

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**REGENERAÇÃO ÓSSEA ESTIMULADA PELA  
MATRIZ DENTINÁRIA ALOGÊNICA EM DEFEITOS  
ÓSSEOS NA TÍBIA DE RATOS (*Rattus norvegicus*),  
TRATADOS PELA TÉCNICA DA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA GUIADA.**

**ÍSIDRA MANOELA SOUSA PORTELA SANTOS**

**BAURU – 2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

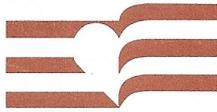
**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**REGENERAÇÃO ÓSSEA ESTIMULADA PELA  
MATRIZ DENTINÁRIA ALOGÊNICA EM DEFEITOS  
ÓSSEOS NA TÍBIA DE RATOS (*Rattus norvegicus*),  
TRATADOS PELA TÉCNICA DA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA GUIADA.**

Dissertação apresentada à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, no Programa de Pós-graduação em Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães

**BAURU – 2006**



Universidade do Sagrado Coração

**PRPPG**

Pró-reitoria  
de Pesquisa e  
Pós-graduação

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE ÍSIDRA MANOELA SOUZA PORTELA SANTOS, ALUNA DO PROGRAMA DE Mestrado EM BIOLOGIA ORAL, DA UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO, USC, BAURU.**

Aos dois dias do mês de agosto do ano dois mil e seis, em sessão pública, na Universidade do Sagrado Coração, na presença da Banca Examinadora, composta pelos docentes: **Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim**, Professor Doutor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP; **Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães**, Professor Doutor da Universidade do Sagrado Coração; e **Prof.ª Dr.ª Angela Mitie Otta Kinoshita**, Professora Doutora da Universidade do Sagrado Coração; tiveram início os trabalhos de julgamento da Prova de Dissertação de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Oral, pela mestranda **ÍSIDRA MANOELA SOUZA PORTELA SANTOS**. Os examinadores, observando o tempo regulamentar, argüiram a candidata sobre a dissertação que a mesma havia apresentado, intitulada **“REGENERAÇÃO ÓSSEA ESTIMULADA PELA MATRIZ DENTINÁRIA ALOGÊNICA EM DEFEITOS ÓSSEOS NA TÍBIA DE RATOS (RATTUS NORVEGICUS), TRATADOS PELA TÉCNICA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA”**, tendo a candidata procurado explicar e/ou rebater as críticas formuladas pelos argüidores. Após a conclusão da prova de Dissertação de Mestrado, foi suspensa a sessão pública e, em sessão secreta, os argüidores atribuíram seus conceitos. Reaberta a sessão pública, foram anunciados os resultados: **Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim**, Aprovada; **Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães**, aprovada; **Prof.ª Dr.ª Angela Mitie Otta Kinoshita**, aprovada. Conceito Final: aprovada, fazendo jus, portanto, ao título de Mestre em Biologia Oral, de acordo com o artigo 43 do Regimento Geral da Pós-graduação da USC. Nada mais havendo a registrar, foi lavrada a presente ata, que vai por mim assinada, Angela Lemes de Moraes e pelos (as) Senhores (as) Membros da Comissão Examinadora. Universidade do Sagrado Coração – USC, aos 2 dias do mês de agosto de 2006.

Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

Prof. Dr. Angela Mitie Otta Kinoshita

Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães  
(Presidente da Banca e Orientador)

Angela Lemes de Moraes  
(Secretária *Stricto Sensu*)

## DEDICATÓRIA

*À Deus pelo dom supremo, a vida; E à  
Santa Rita por todas às vezes que não me  
deixou desistir iluminando o meu caminho;*

*Aos meus pais, Marconi (in memoriam) e  
Graça pela educação , dedicação, amor  
eterno e incondicional; em especial minha  
mãe, exemplo de força e coragem em que  
sempre me espelho;*

*Ao meu marido Zilton pelo incentivo,  
confiança e cumplicidade em todas as horas;*

*À minha família pelo carinho e pelos  
ensinamentos, em especial aos Tios Lúcia e  
Celso pela presença constante na minha  
vida;*

*E principalmente, à minha filha Indra, razão da minha existência, dona maior do meu amor  
mais puro e verdadeiro; “...nunca se esqueça nenhum segundo que eu tenho o amor maior do  
mundo, como é grande o meu amor por você.”*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador e coordenador do curso de Pós-graduação em Biologia Oral da USC Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães pela confiança em mim depositada para a elaboração deste trabalho e pela firmeza e segurança nos conhecimentos a mim transmitidos;*

*Ao mestre e amigo Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo pelo carinho e amizade com que sempre me atendeu no decorrer de todo esse tempo, desde o início quando me acolheu sem mesmo me conhecer até o final me encorajando e me contaminando com suas palavras de otimismo principalmente nos momentos difíceis. Muito me honra em considerá-lo como amigo e exemplo de dedicação profissional em busca do conhecimento científico. As palavras me faltam neste momento para expressar toda minha admiração e agradecimento.*

*A todos os professores do corpo docente do curso de Pós-graduação em Biologia Oral da USC que compartilharam seus conhecimentos de maneira brilhante.*

*Aos colegas de Pós-graduação pelos momentos de descontração e convivência, principalmente a “turma velha” por ter me acolhido com muito carinho desde o primeiro momento.*

*Às amigas Claudia Astolfi e Daniela Buchain pela amizade incondicional e pelos melhores momentos dessa jornada, sem dúvida a maior conquista durante esses dois anos.*

*Aos funcionários da Pós-graduação da USC, em especial a Ângela e o Ricardo pela constante atenção dedicada.*

*Aos queridos amigos Michelle Lizze e Rafael Fernandes pelo carinhoso convívio e amizade que foram essenciais durante esse período que estive em Bauru. Prova maior que amizade é para toda a vida e para todas as horas.*

*Ao Prof. Paulo Vasconceos e a Profa. Sara pela atenção e grandiosa contribuição na elaboração da análise radiográfica desse trabalho.*

*Às Faculdades FACIME, FACID e NOVAFAPÍ por viabilizar o licenciamento parcial das minhas atividades como docente durante o curso de Pós-graduação, em especial à Diretora da NOVAFAPÍ Dra. Cristina Miranda pelo financiamento da parte cirúrgica desse trabalho.*

*Ao Prof. Maia, médico veterinário, e ao técnico Cleion ambos do Biotério da NOVAFAPÍ, pela preciosa colaboração no trato com os animais utilizados nesta pesquisa.*

*Às alunas de medicina da NOVAFAPÍ Bruna e Lívia pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos deste trabalho.*

*Às técnica de histologia, Ana Cláudia, Graça e Mayra pelo auxílio valioso na inclusão das peças, corte e coloração.*

*Aos animais experimentais, cujas vidas foram sacrificadas em benefício da ciência.*

*Agradeço também a todos que de maneira sileniosa ou explícita, contribuíram para a realização desse trabalho.*

*...” De tudo ficaram três coisas: a certeza de que eu estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.” (O encontro marcado- Fernando Sabino).*

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 Morfologia do Tecido Ósseo.....	27
2.1.1 Considerações gerais.....	27
2.2 Biologia da Regeneração Óssea .....	33
2.2.1 Fatores de crescimento e diferenciação óssea.....	39
2.2.1.1 Proteínas morfogenéticas ósseas.....	41
3. PROPOSIÇÃO.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1 Materiais.....	52
4.1.1 Animais utilizados.....	52
4.1.2 Matriz dentinária alógena desmineralizada.....	53
4.1.3 Membrana de resina de poliuretana.....	54
4.1.4 Reagentes, compostos e soluções.....	54
4.1.5 Materiais cirúrgicos.....	55
4.2 Métodos.....	55
4.2.1 Preparo da matriz dentinária desmineralizada.....	55

4.2.2 Preparo cirúrgico dos defeitos ósseos.....	56
4.2.2.1 Grupo controle.....	56
4.2.2.2 Grupo tratado.....	57
4.2.3 Preparo das peças.....	59
4.2.3.1 Análise macroscópica.....	59
4.2.4 Preparo das peças para análise radiográfica.....	59
4.2.4.1 Análise radiográfica convencional.....	61
4.2.4.2 Análise radiográfica digitalizada.....	61
4.2.5 Preparo das peças para análise microscópica.....	62
4.2.5.1 Análise microscópica.....	63
4.2.5.2 Análise histomorfométrica.....	65
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>5.1 Análise Macroscópica.....</b>	<b>68</b>
5.1.1 Período de 15 dias.....	68
5.1.2 Período de 30 dias.....	69
5.1.3 Período de 60 dias.....	70
5.1.4 Período de 90 dias.....	71
<b>5.2 Análise Radiográfica.....</b>	<b>72</b>
5.2.1 Período de 15 dias.....	72
5.2.2 Período de 30 dias.....	73
5.2.3 Período de 60 dias.....	74
5.2.4 Período de 90 dias.....	75
<b>5.3 Análise Microscópica.....</b>	<b>80</b>
5.3.1 Período de 15 dias.....	80
5.3.2 Período de 30 dias.....	83

5.3.3 Período de 60 dias.....	86
5.3.4 Período de 90 dias.....	89
5.4 Análise Histomorfométrica.....	94
6. DISCUSSÃO .....	97
7. CONCLUSÕES.....	104
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
ANEXOS	

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

- FIGURA 1 - Esquema ilustrando o princípio da osteopromoção, com colocação de barreiras mecânicas (membranas) para o isolamento do defeito ósseo contra a invasão de tecido conjuntivo circundante. ....36
- FIGURA 2 – Figura representativa do local do defeito ósseo na tíbia do rato Wistar (*Rattus norvegicus*). .....53
- FIGURA 3 – (A) Incisão, (B) Exposição do osso, (C) Confecção do defeito ósseo cirúrgico, (D) Defeito ósseo cirúrgico. ....57
- FIGURA 4 – Grupo tratado E1: (A) Defeito ósseo cirúrgico marcado com guta-percha, (B) Polímero de poliuretana sob o leito cirúrgico; Grupo tratado E2: (C) Defeito ósseo cirúrgico preenchido com partículas de matriz dentinária e marcado com guta-percha, (D) Sutura do músculo após colocação do polímero de poliuretana.....58
- FIGURA 5 – (A) Tomada radiográfica convencional, (B) Sistema DIGORA com leitor óptico a laser acoplado a um computador. ....62
- FIGURA 6 – Representação gráfica dos componentes estruturais mensurados antes da histomorfometria com coloração HE.....66

FIGURA 7 – Representação gráfica dos componentes estruturais mensurados durante a histomorfometria.....	66
FIGURA 8 – Fotos das tíbias contendo os defeitos ósseos mostrando a regeneração com 15 dias. ....	69
FIGURA 9 – Fotos das tíbias contendo os defeitos ósseos mostrando a regeneração com 30 dias. ....	70
FIGURA 10– Fotos das tíbias contendo os defeitos ósseos mostrando a regeneração com 60 dias. ....	71
FIGURA 11– Fotos das tíbias contendo os defeitos ósseos mostrando a regeneração com 90 dias. ....	72
FIGURA 12 – Imagens radiográficas digitais (positiva, negativa e alto relevo) das tíbias dos animais no período de 15 dias: grupo controle (C), grupos controle (C) e tratados (E1 e E2). ....	73
FIGURA 13 – Imagens radiográficas digitais (positiva, negativa e alto relevo) das tíbias dos animais no período de 30 dias: grupo controle (C) e tratados (E1 e E2). ....	74

FIGURA 14 – Imagens radiográficas digitais (positiva, negativa e alto relevo) das tíbias dos animais no período de 60 dias: grupo controle (C) e grupos tratados (E1 e E2). .....75

FIGURA 15 – Imagens radiográficas digitais (direta, negativa e alto relevo) das tíbias dos animais no período de 90 dias: grupos controle (C) e tratados (E1 e E2). .....76

FIGURA 16 – Grupo controle (C) – 15 dias: Trabéculas ósseas finas e entrelaçadas com abundante tecido mesenquimal no centro de defeito; Grupo experimental (E1) – 15 dias: Trabeculado ósseo fino preenchendo o defeito; Grupo experimental (E2a) – 15 dias: Trabéculas ósseas imaturas entrelaçadas preenchendo o defeito. Aumento 2x. Grupo experimental (E2b) – 15 dias: Evidente atividade osteogênica em torno da partícula de dentina desmineralizada. Aumento 5x. HE. ....81

FIGURA 17 – Grupo controle (C) – 30 dias: Trabéculas ósseas imaturas e irregulares principalmente próximo ao canal medular e bastante tecido mesenquimal osteogênico preenchendo o defeito; Grupo experimental (E1) – 30 dias: Trabéculas ósseas imaturas com poucos espaços medulares preenchendo todo o defeito; Grupo experimental (E2a) – 30 dias: Trabéculas ósseas imaturas estendendo-se para a região central do defeito. Aumento 2x. Grupo experimental (E2a) – 30 dias: Matriz dentinária alogênica circundada por tecido ósseo com intensa atividade osteogênica. Aumento 5x. HE. ....84

FIGURA 18 – Grupo controle (C) – 60 dias: Loja cirúrgica com trabéculas ósseas maduras e imaturas e com espessura um pouco menor que da cortical original; Grupo experimental (E1) – 60 dias: Tecido ósseo neoformado maduro ligeiramente lamelar com espessura semelhante ao original; Grupo experimental (E2a) – 60 dias: A área do defeito ósseo foi totalmente preenchida por tecido ósseo lamelar. Aumento 2x. Grupo experimental (E2b) – 60 dias: Detalhe da matriz dentinária desmineralizada alógena completamente incorporada por tecido ósseo neoformado maduro. Aumento 5x. HE. ....87

FIGURA 19 – Grupo controle (C) – 90 dias: Tecido ósseo, maduro, lamelar, com espessura menor em relação as corticais adjacentes; Grupo experimental (E1) – 90 dias: O defeito ósseo foi completamente preenchido com osso maduro de aparência lamelar; Grupo experimental (E2a) – 90 dias: Defeito ósseo totalmente preenchido por tecido ósseo maduro, lamelar, com presença de lamelas circunferenciais bem definidas. Aumento 2x. Grupo experimental (E2b) – 90 dias: Fatia de dentina desmineralizada alógena totalmente incorporadas pelo tecido ósseo neoformado . Aumento 5x. HE. ....90

FIGURA 20 – Grupo tratado (E2) 15 dias: partícula de matriz dentinária desmineralizada alogênica (**MDDA**) circundada por medula óssea (\*), tecido ósseo imaturo (✱) e células osteogênicas ativas (◄). Tricrômico de Mallory. 100x.....92

FIGURA 21 – Grupo tratado (E2) 30 dias: deposição de matriz óssea por células com perfil osteoblástico (\*) ao redor da matriz dentinária desmineralizada alogênica (**MDDA**) e osteócito em lacunas (▲). Tricrômico de Mallory. 100x.....92

FIGURA 22 – Grupo tratado (E2) 60 dias: aspecto histológico da partícula de matriz dentinária desmineralizada alogênica (**MDDA**) incorporada ao tecido ósseo em remodelação (✱). Tricrômico de Mallory. 40x.....93

FIGURA 23 – Grupo tratado (E2) 90 dias: partículas de dentina desmineralizada alogênica ( <b>MDDA</b> ) com superfície regular, pouco sinal de reabsorção e incorporada por tecido ósseo maduro. Tricrômico de Mallory. 100x.....	93
TABELA 1 – Modelo de ficha confeccionada para descrição de achados microscópicos referente aos fenômenos morfológicos durante o reparo ósseo com 15 dias. ....	64
TABELA 2 – Valores das densidades radiográficas obtidas no sistema Digora presentes nas imagens digitalizadas do controle (C1) e grupos experimentais (E1- polímero/ E2- polímero + dentina) durante os períodos de 15 e 30 dias. Dm: densidade mínima; DM: densidade máxima; SD: desvio padrão. ....	77
TABELA 3 – Valores das densidades radiográficas obtidas no sistema Digora presentes nas imagens digitalizadas do controle (C1) e grupos experimentais (E1- polímero/ E2- polímero + dentina) durante os períodos de 60 e 90 dias. Dm: densidade mínima; DM: densidade máxima; SD: desvio padrão. ....	78
TABELA 4 – Distribuição das médias da área de tecido ósseo de acordo com os grupos controle e tratado (E1 e E2) nos períodos do experimento.....	94

TABELA 5 – Distribuição das médias da área de tecido conjuntivo de acordo com os grupos controle e tratado (E1 e E2) nos períodos do experimento.....	95
TABELA 6 – Distribuição das médias da área de medula óssea de acordo com os grupos controle e tratado (E1 e E2) nos períodos do experimento.....	96
GRÁFICO 1 – Médias das densidades radiográficas obtidos pelo Sistema Digora nos grupos controle e tratado (E1 e E2).....	79
GRÁFICO 2 – Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupos tratados (E1 e E2) no período de 15 dias.....	82
GRÁFICO 3 – Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupos tratados (E1 e E2) no período de 30 dias.....	85
GRÁFICO 4 – Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupos tratados (E1 e E2) no período de 60 dias.....	88
GRÁFICO 5 – Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupos tratados (E1 e E2) no período de 90 dias.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg-Gly-Asp .....	Arginina – glicina – ácido aspártico
BMP .....	Proteína Morfogenética Óssea
BP .....	Barreira de Politetrafluoretileno
CDPM .....	Proteína Derivada da Cartilagem
e-PTFE .....	Politetrafluoretano expandido
FCDO .....	Fatores de Crescimento e Diferenciação Óssea
FDA .....	Food & Drug Administration
FGF .....	Fator de Crescimento Fibroblástico
GDF .....	Fator de Crescimento e Diferenciação
HE .....	Hematoxilina e Eosina
IGF .....	Fator de Crescimento semelhante à Insulina
MAH .....	Membrana Amniótica Humana
MDAD.....	Matriz Dentinária Autógena Descalcificada
MDDH .....	Matriz Dentinária Desmineralizada Homóloga
MDI .....	Difenilmetano diisocianato
MP .....	Membrana de Politetrafluoretileno
PVPI .....	Polivinilpirrolidona-iodo
OPG .....	Osteoprotegerina
rhBMP .	Proteína morfogenética recombinante do osso humano
TGF- $\beta$ .....	Fator de Crescimento Transformador beta
USC .....	Universidade do Sagrado Coração

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo da efetividade da matriz dentinária alogênica desmineralizada como material osteoindutor em associação com a técnica da regeneração óssea guiada com membrana de polímero de poliuretana em defeitos ósseos cirúrgicos experimentais na tíbia de ratos. Foram utilizados 60 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) divididos em três grupos, sendo que no grupo controle (C1) os animais tiveram o defeito preenchido apenas com coágulo sangüíneo, no grupo tratado (E1) os defeitos contendo coágulo foram ocluídos com membrana de poliuretana e no grupo tratado (E2) foram implantados partículas de matriz dentinária desmineralizada alogênica envolvidos com membrana de poliuretana. A dentina foi obtida após exodontia de incisivos centrais de ratos da mesma espécie. De acordo com o período de cicatrização óssea, determinado de 15, 30, 60 e 90 dias, os animais foram sacrificados, em grupos de cinco a cada período. As peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em blocos e fixadas em formol à 10% sendo submetidas à análise macroscópica, radiográfica digital e convencional, microscópica e histomorfométrica. Os resultados obtidos mostraram que a membrana de poliuretana exibiu propriedades de osteopromoção favorecendo o processo de neoformação óssea permanecendo na superfície da loja cirúrgica durante todo o período experimental e que a matriz dentinária desmineralizada alogênica exibiu atividade osteoindutora e osteocondutora estimulando a regeneração óssea de forma direta, sendo incorporada ao osso neoformado sofrendo pouca reabsorção durante o processo de remodelação.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to perform a comparative study of the effectiveness of the alogenic dentin matrix as an osteoinductive material in association with the guided bone regeneration technique using a polyurethane polymer membrane in experimental surgical bone defects in tibia of rats. 60 Wister rats (*Rattus norvegicus*) were divided in 3 groups. In the control group (C1) the bone defect was filled only with the blood clot. In the treated group (E1) the bone defects filled with blood clot were covered with the polyurethane membrane and in the treated group (E2) particles of alogenic desmineralized dentin matrix were inserted in the bone defect and covered with the polyurethane membrane. The dentin was obtained from incisor of rats belonging to the same specie. For each group, 5 animals were sacrificed after a period of 15, 30, 60 and 90 days. The tibias were removed in blocks and fixed in formalin 10% and submitted to macroscopic, digital and conventional radiographic, microscopic and histomorphometric analyze. The results showed that the polyurethane membrane exhibited osteopromotion properties wich is favorable to the process of newly formed bone. The membrane remained in the surface of the surgical bone defect during all the bone healing process. The alogenic desmineralized dentin matrix showed osteoinductive and osteoconductive activity and stimulated the bone regeneration in a direct way. The grafter dentin was incorporated to the newly formed bone and soffered few resorption during the remodeling process.

## INTRODUÇÃO

---

## 1 – INTRODUÇÃO

A reconstrução de defeitos com grande perda óssea devido a traumas, infecções, tumores ou anomalias de desenvolvimento ainda é um grande desafio para as cirurgias reconstrutivas. No processo reconstrutivo é preciso criar condições para o estímulo da neoformação óssea, a fim de impedir o crescimento de tecido conjuntivo cicatricial no interior do defeito ósseo que perturba ou impede totalmente a osteogênese. Para contornar este problema vários procedimentos foram utilizados como os relacionados a enxertos e implantes, assim como a técnica de regeneração óssea guiada.

A técnica da regeneração óssea guiada tem sido preconizada como um método efetivo para estimular a regeneração óssea em defeitos ósseos cirúrgicos por mais de uma década (DUPOIRIEUX et al., 1994). A técnica se baseia no princípio de que os diferentes tecidos que contornam o defeito ósseo cirúrgico regeneram-se com velocidades diferentes e, desta forma, competem entre si na ocupação da área cruenta durante o processo de reparação (BLUHN & LASKING, 1955; KARRING et al., 1993; NYMAN & LANG, 1994). Estudos experimentais realizados em vários modelos animais provaram que ao ser utilizada membrana oclusiva como barreira, cria-se um obstáculo mecânico que previne o crescimento de tecido conjuntivo cicatricial no local a ser regenerado, permitindo assim a repopulação preferencial do defeito cirúrgico com células osteogênicas (SCHENK, 1994).

A aplicação de uma barreira em forma de membrana em defeitos ósseos atuaria através da osteopromoção, isto é, além de manter a concentração dos fatores estimulantes da osteogênese, protegeria fisicamente a área do defeito contra

a invasão por tecidos moles circundantes altamente proliferantes, prevenindo a inibição celular heterotópica, e delimitaria a osteogênese no contorno ósseo desejado.

Os dois principais componentes do tecido ósseo são as células e a matriz óssea. A parte inorgânica da matriz óssea, é responsável por dois terços do volume ósseo e é composta por cristais de fosfato de cálcio depositado como hidroxiapatita. A parte orgânica da matriz óssea corresponde a um terço da massa óssea e é composta por colágeno, proteínas não colagenosas e água (FORELL & STRAW, 1993). Incluídas dentro das proteínas não colagenosas estão as proteínas ósseas morfogenéticas, as quais são responsáveis pela morfogênese óssea e regulação da atividade celular osteogênica (MOHAN & BAYLINK, 1991).

As células encontradas no tecido ósseo são as células osteoprogenitoras, que estão localizadas na camada celular interna de perióstio, revestindo canais de Havers, canais de Volkmann e canal medular, possuindo a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos; os osteócitos que são denominados de células maduras do osso, derivadas dos osteoblastos, são encontrados em pequenos espaços da matriz óssea chamados de lacunas; e os osteoclastos que são células que se originam de precursores da medula óssea, sendo responsáveis pela reabsorção e remodelação da matriz óssea depositada pelo osteoblasto.

O tecido ósseo apresenta uma extraordinária capacidade de remodelação e regeneração ao longo da vida, e isso tem sido atribuído tanto à proliferação das células osteoprogenitoras, como à indução e proliferação das células mesenquimais indiferenciadas (CORMACK, 1999). Pesquisas têm sido realizadas para acelerar o processo de regeneração óssea utilizando-se como material osteoindutor a matriz dentinária homogênea desmineralizada devido a sua biocompatibilidade, baixo custo,

facilidade na manipulação e potencial imunogênico e principalmente por apresentar na sua composição proteínas morfogenéticas ósseas (YOSHIDA et al., 1998; OKAMOTO et al., 1999; CARVALHO, 2001; CARVALHO, 2004). Os materiais osteoindutores participam da reparação de uma ferida induzindo à formação de novo tecido ósseo.

