

HIDROXIAPATITA SINTÉTICA ASSOCIADA A FATORES DE CRESCIMENTO EM SUBCUTÂNEO DO PAVILHÃO AURICULAR DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA

*Juliana Martins da Silva*¹, *Hudson Armando Nunes Canabrava*²,
*Marcelo Emílio Beletti*³, *Fernanda Mandim Crestana*¹, *Sabrina Vaz dos Santos e Silva*⁴,
*Tânia Berbet Ferreira Lima*⁵

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a eficácia da hidroxiapatita sintética (HA), como carreadora de proteína morfogenética óssea bovina (BMP), plasma rico em plaquetas (PRP) e medula óssea (MO), na formação óssea ectópica, num modelo experimental no pavilhão auricular de coelho. Dois túneis longitudinais subcutâneos foram feitos em cada face externa da orelha dos animais, abrindo, no seu final, uma loja levemente escarificada para a inserção de 5 combinações desses biomateriais: HA+BMP, HA+MO, HA+BMP+MO, HA+PRP e HA+BMP+PRP. Biópsias foram feitas aos 30 e 45 dias pós-implantação para exame em microscopia de luz. A análise histológica demonstrou abundante reação de corpo estranho, caracterizada pela presença de células gigantes multinucleares, em contato direto com o biomaterial, além de pouca neovascularização, bem como mínima reação inflamatória e baixa antigenicidade. Aos 30 e 45 dias pós-implante, houve formação de tecido ósseo ectópico nas associações de HA+BMP+PRP e HA+BMP, respectivamente. Concluiu-se que as associações de HA+BMP+PRP e HA+BMP foram capazes de formar osso ectópico no subcutâneo do pavilhão auricular de coelhos.

Palavras-chave: Pavilhão auricular, BMP, células gigantes, medula óssea, osso ectópico, PRP, coelho.

INTRODUÇÃO

O osso representa o principal elemento de sustentação do corpo. É um tecido mineralizado que possui propriedades mecânicas e capacidade de regeneração. Para a reparação de fraturas ou defeitos ósseos há produção de novo tecido com a mesma organização estrutural do original. No entanto, esta característica é limitada pelo tamanho da lesão, assim defeitos ósseos extensos, provocados por traumas, infecções, neoplasias e anomalias de desenvolvimento que, deixadas ao seu livre curso, não regenerariam ou o faria muito lentamente e de forma incompleta. O reparo destes defeitos representa um desafio em cirurgias ortopédicas e na odontologia (DUARTE DA SILVA et al., 2000; CALIXTO et al., 2001; DONG et al., 2001; HERCULIANI et al., 2000).

Para reconstrução, substituição ou preenchimento dos defeitos ósseos a solução pode ser obtida com a utilização de enxertos ósseos de origens autógena, homogênea e heterogênea. O primeiro mostra disponibilidade limitada de material do local doador, além de que muitas vezes requer hospitalização do paciente, aumentando, assim, os custos. Enquanto os dois últimos apresentam riscos de transmitir infecção e ativar reações imunológicas ao hospedeiro (SCHENK, 1996; TONG et al., 1998; BAUER; MUSCHLER, 2000; DONG et al., 2001; LINDSEY, 2001; ANDRADE et al., 2002).

Em vista das limitações de enxertia óssea

¹ Médica Veterinária. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária/FAMEV. Universidade Federal de Uberlândia/UFU, Uberlândia-MG.

² Médico Veterinário. Professor Adjunto Doutor. Instituto de Ciências Biomédicas, UFU.

³ Médico Veterinário. Professor Associado. Doutor. Instituto de Ciências Biomédicas, UFU.

⁴ Médica Veterinária. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Instituto de Genética e Bioquímica, UFU.

⁵ Odontóloga. Mestre em Ciências Veterinárias, UFU.

têm-se intensificado pesquisas para o desenvolvimento de materiais aloplásticos que apresentem características adequadas de biocompatibilidade e osseointegração (CALIXTO et al., 2001; DONG et al., 2001; LINDSEY, 2001; BAUER; SMITH, 2002). As hidroxiapatitas (HA) puras ou em combinação com outros materiais estão sendo usadas como biomaterial para implantes ósseos. Estas não necessitam de um segundo local cirúrgico, além de serem biocompatíveis. Entretanto não apresentam características osteoindutoras e não contêm células osteoprogenitoras (DONG et al., 2001; BAUER; SMITH, 2002).

