

Bruno Machado de Carvalho

**Estudo do comportamento biológico da matriz óssea homogênea desmineralizada conservada em meio químico. Estudo em defeitos ósseos experimentais.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do Grau de “Mestre em Odontologia” – Área de Concentração de Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

ARAÇATUBA – SP  
2011

# Dados Curriculares

## Bruno Machado de Carvalho

Nascimento	03/01/1981, Coronel Fabriciano/MG
Filiação	José Menezes de Carvalho Ernestina Machado de Carvalho
1999/2003	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia – Universidade Federal do Espírito Santo
2006/2008	Obtenção dos créditos referentes ao curso de especialização em Implantodontia – Universidade Federal do Espírito Santo.
2008/2010	Obtenção dos créditos referentes ao Curso de Pós - Graduação em Odontologia, área de Implantodontia, em nível de Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

# Dedicatória

A **Deus**, a minha **família** e a meus **amigos**, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

# Agradecimentos especiais

A **Deus**, pela ajuda sempre presente, mesmo não sendo merecedor desse incondicional amor.

A meus pais **José Menezes de Carvalho** e **Ernestina Machado de Carvalho**, pelo amor, carinho e sacrifício dispensados, além do ensinamento dos princípios de trabalho, esforço e dignidade.

A meu irmão **Sandro**, cunhada **Amanda** e sobrinhos **Heloísa** e **Tomás**, pelo amor, apoio e suporte.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Idelmo Rangel García Júnior**, que, nos anos de convivência, me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual, pelo direcionamento, ensinando-me uma linha de pesquisa e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. **Eduardo Piza Pellizzer** pela atenção e apoio a mim dispensados durante o mestrado. Muito obrigado por acreditar em mim e pelas múltiplas lições de respeito, ética, competência, dedicação e caráter.

Aos meus amigos **Cristiane, Viviane, Verônica, Daniel, Natane, Bárbara, Pollyana, Ierla, Tenille, Lorena, Marcos** e **George** pelo ombro amigo sempre presente em todos os momentos dessa caminhada.

Ao Prof. Dr. **Marco Antonio B. Pontual** pela amizade e ensinamentos fundamentais para minha formação acadêmica.

Às Prof. Dras. **Martha Alayde Alcântara Salim** e **Liliane Zanetti** pela amizade, carinho e suporte sempre presente.

Ao Prof. Adj. **Marcelo Coelho Goiato**, Chefe de Departamento, pelo carinho e amizade desde o início em que cheguei à FOA-UNESP, pelas oportunidades e pelo exemplo, como pesquisador.

À Profa. Dr<sup>a</sup>. **Daniela Micheline dos Santos** pelas oportunidades, pela amizade sincera e companheirismo nos artigos publicados.

Ao Prof. Tit. **Michel Saad Neto** pelos conselhos, pelo carinho, pela amizade, pela oportunidade de poder aprender sempre um pouco mais espiritual, científica e clinicamente.

Meus agradecimentos especiais para o Prof. titular **Paulo Sérgio Perri de Carvalho**, um professor que dispensa comentários sobre o perfil acadêmico, científico e clínico.

Meus agradecimentos especiais para a Professora Dr<sup>a</sup>. **Alessandra Marcondes Aranega**, Chefe de departamento Clínica Integrada e Cirurgia, por todo apoio, perspectivas acadêmicas e conselhos.

Ao **Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho** pela boa vontade que conduziram minha formação neste curso de Mestrado, muito obrigado pela compreensão em todos os momentos de dificuldade.

Ao Prof.Dr. **Wilson Roberto Pói** pelo apoio em cada momento deste curso.

Meus agradecimentos especiais para o mestrando **Joel Ferreira Santiago Júnior** pelos ensinamentos, pela disponibilização, amizade e ajuda sempre presente.

Meus agradecimentos especiais para o amigo **Erivan Gualberto Júnior** pela amizade, companheirismo e suporte dispensados.

À Mestranda **Pâmela Letícia dos Santos** por todo apoio e amizade, sempre.

À Doutoranda **Rosse Mary Fálcon Antenucci**, pelo carinho, pelo apoio.

Meus agradecimentos especiais à Doutoranda **Sandra Lúcia Danta de Moraes**, uma pessoa maravilhosa, que me ensinou muito e a quem devo tanto apreço e apoio.

Meus agradecimentos especiais à secretária do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Cleide Lemes da Silva**, pelo apoio constante, pela amizade sincera.

Aos amigos **Paulo, Gilmar, Dirce e Bernadete** pela ajuda sempre presente.

# Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do Diretor, Prof. Dr. **Pedro Felício Bernabé Estrada** pela oportunidade em realizar o Mestrado em Implantodontia.

À coordenadora do curso de pós-graduação **Maria José Hitomi Nagata** pelo excelente trabalho realizado em sua gestão.

Aos professores que ministraram disciplinas na pós-graduação, departamento de **Prótese Dentária e Cirurgia e Clínica Integrada**, pela amizade e conhecimento.

Aos funcionários da Pós Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, representados aqui por **Diogo Luís Reatto** e **Valéria de Queiroz M. Zagatto** por toda atenção sempre!

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, aqui representados pela **Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti**, por toda atenção e consideração!

À meus colegas de pós-graduação **Marcelo S. Abla, Carlos Alberto Fugiwara, Ellen Ramon Esper, Roberto M Hayacibara** pela convivência agradável e pelos ensinamentos. Meu muito obrigado.

À meus colegas de pós graduação **Amália Moreno, Thais, Aldiéris, Marcela, Liziane, Douglas, Paula, Bianca Tonella, Renato Ferraço**, pela amizade sincera, apoio sempre!

À meus colegas de pós graduação **Igor, Lamis, Rodolfo, Abrahão, Fernando, Heloísa, Jônatas, Pedro, Leonardo, Gabriel, Elisa, Cassiano, Walter, Franscilei,**

**Jéssica e Talita** agradeço pela convivência harmoniosa sempre, pelas palavras de apoio!

Àqueles que contribuíram ou participaram direta ou indiretamente da elaboração deste trabalho.

# Epígrafe

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

*Dalai Lama*

Carvalho BM. Análise do comportamento biológico da matriz óssea homogênea desmineralizada conservada em meio químico. Estudo em defeitos ósseos experimentais [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2011.

