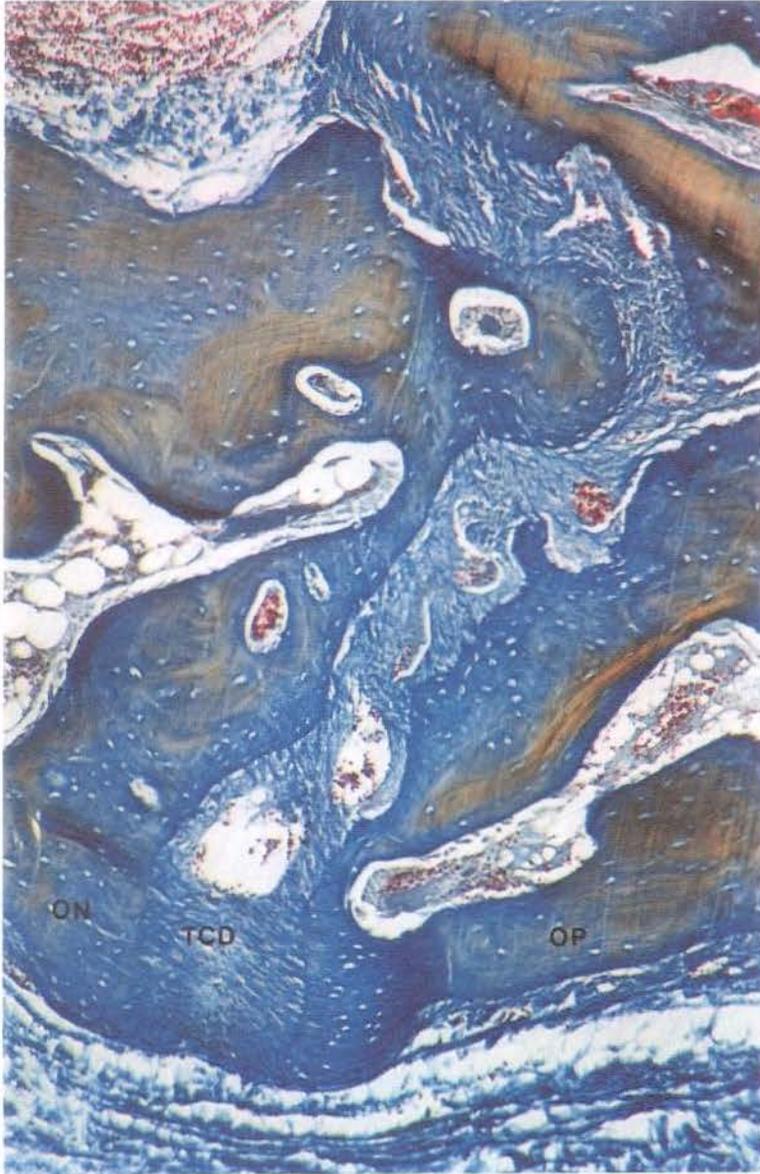


Fig. 19. Notar a presença de tecido conjuntivo denso (TCD) formando uma união fibrosa entre o tecido ósseo pré-existente (OP) e o tecido ósseo neoformado (ON). Grupo I, 15 semanas. T.M. 10x.

Grupo II

O limite entre o osso pré-existente e a cavidade óssea cirúrgica, na porção periférica da amostra, podia ser identificado pela presença de tecido conjuntivo interposto. O tecido ósseo pré-existente conservou suas características de apresentar duas corticais bem nítidas e tecido medular constituído por tecido adiposo com rica celularidade e vascularização. O osso neoformado a partir das margens da cavidade crescia em direção centrípeta tendendo ao afilamento. As projeções ósseas não se encontravam no centro pois existia tecido conjuntivo denso no centro da cavidade (figura 20).

A cavidade óssea cirúrgica apresentava partículas ainda em reabsorção, e ilhotas de tecido ósseo neoformado circundadas por tecido conjuntivo denso na sua porção mediana (figura 21). A porção mais inferior da cavidade encontrava-se revestida por uma fina camada de tecido conjuntivo denso e a região superior estava preenchida por tecido conjuntivo frouxo.