A osteoindução pode ser obtida por dois processos: processo mediado por células e mediados por fatores de crescimento. No primeiro processo, as células mesenquimais indiferenciadas osteogênicas são colhidas da medula óssea e colocadas nas paredes do defeito ósseo onde proliferam e se diferenciam em osteoblastos, cuja função é sintetizar a parte orgânica da matriz óssea com posterior mineralização. No segundo processo, fatores de crescimento específico, denominados proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's) pertencentes as subfamílias dos fatores de crescimento transformadores beta (GONÇALVES et al., 1998; FERNANDES, 2000) tem propriedade de estimular a proliferação das células mesenquimais indiferenciadas osteoprogenitoras e a sua migração, reagregação e diferenciação em condroblastos e/ou osteoblastos, com subseqüente deposição de matriz óssea (URIST, 1965; REDDI et al., 1986).

As células mesenquimais não especializadas que se diferenciam em células formadoras de osso, em resposta à estimulação das proteínas morfogenéticas são denominadas células osteoprogenitoras indutíveis, estando presente em abundância no músculo esquelético e tecido conjuntivo, locais onde a formação de osso pode ser induzida com maior facilidade (FORELL & STRAW, 1993).

Pelo exposto, pensou-se em realizar um estudo comparativo da efetividade da matriz dentinária alogênica desmineralizada como material osteoindutor em associação com a técnica da regeneração óssea guiada com membrana de polímero

de poliuretana em defeitos ósseos cirúrgicos experimentais na tíbia de ratos para melhor entendimento da dinâmica da biologia óssea.

**REVISÃO DA LITERATURA**

---

## **2 – REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Morfologia do Tecido Ósseo**

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado formado por células e por uma matriz óssea mineralizada. A matriz óssea é composta por 25% de parte orgânica e 75% de parte inorgânica cuja composição é dada basicamente por íons fosfato e cálcio formando cristais de hidroxiapatita. A extrema rigidez do tecido ósseo é resultado da interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

#### **2.1.1 Considerações Gerais**

A matriz óssea está formada principalmente por fibras colágenas do tipo I (90%), proteoglicanos (ricos em condroitinsulfato, queratansulfato e ácido hialurônico) e proteínas não colagenosas. As proteínas não colagenosas incluem sialoproteínas ósseas, BMP's, osteocalcina, osteopontina e osteonectina, sintetizada pelos osteoblastos e com propriedades específicas na mineralização do osso (KIERSZENBAUM, 2004). Entre estas proteínas, a osteonectina é responsável pela ligação do colágeno ao mineral e nucleação da deposição mineral. A osteocalcina é a proteína não colagenosa responsável pela ligação do cálcio a hidroxiapatita, controlando o crescimento do cristal de hidroxiapatita. Já a osteopontina contém uma seqüência de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp) específica para um receptor integrina responsável pela adesão células-matriz, sendo atuante no recrutamento de osteoclastos (CORMACK, 1999).

De acordo com ROSS & ROWRELL (1993), as células típicas do tecido ósseo são as células osteoprogenitoras, os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos. As células osteoprogenitoras são consideradas células de repouso ou de reserva que pode ser estimulada para se transformar em osteoblastos e produzir matriz óssea. Compõem a população de células presente na camada mais interna do periósteo assim como as células endósteas de revestimento do canal medular, canais de Havers e canais de Volkmann. Para que ocorra a formação óssea em um sítio determinado, células osteoprogenitoras, ou seja, células mesenquimais indiferenciadas podem migrar para o sítio e proliferarem para se tornar osteoblastos.

FRIEDENSTEIN em 1976 dividiu as células osteoprogenitoras em células precursoras osteogênica induzidas e determinadas. As células precursoras osteogênicas determinadas estão presentes na medula óssea, no endósteo e no periósteo que recobrem a superfície óssea. Tais células possuem a capacidade intrínsecas de proliferar e se diferenciar em osteoblastos. As células precursoras osteogênicas induzidas, por outro lado, representam as células mesenquimais presentes em outros organismos e tecidos que podem se tornar células formadoras de osso quando expostas a estímulos específicos. As células osteoprogenitoras determinadas são responsáveis pela ossificação ortotópica e as induzidas pela ossificação heterotópica.

Os osteoblastos são células completamente diferenciadas e não apresentam capacidade de migração e proliferação. Caracterizam-se por ser células uninucleadas que derivam das células mesenquimais pluripotentes, e sintetizam tanto colágeno quanto as proteínas não colagenosas. Também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. A matriz óssea adjacente aos osteoblastos ativos e que não foi ainda mineralizada, recebe o nome de osteóide. Os

osteoblastos são encontrados na superfície da matriz óssea em arranjo epitelial, quando em alta atividade sintética apresentam uma forma cubóide, quando inativos, apresentam-se pavimentosos (SODEK & MCKEE, 2000).

A diferenciação dos osteoblastos é controlada por fatores de crescimento e de transcrição. Vários membros da família de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's) e o fator de transformação  $\beta$  regulam o desenvolvimento embrionário e a diferenciação dos osteoblastos. De acordo com DUCY et al. (2000), genes osteoblastos-específicos modulam a diferenciação do progênie do osteoblasto: o Cbfa 1 (família do fator de ligação-centro) codifica o fator de transcrição que induz à diferenciação dos osteoblastos e controlam a expressão da osteocalcina. Outra substância que também atua inibindo a formação óssea pelos osteoblastos é a leptina, um peptídeo produzido pelos adipócitos (SAUTIER, 2003; KIERSZENBAUM, 2004).

Para STEVENS & LOWE (2001), os osteócitos são células achatadas em forma de amêndoas com inúmeros prolongamentos citoplasmáticos, localizados em cavidades ou lacunas no interior da matriz óssea. Destas lacunas formam-se canalículos que se dirigem para outras lacunas, tornando assim a difusão de nutrientes possível graças à comunicação existente entre osteócitos. Originam-se dos osteoblastos, quando estes são envolvidos completamente pela matriz óssea mineralizada. Apresentam um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea.

Os osteoclastos participam dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, que derivam da linhagem celular progenitora de monócito-macrófago da medula óssea, que desvia para a via progenitora osteoclástica. Dilatações dos osteoclastos, através

da sua ação enzimática, escavam a matriz óssea, formando depressões conhecidas como lacunas de Howship. Estas células secretam ácidos, colagenases e pirofosfatases e outras enzimas que descalcificam e hidrolisam a matriz orgânica (HID, 2003).

De acordo com TEITELBAUM (2000), o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) é um produto secretado pelos osteoclastos que é necessário para a sobrevivência e proliferação dos precursores de osteoclastos, o monócito-macrófago. Os osteoblastos e as células do estroma da medula óssea produzem um ligante (RANKL) do fator nuclear de ativação Kappa B (NF- $\kappa$ B) com finalidade de ligação para o receptor RANK. A interação do receptor RANK com o RANKL exposto na superfície dos osteoblastos determina o contato célula-célula necessário para futura maturação do precursor de osteoclasto. Os osteoblastos sintetizam osteoprotegerina (OPG) que inibe a diferenciação dos precursores de osteoclastos pela interação com o fator RANKL.

FERRER CAÑABATE et al. em estudo publicado em 2002 comentam que o sistema OPG/RANKL/RANK traz uma ampla clareza no conhecimento da fisiologia óssea, onde o ponto mais importante desse sistema é a osteoprotegerina, também conhecido como fator de inibição da osteoclastogênese, tendo como principal função à inibição da maturação dos osteoclastos e de sua ativação.

Fatores que regulam a remodelagem do osso, como o hormônio da paratireóide e fator de necrose tumoral, o fazem pela regulação da expressão da osteoprotegerina e do RANKL. A massa óssea pode ser determinada pela concentração relativa de RANKL e osteoprotegerina (RAMOS et al., 2002).

O tecido ósseo pode ser classificado baseado no seu aspecto morfológico e anatômico em osso compacto (sem cavidades visíveis) e osso esponjoso (com

cavidades intercomunicantes). No critério histológico, ROBERTS em 1987 classificou o tecido ósseo em quatro tipos: o tecido ósseo trabeculado ou entrelaçado (primário), o composto, o lamelar (secundário ou Haversiano) e o fasciculado. O osso trabeculado é o primeiro tecido ósseo a ser formado durante o reparo ósseo. Caracteriza-se por uma velocidade de formação muito rápida (30-50  $\mu\text{m}$  ao dia), por ter uma matriz de colágeno desorganizada sem as estruturas lamelares dos sistemas haversianos e por ser frágil com pouca resistência biomecânica. É o tecido que caracteriza a primeira fase da cicatrização óssea, sendo reabsorvido e substituído por osso lamelar. O termo tecido ósseo composto é usado para descrever o estágio de transição entre o osso trabeculado para o osso lamelar. O tecido osso lamelar ou haversiano é um tecido ósseo maduro que forma-se devagar, a uma velocidade de 6  $\mu\text{m}$  ao dia, e caracteriza-se por apresentar fibras colágenas organizadas em lamelas ósseas concêntricas, formando os sistemas de Havers, que é a unidade estrutural do osso compacto. O tecido ósseo fasciculado é o osso encontrado onde estão inseridos os feixes de fibras de Sharpey e na superfície interna da parede óssea do alvéolo dentário.

Os sistemas de Havers ou ósteon são compostos por cilindros de lamelas dispostas concentricamente em torno de um espaço vascular denominado canal de Havers. Os canais de Havers comunicam-se entre si através dos canais de Volkmann, que têm uma orientação oblíqua ou perpendicular em relação aos canais de Havers, como descritos por GARTNER & HIATT em 2003.

As superfícies ósseas são revestidas por tecido conjuntivo e células osteoprogenitoras, formada externamente pelo periósteo e internamente pelo endósteo. O periósteo apresenta uma camada externa fibrosa e uma interna rica em células osteoprogenitoras. O canal medular, canais de Havers, canais de Volkmann

e as cavidades do osso esponjoso são revestidos por endóstio (JUNQUEIRA, 2005).

Segundo CORMACK em 1999, o processo de formação óssea ou osteogênese observada no embrião é classificado em ossificação intramembranosa, na qual o tecido ósseo é depositado diretamente no tecido conjuntivo primitivo ou mesênquima, e ossificação endocondral, na qual o tecido ósseo substitui uma cartilagem hialina preexistente, o molde do futuro osso.

Para ERICKSEN et al. (1986), a osteogênese tem sido considerada um grande passo na evolução dos tecidos de suporte, pois proporciona uma complexa cascata de eventos que envolvem a proliferação de células mesenquimais embrionárias, diferenciação em células precursoras osteoblásticas (osteoprogenitoras, pré-osteoblastos), maturação dos osteoblastos, formação de matriz e, finalmente mineralização.

A ossificação intramembranosa começa a partir de um centro de ossificação primária que se inicia a partir de células mesenquimais indiferenciadas, que se transformam em osteoblastos; estes sintetizam osteóide, entre as traves que vão se formando, ficando espaços que vão sendo ocupados pelos vasos sanguíneos e por células mesenquimatosas indiferenciadas, que darão origem à medula óssea. Os ossos planos cranianos (frontal, parietal, parte do occipital e as partes escamosa e timpânica do temporal) e faciais (maxila e mandíbula), bem como as clavículas, desenvolvem-se por este tipo de ossificação. Já a ossificação endocondral tem início a partir de um molde de cartilagem hialina, com o formato do osso um pouco menor e geralmente está relacionado com a formação dos ossos curtos e longos. Neste tipo de ossificação ocorre inicialmente hipertrofia dos condrócitos, diminuição da matriz cartilaginosa, mineralização e morte dos condrócitos, e em um segundo momento,

células provenientes do tecido conjuntivo próximo ocupam as lacunas onde estavam os condrócitos, diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a produção de matriz óssea sobre os pequenos tabiques de cartilagem calcificada, dando origem ao tecido ósseo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

## **2.2 Biologia da Regeneração Óssea**

Segundo LINDHE et al. (2005), o tecido ósseo rapara-se por regeneração, ou seja, o osso é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais com tecido que apresenta a mesma morfologia e função do tecido ósseo original.

A grande capacidade de reparo do tecido ósseo pode ser demonstrada quando o osso é fraturado. A reparação óssea durante uma consolidação de uma fratura pode seguir dois padrões distintos: reparação direta ou primária, e reparação indireta ou secundária (SCHENK, 2000). A reparação primária consiste na formação direta de osso lamelar no defeito ósseo ou na linha de fratura, a partir dos sistemas de Havers da cortical óssea, sem formação de calo ósseo. Ao contrário, a reparação secundária envolve respostas do perióstio e dos tecidos moles adjacentes, com subsequente formação do calo. Embora algumas fraturas possam consolidar primariamente, a maioria delas consolida de forma secundária, através da combinação de ossificação intramembranosa e endocondral.

Segundo EINHORN (1998) pode-se dividir o processo de reparo ósseo em cinco estágios. Estes estágios incluem uma fase inicial de formação do hematoma e desencadeamento do processo inflamatório, uma fase subsequente de angiogênese e formação de tecido cartilaginoso, três fases sucessivas de calcificação da matriz condróide, apoptose e remoção dos condrócitos e deposição de matriz osteóide.

Após a consolidação da fratura, inicia-se o estágio de remodelação, restabelecendo as características mecânicas do osso. No processo de remodelação óssea os osteoclastos removem o tecido ósseo, e os osteoblastos depositam osso lamelar em volta do canal central medular.

Os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de formação do tecido ósseo podem ocorrer por três processos distintos: osteogênese, osteocondução e osteoindução (GLOWACKI & SPECTOR, 1990). Para OSTRUM et al. (1994), o termo osteoindução tem sido usado para descrever o processo de diferenciação de células osteoprogenitoras em condroblastos e osteoblastos, resultando na regeneração do tecido ósseo danificado. Na osteocondução, a formação óssea normal é auxiliada para estender internamente uma área devido um desenvolvimento estrutural favorável onde o material condutivo ósseo serve como um substrato para novas formações ósseas.

Segundo FERNANDES (1998), a indução óssea pode ser obtida por dois métodos: mediado por células e por fatores de crescimento. Células osteogênicas precursoras (determinadas ou induzíveis) alojadas em ambientes biológicos ósseos e não ósseo podem proliferar e se diferenciar em osteoblastos maduros que formam a matriz óssea que subsequentemente mineralizam formando tecido ósseo maduro. Para GIORDANO et al. (2003) o contato destas células com substâncias osteoindutoras promove sua proliferação e diferenciação, e dependendo do local em que ocorra essa transformação, há a formação de tecido cartilaginoso e/ou ósseo. Quando este processo se dá no esqueleto, é denominada ossificação ortotópica, e quando ocorre fora do tecido ósseo, é chamada heterotópica (ectópica).

Um dos principais fatores que atuam impedindo a regeneração óssea é a rápida formação de tecido conjuntivo de origem não óssea que invade a área do

defeito. O crescimento de tecido mole pode perturbar ou impedir parcialmente ou totalmente a neoformação óssea local (FRAME, 1980; SCHIMTZ & HOLLINGER, 1986). Vários procedimentos cirúrgicos têm sido desenvolvidos para resolver esse problema, uma alternativa no tratamento foi baseada na técnica da regeneração óssea guiada, utilizando uma membrana biológica de material inerte sobre a região da lesão. A membrana é colocada em contato direto com a superfície óssea circulante com o posicionamento do perióstio na superfície externa da membrana.

O princípio do selamento físico de um local anatômico para melhorar o reparo de certo tipo de tecido e direcionar a regeneração tecidual por algum tipo de barreira mecânica é utilizado em cirurgias reconstrutivas desde os meados de 1950 (DAHLIN et al., 1996). Ainda em 1957, MURRAY et al. declararam que durante a neoformação óssea é necessário à presença de coágulo sangüíneo, osteoblastos preservados e contato com o tecido vital. Os autores realizaram um defeito nos ossos íliacos e fêmur de cães, e em seguida, revestiram a superfície do defeito com um material plástico e rígido. Após 10 semanas os autores perceberam crescimento ósseo de 6 mm acima do osso íliaco circunvizinho e de 5 mm no osso fêmur, tendo esse tecido ósseo as mesmas características microscópicas do osso subjacente. Com isso concluíram que o material aloplástico impediu a invasão de tecido mole no interior do defeito.

KAHNBERG (1979) estudou o processo de cicatrização óssea em defeitos na base da mandíbula de coelhos, usando uma lâmina de Teflon implantada subperiostealmente, e declarou que esta lâmina previne o desenvolvimento de tecido cicatricial fibroso, permitindo a ocorrência da regeneração óssea.

O termo osteopromoção é usado para descrever o uso de meios físicos para o selamento total de um local anatômico, ou seja, o local que o osso está planejado

para ser neoformado, para prevenir que outro, principalmente tecido conjuntivo cicatricial, interfira na osteogênese bem como no direcionamento da formação óssea (figura 1). Esta terminologia está de acordo com as designações utilizadas anteriormente para descrever os mecanismos diferentes que caracterizam o processo osteogênico, isto é, osteocondução e osteoindução (DAHLIN et al., 1988).

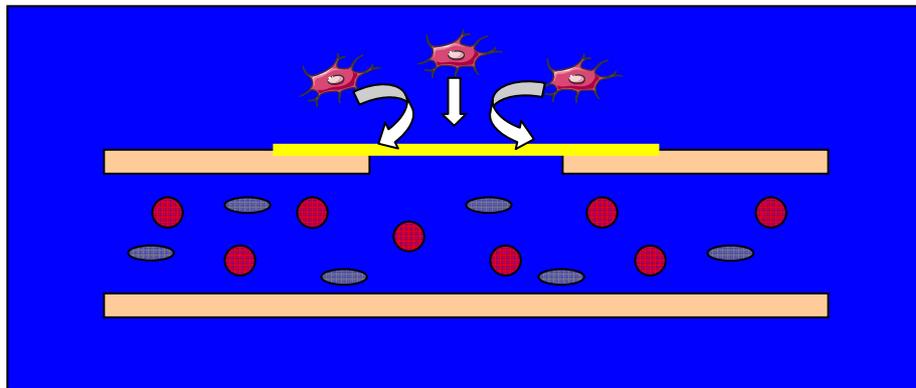


FIGURA 1 - Esquema ilustrando o princípio da osteopromoção, com colocação de barreiras mecânicas (membranas) para o isolamento do defeito ósseo contra a invasão de tecido conjuntivo circundante.

A técnica da regeneração óssea guiada inicialmente foi desenvolvida para a regeneração de tecidos periodontais perdidos resultantes de doença periodontal inflamatória com extensas perdas ósseas. Diversos tipos de membranas oclusivas foram estudadas nos últimos anos, e alguns pesquisadores classificaram essas membranas em não-biológicas e biológicas (FONTANA et al. 1994). Segundo BECKER et al. (1992) e SIMION et al. (1997), o melhor material de membrana documentado para a técnica da regeneração óssea guiada, é o politetrafluoretano expandido e-PTFE. DAHLIN et al. em 1988 produziram um defeito ósseo bilateral na mandíbula de 30 ratos adultos, e em um dos lados o defeito foi recoberto com

membrana de e-PTFE (Gore-Tex), enquanto do outro o defeito foi recoberto apenas com o retalho mucoperiosteal. Os resultados obtidos após análise macroscópica e histomorfométrica mostraram que a barreira mecânica de crescimento celular de tecido conjuntivo fibroso no interior do defeito ósseo resultou em reparo ósseo completo no local testado, levando em consideração que o defeito do lado controle foi preenchido por tecido conjuntivo cicatricial com pouca neoformação óssea.

A descoberta de novos polímeros e copolímeros tem contribuído significativamente para a evolução do campo dos biomateriais. Em 1984, o grupo de química analítica e tecnologia de polímeros do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo desenvolveram um novo polioli derivado do óleo da mamona. A mamona (*Ricinus communis*) da classe dicotiledônea, origem Geraniácea, família Euforbaceae, é uma planta característica de clima tropical, possui grande potencial oleoquímico, podendo garantir o fornecimento de polióis e pré-polímeros a partir de ácidos graxos. Essas características levaram os pesquisadores a investigarem a viabilidade do emprego desses polímeros na área biológica (OHARA et al., 1995; LEONEL et al., 2004).

IGNÁCIO (1995) avaliou a neoformação óssea e a incorporação do cimento derivado do polímero de mamona através de análise radiográfica e histológica. Para isso a autor utilizou 32 coelhos os quais confeccionou defeitos osteoperiosteais de 2 cm no osso rádio bilateralmente de coelhos, no grupo controle os defeitos foram preenchidos apenas com coágulo sangüíneo, no grupo experimental os defeitos foram preenchidos com cimento derivado do polímero da mamona. Os resultados mostraram que o polímero de mamona é um material osteocondutor, permitindo que o osso neoformado desenvolva-se por toda superfície externa do material.

Em 2001, BELMONTE, em sua dissertação de mestrado, avaliou a reação tecidual frente à implantação do polímero vegetal derivado da mamona em defeitos criados nos ossos do crânio e do rádio de coelhos. Foram utilizados 12 coelhos divididos em dois grupos de 6 animais em cada, respectivamente, grupo experimental e controle. Cada animal do grupo experimental recebeu o polímero vegetal como material de implante em defeitos criados no osso frontal e no osso rádio. Os animais do grupo controle tiveram seus defeitos preenchidos apenas por coágulo sanguíneo. O período de observação foi de 30 e 90 dias. Após análise histológica, o autor concluiu que o polímero vegetal é um material de implante bioativo e osteocondutível, podendo ser considerado como um substituto ósseo nacional alternativo e facilmente disponível.

BELMONTE et al. em 2005, analisaram o efeito “barreira” de uma nova membrana de resina de poliuretano em procedimentos de cicatrização óssea guiada na calvária de coelhos. Foram utilizados 18 coelhos machos adultos. Após anestesia os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de craniotomia com defeitos de 15 x 5 mm. No grupo experimental foram colocadas membranas de resina de poliuretano no assoalho e na superfície do defeito. No grupo controle os defeitos foram preenchidos apenas por coágulo sanguíneo. Os animais foram sacrificados nos períodos de 15, 30 e 60 dias. As peças foram submetidas aos processos de obtenção da imagem digital do sistema Digora. No grupo experimental de 15 a 30 dias observou-se um início de reparo mais acentuado nas margens do defeito, com nível de cinza 80. Nos grupos controles apareceram áreas de radiopacidade esparsas. As áreas transparentes apresentaram nível de cinza 60. No período de 60 dias, no grupo experimental, as áreas radiopacas, com medida de cinza 90, praticamente fecham o defeito ósseo. No grupo controle, as áreas de

reparo não ocorrem de forma homogênea neste período, sendo observadas áreas radiotransparentes pequenas, entremeadas a áreas radiopacas. Os autores concluíram que a membrana feita com resina de poliuretano atua como barreira no processo de regeneração óssea guiada em modelos cirúrgicos em calvária de coelhos.

### **2.2.1 Fatores de crescimento e diferenciação óssea**

O termo fatores de crescimento foi descrito por WOZNEY em 1993 como sendo um grupo de polipeptídeos de aproximadamente 6-45 kDa os quais estão envolvidos na proliferação celular, diferenciação e morfogênese de tecidos e órgãos durante a embriogênese até a fase adulta. Os fatores de crescimento e diferenciação ósseos (FCDO) são produzidos fisiologicamente por osteoblastos em pequenas concentrações e incorporados na matriz óssea em forma de pró-peptídeos correspondendo menos de 1% das proteínas não colagenosas do osso (SOLHEIN, 1998).

Segundo EINHORN (1998) muitos fatores de crescimento são depositados na matriz extracelular onde são liberados durante a degradação da matriz fazendo parte da sinalização celular que ativa o processo de regeneração e remodelação dos tecidos. Uma vez ativados, os FCDO ligam-se a receptores específicos da membrana celular de osteoblastos e outras células envolvidas no reparo ósseo, estimulando a expressão de genes responsáveis pelo desencadeamento do processo de neoformação óssea. Em termos de interação célula/célula, para FERNANDES (1998) os fatores de crescimento manifestam duas formas distintas de atuação: estimulam localmente a proliferação e diferenciação celular e a síntese de

nova matriz protéica (efeito parácrino); além disto, os osteoblastos, que produzem os fatores de crescimento, podem simular eles mesmos para a atividade metabólica adicional (efeito autócrino).

Para ORINGER (2001) os fatores de crescimento e diferenciação podem ser identificados, caracterizados e sinteticamente produzidos utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Segundo o autor, fatores de crescimento são proteínas que afetam o crescimento e a função de uma célula específica, afetando a proliferação celular e a síntese de matriz extracelular, por outro lado, fatores de diferenciação controlam a condição fenotípica das células, ou seja, células precursoras como as células mesenquimais indiferenciadas tornam-se osteoblastos.

GRAVES & COCHRAN (1994) descreveram a família dos cinco fatores de crescimento que tinham potencial para induzir regeneração periodontal, quando colocados em contato com osteoblastos e células do ligamento periodontal *in vitro* e *in vivo*. Nesse caso, incluíram o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento insulínico (IGF) e as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP's).