## Resumo

Devido à oferta limitada e morbidade associadas ao uso de enxertos autógenos, substitutos ósseos têm sido desenvolvidos e estudados. Implantes homogêneos de matriz óssea desmineralizada (MOD) têm sido utilizados como material clínico de enxerto devido à sua suposta capacidade de osseoindução e osseocondução. Este estudo teve por objetivo comparar os resultados histológicos da utilização da matriz óssea homogênea conservada em glicerina a 98% e em glutaraldeído 4% em defeitos ósseos cirurgicamente criados em tíbias de rato. Foram selecionados 18 ratos machos, destes, seis como grupo doador de matriz óssea (MOD). Os doze animais restantes foram operados, recebendo a matriz óssea desmineralizada em defeitos cirúrgicos criados em suas tíbias, onde, na direita foi implantado MOD armazenada em glicerina a 98% e na tibia esquerda MOD armazenada em glutaraldeído a 4%. Foram sacrificados seis animais em cada tempo pós-operatório de 30 e 60 dias. Para análise microscópica, as lâminas foram coradas pelos métodos da hematoxilina e eosina e tricrômio de Masson. Após análise microscópica das peças, foi constatado áreas da implantação da MOD claramente visíveis e constituídas em ambas as amostras, contudo os implantes conservados em glutaraldeído induziram um tecido conjuntivo de uma forma mais desorganizada e fragmentada, quando comparados com os tratados com glicerina, que mostraram maior quantidade de áreas de neoformação óssea em sua periferia. Este estudo mostrou que a glicerina a 98% foi um meio de conservação mais favorável à neoformação óssea da MOD, quando comparado ao glutaraldeído a 4%.

*Palavras-chave:* transplante homólogo, glicerol e glutaral

Carvalho BM. Analysis of the biological behavior of allogeneous demineralized bone matrix preserved in chemical medium. Study in experimental bone defects. [thesis]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2011.

## **Abstract**

This study compared the histological results of allogeneic demineralized bone matrix (DBM) preserved in 98% glycerin and 4% glutaraldehyde in experimental bone defects. We selected 18 male rats, of these, six were used as donor of DBM. The remaining twelve animals received in the right tibia DBM stored in 98% glycerin and DBM in 4% glutaraldehyde in the left tibia. Six animals were sacrificed at each postoperative time of 30 and 60 days. For microscopic analysis, slides were stained by the methods of hematoxylin and eosin and Masson Tricomium. Microscopic analysis found areas of deployment of MOD in both samples, but the implants preserved by glutaraldehyde presented themselves in a more disorganized and fragmented compared to those treated with glycerin, which showed a larger amount of bone formation. This study showed that 98% glycerin was a more favorable medium of preservation for bone formation when compared to 4% glutaraldehyde.

*Keywords:* homologous transplantation, glycerol and glutaraldehyde

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODO</b>	<b>25</b>
3.1. Obtenção da matriz óssea homogênea desmineralizada	26
3.2. Cirurgia para as implantações das matrizes ósseas desmineralizadas nas tíbias dos ratos	27
3.3. Obtenção das peças para análise histológica	27
<b>4. RESULTADO</b>	<b>28</b>
4.1. Observações clínicas pós-operatórias:	29
4.2. Análise histológica por meio de microscopia de luz:	29
4.2.1. 30 dias pós-operatórios:	29
4.2.2. 60 dias pós-operatórios:	29
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>35</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>37</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>44</b>

# 1 Introdução

A reconstrução de partes do esqueleto, em especial rebordos alveolares desdentados atróficos, com o objetivo de devolver estética e função mastigatória ocorre, na maioria das vezes, por meio de enxertos ósseos aliados a uma reabilitação protética suportada por implantes idealmente posicionados, tendo como um dos pontos críticos, a correta seleção dos biomateriais a serem utilizados [1].

A dificuldade da escolha de um biomaterial não autógeno se dá principalmente pelas suas características e propriedades requisitadas. O biomaterial deve ser, por exemplo, biocompatível ou biotolerado, osseoindutor, osseocondutor, osseogênico, além de permanecer no organismo por um tempo compatível para sua substituição por um novo tecido ósseo; deve ser de fácil manipulação, esterilizável, facilmente obtido, hidrofílico, econômico, não devendo atuar como substrato para a proliferação de patógenos, não ser cancerígeno ou teratogênico e antigênico [2]. Contudo, nenhum biomaterial atualmente conhecido, possui todas as características requisitadas, exceto o osso autógeno [3,4], ou o osso isogênico ou monozigótico característico dos gêmeos univitelinos [5].

A utilização de tecidos autógenos constitui o tratamento com melhores resultados clínicos e histomorfológicos, embora, exista a necessidade de cirurgia no leito doador, estendendo e complicando o ato cirúrgico [6]. Os implantes homogêneos e heterogêneos, juntamente com os materiais biossintéticos, facilitam e simplificam o procedimento, eliminando a abordagem cirúrgica no leito doador e sua morbidade [7, 8], contudo exigem métodos para sua obtenção, e há necessidade de meios para sua conservação. Desta forma, bancos de enxertos são criados para viabilizar meios que venham facilitar o seu uso em condições de serem utilizados como implantes biológicos [9].

Atualmente, preparados ósseos desmineralizados de origem humana e bovina estão disponíveis em várias formas, como: partículas, grânulos, blocos, pó, gel e outros, e comercializados em diferentes condições de preparo e conservação [10, 11, 12, 13, 14].

Objetivando o tratamento clínico, as matrizes ósseas desmineralizadas são utilizadas em procedimentos periodontais [12, 15], em defeitos ósseos congênitos [16], correção de rebordos alveolares atróficos, nas áreas de cirurgia plástica [14, 17], e em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial [18, 19].

Diante disto, as expectativas do uso de matrizes ósseas desmineralizadas superam o objetivo apenas de preenchimento dos defeitos ósseos e possibilitam estimular e interagir com o organismo levando à neoformação óssea local e devolvendo sua biofuncionalidade [7, 10].

Ossos conservados apresentam vantagens em relação ao material colhido fresco, pois existe uma possibilidade menor de rejeição por parte do receptor, além de poder haver formação de um banco de ossos [20, 21].

A solução preservadora deve manter ao máximo a integridade tecidual, atenuar a ação antigênica do tecido implantado, aumentar sua resistência à tração e atuar por um longo período. A glicerina a 98% é um dos meios de conservação mais utilizados, destinados a cirurgia reconstrutiva, por apresentar ação anti-séptica, manter o arcabouço tecidual, ser de fácil armazenamento e possuir baixo custo [22].

O glutaraldeído também é muito utilizado, principalmente na conservação de pericárdio bovino, utilizado como enxerto tanto em medicina veterinária como humana. Este meio de conservação apresenta uma excelente ação antimicrobiana.

Outros meios têm sido testados como o polivinilpirrolidona [23, 24], solução supersaturada de açúcar [25, 26], solução hipersaturada de sal [27, 28], tintura de tiomersal 1:1000 [24], solução fisiológica 0,9% congelada a  $-16^{\circ}\text{C}$  [24], centro frênico e mel [29, 30, 31].