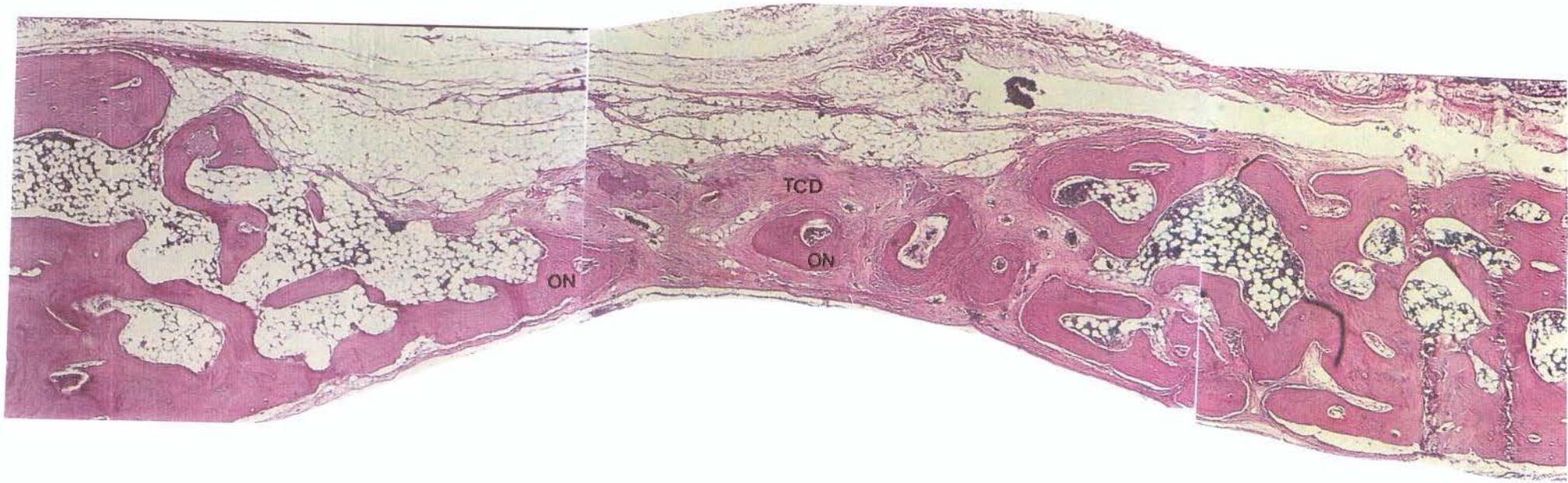


Fig. 20. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. No centro da cavidade uma pequena quantidade de tecido conjuntivo denso (TCD) impede que as projeções de tecido ósseo neoformado (ON) se encontrem. Grupo II, 15 semanas. H.E. 2,5x.

Cavidades controle

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

A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por tecido conjuntivo denso que circundava as pequenas ilhotas de tecido ósseo neoformado, ricamente celularizadas e vascularizadas, nas proximidades do osso pré-existente. A cavidade era revestida na região inferior por uma camada de tecido conjuntivo denso e o espaço mais superior era preenchido por tecido conjuntivo frouxo (figura 22).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Atualmente, existe um interesse muito grande no desenvolvimento de materiais que sejam capazes de auxiliar o reparo ósseo em casos de defeitos, principalmente em função do surgimento de tratamentos, como os implantes osseointegrados, que aumentaram a frequência com que os enxertos ósseos são necessários.

No intuito de avaliar os diferentes materiais, que vem sendo desenvolvidos para auxiliar o reparo ósseo, vários métodos de pesquisa são utilizados. Segundo FRAME¹⁷, 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. A calvária de coelhos é um local que apresenta características similares aos maxilares, como a origem embriológica intramembranosa, a morfologia apresentando duas corticais separadas por osso esponjoso, e a fisiologia de reparo ósseo. As cavidades ósseas cirúrgicas que são preparadas com menos de 5mm de diâmetro podem se reparar espontaneamente a partir das margens da cavidade até o seu preenchimento completo com tecido ósseo neoformado. Desta forma, a cavidade óssea ideal para o estudo de enxertos ósseos num período de 24 semanas deve ter 15mm de diâmetro, pois com este diâmetro o coágulo não é capaz de se organizar para promover o reparo ósseo em todo o defeito.