De acordo com BURT (1992), os fatores de crescimento transformador são citocinas multifuncionais com uma larga extensão de funções biológicas. Essas incluem regulação de crescimento e diferenciação de muitos tipos celulares e em geral, efeitos estimulativos em células mesenquimais e efeitos inibitórios em células de origem ectodérmica. O TGF- $\beta$  pertence a um grupo de proteínas relacionadas, que demonstram vários graus de homologia nas seqüências de aminoácidos, essa família de proteínas é chamada superfamília de proteínas TGF- $\beta$ .

Segundo RAMOSHEBI et al. (2002), os membros da superfamília TGF- $\beta$  exibem variações estruturais na seqüência C-terminal do aminoácido, no entanto, os vários isoformes compartilham muitas atividades biológicas qualitativamente similares. Uma família especial de fatores de crescimento chamado de proteína morfogenética óssea (BMP) tem uma propriedade única de estimular a diferenciação de células mesenquimais em células da linhagem condroblástica e osteoblástica.

### **2.2.1.1 Proteínas Morfogenéticas Ósseas**

Os primeiros experimentos sobre osteoindução foram relatados por LEVANDER (1938) com a implantação de fragmentos ósseos intramusculares e subcutâneos após a remoção do periósteo e da camada óssea superficial com formação óssea ectópica. Na época o autor sugeriu que deveria haver um agente estimulante originado do próprio enxerto.

Entretanto somente em 1965, em um estudo clássico, URIST implantou osso desmineralizado por diferentes ácidos em músculos de camundongos, ratos, coelhos e defeitos ósseos de coelhos, cães e humanos. Os fragmentos desmineralizados com 0,6N de HCl obtiveram resultados impressionantes, a matriz óssea obtida com a descalcificação com esse ácido foi invadida por novos vasos e reabsorvida rapidamente, enquanto ocorria neoformação óssea e proliferação de células osteoprogenitoras. Isso ocorreu mesmo em tecido muscular, assim essa matriz óssea tinha a propriedade de induzir a diferenciação de células indiferenciadas em células osteoprogenitoras com formação de novo osso. O autor concluiu que haveria uma substância na matriz óssea desmineralizada que induzia células indiferenciadas a se diferenciarem em células osteoprogenitoras ou

condroprogenitoras. Embora não fosse possível determinar o componente ativo do fragmento ósseo, URIST identificou como sendo de origem protéica e denominou de proteína morfogenética óssea (BMP).

URIST & STRATES em 1971, afirmaram que a BMP está armazenada na matriz extracelular do osso, dentina, assim como em células neoplásicas do osteossarcoma e de certos tumores odontogênicos. Os autores observaram que sua liberação nos tecidos induz a neoformação óssea através da diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos, possuindo ainda ação quimiotática e mitogênica bem como aumentam a síntese óssea. O termo osteoindução foi então designado como um princípio básico da regeneração óssea através da atividade das proteínas morfogenéticas (GONÇALVES et al., 1998; WOLFE et al., 1999; GROENEVELD & BURGER, 2000; SYKARAS & OPPERMAN, 2003).

REDDI & HUGGINS (1972) demonstraram que o implante de matriz óssea desmineralizada, em tecido subcutâneo de ratos, age como um estímulo que desencadeia um processo de diferenciação e organização celular, levando à formação seqüencial de cartilagem e osso.

Em 1990, num estudo pioneiro, BESSHO et al. extraíram e purificaram BMP da matriz dentinária, óssea e de tecido de reparação de alvéolos dentários de coelhos 14 dias após a extração. A análise da seqüência de aminoácidos sugeriu uma proteína de 191 aminoácidos e peso molecular de 20 kDa. Depois de purificadas, foram misturadas com poliacrilamina a 10-20% em gel de eletroforese e implantados na musculatura da panturrilha de ratos Wister. Foi observado que a matriz dentinária apresentou peso molecular e propriedades de purificação diferentes, no entanto, características similares no que diz respeito ao potencial osteoindutor. Em trabalho posterior, BESSHO et al. (1992) extraíram e purificaram

BMP da matriz óssea de boi, porco, coelho e ratos, e compararam os extratos com referência especial as diferenças relacionadas às espécies. Os autores concluíram que as BMP's de espécies diferentes tinham atividades similares, porém apresentavam diferenças após o processo de purificação.

As proteínas morfogenética do osso (BMP's) são proteínas multifuncionais do crescimento que pertencem à superfamília do fator de crescimento transformador. Os membros dessa família são expressos durante o desenvolvimento da ossificação endocondral, durante uma fratura e no reparo de cartilagem. Aproximadamente 15 membros da família das BMP's foram identificadas e caracterizadas. O sinal provocado pelas BMP's é traduzido através dos receptores kinase da serine/threonine, tipo I e II. As BMP's parecem estar envolvidas na regulação, proliferação, sobrevivência, diferenciação e apoptose, sendo sua maior habilidade na indução óssea em locais heterotópicos e ortotópicos. Diversos estudos em animais ilustraram o potencial das BMP's em reparar defeitos de tamanho crítico (SANDBERG et al., 1993; GRANJEIRO et al., 2005).

Membros da família das BMP's são divididos em pelo menos quatro subgrupos baseados na similaridade da seqüência do ácido amínico primário. Um grupo é formado pela BMP-2 e BMP-4, estas proteínas apresentam 92% da seqüência de aminoácidos idênticas entre si e 33-35% idênticas à seqüência do TGF- $\beta$ . A BMP-5, BMP-6, BMP-7(OP-1) e a BMP-8(OP-2) são intimamente relacionados entre si com 89% da seqüência de ácido amínico em suas regiões correspondentes. O terceiro grupo é formado apenas pela BMP-3, ou também chamado osteogenina, com 45% de seqüência idêntica a BMP-2. A BMP-1 não é considerada membro da superfamília TGF-  $\beta$  (WOZNEY, 1993; SAKOU, 1998; CARVALHO, 2001, RENGACHARY, 2002). Estudos mais recentes têm identificado

através de clonagem uma subfamília similar a BMP importantes na formação óssea, estas proteínas foram denominadas de fator de crescimento e diferenciação 5 (GDF-5) ou proteína derivada da cartilagem 1 (CDPM-1), GDF-6 ou CDPM-2 e GDF-7 ou BMP-12. Estas são homólogas em 80-86% entre si, e 46-57% idênticas às BMP-2 até a BMP-8 (RIPAMONTI & REDDI, 1994; ROSEN & THIES, 1995; GONÇALVES, 1997).

Segundo LINDHOLM & GAO (1993), para otimizar a osteoindução promovida pelas BMP's, elas devem estar associadas a uma substância carreadora apropriada, a qual parece possuir efeito sobre a farmacocinética e ação destas proteínas. Para ALDINGER et al. em 1991, o material carreador deve apresentar algumas características dentre elas: relativa solubilidade em condições fisiológicas, biodegradabilidade, proteção contra atividade proteolítica, ser substrato para adesão celular e proliferação, ser imunologicamente inerte, liberar as BMP's lentamente, ser estável mecanicamente no defeito ósseo e facilmente manufacturado.

Em 1997, BOYNE publicaram relatos clínicos da regeneração óssea com proteína morfogenética recombinante do osso humano (rhBMPs), BMP-2 e BMP-7. Embora ambas BMP's pudessem induzir neoformação óssea, uma variação significativa na resposta individual foi observada com ambas as proteínas. Os estudos em animais e as experiências *in vitro* revelaram um número de circunstâncias que influenciam o potencial osteocondutivo das BMP's, tal como a concentração de BMP, as propriedades do portador e a influência de fatores locais e sistêmicos, assim como os hormônios do crescimento.

Desde os estudos pioneiros de URIST em 1965, o uso de matriz dentinária desmineralizada como material estimulador da neoformação óssea, vem sendo amplamente estudado (YOSHIDA et al., 1998; OKAMOTO et al., 1999;

GONÇALVES et al., 2002). Ainda em 1971, URIST fez uma descrição detalhada da metodologia aplicada e das características morfológicas do processo de formação óssea tendo como material osteoindutor a matriz dentinária. O autor removeu dentina de incisivos de vários animais (cães, gatos, coelhos e ratos) e desmineralizou com HCl 1N, liofilizou e implantou em tecido muscular, em defeitos ósseos e dentro dos alvéolos. Foi observado migração de células mesenquimais, com formação óssea no local.

As propriedades morfogenéticas ósseas da matriz dentinária desmineralizada foram estudadas por CATANZARO GUIMARÃES (1976) e mais tarde por CATANZARO GUIMARÃES et al. (1986). Nestes estudos, foi implantada dentina autógena na forma de fatias e partículas, em defeitos confeccionados em mandíbulas de cães e analisadas por meio da microscopia óptica, nos períodos de 15, 30 e 90 dias. Os resultados mostraram que no implante de matriz dentinária em forma de partículas houve reabsorção e substituição das partículas por formação óssea. No implante de dentina em forma de fatias ocorreu proliferação osteogênica mais intensa, tendo sido observada a sua incorporação ao osso neoformado.

GONÇALVES em 1997 estudou a dinâmica temporal do processo de reparo ósseo em defeitos ósseos cirúrgicos no osso rádio de cães utilizando implante de matriz dentinária autógena obtida de dentes incisivos. Os animais foram sacrificados em períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias, e as peças submetidas à análise radiográfica, com radiografia digital direta, e análise microscópica. Foi verificado que o reparo ósseo em defeitos cirúrgicos no osso rádio desenvolve-se por ossificação intramembranosa, nas paredes do defeito, e por ossificação endocondral nas áreas centrais do defeito. A autora observou ainda que as fatias de matriz dentinária autógena desmineralizada estimulam a neoformação óssea de forma direta e

aceleram a remodelação do osso imaturo não osteonal para osso maduro osteonal, sendo rapidamente incorporadas ao osso neoformado.

GOMES (1998), em sua tese de doutorado, avaliou a atividade osteoindutora da matriz dentinária autógena descalcificada (MDAD), em defeitos ósseos cirúrgicos experimentais no osso parietal de coelho, associada à regeneração óssea guiada com o uso de membrana amniótica humana (MAH) e membrana de politetrafluoretileno (MP). Nesta pesquisa a autora empregou 72 coelhos divididos em dois grupos controles, MAH e MP, e dois grupos experimentais, MAH associada a MDAD e MP associada a MDAD. Após confecção do defeito ósseo, nos grupos controles, as respectivas membranas foram colocadas na superfície e no assoalho da loja cirúrgica e a cavidade preenchida com coágulo sangüíneo. Nos grupos experimentais, foram implantadas fatias de MDAD na periferia do defeito ósseo e colocação da membrana na superfície e no assoalho do defeito. Decorridos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias três coelhos de cada grupo foram sacrificados e as peças submetidas à análise macroscópica, radiográfica digital direta e microscópica. Os resultados obtidos mostraram que a MAH e a MP não interferiram no reparo ósseo, sendo que a MP permaneceu na região do defeito e a MAH foi absorvida. Além disso, as fatias de MDAD estimularam a neoformação óssea de forma direta, sendo rapidamente incorporadas ao osso neoformado e reabsorvidas durante o processo de remodelação óssea.

GONÇALVES em 2001 comparou a dinâmica da regeneração óssea e a resposta ao implante de matriz dentinária desmineralizada em ossos com mecanismos distintos de ossificação. Dentina autógena foi obtida de dentes incisivos de cães e implantada em defeitos padronizados no osso parietal e no osso rádio, sendo os animais sacrificados em períodos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias. As

peças foram submetidas à análise radiográfica digital direta e análise microscópica. A autora concluiu que ambos os ossos a regeneração óssea foi auxiliada pelo uso de dentina desmineralizada autógena, fonte natural de proteínas morfogenéticas ósseas, sendo que no osso rádio a evolução da regeneração óssea foi mais rápida do que no osso parietal, e desenvolveu-se de forma direta e indireta. No osso parietal houve somente formação óssea direta.

Em 2004, ABREU et al. avaliaram a reparação óssea em alvéolos dentários da região dos terceiros molares inferiores em humanos, após a implantação de matriz dentinária desmineralizada autógena (MDDA) e recobertos com barreira de politetrafluoretileno (BP). Foram selecionados 14 pacientes, sendo 5 utilizados no grupo controle e 9 nos grupos BP e MDDA + BP. Foram realizadas análises clínica, radiográfica e estatística da densitometria óssea nos períodos de observação de 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias. O exame clínico revelou tolerância biológica do tecido ósseo em relação à MDDA e a análise radiográfica mostrou maior homogeneidade na radiopacidade do trabeculado em relação aos grupos controle e BP. Os autores concluíram que a MDDA foi compatível em alvéolos dentários de humanos e auxiliou no processo de reparação alveolar devido à sua atividade osteopromotora. A densidade radiográfica da MDDA mostrava-se semelhante ao aspecto do tecido ósseo normal.

A capacidade osteopromotora da matriz dentinária desmineralizada homogênea também foi demonstrada no trabalho de CARVALHO (2004) que analisou os efeitos da MDDH liofilizada na reparação de defeitos cirúrgicos em coelhos nos períodos de 30, 60 e 90 dias. Foram utilizados 18 coelhos divididos em dois grupos de 9 animais (controle e tratado). Em ambos os grupos foram realizados defeitos cirúrgicos de 5 mm de diâmetro na cortical óssea vestibular da mandíbula e

recobertos por membrana de politetrafluoretileno. Na periferia do defeito do grupo tratado foram colocadas partículas de MDDH-L de 0,105 mm de diâmetro. Estas foram previamente desmineralizadas num sistema de diálise, em solução de ácido acético 0,5 M e pH 5, liofilizadas a frio e esterilizadas por irradiação de cobalto-60. As análises histomofológica e histomofométrica mostraram que no grupo tratado houve neoformação óssea qualitativa e quantitativamente superior em todos os períodos observados.

**PROPOSIÇÃO**

---

### **3 – PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo da regeneração óssea induzida pela matriz dentinária alogênica descalcificada em defeitos ósseos cirúrgicos experimentais na tíbia de ratos, ocluído com membrana de polímero de poliuretano.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Animais utilizados

O protocolo de pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Ensino e Pesquisa com Animais da USC em 05/08/2005.

Um total de 60 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos adultos, com peso médio de 290 g, com aproximadamente 60 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Saúde, Ciências e Tecnologia do Piauí, NOVAFAPI, foram divididos em três grupos, sendo que no grupo controle (C1) os animais tiveram o defeito preenchido apenas com coágulo sangüíneo, no grupo tratado (E1) os defeitos contendo coágulo foram ocluídos com membrana de poliuretano e no grupo tratado (E2) foram implantados partículas de matriz dentinária desmineralizada alogênica envolvidos com membrana de poliuretano (figura 1).

Os animais foram mantidos durante o experimento em boas condições de higiene, e alimentados com dieta padrão do biotério, ração (Labina <sup>TM</sup>) e água *ad libidum*.

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à medicação pré-anestésica com Atropina numa dose de 0,1 ml por animal intraperitonal, e em seguida anestesia geral através da injeção também intraperitonal de Cloridrato de Cetamina (Ketamin<sup>®</sup>, Cristália), e Xilasina (Rompum<sup>®</sup>, Bayer), diluídos numa relação de uma parte de Ketamin<sup>®</sup> para uma parte de

Rompum<sup>®</sup>, com dose de 0,1ml/100g de peso. Em seguida foi realizada uma tricotomia na área da tíbia seguida de antissepsia com solução de PVPI (polivinilpíloridona) tópico.

De acordo com o período de cicatrização óssea, determinado de 15, 30, 60 e 90 dias, os animais foram sacrificados, em grupos de cinco a cada período.

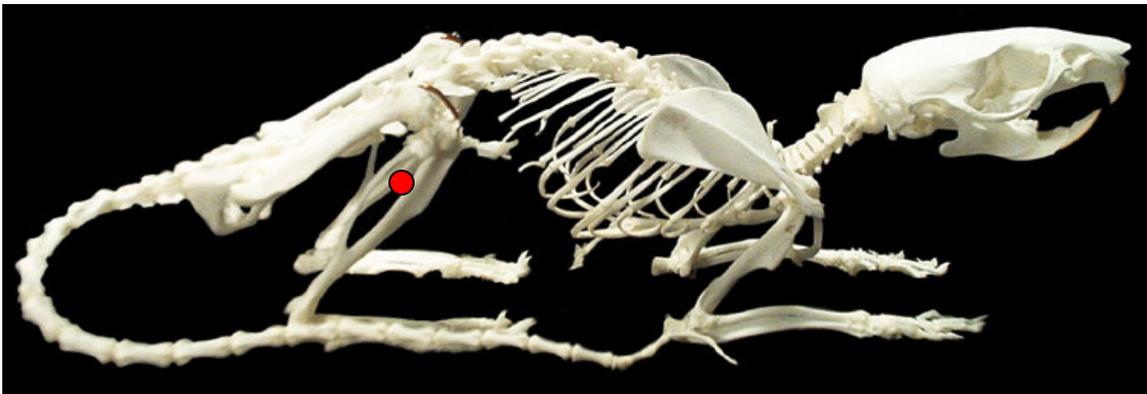


FIGURA 2 - Figura representativa do local do defeito ósseo na tíbia do rato Wistar (*Rattus norvegicus*).

#### 4.1.2 Matriz dentinária alogênica desmineralizada

A matriz dentinária alogênica desmineralizada foi obtida após exodontia de incisivos centrais de ratos da mesma espécie. A matriz dentinária foi preparada e depois cortada em forma de partículas (CATANZARO-GUIMARÃOES et al., 1986).

#### **4.1.3 Membrana de resina de poliuretana**

No experimento foi utilizada uma membrana de resina de poliuretana que é desenvolvida a partir de polióis e pré-polímeros derivados de óleo de mamona (Castor Oil) e do difenilmetano diisocianato (MDI), de maneira a se obter produtos com diferentes propriedades físico-químicas e compatibilidade com organismos vivos. Os polióis desenvolvidos para a síntese desses polímeros possuem em sua estrutura molecular segmentos poliésteres com grupos hidroxilas primárias e secundárias. Esses segmentos poliésteres são derivados do ácido ricinoleico e glicóis, onde se obtém moléculas de diferentes massas moleculares e funcionalidade. As propriedades mecânicas finais do polímero estão relacionadas a essas variações da massa molecular e da funcionalidade. Os pré-polímeros são os componentes dessa poliuretana que possuem grupos isocianatos livres para reagirem com os grupos hidroxilas do poliol. Esses pré-polímeros são sintetizados a partir do difenilmetano diisocianato (MDI) e polióis derivado do óleo de mamona. A característica básica do MDI utilizado nesses pré-polímeros é seu alto grau de pureza com aprovação do FDA para utilização em alimentos, drogas e cosméticos.

#### **4.1.4 Reagentes, compostos e soluções**

Para conservação, transporte e preparação da matriz dentinária e para os procedimentos cirúrgicos e histotécnicos, foram utilizados os seguintes produtos: Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Mallory (QEEL – Química Especializada Erich/Ltda.), Polivinilpirrolidona-iodo (PVPI), anestésico Ketamin<sup>®</sup>, Rompum<sup>®</sup>,

atropina<sup>®</sup>, solução aquosa de ácido fórmico e citrato de sódio (Merck S.A Indústrias Químicas), Formol à 10% (Merck S.A Indústrias Químicas), parafina, xilol, soluções processadoras GBX.

#### **4.1.5 Materiais cirúrgicos**

Foram utilizados os seguintes materiais para os procedimentos cirúrgicos: seringas anestésicas descartáveis, pano de campo, bisturi cirúrgico descartável, tesouras Metzemaum QT330/15 e QT331/15, pinça de dissecação QC100/14, descolador Molt QD935/18, afastadores de Farabeuf, sindesmótomo, extrator Seldin QD405/00, espátula 7, broca esférica nº 8, porta agulha, pinça hemostática tipo mosquito curva e reta, afastadores cirúrgicos, gazes estéril, fio de sutura Vycril (ETHICON/ Johnson & Johnson 6.0), fio de sutura montado (ETHICON/ Johnson & Johnson com agulha de seda 4.0), seringa de 1ml descartável (Becton Dicknson Indústrias Cirúrgicas Ltda), aparelho de micromotor 405n Dentec.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Preparo da matriz dentinária desmineralizada**

Para a preparação da matriz dentinária alógena, foi realizada exodontia dos dentes incisivos centrais de ratos da mesma espécie e logo imediatamente esses dentes foram despulpados por via retrógrada, o ligamento periodontal removido por

raspagem vigorosa da raiz, e o esmalte dentário cortado. Após lavagem com soro fisiológico estéril a 2°C, esses dentes foram imersos em soluções desmineralizadoras contendo ácido acético ( $C_2H_4O_2$  – 2,87ml/L), cloreto de cálcio ( $CaCl_2$  – 2,2 mM/ 244,2 mg/L) e fosfato de sódio monohidratado ( $NaH_2PO_2$ – 2,2Mm/ 349,14 mg/L) até sua completa desmineralização.

Em seguida, os dentes foram lavados com água destilada, sob constante agitação e acondicionados em recipientes esterilizados, sendo armazenados a uma temperatura de 2°C até sua utilização como material de implante.

## **4.2.2 Preparo cirúrgico dos defeitos ósseos**

### **4.2.2.1 Grupo controle**

A preparação cirúrgica do defeito foi realizada na tíbia dos ratos, e teve início com a tricotomia da região a ser incisada e assepsia com polvidine tópico. A área a ser operada foi isolada com campos cirúrgicos estéreis e uma incisão linear de 20 mm de extensão, no sentido crânio-caudal, foi feita com um bisturi nº15, seguida de divulsão da pele, músculo e periósteo para a exposição da superfície óssea. Com uma broca esférica de aço nº 8 montada em um micromotor cirúrgico e com abundante irrigação com soro fisiológico foi realizado um defeito ósseo na forma elíptica com dimensão de 6 mm e profundidade até atingir o canal medular. Os animais pertencentes ao grupo controle C1 tiveram os defeitos preenchidos apenas com coágulos sangüíneos e, em seguida foi procedida à sutura por planos. Para delimitar o defeito ósseo foi realizado duas pequenas perfurações com broca

esférica nº 1 ao lado da loja cirúrgica, sendo as mesmas preenchidas com um material radiopaco, a guta-percha (figura 3).

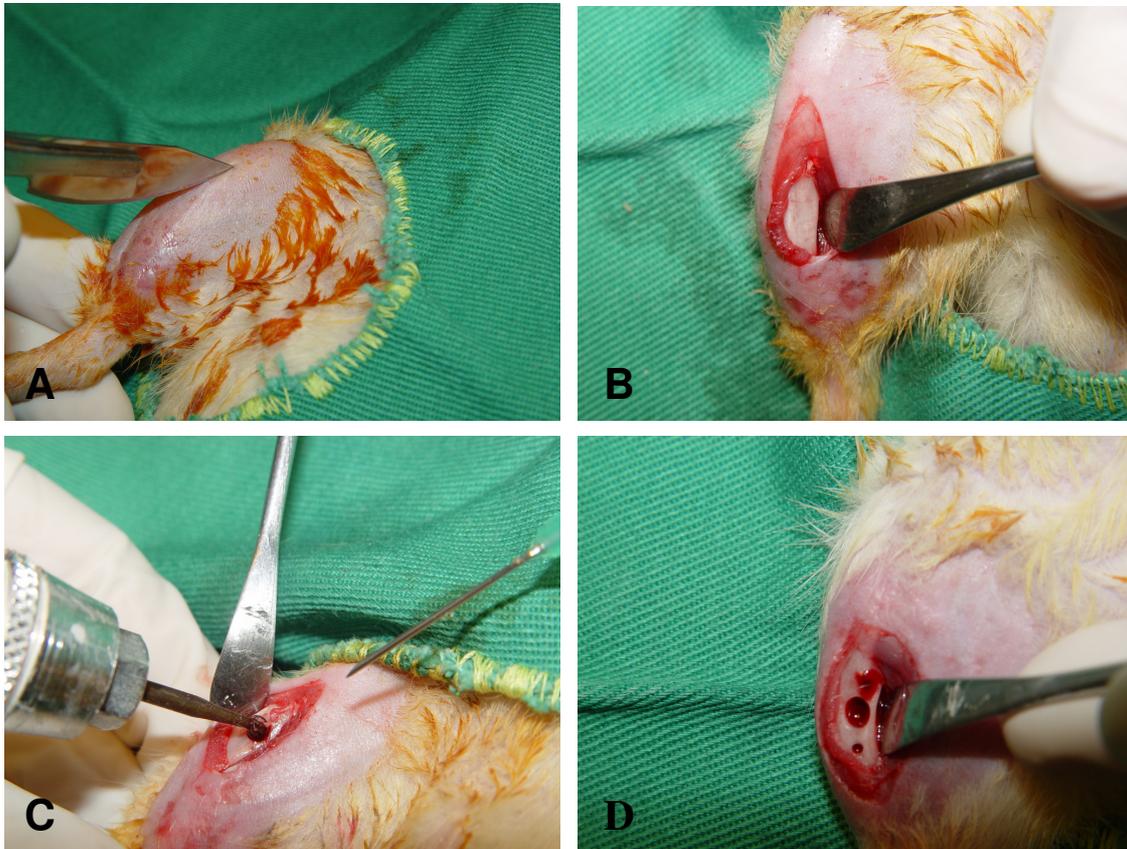


FIGURA 3 – (A) Incisão, (B) Exposição do osso, (C) Confeccção do defeito ósseo cirúrgico, (D) Defeito ósseo cirúrgico.

