

# ANÁLISE HISTOLÓGICA, RADIOGRÁFICA E DO PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS APÓS IMPLANTAÇÃO DE ENXERTO DE OSSO ESPONJOSO BOVINO DESMINERALIZADO EM BLOCO EM MÚSCULO DE RATOS

*HISTOLOGIC, RADIOGRAPHIC AND IMUNOGLOBULINE PROFILE ANALYSIS AFTER IMPLANTATION BLOCKS OF DEMINERALIZED BOVINE CANCELLOUS BONE GRAFT IN MUSCLE OF RATS*

**Jefferson Tomio SANADA**

**José Gustavo Ribeiro RODRIGUES**

Alunos do Curso de Odontologia, FOB - USP.

**Giovana Calicchio CANOVA**

Mestranda em Endodontia da FOB - USP.

**Tânia Mary CESTARI**

Bióloga – Técnica da Disciplina de Histologia, FOB - USP.

**Eulazio Mikio TAGA**

**Rumio TAGA**

Professores Titulares do Departamento de Ciências Biológicas, FOB - USP.

**Marília Afonso Rabelo BUZALAF**

**José Mauro GRANJEIRO**

Professores Associados do Departamento de Ciências Biológicas, FOB - USP.

---

O objetivo deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade de blocos de enxerto de osso bovino esponjoso acelular e desmineralizado (Gen-Ox<sup>®</sup>, Baumer S.A.). Um bloco cilíndrico (5x12mm) de material de enxerto foi implantado em músculo abdutor da coxa de 30 ratos, sendo os animais sacrificados 3, 7, 14, 21 e 28 dias (n=6) após as cirurgias. Após a tomada das radiografias, as peças foram removidas para o processamento histológico. A análise histológica mostrou que nos períodos de 3 e 7 dias foi evidenciado um processo inflamatório agudo, caracterizado pela presença de neutrófilos, reabsorção do coágulo sanguíneo e angiogênese. Entre 14 e 21 dias, verificou-se a reabsorção da matriz implantada por células mononucleadas, raras células gigantes e sua substituição por tecido conjuntivo fibroso rico em vasos e células. Aos 28 dias, na maioria dos casos, observou-se apenas pequenos fragmentos de matriz implantada envoltos por tecido conjuntivo característico da região. Radiograficamente, não se notou evidências de mineralização. Com base nos resultados obtidos concluímos que o enxerto de matriz de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco é biocompatível quando implantado em tecido conjuntivo intramuscular de ratos, sendo absorvido e substituído por tecido conjuntivo característico da região, sem qualquer indício de ocorrência de osteogênese ectópica.

**UNITERMOS:** Osso; Músculo; Enxerto xenogênico.

---

## INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é constituído principalmente de colágeno tipo I e hidroxiapatita, conferindo estabilidade para os sistemas de implantes e próteses utilizados em odontologia<sup>13</sup>. A perda do elemento dentário promove a reabsorção contínua do rebordo alveolar e, para arcos edêntulos extremamente reabsorvidos, poucos métodos contribuem para o aumento em qualidade e quantidade do osso remanescente como, por exemplo, alguns procedimentos de enxerto ósseo. Neste contexto, é crescente o interesse no desenvolvimento de biomateriais que possuam propriedades biológicas e físico-químicas adequadas para o tratamento de perdas ósseas.

Quanto ao mecanismo de ação, estes biomateriais podem ser classificados em: osteocondutores, osteogênicos, osteopromotores e osteoindutores. A capacidade osteocondutora é atribuída ao material, geralmente inorgânico, que orienta a proliferação celular, permitindo a aposição de tecido ósseo originado de células osteoprogenitoras já existentes<sup>15</sup>. Aqueles biomateriais capazes de atuar separando tecidos com características distintas, como fibroblastos e osteoblastos são denominados de osteopromotores. Na regeneração tecidual guiada os materiais osteopromotores buscam impedir que fibroblatos proliferem para dentro da região do defeito ósseo em detrimento dos osteoblastos que proliferam mais lentamente. A osteoindução é definida pela capacidade do material induzir células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos<sup>14</sup>.