As cavidades ósseas cirúrgicas na calvária de animais de laboratório são modelos de estudo bastante úteis no estudo do reparo ósseo. Este tipo de defeito ósseo é facilmente reproduzível, simples de ser realizado, rápido, seguro, e não requer estabilização. O tecido ósseo caracteriza-se por apresentar uma alta capacidade de reparação espontânea quando é lesionado. Contudo, dependendo da extensão da lesão, as capacidades naturais de reparo do tecido ósseo não são suficientes para restaurar a quantidade de tecido perdida. Um defeito ósseo pode ser considerado de tamanho crítico quando, ao longo de toda a vida do animal, o reparo ósseo espontâneo não é capaz de preencher todo o defeito com tecido ósseo neoformado. O que ocorre nos defeitos ósseos críticos que não são tratados adequadamente com materiais de enxerto ósseo é o desenvolvimento de um tecido cicatricial que preenche as regiões do defeito onde não ocorreu neoformação óssea. A utilização de defeitos críticos nos modelos de estudo de enxertos ósseos tem uma importância relevante, pois qualquer neoformação de tecido ósseo que porventura ocorra pode ser atribuída ao material que foi utilizado para o preenchimento (URIST⁶¹, 1965; HOLLINGER *et al.*²⁵, 1991; ISAKSSON & ALBERIUS²⁷, 1992; TAGA *et al.*⁵⁹, 1997).

No nosso trabalho as cavidades ósseas cirúrgicas apresentavam um diâmetro de 10mm. Entretanto, os resultados demonstraram que mesmo ao final do maior período para sacrifício, 15 semanas após o preparo da cavidade, o reparo ósseo espontâneo não foi suficiente para promover a união óssea entre as bordas das cavidades controle, que permaneceram preenchidas por tecido conjuntivo. Isto vem de encontro a 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 (MULLIKEN & GLOWACKI³⁸, 1980; GLOWACKI *et al.*²¹, 1981a; MELLONIG *et al.*³⁶, 1981b; HOLLINGER *et al.*²⁵, 1991; SOLHEIM *et al.*⁵⁸, 1992; DUPOIRIEUX *et al.*¹⁴, 1994; RABIE & LIE KEN SIE⁴⁴, 1996). Por isso, o reparo ósseo encontrado nas cavidades experimentais do nosso trabalho pode ser relacionado ao preenchimento das cavidades com matriz óssea desmineralizada. Apesar de não serem consideradas defeitos ósseos críticos, as cavidades ósseas cirúrgicas realizadas neste estudo apresentavam um diâmetro que permitiu avaliar a capacidade de reparo das matrizes utilizadas, e diferenciar os resultados encontrados entre os grupos I, II, e controle.

Segundo URIST⁶¹ (1965), as primeiras células do hospedeiro ao invadirem a região onde foi colocada a matriz óssea desmineralizada estão basicamente relacionadas à sua reabsorção. Apenas depois de 4 a 6 semanas, ocorre aposição de tecido ósseo neoformado nas lacunas onde antes houve reabsorção da matriz. A matriz óssea desmineralizada não é totalmente reabsorvida durante o experimento antes de induzir o reparo ósseo. Na realidade a matriz é pouco reabsorvida, assim a medida que ocorre o reparo ósseo e a quantidade de osso neoformado aumenta, as partículas de matriz são incorporadas pelo tecido ósseo. Por outro lado, quando a osseoindução não ocorre por algum motivo as partículas da matriz são totalmente reabsorvidas (MULLIKEN & GLOWACKI³⁸, 1980; GLOWACKI *et al.*²¹, 1981a; GENDLER²⁰, 1986).