#### 4.2.2.2 Grupo tratado

Após isolamento da área com campos cirúrgicos estéreis, foi realizada uma incisão linear, com dimensões semelhantes à cirurgia do grupo controle. No grupo tratado (E1) o defeito foi ocluído por membrana de poliuretano na superfície da loja cirúrgica. No grupo tratado (E2), foi implantado matriz dentinária desmineralizada alogênica no centro do defeito e imediatamente após, o defeito foi ocluído pela

membrana de poliuretano na superfície da loja cirúrgica. Em seguida, foi realizada a sutura do periósteo, músculos e da pele (figura 4).

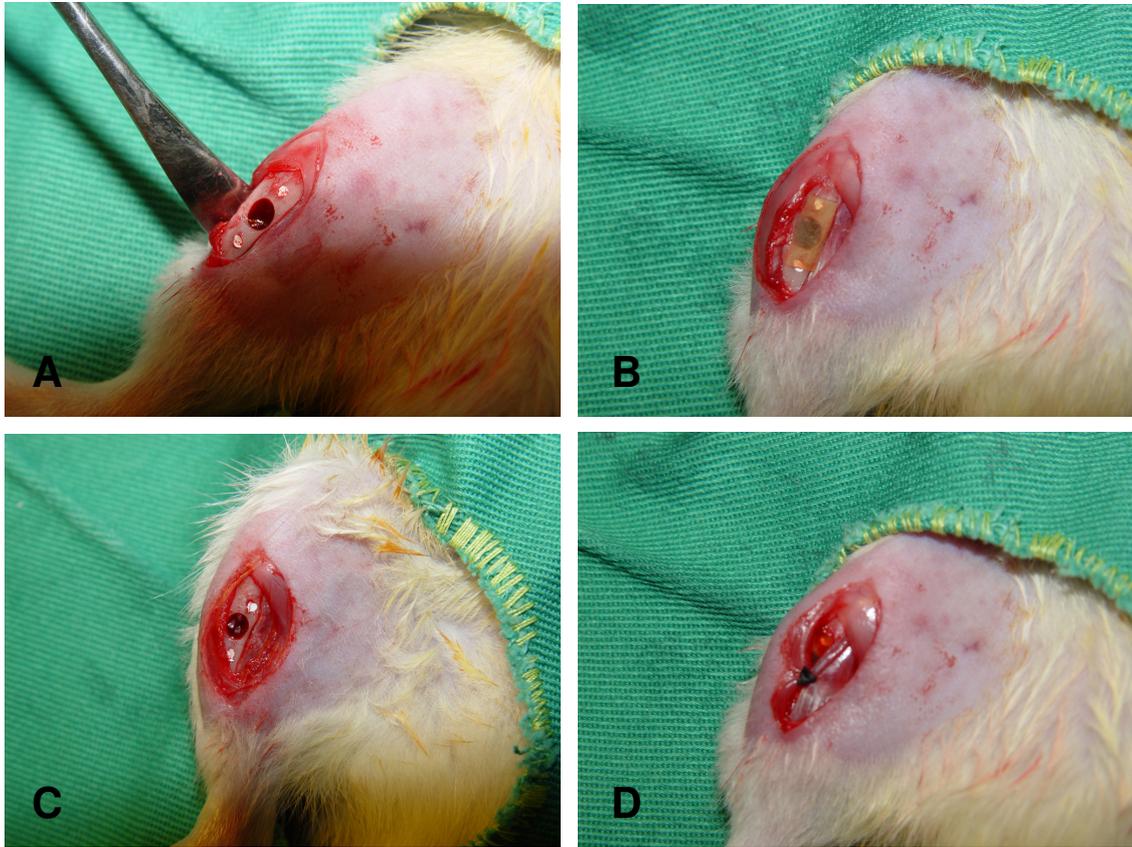


FIGURA 4 – Grupo tratado E1: (A) Defeito ósseo cirúrgico marcado com guta-percha, (B) Polímero de poliuretano sob o leito cirúrgico; Grupo tratado E2: (C) Defeito ósseo cirúrgico preenchido com partículas de matriz dentinária e marcado com guta-percha, (D) Sutura do músculo após colocação do polímero de poliuretano.

### **4.2.3 Preparo das peças**

Decorridos 15, 30, 60 e 90, os animais de cada grupo foram sacrificados. As peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em blocos e fixadas em formol à 10%.

#### **4.2.3.1 Análise macroscópica**

As tíbias contendo os defeitos ósseos foram removidas em bloco e os defeitos analisados macroscopicamente, em suas dimensões, consistência e coloração. Estas observações foram registradas e fotografadas com lente de aproximação.

### **4.2.4 Preparo das peças para análise radiográfica**

Após a fixação, a neoformação óssea foi analisada através da densidade radiográfica. Imagens radiográficas digitais dos espécimes, a tíbia dos ratos, foram avaliadas levando em consideração o processo de reparo ósseo.

Para a tomada radiográfica convencional a umidade das peças foi absorvida por um lenço de papel, e posicionadas horizontal e paralelamente ao longo eixo do filme radiográfico, colocado sobre uma superfície plana (paralela ao solo) de uma cadeira odontológica. Foi utilizado um aparelho de raios X regulado para 70kVp e 8mA, com filtragem total equivalente a 2mm de alumínio. Posicionou-

se o cilindro localizador de modo que o feixe central incidiu perpendicularmente ao plano do filme, com distância foco/filme de 40 cm e a exposição de 8mAs previamente selecionado. As tíbias foram então radiografadas utilizando filmes radiográficos tamanho 2 Kodak Insight. Após exposição, os filmes foram processados automaticamente na máquina Perio-ProIII, usando soluções processadoras GBX da Kodak. O tempo de processamento nesse equipamento foi de 6 minutos, após o qual as radiografias foram emolduradas e arquivadas, devidamente identificadas.

Para a obtenção da imagem digital pela técnica direta, as placas de imagem específicas do sistema Digora (sistema de obtenção por placa de fósforo "blue"), envoltas por embalagens plásticas, fornecidas pelo fabricante, foram lacradas na sua extremidade aberta, pelo soldador térmico do aparelho, e posicionadas da mesma maneira que foram feitas as tomadas radiográficas convencionais. Para as tomadas radiográficas digitais foi utilizado os mesmos parâmetros e condições técnicas usadas no filme radiográfico convencional, porém, uma menor exposição (4mAs), previamente selecionado. A placa de imagem sensibilizada, desta maneira, após sua remoção da embalagem plástica, foi introduzida no leitor óptico do Sistema Digora que, por varredura a laser, transferiu, depois de convertido os sinais analógicos em digitais, para um computador IBM compatível e armazenada em arquivos binários na memória da CPU PENTIUM III, 650 MHz para posterior manipulação e análise interpretativa (figura 5).

As imagens digitalizadas pelo método indireto foram obtidas através das radiografias convencionais que foram convertidas para o formato digital através de um *scanner* permitindo que a imagem seja trabalhada através da aplicação de um *software* específico.

#### **4.2.4.1 Análise radiográfica convencional**

A fim de estabelecer uma padronização do exame radiográfico convencional, a análise dos filmes foi efetuada em turnos programados, na mesma sala de interpretação radiográfica e feita por três examinadores independentes, sendo dois professores de radiologia. Através de uma lupa (Intex) e com o auxílio de negatoscópio para auxiliar a visualização durante o exame dos filmes, os critérios adotados para a definição da análise radiográfica foram as seguintes: 0-defeito sem nenhuma regeneração óssea; 1- defeito com regeneração óssea nas bordas; 2- regeneração óssea com  $\frac{1}{2}$  do defeito preenchido; 3- regeneração óssea com  $\frac{3}{4}$  do defeito preenchido; 4- regeneração óssea completa.

#### **4.2.4.2 Análise radiográfica digitalizada**

As imagens digitalizadas foram resgatadas do arquivo e, apresentadas uma a uma para os três examinadores, no monitor do mesmo computador e em uma sala abscurecida. Utilizando o programa do Sistema Digora ainda foi obtido valores relacionados com a densidade óssea (densidade máxima e mínima) das peças. Os critérios adotados para definir o padrão da regeneração óssea nas imagens digitais (técnica direta e indireta), foram os mesmo do exame radiográfico convencional.



FIGURA 5 – (A) Tomada radiográfica convencional, (B) Sistema DIGORA com leitor óptico a laser acoplado a um computador.

#### 4.2.5 Preparo das peças para análise microscópica

Para estudo microscópico, após fixação em formol a 10% por 92 horas, as peças foram descalcificadas pelo método de Morse (solução aquosa de ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20%) e incluídos em parafina. Os cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal com 6 (seis) micrômetros de espessura. Os cortes foram corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE) e pelo tricrômico de Mallory.

#### 4.2.5.1 Análise microscópica

Os cortes microscópicos foram analisados e descritos em todas as suas peculiaridades em um microscópio óptico binocular Micronal Olympus. Os fenômenos foram observados por três professores de Histologia e registrados em uma ficha apropriada confeccionada para esta finalidade, visando facilitar a descrição dos dados (tabela 1).

A análise microscópica efetuada procurou observar as seguintes características histológicas:

- Tecido de mesenquimal osteogênico;
- Osso imaturo periférico;
- Osso imaturo medular;
- Incorporação da dentina por neoformação óssea;
- Reabsorção da matriz dentinária;
- Remodelação do osso imaturo periférico;
- Remodelação com recomposição do canal medular;
- Presença de cartilagem;
- Presença de coágulo sangüíneo.

Os dados mais relevantes foram fotografados no próprio microscópio para a competente comprovação.

TABELA 1 – Modelo de ficha confeccionada para descrição de achados microscópicos referente aos fenômenos morfológicos durante o reparo ósseo com 15 dias.

<b>Análise Histológica do Defeito Ósseo com 15 Dias</b>															
Características Histológicas	Grupo C1	Escores				Grupo E1	Escores				Grupo E2	Escores			
		0	1	2	3		0	1	2	3		0	1	2	3
Tecido de Mesenquimal Osteogênico	R1C115					R1E115					R1E215				
	R2C115					R2E115					R2E215				
	R3C115					R3E115					R3E215				
	R4C115					R4E115					R4E215				
	R5C115					R5E115					R5E215				
Osso Imaturo Periférico	R1C115					R1E115					R1E215				
	R2C115					R2E115					R2E215				
	R3C115					R3E115					R3E215				
	R4C115					R4E115					R4E215				
	R5C115					R5E115					R5E215				
Osso Imaturo Medular	R1C115					R1E115					R1E215				
	R2C115					R2E115					R2E215				
	R3C115					R3E115					R3E215				
	R4C115					R4E115					R4E215				
	R5C115					R5E115					R5E215				
Incorporação da Dentina por Neoformação Óssea	R1C115					R1E115					R1E215				
	R2C115					R2E115					R2E215				
	R3C115					R3E115					R3E215				
	R4C115					R4E115					R4E215				
	R5C115					R5E115					R5E215				
Reabsorção da Matriz Dentinária	R1C115					R1E115					R1E215				
	R2C115					R2E115					R2E215				
	R3C115					R3E115					R3E215				
	R4C115					R4E115					R4E215				
	R5C115					R5E115					R5E215				
Remodelação do Osso Imaturo Periférico	R1C115					R1E115					R1E215				
	R2C115					R2E115					R2E215				
	R3C115					R3E115					R3E215				
	R4C115					R4E115					R4E215				
	R5C115					R5E115					R5E215				
Remodelação com Recomposição do Canal Medular	R1C115					R1E115					R1E215				
	R2C115					R2E115					R2E215				
	R3C115					R3E115					R3E215				
	R4C115					R4E115					R4E215				
	R5C115					R5E115					R5E215				
Cartilagem	R1C115					R1E115					R1E215				
	R2C115					R2E115					R2E215				
	R3C115					R3E115					R3E215				
	R4C115					R4E115					R4E215				
	R5C115					R5E115					R5E215				
Coágulo Sangüíneo	R1C115					R1E115					R1E215				
	R2C115					R2E115					R2E215				
	R3C115					R3E115					R3E215				
	R4C115					R4E115					R4E215				
	R5C115					R5E115					R5E215				

#### 4.2.5.2 Análise Histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica, foi utilizado um microscópio óptico binocular NIKON Eclipse 80i com objetiva para aumento de 4 vezes, acoplado a uma câmera de vídeo Q IMAGING Micropublisher 3.3 - Cooled, RTV. As imagens capturadas foram transferidas para a tela de um computador com processador INTEL Pentium 4 e analisadas por meio de um software específico denominado Image-Pro Plus 5.1. Através desse programa, foi criada uma macro, que significa um conjunto de funções que permite executar automaticamente a seleção das imagens, definindo as condições da histomorfometria e a execução da medida, por meio do analisador de imagens. A imagem da lâmina foi captada pelo sistema e visualizada no monitor, que, pelo software, normalizou e congelou a mesma. Os diferentes componentes estruturais foram quantificados de acordo com os diferentes níveis de coloração (figura 18 e 19), sendo mensuradas as áreas das seguintes estruturas:

- Tecido Ósseo – coloração azul;
- Tecido Conjuntivo – coloração amarela;
- Medula Óssea – coloração verde.

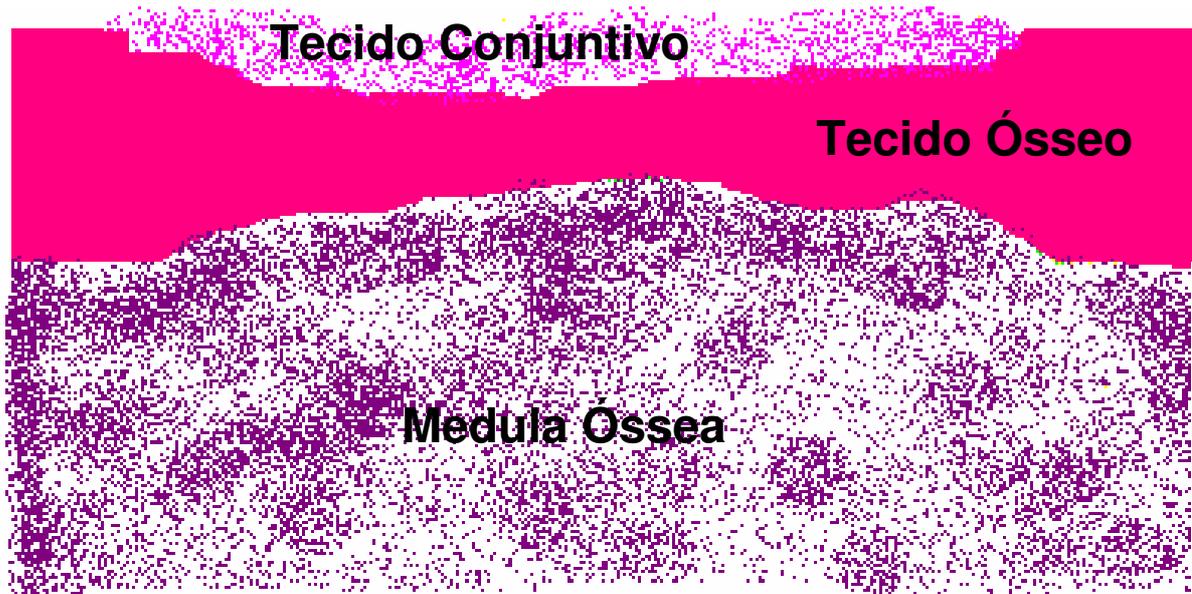


FIGURA 6 – Representação gráfica dos componentes estruturais mensurados antes da histomorfometria com coloração HE.

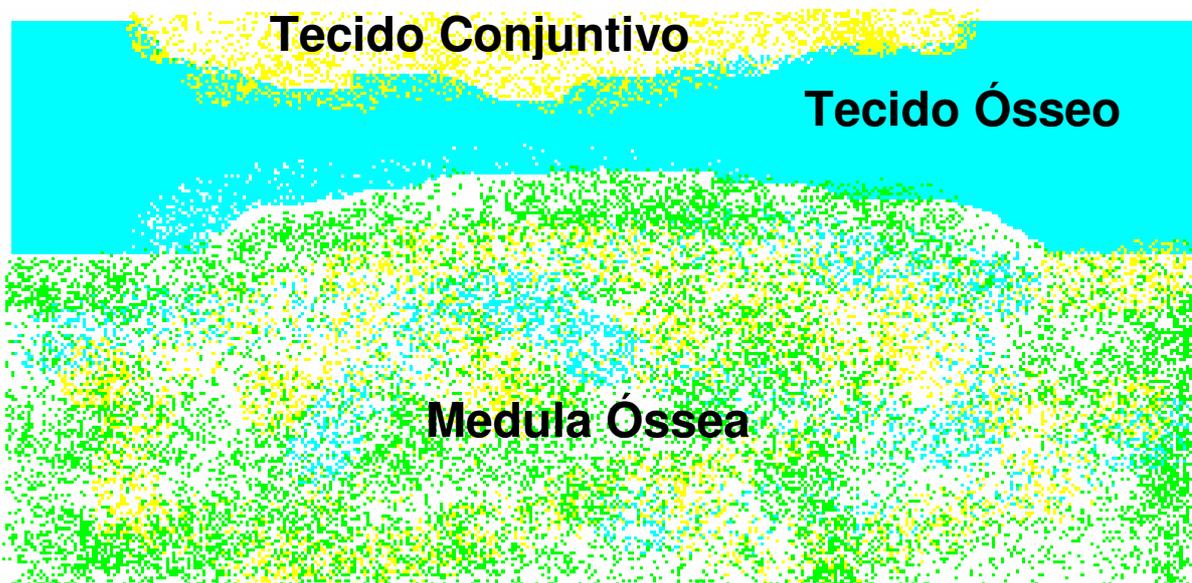


FIGURA 7 – Representação gráfica dos componentes estruturais mensurados durante a histomorfometria.

**RESULTADOS**

---

## **5- RESULTADOS**

### **5.1 Análise Macroscópica**

Para realizar a análise macroscópica os espécimes foram observados após dissecação e remoção da pele, tecido subcutâneo e muscular, e para facilitar a descrição dos resultados obtidos, os defeitos ósseos cirúrgicos foram divididos em zona central e periférica e analisados macroscopicamente, nas suas dimensões, consistência e coloração.

#### **5.1.1 Período de 15 dias**

No grupo controle, em quatro animais o defeito ósseo apresentou-se nítido com dimensão preservada, consistência mole e coloração castanha, apenas um animal o defeito ósseo teve consistência levemente dura, dimensão alterada e coloração semelhante das regiões adjacentes.

No grupo tratado E1, um dos espécimes apresentou dimensão alterada com limites de difícil percepção, consistência amolecida ao toque e coloração castanha apenas na zona central do defeito. Nos demais animais as lojas cirúrgicas tiveram suas dimensões preservadas, pequena resistência ao toque e coloração acastanhada.

No grupo tratado E2, apenas duas lojas cirúrgicas apresentaram limites precisos, com concavidade uniforme e quebradiça, rompendo-se facilmente a pressão e coloração acastanhada. Nos demais, o defeito apresentou limites

ligeiramente imprecisos com dimensão alterada, sendo que dois deles apresentaram consistência endurecida em todo defeito.



FIGURA 8 – Fotos das tíbias contendo os defeitos ósseos mostrando a regeneração com 15 dias.

### 5.1.2 Período de 30 dias

No grupo controle, foi observado que todos os espécimes tiveram seus defeitos com dimensões alteradas, limites irregulares, consistentes ao toque e com coloração da região do reparo ósseo compatível a das áreas adjacentes. Em apenas um animal a loja cirúrgica apresentou consistência mole na região central e resistência aumentada na periferia, assim como a coloração permaneceu castanha apenas no centro do defeito.

No grupo tratado E1, todos os defeitos apresentaram suas dimensões alteradas com limites de difícil percepção, consistência dura ao toque em toda sua extensão com coloração esbranquiçada. Em uma das lojas cirúrgicas pode-se perceber uma discreta coloração acastanhada do centro do defeito.

No grupo tratado E2, a consistência da região observada foi dura em toda a sua extensão, porém as áreas do defeito ósseo cirúrgico ficaram ligeiramente

preservadas em três animais. A coloração do defeito permaneceu castanha em três animais e esbranquiçada em outros dois.

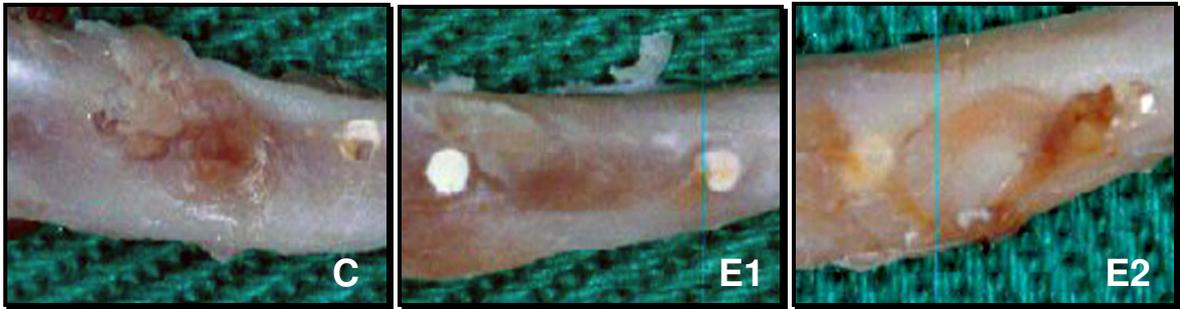


FIGURA 9 – Fotos das tíbias contendo os defeitos ósseos mostrando a regeneração com 30 dias.

### 5.1.3 Período de 60 dias

No grupo controle, as áreas contendo os defeitos ósseos tiveram suas dimensões alteradas, com seus limites imprecisos, mas perceptíveis ao olho nu. Notou-se ainda uma coloração acastanhada no centro do defeito, porém de consistência firme.

No grupo tratado E1, os defeitos ósseos apresentaram limites imprecisos, consistências firmes ao toque e uma discreta coloração acastanhada na região central. A periferia do defeito apresentou-se parcialmente circundada por uma área esbranquiçada semelhante ao tecido ósseo adjacente.

No grupo tratado E2, verificou-se que as lojas ósseas cirúrgicas foram totalmente preenchidas por tecido ósseo de consistência dura e coloração compatível com as áreas circundantes. A área do defeito ficou de difícil percepção ao exame macroscópico.



FIGURA 10 – Fotos das tíbias contendo os defeitos ósseos mostrando a regeneração com 60 dias.

#### 5.1.4 Período de 90 dias

No grupo controle, observou-se que em apenas um animal a dimensão do defeito ósseo permaneceu com limites nítidos e de fácil percepção. As cavidades foram todas preenchidas por um tecido ósseo de consistência firme e de coloração ligeiramente esbranquiçada.

No grupo tratado E1, as lojas ósseas cirúrgicas tiveram seus limites indistinguíveis das demais áreas circundantes e preenchidas por tecido ósseo uniforme e de consistência dura. Notou-se que em dois defeitos ainda foi possível identificar uma discreta mancha castanha na região central.

No grupo tratado E2, ocorreu um preenchimento completo de tecido ósseo neoformado em toda a extensão do defeito ósseo de consistência bastante dura ao toque, uniforme e com coloração idêntica às áreas adjacentes.



FIGURA 11 – Fotos das tíbias contendo os defeitos ósseos mostrando a regeneração com 90 dias.

## 5.2 Análise Radiográfica

A análise da radiografia convencional foi realizada em condições próprias para a interpretação radiológica, ou seja, em ambiente escuro, utilizando-se negatoscópio e uma lupa, e feita por três examinadores, sendo: dois professores de radiologia. Estes profissionais examinaram uma única vez cada tipo de radiografia, isoladamente, sendo previamente calibrados. Não houve comunicação entre os examinadores durante os exames. Para as radiografias digitais foi utilizado o mesmo computador nas mesmas condições.

### 5.2.1 Período de 15 dias

No grupo controle a área do defeito ósseo permaneceu radiolúcido, circular, com limite bem definido. No grupo tratado E1, notou-se uma discreta radiopacidade nas bordas do defeito, que se tornou mais evidente no grupo tratado E2.