Dependendo da origem, os materiais para enxerto ósseo podem ser classificados como: autógeno, alógeno e aloplástico<sup>16</sup>. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, um novo tipo vem sendo largamente utilizado, o enxerto xenógeno.

O enxerto autógeno é, ainda, a referência (“gold standard”) devido as suas vantagens biológicas e potencial osteogênico. Porém, uma série de inconvenientes como um maior período de convalescença, morbidade e susceptibilidade a infecções no sítio doador e uma reabsorção progressiva e constante estimulou a busca de novos materiais<sup>7</sup>.

O aloenxerto, obtido de banco de ossos humanos, apresenta risco como a possibilidade de contaminação, necessidade de armazenamento especial e controle rígido de infecção<sup>1</sup>.

Os derivados inorgânicos como o fosfato tricálcico e a hidroxiapatita receberam grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para os enxertos ósseos<sup>3,7,8</sup>, principalmente devido à sua biocompatibilidade<sup>4,9</sup>, bioatividade e características de osteocondução<sup>2</sup> em relação ao tecido hospedeiro<sup>5</sup>. Porém, foi relatado que a hidroxiapatita sintética (biomaterial

aloplástico) possui microestrutura e tamanho do cristal, diferente do osso natural, podendo produzir resposta biológica indesejada<sup>20</sup>.

O enxerto xenogênico (obtido de outra espécie) vem apresentando resultados promissores e mostra-se como uma alternativa à intervenção em um segundo leito cirúrgico (no caso do enxerto autógeno) ou aos riscos de contaminação e custos com exames laboratoriais (no caso do enxerto alógeno). Alicerçado na abundância, baixo custo do osso bovino e no processamento mecânico e químico adequado, diversas empresas vem produzindo biomateriais com osso bovino como substituto ósseo (Gen-Ox<sup>®</sup>, Baumer S.A., Mogi Mirim, Brasil; Keil Bone<sup>™</sup>, Braun Milsungen, Milsungen, Alemanha; Bio-Oss<sup>™</sup>, Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça; e Surgibone<sup>™</sup>, Unilab Surgibone, Mississauga, Ontário, Canadá<sup>26</sup>).

O processamento do osso bovino pode resultar em dois tipos distintos de material: o inorgânico e o orgânico. O inorgânico é livre de proteínas e células, e está caracterizado pelo elevado conteúdo de hidroxiapatita. A desproteinização é obtida através de tratamento térmico a temperaturas superiores a 300°C, mas, quanto mais alta a temperatura, menor a possibilidade de bioabsorção do material. Por outro lado, o tratamento do osso bovino com solventes orgânicos, álcalis e ácidos com concentração e temperatura controlada leva à remoção de células, detritos celulares e várias proteínas não colágenas, bem como a porção mineral, deixando um arcabouço protéico constituído basicamente de colágeno tipo I e pequena quantidade de fatores de crescimento, como a proteína morfogenética óssea. Wenz et al (2000) demonstraram que o tratamento acima de 300°C ou tratamento com álcalis, seguindo de neutralização, remove praticamente qualquer prion que porventura exista na amostra. Apesar desta característica, o Brasil tem, ainda, uma posição invejável neste campo por ter seu rebanho livre de encefalopatia espongiforme (BSE, doença da vaca-louca).

Estudos *in vivo* têm demonstrado a viabilidade do emprego de osso xenogênico em defeitos ósseos em fêmur de ratos<sup>22</sup>, com diferentes resultados de acordo com o tipo de defeito provocado<sup>23</sup>.

O osso bovino esponjoso, adequadamente processado e desmineralizado, proporciona um material de enxerto poroso constituído principalmente de colágeno bovino tipo I, que apresenta grande homologia com o colágeno humano. Possui ainda traços de fatores de crescimento que podem estimular a osteogênese, conferindo propriedades que colocam o material com grande potencial para o tratamento de perdas ósseas.

