

# Estudo prospectivo de um novo substituto ósseo em Odontologia

*Prospective study of a new bone substitute in Dentistry*

Olympio Faissol\*  
Tatiana Fernandes\*\*  
Tatiana Lima\*\*\*  
Eduardo Cruz\*\*\*\*  
Benedicto de Campos Vidal\*\*\*\*\*

## RESUMO

Os avanços recentes da Odontologia, aliados ao aprimoramento dos materiais obtidos através das técnicas de bioengenharia, impulsionaram o desenvolvimento de um novo substituto ósseo, composto por colágeno bovino tipo I e hidroxiapatita. Os autores acompanharam 15 pacientes com diferentes diagnósticos e nos quais foi utilizado o material em questão. Os resultados favoráveis encontrados estiveram de acordo com os resultados de estudo histopatológico e foram atribuídos às características de biocompatibilidade, osteocondução e osteoindução e correlacionados com dados da literatura científica.

**Unitermos** - Hidroxiapatita; Colágeno; Enxertos; Biocomposto; Odontologia.

## ABSTRACT

Recent advances in implantology, allied to bioengineering progress stimulated the development of a new bone substitute, composed by collagen type I and hydroxyapatite. The authors followed 15 patients with different diagnosis and applied the bone substitute described. The favorable results achieved were in agreement with the results of the histologic evaluation and were attributed to the biocompatibility, osteoinduction and osteoconduction and were correlated to others scientific reports.

**Key Words** - Hydroxyapatite; Collagen; Grafts; Biocomposite; Dentistry.

Recebido em: ???/2007

Aprovado em: ???/2007

\* Cirurgião-Dentista; MSc em Prótese pela Universidade de Georgetown - USA.

\*\* Cirurgião-Dentista; Especialista em Endodontia pela ABO.

\*\*\* Farmacêutica; Especialista em Farmacologia pela UFRJ.

\*\*\*\* Farmacêutico; Bioquímico (USP e UFRJ), Diretor de Planejamento da Cryopraxis; Diretor do Combiorio.

\*\*\*\*\* Bioquímico; Pós-Doutor em Patologia pelo Instituto de Patologia da Universidade de Freiburg - Alemanha e pela Fundação de Câncer de Detroit - USA.

## Introdução

A regeneração óssea fisiológica requer quatro componentes: um sinal morfogenético, células do hospedeiro responsivas ao sinal, um carreador adequado que seja capaz de transmitir esta mensagem a sítios específicos e que sirva como arcabouço para o crescimento celular, além de um leito viável e bem vascularizado<sup>1</sup>.

Nas últimas décadas, a partir dos avanços da bioengenharia óssea tecidual, diferentes materiais têm sido sugeridos como substitutos ósseos, no sentido de funcionarem como arcabouço de matriz extracelular e permitirem neoformação óssea. Diversas propriedades são necessárias a estes substitutos, tais como: bioatividade, osteocondução, osteoindução, biocompatibilidade e biodegradação. Adicionalmente, devem ter custos acessíveis e serem facilmente produzidos, moldados e estocados<sup>1-2</sup>.

Os materiais tradicionalmente utilizados para correção de defeitos ósseos são os enxertos ósseos autólogos e alogênicos. Os primeiros trazem em contrapartida a necessidade de uma área doadora, o que implica num procedimento cirúrgico adicional e aumenta a morbidade (dor pós-operatória, possibilidade de hematomas, infecção intercorrente). Sua utilização também é limitada, já que muitas vezes não há material ósseo disponível em quantidade suficiente<sup>3-4</sup>. Por outro lado, a utilização de tecido ósseo obtido de outro indivíduo poderia acarretar o risco de doenças e/ou infecções<sup>1,5-6</sup>, além de provocar a perda de fatores ósseos indutivos<sup>1</sup>. Com o aumento da procura por soluções alternativas, métodos seguros podem oferecer um suprimento rápido e satisfatório em extensas reconstruções maxilomandibulares.

O desenvolvimento e aplicação da engenharia tecidual óssea oferecem soluções alternativas com potencial importante para reconstrução e expansão<sup>7</sup>. Há múltiplas razões clínicas para desenvolver alternativas de engenharia tecidual óssea, incluindo a necessidade de melhores materiais de preenchimento para a reconstrução de defeitos ósseos extensos e a obtenção de implantes mecanicamente mais adequados ao ambiente biológico envolvido<sup>1</sup>. Os obstáculos mais imediatos que devem ser superados por estes biomateriais são a reação de corpo estranho aos arcabouços e a manutenção da morfologia do tecido regenerado sem a obliteração por um processo cicatricial<sup>8</sup>.