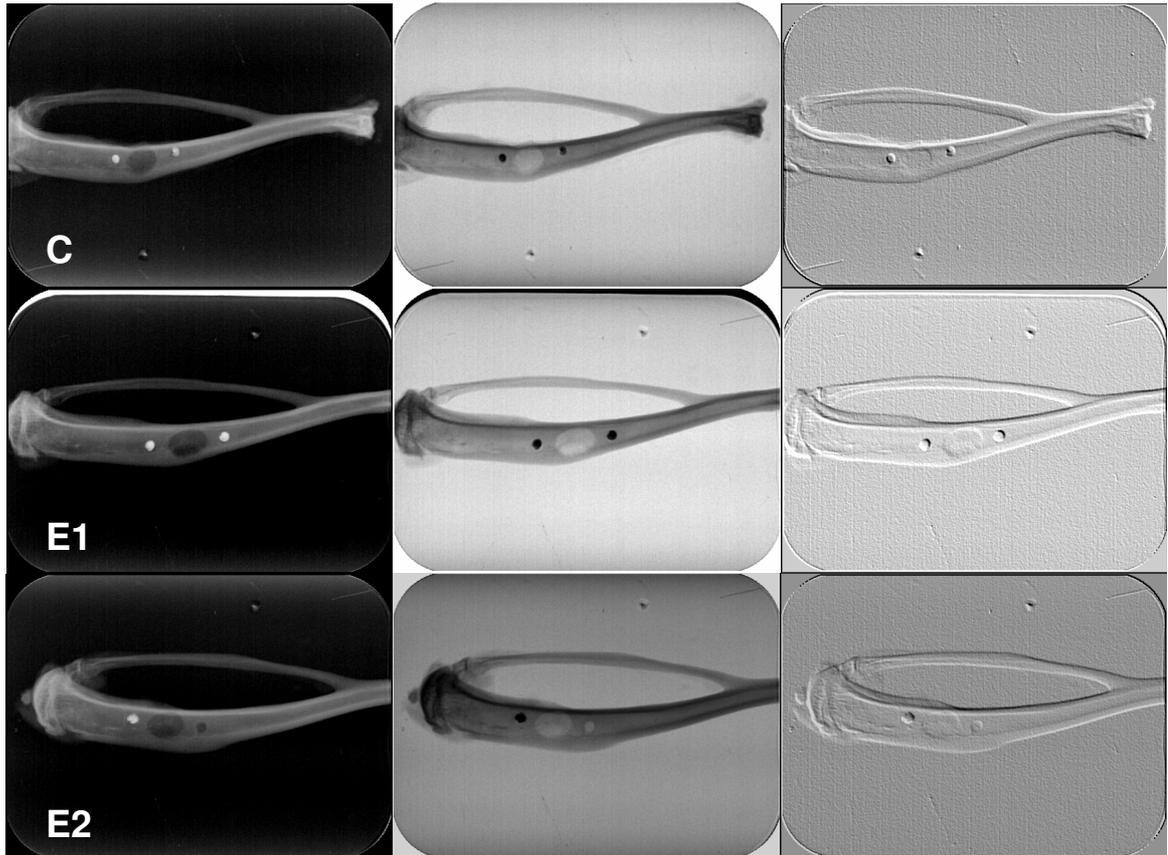


FIGURA 12 – Imagens radiográficas digitais (positiva, negativa e alto relevo) das tíbias dos animais no período de 15 dias: grupo controle (C) e tratado (E1 e E2).

### 5.2.2 Período de 30 dias

No grupo controle e no grupo tratado E1 a área do defeito ósseo apresentou limites irregulares com aumento da radiopacidade nas bordas do defeito. No grupo tratado E2 metade do defeito ósseo exibiu radiopacidade compatível com as áreas adjacentes.

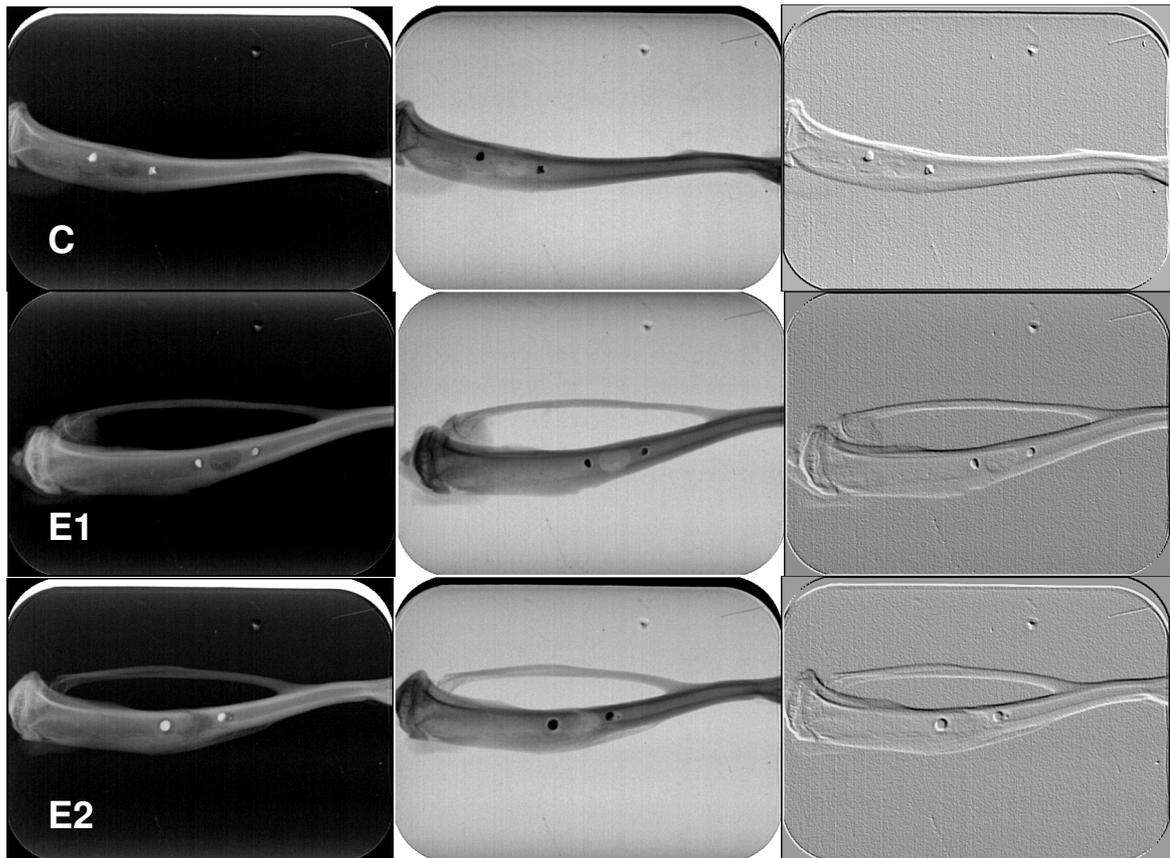


FIGURA 13 – Imagens radiográficas digitais (positiva, negativa e alto relevo) das tíbias dos animais no período de 30 dias: grupo controle (C) e tratado (E1 e E2).

### 5.2.3 Período de 60 dias

No grupo controle, notou-se maior radiopacidade principalmente nas bordas do defeito compatível com o tecido ósseo circundante. No grupo tratado E1 a loja cirúrgica apresentou-se irregular, sendo quase totalmente preenchido com material radiopaco semelhante à das áreas adjacentes. No grupo tratado E2 não foi possível delimitar o defeito ósseo.

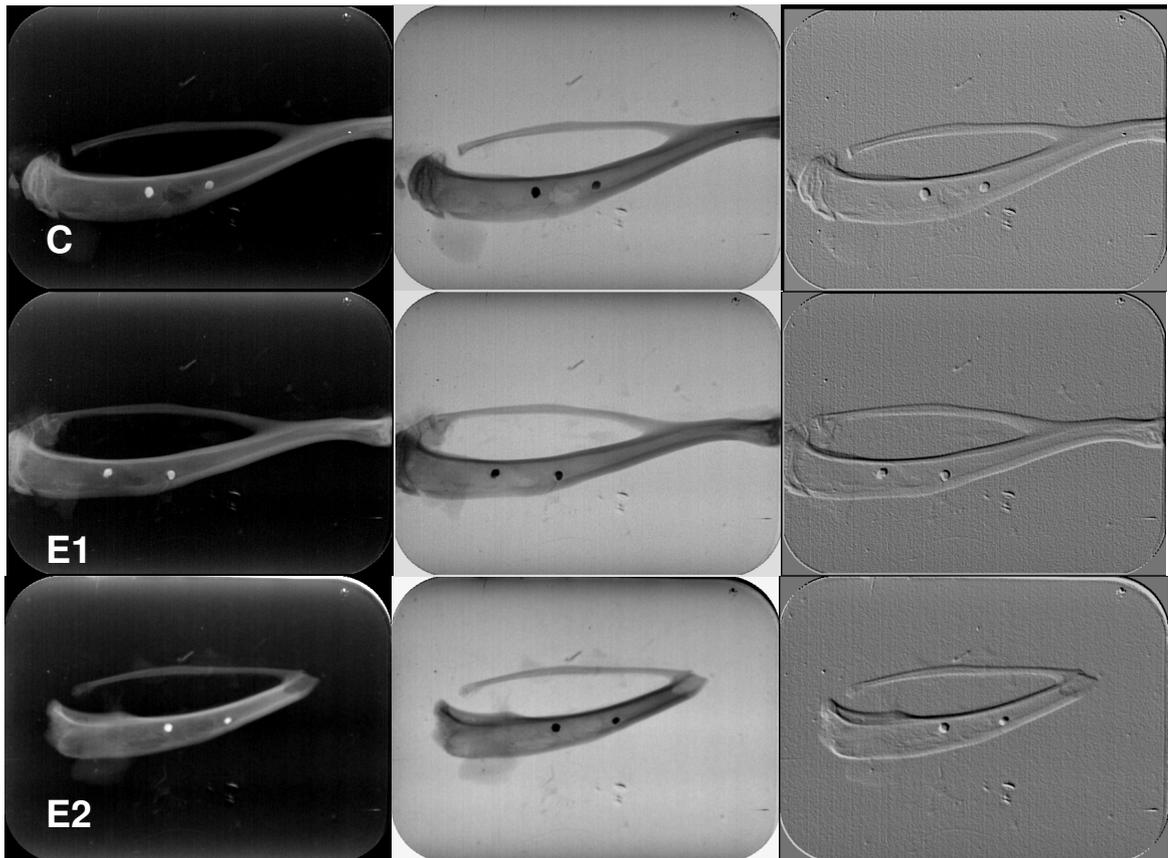


FIGURA 14 – Imagens radiográficas digitais (positiva, negativa e alto relevo) das tíbias dos animais no período de 60 dias: grupo controle (C) e tratado (E1 e E2).

#### 5.2.4 Período de 90 dias

Em todos os grupos foi difícil delimitar a área do defeito ósseo. No grupo controle, ainda notou-se discretas áreas radiolúcidas no interior da loja cirúrgica, porém o defeito foi de difícil delimitação. Já nos grupos tratados E1 e E2 a densidade óssea permaneceu homogênea ao longo de toda a tíbia.

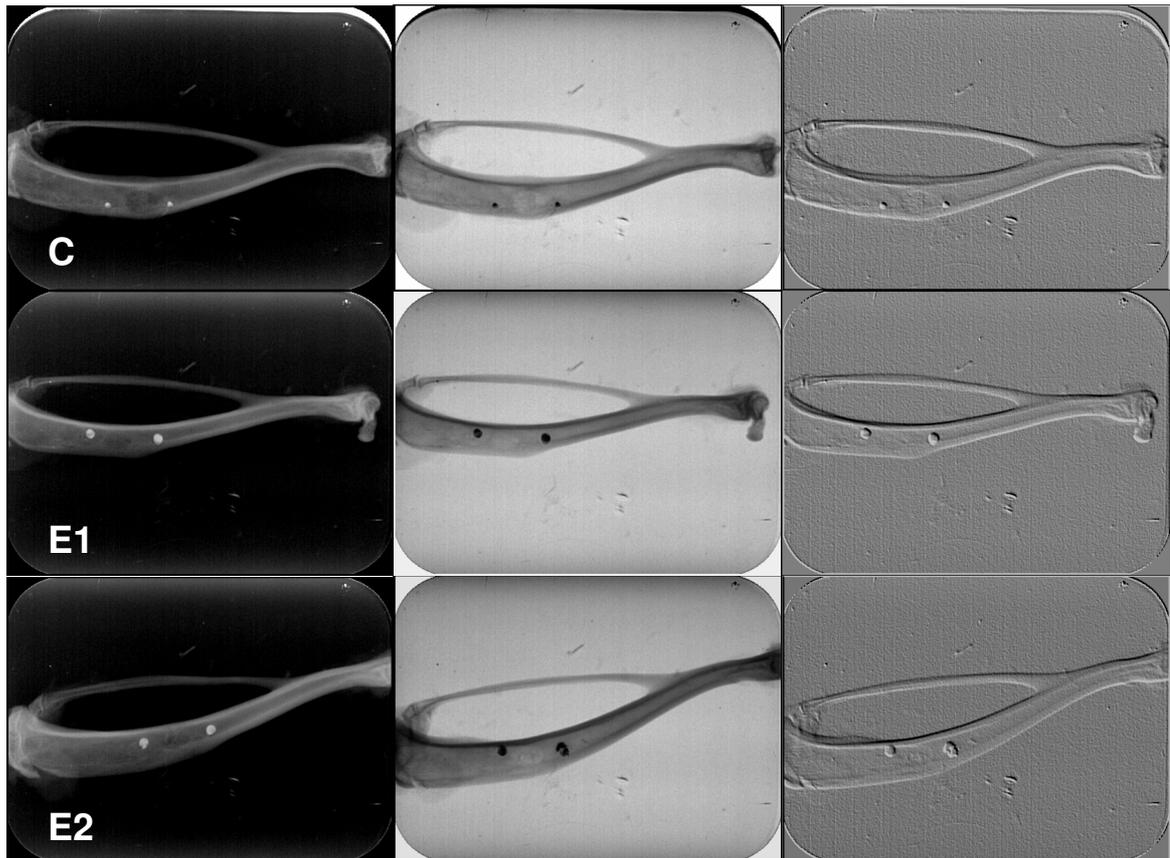


FIGURA 15 – Imagens radiográficas digitais (direta, negativa e alto relevo) das tíbias dos animais no período de 90 dias: grupo controle (C) e tratado (E1 e E2).

TABELA 2 – Valores das densidades radiográficas obtidas no sistema Digora presentes nas imagens digitalizadas do controle (C1) e grupos tratados (E1- polímero/ E2- polímero + dentina) durante os períodos de 15 e 30 dias. Dm: densidade mínima; DM: densidade máxima; SD: desvio padrão.

<b>Animais</b>	<b>Dm</b>	<b>DM</b>	<b>Média</b>	<b>SD</b>
1 - Rato 01 C1 15	62	103	82	6,79
2 - Rato 02 C1 15	75	118	96	8,27
3 - Rato 03 C1 15	72	104	89	6,42
4 - Rato 04 C1 15	77	102	89	3,61
5 - Rato 05 C1 15	54	73	64	2,93
<b>Média</b>	<b>68</b>	<b>100</b>	<b>84</b>	<b>5,60</b>
6 - Rato 01 E1 15	70	111	89	9,25
7 - Rato 02 E1 15	95	131	118	5,94
8 - Rato 03 E1 15	80	112	91	3,95
9 - Rato 04 E1 15	84	115	99	4,96
10-Rato 05 E1 15	64	112	88	7,81
<b>Média</b>	<b>79</b>	<b>116</b>	<b>97</b>	<b>6,38</b>
11-Rato 01 E2 15	74	110	93	6,08
12-Rato 02 E2 15	79	112	93	5,67
13-Rato 03 E2 15	60	99	80	7,49
14-Rato 04 E2 15	78	119	100	8,21
15-Rato 05 E2 15	78	114	94	7,55
<b>Média</b>	<b>74</b>	<b>111</b>	<b>92</b>	<b>7,00</b>
16-Rato 01 C1 30	67	106	83	4,91
17-Rato 02 C1 30	75	94	86	2,49
18-Rato 03 C1 30	75	108	90	5,10
19-Rato 04 C1 30	65	118	84	8,87
20-Rato 05 C1 30	71	116	90	5,28
<b>Média</b>	<b>71</b>	<b>108</b>	<b>87</b>	<b>5,33</b>
21-Rato 01 E1 30	75	110	91	5,18
22-Rato 02 E1 30	88	124	106	5,95
23-Rato 03 E1 30	92	124	110	5,22
24-Rato 04 E1 30	89	117	103	5,70
25-Rato 05 E1 30	58	91	75	4,99
<b>Média</b>	<b>80</b>	<b>113</b>	<b>97</b>	<b>5,41</b>
26-Rato 01 E2 30	68	115	85	4,66
27-Rato 02 E2 30	70	111	92	8,05
28-Rato 03 E2 30	101	139	118	6,70
29-Rato 04 E2 30	69	111	91	8,53
30-Rato 05 E2 30	65	102	83	5,73
<b>Média</b>	<b>75</b>	<b>116</b>	<b>94</b>	<b>6,73</b>

TABELA 3 – Valores das densidades radiográficas obtidas no sistema Digora presentes nas imagens digitalizadas do controle (C1) e grupos tratados (E1- polímero/ E2- polímero + dentina) durante os períodos de 60 e 90 dias. Dm: densidade mínima; DM: densidade máxima; SD: desvio padrão.

<b>Animais</b>	<b>Dm</b>	<b>DM</b>	<b>Média</b>	<b>SD</b>
31-Rato 01 C1 60	76	144	104	11,90
32-Rato 02 C1 60	58	87	70	4,00
33-Rato 03 C1 60	62	91	76	6,15
34-Rato 04 C1 60	81	112	91	3,55
35-Rato 05 C1 60	62	91	74	4,17
<b>Média</b>	<b>68</b>	<b>105</b>	<b>83</b>	<b>5,95</b>
36-Rato 01 E1 60	67	100	81	5,03
37-Rato 02 E1 60	63	99	78	5,08
38-Rato 03 E1 60	71	100	88	2,98
39-Rato 04 E1 60	70	100	83	5,94
40-Rato 05 E1 60	66	90	76	4,93
<b>Média</b>	<b>67</b>	<b>98</b>	<b>81</b>	<b>4,79</b>
41-Rato 01 E2 60	72	105	82	3,63
42-Rato 02 E2 60	74	103	84	3,96
43-Rato 03 E2 60	67	91	76	2,95
44-Rato 04 E2 60	29	79	52	6,45
45-Rato 05 E2 60	77	105	90	3,60
<b>Média</b>	<b>64</b>	<b>97</b>	<b>77</b>	<b>4,12</b>
46-Rato 01 C1 90	52	106	73	9,65
47-Rato 02 C1 90	76	105	89	4,65
48-Rato 03 C1 90	70	101	82	4,48
49-Rato 04 C1 90	51	85	63	5,02
50-Rato 05 C1 90	85	113	99	5,21
<b>Média</b>	<b>67</b>	<b>102</b>	<b>81</b>	<b>5,80</b>
51-Rato 01 E1 90	78	106	92	3,77
52-Rato 02 E1 90	78	110	94	5,88
53-Rato 03 E1 90	71	113	87	8,34
54-Rato 04 E1 90	86	130	107	6,85
55-Rato 05 E1 90	74	97	84	4,67
<b>Média</b>	<b>77</b>	<b>111</b>	<b>92</b>	<b>5,90</b>
56-Rato 01 E2 90	76	99	88	3,91
57-Rato 02 E2 90	84	118	99	4,98
58-Rato 03 E2 90	79	109	95	4,60
59-Rato 04 E2 90	72	101	86	5,56
60-Rato 05 E2 90	73	116	92	6,46
<b>Média</b>	<b>77</b>	<b>109</b>	<b>92</b>	<b>5,10</b>

O software do Sistema Digora, determina níveis de cinza que variam de 0 (preto) a 255 (branco), com 254 tons intermediários de cinza que se convencionou denominar de densidade radiográfica (TAVANO et al.,1999). Os valores da densidade radiográfica, médias aritméticas dos resultados dos 5 animais dos grupos tratados (E1 e E2) aumentaram gradativamente durante os períodos 15 dias a 90 dias, em relação ao grupo controle, tendo os valores dos níveis de cinza uma variação que foi de 77 a 97.

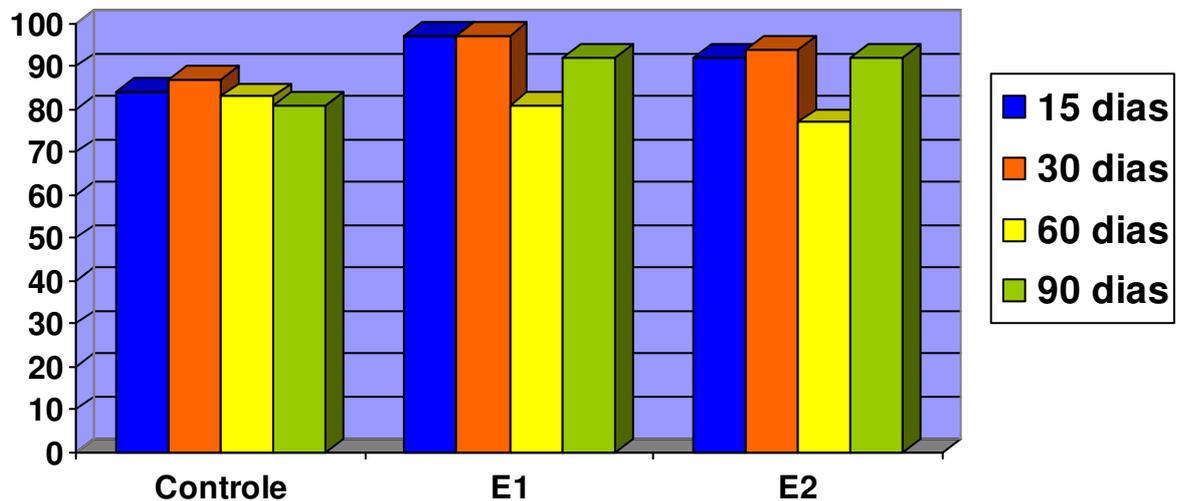


GRÁFICO 1 – Médias das densidades radiográficas obtidos pelo Sistema Digora nos grupos controle e tratado (E1 e E2).

### **5.3 Análise Microscópica**

A descrição dos achados microscópicos do processo de regeneração óssea na tíbia dos ratos foi elaborada buscando-se ressaltar as diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados (E1 e E2). Os valores usados nos gráficos são das médias aritméticas dos escores dados por três examinadores, sendo todos, professores de histologia, para as características histológicas de cada grupo (5 ratos) para cada período (15, 30, 60 e 90 dias).

#### **5.3.1 Período de 15 dias**

No grupo controle, observou-se que o defeito ósseo cirúrgico foi preenchido por bastante tecido mesenquimal osteogênico principalmente na região central do defeito. As trabéculas ósseas de tecido ósseo primário apresentavam-se finas e entrelaçadas, com espaços medulares amplos e celularizados sendo revestido por osteoblastos. O canal medular encontra-se preenchido também por trabéculas ósseas anastomosadas.

No grupo tratado E1, pode-se perceber que a loja cirúrgica foi preenchida por uma estreita faixa de tecido ósseo de espessura menor que da cortical anterior ao defeito, com trabéculas ósseas imaturas. Os limites da borda óssea permaneceram nítidos.

O grupo tratado E2, a região do defeito mostrou-se com uma maior quantidade de trabéculas ósseas imaturas bem entrelaçadas preenchendo o defeito e uma evidente atividade osteogênica principalmente em torno da partícula de dentina desmineralizada, com ausência de infiltrado inflamatório.

