

Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia

Bone Graft Materials and their Application in Dentistry

Talita Souza Dantas^{a*}; Éverton Ribeiro Lelis^a; Lucas Zago Naves^b; Alfredo Júlio Fernandes-Neto^a;
Denildo de Magalhães^a

^a Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil
^b Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, SP, Brasil

* E-mail: talitadantas_@hotmail.com

Recebido: 07 de Fevereiro de 2011. Aceito: 29 de Março de 2011.

Resumo

Diversos materiais e técnicas têm sido utilizados no tratamento da doença periodontal para se conseguir a regeneração dos tecidos perdidos, incluindo cimento, ligamento periodontal e o osso alveolar. O enxerto ósseo e a Regeneração Tecidual Guiada (RTG) são considerados como dois dos mais bem sucedidos métodos de restabelecimento dos tecidos periodontais. Para tal, alguns materiais, denominados biomateriais, são utilizados para estimular a regeneração periodontal. O objetivo deste estudo foi fazer uma revisão da literatura sobre os biomateriais, assim como discutir a sua classificação, utilização e o seu mecanismo de ação. Uma variedade de materiais e técnicas associados pode ser utilizada na regeneração periodontal e vários fatores podem influenciar no resultado da terapia, incluindo características anatômicas e biológicas do defeito, a experiência e competência cirúrgica dos clínicos, os fatores ambientais, como tabagismo e o comportamento do paciente, como cumprimento das instruções pós-operatórias. Assim, a escolha da técnica deve ser orientada por diversos critérios que associados à análise crítica da literatura disponível devem direcionar o clínico a resultados satisfatórios.

Palavras-chave: Materiais Biocompatíveis. Transplante Ósseo. Regeneração Tecidual Guiada.

Abstract

Several materials and techniques have been used in treatment of periodontal disease aiming tissue regeneration, including cementum, periodontal ligament and alveolar bone. The bone graft and Guided Tissue Regeneration (GTR) are considered as the two most successful restoration methods of periodontal tissues. For this purpose, some materials, known as biomaterials, are used to stimulate periodontal regeneration. This study aims to review the published data regarding biomaterials, discussing their classification, applications and its biological and therapeutical action. A wide range of materials and associated techniques can be used in periodontal regeneration and several factors may influence the prognostic, including anatomical and biological characteristics of the defect, the clinician's surgical experience and competence, environmental factors, such as smoking and other patients' behaviors, as observance with postoperative recommendations. The results of the use of biomaterials are satisfactory when used in case-sensitive situation for its recommended applications.

Keywords: Biocompatible Materials. Bone Transplantation. Guided Tissue Regeneration.

1 Introdução

A utilização de materiais sintéticos para substituir, aumentar ou reparar tecidos biológicos sempre foi alvo de preocupação e que remete a muitas pesquisas, quer seja na área médica ou odontológica¹.

A importância do tecido ósseo no âmbito médico e odontológico é tão grande que as estatísticas mostram que mais de 500 mil enxertias são realizadas anualmente nos EUA^{2,3} e 2,2 milhões no mundo inteiro para o reparo de defeitos ósseos, fazendo com que esse tecido seja o segundo mais transplantado na atualidade.

Há enorme diversidade de biomateriais que se diferem pelo modo de aplicação, tempo de permanência em contato com os tecidos e o material utilizado para sua fabricação. A variedade de aplicações destes materiais compreende desde implantes dentários ou de articulações, como o joelho, placas e parafusos ortopédicos, até válvulas cardíacas, lentes de

contato, aparelhos intrauterinos, fios de sutura, enchimentos para cirurgia plástica e inúmeros outros⁴.

Várias razões clínicas justificam o desenvolvimento dos biomateriais, especialmente quando se trata de defeitos ósseos, em que se objetiva o preenchimento de áreas extensas, por meio de enxerto, ou mesmo de implantes, seja na área médica ou odontológica⁵.