A (HA),  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , é uma das biocerâmicas mais freqüentemente utilizadas para reconstrução óssea e dentária<sup>9-10</sup>. Tem excelente compatibilidade com tecido ósseo e alta osteocondutividade. Tal capacidade osteocondutora permite que funcione como arcabouço para formação óssea. Além disto, apresenta importante bioatividade, apesar de sua lenta taxa de degradação<sup>1,5,7</sup>, força mecânica e potencial osteoindutivo<sup>6-7</sup>, não sendo antigênica nem citotóxica<sup>11</sup>.

Sabe-se que é essencial para eficácia dos implantes ortopédicos e odontológicos estabelecer uma interface mecanicamente sólida com uma fusão completa entre a superfície do material e o tecido ósseo, sem a presença de tecido fibroso<sup>1</sup>. A

hidroxiapatita é considerada um material bioativo que permite a osseointegração, pois forma um elo químico direto com o osso subjacente sem a formação de tecido fibroso<sup>12</sup>. A capacidade de se unir ao tecido ósseo é uma propriedade única das cerâmicas bioativas. Análises da interface osso-implante revelaram que a presença da hidroxiapatita é uma das características-chave na zona de união<sup>5</sup>.

A porosidade também desempenha um papel importante para o comportamento celular. Um tamanho suficiente de poros e uma estrutura porosa interconectada são requisitos para o crescimento esquematizado de osteoblastos<sup>13</sup>. Estruturas de polifosfato de cálcio porosas submetidas à sinterização em temperaturas adequadas podem ser produzidas com porosidade de tamanho e geometria adequados ao crescimento ósseo<sup>2</sup>.

O colágeno, por outro lado, é biocompatível, biodegradável e osteoindutor, agindo como sistema de liberação de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)<sup>14-15</sup>, citoquinas capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais em células osteogênicas e condrogênicas<sup>16</sup>. Tem sido confirmado que determinadas BMPs (BMP-2 e/ou BMP-4) aparecem no estágio inicial do processo de consolidação da fratura e parecem estar envolvidas na progressão de uma série de eventos em cascata no reparo ósseo<sup>17</sup>. Através de tais citoquinas, as células enviam mensagens em nível local ou sistêmico, sendo essencial a utilização de materiais carreadores adequados para um sistema de comunicação<sup>10</sup>. O colágeno extraído de pele ou tendão suíno ou bovino, com sua antigenicidade reduzida através de processamento químico, é considerado o padrão-ouro para os carreadores de BMP<sup>17</sup>.

Por ser a proteína mais abundante da porção orgânica do osso, o colágeno desempenha neste tecido papel fundamental na interação célula-matriz, tendo atividade moduladora na proliferação, migração, diferenciação e expressão gênica específica das células. O colágeno do tipo I é uma proteína da matriz extracelular óssea que apresenta propriedades adesivas por conter uma seqüência Arg-Gly-Asp (RGD) que é específica para a fixação dos receptores de membrana celulares dos osteoblastos, como integrinas<sup>6</sup>.

Algumas cerâmicas à base de fosfato de cálcio bovino comercialmente disponíveis têm sido aplicadas *in vitro* e *in vivo* com excelente biocompatibilidade e osteocondução<sup>13,18</sup>. A combinação de colágeno bovino do tipo I com hidroxiapatita sintética e fosfato tricálcio aumentou a formação de tecido ósseo em defeitos radiais de caninos, em comparação com HA e fosfato tricálcio isolados ou associados a aspirado de medula óssea<sup>19</sup>.

Microesferas de HA/colágeno reconstituído estimularam o crescimento de osteoblastos após sete dias de incubação, justificando a utilização destes materiais para o preenchimento de defeitos ósseos<sup>20</sup>.

Os dados apresentados motivaram a elaboração de um substituto ósseo composto por hidroxiapatita e colágeno tipo I de origem bovina por um pesquisador<sup>21</sup>. Este biocomposto foi avaliado previamente em animais, tendo sido demonstrado que

a ordem molecular e as reações geradas do ponto de vista físico-químico dos componentes HA/colágeno tipo I produzem um complexo capaz de enviar sinais para induzir ossificação<sup>21</sup>.

