

FERNANDO LUIZ ZANFERRARI

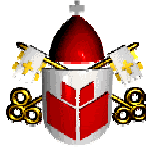
**REAÇÕES ÓSSEAS A IMPLANTES DE
CIMENTO PORTLAND EM FASE SÓLIDA**

**CURITIBA
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

FERNANDO LUIZ ZANFERRARI

REAÇÕES ÓSSEAS A IMPLANTES DE CIMENTO PORTLAND EM FASE SÓLIDA

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração em Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Denis Martins

**CURITIBA
2006**

Zanferrari, Fernando Luiz
Z28r Reações ósseas a implantes de cimento Portland em fase sólida / Fernando
2006 Luiz Zanferrari ; orientador, Wilson Denis Martins. – 2006.
xii, 54 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2006
Inclui bibliografia

1. Implantes dentários. 2. Implantes dentários osseointegrados. 3. Cimento
Portland. I. Martins, Wilson Denis. II. Pontifícia Universidade Católica do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 21.ed. – 617.69



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Curso de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


TERMO DE APROVAÇÃO


FERNANDO LUIZ ZANFERRARI

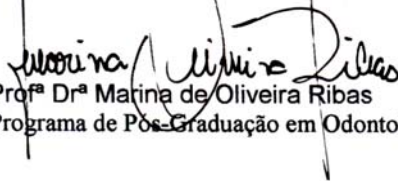
REAÇÕES ÓSSEAS A IMPLANTES DE CIMENTO PORTLAND EM FASE SÓLIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia.

Orientador(a):


Prof. Dr. Wilson Denis Benato Martins
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Marília Gerhardt de Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS


Profª Drª Marina de Oliveira Ribas
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Curitiba, 11 de dezembro de 2006.

DEDICATÓRIA

Dedico o trabalho à minha família por sempre me apoiarem nos momentos difíceis da caminhada. Ao meu pai Gentil Zanferari, minha mãe Maria Sini Baron Zanferrari e meu irmão Alexandre Zanferrari. Em especial à minha esposa Maria Luiza e aos meus filhos João Pedro e Gabriela. Este trabalho foi fruto do empenho de todos. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por permitir a realização de tudo em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilson Denis Martins que me ensinou, como um amigo, a percorrer os caminhos da Ciência, meu muito obrigado por sua compreensão, paciência, sabedoria, respeito e principalmente obrigado por acreditar em mim.

A Prof^a. Dr^a. Marina de Oliveira Ribas que esteve sempre presente em todos os momentos deste trabalho colocando suas idéias e colaborações e acima de tudo pelo incentivo e respeito, meu muito obrigado.

A Prof^a. Dr^a. Lúcia de Noronha Doutora em Patologia PUCPR, por sua paciência, atenção e respeito dedicado a mim durante a realização deste trabalho, muito obrigado.

A Ana Paula Camargo Martins, Bióloga e Técnica responsável pelo laboratório de Patologia experimental PUCPR, Misael Gomes Barbosa, auxiliar técnico do laboratório de Cirurgia experimental PUCPR e Álvaro Roberto G. Machado, auxiliar técnico do laboratório de Cirurgia experimental PUCPR, por estarem sempre dispostos a nos atender em todos os momentos deste trabalho, muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODO	14
3.1 Amostra selecionada	15
3.2 Método	15
3.2.1 Corpos de prova	15
3.2.2 Procedimentos cirúrgicos	17
3.2.3 Morte dos animais	20
3.2.4 Processamento dos espécimes	20
3.2.5 Macroscopia	22
3.2.6 Microscopia	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Grupo I – 15 dias – HE	24
4.2 Grupo II – 30 dias – HE	26
4.3 Grupo III – 45 dias – HE	28
4.4 Grupo IV – 60 dias – HE	30

4.5 Grupo V – 90 dias – HE	32
4.6 Grupo VI – 120 dias – HE	34
4.7. Outras colorações	36
4.7.1 Hematoxilina fosfotúngstica	36
4.7.2 Alizarina 4.2	38
4.7.3 Picrosirius red	38
5 DISCUSSÃO	40
5.1 Espécimes analisados em HE	41
5.2 Outras colorações	43
Hematoxilina fosfotúngstica	43
Alizarina 4.2	44
Picrosirius red	44
6 CONCLUSÕES	45
7 REFERÊNCIAS	47
8 ANEXOS	52
Anexo A	53
Anexo B	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABCP	Associação Brasileira de cimento Portland
ATM	Agregado trióxido mineral
Al_2O_3	Óxido de alumínio
Ca^{++}	Íon cálcio
$Ca(OH)_2$	Hidróxido de cálcio
$CaCO_3$	Carbonato de cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CO_2	Gás carbônico
Fe_2O_3	Óxido de ferro
IRM	Material restaurador intermediário
K_2O	Óxido de potássio
Na_2O	Óxido de sódio
MgO	Óxido de magnésio
$(OH)^-$	Íon hidroxila
SO_3	Óxido de enxofre
SiO_2	Óxido de Silício

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Proporção pó e líquido (3:1)	16
FIGURA 2. Cimento manipulado	16
FIGURA 3. Material acondicionado no molde	16
FIGURA 4. Detalhe do molde	17
FIGURA 5. Corpo de prova	17
FIGURA 6. Corpo de prova	17
FIGURA 7. Incisão e acesso ao periósteeo	18
FIGURA 8. Colocação subperiósteeo	19
FIGURA 9. Implante <i>in situ</i> coberto pelo periósteeo. Notar a incisão parasagital (seta).	19
FIGURA 10. Espécime contendo o implante (Vista superior)	21
FIGURA 11. Espécime contendo o implante (Vista inferior)	21
FIGURA 12. Desenho do plano de corte do espécime	22
FIGURA 13. Implante (I) de cimento Portland aposto na cortical externa (CE), Fibrina (Fi), tecido de granulação (Tg), fibrose (Fo), endósteeo (E), periósteeo (P), cortical interna (CI) (15 dias, HE 40X)	25
FIGURA 14. Área destacada mostrando as faixas centrípetas. Fibrose (Fo), tecido de granulação (Tg), fibrina (Fi). Implante (I) e cortical externa (CE) (15 dias, HE 200X)	25
FIGURA 15. Região inferior esquerda (30 dias HE 40X)	26
FIGURA 16. Tecido ósseo lamelar neoformado (ON) na região inferior direita que se estende para a parte superior do implante. (30dias, HE 40X)	27
FIGURA 17. Destaque mostrando o tecido ósseo lamelar neoformado (ON), anel de osteoblastos (seta), faixa de fibrose (Fo), tecido de granulação (Tg), faixa de deposição de fibrina (Fi). (30 dias, HE 200X)	27
FIGURA 18. Tecido ósseo lamelar neoformado (ON) em toda a extensão do implante: superior, inferior e na lateral esquerda. (45 dias, HE 40X)	28
FIGURA 19. Tecido ósseo lamelar neoformado (ON) em toda a extensão do implante: superior, inferior, e na lateral direita (45 dias, HE 40X)	29

FIGURA 20. Fibrina (Fi), colágeno (Co) na área de granulação, fibrose (Fo), osteóide (Os) e osteócito (seta). (45 dias, HE 200X)	29
FIGURA 21. Tecido ósseo lamelar neoformado na interface osso/implante (seta) sem a formação de fibrose (60 dias HE (40X)	30
FIGURA 22. Tecido ósseo lamelar neoformado na interface osso/implante (seta) sem a formação de fibrose (60 dias HE (40X)	31
FIGURA 23. Fibrina (Fi), tecido de granulação (Tg), Fibrose (Fo), vaso (V), anel de osteoblastos (Ob), osteóide (Os), osso lamelar neoformado (ON), osteócito (seta), implante (I) (60 dias, HE 400X)	31
FIGURA 24. Formação de vasos no periósteo (seta), osso lamelar neoformado com direção vertical (ON), cortical externa com direção horizontal (CE). (90 dias, HE 40X).	32
FIGURA 25. Formação de vasos no periósteo (seta), osso lamelar neoformado com direção vertical (ON), cortical externa com direção horizontal (CE). (90 dias, HE 40X).	33
FIGURA 26. Vaso (V), osso lamelar neoformado circundado pelo anel de osteoblastos (ON), osteócitos (seta). (90 dias, HE 200X)	33
FIGURA 27. Interface osso/implante, ausência de fibrose (seta), osso lamelar neoformado (ON), cortical externa (CE), canal vascular (CV).(90 dias, HE 400X)	34
FIGURA 28. Compactação do tecido ósseo neoformado sem fibrose na interface osso/implante (120 dias, HE 40X)	35
FIGURA 29. Periósteo (P) – Camada fibrosa (CF) e camada osteogênica (CO), osso lamelar neoformado (ON). (120 dias,HE 200X)	35
FIGURA 30. Interface osso/implante sem a formação de fibrose (setas), osso lamelar neoformado (ON), cortical externa (CE) (120 dias, HE 200X)	36
FIGURA 31. Faixa de fibrina (Fi), tecido de granulação (Tg), fibrose (Fo), osso lamelar neoformado (NO), periósteo (P) (45 dias, Hematoxilina fosfotúngstica 40X)	37

FIGURA 32. Rede de fibrina (setas). (45 dias, hematoxilina fosfotúngstica 200X)	37
FIGURA 33. Alizarina 4.2 corando carbonato de cálcio e fosfato de cálcio. (90 dias, Alizarina 4.2 40X)	38
FIGURA 34. Perióstio (P), colágeno total (Ct), cortical (C) (120 dias, picosirius red 40X)	39
FIGURA 35. Picosirius polarizado. Osteóide (seta), Perióstio (P), colágeno jovem amarelo birrefringente, canal vascular (CV), cortical (C) (120 dias, picosirius polarizado 40X)	39

RESUMO

Zanferrari, Fernando Luiz. **Reações ósseas a implantes de cimento Portland em fase sólida**. Prof.Dr. Wilson Denis Martins. Curitiba: PUCPR 2006, Mestrado em Odontologia, área de concentração em Estomatologia.

Objetivos: Os objetivos do presente estudo foram investigar experimentalmente a osteotransdutividade do cimento Portland e testar a hipótese de que este material, na fase sólida, é adequado para substituição óssea. *Método:* foram utilizados 30 ratos *Wistar*. Corpos de prova de cimento Portland, em fase sólida, foram implantados na calvária dos animais, em posição subperiosteal e justapostos ao osso. Os animais foram mortos aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias. Os espécimes foram removidos em bloco da região da calvária e processados para exame microscópico. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, hematoxilina fosfotúngstica, alizarina 4.2, e picrossirius red sob luz polarizada. *Resultados:* Observou-se osteointegração do implante sem a formação de fibrose na interface osso cortical/implante. Aos 120 dias ocorreu osteotransdução (implante totalmente substituído por osso neoformado normal). O tecido ósseo neoformado contém carbonato e fosfato de cálcio, tal como ocorre no tecido ósseo maduro e sadio. A presença de osteóide e colágeno jovem denotam atividade de deposição de matriz óssea não mineralizada. *Conclusões:* Pela análise dos resultados obtidos foi possível concluir que o cimento Portland sólido integrou-se totalmente e foi substituído por osso lamelar compacto. Parece lícito concluir que o cimento Portland em estado sólido tem potencial para ser usado como substituto ósseo.