De ampla utilização, em diversas áreas, na odontologia os biomateriais também se destacam nas terapias periodontais de cunho regenerativo. Sendo amplamente pesquisados e utilizados na tentativa de recuperar os tecidos periodontais perdidos, com bloqueio da entrada de células indesejáveis no leito cirúrgico, potencializando os processos de reparo através do uso simples ou combinado de mais de um biomaterial⁶.

Para que um biomaterial possa ser usado de forma bem sucedida, algumas condições devem ser observadas, tendo-se em vista que este deve ser biocompatível, não causando, portanto, danos locais ou sistêmicos, além de não ser tóxico,

carcinogênico ou radioativo⁵. Somado a isso, um biomaterial ideal deve ser fabricável, esterilizável e estável durante sua aplicação ou implantação, quando for o caso⁷.

A evolução dos biomateriais é recente e está intimamente relacionada ao fato de ser multidisciplinar, assim, depende dos avanços de várias áreas do conhecimento, de maneira global da biotecnologia e da ciência dos materiais⁸.

2 Desenvolvimento

2.1 Classificação

A regeneração tecidual é um termo usado para descrever um reparo que leva a completa restauração da morfologia e função do tecido afetado⁹. Nesse sentido, o reparo ósseo envolve fenômenos tanto de regeneração quanto de cicatrização dependendo da injúria. Apesar de o tecido ósseo apresentar alto potencial de reparo, defeitos ósseos podem não cicatrizar com tecido ósseo¹⁰. Para facilitar o reparo, materiais de enxerto ósseo podem ser colocados nos defeitos.

Os vários enxertos e materiais utilizados até agora podem ser classificados quanto a sua composição e comportamento biológico. Quanto a composição pode-se considerar que os enxertos autógenos são transplantados de um lugar para outro no mesmo indivíduo, sendo então, gradualmente reabsorvidos e substituídos por novo osso. Assim, problemas de histocompatibilidade e transmissão de doenças são eliminados com esses enxertos¹¹. São os únicos entre os tipos de enxerto ósseo a fornecer células ósseas vivas imunocompatíveis que são responsáveis pela proliferação das células ósseas, assim, quanto mais células vivas forem transplantadas, mais tecido ósseo será formado. Os enxertos autógenos podem ser obtidos de diferentes regiões do corpo, sendo a crista do osso ilíaco, a calota craniana, a tibia, as costelas e a mandíbula as áreas doadoras de eleição¹².

Os enxertos autógenos intra-orais têm sido comumente utilizados na cirurgia periodontal regenerativa e podem ser obtidos de regiões edentadas da mandíbula, de regiões de extração em processo de cicatrização, de tuberosidades maxilares ou da área retromolar da mandíbula¹¹.

Nos enxertos autógenos extra-orais, outras regiões doadoras bastante utilizadas são as costelas, e principalmente a região de crista do osso ilíaco. A calvária também é uma região utilizada com altos índices de sucesso¹³. No entanto, requerem a internação hospitalar, que além do risco de infecção, tornam este tipo de enxerto mais complicado¹⁴. As desvantagens de enxertos autógenos são a quantidade de material de enxertos disponíveis e a morbidade associada à sua colheita. Essas desvantagens levaram ao desenvolvimento de uma diversidade de materiais de enxerto que podem ser potenciais substitutos para os enxertos autógenos¹⁵.

Os aloenxertos são enxertos transplantados entre indivíduos da mesma espécie, porém diferentes geneticamente. Foram utilizados na tentativa de estimular a formação óssea em defeitos infra-ósseos para evitar a agressão cirúrgica adicional

associada ao uso de enxertos autógenos. No entanto, o uso de aloenxertos envolve certo risco com relação à antigenicidade, embora os aloenxertos sejam usualmente pré-tratados por congelamento, radiação ou agentes químicos, visando evitar reações de corpo estranho¹¹. Os tipos de aloenxertos usados são o osso trabecular e medular ilíacos congelados, enxertos de osso mineralizados congelado seco (FDBA) e enxertos de osso descalcificado congelado seco (DFDBA)¹⁵. São consideradas vantagens o uso exclusivo de anestesia local, ou seja, evitando procedimento cirúrgico hospitalar como no caso de coleta do osso da crista ilíaca, reduzindo assim os custos da intervenção e a disponibilidade de grandes quantidades de material para enxerto. Como desvantagem a possibilidade de transmissão de doenças e potencial antigênico¹⁵.