## Proposição

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento de um novo substituto ósseo, composto por colágeno tipo I e hidroxiapatita bovinos, em diversas situações clínico-cirúrgicas em Odontologia, a partir de resultados histológicos obtidos em um estudo pré-clínico.

## Material e Método

Foram acompanhados 15 pacientes no período de 1992 a 2006, com faixa etária entre 17 e 78 anos, de ambos os sexos, cujas características e diagnósticos podem ser observados na Tabela 1. As datas em que foram realizadas as radiografias para o acompanhamento dos casos podem ser observadas na Tabela 2.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Casos	Aplicações	Idade	Sexo	Área envolvida
01	Lesão endoperiodontal	54	Masculino	Elemento 47
02	Lesão endoperiodontal	78	Feminino	Elemento 47
03	Levantamento de seio maxilar	78	Masculino	SUP ESQ
04	Exodontia para colocação de implante	54	Feminino	Elemento 16
05	Bolsa periodontal	48	Feminino	Elementos 24 e 26
06	Lesão endoperiodontal	73	Masculino	Elemento 33
07	Bolsa periodontal	43	Masculino	Elemento 37
08	Lesão endoperiodontal	53	Feminino	Elemento 36
09	Bolsa periodontal	70	Masculino	Elemento 38
10	Cisto ósseo	17	Feminino	INF DIR INF ESQ SUP DIR
11	Exodontia para colocação de prótese fixa	62	Feminino	Elemento 47
12	Levantamento de seio maxilar	50	Masculino	SUP DIR
13	Exodontia para colocação de implante	60	Feminino	INF ESQ
14	Levantamento de seio maxilar	73	Feminino	SUP DIR
15	Exodontia para colocação de prótese fixa	70	Masculino	Elemento 25

TABELA 2 - INDICAÇÕES E DATAS DOS ACOMPANHAMENTOS RADIOGRÁFICOS DOS PACIENTES SUBMETIDOS À ENXERTIA

Casos	Aplicações	Rx Inicial	Rx Enxerto	Rx Controle	Rx Controle
01	Lesão endoperiodontal	02/07/92	06/08/92	07/11/94	01/04/02
02	Lesão endoperiodontal	22/08/94	23/09/94	17/11/03	13/09/05
03	Levantamento de seio maxilar	06/01/97	19/01/97	01/12/97	07/02/01
04	Exodontia para colocação de implante	24/11/97	24/11/97	10/05/99	19/04/06
05	Bolsa periodontal	23/04/99	12/08/99	10/08/04	19/01/06
06	Lesão endoperiodontal	30/04/99	30/04/99	04/06/02	25/04/05
07	Bolsa periodontal	05/11/99	18/11/99	14/01/03	11/11/05
08	Lesão endoperiodontal	11/09/00	15/09/00	13/02/01	30/09/02
09	Bolsa periodontal	19/09/00	25/09/00	09/10/00	07/05/02
10	Cisto ósseo	18/10/01	01/07/02	08/05/03	25/02/05
11	Exodontia para colocação de prótese fixa	08/10/02	13/10/02	01/07/05	
12	Levantamento de seio maxilar	22/10/03	10/11/03	13/12/04	27/12/05
13	Exodontia para colocação de implante	23/03/04	24/03/04	01/09/04	02/09/05
14	Levantamento de seio maxilar	17/02/05	29/03/05	05/05/06	
15	Exodontia para colocação de prótese fixa	28/09/05	03/10/05	22/11/06	

As indicações da aplicação do biomaterial foram variadas, abrangendo situações referentes à bolsa periodontal, cisto ósseo, lesão endoperiodontal, levantamento de seio maxilar e preenchimento de alvéolo após exodontia para colocação de implantes e de prótese fixa.

O material utilizado foi um substituto ósseo composto por colágeno tipo I e hidroxiapatita bovinos, esterilizado por raios gama (Extra Graft XG-13 - Silvestre Labs - RJ/Brasil).

No momento da aplicação, o substituto ósseo foi misturado com cloridrato de lincomicina (Frademicina solução injetável). O local a ser enxertado foi preparado com curetagem convencional para garantir a desbridação completa e remoção de todo material necrótico da região e irrigado com solução salina

estéril. O material foi condensado na área do defeito, seguido do reposicionamento das pontas do tecido no local e sutura em rede para garantir a melhor permanência do enxerto.