Apesar de existirem diversos trabalhos sobre enxertos xenogênicos, pouco se sabe sobre os

mecanismos celulares e moleculares envolvidos na interação célula - matriz extracelular - xenoenxerto. O objetivo deste trabalho é investigar a resposta celular à matriz de osso esponjoso bovino desmineralizado em blocos implantados em músculo de ratos. Um vez que a matriz orgânica pode induzir mineralização ectópica<sup>26</sup>, tomadas radiográficas serão realizadas a fim de verificar a presença de possíveis imagens radiopacas. O perfil de imunoglobulinas (Ig G e Ig M) podem indicar ativação do sistema imune pelo material e serão, portanto, monitoradas. Nossa hipótese é de que o material apresente-se biocompatível, induzindo a formação de osso ectópico, sem ativar o sistema imune.

## MATERIAL E MÉTODO

O material utilizado neste trabalho foi a matriz de osso esponjoso bovino em bloco e desmineralizado (Gen-Ox<sup>®</sup>, Baumer S.A. Registro Ministério da Saúde: 103.455.00001), lote 0654 (Figura 1).

Foram utilizados 30 ratos albinos (Wistar), machos adultos, com aproximadamente 160g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Por todo o período experimental os animais receberam ração peletada e água “ad libitum”. Todos os procedimentos realizados obedeceram as normas do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru.

O material de enxerto foi previamente cortado em cilindros de 5mm de diâmetro e 12mm de comprimento, com o auxílio de uma trefina de 5,0 mm e micro motor Driller, a 1500 rpm. Após anestesia geral intramuscular, com Quetamina / Xilazina e água deionizada (2:1:1), na dose 0,14 mL/100 g de massa corporal, realizou-se a



**FIGURA 1-** Bloco de Osso Medular Orgânico, produzido a partir de ossos longos de bovinos. Proteínas inorgânicas e gorduras foram removidas após tratamento com solventes orgânicos.

tricotomia da coxa direita do animal e anti-sepsia vigorosa com álcool iodado. Em seguida, com um bisturi n° 15 foi realizada uma incisão de 1 cm no tegumento que reveste a coxa do animal, expondo o músculo abdutor que foi divulsionado até a formação de uma bolsa no seu interior na qual foi implantado o material embebido em sangue obtido por punção cardíaca. Ato contínuo, os retalhos foram colocados em posição e suturados, as fâscias musculares com linha de polivicryl n° 5-0 (Ethicon – Johnson & Johnson) e o tegumento, com linha de seda n° 4-0 (Ethicon – Johnson & Johnson). Após a sutura, realizou-se a anti-sepsia sobre a área cirúrgica com gaze embebida em solução de álcool iodado.

Após 3, 7, 14, 21 e 28 dias, os animais (6/período) foram novamente anestesiados e submetidos às tomadas radiográficas com o aparelho Spectro II<sup>®</sup>, Dabi Atlante com os seguintes parâmetros: distância foco-filme de 40 cm, tempo de exposição de 0,4 s, diferença de potencial de 70 kV, amperagem de 10 mA. O filme utilizado foi o Kodak Insight oclusal (lote 2103013). As radiografias foram reveladas pela técnica tempo-temperatura sempre utilizando soluções recém-preparadas de acordo com as normas do fabricante.

Na seqüência, foi realizada a divulsão na região ventral, na altura do tórax para a retirada de 5 mL de sangue por punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm, 10 °C, permitindo a separação do soro e plasma. O soro coletado foi mantido a temperatura de 5°C e encaminhado ao laboratório de Bioquímica da Universidade do Sagrado Coração para a quantificação das imunoglobulinas G e M seguindo a técnica de rotina do laboratório.

O músculo com o tecido reacional foi removido, fixado em formol a 10% em tampão fosfato durante uma semana e processado histologicamente até a obtenção de cortes de 5µm de espessura, que foram corados com hematoxilina-eosina (H.E.).

Os animais, após remoção das peças histológicas, foram sacrificados com dose excessiva de anestésico.

## RESULTADOS

### Análise histológica

A resposta biológica tecidual foi determinada em função das alterações inflamatórias (presença de edema, alterações vasculares e infiltrado inflamatório) e dos processos reparatórios (grau de fibrosamento, proliferação angioblástica e fibroblástica). Foram atribuídos escores (de zero a três), subjetivamente, a cada evento analisado. As lâminas foram avaliadas por três examinadores, previamente calibrados quanto

aos critérios a serem utilizados.