Os enxertos ósseos xenógenos são aqueles retirados de espécie e transplantados para outra. As diferenças antigênicas desses enxertos são mais pronunciadas do que no osso alo gênico. Exigem tratamento mais vigoroso do enxerto para prevenir rápida rejeição. O exemplo mais comum empregado na odontologia é o enxerto ósseo bovino liofilizado¹⁶. Recentemente, novos métodos de processamento e purificação têm sido utilizados, possibilitando a remoção de todos os componentes orgânicos do osso bovino utilizado como matéria prima, deixando uma matriz óssea não-orgânica em forma inorgânica inalterada. No entanto, existem diferenças nos métodos de purificação e manipulação do osso bovino, resultando em produtos comerciais com diferentes propriedades químicas e possivelmente, diferentes comportamentos biológicos. Esses materiais estão disponíveis em partículas de tamanhos diferentes ou em blocos¹¹. Outros animais têm sido estudados para prover matéria-prima para confecção de biomatérias como ovelha e o cavalo. Além de utilizar mamíferos, como fonte de matéria-prima, outros seres vivos apresentam propriedades de interesse para a engenharia tecidual, como as cascas de ovos de aves e conchas marinhas¹⁷.

Os aloplásticos são materiais de implante sintéticos ou inorgânicos utilizados como substitutos aos enxertos ósseos. Esses materiais sintéticos são inertes com nenhuma ou pouca atividade osteoindutora¹⁵.

Subdivididos em reabsorvíveis ou não absorvíveis, esse tipo de material vem ganhando cada vez mais aceitação no mercado em razão do fácil uso e manipulação e por diminuir a morbidade do sítio doador do enxerto¹⁸. Outros benefícios dos materiais aloplásticos são diminuição do tempo cirúrgico, além de múltiplos tamanhos e formatos disponíveis. Como desvantagens, esses tipos de materiais correm o risco de rejeição seguida de infecção, com necessidade de nova intervenção cirúrgica. Nesses casos, materiais reabsorvíveis são preferidos, pois estudos mostram que alguns materiais não reabsorvíveis podem causar reações a longo prazo¹⁹.

Na odontologia, os materiais aloplásticos mais comumente utilizados incluem: hidroxiapatita (HÁ), beta-fosfato-tricálcio (β -TCP), polímeros, vidros bioativos e metais^{11,20}.

O uso da hidroxiapatita (HA) tem sido muito pesquisado desde seu surgimento como biomaterial, em 1970. A HA é um fosfato de cálcio hidratado, principal componente (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos. A hidroxiapatita é o material presente nos vertebrados, compondo o esqueleto ósseo e atuando como reserva de cálcio e fósforo. Entre as indicações de uso está o reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas; aumento de rebordo alveolar; regeneração guiada de tecidos ósseos; reconstrução bucomaxilofacial; reparo e substituição de paredes orbitais; e substituição do globo ocular²⁰.

As hidroxiapatitas de origem sintética ou natural têm recebido atenção especial pela sua semelhança estrutural, química e física com a matriz mineral óssea. Além de não induzir qualquer reação imunológica ou tóxica indesejável, ao contrário de alguns materiais de origem orgânica²¹. Talvez a característica mais importante da HA seja a osteocondutividade, a qual induz crescimento ósseo no interior do enxerto, promovendo a estabilidade e manutenção do volume do implante. As preparações de HA têm sido apresentadas em forma de cerâmicas, comercializadas como formas densas ou porosas, blocos e grânulos. A forma porosa promove osseointegração mais consistente, resultando na formação de união forte entre o enxerto e osso adjacente¹⁹. No entanto sua reabsorção é muito lenta, o que pode dificultar a remodelação óssea²².