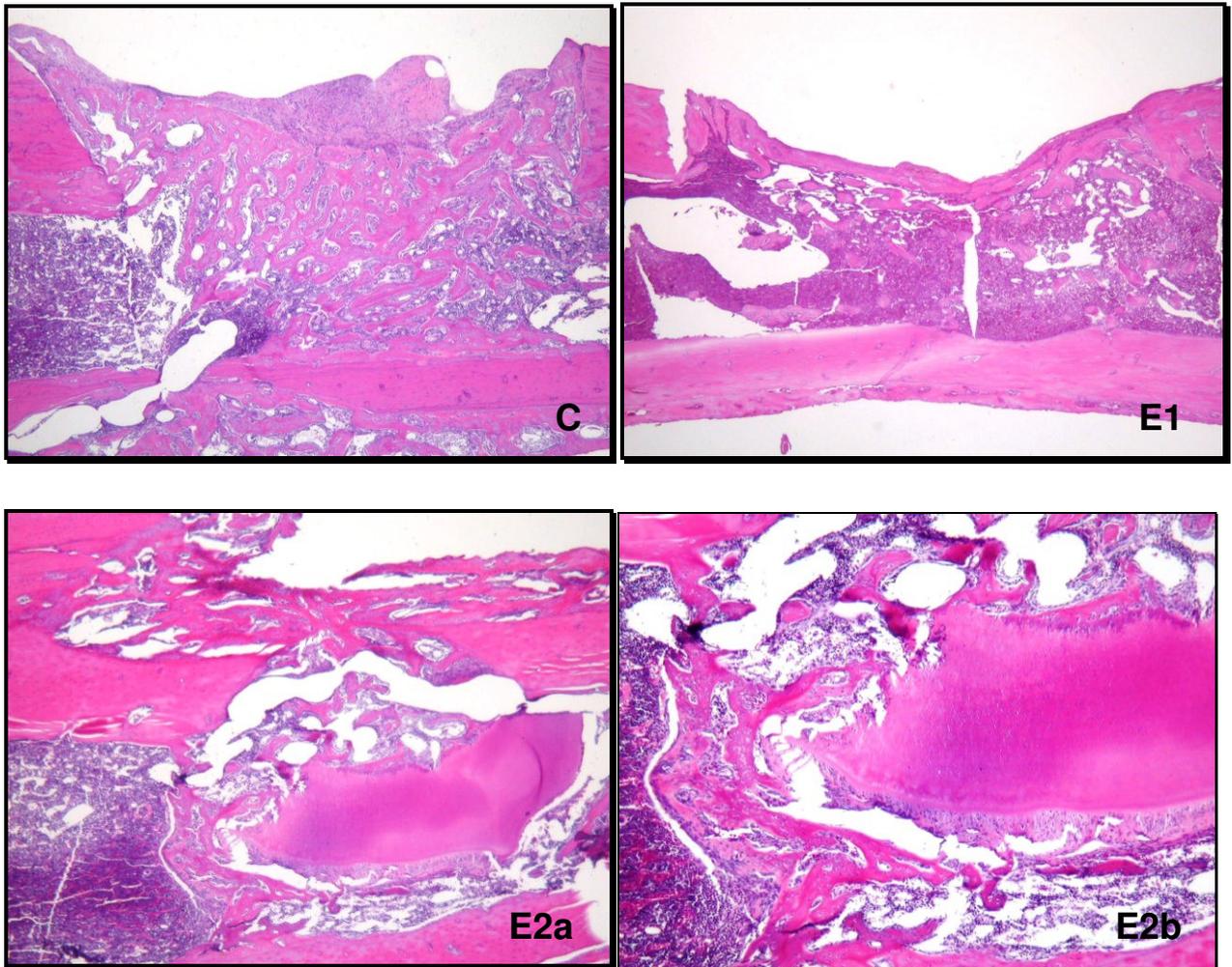


FIGURA 16 – Grupo controle (C) – 15 dias: Trabéculas ósseas finas e entrelaçadas com abundante tecido mesenquimal no centro de defeito; Grupo tratado (E1) – 15 dias: Trabeculado ósseo fino preenchendo o defeito; Grupo tratado (E2a) – 15 dias: Trabéculas ósseas imaturas entrelaçadas preenchendo o defeito. Aumento 2x. Grupo tratado (E2b) – 15 dias: Evidente atividade osteogênica em torno da partícula de dentina desmineralizada. Aumento 5x. HE.

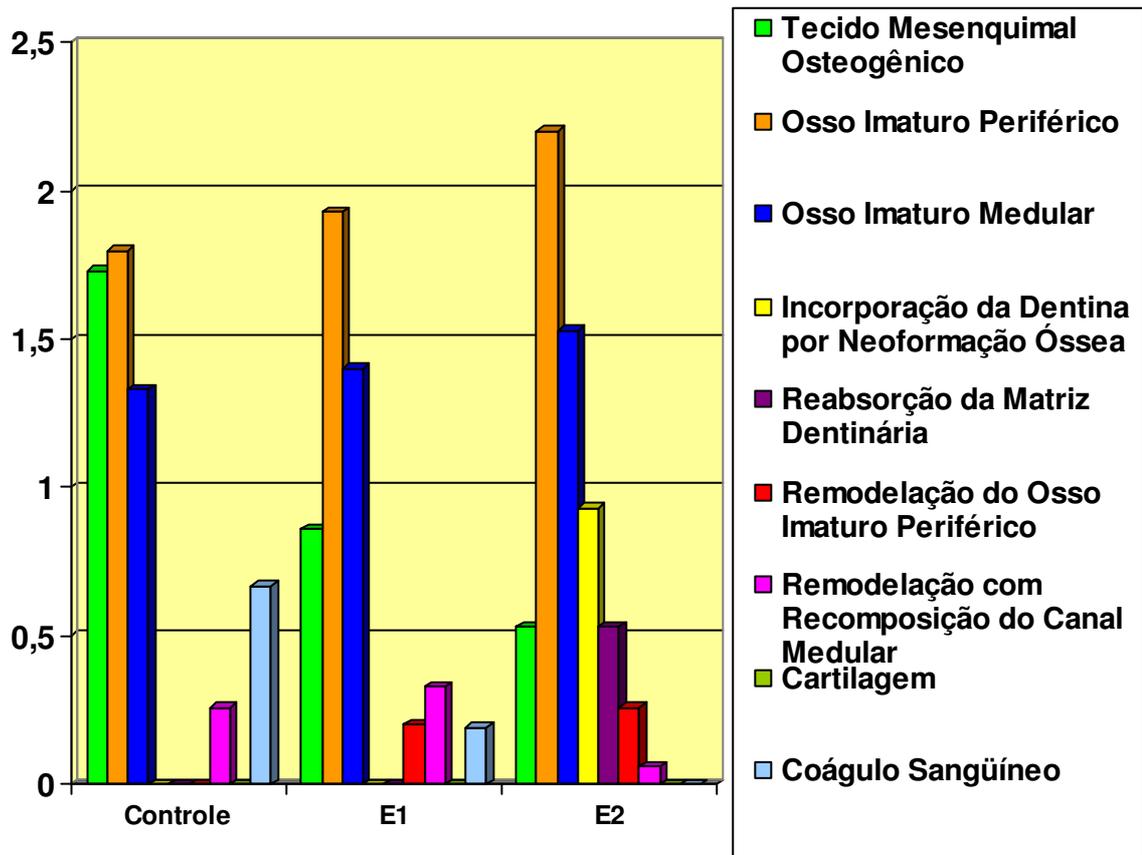


GRÁFICO 2 – Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupos tratados (E1 e E2) no período de 15 dias.

### 5.3.2 Período de 30 dias

No grupo controle, o tecido mesenquimal osteogênico é muito evidente em todo a loja cirúrgica. O tecido ósseo apresenta as fibras colágenas desorganizadas com trabéculas ósseas imaturas e trançadas principalmente próximas ao canal medular. Dentro do canal foram observadas trabéculas ósseas menos numerosas quando comparadas com as da região periférica do defeito.

No grupo tratado E1, a superfície do defeito ósseo apresentou uma faixa de tecido ósseo com trabéculas ósseas imaturas, mais compactada com pequenos espaços medulares e com a metade da espessura da cortical original. É possível observar abundante matriz osteóide hialina e eosinófila que se distribui entre o trabeculado ósseo. Metade do defeito ósseo foi preenchido por medula óssea.

No grupo tratado E2, o trabeculado ósseo neoformado apresentou-se imaturo com pequenos espaços medulares e com espessura menor que na cortical original, estendendo-se para a porção central do defeito. Observou-se que a partícula de matriz dentinária alogênica foi circundada por tecido ósseo primário com intensa atividade osteogênica. Em algumas áreas observa-se discreta reabsorção na matriz dentinária.

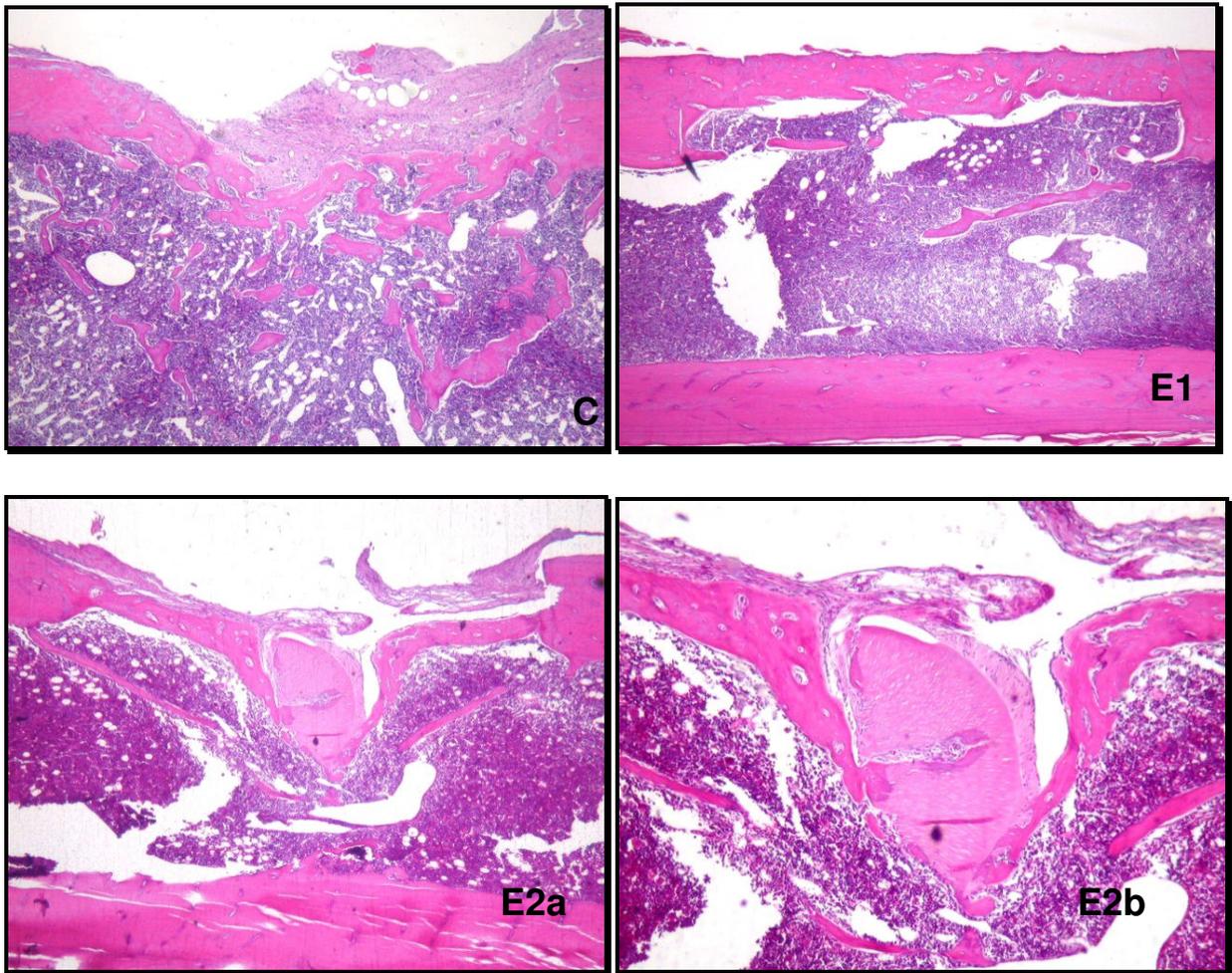


FIGURA 17 – Grupo controle (C) – 30 dias: Trabéculas ósseas imaturas e irregulares principalmente próximo ao canal medular e bastante tecido mesenquimal osteogênico preenchendo o defeito; Grupo tratado (E1) – 30 dias: Trabéculas ósseas imaturas com poucos espaços medulares preenchendo todo o defeito; Grupo tratado (E2a) – 30 dias: Trabéculas ósseas imaturas estendendo-se para a região central do defeito. Aumento 2x. Grupo tratado (E2a) – 30 dias: Matriz dentinária alogênica circundada por tecido ósseo com intensa atividade osteogênica. Aumento 5x. HE.

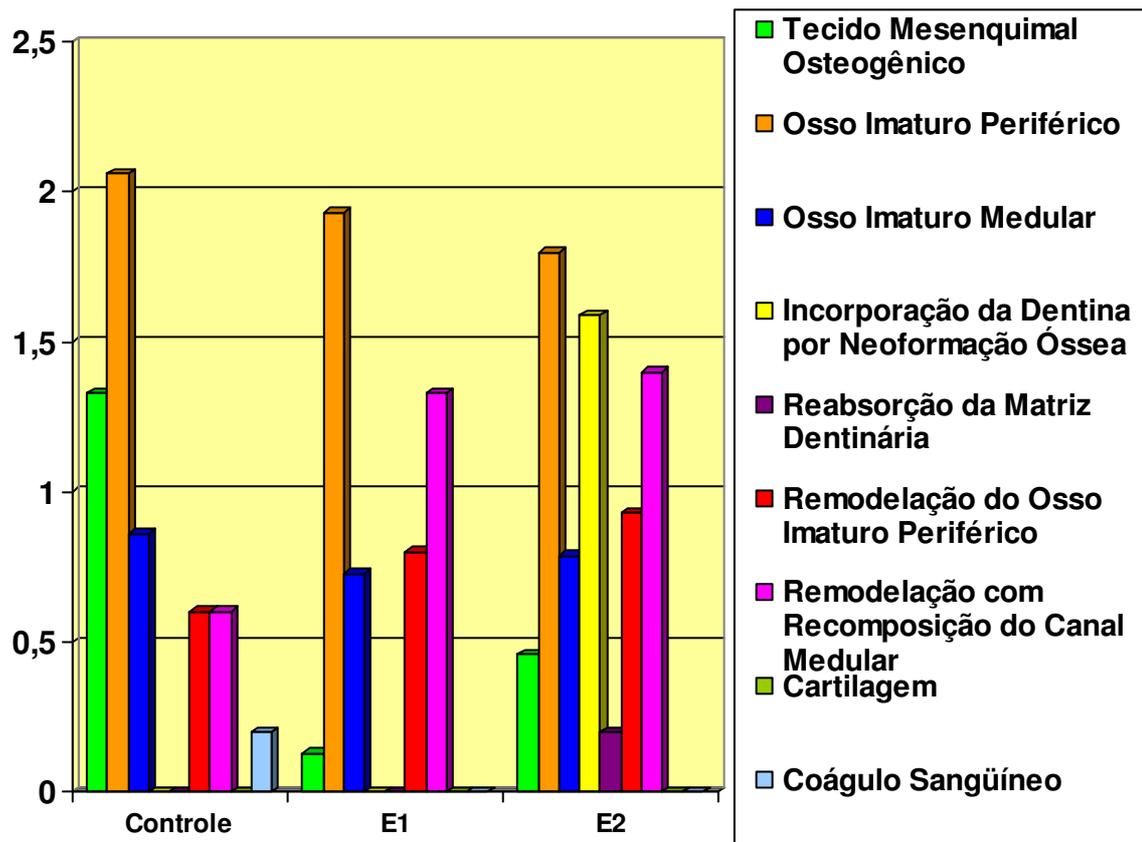


GRÁFICO 3 – Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupos tratados (E1 e E2) no período de 30 dias.

### 5.3.3 Período de 60 dias

No grupo controle, a loja cirúrgica encontrou-se preenchida por tecido ósseo neoformado com trabéculas ósseas maduras e imaturas e com espessura um pouco menor que da cortical original. Uma pequena área do defeito ainda é preenchida por medula óssea.

No grupo tratado E1, o tecido ósseo neoformado maduro ligeiramente lamelar, atingiu a espessura e a distribuição semelhantes às do tecido ósseo envolvente, sendo difícil reconhecer o limite do defeito ósseo. Houve recomposição do canal medular, apesar de ainda ser visíveis pequenas trabéculas ósseas no seu interior.

No grupo tratado E2, a matriz dentinária desmineralizada alógena foi completamente incorporada por tecido ósseo neoformado com características lamelares e com grande quantidade de osteócitos em lacunas no interior da matriz óssea e linhas cementantes basofílicas de aposição. As linhas cementantes delimitam os sistemas de Havers em formação, sendo visíveis canais de Havers amplos. Houve recomposição do canal medular.

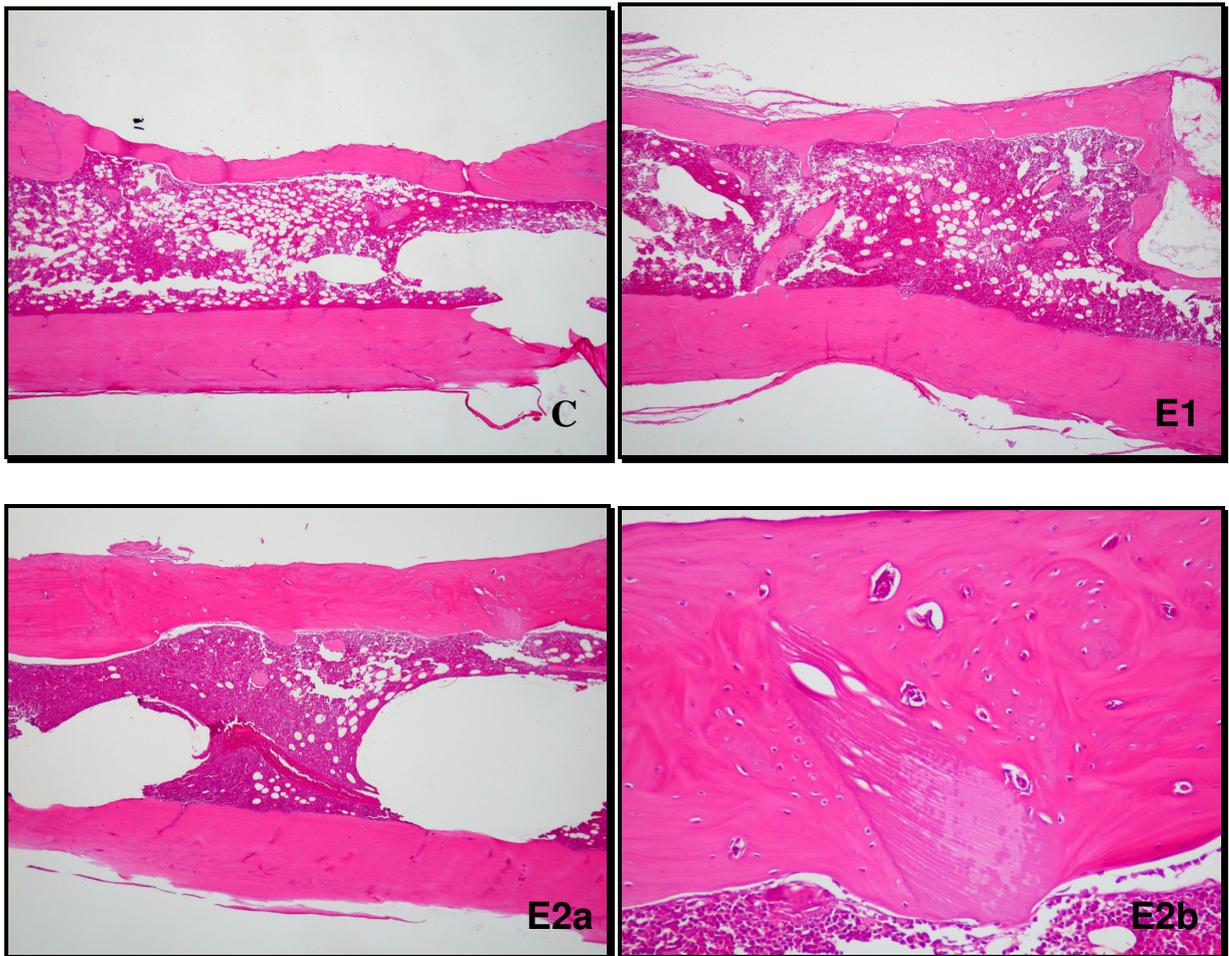


FIGURA 18 – Grupo controle (C) – 60 dias: Loja cirúrgica com trabéculas ósseas maduras e imaturas e com espessura um pouco menor que da cortical original; Grupo tratado (E1) – 60 dias: Tecido ósseo neoformado maduro ligeiramente lamelar com espessura semelhante ao original; Grupo tratado (E2a) – 60 dias: A área do defeito ósseo foi totalmente preenchida por tecido ósseo lamelar. Aumento 2x. Grupo tratado (E2b) – 60 dias: Detalhe da matriz dentinária desmineralizada alógena completamente incorporada por tecido ósseo neoformado maduro. Aumento 5x. HE.

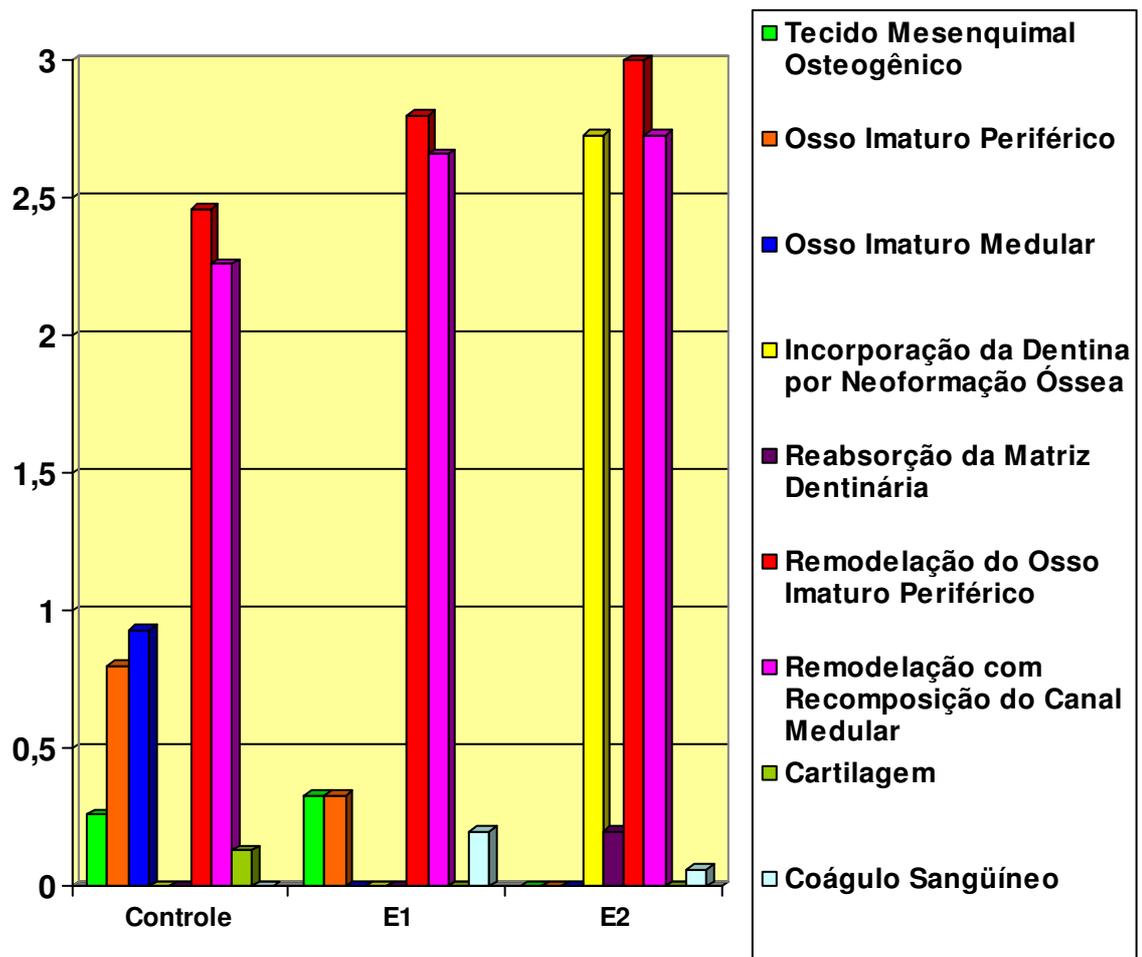


GRÁFICO 4 – Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupos tratados (E1 e E2) no período de 60 dias.

#### **5.3.4 Período de 90 dias**

No grupo controle, observou-se tecido ósseo, maduro, lamelar, com espessura menor em relação as corticais adjacentes. Houve dificuldade na delimitação da cavidade cirúrgica que se igualou ao tecido ósseo envolvente. Foi bem evidente a recomposição o canal medular.

No grupo tratado E1, o defeito ósseo foi completamente preenchido com osso maduro de aparência lamelar. Células sangüíneas hematopoiéticas e células adiposas constituem o espaço medular que se tornou bem delimitado.

No grupo tratado E2, o defeito ósseo foi totalmente preenchido por tecido ósseo maduro, lamelar, com presença de lamelas circunferenciais bem definidas e formação de ósteons secundários. As fatias de dentina desmineralizada alógena foram totalmente incorporadas pelo tecido ósseo neoformado, tornando-se quase indistinguível do osso envolvente.