Assim sendo, como os meios mais utilizados atualmente na conservação de tecidos conjuntivos vêm sendo o glutaraldeído e a glicerina, provavelmente por suas características químicas, acessibilidade e baixo custo, esses foram os meios químicos escolhidos para a realização deste experimento.

## 2 Proposição

Este estudo tem por objetivo comparar o comportamento biológico da matriz óssea homogênea conservada em glicerina a 98% e em glutaraldeído 4% na reconstrução e proteção de defeitos ósseos cirurgicamente criados, visando obter dados que possam subsidiar a sua indicação clínica.

## 3 Material e método

Após a liberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, com o protocolo de número 2008-009313, foram selecionados 18 ratos (*Rattus norvegicus, albinus Wistar*) machos, com peso variando entre 150 e 200 gramas. Os animais foram alimentados com ração sólida (PRIMOR LTDA), com exceção nas primeiras 6 horas pré-operatória e 3 horas pós-operatória, e água *ad libitum*.

Seis animais foram sacrificados para a obtenção da matriz óssea, para a remoção de suas tíbias. Os doze animais restantes constituíram os animais receptores desta matriz óssea homogênea, que por sua vez foram divididos em dois grupos:

- Grupo I: glicerina (tíbias direitas);
- Grupo II: glutaraldeído (tíbias esquerdas).

Os animais foram operados sob anestesia geral, através de injeção por via intramuscular de Cloridrato de Xilazina (Anasedan; AgriBrands Ltda.) na dosagem de 0,1 ml para cada Kg de peso corporal, para promover relaxamento muscular. Na seqüência foi utilizado o Cloridrato de Quetamina (Dopalen; AgriBrands Ltda) na dosagem de 1 ml para cada Kg de peso corporal para obtenção de efeito anestésico.

### **3.1. Obtenção da matriz óssea homogênea desmineralizada**

Para a obtenção da matriz óssea, foram utilizados seis animais doadores, dos quais, após a remoção do tecido mole circunvizinho, foram removidas ambas as tíbias. Em seguida, as tíbias passaram por um ciclo de desmineralização através do ácido clorídrico (LABSYNTH S/A) a 0,4mol (HCL) por um período de 48 horas, a uma temperatura variando entre 5 e 10 graus centígrados, sendo que a solução descalcificadora foi trocada a cada 24 horas [1, 32].

Após este período, as tíbias foram recortadas em partículas de 0,3 a 0,5cm<sup>2</sup> e lavadas por um período de 24 horas com água bidestilada corrente. Em seguida, metade das peças foram armazenadas em recipiente estéril contendo glicerina (LABSYNTH S/A) a 98%, enquanto a outra metade das peças foram armazenadas em recipiente estéril contendo glutaraldeído a 4%, todas por um período de vinte dias antes da implantação [13], mantendo-as em temperatura variando entre 5 e 7 graus centígrados.

### **3.2. Cirurgia para as implantações das matrizes ósseas desmineralizadas nas tíbias dos ratos**

Após anestesia, tricotomia e antissepsia local na região anterior dos membros posteriores, realizou-se incisão de 20mm em cada um. Através de dissecação cuidadosa e exposição das tíbias, foi realizada osteotomia de 3mm de profundidade com broca carbide esférica n. 02 sob irrigação tépida com solução fisiológica, chegando à cavidade medular.

Em seguida, após a realização da abertura cirúrgica bilateral das cavidades experimentais, o lado direito dos animais recebeu os implantes homogêneos de matriz óssea conservados em glicerina a 98% e o lado esquerdo dos animais recebeu os implantes homogêneos de matriz óssea conservados em glutaraldeído a 4%. Ambos os lados foram suturados, utilizando-se fio de Polivycryl 4.0.

### **3.3. Obtenção das peças para análise histológica**

Foram sacrificados seis animais em cada tempo pós-operatório de 30 e 60 dias, através de sobredosagem anestésica de pentobarbital sódico intrabdominal. Realizou-se a dissecação do local implantado de maneira criteriosa na busca de dados clínicos e obtenção das peças íntegras para a realização do exame histológico. As peças foram fixadas em solução de formalina a 10% por um período de 24 horas. Os espécimes foram desmineralizados e desidratados, com solução de EDTA a 18% (200g de ácido etilenodiaminotetra-cético sal dissódico e 24,4g de hidróxido de sódio dissolvido em 1000ml de água destilada), por um período de 60 dias. Após a desidratação das peças, estas passaram pelo processo de clarificação e foram incluídas em parafina, de forma a permitir cortes histológicos com 6 micrômetros de espessura. Para análise microscópica, as lâminas foram coradas pelos métodos da hematoxilina e eosina e tricrômio de Masson.

## 4 Resultado

### 4.1. Observações clínicas pós-operatórias:

Após a cirurgia, os animais apresentaram ligeiro edema no local operado e claudicação transitória. Em nenhum deles houve infecção ou fratura. Todos os animais sobreviveram e foram analisados histologicamente.

### 4.2. Análise histológica por meio de microscopia de luz:

#### 4.2.1.30 dias pós-operatórios:

Sob objetiva com lente de 4X de aumento, observou-se todas as corticais ósseas e a área de medula óssea tibial estudadas. Notamos canais medulares tibiais íntegros, do ponto de vista anatômico, tendo solução de continuidade apenas nas áreas operadas. Através da análise histológica, foram visualizadas as áreas da implantação da MOD como tecido ósseo maduro e organizado, sem osteócitos, além de grandes espaços medulares preenchidos predominantemente por tecido conjuntivo frouxo, tanto em implantes conservados em glicerina quanto em glutaraldeído. No grupo I, houve áreas de união entre a MOD e as paredes tibiais, enquanto no grupo II essas uniões não foram freqüentes, com a presença de tecido conjuntivo fibroso envolvendo os fragmentos da matriz (fig. 1 e 2).

Nas imagens com 40X de aumento, o grupo II apresentou-se de uma forma mais desorganizada e fragmentada, quando comparado ao grupo I, simulando uma maior atividade osteoclástica. Associado a isso, o grupo conservado em glutaraldeído apresentou áreas de formação de tecido conjuntivo denso não modelado, o que significa áreas de fibrose, juntamente com a presença de células gigantes na medula óssea, associadas à degradação tecidual (Fg. 3, 4 e 5).

#### **4.2.2. 60 dias pós-operatórios:**

Sob objetiva com lente de 4X de aumento, observou-se Imagem mostrando atividade de deposição óssea com trabéculas maduras unidas aos fragmentos de MOD armazenados em glicerina. Já no grupo armazenado em glutaraldeído, houve um processo de incorporação da matriz junto à medula óssea, exibindo grande fragmentação e baixa união entre a matriz e o tecido ósseo tibial do leito ou osso neoformado, aparecendo envolto, em sua maioria, por tecido amorfo semelhante ao da medula óssea (fig. 6 e 7).