Palavras-chave: Cimento Portland; Osteoindução; Osteocondução; Osteointegração; Osteotransdução.

ABSTRACT

Zanferrari, Fernando Luiz. **Bone reactions to solid Portland cement implants.**
Wilson Denis Martins PhD. Curitiba: PUCPR 2006, Dentistry MsC in Stomatology.

Objectives: The aim of the present study was to experimentally investigate the osteoconductive of the Portland cement. The hypothesis was that this material, in the solid phase, is appropriate for bone substitution.

Method: 30 adult, male, *Wistar* rats were used for this study. Solid alloplastic grafts made of prehardened Portland cement were implanted in the calvaria, under the periosteum and in contact with bone. The animals were killed at 15, 30, 45, 60, 90 and 120 post operative days. The specimens containing the implant and bone were removed *in bloc* from the calvaria and processed for microscopic examination. Histologic sections were stained with hematoxylin and eosin, fosfotungstic hematoxylin, alizarin 4.2, and picosirius red under polarized light. *Results:* Osteointegration of the grafted material was observed, without formation of a gap between material and bone. Osteoconduction was observed at 120 days (cement was totally replaced by healthy newly formed bone). The newly formed bone contains calcium carbonate and phosphate, components of the mature and healthy bone. The presence of osteoid and immature collagen reveals deposition activity of non mineralized bony matrix. *Conclusion:* It was possible to conclude that solid Portland cement was osteointegrated and was replaced by compact new bone tissue. It was generally concluded that solid Portland cement has the potential to be used as a bone substitute.

Keywords: Portland cement; Osteoinduction; Osteoconduction; Osteointegration; Osteoconduction.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O cimento agregado trióxido mineral (ATM) constitui-se de uma mistura de componentes em forma de pó, predominando o cimento Portland¹.

O cimento Portland é uma mistura de silicato dicálcico, silicato tricálcico, aluminato tricálcico, aluminoferrita tetracálcico e sulfato de cálcio dihidratado (gesso). Esta composição é denominada clínquer e está presente em todos os tipos de cimento Portland^{2,3}.

Desde a introdução do ATM por Lee et al⁴, como material para reparação de perfuração lateral em Endodontia, a sua utilização expandiu-se em várias aplicações, principalmente no selamento de canais radiculares e no tratamento de insucessos de origem endodôntica e periodontal^{5,6}.

O ATM apresenta biocompatibilidade⁷⁻¹², toxicidade e irritação tissular mínima^{13, 14}, não mutagenicidade¹⁵, ausência de neurotoxicidade¹⁶, aderência e crescimento celular^{17, 18}, atividade antimicrobiana e antifúngica¹⁹⁻²¹ e atividade mitogênica²².

Estas propriedades biológicas encorajaram a pesquisa destes materiais como substitutos ósseos no complexo bucomaxilofacial. Entretanto, os estudos estão direcionados para a utilização do ATM na fase gel coloidal (pastosa), realizando a reação de presa já em contato com os tecidos²³⁻²⁵. Pouca atenção tem sido dada à pesquisa da fase sólida do cimento Portland.

A interação entre enxertos ósseos e o osso hospedeiro é definida pelos fenômenos da osteoindução, osteocondução e osteointegração. Osteoindução caracteriza-se pelo recrutamento e estimulação de células primitivas, indiferenciadas e pluripotentes para se desenvolverem em células formadoras de osso; osteocondução significa crescimento de tecido ósseo na superfície, poros ou canais de um implante e está diretamente interligada ao fenômeno da osteoindução, pois células indiferenciadas somente transformam-se em osteoblastos produtores de matriz óssea desde que estejam aderidos à superfície do implante; osteointegração é descrita histologicamente como o contato direto entre implante e osso sem a formação de fibrose nesta interface; osteotransdução caracteriza-se pelo comportamento *in vivo* do implante, que após a osteointegração, é lenta e gradualmente substituído por osso neoformado.

Fundamentado no excelente resultado biológico acima descrito, avulta a hipótese da possibilidade de utilização do cimento Portland na fase sólida, resultado final da reação de hidratação do cimento, na cirurgia estética (plástica e bucomaxilofacial), nos casos em que seja necessário aumento de volume ósseo como nas mentoplastias e malarplastias e nas cirurgias reparadoras, principalmente nas substituições ósseas em defeitos de continuidade.

Ampla revisão de literatura não encontrou pesquisa da utilização do material na fase sólida, investigação de respostas tissulares, bem como dos mecanismos de integração óssea.

A hipótese é que o cimento Portland em fase sólida integre-se ao tecido ósseo, o que pode indicá-lo como material adequado para implantes e enxertos.

Os objetivos do presente estudo são investigar experimentalmente a osteotransdutividade²⁶ do cimento Portland e testar a hipótese de que este material, na fase sólida, é adequado para enxertia óssea.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

O ATM foi desenvolvido por Lee et al ⁴ causando impacto no estudo dos materiais utilizados em Endodontia.

Torabinejad et al ²⁷ apresentaram a composição química, pH, radiopacidade, tempo de presa, resistência à compressão e solubilidade. A maior parte das moléculas presentes no ATM são Ca e P. O pH inicial é 10,2 aumentando para 12,5 após três horas da manipulação. Os autores observaram que o ATM apresenta duas fases específicas. Uma fase é cristalina e outra amorfa. A fase cristalina constitui-se de óxido de cálcio e a fase amorfa de fosfato de cálcio. Relataram que o ATM é um pó constituído de finas partículas hidrofílicas que endurecem na presença de água. Os principais componentes do material são: silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, óxido silicato e pequenas quantidades de alguns outros minerais, responsáveis pelas propriedades químicas e físicas do agregado. O óxido de bismuto foi acrescentado para fornecer radiopacidade ao ATM. A hidratação do ATM resulta num gel coloidal, que resulta em estrutura sólida, dura, após 2 horas e 45 minutos.

A similaridade do ATM com o cimento Portland foi inicialmente apontada por Wucherpfennig & Green ¹, que demonstraram ser os principais ingredientes: Ca, P e Si, composição idêntica à do cimento Portland. Macroscopicamente, microscopicamente e na análise por difração de raios X, ambas as substâncias são quase idênticas. Ambas são misturadas com água, processando-se reação de hidratação que conduz à fase sólida.

Estrela et al ¹⁹ também demonstraram que o cimento Portland contém os mesmos elementos químicos do ATM, com exceção do Bi. Os autores compararam o Proroot MTA^{®1}, cimento Portland, pasta de hidróxido de cálcio, Sealapex^{®2} e Dycal^{®3} quanto à capacidade antimicrobiana, bem como sua formulação química. O cimento Portland apresentava componentes nas seguintes porcentagens: CaO (58,5%), SiO₂ (17,7%), Al₂O₃ (4,5%), MgO (3,3%), SO₃ (3,0%), Fe₂O₃ (2,9%), K₂O (0,9%), Na₂O (0,2%).

¹ Proroot MTA[®] - Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, Ok - USA.

² Sealapex[®] - Sybron-Kerr-Romulus, MI - USA.

³ Dycal[®] - Dentsply - USA.

Após o primeiro estudo de Wucherpfennig & Green ¹ a respeito da similaridade entre ATM e cimento Portland, Funteas; Wallace; Fochtman²⁸ constataram também que a diferença entre os dois materiais está apenas no acréscimo de Bi no ATM. Constataram que 14 elementos químicos eram os mesmos para os dois cimentos e não apresentavam diferenças quanto às quantidades.

Recentemente, Camilleri et al ²⁹ estudaram a composição de duas versões comerciais de ATM, antes e após a manipulação com água. Demonstraram que o ATM branco é composto primariamente de Ca, Si, Bi e O. O ATM cinza apresenta traços de Fe e Al e é composto principalmente de silicato tricálcico e silicato dicálcico. Concluíram que as versões comerciais de ATM possuem composição similar ao cimento Portland comum, com exceção da adição de compostos de Bi. O ATM branco não contém Fe. Os autores afirmaram que os principais constituintes, silicato tricálcico e silicato dicálcico, reagem com a água para produzir um sal hidratado pobremente cristalizado e Ca(OH)_2 . A interpretação dos autores é que o ATM na fase sólida pode ser considerado como Ca(OH)_2 contido em uma matriz de silicato. A presença de Ca(OH)_2 justifica seu pH alcalino (12,5), que possivelmente contribui para sua biocompatibilidade.

Islam et al ³⁰ compararam as propriedades físicas e mecânicas entre ProRoot MTA[®], cimento Portland branco e cimento Portland convencional. Os resultados demonstraram que o ProRoot MTA[®] e o cimento Portland apresentam propriedades físicas similares. A radiopacidade do cimento Portland é muito menor do que a do ProRoot MTA[®]; a resistência à compressão do cimento Portland é menor após 28 dias. O principal constituinte do ProRoot MTA[®] é cimento Portland. O cimento Portland pode ser facilmente esterilizado tanto por gás como por autoclave, entretanto não existem sugestões de que o cimento Portland esteja pronto para ser usado na clínica em seu estado nativo.

Pelliccioni et al ³¹ apresentaram a fórmula do ProRoot MTA[®]: pó - cimento Portland (silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, aluminoferrita tetracálcico) - 75%; óxido de Bi - 20%; sulfato de Ca dihidratado (gesso) - 5%; traços de elementos (sílica cristalina, óxido de cálcio, potássio e sulfato de sódio) - acima de 0,6% e líquido: água.

Segundo Gobbo ³, industrialmente o processo de fabricação do clínquer Portland consiste na mineração e britagem das matérias-primas, seguido da preparação adequada da mistura crua com posterior queima por volta de 1.400 °C

em forno rotativo. O material utilizado para a fabricação deve conter em sua composição química os principais óxidos componentes do clínquer: CaO , SiO_2 , Al_2O_3 e Fe_2O_3 . O calcário e a argila são as matérias-primas mais comuns como fonte de CaO , SiO_2 , Al_2O_3 sendo o minério de ferro, a principal fonte de Fe_2O_3 . No caso da fabricação de cimentos brancos, a presença de Fe_2O_3 é restringida. Os componentes do clínquer Portland podem ser subdivididos em três grupos distintos: Os silicatos cálcicos (silicato tricálcico e silicato dicálcico), a fase intersticial (aluminoferrita tetracálcico, aluminato tricálcico) e os compostos menos freqüentes como MgO , CaO , K_2O e Na_2O . O gesso é o produto de adição final no processo de fabricação do cimento Portland, com a finalidade de regular o tempo de presa por ocasião das reações de hidratação.

No Brasil, a qualidade do cimento Portland é aferida pela Associação Brasileira de Cimento Portland (ABCP) ² com base nas normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e nos princípios do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). O cimento Portland branco apresenta matérias-primas com baixo teor de Fe_2O_3 , Mn e por condições especiais durante a fabricação, especialmente com relação ao resfriamento e à moagem do produto. No Brasil o cimento Portland branco atende a norma NBR 12989, sendo classificado em dois subtipos: cimento Portland branco estrutural e cimento Portland branco não estrutural, este último com o código de identificação (sigla+classe) CPB e pela norma brasileira NBR 12989.