No período de três semanas do nosso trabalho, tanto no grupo I quanto no grupo II, é possível identificar a presença de partículas de matriz óssea desmineralizada rodeadas por tecido conjuntivo no interior da cavidade óssea cirúrgica como descrito por URIST⁶¹ (1965), GLOWACKI *et al.*²¹ (1981a) e TAGA *et al.*⁵⁹ (1997). Contudo, a quantidade de partículas é extremamente maior nas amostras do grupo II, apesar do preenchimento ter sido igual para os dois grupos no momento da cirurgia. Já no período de sete semanas do nosso trabalho, não existem partículas no grupo I, e sim, tecido conjuntivo, unindo as projeções de tecido ósseo neoformado a partir do osso pré-existente. Este resultado é bastante diferente do que foi encontrado para o grupo II, onde ainda é possível identificar algumas partículas, que apresentam áreas de reabsorção e áreas sugestivas de aposição de tecido ósseo neoformado na superfície das partículas de matriz óssea desmineralizada. Isto sugere que a matriz utilizada no grupo I tenha sido reabsorvida num período de tempo mais curto em relação à utilizada no grupo II. Devido ao processo de reabsorção as partículas presentes nas amostras de sete semanas do grupo II são menores e menos numerosas quando comparadas com as partículas encontradas no período de três semanas do mesmo grupo. Os resultados observados nas grupo I, tanto no período de três quanto de sete semanas, são bastante diferentes do que foi relatado por TAGA *et al.*⁵⁹ (1997) que avaliaram o OSSEOBOND[®] em calvária de cobaias, no período de quatro semanas, encontrando muitas partículas do material no interior da cavidade em várias fases de reabsorção.

Na osseoindução, as células mesenquimais indiferenciadas do hospedeiro são induzidas a se transformarem em células condrogênicas ou osteogênicas. Quando a osseoindução é responsável pela neoformação óssea, o processo ocorre através de ossificação endocondral, ou seja, as células mesenquimais que passaram por diferenciação, transformaram-se em células condrogênicas e depositaram uma matriz de cartilagem. A matriz de cartilagem tornou-se vascularizada e outras células mesenquimais próximas à estes vasos foram induzidas a se diferenciarem em células condrogênicas e osteogênicas, e promoveram a ossificação endocondral (URIST⁶¹, 1965; REDDI & HUGGINS⁴⁶, 1972). Praticamente todos os experimentos que utilizaram matriz óssea desmineralizada, particulada ou em segmentos, relataram a ossificação endocondral como característica da análise histológica no processo de osseoindução (MULLIKEN & GLOWACKI³⁸, 1980; GENDLER²⁰, 1986). Autores como SCOTT & HIGHTOWER⁵³ (1991) afirmaram que existem diferenças qualitativas entre as matrizes ósseas desmineralizadas de origem endocondral e intramembranosa, e que as últimas deveriam ser utilizadas com maior frequência em cirurgias crânio-faciais. Da mesma forma, ISAKSSON & ALBERIUS²⁷, em 1992, encontraram um resultado inicial levemente melhor quando utilizaram matriz de origem intramembranosa em cavidades ósseas na calvária de coelhos. Já SALYER *et al.*⁵⁰ (1995) relataram que o potencial osteogênico independe da matriz óssea ter origem endocondral ou intramembranosa, e a osseoindução ocorre sempre através de ossificação endocondral.

Nos grupos I e II, 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 o reparo ósseo nas cavidades experimentais I e II ocorreu mais em função da osseocondução, que do processo de osseoindução. Por outro lado, no período de sete semanas encontramos, em algumas amostras do grupo II, 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 URIST⁶¹ (1965), MULLIKEN & GLOWACKI³⁸ (1980), GLOWACKI *et al.*²² (1981a) e MARINAK *et al.*³³ (1989). No grupo II, após quinze semanas, as amostras apresentavam-se quase completamente preenchidas por tecido ósseo neoformado, mas ainda existia tecido conjuntivo no centro da cavidade impedindo a união entre as projeções de tecido ósseo. Outra amostra apresentava uma ilha de tecido ósseo isolada no centro da cavidade rodeada por tecido conjuntivo que a separava das bordas do tecido ósseo neoformado na periferia da cavidade. Já no grupo I, após quinze semanas, enquanto duas

amostras apresentaram o fechamento completo da cavidade com tecido ósseo neoformado, outra amostra ainda apresentava tecido conjuntivo no centro da cavidade, semelhante às cavidades controle deste período, impedindo a união entre as projeções do tecido ósseo que crescia em direção centrípeta.