Nos períodos de 3 e 7 dias, observou-se uma reação inflamatória aguda, com muitos neutrófilos ao redor do implante. O material ainda estava envolto pelo coágulo e já apresentava uma fina cápsula fibrosa contendo vasos sanguíneos e fibroblastos (Figura 2A), e tecido conjuntivo nos espaços entre as trabéculas do enxerto (Figuras 2B e 2C). Linfócitos, macrófagos e células gigantes também estavam presentes em pequena quantidade.

No 14º dia, observou-se um aumento na quantidade de macrófagos e células gigantes (Figura 3A). Embora não tenha sido realizada a medição das dimensões do material remanescente, as imagens sugeriram a diminuição da área do material devido à contração ou, mais provavelmente, à reabsorção do material. Células mononucleadas em íntimo contato com o material, semelhantes a fibroblastos, foram observadas (Figura 3B). A angiogênese era evidente tanto na periferia quanto no centro do material, sendo o coágulo substituído por tecido conjuntivo próprio da região (Figura 3C). O número de neutrófilos envolvendo o material foi menor e o fibrosamento mais evidente do que no período anterior.

O período de 21 dias pós-implantação foi caracterizado pela fusão dos macrófagos em células gigantes, intensa e extensa angiogênese e a reabsorção da matriz implantada (Figuras 4A). Foi possível observar que a degradação do material ocorreu pela solubilização das fibras colágenas (Figura 4B).

Ao final de 28 dias, os tipos celulares presentes e a sua quantidade não variaram em relação ao período anterior. Era evidente a absorção do material por macrófagos e células gigantes que estavam em íntimo contato com o material e a presença de vasos em grande quantidade, demonstrando, ainda, uma atividade angiogênica (Figura 5).

### Análise Radiográfica

O exame radiográfico não mostrou qualquer evidência de radiopacidade na região de implantação do material em qualquer dos períodos experimentais, coincidindo com a análise microscópica que não detectou a ocorrência de osteogênese ectópica em nenhum dos animais.

### Perfil de Imunoglobulinas

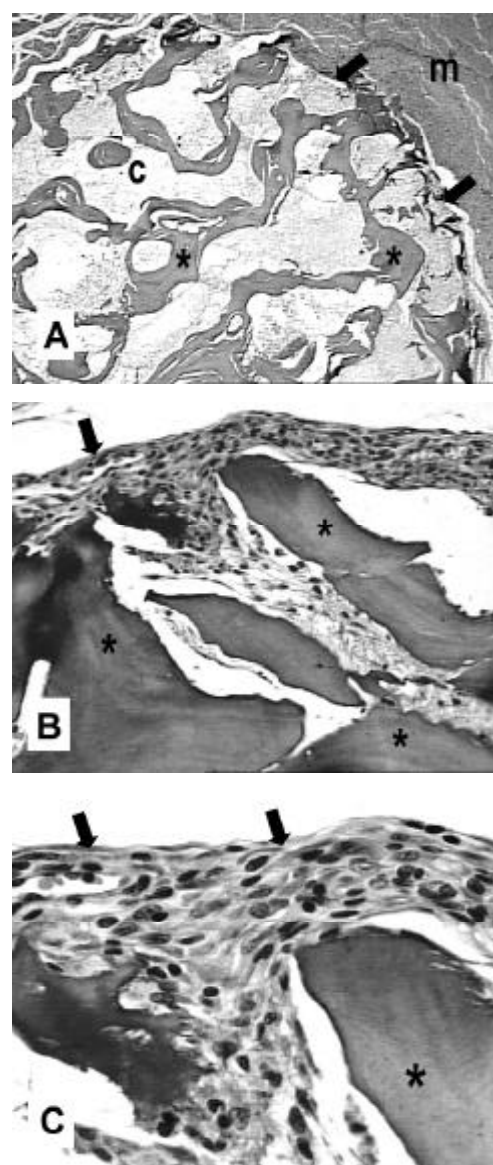
A concentração de IgG e IgM determinada no sangue obtido de cada animal no momento do sacrifício, mostrou que não houve diferenças significantes ( $P > 0,05$ , análise de variância e teste de Tukey) entre os períodos experimentais, sugerindo que o material não induziu resposta do sistema imune (não mostrado).

## DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a resposta celular ao enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco (Gen-Ox®) quanto a sua biocompatibilidade, capacidade de indução de osteogênese ectópica, bem como o perfil de imunoglobulinas (Ig G e M), após ser implantado em músculo de rato.

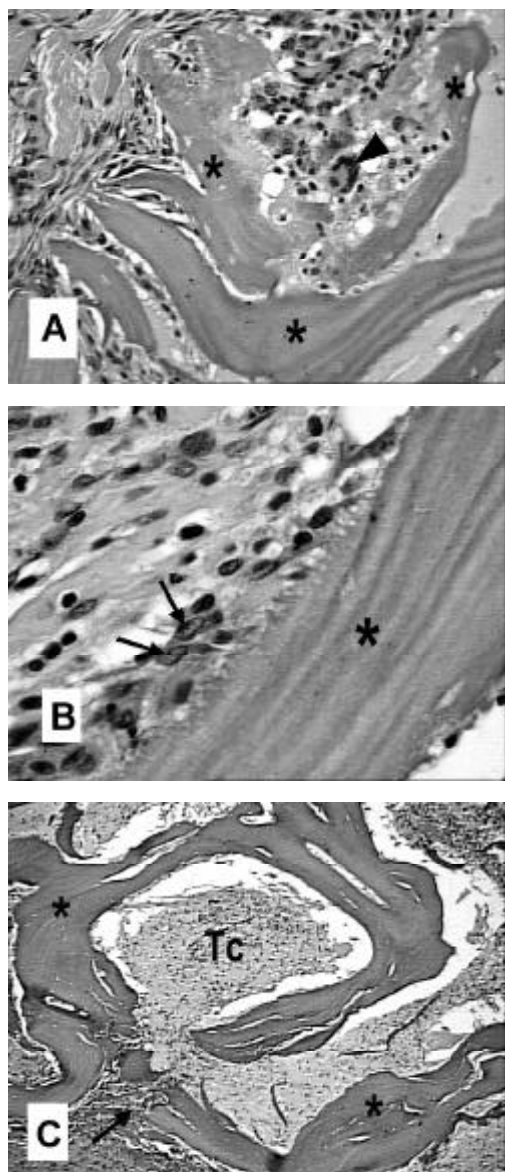
O perimísio do músculo foi escolhido como local de implantação do material por permitir uma adequada análise da biocompatibilidade<sup>19</sup> e por ser um tecido altamente vascularizado, propício a formação óssea ectópica<sup>18,25</sup>, quando convenientemente estimulado.