Abdullah et al ³² compararam a biocompatibilidade *in vitro* de dois tipos de cimento Portland de presa rápida, cimento ionômero de vidro, ATM e cimento Portland não modificado, por meio de observação: das características da superfície dos cimentos Portland de presa rápida, citomorfologia em cultura de células de osteosarcoma na presença dos materiais testados, avaliação do efeito destes materiais na expressão de marcadores de remodelação óssea. A morfologia celular foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Do meio de cultura coletou-se material para quantificação de citocinas, usando o exame de enzimaímunoensaio (ELISA). A microscopia eletrônica de varredura mostrou a aderência de células saudáveis de osteosarcoma na superfície das variantes de cimento Portland de presa rápida, cimento Portland não modificado e ATM. Em contraste, observaram-se células arredondadas e mortas no cimento ionômero de vidro. Usando ELISA os níveis de interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-18 e osteocalcina foram significativamente altos

nas variantes de cimento Portland de presa rápida comparado com os controles, porém não estatisticamente significativos comparados com o ATM. Os autores ressaltam que os defeitos dentários e a restauração do tecido ósseo requerem um material capaz de se integrar com este ambiente biológico. Materiais em contato direto com o osso devem atuar como materiais osteocondutores capazes de promover remodelação óssea normal. O estudo sustenta evidências de que as duas variantes do cimento Portland de presa rápida não apresentam toxicidade e tem potencial para promover cicatrização óssea. Acrescentam que o ATM é derivado do cimento Portland com propriedades químicas similares e apresenta formidáveis propriedades, tais como: biocompatibilidade, boa capacidade de selamento e a capacidade para promover regeneração do tecido original quando colocado em contato direto com a polpa dental e tecidos periradiculares.

Schwarz et al ³³ comentaram que várias pesquisas sugerem que o ATM permite, quando implantado, o crescimento de tecidos similares ao osso, bem como ao cimento.

Torabinejad et al ²⁴, em estudo comparativo entre materiais de retro obturação endodôntica, constataram a formação de tecido duro na presença de implantes de ATM. Observaram microscopicamente a aposição de novo osso adjacente ao implante de ATM, na fase pastosa, em defeitos ósseos na tíbia em modelo animal.

A resposta do tecido ósseo à implantação do ATM foi estudada por Torreira et al ¹¹, que demonstraram o potencial osteocondutivo do material em estudo histológico em ratos. A implantação do material na fase pastosa em defeitos ósseos resultou em regeneração óssea após quatro semanas da cirurgia. Porém, os autores não consideraram significativa a quantidade de novo osso formado, considerando-a limitada.

Cintra et al ³⁴ implantaram ATM na fase pastosa em alvéolos de dentes recém extraídos em ratos. Após 30 dias, constataram a presença de tecido mineralizado em contato direto com o material. O tecido conjuntivo estava bem organizado, porém o osso ainda não apresentava completa cicatrização. Os autores sugerem um período mais longo de observação, para melhor avaliação da mineralização óssea completa.

A reação do tecido ósseo ao cimento Portland na fase pastosa foi estudada por Saidon et al ⁹ que classificaram a reação em dois tipos: tipo I, onde ocorreu aposição de novo osso em contato direto com o material; tipo II, onde ocorreu

formação de novo osso separado do material por fina camada de tecido conjuntivo fibroso. A resposta tipo I, constatada após 12 semanas, demonstra osteointegração do material. A análise microscópica demonstrou que o osso neoformado em contato direto com o cimento Portland é sadio. No mesmo estudo, comparou-se a resposta tissular óssea entre o cimento Portland e o ATM, sendo que os resultados foram idênticos.

As bases físico-químicas das propriedades biológicas do ATM foram demonstradas em recente estudo³⁵. Demonstrou-se a interação do ATM com fluidos tissulares sintéticos, ambiente escolhido para simular condições *in vivo*, no qual o ATM é usado. O material apresenta uma camada apatítica na sua superfície, em proximidade com tecidos calcificados, forma uma união química com os mesmos. Devido à exposição do ATM aos fluidos biológicos sintéticos, forma-se uma camada de hidroxiapatita. A firme união com o osso reflete esta união química. O ATM não é um material inerte, pois em contato com fluidos biológicos libera seus principais componentes catiônicos, disparando a precipitação de hidroxiapatita em sua superfície e nos fluidos adjacentes presentes no ambiente bucal.

Estudando compostos (cimentos de fosfato de Ca) em fase sólida, Yokoyama et al³⁶ implantaram corpos de prova sólidos entre o periósteo e o osso parietal de ratos. Após 30 dias, constataram a neoformação óssea oriunda do osso parietal, parcialmente aderida ao cimento. Muitas partes da superfície do material implantado, que estavam aderidas ao osso neoformado, apresentaram estruturas semelhantes a lamelas e formação de osso medular.

Guarnieri & Bovi³⁷ utilizaram sulfato de cálcio hemihidratado (gesso) em fase sólida para levantamento de seio maxilar e após 8 meses realizaram implantes na região. No mesmo ato operatório da colocação dos implantes, realizaram biópsia incisional para coleta de material para avaliação histológica da área receptora do enxerto de sulfato de cálcio hemihidratado (gesso). A microscopia mostrou completa reabsorção do sulfato de cálcio hemihidratado e o osso apresentou-se primeiramente como estrutura lamelar. O material enxertado apresentava reabsorção em direção centrípeta detectável aos 60 dias. Oito meses após a realização do enxerto, o tecido ósseo regenerado mostrou-se de boa consistência (variando entre os tipos ósseos I e II). Não ocorria invaginação de tecidos moles para o interior do osso neoformado. Os implantes foram colocados e apresentaram 100% de osteointegração. Ressaltam que o sulfato de cálcio hemihidratado, quando

usado como material de enxerto para levantamento de seio maxilar, conduz para uma adequada osteointegração de implantes dentários.

Em estudo realizado por Holland et al ³⁸ comparou-se a resposta tecidual do ATM com o hidróxido de cálcio. Os materiais formam granulações de calcita (CaCO_3 – carbonato de cálcio) e uma ponte de tecido mineralizado subjacente. O mecanismo de ação do ATM seria o mesmo do hidróxido de cálcio. O óxido de cálcio do pó do ATM, ao reagir com água, converte-se em hidróxido de cálcio. Uma vez em contato com os fluidos tissulares, dissocia-se em íons Ca^{++} e $(\text{OH})^-$. Os íons cálcio reagem com o gás carbônico dos tecidos e originam os grãos de calcita. Junto dessas granulações ocorre acúmulo de fibronectina que permite adesão, diferenciação celular e em consequência ocorre formação de uma ponte de tecido duro. O comportamento do hidróxido de cálcio pró-análise em contato com o tecido pulpar produz cauterização superficial, determinando a ocorrência de zona de necrose pela penetração de íons hidroxila. Essa área cauterizada eliminaria eventual contaminação superficial (pelo pH 12,5) bem como a porção pulpar superficial mais alterada. A deposição das granulações de calcita e consequente formação da ponte de tecido duro ocorreriam a partir do limite entre a zona de necrose e o tecido pulpar vital. Com o ATM praticamente não ocorre formação de zona de necrose, o que sugere pouca penetração de íons cálcio e hidroxila.

Partindo do princípio de que o ATM é semelhante ao cimento Portland, Holland et al ²³ estudaram o cimento Portland, ATM e o hidróxido de cálcio quimicamente puro, implantando-os em tecido subcutâneo de ratos. Os resultados foram semelhantes entre o ATM e o cimento Portland, ou seja, foram observadas granulações de calcita em contato com os materiais estudados. Diante dos resultados obtidos os autores sugerem que o mecanismo de ação dos três materiais estudados é similar. Os autores ressaltaram que todos os experimentos mencionados apóiam os resultados relatados por Wucherpfennig & Green ¹ e Estrela et al ¹⁹, que sugerem que o ATM e o cimento Portland são materiais similares.

Em estudo realizado por Koh et al ⁷ na ação do ATM na produção de citocinas em osteoblastos humanos e na adesão das células à superfície do material, utilizando meio de cultura para osteoblastos (MG-63), observou-se: crescimento celular na superfície do ATM em 6 horas e aumento deste crescimento até 144 horas. Os ensaios de ELISA demonstraram níveis elevados de interleucinas (IL-1 α , IL-1 β e IL6) na presença do ATM. Os níveis de citocinas aumentados

demonstraram-se favoráveis para a estimulação da atividade de osteoclastos; porém, o ATM apresentou-se como um estimulador de osteoblastos e parece ser a fase de fosfato de cálcio do ATM a responsável pelo favorecimento da estimulação. Esta fase, enquanto não é representada pela formação de hidroxiapatita, poderia ser responsável pela mudança no comportamento celular que estimula o crescimento celular sobre o ATM.

Em outro estudo realizado por Koh et al.⁸ para analisar a resposta celular ao ATM, os autores observaram a citomorfologia dos osteoblastos na presença do material, bem como a produção de citocinas. As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular secretadas como resultado de estimulação celular que interagem com os receptores celulares, levando a modificação na síntese do RNA celular, proteínas e no comportamento celular. As citocinas estão diretamente relacionadas com o processo de coordenação do metabolismo ósseo. O estudo abordou ainda a capacidade pela qual o ATM parece induzir a cementogênese, investigando a capacidade celular de produzir matriz que posteriormente poderia ser calcificada. As interleucinas estudadas foram (IL-12, IL-1 β , IL-6), além do fator estimulador da colônia de macrófagos. A citomorfologia foi observada em microscopia eletrônica de varredura e os resultados foram: diferenças marcantes na morfologia celular entre as células cultivadas na presença do ATM, sendo que estas células apresentavam morfologia normal, aparência achatada e estavam aderidas ao cimento, em contato direto com o mesmo. As células controle cresceram em confluência e as células na presença do IRM estavam arredondadas e esparsas, indicando que o IRM é tóxico. O teste ELISA mostrou níveis elevados de todas as interleucinas, em todos os períodos de tempo quando as células cresceram na presença do ATM. Quando as células cresceram sozinhas, sem estar em contato com o cimento, os níveis de interleucinas não foram detectados. O fator estimulador de macrófagos foi produzido pelas células independentemente do material que estava sendo testado, mostrando que o ATM atua como substrato biologicamente ativo para as células ósseas e estimula a produção de interleucinas. A formação óssea pode ser dividida em duas fases. A primeira envolve o recrutamento e diferenciação de precursores de osteoblastos. A segunda é a produção e mineralização da matriz óssea por osteoblastos perfeitamente desenvolvidos. As citocinas envolvidas na formação óssea podem ser divididas em dois grupos. O primeiro inclui as citocinas que estimulam a proliferação de células ósseas, mas

inibem osteoblastos perfeitamente desenvolvidos (IL-1 e fator estimulador de macrófagos). O segundo estimula ambos, proliferação de precursores de osteoblastos e atividade de osteoblastos perfeitamente desenvolvidos (IL-6). A estimulação do precursor do osteoblasto é guiada em preparação para a próxima fase da formação óssea.