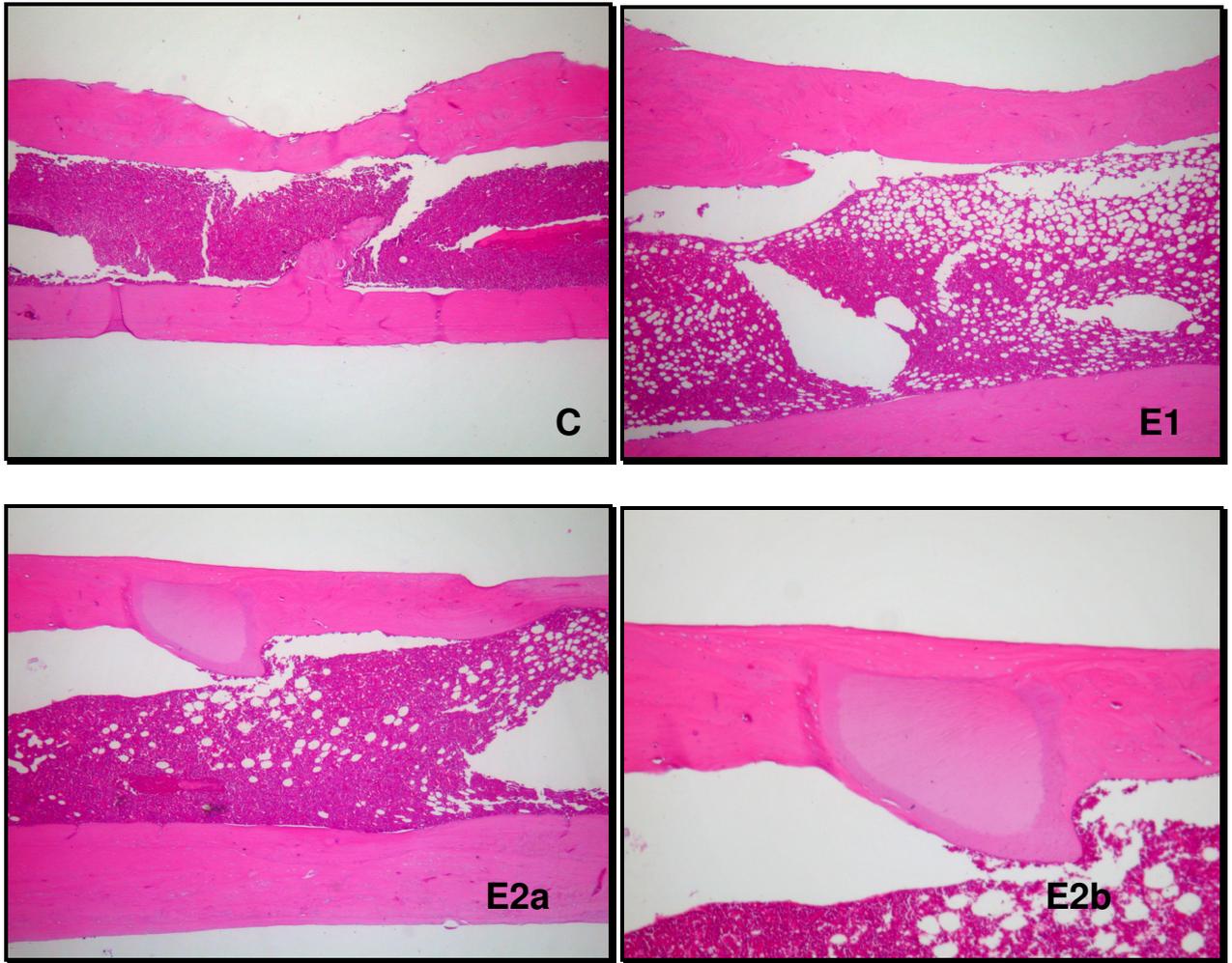


FIGURA 19 – Grupo controle (C) – 90 dias: Tecido ósseo, maduro, lamelar, com espessura menor em relação as corticais adjacentes; Grupo tratado (E1) – 90 dias: O defeito ósseo foi completamente preenchido com osso maduro de aparência lamelar; Grupo tratado (E2a) – 90 dias: Defeito ósseo totalmente preenchido por tecido ósseo maduro, lamelar, com presença de lamelas circunferenciais bem definidas. Aumento 2x. Grupo tratado (E2b) – 90 dias: Fatia de dentina desmineralizada alógena totalmente incorporadas pelo tecido ósseo neoformado . Aumento 5x. HE.

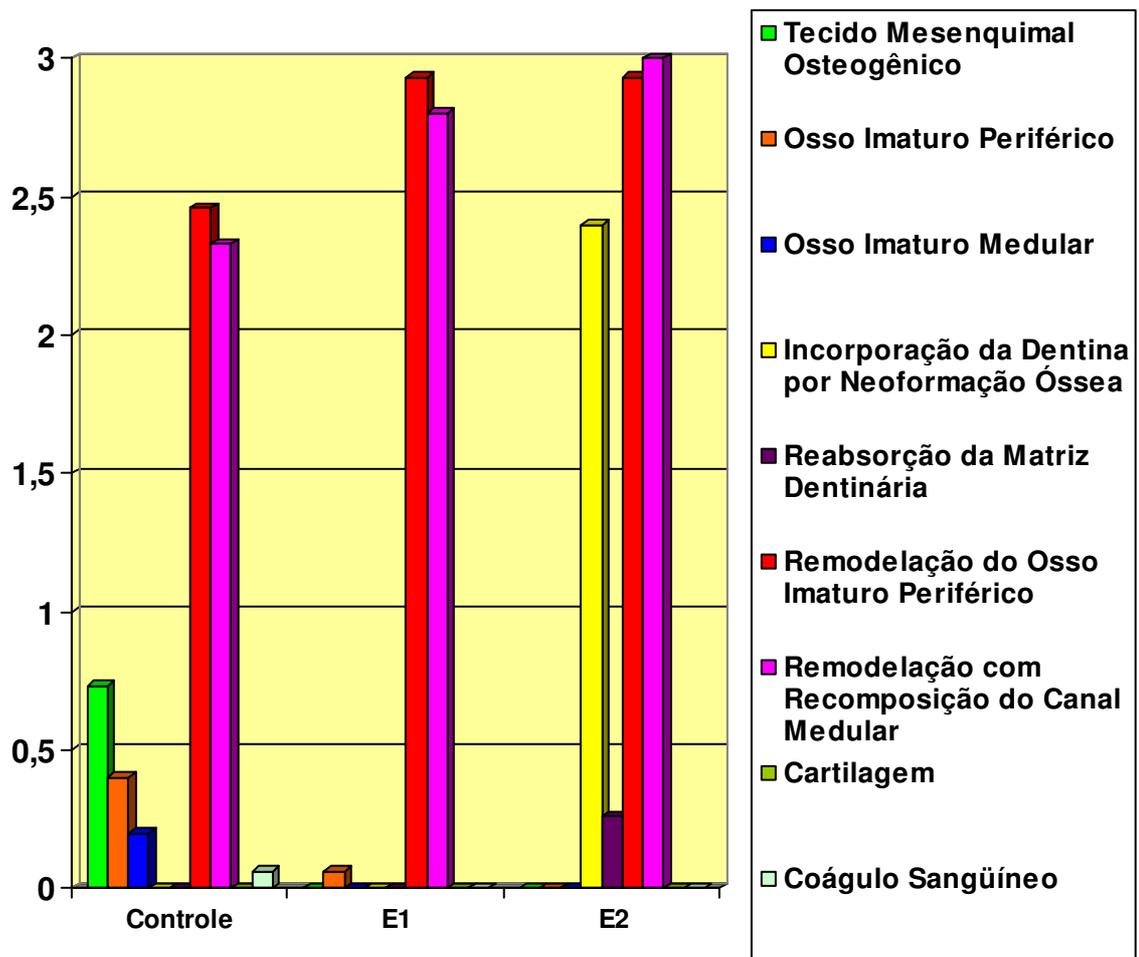


GRÁFICO 5 – Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupos tratados (E1 e E2) no período de 90 dias.

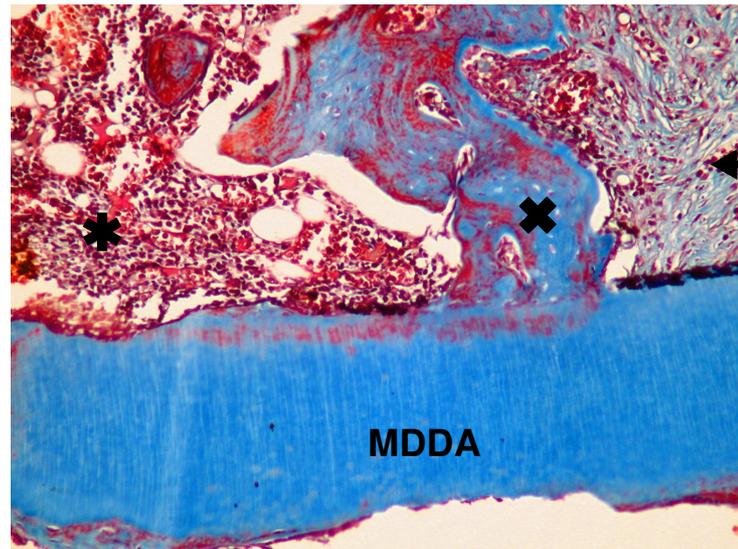


FIGURA 20 – Grupo tratado (E2) 15 dias: partícula de matriz dentinária desmineralizada alogênica (**MDDA**) circundada por medula óssea (\*), tecido ósseo imaturo (x) e células osteogênicas ativas (◄). Tricrômico de Mallory. 100x.

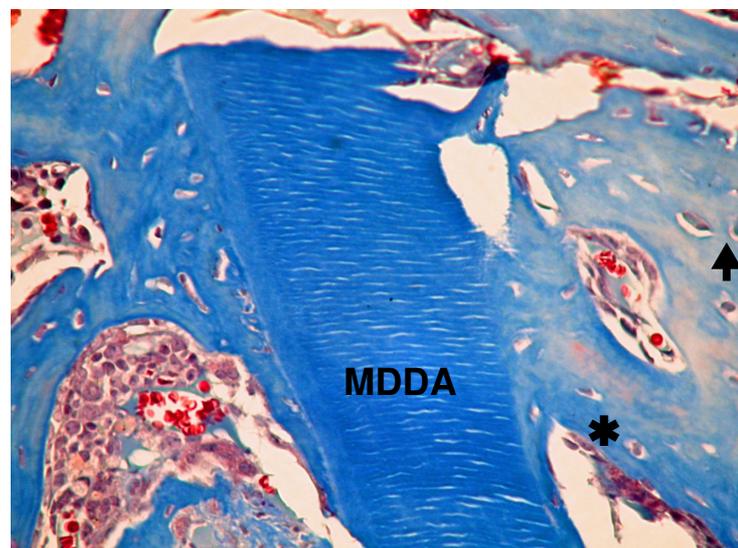


FIGURA 21 – Grupo tratado (E2) 30 dias: deposição de matriz óssea por células com perfil osteoblástico (\*) ao redor da matriz dentinária desmineralizada alogênica (**MDDA**) e osteócito em lacunas (▲). Tricrômico de Mallory. 100x.

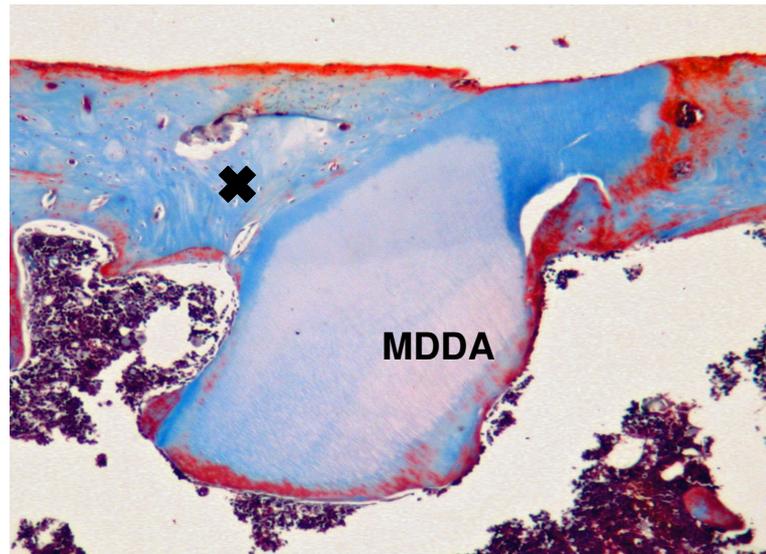


FIGURA 22 – Grupo tratado (E2) 60 dias: aspecto histológico da partícula de matriz dentinária desmineralizada alôgênica (**MDDA**) incorporada ao tecido ósseo em remodelação (✕). Tricrômico de Mallory. 100x.

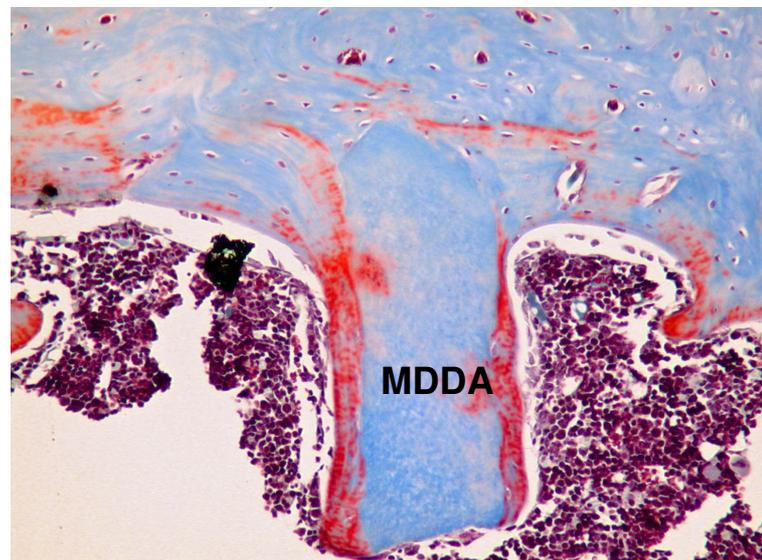


FIGURA 23 – Grupo tratado (E2) 90 dias: partículas de dentina desmineralizada alôgênica (**MDDA**) com superfície regular, pouco sinal de reabsorção e incorporada por tecido ósseo maduro. Tricrômico de Mallory. 100x.

## 5.4 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica teve como finalidade mensurar a área de matriz óssea neoformada, tecido conjuntivo e medula óssea nos defeitos ósseos dos grupos controle e tratado (E1 e E2), bem como fornecer os dados necessários à análise estatística destas medições através do teste de variância ANOVA.

TABELA 4 – Distribuição das médias da área de tecido ósseo de acordo com os grupos controle e tratado (E1 e E2) nos períodos do experimento.

Período (dias)	Grupo controle		Grupo E1		Grupo E2	
	Média (%)	dp	Média (%)	dp	Média (%)	dp
15	0.513	0.152	0.629	0.214	0.662	0.109
30	0.504	0.213	0.557	0.127	0.579	0.165
60	0.501	0.104	0.512	0.046	0.538	0.101
90*	0.405	0.080	0.548	0.073	0.679	0.040

dp: desvio padrão

\* grupo controle  $\neq$  E1 com  $p=0.016$ / grupo controle  $\neq$  E2 com  $p=0.000$ / grupo E1  $\neq$  E2 com  $p=0.029$

A tabela 4 mostra uma evolução nos valores médios da área de matriz óssea, expressos em porcentagem, dentro de cada período, ao longo dos grupos analisados. De acordo com os dados, referentes à análise de variância (ANOVA) houve diferença estatisticamente significativa da área de matriz óssea neoformada entre os grupos estudados no período de 90 dias.

TABELA – 5 Distribuição das médias da área de tecido conjuntivo de acordo com os grupos controle e tratado (E1 e E2) nos períodos do experimento.

Período (dias)	Grupo controle		Grupo E1		Grupo E2	
	Média (%)	dp	Média (%)	dp	Média (%)	dp
15*	0.339	0.133	0.014	0.020	0.078	0.122
30	0.139	0.190	0.033	0.073	0.072	0.098
60	0.534	0.119	0.035	0.080	0.000	0.000
90	0.082	0.115	0.000	0.000	0.000	0.000

dp: desvio padrão

\*grupo controle  $\neq$  E1 com  $p=0.01$ / grupo controle  $\neq$  E2 com  $p=0.006$

Baseado nos valores da tabela 5 constatou-se diferença significativa com relação à presença de tecido conjuntivo entre o grupo controle e os grupos tratados (E1 e E2) com 15 dias, no entanto não foi observada diferença significativa entre o grupo E1 e E2 no mesmo período.

TABELA 6 – Distribuição das médias da área de medula óssea de acordo com os grupos controle e tratado (E1 e E2) nos períodos do experimento.

Período (dias)	Grupo controle		Grupo E1		Grupo E2	
	Média (%)	dp	Média (%)	dp	Média (%)	dp
15	0.146	0.049	0.356	0.227	0.259	0.090
30	0.356	0.178	0.409	0.113	0.348	0.132
60	0.445	0.189	0.451	0.064	0.461	0.101
90*	0.512	0.147	0.451	0.073	0.321	0.040

dp: desvio padrão

\*grupo controle  $\neq$  E2 com  $p=0.028$

De acordo com a tabela 6 pôde-se evidenciar uma progressão das médias da área da medula óssea mensurada no decorrer dos períodos analisados. Porém observou-se que houve diferença significativa apenas entre os grupos controle e o tratado E2 no período de 90 dias.

**DISCUSSÃO**

---

## 6 – DISCUSSÃO

No presente trabalho, o modelo animal utilizado para o estudo da regeneração óssea foi o rato, que embora tenha algumas particularidades e diferenças quando comparado com o processo de regeneração em humanos, principalmente no que diz respeito ao alto potencial osteogênico, é de fácil manejo e pouco se encontra na literatura trabalhos envolvendo a associação da técnica da regeneração óssea guiada induzida por dentina alogênica em roedores. Foi evitado o uso de fêmeas devido à influência de fatores hormonais que poderiam interferir nos resultados obtidos.

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos. Em organismos superiores, o reparo de tecidos pode se dar de duas formas: (1) pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou (2) pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido com perda da sua atividade funcional pela formação de uma cicatriz fibrótica. No caso de tecido ósseo este reparo acontece normalmente por regeneração onde a neoformação óssea apresenta uma organização estrutural semelhante com a original (CATANZARO GUIMARÃES, 1982; SCHENK, 2000).

Qualquer lesão óssea como fratura, defeito ou fixação de implantes pode ativar a liberação de fatores de crescimento e indutores, sendo que esses fenômenos biomeleculares estão associados com o processo da regeneração óssea. Durante a formação da loja cirúrgica, vasos sangüíneos são rompidos e uma hemorragia localizada preenche a loja cirúrgica resultando na formação de um coágulo sangüíneo. As plaquetas e a matriz extracelular da área danificada liberam fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fatores de crescimento dos

fibroblastos (FGF) e fatores de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ), que atuam como fatores quimiotáticos e reguladores da atividade celular. Nesse estágio o TGF- $\beta$  estimula o recrutamento e a proliferação de células mesenquimais, condroblastos e células osteoprogenitoras (FERNANDES, 1998; RAMOSHEBI, 2002).

Nos resultados das análises macroscópica e radiográfica foi evidenciada uma neoformação óssea inicial nas bordas do defeito ósseo em todos os grupos no decorrer dos períodos como mostra as figuras 9 e 13. O processo de ossificação intramembranosa começa devido à agregação de células mesenquimais e osteoprogenitoras principalmente nas bordas do defeito (GONÇALVES, 1997). Estas células se hipertrofiam, assumindo perfil fenotípico de osteoblastos, que sintetizam a matriz orgânica rica em colágeno tipo I, que posteriormente se mineraliza. A riqueza de células fonte mesenquimais encontradas na medula óssea, onde está o assoalho do defeito ósseo, explicaria a rapidez do reparo ósseo neste estudo. Em condições estáveis, o osso é formado direta ou primariamente, pois as margens ósseas do defeito fornecem uma base sólida para a deposição óssea.

O principal obstáculo para o sucesso do processo regenerativo ósseo é o rápido crescimento de tecido conjuntivo cicatricial que invade a loja cirúrgica, onde as células do tecido conjuntivo, principalmente fibroblastos, proliferam mais rapidamente que as células osteoprogenitoras responsáveis pela neoformação óssea. Esta rapidez na proliferação celular define a qualidade da regeneração óssea (DAHLIN, 1996). Portanto, a utilização de membranas oclusivas evita a invasão altamente proliferante dos fibroblastos permitindo assim um intervalo de tempo maior para que as células osteoprogenitoras repovoem com eficiência a área do defeito e promovam a neoformação óssea.

O uso de vários tipos de membrana oclusivas que envolvem a técnica da regeneração óssea guiada, como as membranas não-biológicas de Teflon (KAHNBERG, 1979), de politetrafluoretileno expandida (SIMION, 1996; GOMES, 1998), e as biológicas, como as de colágeno (PITARU et al., 1987), de dura-máter desidratada (FONTANA et al., 1994) e membrana amniótica humana (GOMES, 1998), têm sido amplamente relatado em trabalhos de pesquisas. No presente trabalho foi utilizada uma membrana oclusiva de origem vegetal derivada do óleo da mamona por ser biocompatível (BELMONTE, 2001; LEONEL et al. 2004), de fácil adaptação no modelo cirúrgico, baixo custo e por apresentar uma longevidade a fim de assegurar a função de barreira por tempo adequado sem ser reabsorvida.

Os resultados da análise microscópica dos grupos estudados mostram que no grupo controle a presença de tecido conjuntivo mesenquimal é bem mais evidente que nos grupos tratados nos períodos de 15 e 30 dias (figuras 16C e 17C). Esses dados foram confirmados na análise histomorfométrica que mostrou uma diferença significativa com relação à presença de tecido conjuntivo entre o grupo controle e os grupos tratados (E1 e E2) com 15 dias (tabela 5), evidenciando o papel osteopromotor da membrana de poliuretano no contexto da regeneração óssea guiada, confirmando os relatos feitos por BELMONTE (2005).

Com o objetivo de acelerar a resposta da regeneração óssea em cirurgias reconstrutivas, tem-se utilizado materiais osteoindutores de ação local como, por exemplo, a matriz óssea desmineralizada (BESSHO et al., 1992), a matriz dentinária desmineralizada (CATANZARO-GUIMARÃES et al., 1986; BESSHO et al., 1990; GONÇALVES et al., 2002; GOMES et al., 2001, GOMES, 2002) e ainda alguns fatores de crescimento ósseo (BECKER et al., 1992), sendo a ação destes materiais baseada no aumento da proliferação osteoblástica e da síntese de matriz óssea.

Dentre esses materiais osteoindutores a matriz dentinária desmineralizada alogênica têm mostrado provocar reação antigênica (CARVALHO, 2001; CARVALHO, 2004).

A matriz dentinária alogênica exibe atividade osteoindutora que é comprovada na análise microscópica do grupo tratado E2 com 15 e 30 dias pela condensação de células com perfil osteogênico ao redor das partículas de dentina (figuras 16E2b e 21). Esta atividade osteoindutora da dentina desmineralizada alogênica pode ser explicada pelo fato da matriz orgânica dentinária apresentar um reservatório de fatores indutores da proliferação celular e quimiotaxia como IGF- I e II, TGF- $\beta$  e as BMP's (BESSHO *et al.*, 1992; CATANZARO-GUIMARÃES, 1986). As BMP's são liberadas pelas partículas de dentina desmineralizada induzindo a neoformação óssea através da diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos, que iniciam a deposição de matriz óssea, originando trabéculas ósseas (URIST & STRATES, 1971).

Ainda de acordo com CATANZARO-GUIMARÃES *et al.* (1986), quando substâncias osteoindutoras, como as BMP'S, atuam sobre as células osteoprogenitoras determinadas, ocorre neoformação óssea direta ou ortotópica através de uma ossificação intramembranosa.

A dentina desmineralizada tem obtido excelentes resultados durante o processo de regeneração óssea sob as formas de partículas (GONÇALVES, 2001) ou fatias (CATANZARO-GUIMARÃES, 1976). A ocorrência de grande quantidade de células osteogênicas localizadas sobre as partículas da dentina desmineralizada alogênica, nos períodos de 15 e 30 dias no grupo tratado E2 (figura 20), sugere também que a matriz dentinária enxertada poderia promover uma superfície adequada para fixação das células mesenquimais indiferenciadas, auxiliando na orientação celular, caracterizando sua atividade osteocondutora. Este fato deve-se,

provavelmente, à maior superfície de contato oferecida pelas partículas de dentina desmineralizada alogênica com o tecido osteogênico da região, fornecendo substrato favorável à deposição de matriz óssea (figura 21).. Essa contínua deposição óssea ao redor da dentina faz com que ela seja completamente incorporada no tecido ósseo neoformado, como foi demonstrado na análise microscópica a partir do período de 60 dias (figuras 18E2a e 18E2b).