Adotou-se tratamento profilático para o pós-operatório imediato e tardio, através da administração de analgésico, antibiótico e cuidados especiais de rotina pós-cirúrgica. Em casos de defeitos ósseos extensos, utilizou-se curativo cirúrgico nos dois primeiros dias pós-operatórios.

Cortes histológicos da utilização deste substituto na calvária e no fêmur de ratos foram anexados a este estudo para complementação da análise do material. Os cortes foram corados através do método padrão hematoxilina-eosina e a birrefringência (propriedade fotoóptica) foi determinada com um microscópio de luz polarizada para detectar a orientação e o estado de agregação das fibras de colágeno.

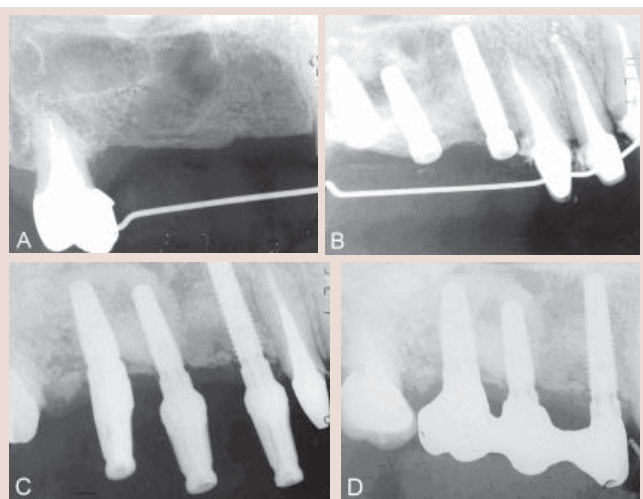
## Resultados

Os resultados foram obtidos a partir do acompanhamento clínico e radiográfico dos pacientes.

Nos quatro casos de lesão endoperiodontal (1, 2, 6 e 8), houve regressão total das lesões, podendo ser constatados inicialmente integração total do enxerto com o osso resultando em aspecto fisiológico.

Os três casos que envolviam bolsa periodontal apresentaram integração do enxerto com imagem sugestiva de remodelação óssea (casos 5, 7 e 9, respectivamente).

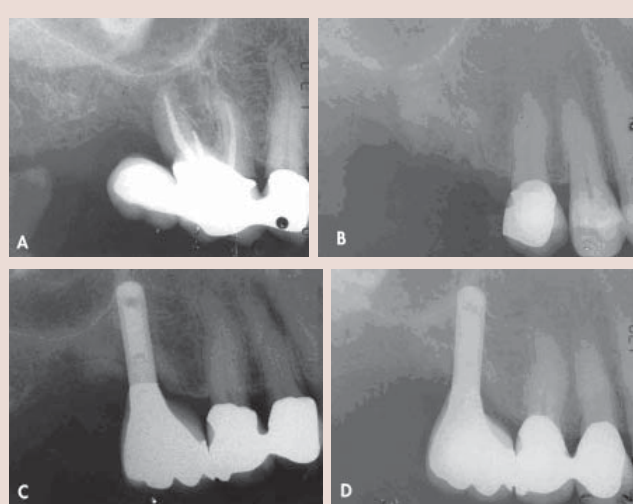
Quando foi realizado o levantamento de seio maxilar nos casos 3, 12 e 14, o material enxertado permitiu a ancoragem dos implantes na mesma sessão clínica. Foram colocados quatro implantes no caso 3, três no caso 12 e dois no caso 14. Em todos os casos, verificaram-se as pontes fixas metalocerâmicas sobre os implantes com a comprovação da resistência mecânica do material (Figura 1).



**Figuras 1**  
Levantamento de seio maxilar.

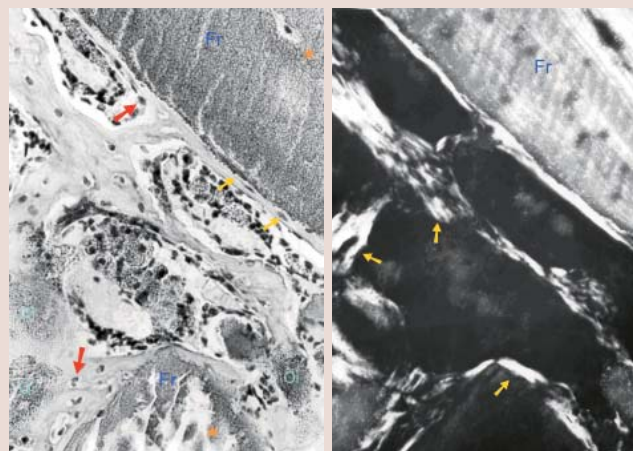
A. Indicação de colocação de implantes B. Enxertia óssea e três implantes colocados na mesma sessão clínica. C. Controle de um ano. D. Controle de dois anos e um mês. Prótese fixa cimentada sobre os implantes.