Mitchell et al ¹² avaliaram a biocompatibilidade de três variantes do ATM, três materiais para enxerto ósseo sintético e hidróxido de cálcio; por meio de cultura de células de osteossarcoma (MG 63) e observaram a citomorfologia, crescimento celular e a produção de citocinas (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-11 e fator estimulador de colônias de macrófagos – principais citocinas envolvidas no fenômeno de remodelação óssea). Os testes foram comparados com controles onde não havia material presente. Os resultados demonstraram que ocorreu crescimento celular com as três variantes do ATM e muitas destas áreas estavam totalmente recobertas ao final do segundo dia. O crescimento celular também foi observado nos materiais para enxerto sintético, o que foi pobremente observado no hidróxido de cálcio. A expressão da IL-6 foi representativa somente com o ATM e uma variedade de enxerto ósseo sintético. A expressão da IL-8 somente foi observada no ATM. Não foram observadas expressões da IL-1 α e IL-11 em nenhum dos materiais estudados. A produção de fator estimulador de colônias de macrófagos foi expressiva para todos os materiais e em menor quantidade para o hidróxido de cálcio e o gesso paris. O fator estimulador de colônias de macrófagos é importante na maturação e desenvolvimento de osteoclastos, atraindo osteoclastos para os locais de reabsorção e controlando o seu funcionamento. O estudo sugere que este é um fator secretado por osteoblastos saudáveis e não requer a ativação dos osteoblastos. O processo pelo qual osteoblastos são ativados pelo ATM é ainda obscuro. Os autores relataram que a solubilidade do ATM é pequena, mas é possível que ocorra alguma diluição superficial do material que estimule os osteoblastos a sintetizarem IL-6 e IL-8. Existe ainda a possibilidade de que a microestrutura cristalina do ATM possa fornecer o estímulo necessário para a adesão, crescimento celular e expressão de citocinas. A IL-8 também estimula a angiogênese. A proliferação de vasos sanguíneos é de fundamental importância para a cicatrização do tecido conjuntivo e provavelmente explica porque o ATM tem sucesso *in vivo*, pois neste estudo somente este material produziu IL-8.

Safavi & Nichols ³⁹ avaliaram os efeitos do ATM e cimento Portland na secreção de prostaglandinas PGE₂ pelos monócitos. Utilizaram monócitos provenientes de sangue fracionado e incubados a 37°C na presença de 5% de CO₂ por 2 horas. Fez-se outra incubação, desta vez por 24 horas, agora contendo os materiais a serem testados. Os resultados mostraram diminuição da produção de PGE₂ em contato com os materiais. Concluíram que tanto o cimento Portland como o ATM inibe a formação de prostaglandinas secretadas pelos monócitos, o que seria devido à solubilidade de produtos contidos nestes cimentos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR (Protocolo 75/05/CEPA-PUCPR) (ANEXO A). Foram observadas as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (Lei 6.638 de 08 de maio de 1979)⁴⁰ (ANEXO B).

A pesquisa é experimental, descritiva, dentro do paradigma tradicional quantitativo.

3.1 Amostra selecionada

Constituída de 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) – *Rodentia* – *Mammalia*, linhagem Wistar, machos, adultos, pesando cerca de 250g +/- 50g, alimentados com ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em seis grupos, de acordo com os períodos de tempo de morte (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição e morte dos animais por período de tempo.

Grupos	I	II	III	IV	V	VI
Morte dos Animais	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Número de Animais	05	05	05	05	05	05

n = 30 animais

3.2 Método.

3.2.1 Corpos de prova.

Confeccionados em cimento Portland branco não estrutural⁴, na proporção de 1:3 (água destilada estéril e pó). Manipulação em placa de vidro estéril; espátula para cimento também estéril, até obter-se consistência pastosa. O material foi acondicionado em moldes do elastômero odontológico Xantopren^{®5} e Optosil^{®6}, na forma de calotas esféricas, obtendo-se corpos de prova medindo 6,06 mm de diâmetro por 1,10 mm de espessura e conferidos com paquímetro digital⁷.

⁴ Irajazinho – Cimento Rio Branco – Companhia de cimento Portland Itaú – Votorantin – NBR 12989 da ABNT – Brasil.

⁵ Heraeus – Kulzer, Bayer[®] - Alemanha.

⁶ Heraeus - Kulzer, Bayer[®]. Alemanha.

⁷ Mitutoyo[®] - Japan.

Os corpos de prova foram esterilizados em óxido de etileno por ocasião das cirurgias experimentais (Figuras 1 a 6).



FIGURA 1 - Proporção pó e líquido (3:1).



FIGURA 2 - Cimento manipulado

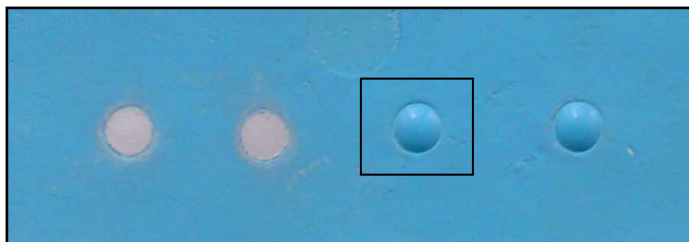


FIGURA 3 - Material acondicionado no molde.



FIGURA 4 - Detalhe do molde.



FIGURA 5 - Corpo de prova.



FIGURA 6 - Corpo de prova.

3.2.2 Procedimentos cirúrgicos.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de Ketamina⁸ e cloridrato de 2-(2,6 - xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-Tiazina (5:1)⁹; 0,1 ml/100g intramuscular (protocolo do Biotério da PUCPR supervisionado pelo Médico Veterinário Dr. Indalécio Mainardes Sutil – CRMV 3-0283).

⁸ Vetanarcol[®] - Konig – Argentina.

⁹ Rompun[®] - Bayer – Alemanha.

Protocolo cirúrgico:

- a) tricotomia na região da calvária; assepsia do campo operatório com PVPI tópico;
- b) incisão reta de 2 cm com lâmina nº 15 ao longo da sutura sagital; divulsão do couro e tecido subcutâneo; acesso ao periósteo; retalho dividido (Figura 7);
- c) incisão reta parasagital, descolamento e afastamento do periósteo; acesso direto aos ossos da calvária (Figura 8);
- d) aposição do implante de cimento Portland em fase sólida na região subperiosteal da calvária (Figuras 8 e 9);
- e) sutura simples com fio mononylon 4-0¹⁰;
- f) pós-operatório: administração de 0,1ml de Banamine®¹¹ IM;
- g) remoção da sutura após sete dias.

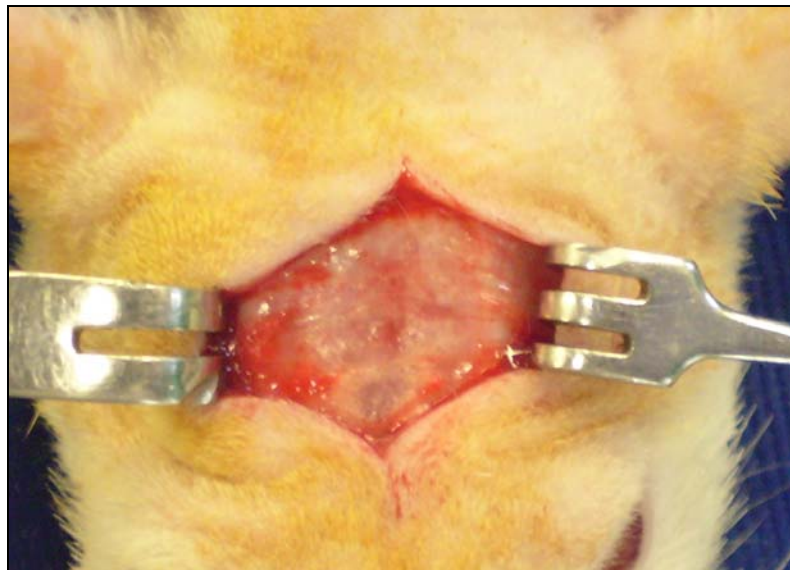


FIGURA 7 – Incisão e acesso ao periósteo.

¹⁰ Nylon 4-0 - Monofilamento preto-Shalon® - Brasil.

¹¹ Schering-Plough® - USA.

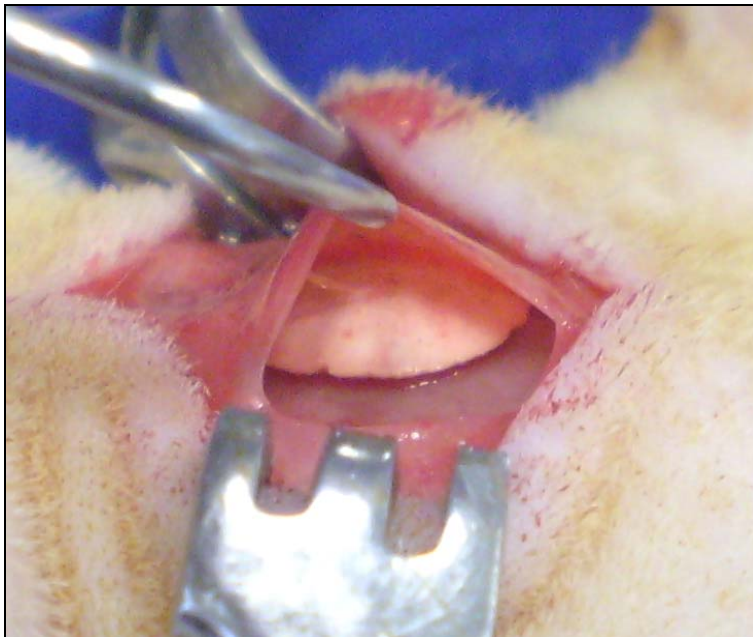


FIGURA 8 - Colocação subperiosteia.

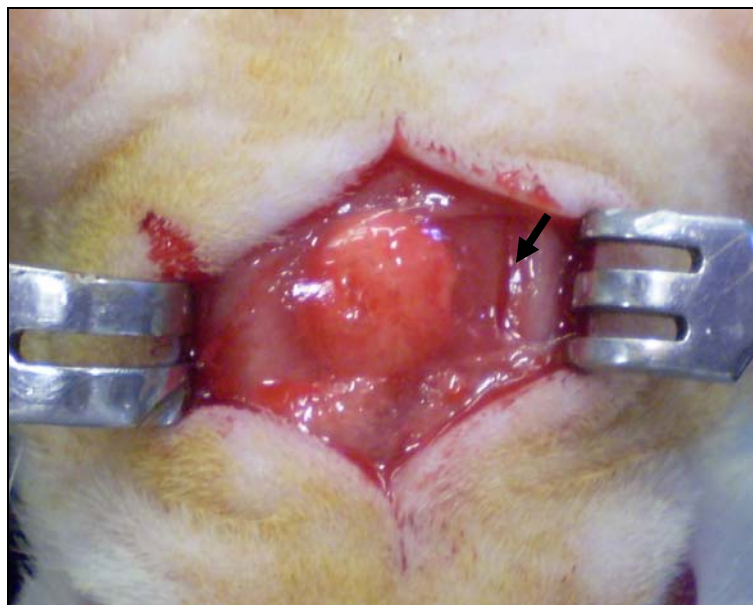


FIGURA 9 – Implante *in situ* coberto pelo periosteio.
Notar a incisão parasagital (seta).