Beta-fosfato-tricálcio (β -TCP): β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) é um típico substituto ósseo sintético utilizado na odontologia em uma série de casos para tratamento de lesões ósseas periodontais, bem como na cirurgia bucomaxilofacial. Caracterizado por sua excelente osteocondução e biocompatibilidade devido a semelhança química e cristalográfica a apatita humana²³, o β -TCP não tem mostrado efeito adverso sobre a contagem celular, viabilidade e morfologia e pode fornecer uma matriz que privilegia a proliferação celular limitada in vitro¹⁵. Comercialmente o β -TCP disponível em blocos tem sido utilizado na prática clínica devido a sua facilidade de manipulação e capacidade de regenerar quantidade adequada de osso²³.

Existem dois materiais poliméricos que vem sendo utilizados como materiais substitutos de enxertos ósseos no tratamento de defeitos ósseos: copolímero não-reabsorvível de polimetilmetacrilato coberto por hidróxido de cálcio (PMMA) e poli(hidroxi)etilmetacrilato (PHEMA), geralmente chamado de HTR e um polímero reabsorvível de ácido polilático (PLA)^{11,22}.

Vidros Bioativos (Biovidros) são compostos de SiO_2 , Na_2O , P_2O_5 . Quando os biovidros são expostos a líquidos teciduais, uma dupla camada de sílica em gel e fosfato de cálcio é formada na sua superfície. Através dessa camada, o material proporciona absorção e concentração de proteínas usadas pelos osteoclastos para formar a matriz celular, a qual teoricamente, pode promover a formação óssea¹¹.

Com relação aos metais, o titânio, em termos químicos, apresenta-se como material muito similar ao cálcio (elementos número 22 e 20 da tabela periódica, respectivamente). A partir dessa similaridade com o cálcio, o titânio apresenta excelente biocompatibilidade, bem como boa osseointegração ao organismo quando justaposto ao osso. No entanto têm algumas desvantagens, como dificuldade de remoção, se necessário em caso de infecção²⁰.

Quanto ao comportamento dos tecidos frente aos biomateriais, estes podem ser considerados bioinertes, biotolerados, bioativos ou reabsorvíveis. Os bioinertes não provocam reação de corpo estranho no organismo e estão em contato direto com o tecido receptor (p. ex., titânio, zircônia e alumina). Os biotolerados são moderadamente aceitos pelo tecido receptor não estabelecendo a osseointegração verdadeira, levando a formação de cápsula fibrosa, geralmente delgada, acelular e contínua. Sendo que a formação de tecido fibroso é interpretada como resposta do tecido ao material, que estimula as células adjacentes a sintetizar, secretar e manter um tecido conjuntivo na interface (p. ex., aço inoxidável, ligas Cr-Co e polimetilmetacrilato (PMMA)). Já os bioativos não só estabelecem osseointegração direta, como também interagem com os tecidos vizinhos de forma a estimular a proliferação de células, a síntese de produtos específicos e a adesão celular (p. ex., hidroxiapatita (HA) e biovidros). Por fim os reabsorvíveis que são lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos tecidos (p. ex., fosfato tricálcio (TCP) e biovidros)^{23,24}.

2.2 Mecanismos de ação

Os mecanismos de ação apresentados pelos biomateriais também são utilizados para a classificação dos mesmos, podendo ser osteoindutores, osteocondutores, osteogênicos ou osteopromotores¹¹.

Os materiais osteoindutores possuem capacidade de atrair células mesenquimais indiferenciadas, que diferenciarão em osteoblastos aumentando o crescimento ósseo. Isto ocorre devido à presença de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) entre seus componentes^{11,25}.