Já com a objetiva de 40X de aumento, notou-se no grupo I, áreas de neoformação óssea por meio de ossificação endocondral (fig. 8), enquanto no grupo II notou-se a presença de processos de incorporação da matriz óssea, sem atividade osseoindutora e sim áreas de reabsorção (Fig. 9).

Quando comparamos os resultados de 30 dias com os de 60 dias, podemos perceber o amadurecimento do osso neoformado, o qual se apresenta mais regularizado e organizado no segundo período do experimento.

## 5 Discussão

A constante busca por um material para implante ou enxerto de origem autógena, homogênea ou heterogênea que ofereça possibilidade de conservação sem perda da viabilidade, tem levado os pesquisadores a estudarem um número elevado de substâncias e meios de conservação.

O grande desafio está na reposição do tecido ósseo com o restabelecimento das suas funções morfofisiológicas. Isto significa implantar na área óssea lesada, um material aloplástico ou implante tecidual que lhe devolva a capacidade de suportar os esforços musculares, que tenha a mesma capacidade de deformação pré-existente e principalmente, promova uma interação físico-química com o meio interno de forma compatível levando a processos de total incorporação e de histoição [12, 23, 33].

Em transplantes ósseos o conteúdo mineral residual deve sofrer reabsorção antes que a matriz colagenosa e a BMP possam estimular a osseoição. Presumivelmente, quanto mais minerais são removidos, mais BMPs tornam-se expostas e solubilizadas na MOD. Além disso, o processo de obtenção de matriz óssea através de ciclos de desmineralização ácida não só assegura à conservação do conteúdo protéico como, ao mesmo tempo, impossibilita a sobrevivência de microorganismos patogênicos, preocupação importante nos dias de hoje, já que a esterilização ou a desinfecção através de radiações, calor seco ou úmido e mesmo através de soluções químicas, interferem na qualidade do tecido a ser implantado [1, 22, 32].

A glicerina e o glutaraldeído vêm sendo utilizados clinicamente e citados na literatura em diversos artigos, todos eles citando vantagens e desvantagens de cada uma, porém a maioria deles os compara com outros meios de conservação, não havendo estudos comparando esses dois meios na conservação de MOD para que possamos discutí-los com nossos resultados. Entretanto, experimentos foram realizados utilizando a glicerina e o glutaraldeído como meio conservante de diferentes materiais biológicos. Dentre eles citam-se dura-máter, peritônio, pericárdio, tibia e cartilagem, mostrando a eficácia de seu uso como meio conservante, ocorrendo, contudo, divergências quanto ao tempo de conservação e a análise bacteriológica [34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41].

Estudos prévios sobre a estrutura e composição do pericárdio bovino, assim como as demais estruturas citadas nos estudos anteriores, revelaram que eles são compostos por camadas de elastina e fibras colágenas [42, 43, 44], o que constitui a

maior porcentagem compositora da matriz óssea desmineralizada, podendo assim, ser comparada com nossos resultados.

Neste experimento, a MOD integrou-se ao osso hospedeiro de maneira diferente de acordo com o meio de conservação utilizado. Mesmo assim, o comportamento de ambas as matrizes foi de biocompatibilidade, com processo inflamatório crônico e leve, apresentado sempre pelo tecido envolvendo a matriz conservada em glutaraldeído. A propriedade antisséptica, e a quebra da antigenicidade com preservação da integridade protéica foi percebida e está de acordo com outros estudos encontrados na literatura [13, 40, 45, 46].

O risco de transmissão de doenças infecciosas e de contaminação cirúrgica para os pacientes que recebem implantes de tecidos é de grande interesse na formação de um banco para estocagem de tecidos. Microrganismos são introduzidos durante a coleta, processamento e estocagem. Condições de assepsia fazem com que a possibilidade de transmissão de doenças bacterianas, fúngicas ou virais seja praticamente excluída. Portanto, para minimizar os riscos de transmissão de doenças, deve-se monitorar rigorosamente todas as etapas, incluindo-se a cuidadosa seleção do doador, o processo de coleta e os meios de esterilização e/ou conservação dos tecidos a serem implantados [47]. Isto justifica a tentativa de outros meios de conservação com características citadas anteriormente.

A MOD armazenada em glicerina a 98% apresentou melhores resultados à microscopia ótica, tanto em 30 como em 60 dias pós-cirúrgicos, quando comparada à MOD armazenada em glutaraldeído a 4%. Estudos justificam esse fato pela maior citotoxicidade do glutaraldeído, devido à presença de grupos aldeídos residuais livres, que podem prender-se ao cálcio plasmático do hospedeiro, contribuindo para a calcificação dos tecidos. Anticorpos circulantes específicos podem contribuir para a calcificação dos tecidos alógenos pela reação imune [45]. Contudo, outros autores discordam com esse achado, como no trabalho utilizando enxerto vascular homólogo de eqüinos fixado em glutaraldeído, que apresentou boa manipulação cirúrgica, sendo possível a realização do implante com as suturas anastomóticas. O conservante também reduziu a antigenicidade do enxerto, permitindo boa preservação histológica da estrutura vascular [48]. Outro também contrário é o de Rabelo e colaboradores [49], que utilizaram o centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glutaraldeído a 4% durante 30 dias, mostrando incremento em sua resistência quando comparado ao material *in natura* com bons resultados e incorporação ao tecido hospedeiro.

A conservação em glicerina pode reduzir a antigenicidade dos tecidos [28, 25, 46, 50, 51], o que evita o uso de drogas imunossupressoras durante os períodos trans

e pós-operatórios [52]. Além disso, é capaz de preservar a textura dos biomateriais, atuando também como fixador e desidratante de atuação rápida [34, 46].

Em nosso estudo a glicerina preservou as características orgânicas do osso conservado, permitindo o processo de neoformação óssea com características parecidas com o processo de osseoindução, muito embora a área de estudo possua, naturalmente, processo de osseogênese espontânea. Mas, a diferença no comportamento biológico de ambas as matrizes pelos diferentes meios de conservação, nos leva a concluir que a glicerina interagiu de maneira a preservar aspectos protéicos do tecido ósseo conservado, que proporcionou deposição de novo tecido ósseo com características bem diferentes do conservado em glutaraldeído. Por meio desta observação e pela diferenciação qualitativa deste tecido ósseo depositado junto ao implante de MOD em glicerina, podemos nos aventurar a dizer que houve atividade neste tecido do ponto de vista de interagir e induzir ou conduzir, a uma diferenciação celular o que não aparece com a MOD em glutaraldeído que se mostrou de maneira inerte.