3.2.3 Morte dos animais.

Seguindo-se o cronograma da Tabela 1, os animais foram mortos utilizando-se cloridrato de ketamina e cloridrato de 2-(2,6 – xilidino)–5,6–dihidro-4H-1,3-tiazina em dose letal (superior a 0,2ml/100g), por via intraperitoneal.

3.2.4 Processamento dos espécimes.

Os espécimes foram obtidos por osteotomia e remoção em bloco da região da calvária contendo o implante (Figuras 10 e 11) e processados de acordo com as técnicas padronizadas para histologia em tecidos duros.

Os cortes histológicos foram obtidos da parte central do implante, com espessura de 4 µm (Figura 12).

De cada grupo de animais - **I a VI**, classificados na Tabela 1, foram obtidas lâminas coradas com hematoxilina e eosina, hematoxilina fosfotúngstica, alizarina 4.2, picrossirius red, totalizando 120 lâminas.

- 30 (**Grupo I a VI**) com hematoxilina e eosina (HE);
- 30 (**Grupo I a VI**) com hematoxilina fosfotúngstica;
- 30 (**Grupo I a VI**) com alizarina 4.2;
- 30 (**Grupo I a VI**) com picrossirius red

(A coloração hematoxilina fosfotúngstica foi acrescentada em face dos resultados iniciais observados na coloração por HE, que sugeriam adesão celular ao material).

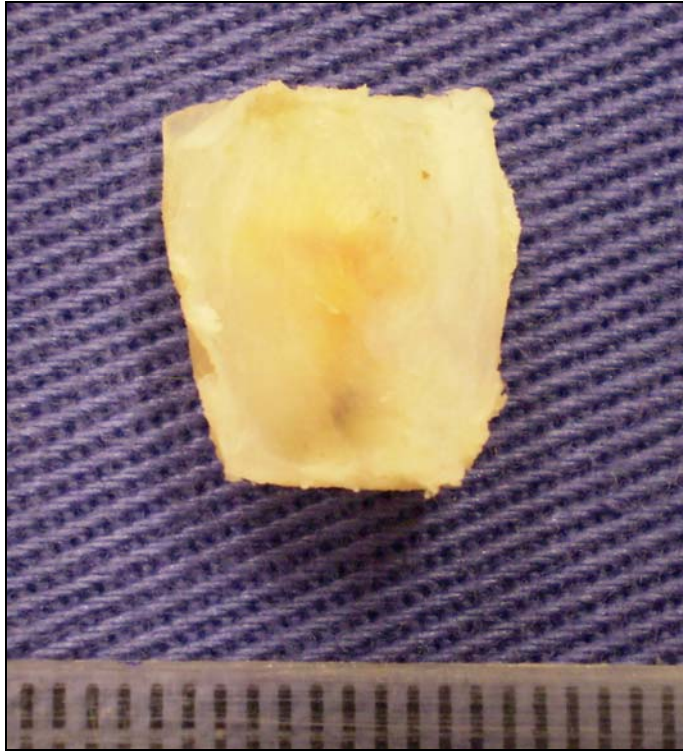


FIGURA 10 - Espécime contendo o implante (vista superior).

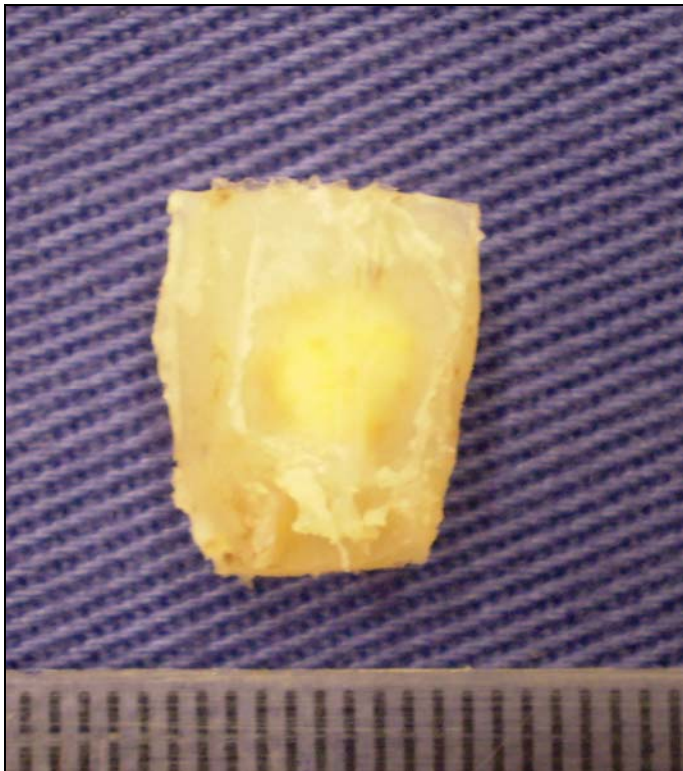


FIGURA 11 - Espécime contendo o implante (vista inferior).

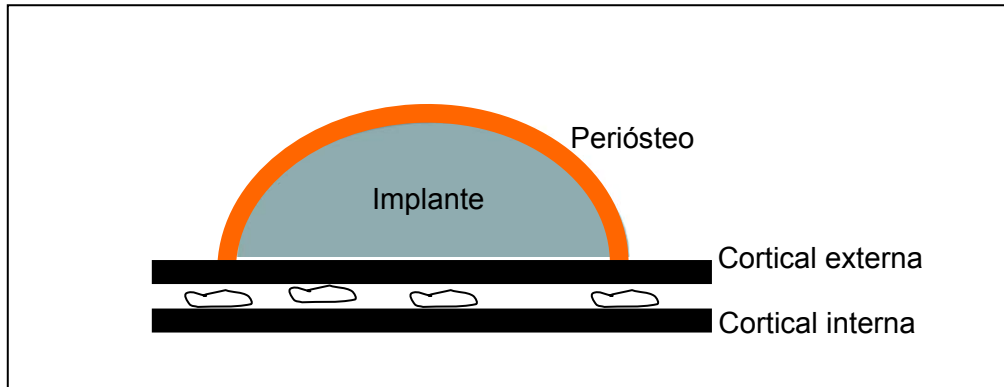


FIGURA 12 – Desenho do plano de corte do espécime.

3.2.5 Macroscopia.

Em todos os espécimes os implantes apresentaram-se cobertos pelo periosteio e aderidos à cortical da calvária, portanto sem apresentarem mobilidade.

3.2.6 Microscopia.

Utilizou-se microscópio de luz Olympus^{®12} acoplado a uma câmera Sony^{®13} com aumentos de 40x, 200x e 400x. As fotomicrografias das lâminas representativas de cada grupo foram obtidas com filme Fujicolor^{®14}.

¹² BX50 – Japan.

¹³ CCD – Íris color vídeo camera – Japan.

¹⁴ Quality II – ASA 100 – Brasil.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados foram uniformes para todos os grupos em seus respectivos períodos de tempo. As lâminas apresentadas a seguir são representativas de cada grupo.

4.1 Grupo I - 15 dias – HE.

Fotomicrografia com visão panorâmica da área do implante (I) apostado à cortical externa (CE). Área central representada pelo implante, parcialmente removido devido à técnica histológica (I). Na parte superior do implante, observa-se o perióstio (P); subjacentes, faixa de fibrose (Fo) (colágeno), faixa de tecido de granulação (Tg) e faixa com depósito de fibrina (Fi), sugerindo organização centrípeta. Na parte inferior observa-se a mesma organização, igualmente centrípeta: cortical interna (CI) revestida pelo endóstio (E), suprajacentes, faixas de fibrose, granulação e fibrina (Figura 13). Na área destacada, observa-se área de fibrose penetrando a cortical externa, faixa de fibrina (Fi), faixa de tecido de granulação (Tg) e faixa de fibrose (Fo) (Figura 14).

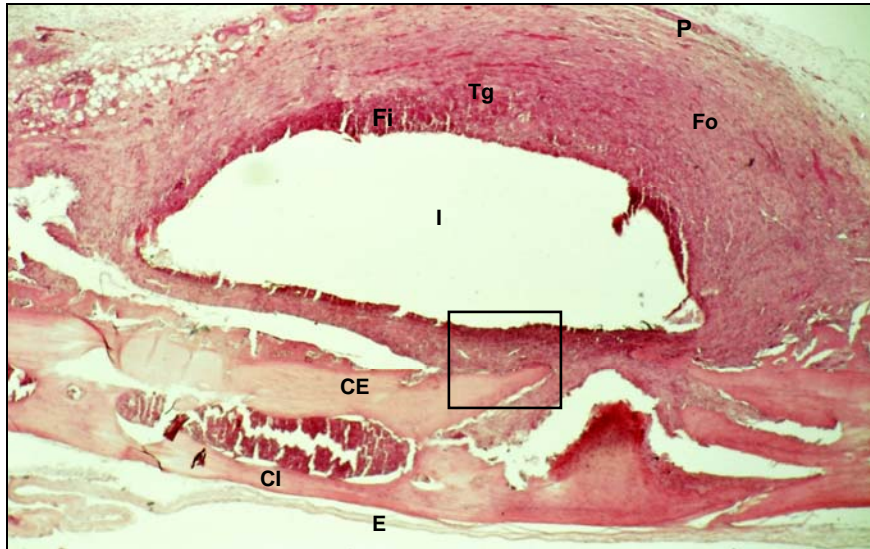


FIGURA 13 – Implante (I) de cimento Portland aposto na cortical externa (CE) fibrina (Fi), tecido de granulação (Tg), fibrose (Fo), periósteo (P), endósteo (E) cortical interna (CI). (15 dias, HE 40X).

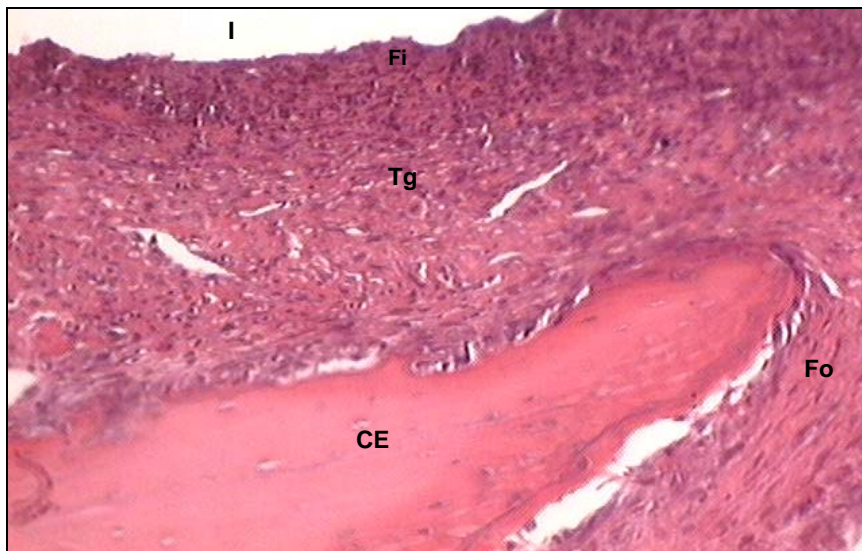


FIGURA 14 – Área destacada mostrando as faixas centrípetas. Fibrose (Fo) tecido de granulação (Tg), fibrina (Fi), implante (I) e cortical externa (CE) (15 dias, HE 200X).