Existe uma grande variedade de biomateriais, que podem ser adquiridos no comércio, todos indicados para o tratamento de defeitos ósseos. Por isso, do ponto de vista clínico, é importante avaliar os resultados que estes biomateriais podem oferecer quando utilizados. URIST⁶¹ (1965) acreditava que o processo de liofilização não poderia inibir a capacidade da matriz óssea desmineralizada em promover osseoindução. Entretanto, SHIGEYAMA *et al.*⁵⁶ (1995), analisando proteínas ósseas morfogenéticas extraídas de enxertos ósseos obtidos comercialmente, encontraram uma menor concentração, e menos habilidade na indução de proliferação celular, quando comparadas com as proteínas obtidas de osso humano fresco. Estes autores relataram que fatores que atuam na promoção de proliferação celular podem ser removidos, ou os processos laboratoriais podem alterar de alguma forma as atividades biológicas da matriz.

SHTEYER *et al.*⁵⁷ (1990), relataram a necessidade de se avaliar o controle de qualidade dos enxertos ósseos homogêneos. Existe a hipótese de uma grande variabilidade dos resultados clínicos encontrados na literatura, até quando se utiliza o mesmo tipo de enxerto, estar ocorrendo por causa da falta de padronização nas técnicas de processamento. SCHWARTZ *et al.*⁵¹, em 1996, avaliaram a atividade osseointutiva 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.

Tanto a possibilidade de alteração que os enxertos sofrem durante os processos de desmineralização e liofilização, quanto a possível falta de padronização no preparo laboratorial das matrizes utilizadas no nosso trabalho, podem ser considerados fatores que levaram à obtenção de resultados diferentes entre animais do mesmo grupo. No período de três semanas, as amostras do grupo I apresentaram poucas partículas do material circundadas por tecido conjuntivo e células multinucleares na superfície sugerindo atividade osteoclástica. Da mesma forma, apenas uma amostra do grupo II apresentava partículas com células na superfície sugerindo atividade osteoblástica e aposição de tecido ósseo, no período de três semanas. Nas outras amostras deste grupo as partículas aparentemente estavam sendo reabsorvidas. No período de sete semanas apenas uma amostra do grupo I apresentou uma ilhota que sugeria a presença de tecido ósseo neoformado longe das bordas do osso pré-existente. Já o grupo II apresenta áreas sugestivas de aposição óssea na superfície das partículas sugerindo atividade osteoblástica, e também células multinucleadas em áreas de reabsorção sugerindo atividade osteoclástica conforme descrito em outros experimentos (URIST⁶¹, 1965; MULLIKEN & GLOWACKI³⁸, 1980; GLOWACKI *et al.*²¹, 1981a; MARINAK *et al.*³³, 1989).

No período de quinze semanas as cavidades controle, apresentaram todas as amostras preenchidas praticamente apenas por tecido conjuntivo e

apenas algumas ilhotas de tecido ósseo neoformado próximo às margens da cavidade. No grupo I, duas amostras apresentaram uma ponte de tecido ósseo neoformado entre as bordas da cavidade óssea cirúrgica. Na outra amostra o tecido ósseo neoformado se limitou às bordas da cavidade, semelhante às amostras das cavidades controle no período de quinze semanas. No grupo II, uma das amostras apresentava praticamente toda a cavidade preenchida com tecido ósseo neoformado, enquanto outra amostra apresentava grande quantidade de tecido ósseo neoformado que preenchia a cavidade com exceção do centro que apresentava tecido conjuntivo denso. Estes resultados mostraram-se diferentes dos encontrados por MULLIKEN & GLOWACKI³⁸ (1980) e GLOWACKI *et al.*²¹ (1981a), 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 realizadas na calvária de ratos e apresentavam apenas 4mm de diâmetro. DE LAVALLE RESTREPO *et al.*¹¹, (1998) também relataram o reparo ósseo completo em cavidades ósseas pequenas com 3X2 mm de extensão, em tibia de ratos, 40 dias após o preenchimento com OSSEOBOND[®] e proteção com uma barreira reabsorvível de osso bovino. Da mesma forma, quando as cavidades ósseas cirúrgicas são preenchidas por uma associação de matriz óssea desmineralizada e proteína óssea morfogenética, os resultados podem ser melhores que quando estes biomateriais são utilizados separadamente (BOLANDER & BALIAN⁶, 1986). RUTHERFORD *et al.*⁴⁹, (1992) apesar da associação de matriz desmineralizada e proteína óssea morfogenética bovina,