## 6 Conclusão

- Os dois meios mantiveram as características físicas do tecido e sua conservação por um processo de desidratação;
- A matriz óssea desmineralizada conservada em glicerina mostrou áreas de osteogênese e deposição óssea em maior quantidade. Fato menos observado com o osso conservado em glutaraldeído; e
- A avaliação qualitativa se mostrou suficiente para as conclusões e estudo histológico.

## Referências Bibliográficas

[1] Mellonig JT. Periodontal Regeneration: Bone Grafts. In: **Periodontal therapy Clinical Approaches and Evidences of Success**. Illinois: Quintessence Publishing, 1998, 15: 233-248.

[2] Santos J. **Transplante de osso homólogo em odontologia classificação**, riscos e benefícios. Tese universidade veiga de almeida, 2007, 62p.

[3] Chiapasco M, Romeo E. Cirurgias pré implantes nas atrofia maxilares. In: **Reabilitação oral com prótese implantosuportata para casos complexos**. São Paulo: Santos. 2007, 3: 131-160.

[4] Moore ST et al., Osteoconductivity and Osteoinductivity of Puros(R) DBM Putty. **J Biomater Appl**. 2010 Jun 21.

[5] Fonseca RJ, Davies WH. Bone Induction and the Biology of Grafting; In: **Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery**. 2.ed. New York: Sanders Company, 1995, 3: 41-48.

[6] Logeart-Avramoglou D. et al. Engineering bone: challenges and obstacles. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 2005, 9 (1): 72-84.

[7] Bernick, S. et al. Cellular events associated with the induction of bone by demineralized bone. **J Orthop Res**, 1989, 7: 1-11.

[8] Ellis E, Sinn D. Use of homogeneous bone in maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, 1993, 51: 1181-93.

[9] Gleeson MJ, Griffith DP. The Use of Alloplastic Biomaterials in Bladder Substitution. **The Journal of Urology**, 1992, 149: 1377-1382.

- [10] Feighan JE et al. Induction of bone by a demineralized bone matrix gel: study in a rat femoral defect model. **J Orthop Res**, 1996, 13: 881-91.
- [11] Vail TB, Trotter GW, Powers BE. Equine demineralized bone matrix: relationship between particle size and osteoinduction. **Vet Surg**, 1994, 23: 386-95.
- [12] Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. **J Periodontol**, 1995, 66: 506-10.
- [13] Okamoto T et al., Autogenous transplantation of rib cartilage preserved in glycerol after removal of the perichondrium, to the malar process of rats. A histological study (part I). **J Nihon Univ Sch Dent**, 1990 32: 116-26.
- [14] Ono I et al., Bone induction of hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein and covered with periosteum. **Plast Reconstr Surg**, 1995, 95: 1265-72.
- [15] Mellonig JT. Decalcified freeze - dried bone allografts as an implant material in human periodontal defects. **Int J Periodont Rest Dent**, 1984, 4: 40-55.
- [16] Mulliken JB et al., Use of demineralized allogenic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. **Ann Surg**, 1981, 194: 366-72.
- [17] Mulliken JB, Kaban LB, Glowacki J. Induced osteogenesis - the biological principle and clinical applications. **J Surg Res**, 1984, 37: 487-96.
- [18] Harrison J A. Healing of routine and of severely traumatized exodontic wounds. **Bur**, 1943, 43: 107-15.
- [19] Neigel JM, Ruzicka PO. Use of demineralized bone implants in orbital and craniofacial reconstruction and a review of the literature. **Ophtal Plast Reconstr Surg**. 1996, 12: 108-20.
- [20] Weigel PJ. Bone grafting. In: Bojrab, JM. **Disease mechanism in small animal surgery**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993, 98: 678-85.

[21] Hunter SA et al., Demineralization Removes Residual Alendronate in Allograft Bone Procured from Donors with a History of Bisphosphonate use. **J Periodontol.** 2010 Aug 23.

[22] Alvarenga J. Possibilidades e Limitações da Utilização de Membranas Biológicas Preservadas em Cirurgia. *In*: Daleck CR, Baptista LC, Mukai LS(eds.) **Tópicos em Cirurgia de Cães e Gatos. Jaboticabal, FUNEP-UNESP, 113, 1992.**

[23] Mota FCD, Eurides D, Belletti ME et al. Análise Ultra-estrutural da Túnica Muscular do Intestino Delgado de Cães Preservado em Diferentes Meios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2002, 39 (1): 13-17.

[24] Mota FCD et al., Análise Morfológica Utilizando-se Diferentes Métodos de Preservação sobre a Camada Muscular do Intestino Delgado de Cães. **Ciência Animal Brasileira**, 2003, 4 (2): 117-123.

[25] Mazzanti A et al., Músculo Diafragma Homólogo Conservado em Solução Supersaturada de Açúcar para a Reparação de Grande Defeito na Diafragma de Cão. **Ciência Rural**, 2001, 31 (2): 277-283.

[26] Mazzanti A et al., Hernioplastia Diafragmática em Cão com Pericárdio Bovino Conservado em Solução Supersaturada de Açúcar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2003, 55: 6.

[27] Brun MV et al., Solução Hipersaturada de Sal como Conservante de Pericárdio Canino Utilizado na Reparação do Músculo Reto Abdominal de Ratos Winstar. **Ciência Rural**, 2002, 32 (6): 1019-1025.

[28] Brun MV et al., Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98 % como conservante de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos Wistar. **Ciência Rural**, 2004, 34: 147-153.

- [29] Amendola GF et al., Correção de defeito ósseo femoral em case utilizando implante cortical homólogo conservado em mel. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2003, 18 (4): 302-306.
- [30] Gaiga LH, Schossler JEW. Osteossíntese de úmero por xenoenxerto ósseo preservado em mel em pombos domésticos (*Columbia lívia*). **Ciência Rural**, 2003, 33 (4): 709-715.
- [31] Alievi MM et al., Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. **Ciência Rural**, 2007, 37 (2): 450-457.
- [32] Urist, M.R. Bone formation by autoinduction. **Science**, 1965, 150: 893-99.
- [33] Senn N. The Healing of Aseptic Bone Cavities by Implantation of Antiseptic Decalcified Bone. **Ann Surg.** 1889,10(5):352-68.
- [34] Pigossi N et al., Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista de Associação Médica Brasileira**, 1971, 17: 263-278.
- [35] Daleck CR et al., Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, 1992, 22: 179-183.
- [36] Neto JMC et al., **Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina.** In: Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Goiânia: CBCAV, 2000, 96: 104.
- [37] Okamoto T et al., Homogenous implant in rat tibia of matrix preserved in 98% glycerin: hitomorphologic study. **Braz Dent J**, 2000, 11 (2): 79-87.
- [38] Gallo JI, Artinano E, Val F, Duran CG. Glutaraldehyde preserved heterologous pericardium for the repair of diaphragmatic defects. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 1982, 83: 905-908.