Dados da literatura têm mostrado que materiais

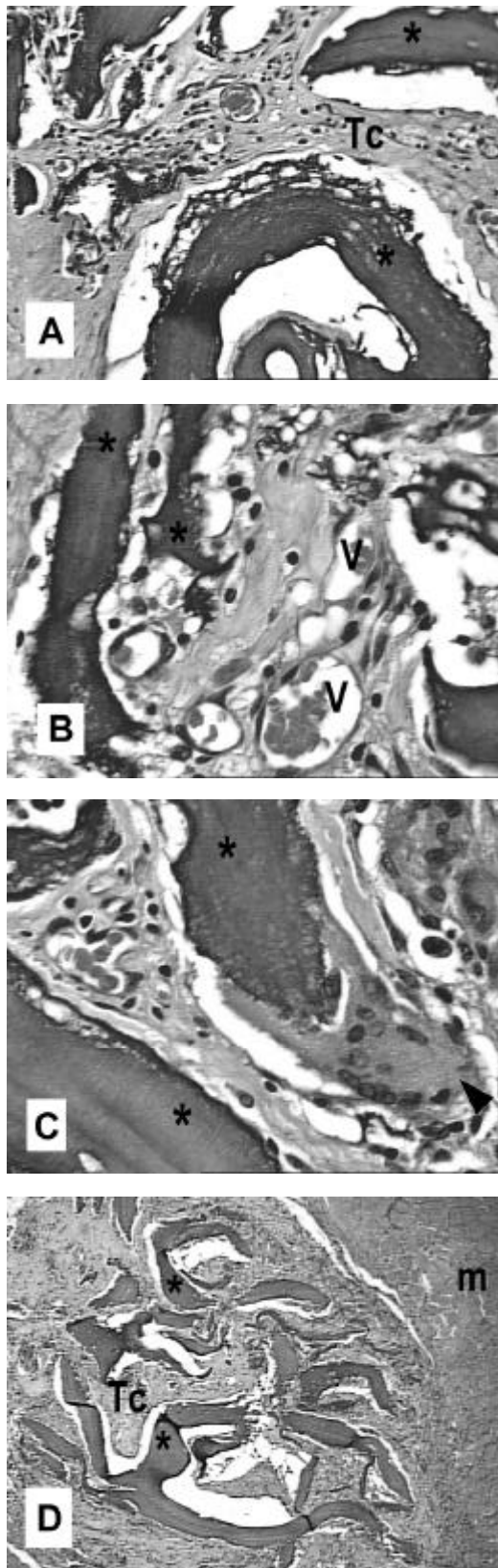


**FIGURA 2-** Fotomicrografia do período de 7 dias: A) Vista geral do material implantado (\*) entre os feixes musculares (m), presença de coágulo (c) e formação de cápsula (setas largas), HE, 38x; B) e C) Migração (setas largas) do tecido conjuntivo entre dos espaços ósseos, HE, 384x.

osteocondutores com potencial para ser usado também como carreador de BMPs deve possuir um arcabouço tridimensional e uma grande quantidade de poros interconectados que permita a proliferação celular e vascular e a formação de tecido de granulação no seu interior. Deve ser biocompatível e absorvível, com degradação lenta e controlável e possuir propriedades físico-químicas de superfície que favoreça a adesão e proliferação celular<sup>10</sup>. Salientamos que estas características foram observadas no material testado no progresso da angiogênese durante o decorrer dos períodos experimentais (comparar Figuras 2B, 4A e 5), sugerindo



**FIGURA 3-** Fotomicrografia do período de 14 dias: A) Células gigantes (cabeça de seta) em contato com o material (\*), HE, 96x; B) Células mononucleadas (setas) ao redor do enxerto, HE, 384x; C) Vista geral do material (\*), nota-se a migração (seta) do tecido conjuntivo (Tc) para o interior do mesmo, HE, 38x.



**FIGURA 4-** Fotomicrografia do período de 21 dias: A) Material (\*) envolvido por tecido conjuntivo (Tc) frouxo, HE, 96x; B) Vasos sangüíneos (V) em maior aumento, HE, 384x; C) Células gigantes (cabeça de seta) em íntimo contato com o material (\*), HE, 384x; D) Vista geral do material (\*), observado-se a absorção deste, HE, 38x.

que isto ocorreu graças a sua geometria favorável definida por seus poros biologicamente desenhados.

A resposta inflamatória aguda observada principalmente nos períodos iniciais foi compatível com uma reação decorrente da desorganização tecidual causada pelo procedimento cirúrgico. A intensa quantidade de neutrófilos nos três primeiros dias declinou ao longo do tempo devido à intensa vascularização. A reduzida presença de plasmócitos e linfócitos em todos os períodos indicou a boa aceitação biológica da matriz orgânica bovina pelo tecido.

O princípio da osteoindução foi demonstrado por Urist em 1965, o qual induziu neoformação óssea no interior de músculo de coelho pela implantação de matriz óssea desmineralizada<sup>26</sup>. Porém, a presença de matriz óssea mineralizada no tecido subcutâneo ou intramuscular, inibe a capacidade indutiva<sup>25</sup>.

Em 1972, Reddi e Huggins<sup>18</sup> após encontrarem células gigantes multinucleadas ricas em ácidos orgânicos no local da implantação de matriz mineralizada, supostamente relacionados na dissolução mineral, propuseram que a presença de matriz mineralizada sozinha ou juntamente com a matriz desmineralizada, inibia a osteogênese.