Uma alternativa para auxiliar no reparo dos defeitos ósseos seria a utilização de fatores de crescimento (FC) aliados a biomateriais aloplásticos (BARBANTI et al., 2005). Estes são mediadores biológicos que ocorrem naturalmente e regulam a estimulação, proliferação, migração, quimiotaxia, diferenciação e síntese da matriz, via ligação aos receptores específicos de superfície celular. Essas substâncias são liberadas ou ativadas quando da necessidade de divisão celular, ação que ocorre durante eventos como a cicatrização de feridas ou regeneração de tecidos ósseos (GIONNOBILE, 1996; BARTOLD et al., 1992). Dentre os FC mais usados em estudo experimental, estão o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) (FENNIS et al., 2004), que estão presentes em alta concentração no plasma rico em plaquetas (PRP) (MARX et al., 1998), e a proteína morfogênica óssea (BMP).

A medula óssea (MO) apresenta em sua constituição células primordiais indiferenciadas, as células-tronco, que desempenham papel importante na osteogênese; por terem capacidade de auto-renovação e potencial para diferenciarem-se em várias linhagens (BARROS et al., 2001; CONNOLLY, 1995).

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar, de formas comparada e controlada, em ensaios casualizado e cego, a eficácia da hidroxiapatita sintética obtida da calcita (HAP-91), como carreadora de BMP, PRP e MO, na formação óssea ectópica, num modelo experimental no pavilhão auricular de coelho, bem como avaliar a interação destes biomateriais neste sistema biológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se 51 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, da raça Nova Zelândia, brancos,

com idade entre 3 e 5 meses e pesando entre 1,5 a 2,5kg.

Estabeleceu-se cinco grupos de dez (10) animais cada, excetuando-se o último formado por onze (11), submetidos aos seguintes implantes:

Tratamento 1 – HA + BMP

Tratamento 2 – HA + MO

Tratamento 3 – HA + BMP + MO

Tratamento 4 – HA + PRP

Tratamento 5 – HA + BMP + PRP

A hidroxiapatita sintética foi extraída a partir do calcário, preparada com granulometria média de 50 mesh (grânulos de 200 a 300 μ m) e constituída de 70% de hidroxiapatita e 30% de b-trifosfato de cálcio (ANDRADE et al., 2002).

A BMP é um conjunto de proteínas originárias do osso cortical fetal bovino, obtidas pela técnica de Taga; Mulatinho (1999).

Aspirou-se 1,0 mL de medula óssea no tubérculo maior do úmero, com o auxílio de uma agulha hipodérmica 18G, acoplada a uma seringa de 10 mL, contendo 0,5mL (1000 U/mL) de heparina sódica.

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido pela coleta de 4,5 mL de sangue a partir da veia jugular externa, num tubo estéril contendo 0,5 mL do anticoagulante citrato de sódio, que posteriormente foi centrifugado, em uma centrífuga de bancada, conforme protocolo proposto por Sonleitner et al.(2000).

Após anestesia geral dos animais, com o auxílio de uma agulha peridural Tuohy 18G estéril e descartável foram feitos dois túneis longitudinais subcutâneos, medindo aproximadamente 2,5 cm de comprimento, em cada face externa do pavilhão auricular dos coelhos, sendo um medial e outro lateral a artéria auricular média, e abriu-se, em seu final, uma loja levemente escarificada.

Com o subsídio de um cateter intravenoso 10G, também estéril e descartável (BD, São Paulo – SP, Brasil), introduzido pelo túnel subcutâneo, implantou-se em sua porção final $\pm 0,01$ mg dos biomateriais sólidos, HA ou HA + BMP e 0,2 ml dos líquidos (MO ou PRP), de acordo com o que foi preconizado para cada tratamento.

A coleta do material foi realizada aos 30 e 45 dias pós-implante, em ambiente cirúrgico, seguindo-se as técnicas de assepsia. Após anestesia geral, usou-se um trépano com diâmetro 0,5cm, para excisar um fragmento, o qual continha pele externa, material, cartilagem e pele interna da orelha. Para padronização das coletas das amostras, os implantes laterais foram retirados com 30 dias e os mediais com 45 dias.

Os fragmentos do pavilhão auricular coletados foram fixados em formol a 10%, processados em parafina, cortados com 5 μ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscopia de luz.