Nos casos 4 e 13 foram realizados preenchimentos dos alvéolos com o biomaterial imediatamente após a exodontia e foram colocados implantes cinco meses e meio após a enxertia óssea no caso 4 e cinco meses após no caso 13. As radiografias iniciais de controle de ambos os casos evidenciaram a integração total enxerto-implante e as radiografias de controle de oito anos e cinco meses (caso 4) e de um ano e seis meses (caso 13) apresentaram excelentes resultados clínicos com imagem sugestiva de remodelação óssea, conforme Figura 2.



**Figuras 2**

A. Indicação de exodontia do elemento 16. B. Preenchimento do alvéolo com Extra Graft XG-13 imediatamente após a cirurgia. C. 17 meses após a enxertia óssea e 1 ano após a colocação do implante. D. 8 anos e 5 meses após a cirurgia.



**Figuras 3 e 4**

Corte histológico 20 dias após a enxertia com o substituto ósseo na calvária de ratos.

Figura 3 - A zona de implantação no espaço medular demonstra intensa vascularização. O fragmento do material (fr) está circundado por fibroblastos (setas amarelas), osteoblastos (setas vermelhas) e osso imaturo (oi). O fragmento é invadido por osteócitos (estrelas).

Figura 4 - No mesmo campo, foi verificado o estado de agregação das fibras de colágeno através de intensa birrefringência, comprovando a presença de osteoblastos na síntese destas novas fibras (setas amarelas). (HE, 250x).

Os casos 11 e 15 envolveram preenchimento de alvéolo com o biomaterial imediatamente após a exodontia dos elementos dentários. Nas radiografias finais de controle após a enxertia óssea, verificaram-se as próteses fixas cimentadas comprovando

a resistência mecânica do material empregado.

O diagnóstico do caso 10 foi um ceratocisto odontogênico ocorrido em uma paciente com 17 anos de idade. Foi realizado esvaziamento dos cistos e preenchimento com o material utilizado no presente estudo. Após dois anos e sete meses da colocação do substituto ósseo, pôde ser comprovada a eficácia do material no preenchimento dos cistos.

## Discussão

Os enxertos de biomateriais têm sido indicados para o tratamento de defeitos ósseos, buscando novas possibilidades que satisfaçam requisitos necessários à adequada utilização. Os métodos biológicos tradicionais de correção dos defeitos, como a utilização de osso autólogo ou alógeno, apresentam diversas limitações<sup>1,3,4-7,13,17,22</sup>.

A engenharia tecidual óssea tem buscado soluções para gerar um novo tecido ósseo com qualidades mecânicas e funcionais adequadas<sup>1-2</sup>. Dentre os diversos materiais obtidos por técnicas de bioengenharia e disponíveis para uso clínico, a associação de colágeno bovino do tipo I com hidroxiapatita tem sido utilizada para preenchimento de defeitos ósseos, apresentando resultados satisfatórios<sup>9,13,18-20</sup>, aliando a osteoindução e a propriedade adesiva do colágeno à bioatividade superior e osteocondução da hidroxiapatita<sup>9</sup>.

O diâmetro médio ideal das partículas de fosfato de cálcio deve estar entre 200 µm - 500 µm, sendo que partículas inferiores a 50 µm podem induzir citotoxicidade<sup>10,23</sup>. A presença de poros com diâmetro médio de 200 µm - 400 µm funciona como suporte para a invasão vascular e induz migração, adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos no interior dos poros<sup>13</sup>. A presença de interconexões entre os poros é uma importante condição para que os eventos descritos ocorram<sup>13</sup>.

Estudos histológicos e de microscopia eletrônica demonstraram que o composto de colágeno e hidroxiapatita utilizado no presente estudo apresenta macroporosidade ideal, relacionada à interação das partículas de colágeno. Além disto, as ligações fracas dos grupos carbonato à hidroxiapatita têm o potencial de gerar carbonato-HA em partículas de superfície consideradas muito importantes na adesão celular e futuro comportamento celular<sup>9</sup>.