Kelly e Schneider<sup>12</sup>, em 1991, verificaram em subcutâneo de ratos que as células gigantes presentes ao redor de implante mineralizado não possuíam atividade fosfatase tartarato resistente (TRAP), nem morfologia característica de osteoclastos, e que ao redor de implante desmineralizado, a grande maioria das células gigantes apresentou expressão significativa da TRAP e morfologia semelhante a osteoclastos. Os dois tipos de células gigantes foram observadas após a implantação combinada de matriz mineralizada e desmineralizada. Segundo estes autores, tanto os osteoclastos como as células gigantes podem ser responsáveis pela reabsorção.

No presente estudo verificou-se que a absorção da matriz enxertada ocorreu concomitantemente ao

povoamento celular de seu interior. Ao longo dos períodos analisados, observou-se o crescimento da população de macrófagos que, ao se fusionarem, originavam as células gigantes.

Na análise radiográfica, não foi constatado nenhum indicativo de neoformação óssea no interior do material implantado, em concordância com a análise morfológica ao microscópio. Por outro lado, a grande quantidade de células gigantes em íntimo contato com o material, sugeriu a presença de resquícios de minerais no seu interior.

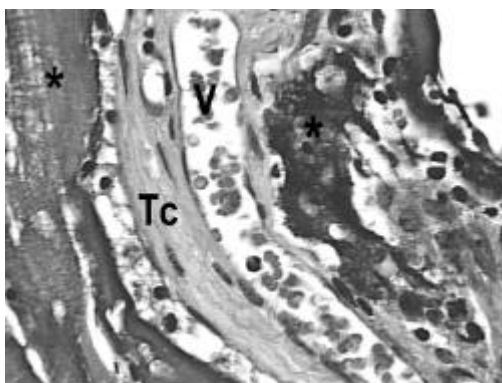
Estes resultados obtidos aqui, permitem concluir que o enxerto de osso bovino orgânico medular (Baumer S.A.) é biocompatível e bioabsorvível, sem qualquer indício de capacidade osteoindutora. Uma possibilidade para a ausência dessa capacidade seria a presença de traços de minerais em sua estrutura, que ativaria a formação de células gigantes inibidoras da osteogênese.

## AGRADECIMENTOS

Ao Cnpq/PIBIC pela bolsa de iniciação científica, a FAPESP pelo apoio ao desenvolvimento desta pesquisa, aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas – Bioquímica, Ovídio dos Santos Sobrinho e Thelma Lopes Silva e à BAUMER S.A. pelo material gentilmente cedido.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of blocks of organic bovine cancellous bone graft material (Gen-Ox<sup>TM</sup>, Baumer) in ectopic sites. A cylinder of block of graft material measuring 5mm in diameter and 12mm in length was implanted in abductor muscle of 30 Wistar rats. After 3, 7, 14, 21e 28 days, (6 animals/period) were killed, radiographies were taken and the tissues and blood were collected to histological and imunoglobuline G and M profile analysis, respectively. The analysis of the sections revealed an acute inflammatory process at 3 and 7 days, characterized by the presence of neutrophils. Absorption of the implanted matrix by mononuclear cells and scarce giant cells and their replacement by fibrous connective tissue rich in vessels and cells, was suggested. At 28 days, in most cases just remnants of the implanted matrix involved by the typical connective tissue of the perimysium were found. There was no radiographic evidence of mineral content or change in the IgG and IgM profile. On the basis in results described here, it could be concluded



**FIGURA 5** Fotomicrografia do período de 28 dias: Vasos sanguíneos (V), Tecido conjuntivo (Tc) e material implantado entre os feixes musculares (\*), HE, 384x.

that the material is biocompatible and absorbable but, with no signs of osteoinductive capacity was observed.