A osteocondução caracteriza um material que permite a aposição de novo tecido ósseo, a partir de osso pré-existente, funcionando como arcabouço para as células osteoprogenitoras se fixarem e atuarem com a participação de vasos sanguíneos proliferados que levam os componentes necessários à formação óssea²⁶.

A osteogênese refere-se a materiais orgânicos capazes de formar osso diretamente a partir de osteoblastos²⁷, um exemplo é o enxerto autógeno.

Os materiais osteopromotores são caracterizados pelo uso de meios físicos que promovem o isolamento anatômico de um local, permitindo a seleção e a proliferação de um grupo de células, predominantemente osteoblastos a partir do leito receptor e, simultaneamente, impedem a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração²⁸.

2.3 Uso de técnicas combinadas

Os procedimentos cirúrgicos e a reconstrução periodontal apresentam melhoras significativas no tratamento dos defeitos intra-ósseos quando comparado com outras modalidades disponíveis atualmente. A literatura mostra que os ganhos pós-cirúrgicos iniciais são mantidos por 3 a 5 anos em pacientes que concordam com o programa de manutenção normal. Uma gama de materiais forneceu resultados similares de regeneração, sendo que a combinação desses materiais com membranas reabsorvíveis, plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento derivados do plasma parecem fornecer benefícios adicionais. Propõe-se a combinação de várias técnicas na tentativa de melhorar os resultados²⁹.

Em 1988 uma técnica combinada foi descrita usando material de enxerto, condicionamento radicular com ácido cítrico e recobrimento com membrana não reabsorvível (a única disponível no momento)⁷. Mais recentemente, com o advento dos agentes de osteopromoção, como os derivados da matriz de esmalte e materiais de enxerto ósseo inorgânico derivado de boi, outras técnicas combinadas foram propostas. O uso combinado desses produtos juntamente com osso autógeno e com cobertura de membrana reabsorvível resultou no aumento de casos com nova inserção e reconstrução periodontal bem sucedida²⁹.

A escolha da técnica deve ser orientada por alguns critérios. Os resultados clínicos dependem: 1) da dimensão e morfologia do defeito (defeitos profundos resultam em maior preenchimento ósseo do que os rasos); 2) do número de paredes do defeito (defeitos de três paredes possuem maior potencial de preenchimento do que defeitos de 2 ou 1 parede); 3) da quantidade de superfície radicular exposta e da capacidade de obter adequada cobertura radicular; e 4) do ângulo do defeito com o longo eixo do dente (quanto menor o ângulo maior a chance e sucesso)³⁰.

3 Conclusão

Diante da revisão pode-se concluir que os enxertos autógenos continuam sendo o material de escolha no tratamento de perdas ósseas. No entanto, suas desvantagens relacionadas principalmente à morbidade do procedimento e a quantidade de material enxertivo disponibilizada limita sua utilização. Assim, os enxertos ósseos com materiais sintéticos se tornaram comuns, de maneira que a indicação e a escolha dos variados tipos disponíveis no mercado estão diretamente ligadas às vantagens e limitações de cada um bem como a habilidade do cirurgião dentista e sua preferência pessoal.

Assim, o futuro das técnicas de reconstrução periodontal dependerá do surgimento de novos produtos, que levarão a resultados positivos previsíveis quando usadas em combinação adequada aos defeitos selecionados. O clínico deve diferenciar técnicas que foram extensivamente estudadas e com resultados aceitáveis, daquelas que ainda são experimentais, embora promissoras, visto que, os profissionais utilizam biomateriais

desconhecendo riscos e efeitos adversos, distanciando-se do princípio da beneficência. Artigos de pesquisas devem ser criticamente avaliados para adequação dos controles, seleção dos casos, métodos de avaliação e resultados pós-operatórios em longo prazo.