[39] Jasso-Victoria R et al., Reconstrucción del esternón con pericardio bovino tratado con glutaraldehído PBTG; estudio experimental. **Rev Inst Natl Enf Resp. Méx.** 1995, 8 (3): 189-191.

[40] Golomb G et al., The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. **Am J Pathol.** 1987, 127: 122.130.

[41] Sánchez-Arévalo FM et al., The micromechanical behavior of lyophilized glutaraldehyde-treated bovine pericardium under uniaxial tension. **J Mech Behav Biomed Mater.** 2010, 3(8):640-6.

[42] Holt JP. The normal pericardium. **Am J Cardiol.** 1970, 26: 455-465.

[43] Elias H, Boyd LJ. Notes on the anatomy, embryology and histology of the pericardium II. **NY Med. Coll. News Notes** 1960, 2: 50-75.

[44] Ishira, T et al., Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. **Am J Cardiol.** 1980, 46: 744-753.

[45] Lee C et al., High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: in vitro material assessment and in vivo anticalcification effect. **Eur J Cardiothorac Surg.** 2010 Aug 23.

[46] Pigossi N. **A glicerina na conservação de dura-máter. Estudo experimental.** Tese de Livre-Docência. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1967: 36p.

[47] Dziedzic GA, Stachowicz W. Sterilization of tissue allografts. In: Philips G, Versen R, Strong DM. **Natheradvantages in the banking.** London: World Scientific, 1997: 261-73.

[48] Dornbush PT et al., Implante jugular homólogo fixado em glutaraldeído, nos equinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, 2007, 102: 81-86.

[49] Rabelo RE et al., Características Físicas e Microbiológicas do Centro Tendíneo Diafragmático Bovino Conservado em Glicerina a 98% e no Glutaraldeído a 4%. **Ciência Animal Brasileira**, 2004, 5 (4): 229-238.

[50] Pigossi N et al., Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista de Associação Médica Brasileira**, 1971, 17: 263-278.

[51] Brun MV et al., Solução Hipersaturada de Sal ou de Glicerina a 98% como Conservante de Centros Frênicos Caninos Utilizados na Reparação de Defeitos Musculares em Ratos Wistar. **Ciência Rural**, 2004, 34 (1): 147-153.

[52] Raiser AG et al., Homoimplante Ortotópico de Tendão Calcâneo em Cães Conservação, Assepsia e Implantação. **Ciência Rural**, 2001, 31 (1): 89-94.

Anexos

## ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto **"ESTUDO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DA MATRIZ ÓSSEA HOMÓGENA DESMINERALIZADA NO PROCESSO DE OSTEOINDUÇÃO. ESTUDO HISTOLÓGICO, IMUNOISTOQUÍMICO E COM MARCADORES TECIDUAIS EM RATOS"** sob responsabilidade do **Prof. Dr Idelmo Rangel Garcia Júnior e Fernanda Priscila Ramos** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 05/12/2008 de acordo com o protocolo 2008-009313.

Araçatuba, 05 de Dezembro de 2008

**Prof.<sup>a</sup> Tereza Cristina Cardoso da Silva**  
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

**ANEXO B** – Normas da revista selecionada para a publicação do(s) artigo(s):  
Biomaterials

## Author Guidelines

### Submission

---

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact [ijbm@hindawi.com](mailto:ijbm@hindawi.com) for support.

### Terms of Submission

---

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, or thesis) and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to [ijbm@hindawi.com](mailto:ijbm@hindawi.com).

### Peer Review

---

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and—if not rejected right away—by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

### Article Processing Charges

---

International Journal of Biomaterials is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of International Journal of Biomaterials, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

### Units of Measurement

---

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

## Title and Authorship Information

---

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

## Abstract

---

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 150 words.

## Introduction

---

This section should be succinct, with no subheadings.

## Acknowledgments

---

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

## References

---

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

## Preparation of Figures

---

Upon acceptance of an article, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

## Preparation of Tables

---

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

## Proofs

---

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

## Copyright

---

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

**ANEXO C – Cover Letter**

This paper, so called **analysis of the biological behavior of allogeneous demineralized bone matrix preserved in chemical medium. Study in experimental bone defects**, has not been published elsewhere (except as part of a published thesis) and is not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The article's publication has been approved by all the other coauthors, according to the signatures below:

---

Idelmo Rangel Garcia Júnior

---

Bruno Machado de Carvalho

---

Liliana Aparecida Pimenta de Barros

---

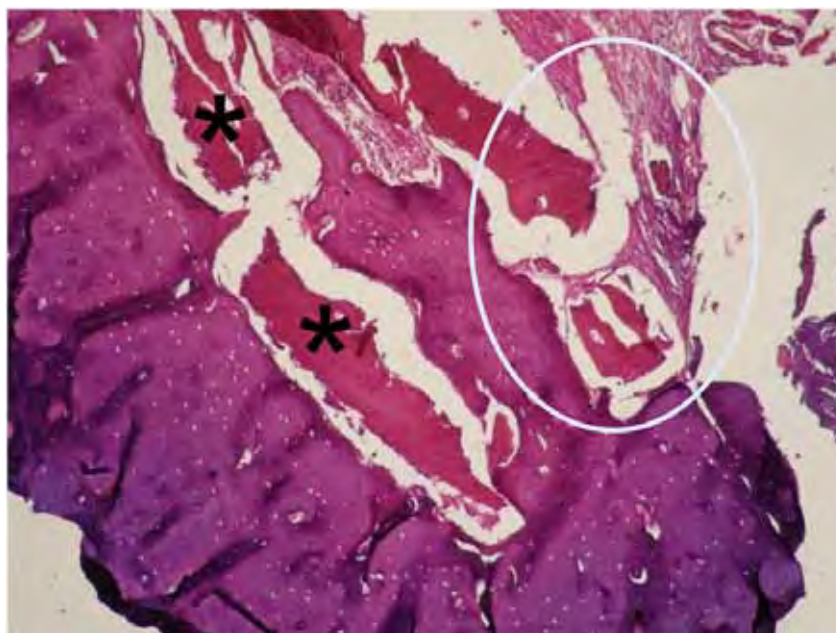
Letícia Gama de Souza

**Anexo D - Ilustrações**

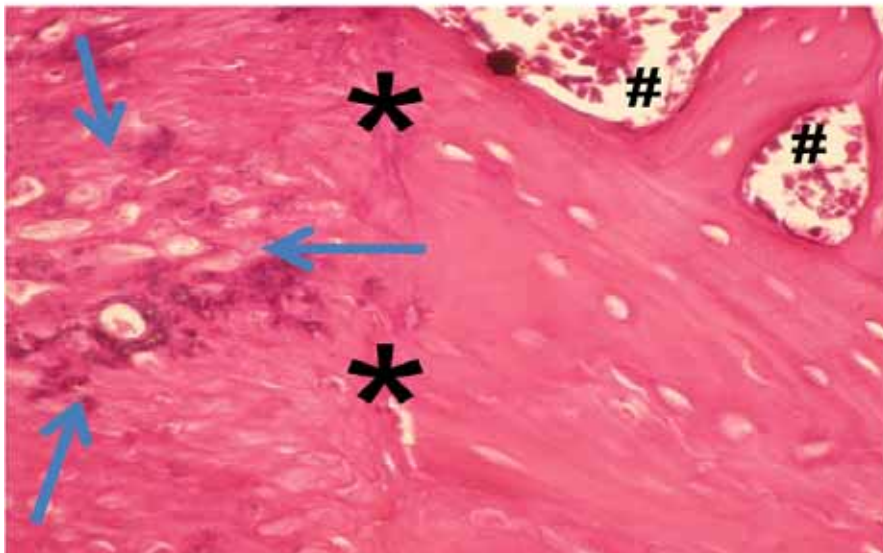
**Figura 1** – Fotomicrografia de 4X de aumento da MOD armazenada em glicerina a 98% com 30 dias pós-operatórios. Imagem mostrando a presença da matriz óssea (\*) no interior do canal medular e áreas de união junto às paredes tibianas (círculo).



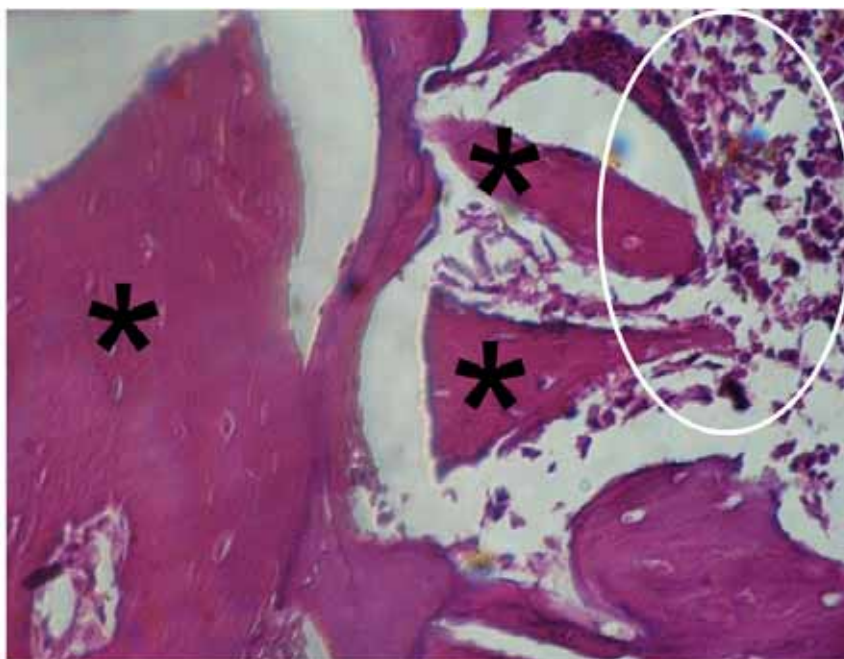
**Figura 2** - Fotomicrografia de 4X de aumento da MOD armazenada em glutaraldeído a 4% com 30 dias pós-operatórios. Imagem mostrando a presença da matriz (\*) no interior da medula óssea sem áreas aparentes de união às paredes tibianas. Ocorre a presença de tecido conjuntivo fibroso envolvendo fragmentos de matriz (círculo).



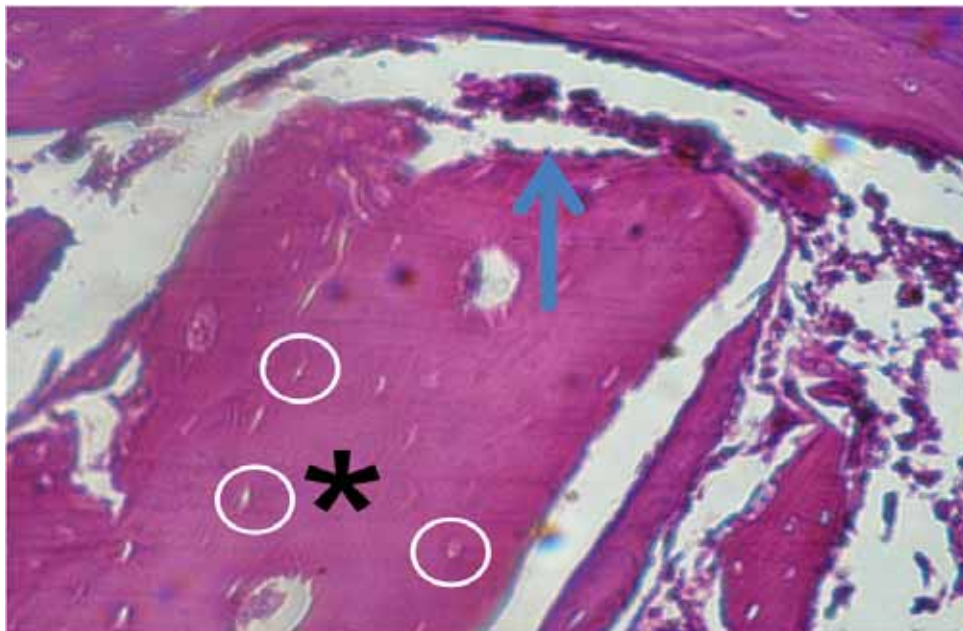
**Figura 3** – Fotomicrografia de 40X de aumento da MOD armazenada em glicerina a 98% com 30 dias pós-operatórios. Imagem mostrando atividade de diferenciação endocondral (setas) junto à superfície da matriz óssea (\*). Observar aspecto normal da medula óssea no interior da matriz (#).