**UNITERMS:** Bone; Muscle; Xenograft.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- American Academy of Periodontology. Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration. *J Periodontol* 2001; 72:834-8.
- 2- Brunel G, Brocard D, Duffort JF, Jacquet E, Justumus P, Simonet T, Benqué E, Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases. *J Periodontol* 2001; 72:257-64.
- 3- Burstein FD, Cohen SR, Hudgins R, Boydston W. The use porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1997; 1:47-50.
- 4- Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1990; 2:187-208.
- 5- De Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials* 1980; 1:47-50.
- 6- Glowacki J, Murray E, Kaban J, Folkman J, Mulliken JB. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *Lancet* 1981; 8227:959-62.
- 7- Gosain AK. Hydroxyapatite cement paste cranioplasty for the treatment of temporal hollowing after cranial vault remodeling in a growing child. *J Craniofac Surg* 1997; 8:506-11.
- 8- Granjeiro JM, Taga EM, Fonseca M, Maeda L, Taga MSL, Trebacchetti CR, et al.. Características físico-químicas de hidroxiapatita para uso clínico. *Rev Gaucha Odontol* 1992; 40:130-4.
- 9- Greggi SLA, Campos JRA. Estudo comparativo da biocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido subcutâneo de ratos. *Rev Fac Odontol. Bauru* 1994; 2:73-81.
- 10- Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21:2529-43.
- 11- Jarcho M. Calcium phosphates ceramics as hard tissues prosthetics. *Clin Orthop. Rel Res* 1981; 157:259-78.
- 12- Kelly JD, Schneider GB. Morphological and histochemical comparison of cells elicited by ectopic bone implants and tibial osteoclasts. *Amer J Anat* 1991; 192:45-54.
- 13- Marks SC, Hermey DC. The structure and development of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology. New York: Academic Press; 1996. Cap 1, p.3-14.
- 14- Marx RE, Saunders TR. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In: Fonseca RJ, Davis WH. Reconstructive preprosthetic. Oral and Maxillofacial Surgery. Philadelphia: Saunders; 1986. p.347-428.
- 15- Masters DH. Implants. Bone and bone substitutes. *Calif Dent Ass J* 1988; 16:56-65.
- 16- National institute of health consensus development conference statement on dental implants. *J Dent Educ* 1989; 52:824-27.
- 17- Quina JR, Taga EM. Hidroxiapatita microgranular: comportamento biológico em tecido sub-cutâneo de ratos. *Rev Odontol UNESP* 1993; 22:197-202.
- 18- Reddi AH, Huggins C. Biomechanical sequences in the transformation of normal fibroblast in adolescents rats. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1972; 69:1601-5.
- 19- Sicca CM, Oliveira RC, Silva TI da, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. *Rev Fac Odontol Bauru* 2000; 8:1-10.
- 20- Stephan EB. Anorganic bovine bone supports osteoblastic cell attachment and proliferation. *J Periodontol* 1999; 70:395-9.
- 21- Taga EM. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. *Rev Bras Cir Implant* 1996; 3:29-68.
- 22- Torricelli P; Fini M; Rocca M; Giavaresi G; Giardino R. Xenogenic demineralized bone matrix: osteoinduction and influence of associated skeletal defects in heterotopic bone formation in rats. *Int Orthop* 1999, 23(3):178-81.
- 23- Torricelli P; Fini M; Giavaresi G; Rimondini L; Giardino R. Characterization of bone defect repair in young and aged rat femur induced by xenogenic demineralized bone matrix. *J Periodontol*; 2002, 73(9): 1003-9.
- 24- Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-9.
- 25- Urist MR, Strates ES. Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. *Clin Orthop Rel Res* 1970; 71:271-8.
- 26- Yishikawa T. Bone reconstruction by cultured bone graft. *Mat Sci Engin* 2000; 13: 29-37.
- 27- Zhao YF, Mendes M, Symington JM, Listrom RD, Pritzker KPH. Experimental study of bone growth around a dental implant after surgibone grafting. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14:889-97.

**Recebido para publicação em: 10/02/2003**

**Aceito após reformulações: 12/06/2003**

**Endereço para correspondência:**

**Prof. Dr. José Mauro Granjeiro**

**Departamento de Ciências Biológicas**

**Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75**

**Cep.: 17012-901 - Bauru - SP**

**Fone: (14) 235-8247 - e-mail: jomagra@fob.usp.br**