4.2 Grupo II – 30 dias HE.

Na parte inferior esquerda do implante, observa-se o endósteo (E) revestindo a cortical interna (CI); suprajacentes, faixa de fibrose (Fo) (colágeno), faixa de tecido de granulação (Tg) e faixa com depósito de fibrina (Fi), sugerindo organização centrípeta. As faixas de fibrina e de tecido de granulação apresentam-se mais espessas e a faixa de fibrose mais delgada (Figura 15). Na parte inferior direita e superior observa-se a mesma organização, igualmente centrípeta: Periósteo (P); subjacentes, osso lamelar neoformado (ON) (trabécula óssea circundada por anel de osteoblastos), faixa de fibrose, tecido de granulação e faixa de fibrina. O osso neoformado não circunda totalmente o implante (Figura 16).

No destaque observa-se o osso lamelar neoformado circundado pelo anel de osteoblastos e subjacente, a fibrose, tecido de granulação e faixa de fibrina (Figura 17).



FIGURA 15 – Região inferior esquerda. (30 dias, HE 40X).

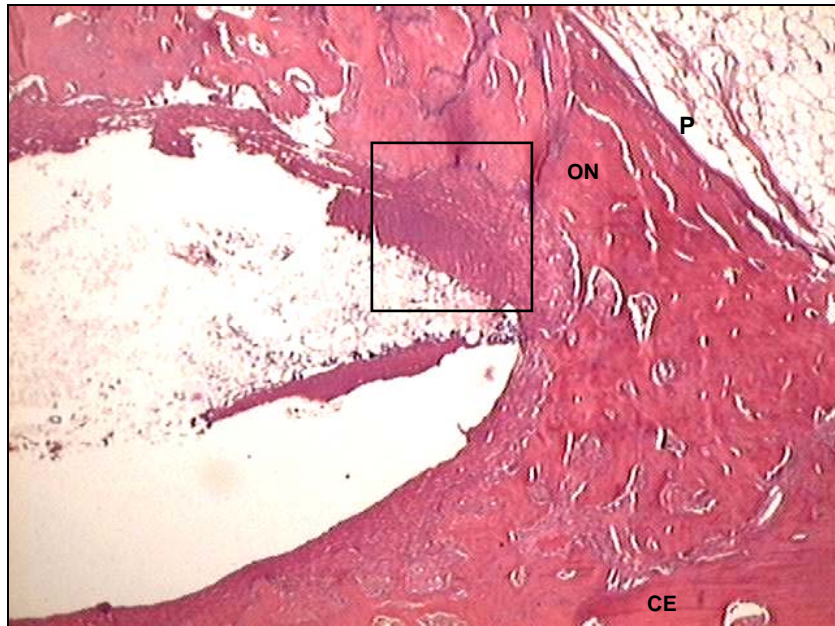


FIGURA 16 – Tecido ósseo lamelar neoformado (ON) na região inferior direita que se estende para a parte superior do implante. (30dias, HE 40X).

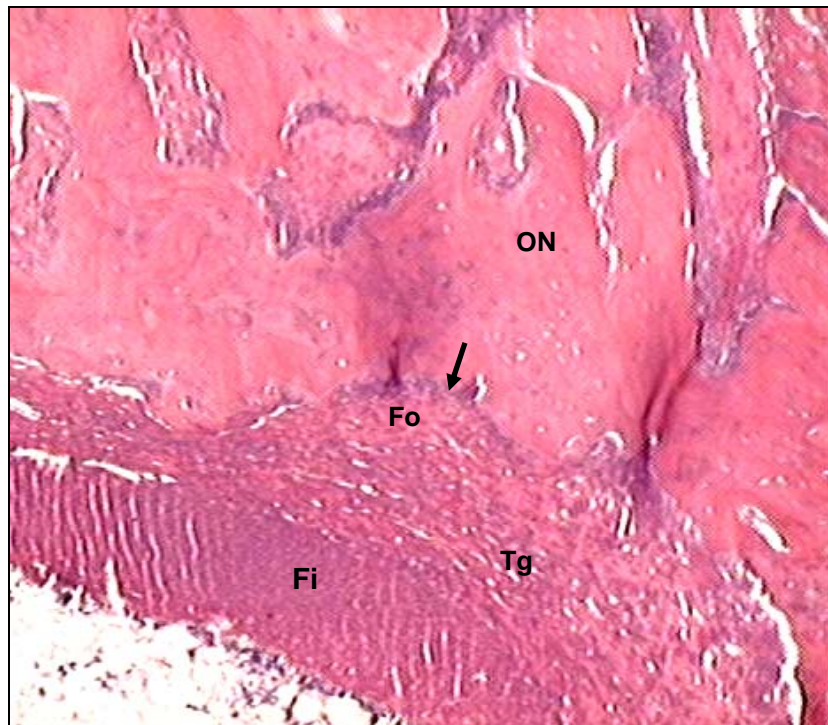


FIGURA 17 - Destaque mostrando o tecido ósseo lamelar neoformado (ON), anel de osteoblastos (seta), faixa de fibrose (Fo), tecido de granulação (Tg), faixa de deposição de fibrina (Fi) (30 dias, HE 200X).

4.3 Grupo III – 45 dias HE.

A organização em faixas é a mesma observada aos 15 e 30 dias. O osso lamelar neoformado apresenta-se compacto e organizado. Observa-se diminuição da área do implante (Figuras 18 e 19). O osso lamelar neoformado circunda o implante.

Na área destacada observam-se as faixas de fibrina, granulação, fibrose e o tecido ósseo neoformado, de aspecto lamelar, com osteócitos aprisionados na matriz mineralizada. Observa-se a formação de osteóide, denotando deposição de matriz óssea não mineralizada. Observa-se igualmente o anel de osteoblastos em torno das trabéculas ósseas e áreas de colágeno entremeadas no tecido conjuntivo adjacente à área de deposição de fibrina. (Figura 20).

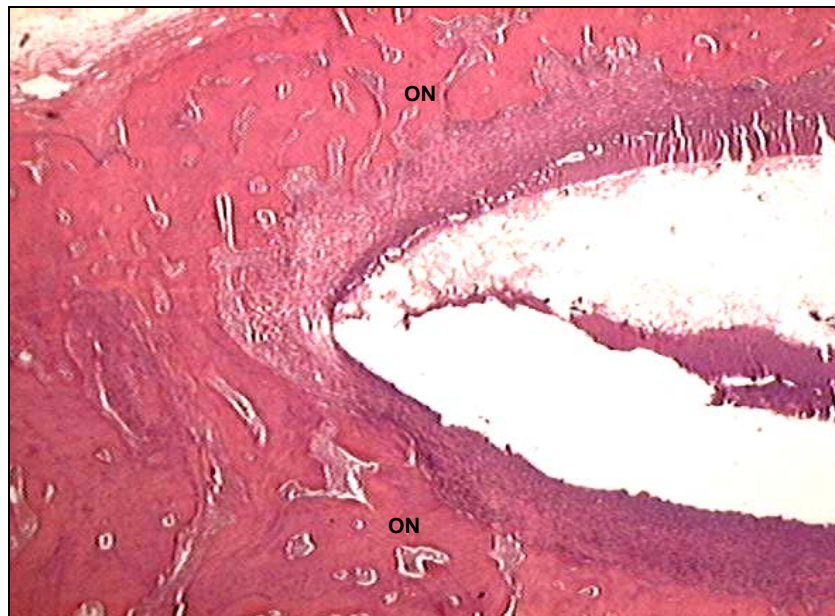


FIGURA 18 - Tecido ósseo lamelar neoformado (ON) em toda a extensão do implante: superior, inferior e na lateral esquerda (45 dias, HE 40X).

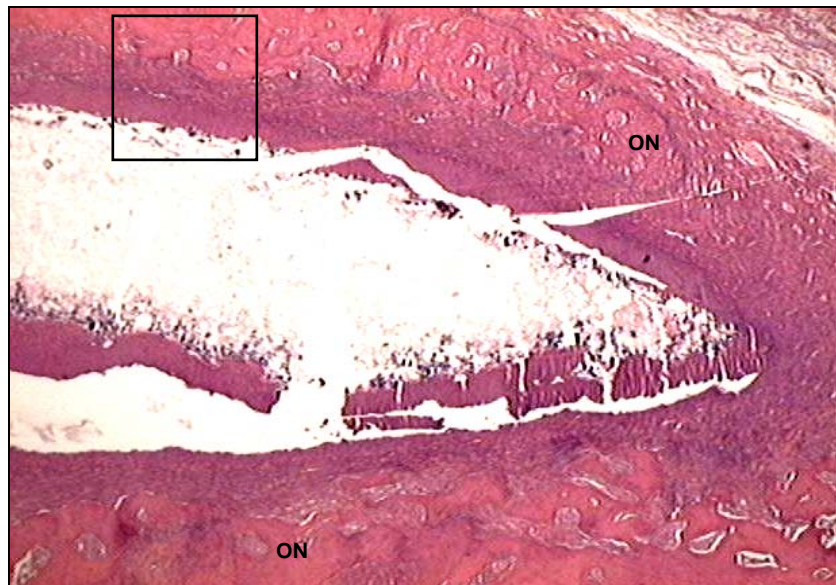


FIGURA 19 – Tecido ósseo lamelar neoformado (ON) em toda a extensão do implante: superior, inferior e na lateral direita (45 dias, HE 40X).

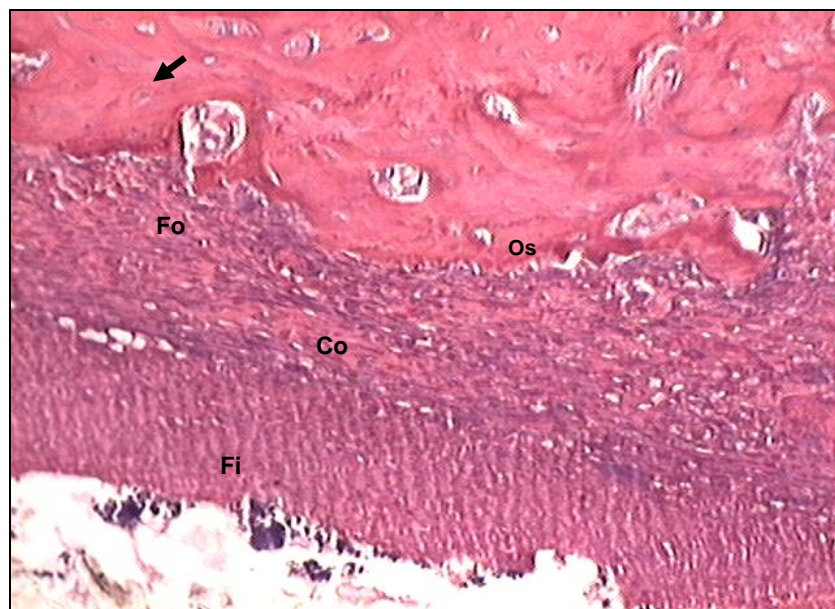


FIGURA 20 – Fibrina (Fi), colágeno (Co) na área de granulação, fibrose (Fo), osteóide (Os) e osteócito (seta). (45 dias, HE 200X).