O estudo dos fragmentos consistiu da contagem de células inflamatórias (polimorfonucleares (PMN), linfócitos e plasmócitos), células gigantes multinucleares tipo corpo estranho (CGMCE) e células de reparação como os fibroblastos. Além da observação quanto a presença (1) ou ausência (0) de formação óssea ectópica (FOE), tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas semelhante a osso primário (OP) e cápsula fibrosa, bem como a mensuração da intensidade da angiogênese (SANADA et al., 2003; FERREIRA et al., 2004). Foram analisados 16 campos por corte, ou seja, analisou-se todo o fragmento da orelha.

Os dados foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon Signed Rank-Sum Test, conforme descrito por Doria Filho (1999), e fixou-se em 0,05 o nível para rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histológica demonstrou abundante reação de corpo estranho caracterizada pela presença de CGMCE, em contato direto com o biomaterial, aliado a hiper celularidade do tecido conjuntivo na região circunvizinha com presença de células semelhantes a fibroblastos, além de pouca neovascularização, mínima reação inflamatória e baixa antigenicidade, as últimas foram caracterizadas pela presença de PMN, linfócitos e plasmócitos.

Houve formação óssea ectópica na associação de HA+BMP (Tratamento 1), no período de 45 dias pós-implantação dos biomateriais. Observou-se também, o desenvolvimento de tecido conjuntivo hiper celularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário, intensa quantidade de CGMCE e maior quantidade de PMN aos 45 dias, além de menor angiogênese quando comparados aos outros biomateriais. Porém, Lima (2003) ao correlacionar os efeitos causados em subcutâneo com o uso de HA sintética pura e em agregação à BMP verificou que as reações destes biomateriais foram muito parecidas, com pouca neovascularização, moderada reação CGMCE, pequena reação inflamatória, alta quantidade de cápsula fibrosa circundando os implantes e ausência de formação óssea ectópica, aos 30

dias. Aparentemente, a pequena neoformação de capilares é uma característica da HA, que pode ser notada ao se comparar o presente trabalho com a os dados de Lima (2003). Talvez, devido a uma pequena diferença de metodologia empregada nesse estudo, que foi a construção de uma loja levemente escarificada no final do túnel, conseguiu-se obter uma menor formação de cápsula fibrosa, pois os biomateriais tiveram maior espaço e menor comprometimento vascular para se alojarem.

Verificou-se que a mistura de HA+MO (Tratamento 2) revelou presença de tecido conjuntivo hiper celularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário, aos 45 dias pós-implante. Maiores quantidades de linfócitos e plasmócitos, aos 30 e 45 dias, respectivamente, caracterizaram uma pequena reação local de antígeno-anticorpo. As CGMCE mantiveram-se em grandes quantidades durante os períodos analisados, o que demonstrou uma bioreabsorção lenta. Isto confere com os achados de Oliveira et al. (2004); Barbanti et al. (2005); Carneiro et al. (2005), porém estes autores responsabilizaram a hidroxiapatita sintética por tal efeito.

Tecido conjuntivo hiper celularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário, também foi observado no período de 45 dias pós-implante, na associação de HA+BMP+MO (Tratamento 3). Esta composição teve maior angiogênese do que a HA+MO (Tratamento 2), sem a proteína BMP, o que faz supor que a adição de BMP promova um acréscimo da neovascularização (MA et al., 2000; MORAN; TOURET, 2001; CROCI et al., 2003; GRANJEIRO et al., 2005; ZAMBUZZI et al., 2005). Notou-se que os linfócitos e plasmócitos, aumentaram, também, aos 30 e 45 dias, respectivamente, causando uma leve reação imunogênica. Isso, provavelmente, pode ter ocorrido em virtude da presença de MO, que, segundo Krebsbach; Robey (2002), é responsável pela hematopoese e precursora dessas células.

Não foi verificada a presença de formação óssea ectópica nos tratamentos 2 e 3 que continham medula óssea em sua composição, o que não concorda com observações feitas por Lucarelli et al. (2003). Estes autores citaram que os enxertos carregados com células mesenquimais originárias da medula óssea, quando implantados em subcutâneo, mostraram formar osso em poucas semanas pós-implantação.

A HA integrado ao PRP, apresentou menor quantidade de PMN, aos 30 dias, e aumento do número de linfócitos, aos 45 dias, revelando intensificação da reação inflamatória crônica. A

angiogênese presente nesta associação foi numericamente, maior, que nos outros implantes durante os períodos pesquisados, o que confere com achados de Marx (2001); Lucarelli et al. (2003). Menores quantidades de CGMCE e fibroblastos foram observados, porém com maior frequência de cápsula fibrosa aos 45 dias pós-implante. O tecido conjuntivo hiper celularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário, também foi observado no período de 45 dias.