encontraram menor neoformação óssea quando os implantes osseointegrados imediatos estavam a distâncias acima de 3mm da parede do alvéolo.

TAGA *et al.*⁵⁹, em 1997, relataram que o fato de algumas cavidades ósseas cirúrgicas não estarem totalmente preenchidas por tecido ósseo neoformado, mesmo num período de seis meses, pode estar relacionado à componentes imunológicos presentes na matriz de origem bovina. Os autores também levantaram a hipótese da não utilização de uma barreira biológica ter prejudicado os resultados, uma vez que as células do tecido conjuntivo ocuparam todo o espaço concomitante às células de origem óssea prejudicando o reparo. Concordamos com esta segunda hipótese, uma vez que as barreiras biológicas, ou membranas, apresentam a capacidade de manter o espaço previamente ocupado pelo tecido ósseo, e impedem que células do epitélio e do tecido conjuntivo invadam a cavidade óssea antes da diferenciação de células mesenquimais em células osteogênicas (KLEINSCHMIDT *et al.*³¹, 1993; PETIT & RIPAMONTI⁴⁰, 1994; BECKER *et al.*⁵, 1996; DE LAVALLE RESTREPO *et al.*¹¹, 1998). Os grupos I, II, e controle do nosso trabalho apresentaram o tecido ósseo neoformado projetando-se a partir das bordas da cavidade, e afinando-se em direção ao centro em todos os períodos para sacrifício. Estas projeções de tecido ósseo encontravam-se no centro da cavidade, no período de quinze semanas dos grupos I e II, entretanto a espessura do osso neoformado era bem menor que as bordas do osso pré-existente, provavelmente em função de não termos utilizado uma barreira biológica neste experimento.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

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

1. A matriz óssea desmineralizada de origem bovina foi reabsorvida mais rapidamente que a matriz óssea desmineralizada de origem humana, conforme observado nos períodos de 3 e 7 semanas.
2. Tanto o grupo I quanto o grupo II apresentaram neoformação óssea melhor que as cavidades controle nos períodos de sete e de quinze semanas.
3. Nos grupos I, II e controle a neoformação óssea foi melhor evidenciada após 15 semanas, apesar de não ter ocorrido regeneração óssea completa em nenhum dos grupos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Alberius P, Klinge B, Isaksson S: Management of craniotomy in young rabbits. *Lab Anim* 23: 70, 1989
2. Alper G, Bernick S, Yazdi M, et al: Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. *The American Journal of the Medical Sciences* 298: 371, 1989
3. Aspenberg P, Kålebo P, Albrektsson T: Rapid bone healing delayed by bone matrix implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3: 123, 1988
4. Barbosa EP, Lima JHC: Ossoliofilizado – critérios para escolha com segurança. *Revta bras Implantodont* 2: 17, 1996
5. Becker W, Urist M, Becker BE, et al: Clinical and histologic observations of sites implanted with intraoral autologous bone grafts or allografts. 15 human case reports. *J Periodontol* 67: 1025, 1996.
6. Bolander ME, 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* 68-A: 1264, 1986

* De acordo com as normas de publicação do *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1998.