4.4 Grupo IV – 60 dias HE.

Observa-se deposição de tecido ósseo neoformado de aspecto lamelar, mais organizado e compacto. É visível faixa de deposição de fibrina, tecido de granulação e estreita faixa de fibrose. Observa-se o padrão centrípeto de formação óssea, com o anel de osteoblastos circundando as trabéculas ósseas neoformadas.

Na interface implante/osso, não há fibrose (Figuras 21 e 22).

Na área destacada, observam-se as faixas de fibrina, tecido de granulação, fibrose e neoformação óssea (osteóide depositado pelo anel de osteoblastos adjacentes à trabécula óssea neoformada), os osteócitos estão aprisionados na matriz óssea mineralizada com manutenção dos núcleos e formação de vasos (V) no tecido de granulação (Figura 23).

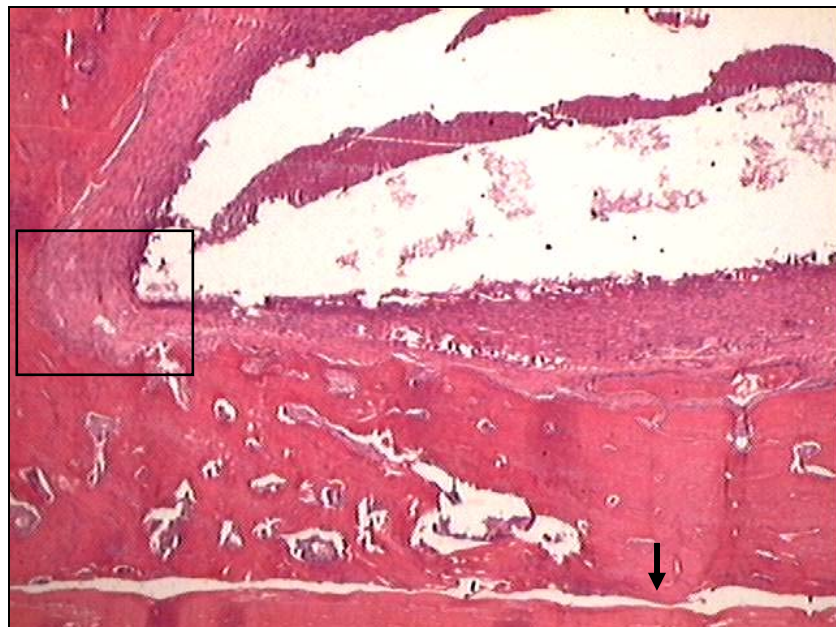


FIGURA 21 - Tecido ósseo lamelar neoformado na interface osso/implante (seta) sem a formação de fibrose (60 dias HE 40X).



FIGURA 22 - Tecido ósseo lamelar neoformado na interface osso/implante (seta) sem a formação de fibrose (60 dias HE 40X).

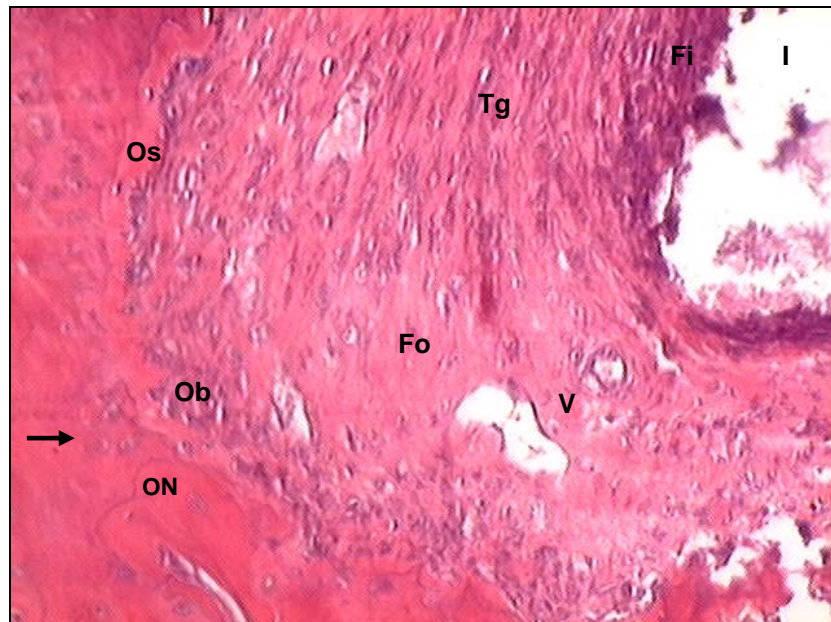


FIGURA 23 – Fibrina (Fi), tecido de granulação (Tg), fibrose (Fo), vaso (V), anel de osteoblastos (Ob), osteóide (Os), osso lamelar neoformado (ON), osteócito (seta), implante (I) (60 dias, HE 400X).

4.5 Grupo V – 90 dias HE.

O osso lamelar neoformado apresenta-se perpendicular à cortical externa substituindo quase que totalmente o implante por novo tecido ósseo. Observa-se formação de osso de aspecto lamelar circundado pelo anel de osteoblastos e o perióstio cobre totalmente a superfície do implante. (Figuras 24 e 25). Na área superior, em destaque, observa-se trabécula óssea circundada por anel de osteoblastos, osteócitos nucleados aprisionados na matriz óssea mineralizada, formação de colágeno e presença de vasos sanguíneos no perióstio (Figura 26). Na área destacada inferior vê-se claramente a interface osso/implante sem a formação de fibrose, juntamente com tecido ósseo neoformado lamelar, osteócitos aprisionados na matriz mineralizada. São visíveis canais vasculares (Figura 27).

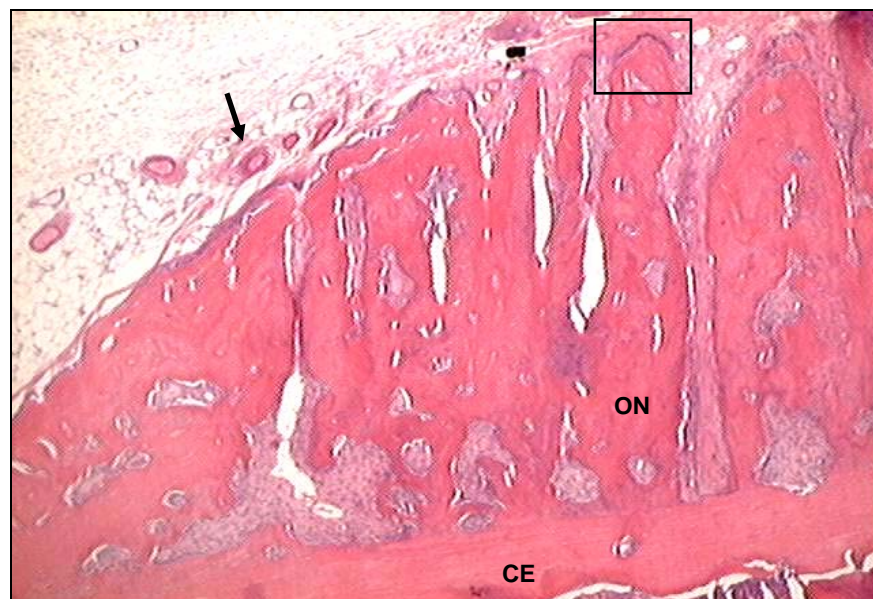


FIGURA 24 – Formação de vasos no perióstio (seta), osso lamelar neoformado com direção vertical (ON), cortical externa com direção horizontal (CE) (90 dias, HE 40X).

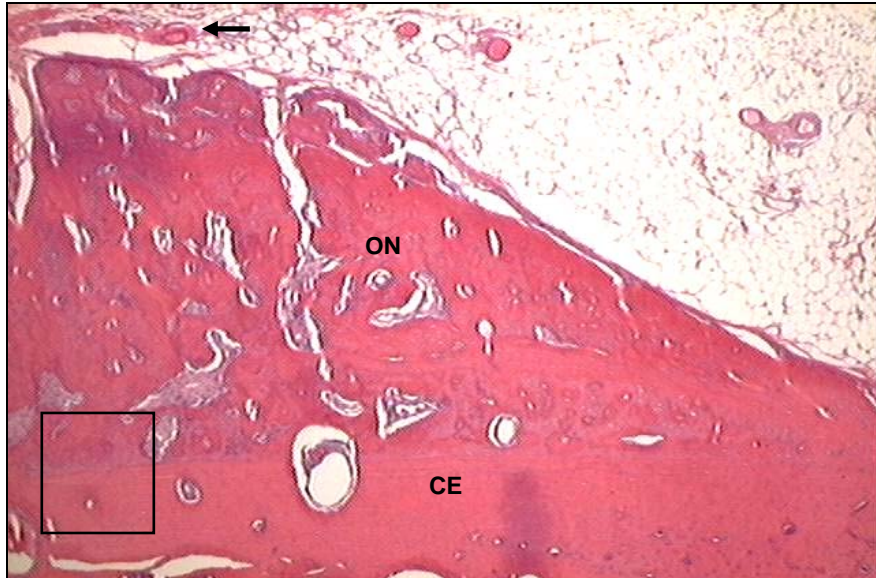


FIGURA 25 – Formação de vasos no periósteo (seta), osso lamelar neoformado com direção vertical (ON), cortical externa com direção horizontal (CE) (90 dias, HE 40X).

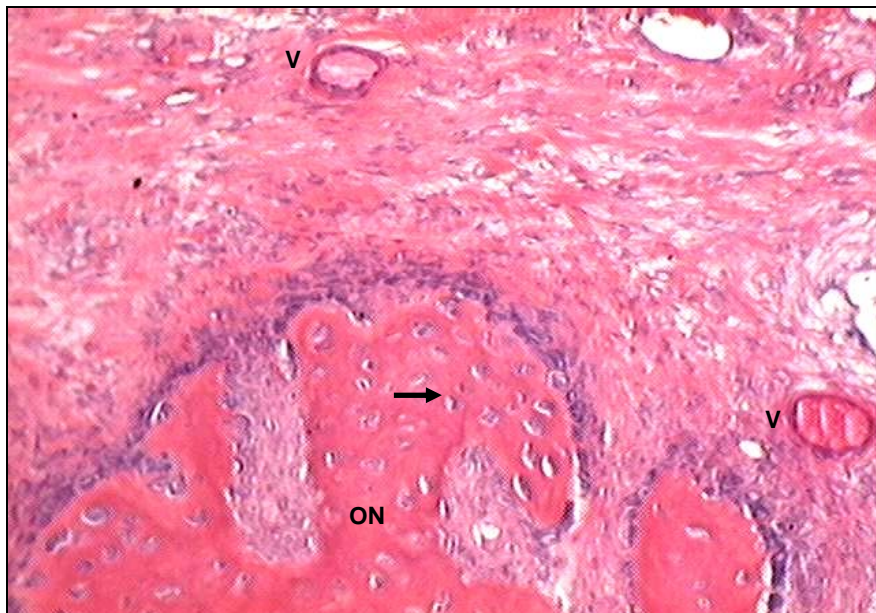


FIGURA 26 – Vaso (V), osso lamelar neoformado (ON) circundado por anel de osteoblastos, osteócitos (seta) (90 dias, HE 200X).