O efeito da associação de HA+BMP+PRP foi benéfico, pois formou osso ectópico aos 30 dias (Figura 1), e promoveu uma reparação tecidual mais rápida quando comparada aos outros tratamentos,

provavelmente devido a maior concentração de fatores de crescimento (DAVIES, 2003; TÖZÜM; DEMIRALP, 2003; FERREIRA, 2004). A agregação desses biomateriais promoveu aumento da angiogênese, aos 45 dias. Observou-se presença de pouquíssimas cápsulas, mas estas estavam em maior quantidade, quando comparadas aos outros enxertos. O processo de bioreabsorção tecidual obteve resultado satisfatório, considerando-se a existência de menor presença de biomateriais, CGMCE e fibroblastos, com moderada quantidade de fibras colágenas, entremeados com o enxerto, aos 45 dias.

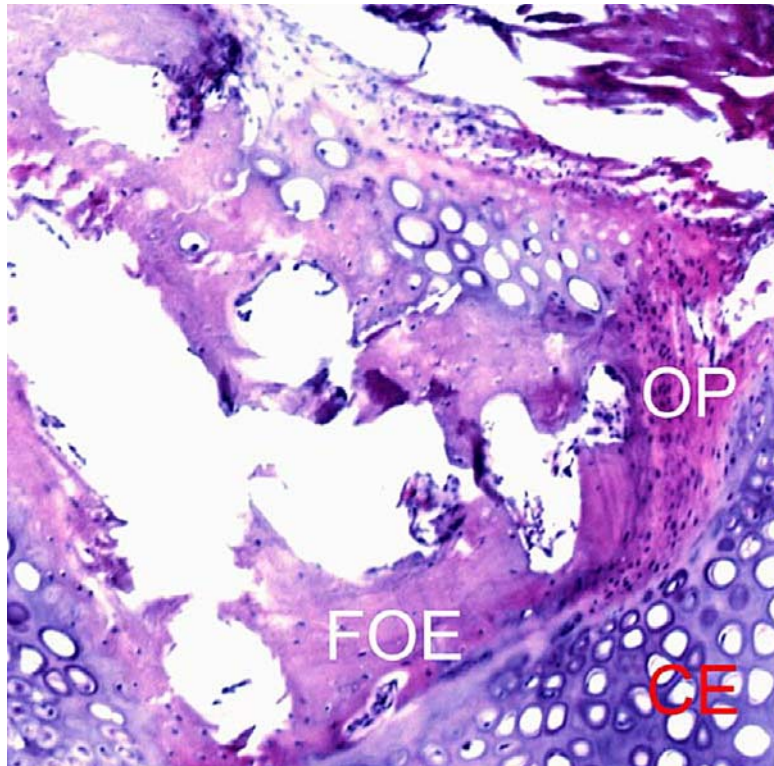


Figura 1. Fotomicrografia em microscopia de luz do pavilhão auricular de coelho visualizando a formação óssea ectópica (FOE). OP = osso primário, CE = cartilagem elástica. HE. 72X.

Os resultados sugerem ausência de reações de rejeição aos implantes, mas sim uma intensa reabsorção destes, uma vez que a rejeição é caracterizada pela reabsorção da periferia do implante sem a substituição por tecido reparador, resposta inflamatória com predominância de linfócitos e tecido fibroso encapsulando o implante, além de ocluir de neovasos com necrose progressiva, bem como pela dor, edema e vermelhidão (ZILIOTO et al., 2003).

Semelhante a citações de Silva et al. (1998), os biomateriais implantados no material que compuseram presente trabalho, mostraram boa biocompatibilidade entre si e com o meio, apesar da presença de reação de corpo estranho.

A bioreabsorção foi satisfatória, apesar de lenta, pois o processo ainda era intenso aos 45 dias de pós-implantação. Provavelmente esse foi um fator que pode ter gerado atraso na formação óssea como sugeriram Sykaras; Opperman (2003);

Salgado et al. (2004), onde foram visualizados tecidos conjuntivos hiper celularizados, semelhantes a osso primário, em maior quantidade aos 45 dias pós-implante.

A HA associada a fatores de crescimento pode formar osso em sítio ectópico, como no pavilhão auricular de coelhos. Esta cerâmica ofereceu uma aceitável armação para o crescimento ósseo, e juntamente com a BMP e o PRP mostraram-se como substitutos ósseos razoáveis, pois foram biocompatíveis, biodegradáveis, osteoindutivos e de natureza osteogênica.