7. Bowers G, Felton F, Middleton C, et al: Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects when Osteogenin is combined with demineralized freeze-dried bone allograft and with purified bovine collagen. *J Periodont* 62: 690, 1991
8. Buck BE, Malinin T, Brown M: Bone transplantation and human immunodeficiency virus: An estimate of risk acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop* 240: 129, 1989
9. Buck BE, Resnick L, Shah SM, et al: Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation. *Clin Orthop* 251: 249, 1990
10. Carlson ER, Marx RE, Buck BE: The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risks and safety. *Oral Surg* 80: 17, 1995
11. De Laval Restrepo L, Marzola C, Consolaro A, Costa Pereira AA, Toledo Filho JL, Andreo JC: Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado "Osseobond®" e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado. *Rev Bras Implant* 4: 8, 1998
12. Dodson TB: Reconstruction of alveolar bone defects after extraction of mandibular third molars. A pilot study. *Oral Surg* 82: 241, 1996
13. Drago MR, Sullivan HC: A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. Part I. Wound healing 2 to 8 months. *J Periodont* 44: 599, 1973

14. Dupoirieux L, Costes V, Jammet P. et al: Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 23: 395, 1994
15. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH: The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. *J Bone and Joint Surg* 66-A: 274, 1984
16. Feighan JE, Davy D, Prewett AB, et al: Induction of bone by a demineralized bone matrix gel: a study in a rat femoral defect model. *J Orthopaed. Research* 13: 881, 1995
17. Frame JW: A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 38: 176, 1980
18. Freeman E, Turnbull RS: Short communication. Histologic evaluation of freeze-dried fine particle bone allografts. Preliminary observations. *J Periodont* 48 288, 1977.
19. Gebhart M, Lane J: A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta Orthopaed. Belg.* 57:130, 1991
20. Gendler E: Perforated demineralized bone matrix: a new form of osteoinductive biomaterial. *J Biomedical. Materials Research* 20: 687, 1986
21. Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB: Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif Tissue Int* 33: 71, 1981

22. Glowacki J, Kaban LB, Murray JE, et al: Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *Lancet* 5: 959, 1981
23. Goldberg VM, Steveson S: Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop* 225: 7, 1987
24. Grillon GL, Gunther SF, Connole PW: A new technique for obtaining iliac bone grafts. *J Oral Maxillofac Surg* 42: 172, 1984
25. Hollinger JO, Mark DE, Goco P, et al: A comparison of four particulate bone derivatives. *Clin. Orthop. and Relat. Resear* 267: 255, 1991
26. Hopp SG, Dahnert LE, Gilbert JÁ: A study of the mechanical strength of long bone defects treated with various bone autograft substitutes: An experimental investigation in the rabbit. *J Orthop Research* 7: 579, 1989
27. Isaksson S, Alberius P: Comparison of regenerative capacity elicited by demineralized bone matrix of different embryonic origins. *J Craniomaxillofac Surg* 20: 73, 1992
28. Isaksson S, Alberius P, Klinge B: Influence of three alloplastic materials on calvarial bone healing. An experimental evaluation of HTR[®]-polymer, lactomer beads, and a carrier gel. *Int J Oral Maxillofac Surg* 22 375, 1993
29. Jazayeri MA, Nichter LS, Zhou ZY, et al: Comparison of various delivery systems for demineralized bone matrix in a rat cranial defect model. *J Craniofacial Surg* 5: 172, 1994

30. Jergesen HE, Chua J, Kao RT, et al: Age effects on bone induction by demineralized bone powder. Clin. Orthop. Related Research 268 253, 1991
31. Kleinschmidt JC, Marden LI, Kent D, et al: A multiphase system bone implant for regenerating the calvaria. Plast Reconst Surg 91: 581, 1993
32. La Fontaine J, Pinto AVS: O que devemos saber sobre osso desmineralizado seco-congelado? Revta APCD 51: 561, 1997
33. Marinak KW, Mellonig JT, Towle HJ: The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. J Periodont 60: 12, 1989
34. Marx RE, Carlson ER: Tissue banking safety: caveats and precautions for the oral and maxillofacial surgeon. J Oral Maxillofac Surg 51: 1372, 1993
35. Mellonig JT, Bowers GM, Bailey RC: Comparison of bone graft materials. Part I. New bone formation with autografts and allografts determined by Strontium-85. J Periodont 52: 291, 1981
36. Mellonig JT, Bowers GM, Cotton, WR: Comparison of Bone Graft Materials. Part II. New bone formation with autografts and allografts: A histological evaluation, J Periodont 52: 297, 1981
37. Morse A: Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. J Dent Res 24 143, 1945