Referências

1. Almeida-Filho E, Assis CM, Versick LO, Guastaldi AC. Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de TI-CP modificada por asperção térmica. *Quím Nova* 2007;30(5):1129-2
2. Cheung C. The future of bone healing. *Clin Podiatr Med Surg* 2005;22(4):631-41.
3. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Tran A Math Phys Eng Sci* 2004;362(1825):2821-50.
4. Helena MPG. Avaliação do comportamento a corrosão e da citocompatibilidade de uma liga ortopédica de Co-Cr-Mo. Lisboa: Universidade de Lisboa; 1995.
5. Amaral MB. Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana. São Carlos: USP; 2006.
6. Buso AM. Avaliação clínica do uso de membrana xenógena absorvível impregnada com tetraciclina em pacientes com doença periodontal crônica avançada. Uberlândia: UFU; 2005.
7. Schallhorn RG, McClain PK. Combined osseous composite grafting, root conditioning, and guided tissue regeneration. *Int J Periodontics Restor Dent* 1988;8(4):8-31.
8. Matsui M. Correlações entre estrutura química, superestrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano. Curitiba: UFPR; 2007.
9. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res* 1967;53:243-83.
10. MavrogenisAF, DimitriouR, ParviziJ, BabisGC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Interact* 2009;9(2):61-71.
11. Lindhe J, Karring T, Long NP. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
12. Ellis E. Reconstrução cirúrgica dos defeitos maxilares. In: Peterson LJ. Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.663-75.
13. Iizuka T, Smolka W, Hallermann W, Mericske-Stern R. Extensive augmentation of the alveolar ridge using autogenous calvarial split bone grafts for dental rehabilitation. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(5):607-15.
14. Zijdeveld SA, Schulten EA, Aartman IH, Bruggenkatte CM. Long-term changes in graft height after maxillary sinus floor elevation with different grafting materials: radiographic evaluation with a minimum follow-up of 4.5 years. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(7):691-700.
15. Precheur HV. Bone graft materials. *Dent Clin North Am* 2007;51(3):729-46.
16. Ellis E. Reconstrução cirúrgica dos defeitos da mandíbula. In: Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR. Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.606-16.
17. Almeida U. Análise e utilização de biomaterial confeccionado a partir das conchas de *Crassostrea Gigas* em defeito periodontal em ratos. Curitiba: Universidade Positivo; 2010.
18. Potter JK, Ellis E. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(10):1280-97.
19. Shindo ML, Costantino PD, Friedman CD, Chow LC. Facial

- skeletal augmentation using hydroxyapatite cement. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1993;119(2):185-90.
20. Pinto JGS, Ciprandi MTO, Aguiar RC, Lima PVP, Hernandez PAG, Silva Júnior AN. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. RFO UPF 2007;12(3):79-84.
 21. Dalapicula SS, Junior GMV, Conz MB, Cardoso ES. Characteristics physicochemical of the biomaterials used of bone grafts. A critical review. Implant News 2006;3(5):487-91.
 22. Truedsson A, Wang JS, Lindberg P, Gordh M, Sunzel B, Warfvinge G. Bone substitute as an on-lay graft on rat tibia. Clin Oral Implants Res 2010;21(4):424-9.
 23. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. Biomaterials 2010;31(7):1465-85.
 24. Hanes PJ. Bone replacement grafts for the treatment of periodontal intrabony defects. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 2007;19(4):499-512.
 25. Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. J Biomed Mater Res 1998;41(4):511-8.
 26. Kirkpatrick CJ, Mittermayer C. Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro. J Mater Sci Mater Med 1990;1:9-13.
 27. Marx RE. Bone and bone graft healing. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 2007;19(4):455-66.
 28. Gatti AM, Monari E, Poli G, Galli E. Clinical long-term evaluation of hydroxyapatite granules implantation in periodontal defects. Key Eng Mater 2001;192-5:921-24.
 29. Marx RE, Saunders TR. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In: Fonseca RJ, Davis WR. Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery. Philadelphia: Saunders; 1986. p.347-428.
 30. Novaes JR. Recursos e soluções em implantes. São Paulo: Artes Médicas; 2000. p.447-66.