As BMPs apresentam diversas possibilidades de aplicação em Odontologia, por representarem um grupo distinto de fatores indutores, favorecendo a neoformação óssea e o reparo de tecido ósseo<sup>10,14-17</sup>. O colágeno bovino presente no material empregado é considerado o carreador de BMP mais adequado<sup>17</sup>.

Sabe-se que a antigenicidade do colágeno está relacionada à presença de telopeptídeos<sup>6</sup>, que podem ser removidos com tratamentos com pepsina e soluções alcalinas fortes e agentes físico-químicos que induzem as ligações cruzadas do colágeno<sup>6,15</sup>. O presente material utiliza tais procedimentos, o que pode justificar, ao menos em parte, a ausência de processo imunológico ou rejeição contra o mesmo, sendo, portanto,

considerado um biocomposto seguro.

Histologicamente foram vistos osteoblastos penetrando nos fragmentos do material, cujos cristais de HA estavam orientados na mesma direção do osso original. Além disto, foram observados cristais de HA no citoplasma de macrófagos, o que enfatiza a idéia de um processo de reabsorção do material implantado.

A análise da birrefringência permitiu concluir que o biocomposto é dotado de alta ordem molecular e de organização dos cristais, um importante fator no fenômeno do reconhecimento e adesão celular<sup>11,21</sup>.

Clinicamente, o material empregado apresentou-se de fácil utilização, confirmando as qualidades antes descritas por outros autores como um material facilmente modelável, flexível e com alta agregação ao defeito ósseo<sup>6,9</sup>. Tais qualidades tornam este substituto uma opção que simplifica a realização dos procedimentos cirúrgicos, com boa adaptação à área a ser enxertada.

O risco teórico de transmissão de doenças priônicas (encefalopatas espongiformes bovinas, "doença da vaca louca") enfatiza a necessidade de manter padrões adequados de controle de infecção e descontaminação para todos os agentes infecciosos, incluindo prions<sup>4</sup>. Os prions são proteínas que se mostram capazes de auto-replicação apesar de, para isto, alterarem o metabolismo celular. São responsáveis por inúmeras doenças fatais em animais e no ser humano<sup>25</sup>.

A literatura recomenda a imersão do material por uma hora em solução de NaOH 2N, seguida por autoclavagem (360°C/uma hora), relatando que este é um procedimento seguro no que diz respeito à contaminação por prions<sup>26</sup>. O material empregado pode ser considerado de baixo risco, pois foi submetido à aquecimento em solução de NaOH 5% e incinerado por três horas, ampliando as margens de segurança em relação às recomendações padrão.

Acrescido a estes dados, o material foi extraído de gado rastreado, proveniente de área geográfica de baixo risco (no Brasil não há relatos de ocorrência de encefalopatas espongiformes). Outro ponto de relevância são os tecidos bovinos de extração dos materiais, ossos e tendões, considerados também de baixo risco<sup>26-27</sup>.

Pesquisas recentes têm relatado que a esterilização com óxido de etileno pode causar uma resposta inflamatória e reações adversas<sup>28</sup>, além de apresentar baixa penetrabilidade<sup>29</sup>. O substituto ósseo empregado foi esterilizado por raios gama, uma radiação eletromagnética com maior penetrabilidade<sup>29</sup>. O produto é esterilizado na embalagem final e a penetração da radiação assegura a esterilização de todo o seu volume, seja na forma de sólido, líquido ou gel<sup>30</sup>.

Por outro lado, não houve nos casos acompanhados nenhum sinal clínico ou radiográfico de infecção ou outras complicações que comprometessem a qualidade do material utilizado.

## Conclusão

Baseado nos resultados obtidos com a aplicação do substituto ósseo composto por hidroxiapatita e colágeno tipo I, concluiu-se que o material pode ser considerado uma matriz de proliferação celular com propriedades osteocondutoras e, possivelmente, induzir a regeneração óssea, justificando sua utilização.

Ressaltamos que não foram observados sinais de rejeição, infecção ou outras complicações que pudessem ser relacionados

ao uso do substituto ósseo estudado em nenhum dos 15 casos acompanhados.

### Agradecimentos:

Os autores agradecem à Silvestre Labs (BioRio/RJ) pela disponibilização das amostras do material utilizado no presente estudo e à Dra. Paula Dadalti e Dr. Omar Lupi (médicos/UFRJ) pelo apoio científico e valiosas considerações.