A imunobiocompatibilidade da matriz dentinária alogênica neste trabalho foi confirmada pela ausência de infiltrado inflamatório e poucas células do tipo clastos envolvendo a dentina desmineralizada alogênica, onde as partículas de dentina mantiveram as superfícies regulares com pouco sinal de reabsorção até o período de 90 dias (figuras 19E2a, 19E2b, 22 e 23). A ausência de rejeição da matriz dentinária evidenciada em nosso trabalho coincide com os resultados de URIST (1971), CATAZARRO GUIMARÃES (1976), GONÇALVES (1997), GOMES (1988), CARVALHO (2001), e ABREU et al. (2004), no entanto, com relação à reabsorção da dentina os resultados obtidos por GOMES (1998) e GONÇALVES (2001) são contrastantes, pois nesses trabalhos ocorreu reabsorção completa da dentina durante o processo de remodelação óssea.

A análise radiográfica digital direta através do sistema Digora, foi utilizada por oferecer melhores condições de visualização, objetividade e precisão para realização da interpretação radiográfica durante a evolução da regeneração óssea nos grupos controle e tratado (E1 e E2), quando se compara aos dados obtidos pelo exame radiográfico convencional e digital indireta (TAVANO, 1999). O exame subjetivo executado nas imagens convencionais do sistema Digora é mais rápido e preciso na busca e análise da imagem, pois determina níveis de cinza em uma

ampla escala (0 a 255 níveis) em comparação com a radiografia periapical (no máximo 32 níveis de cinza).

A melhor qualidade estrutural óssea no grupo tratado E2 está relacionada com o maior grau de organização deste tecido, que apresentou não só uma superioridade qualitativa notória, mas uma superioridade quantitativa em relação aos outros grupos em todos os períodos analisados na análise microscópica, sendo que a área de tecido ósseo neoformado do grupo E2 com 90 dias foi significativa na análise histomorfométrica (tabela 4). Esse fato explica a remodelação da cortical óssea com recomposição do canal medular significativa no mesmo período (figura 19E2a).

Nossos resultados macroscópicos, radiográficos, microscópicos e histomorfométrico concordam que a velocidade do processo de regeneração óssea observada nos grupos tratados (E1 e E2) foi maior que no grupo controle, sendo que no grupo tratado E2 onde no defeito ósseo foram implantadas partículas de matriz dentinária desmineralizada alogênica envolvidos com membrana de poliuretano, foi ainda maior que a velocidade no grupo onde o defeito foi envolvido apenas com membrana de poliuretano. A explicação para esse fato deve-se pela capacidade osteoindutora e osteocondutora da matriz dentinária pela liberação de fatores de crescimento e BMP's que estimulam a migração e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, determinando assim um aumento na velocidade da regeneração óssea.

**CONCLUSÕES**

---

## 7 – CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos aplicando-se a metodologia e com base na revisão de literatura pertinente, pode-se concluir que:

- 1) A membrana de poliuretana exibiu propriedades de osteopromoção favorecendo o processo de neoformação óssea permanecendo na superfície da loja cirúrgica durante todo o período experimental;
- 2) A matriz dentinária desmineralizada alogênica exibiu atividade osteoindutora e osteocondutora estimulando a regeneração óssea de forma direta;
- 3) As partículas de matriz dentinária desmineralizada alogênica foram incorporadas ao osso neoformado, sofrendo pouca reabsorção durante o processo de remodelação e sem provocar reação imunológica.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P. P.; MOROSOLLI, A.; ARAÚJO, M. M.; CARVALHO, V. A. P.; GOMES, M. F. Efeitos da matriz dentinária autógena na reparação alveolar em humanos. **Braz Oral Res**, v. 18, Supplement (Proceedings of the 21nd Annual SBPqO Meeting), 2004.

ALDINGER, G.; HERR, G.; KUSSWETTER, W.; REIS, H. J.; THIELEMANN, F. W.; HOLZ, U. Bone morphogenetic protein: a review. **International Orthopaedics**, Berlin, v.15, n.2, p.169-177, 1991.

BECKER, W. et al. A comparison of e-PTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-1 or demineralized freeze-dried bone in promoting formation around immediate extractions socket implants. **J. Periodont.**, v. 63, p. 929-933, 1992.

BELMONTE, G. C. **Avaliação histológica qualitativa da reação tecidual ao implante do polímero da mamona analisada pela microscopia de luz transmitida e microscopia eletrônica de varredura.** Dissertação de Mestrado em Implantodontia – Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2001.

BELMONTE, G.C.; CARVALHO, R. S.; SOUZA, T. P. T.; TAVANO, O.; GUIMARÃES, S. A. C. Regeneração Óssea Guiada em Modelo de Craniotomia utilizando Membrana de Resina de Poliuretano como Barreira. **Braz Oral Res**, v. 19, Supplement (Proceedings of the 22nd Annual SBPqO Meeting), 2005.

BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 48, n. 2, p. 162-169, 1990.

BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Comparison of bone matrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 50, p. 496-501, 1992.

BLUHM, A. E.; LASKING, D. M. The effects of polytetrafluorethylene cylinders on osteogenesis in rat fibular defects: a preliminary study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, n. 33, p. 163-166, 1995.

BOYNE, P. J. Osseus reconstruction of the maxilla and mandible: surgical techniques using titanium mesh and bone mineral. In: Evensen, L. **Quintessence**, 1997.

BURT, D. W. Evolutionary grouping of the transforming growth factor – beta superfamily. **Biochem Biophys Res Commun**. V. 184, p. 590-5, 1992.

CARVALHO, V.A.P. **Efeitos da matriz dentinária desmineralizada homogênea sobre a reparação óssea em mandíbula de coelhos: análise histomorfométrica.** Dissertação de Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2001.

CARVALHO, V. A. P. **Matriz dentinária desmineralizada homogênea liofilizada aplicada na reparação óssea: análise histomorfométrica.** Tese de Doutorado em Biologia Buco-dental - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2004.

CATANZARO-GUIMARÃES, B. P. N. **Capacidade osteoindutora da matriz dentinária autógena, utilizada sob forma de partículas e fatias, em defeitos ósseos em cães.** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1976.

CATANZARO-GUIMARÃES, S. A. **Patologia Básica da Cavidade Oral.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

CATANZARO-GUIMARÃES, S. A.; CATANZARO-GUIMARÃES, B. P. N.; GARCIA, B.; ALLE, N. Osteogenic potencial of autogenic demineralized dentin implanted in bony defects in dogs. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, n. 15, v. 2, .p. 160-169, 1986.

CORMACK, D. **Fundamentos de Histologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

DAHLIN, C.; BUSER, D.; SCHENK, R. K. **Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia.** São Paulo: Quintessence, 1996.

DAHLIN, C.; LINDE, A.; GOTTLAW, J.; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast. Reconstr. Surg.**, n.81, v. 5, p. 672-676, 1988.

DUCY, P., SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoclast: sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p.1501-4, sept. 2000.

DUPOIRIEUX, L. et al. guided tissue regeneration comparison of bioabsorbable and non-bioabsorbable membranes. Histologic and histometric study in dogs. **J.**

**Periodontal**, n. 65, p.583-591, 1994.

EINHORN, T. A. **The cell and molecular biology of fracture healing**. Clin Orthop 355S: S7-S21, 1998.

ERICKSEN, E. F.; MOSEKILDE, L. Trabecular bone remodeling and balance in primary hyperparathyroidism. **Bone**. v. 7, n. 3, p. 213-21, 1986.

FERNANDES, A. M. **Proteínas Morfogenéticas Ósseas**. Dissertação de Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental - Faculdade de Diamantina de Minas Gerais, 2000.

FERNANDES, A. M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. **Acta Orthop Scand** Suppl. 283, p.2-37, 1998.

FERRER CAÑABATE, J.; TOVAR, I.; MARTÍNEZ, P. Osteoprotegerina y sistema RANKL/ RANK: El futuro del metabolismo óseo?. **An. Med. Int.** (Editorial) n. 19, p. 385-388, 2002.

FONTANA, E.; TRISI, P.; PIATTELLI, A. Freeze-dried dura mater for guided tissue regeneration in post-extraction dental implants: a clinical and histologic study. **J. Periodont.**, v. 65, p. 658- 665, 1994.

FORELL, E. B.; STRAW, R. C. Bone morphogenetic proteins and bone derived growth factors. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, Stuttgart, v. 6, p. 166-171, 1993.

FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **Journal Oral Surgery**, n. 38, p. 176-180, 1980

FRIEDENSTEIN, A. J. Precursor cells of mechanocytes. **Int. Rev. Cytol.** v. 47, p. 327- 359, 1976.

GARTNER, L. P. e HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GIORDANO, V.; GIORDANO, M.; KNACKFUSS, I. G. Perspectives on fracture healing. **Arquivos em ortopedia e traumatologia**. v. 1, p. 6-8, 2003.

GLOWACKI, J.; SPECTOR, M. Tissue responses to bone-derived and synthetic materials. In: DAVIES, J. E. **The bone-biomaterial interface**, United States, University of Toronto Press, 1990.

GOMES, M. F. **Avaliação da atividade osteoindutora da matriz dentinária autógena descalcificada em defeitos ósseos cirúrgicos obtidos por craniotomia e tratados pela técnica de regeneração óssea guiada.** Tese (Doutorado em Odontologia, área de Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1998.

GOMES, M. F. et al. Autogenous demineralized dentin matrix for tissue engineering applications: radiographic and histomorphometric studies. **Int J Oral Maxillofac Implants**. nº.17, v. 4, p. 488-97, 2002.

GONÇALVES, E. A. L. **Estudo do processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos implantados com matriz dentinária desmineralizada autógena no osso rádio de cães.** Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1997.

GONÇALVES, E. A. L. **Dinâmica da regeneração óssea sob ação da matriz dentinária desmineralizada autógena em ossos com mecanismos distintos de ossificação embrionária.** Tese (Doutorado em Odontologia, área de Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2001.

GONÇALVES E. A. L.; CATANZARO GUIMARÃES, S. A.; GARCIA, R. B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Rev Odontol USP**, v. 12, n. 3 p. 299-304, 1998.

GONÇALVES, E. A. L.; PAVAN, A. J.; TAVANO, O.; CATANZARO-GUIMARÃES, S. A. Atividade morfogenética da matriz dentinária desmineralizada: estudo em cães. **Rev Fac Odontol Bauru**. v. 10, nº 1, p. 51-56, 2002.

GRANJEIRO, J. M.; OLIVEIRA, R. C.; BUSTOS-VALENZUELA, J. C. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 10, p. 1463-1473, 2005

GRAVES D.T., COCHRAN D. L. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. **Curr Opin Periodontal**, n. 2, p. 178-86, 1994.

GROENEVELD, E. H. J.; BURGER, E. H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. **European Journal of Endocrinology**, n. 142, p. 9-21, 2000.

HID, J. **Di Fiore: Histologia Texto e Atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

IGNÁCIO, H. **Utilização do cimento derivado do polímero da mamona no preenchimento de falha óssea. Estudo experimental em coelhos**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto 1995.

JUNQUEIRA, L. C. **Histologia Estrutural dos Tecidos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAHNBERG, K. E. Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon mantle leaf. **Int. J. Oral Surg.**, v.8, p. 449-452, 1979.

KARRING, T. et al. Development of the biological concept of guided tissue regeneration: animal and human studies. **Periodont**, n.1, p.26-35, 1993.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

LEONEL, E. C. F. et al. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. **Acta Cir Brás**. vol.19, nº.4, p.342-350, 2004.

LEVANDER, G. A study of bone regeneration. **Surg Gynecol Obstet** n. 67 p.705-14, 1938.

LINDHOLM, T. S.; GAO, T. G. Functional carriers for bone morphogenetic proteins. **Annales Chirurgiae et Gynaecologiae Fenniae: Supplementum, Helsinki**, v.207, p. 3-12, 1993.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**, 4ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005.

MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Bone growth factors. **Clinical Orthopaedics, Philadelphia**, v.263, p.30-48, 1991.

MURRAY, G; HOLDEN, R.; ROSCHLAU, W. Experimental and clinical study of growth of bone in a cavity. **Amer. J. Surg.**, v. 93, n. 3, p.385-387, 1957.

NYMAN, R.; LANG, N. P. Guided tissue regeneration and dental implants. **Periodont.** **2000**, v.4, p.109-118, 1994.

OHARA, G.H., KOJIMA, K.E., ROSSI, J.C. et al. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Orthop. Bras.**, v.3, p.62-68, 1995.

OKAMOTO, T. et al. Implante homogêneo de matriz dentinária conservada em glicerina a 98%: estudo microscópico em tecido conjuntivo subcutâneo de rato. Revista da faculdade de Ciências Odontológicas de Marília. 1999.

ORINGER, R. J. Biological mediators for periodontal and bone regeneration. **Comp Contin Educ Dent** , 23(6), p. 501-14, 2001.

OSTRUM, R.F. et al. Bone injury, regeneration, and repair. **Orthopedic Basic Science**. Chicago, p. 277-323, 1994.

PITARU, S. et al. Collagen membrana prevents the migration of ephitelium during periodontal wond healing. **J. Periodont. Res.**, v. 22, p. 331-332, 1987.

RAMOS, M. H.; MONTENEGRO, S. D.; NUÑEZ, I. J. P.; VARGAS, E. S. Metabolismo oseo: actualizacion. **Revista de Posgrado de la Via Cátedra de Medicina**, n.117, p. 18-21, 2002.

RAMOSHEBI, L.N. et. al. Tissue engineering: TGF-  $\beta$  superfamily members and delivery systems in bone regeneration. Expert Reviews in Molecular Medicine. **<http://www.expertreviews.org>**, 2002.

REDDI, A. H.; HUGGINS, C. B. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 69, p. 1601-1605, 1972.

REDDI, A. H. et al. Biologic Principles of bone induction. **Orthop Clin North Am.**, n. 30, p. 25-47, 1986.

RENGACHARY, S. S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. **Neurosurg Focus**, v. 13, n. 6, p. 1-6, 2002.

RIPAMONTI, U.; REDDI, A. H. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. **J Periodont Res**, v. 29, n.4 p. 225-35,1994.

ROBERTS, W. E. et. al. Bone physiology and metabolism. **CDA J.**, v. 15, n. 10, p.54-61, oct. 1987.

ROSEN, V.; THIES, R.S. **The cellular and molecular basis of bone formation and repair.** Heidelberg, Springer, 1995.

ROSS, M. H.; ROWRELL, L. J. **Histologia Texto e Atlas**, 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Panamericana, 1993.

SAKOU, T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. **Bone**, v. 22, n. 6, p.591-603, 1998.

SANDBERG M.M.; ARO H.T.; VUORIO E.I. Gene expression during bone repair. **Clin Orthop** n. 289, p. 292-312, 1993.

SAUTIER, J. M. Genetic and molecular regulation of bone regeneration. **Alpha Omegan**, v. 96, n. 3, p.16-18, 2003.

SCHENK, R. K. **Biologia da Reparação das Fraturas.** In: BROWNER, P. D.; LEVINE, A. M.; JUPITER, J. B.; TRAFTON, P.G. **Traumatismo do Sistema Musculoesquelético.** Cap. 2, p. 33-78, 2000.

SCHENK, R. K. **Bone Regeneration: Biologic Basis.** In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. **Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry.** Chicago, Quintessence, cap.3, p. 49-100, 1994.

SCHIMTZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin. Orthop. Related Research**, n. 205, p. 9-17, 1986.

SIMION et al. Guided bone regeneration and nonreabsorbable membranes: a comparative histologic study in humans. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 11, n° 6, p. 735-742, 1997.

SODEK, J; MCKEE, M, D Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology 2000**, v. 24, p.99-126, 2000.

SOLHEIN, E. Growth factors in bone. **Int Orthop** v. 22, p. 410-416, 1998.

SYKARAS, N.; OPPERMAN, L. A. Bone morphogenetic protein (BMP's): how do they function and what can they offer the clinician?. **Journal of Oral Science**, v. 45, n. 2, p.57-73, 2003.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. **Histologia Humana**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 2001.

TAVANO et al. Estudo da densidade radiográfica digital do tecido ósseo face ao implante do polímero de mamona em coelhos. **Revista da FOB**, v. 7, n° ¾, 1999.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclast. **Science**, v. 289, n. 5484, p.1504-8, sept. 2000.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-899, 1965.

URIST, M. R. Bone histogenesis and morphogenesis in implants of desmineralized enamel and dentin. **Oral Surg.**, v. 29, n. 2, p. 88-102, 1971.

URIST, M. R.; DELANGE, R.J.; FINERMAN, G.A.M. Bone cell differentiation and growth factors. **Science** v. 220, p. 680-686, 1983.

URIST, M. R; STRATES, B. S. Bone morphogenetic protein. **J Dent Res Supplement**, v. 50, n. 6, p. 1392-1406, 1971.

WOLFE, M. W.; SALKELD, S. L.; COOK, S. D. Bone morphogenetic protein in the treatment of non-unions and bone defects: historical perspective and current knowledge. **The University of Pennsylvania Orthopedic Journal**, n. 12, p. 1-6, 1999.

WOZNEY, J. M.; Bone morphogenetic proteins and their gene expression. In: **Cellular and Molecular Biology of Bone**. Noda, M., San Diego: Academic Press Inc, p. 131-167, 1993.

YOSHIDA, T et al. Histopathological study of the use of freeze-dried allogenic dentin powder and true bone ceramic as apical barrier materials. **J Endod.** p. 581-586, n. 24, v. 9, 1998.

**ANEXOS**

---

## ANEXO 1

Análise Morfológica do Defeito Ósseo com 15 dias						
Características Histológicas	Grupo C1	Valores	Grupo E1	Valores	Grupo E2	Valores
Tecido Ósseo	R1C115	70%	R1E115	58,4%	R1E215	58,7%
	R2C115	63,2%	R2E115	51%	R2E215	78%
	R3C115	32,1%	R3E115	88,8%	R3E215	73,5%
	R4C115	47%	R4E115	80,1%	R4E215	69,7%
	R5C115	44,5%	R5E115	36,2%	R5E215	51,4%
	<b>Média</b>	<b>51,3%</b>	<b>Média</b>	<b>62,9%</b>	<b>Média</b>	<b>66,2%</b>
Tecido Conjuntivo	R1C115	19,2%	R1E115	2,5%	R1E215	28%
	R2C115	19,6%	R2E115	0%	R2E215	0%
	R3C115	45,9%	R3E115	4,6%	R3E215	0%
	R4C115	43%	R4E115	0%	R4E215	0%
	R5C115	42,2%	R5E115	0%	R5E215	11%
	<b>Média</b>	<b>33,9%</b>	<b>Média</b>	<b>14%</b>	<b>Média</b>	<b>7,8%</b>
Medula Óssea	R1C115	10,8%	R1E115	39,1%	R1E215	13,3%
	R2C115	17,2%	R2E115	49%	R2E215	22%
	R3C115	22%	R3E115	6,6%	R3E215	26,5%
	R4C115	10%	R4E115	19,9%	R4E215	30,3%
	R5C115	13,3%	R5E115	63,8%	R5E215	37,6%
	<b>Média</b>	<b>14,6%</b>	<b>Média</b>	<b>35,6%</b>	<b>Média</b>	<b>25,9%</b>

Análise Morfológica do Defeito Ósseo com 30 dias						
Características Histológicas	Grupo C1	Valores	Grupo E1	Valores	Grupo E2	Valores
Tecido Ósseo	R1C130	35,5%	R1E130	67,8%	R1E230	44,4%
	R2C130	67%	R2E130	55,2%	R2E230	64,8%
	R3C130	78%	R3E130	69,4%	R3E230	84%
	R4C130	27,5%	R4E130	44,9%	R4E230	47,2%
	R5C130	44,3%	R5E130	41,5%	R5E230	49,3%
	<b>Média</b>	<b>50,4%</b>	<b>Média</b>	<b>55,7%</b>	<b>Média</b>	<b>57,9%</b>
Tecido Conjuntivo	R1E130	45,3%	R1E130	0%	R1E230	17,3%
	R2E130	5,9%	R2E130	0%	R2E230	0%
	R3E130	0%	R3E130	0%	R3E230	0%
	R4E130	18,5%	R4E130	16,5%	R4E230	0%
	R5E130	0%	R5E130	0%	R5E230	18,7%
	<b>Média</b>	<b>13,9%</b>	<b>Média</b>	<b>3,3%</b>	<b>Média</b>	<b>7,2%</b>
Medula Óssea	R1E230	19,2%	R1E230	32,2%	R1E230	38,3%
	R2E230	27,1%	R2E230	44,8%	R2E230	35,2%
	R3E230	22%	R3E230	30,6%	R3E230	16%
	R4E230	54%	R4E230	38,6%	R4E230	52,8%
	R5E230	55,7%	R5E230	58,5%	R5E230	32%
	<b>Média</b>	<b>35,6%</b>	<b>Média</b>	<b>40,9%</b>	<b>Média</b>	<b>34,8%</b>

## ANEXO 2

Análise Morfológica do Defeito Ósseo com 60 dias						
Características Histológicas	Grupo C1	Valores	Grupo E1	Valores	Grupo E2	Valores
<b>Tecido Ósseo</b>	R1C160	58,2%	R1E160	58,7%	R1E260	69,4%
	R2C160	32,9%	R2E160	50,8%	R2E260	52,2%
	R3C160	47,6%	R3E160	46,3%	R3E260	54,3%
	R4C160	56,6%	R4E160	51,9%	R4E260	41%
	R5C160	55,2%	R5E160	48,7%	R5E260	52,1%
	<b>Média</b>	<b>50,1%</b>	<b>Média</b>	<b>51,2%</b>	<b>Média</b>	<b>53,8%</b>
<b>Tecido Conjuntivo</b>	R1C160	26,7%	R1E160	0%	R1E260	0%
	R2C160	0%	R2E160	0%	R2E260	0%
	R3C160	0%	R3E160	17,9%	R3E260	0%
	R4C160	0%	R4E160	0%	R4E260	0%
	R5C160	0%	R5E160	0%	R5E260	0%
	<b>Média</b>	<b>5,3%</b>	<b>Média</b>	<b>3,5%</b>	<b>Média</b>	<b>0%</b>
<b>Medula Óssea</b>	R1C160	15,1%	R1E160	41,3%	R1E260	30,6%
	R2C160	67,1%	R2E160	49,2%	R2E260	47,8%
	R3C160	52,4%	R3E160	35,8%	R3E260	45,7%
	R4C160	43,4%	R4E160	48,1%	R4E260	59%
	R5C160	44,8%	R5E160	51,3%	R5E260	47,9%
	<b>Média</b>	<b>44,5%</b>	<b>Média</b>	<b>45,1%</b>	<b>Média</b>	<b>46,2%</b>

Análise Morfológica do Defeito Ósseo com 90 dias						
Características Histológicas	Grupo C1	Valores	Grupo E1	Valores	Grupo E2	Valores
<b>Tecido Ósseo</b>	R1C190	45%	R1E190	46%	R1E290	63,8%
	R2C190	36,5%	R2E190	54,8%	R2E290	66,6%
	R3C190	38,3%	R3E190	61,7%	R3E290	74,4%
	R4C190	31%	R4E190	62,6%	R4E290	69%
	R5C190	51,7%	R5E190	49,2%	R5E290	65,7%
	<b>Média</b>	<b>40,5%</b>	<b>Média</b>	<b>54,8%</b>	<b>Média</b>	<b>67,9%</b>
<b>Tecido Conjuntivo</b>	R1C190	24,2%	R1E190	0%	R1E290	0%
	R2C190	17%	R2E190	0%	R2E290	0%
	R3C190	0%	R3E190	0%	R3E290	0%
	R4C190	0%	R4E190	0%	R4E290	0%
	R5C190	0%	R5E190	0%	R5E290	0%
	<b>Média</b>	<b>8,2%</b>	<b>Média</b>	<b>0%</b>	<b>Média</b>	<b>0%</b>
<b>Medula Óssea</b>	R1C190	30,8%	R1E190	54%	R1E290	36,2%
	R2C190	46,5%	R2E190	45,2%	R2E290	33,4%
	R3C190	61,7%	R3E190	38,3%	R3E290	25,6%
	R4C190	69%	R4E190	37,4%	R4E290	31%
	R5C190	48,3%	R5E190	50,8%	R5E290	34,3%
	<b>Média</b>	<b>51,2%</b>	<b>Média</b>	<b>45,1%</b>	<b>Média</b>	<b>32,1%</b>

## ANEXO 3



Universidade do Sagrado Coração

**PRPPG**Pró-reitoria  
de Pesquisa e  
Pós-graduação**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA***Protocolo nº 049/2005*

**Título do Projeto:** "AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA, ESTIMULADA PELO GEL DE MATRIZ DENTINÁRIA ALOGÊNICA EM DEFEITOS ÓSSEOS NA TÍBIA DE RATOS (*RATTUS NORVEGICUS*), TRATADOS PELA TÉCNICA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA"

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães

**Aluno:** Ísidra Manoela Souza Portela Santos

**Parecer do Comitê de Ética:**

O CEP analisou, baseado em parecer competente, o presente projeto e o considerou aprovado.

**Data:** 05/8/05

**Assinatura do Presidente:**

*Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond*

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)