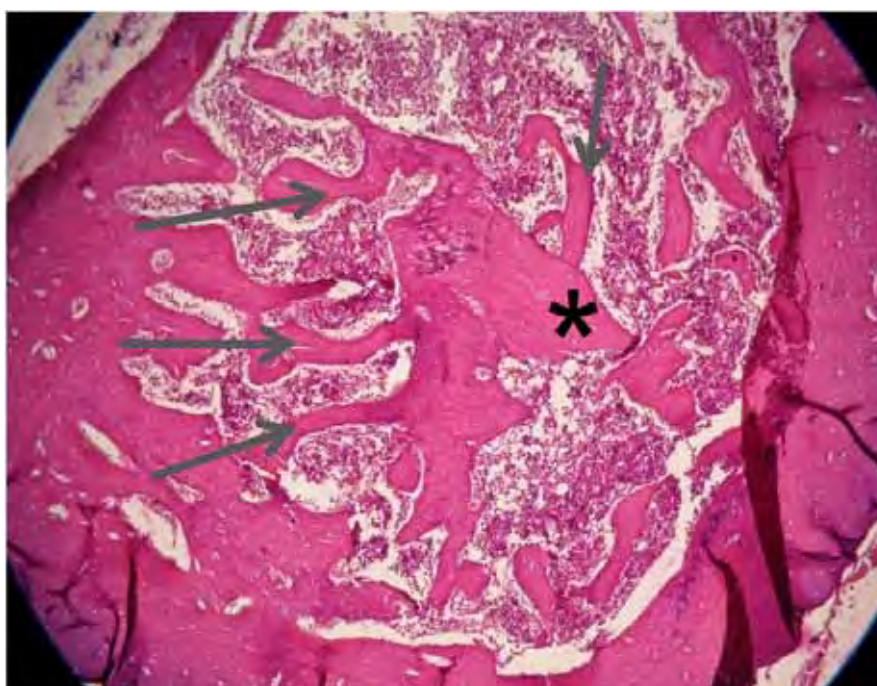
**Figura 4** – Fotomicrografia de 40X de aumento da MOD armazenada em glutaraldeído a 4% com 30 dias pós-operatórios. Imagem mostrando processo de incorporação da matriz (\*) junto à medula óssea, exibindo áreas de processo inflamatório crônico (círculo).



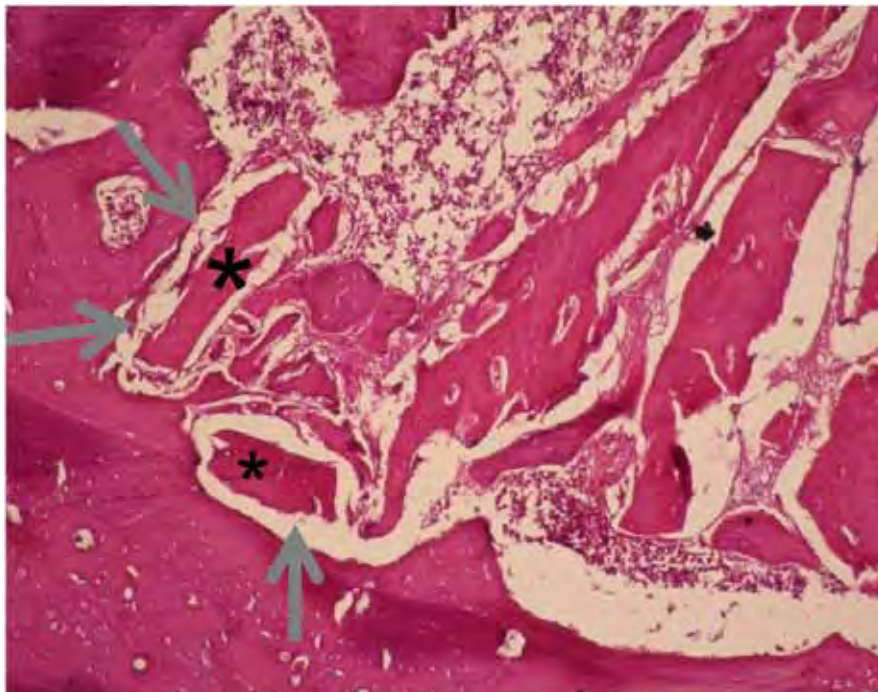
**Figura 5** - Fotomicrografia de 40X de aumento da MOD armazenada em glutaraldeído a 4% com 30 dias pós-operatórios. Imagem mostrando processo de incorporação da matriz (\*) junto à medula óssea, exibindo reabsorção (seta). Não há povoamento celular da matriz, exibe apenas osteoplastos (círculo).



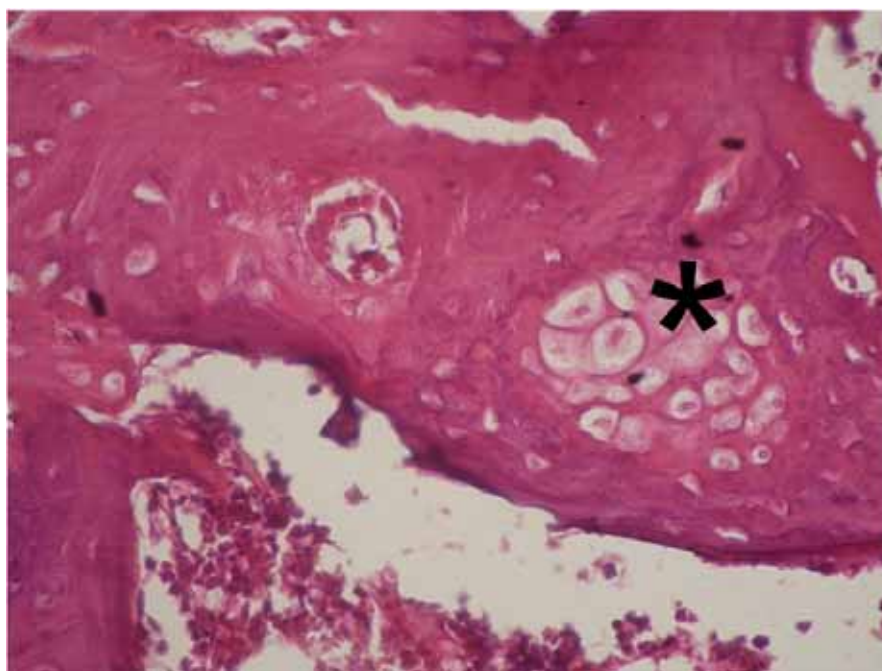
**Figura 6** – Fotomicrografia de 4X de aumento da MOD armazenada em glicerina a 98% com 60 dias pós-operatórios. Imagem mostrando atividade de deposição óssea com trábeculas maduras (setas) unidas ao fragmento de matriz óssea (\*).



**Figura 7** – Fotomicrografia de 4X de aumento da MOD armazenada em glutaraldeído a 4% com 60 dias pós-operatórios. Imagem mostrando processo de incorporação da matriz (\*) junto à medula óssea, exibindo fragmentação e baixa união entre a matriz e o tecido ósseo tibiano do leito e ou neoformado (setas).



**Figura 8** - Fotomicrografia de 40X de aumento da MOD armazenada em glicerina a 98% com 60 dias pós-operatórios. Imagem mostrando atividade de diferenciação endocondral no interior da matriz óssea (\*).



**Figura 9** – Fotomicrografia de 40X de aumento da MOD armazenada em glutaraldeído a 4% com 60 dias pós-operatórios. Imagem mostrando processo de incorporação da matriz óssea (\*) pelo tecido medular mostrando aspecto tecidual de perda de volume por reabsorção (setas).