### Endereço para correspondência:

**Tatiana Jorge Fernandes**

tatiana-jf@ig.com.br

Tel.: (21) 7837-2785

### Referências

- Burg KLJ, Porter S, Kellan JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21:2347-59.
- Pilliar RM, Fillaggi MJ, Wills JD, Grynblas MD, Kandel RA. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute application – in vitro characterization. *Biomaterials* 2001; 22:963-72.
- Agostini M, Pilatti G. Uso de enxerto de biomateriais em Periodontia. *Rev. ABO Nac* 2000;8(2):116-21.
- Yoshida K, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y et al. Enhancement by recombinant human bone morphogenetic protein-2 of bone formation by means of porous hydroxyapatite in mandibular bone defects. *J Dent Res* 1999; 78(9):1505-10.
- Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999;20:2287-303.
- Hsu FY, Chueh SC, Wang YJ. Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth; *Biomaterials* 1999;20:1931-6.
- Green D, Walsh D, Mann S, Oreffo ROC. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone* 2002;30 (6):810-5.
- Nussenbaum B, Teknos T, Chepeha D. Tissue engineering: the current status of this futuristic modality in head neck reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12:311-5.
- Rodrigues CVM, Serricella P, Linhares ABR, Guerdes RM, Borojevic R, Rossi MA et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:4987-97.
- Sun J-S, Tsuang Y-H, Chang WH-S, Li J, Liu H-C, Fin F-H. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. *Biomaterials* 1996;18:683-90.
- Teixeira RG, Vidal BC, Santos EP. Reposicionamento cirúrgico de um segundo molar inferior direito impactado com cárie – Relato de caso. *Jornal Brasileiro de Ortodontia Facial* 2000 Nov/Dez;30:76-81.
- Zim S. Skeletal volume enhancement: implants and osteotomies. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12:349-56.
- Joschek S, Nies B, Krotz R, Gopferich A. Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials* 2000;21:1645-58.
- Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput* 2000;38: 211-8.
- Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic materials. *Tissue Eng* 2000;6(4):351-9.
- Santos A, Miranda C, Alves M, Faloppa F. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. *Acta Ortop Bras* 2005;13(4):194-5.
- Saito N, Takaoka K. New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:2287-93.
- Açil Y, Terheyden H, Dunsche A, Fleiner B, Jepsen S. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res* 2000;51:703-10.
- Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J et al. Porous ceramic as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res* 1996;14:351-69.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-81.
- Vidal BC. The use of a complex of collagen type I with hydroxyapatite from bone, as a bone implant substitute: an experimental approach. *Tissue Eng* 1996;2(2):151-60.
- Calapodopulos J, Volpon J. Ensaio clínico do enxerto ósseo desmineralizado. *RBO* 1994. [Online] Available from Internet <http://www.rbo.org.br/materia.asp?mt=1342&idIdioma=1>. [cited 5-4-2006].
- Evans EJ. Toxicity of HA in vitro: the effect of particle size. *Biomaterials* 1991;12:574-6.
- Azarpazhooh A, Leake J. Prions in dentistry- what are they, should we be concerned and what can we do? *J Can Dent Assoc* 2006;72(1):53-60.
- Lupi O. Doenças priônicas: Avaliação dos riscos envolvidos na utilização de produtos de origem bovina. *An bras Dermatol* 2003;78(1):7-18.
- Prakash B. Sterilization of prions – Agents of transmissible degenerative encephalopathies. *Bull Hosp Infect Soc India* 1996;1(1):23-4.
- World Health Organization Consultation. WHO Infection Control guidelines for Transmissible Spongiform Encephalopathies. [monograph on the internet] Geneva, Switzerland: World Health Organization Communicable Disease Control; 1999 [cited 24-2-2005]. Available from: URL: <http://www.who.int/csr/resources/publications/bse/whocdscrph2003.pdf>. <<http://www.who.int/csr/resources/publications/bse>>.
- Lomas R, Jennings L, Fisher J, Kearney J. Effects of a paracetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts. *Cell and Tissue Banking* 2004;5:149-60.
- Pinto T, Kaneko T, Ohara M. Controle de produtos estéreis. In: Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo,; 2003. p.122-5.
- Normas do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Available from internet <<http://www.ipen.br/ctr/radioesterilizacao.htm>>. [cited 4-5-2006].