CONCLUSÃO

Houve formação de tecido ósseo ectópico com os implantes de hidroxiapatita e proteína morfogenética bovina (BMP), bem como com a HA, BMP e plasma rico em plaquetas (PRP) no pavilhão auricular de coelho da raça Nova Zelândia.

Synthetic hydroxyapatite associated to a growth factor in external ear subcutaneous in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of New Zeland race.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the synthetic hydroxyapatite as a carrier of bovine bone morphogenetic protein (BMP), platelet-rich plasma (PRP) and bone marrow (BM) in the ectopic bone formation in a rabbit model. Two tunnels were made in the external face of the subcutaneous tissue of each ear in the rabbit, opening in the end a scarified large room to insert five types of associations of biomaterials: HA+BMP, HA+BM, HA+BMP+BM, HA+PRP and HA+BMP+PRP. In 30 and 45 days post-implantations, biopsies were made for evaluation using light microscopy. The histological analysis, showed plentiful reaction of foreign body, characterized by the presence of giant multinucleus cells in direct touch with those biomaterials, as well as a few inflammatory reactions and low antigenicity. In the 30 and 45 days post-implantation occurred formation of ectopic bone tissue in the associations of HA+BMP+PRP and HA+BMP, respectively. It was possible to conclude that associations of HA+BMP+PRP and HA+BMP could produce ear tissue of rabbits.

Keywords: External ear, BMP, giant cell, bone marrow, ectopic bone, PRP, rabbits.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.L.; BORGES, A.P.B.; BICALHO, S.M.C.M. **HAP-91: síntese, caracterização e aplicações**. 3. ed. Belo Horizonte: JHS Laboratório Químico, 2002. 146p.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; A. R.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Bauru, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BARROS, S.V.S.G.; CARLO, R.J.D.; VARGAS, M.I.; GALVÃO, S.R.; MAIA FILHO, A. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea. II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v 31, n. 4, p. 627-632, 2001.

BARTOLD, P.M.; NARAYANAN, A.S.; PACE, R. Platelet derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 27, p. 449-505, 1992.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone graft materials: an overview of the basic science. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 371, p.10-27, feb. 2000.

BAUER, T.W.; SMITH, S.T. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 395, p.11-32, 2002.

CALIXTO, R.F.E.; TEÓFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G.; LAMANO CARVALHO, T.L. Implante de um floculado de resina de manona em alvéolo dental de rato. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 257-262, 2001.

CARNEIRO, E.; GARCIA, R.B.; OLIVEIRA, R.C.; MORAES, F.G.; MENEZES, R.; LETRAA; CANOVA, G.C.; CESTARI, T. M.; GRANJEIRO, J.M. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 13, n. 2, p. 157-162, 2005.

CONNOLLY, J.F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenesis repair. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, n. 313, p. 8-18, 1995.

CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; BITAR, G.; PE-

- REIRA, S.L.B.; MOREIRA, M.; FREITAS Jr., S. Effect of plasma concentrate on bone defects induced in mice fêmurs via stimulation of bone formation: an experimental study. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 230-239, oct./dec. 2003.
- DAVIES, J.E. understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**, Washington, v. 67, n. 8, p. 932-949, august, 2003.
- DONG, J.; KOJIMA, H.; UEMURA, T.; KIKUCHI, M.; TATEISHI, T.; TANAKA, J. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of trasplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 57, n. 2, p. 208-216, 2001.
- DORIA FILHO, U. **Introdução à bioestatística: para simples mortais**. São Paulo: Negócios, 1999. p. 101-110.
- DUARTE DA SILVA, A.B.; RODRIGUES, L.; JORGETT, W.; BESTEIRO, J.M.; FERREIRA, M.C.; GOLÇALVES, C.G.; DOS REIS, L.M. Alterações histológicas em enxerto de osso homogêneo preparado e armazenado com duas técnicas diferentes. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 15, p. 74-77, 2000, Suplemento 13.
- FENNIS, J.P.M.; STOELINGA, P.J.W.; JANSEN, J.A. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous sca olds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 33, p. 48-55, 2004.
- FERREIRA, L.F. **Viabilidade no uso de gel de PRP na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.
- FERREIRA, G.R.; CESTARI, T.M.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 3, p.175-180, 2004.
- GIONNOBILE, W.V. Periodontal tissue engineering by growth factors. **Bone**, New York, v. 19, p. 235-275, 1996.
- GRANJEIRO, J.M.; OLIVEIRA, R.C.; BUSTOS-VALENZUELA, J.C.; SOGAYAR, M.C.; TAGA, R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, v. 38, n. 10, p. 1463-1473, out. 2005.
- HERCULIANI, P.P.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAGA, R. Tratamento de defeitos ósseos perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxertos ósseo bovino desmineralizado. **Revista Brasileira de Implantodontia**, Rio de Janeiro, abr./jun., 2000.
- KREBSBACH, P.H.; ROBEY, P.G. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. **Journal of Dental Education**, Washington, v. 66, n. 6, p. 766-773, 2002.
- LIMA, T.B.F. **Implante de hidroxiapatita sintética, associada ou não a proteínas morfogenéticas ósseas, no subcutâneo da face externa da orelha de coelhos**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.
- LINDSEY, W.H. Osseous tissue engineering with gene therapy for facial bone reconstruction. **The Laryngoscope**, St. Louis, v.111, p.1128-1136, 2001.
- LUCARELLI, E.; BECCHERONI, A.; DONAT, D.; SANGIORGI, L.; CENACCHI, A.; DEL VENTO, A.M.; MEOTTI, C.; BERTOJA, A.Z.; GIARDINO, R.; FORNASARI, P.M.; MERCURI, M.; PICCI, P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. **Biomaterials**, Surrey, v. 24, p. 3095–3100, 2003.
- MA, Q.; MAO, T.; LIU, B.; ZHAO, J.; CHEN, F.; WANG, H.; ZHAO, M. Vascular osteomuscular autograft prefabrication using coral, type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, Edinburgh, v. 38, n. 5 p.561-564, 2000.
- MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and What is not PRP? **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 10, n. 4, p. 225-2228, 2001.
- MARX, R.E.; CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R.M.; SCHIMMELE, S.R.; STRAUSS, J.E.; GEORGEFF,

- K.R. Platelet-rich plasma growth factor enhancement for bone grafts. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.
- MORAN, C.G.; TOURET, L.J. Recent advances: orthopaedics. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 322, p. 902-905, 2001.
- OLIVEIRA, R.C.; MENEZES, R.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.T.; BUZALAF, M.A.R.; GRANJEIRO, J.M. Tissue response to a membrane of desmineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1, p. 3-8, 2004.
- SALGADO, A.J.; COUTINHO, O.P.; REIS, R.L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, Alemanha, v. 4, p. 743-765, 2004.
- SANADA, J.F.; RODRIGUES, J.G.R.; CANOVA, G.C.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAGA, R.; BUZALAF, M.A.R.; GRANJEIRO, J.M. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 11, n. 3, p. 209-215, 2003.
- SCHENK, R.K. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R.K. **Regeneração óssea guiada na implantodontia**. São Paulo: Quintessence, 1996. p.49-100.
- SILVA, C.M.F.; MAIA, F.A.S.; VIAS, R.B.; ROSSA, R. Estudo comparativo entre silicóna e silicóna revestida com hidroxiapatita com fins de inclusão. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 293-297, 1998.
- SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D.Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 15, n. 6, p. 879-882, 2000.
- SYKARAS, N.; OPPERMAN, L.A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? **Journal of Oral Science**, Tóquio, v. 45, n. 2, p. 57-73, 2003.
- TAGA, E.M.; MULATINHO, J. **Biomateriais para uso em odontologia médico-odontológica**. 3 ed. Dentoflex: São Paulo, 1999. 16p.
- TONG, D.C.; RIOUX, K.; DRANGSHOLT, M.; BEIRNE, O.R. A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis. **The International Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 13, n. 2, p. 175-182, 1998.
- TÖZÜM, T.F.; DEMIRALP, B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. **Journal Canadian Dental Association**, Ottawa, v. 69, n. 10, p. 664-664h, Nov. 2003.
- ZAMBUZZI, W.F.; NEVES, M.C.M.; OLIVEIRA, R.C.; SILVA, T.L.; CESTARI, T.M.; BUZALAF, M.A.R.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R.; TAGA, E.M. Reação tecidual e perfil de fosfatases após o implante de matriz óssea desmineralizada xenogênica em músculo de ratos. **Ciência Odontológica Brasileira**, São José dos Campos, v. 8, n. 2, p. 90-98, abr./jun. 2005.
- ZILLOTTO, L.; DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G.; SOUZA, A.P.; DINIZ, P.P.V.P. A limb sparing surgery with the use of a cortical allograft preserved in glicerol: an experimental study in dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.18, n.2, p.107-115, mar./apr. 2003.