38. Mulliken JB, Glowacki J: Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast Reconstr Surg* 65: 553, 1980
39. Mulliken JB, Glowacki J, Kaban LB, et al: Use of demineralized allogenic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. *Ann Surg* 194: 366, 1981
40. Petit JC, Ripamonti U: Tissue segregation enhances calvarial osteogenesis in adult primates. *J Craniofac Surg* 5: 34, 1994
41. Pettis GY, Kaban LB, Glowacki J: Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite/demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac Surg* 48: 1068, 1990
42. Piattelli A, Scarano A, Corigliano M, et al: Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials* 17: 1127, 1996
43. Quattlebaun JB, Mellonig JT, Hensel NF: Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal osseous defects. *J Periodont* 59: 394, 1988
44. Rabie ABM, Lie Ken Jie RKP: Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bone matrix. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25: 311, 1996
45. Radaelli RL, Radaelli, CARM: Materiais para preenchimento de defeitos ósseos. *Revta de Odontol Ensino e Pesq* 2: 26, 1997

46. Reddi AG, Huggins C: Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescents rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1601, 1972
47. Redondo SM, Hernández AV, Cantera JMG, et al: Repair of experimental mandibular defects in rats with autogenous, demineralized, frozen and fresh bone. *Br J Oral Maxillofac Surg* 35: 166, 1997
48. Reynolds MA, Bowers GM: Fate of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony defects. *J Periodont* 67: 150, 1996
49. Rutherford RB, Sampath K, Rueger DC, et al: Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. *J Oral Maxillofacial Implants* 7: 297, 1992
50. Salyer KE, Bardach J, Squier CA: Cranioplasty in the growing canine skull using demineralized perforated bone. *Plastic Reconstructive Surg* 96: 270, 1995
51. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes Jr. DL, et al: Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol* 67: 918, 1996
52. Schwarz N, Schlag G, Thumher M: Decalcified and undecalcified cancellous bone block implants do not heal diaphyseal defects in dogs. *Arch Orthop Trauma Surg* 111: 47, 1991
53. Scott CK, Hightower JÁ: The matrix of endochondral bone differs from the matrix of intramembranous bone. *Calcif Tissue Int* 49: 349, 1991

54. Senn N: On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci* 98: 219, 1889. Apud: Mulliken JB, Glowacki J: Induced Osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plastic Reconstruc Surg* 65: 553, 1980
55. Shen WI, Chung KC, Wang GJ, et al: Demineralized bone matrix in the stabilization of porous-coated implants in bone defects in rabbits. *Clinical Orthopaed. Related Research* 293: 246, 1993
56. Shigeyama Y, D'errico JÁ, Stone R, et al: Comercially-prepared allograft material has biological activity in vitro. *J Periodont* 66: 478, 1995
57. Shteyer A, Kaban LB, Kao RT: Effect of demineralized bone powder on osteoblast-like cells in culture. A potential rapi quality control assay. *Int J Oral Maxillofac Surg* 19: 370, 1990
58. Solheim E, Pinholt EM, Bang G, et al: Regeneration of calvarial defects by a composite of bioerodible poliorthoester and demineralized bone in rats. *J Neurosurg* 76: 275, 1992
59. Taga R, Cestari TM, Silva TL, et al: Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. *Revta Bras Implant* 3: 13, 1997
60. Takano-Yamamoto T, Kawakami M, Sakuda M: Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar clefts for testing bone-inductive agents. *J Oral Maxillofac Surg* 51: 887, 1993
61. Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893, 1965

62. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242: 1528, 1988
63. Zambonin G, Grano M: Biomaterials in orthopaedic surgery: effects of different hydroxyapatites and demineralized bone matrix synthesis by human osteoblasts. *Biomaterials* 16: 397, 1995