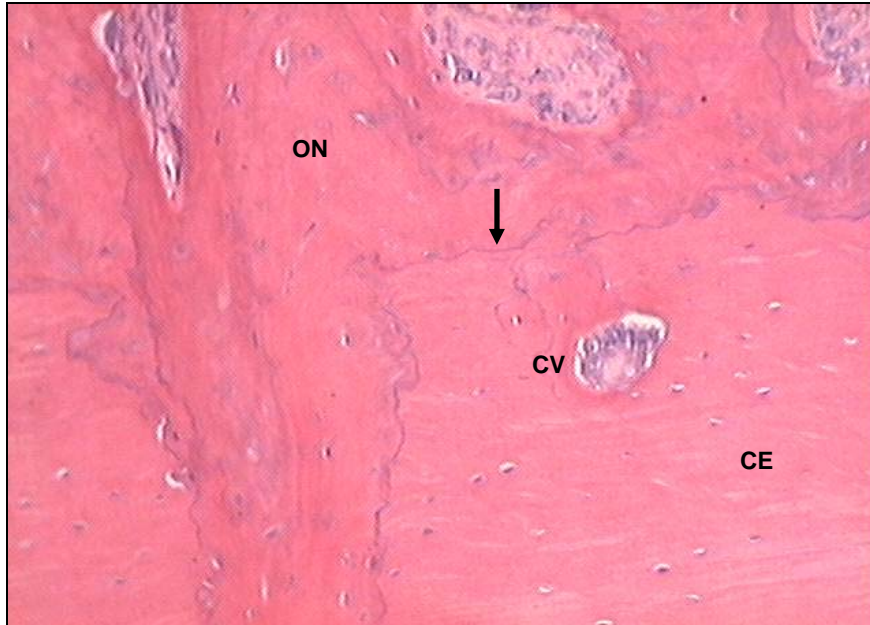


FIGURA 27 – Interface osso/implante: ausência de fibrose (seta), osso lamelar neoformado (ON), cortical externa (CE), canal vascular (CV) (90 dias, HE 400X).

4.6 Grupo VI – 120 dias HE.

Observa-se tecido ósseo lamelar neoformado; diminuição dos espaços medulares; padrão ósseo compacto. A cortical externa apresenta-se sem áreas de reabsorção ou necrose. Persistência do padrão de deposição óssea vertical em relação à cortical externa (Figura 28).

No destaque superior observam-se as trabéculas ósseas fortemente compactas e o anel de osteoblastos na periferia. Presença de osteócitos nucleados na matriz óssea mineralizada e periósteo apresentando aspecto normal caracterizado pela camada fibrosa e a camada osteogênica (Figura 29). Na figura 30 apresenta-se o destaque inferior com a interface osso/implante sem fibrose.



FIGURA 28 – Compactação do tecido ósseo neoformado sem fibrose na interface osso/implante. (120 dias, HE 40X).

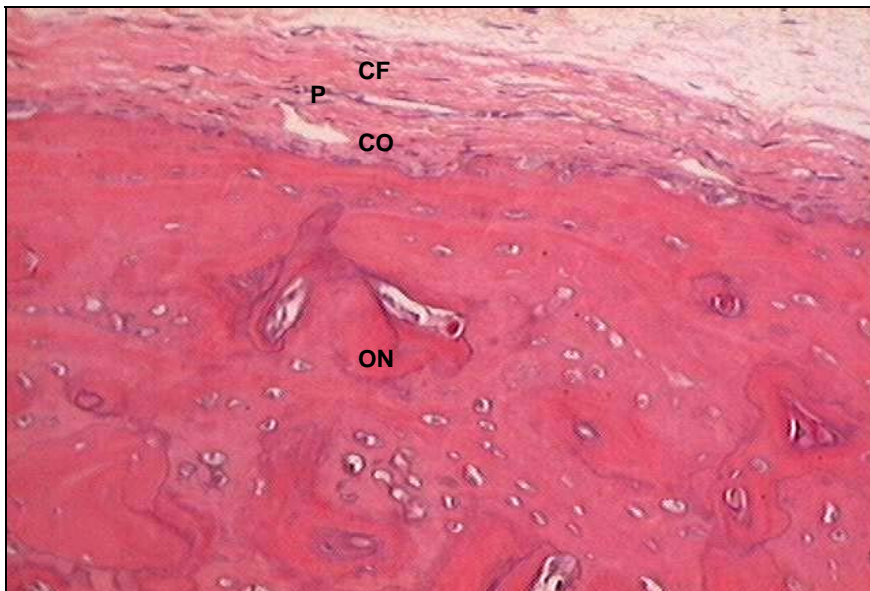


FIGURA 29 – Perióstio (P) – camada fibrosa (CF) e camada osteogênica (CO), osso lamelar neoformado (ON) (120 dias, HE 200X).

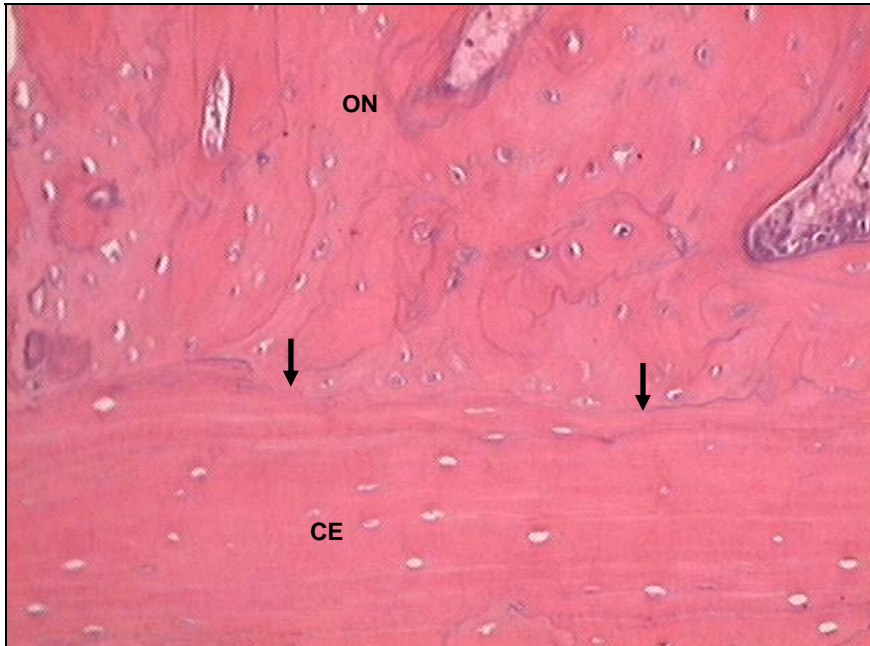


FIGURA 30 – Interface osso/implante sem a formação de fibrose (setas), osso lamelar neoforado (ON), cortical externa (CE) (120 dias, HE 200X).

4.7 Outras colorações.

4.7.1 Hematoxilina fosfotúngstica (cora fibrina) **Grupo III - 45 dias.**

A faixa de fibrina é corada em azul escuro, seguida pela faixa de tecido de granulação em tom azulado e por tecido ósseo neoforado em roxo (Figura 34).

No destaque observa-se claramente a formação da rede de fibrina (seta). As áreas claras são próprias do material. Observam-se ainda pequenas partículas birrefringentes próprias do material sendo entrelaçadas pela rede de fibrina (Figura 35).

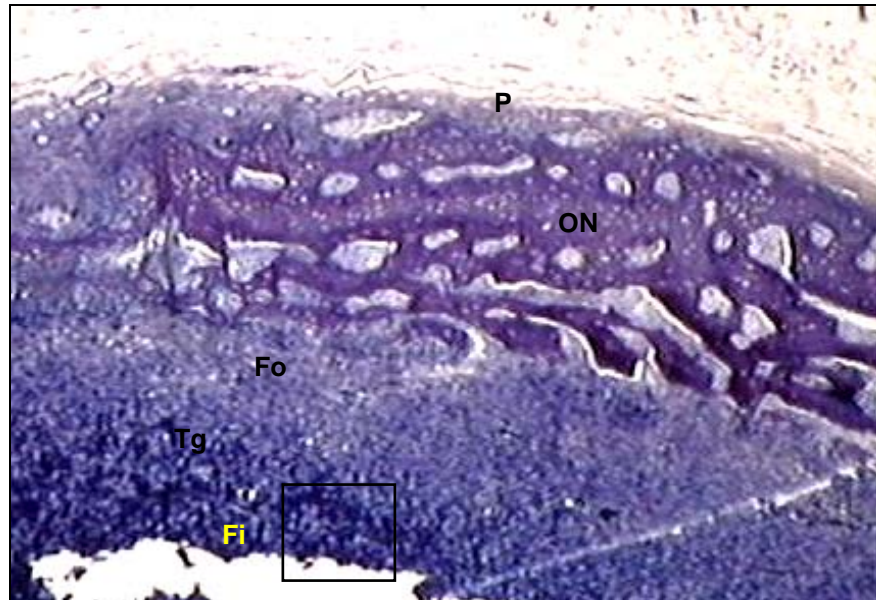


FIGURA 31 – Faixa de fibrina (Fi), tecido de granulação (Tg), fibrose (Fo), osso lamelar neoformado (ON), periósteo (P) (45 dias, Hematoxilina fosfotúngstica 40X).

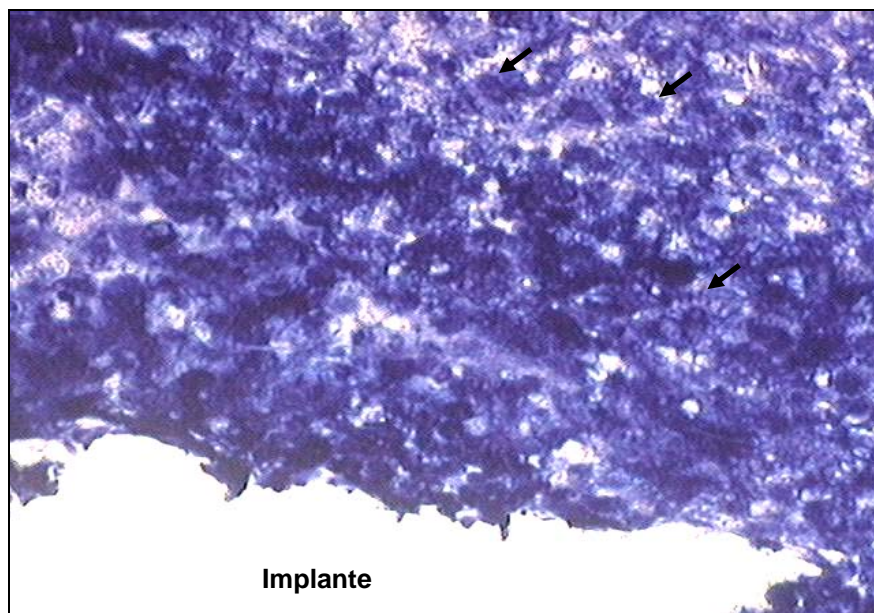


FIGURA 32 – Rede de fibrina (setas) e partículas do material sendo entrelaçadas (45 dias, hematoxilina fosfotúngstica 200X).

4.7.2 Alizarina 4.2 (cora Ca) – Grupo V - 90 dias.

Observa-se a cortical corada em castanho (Fosfato de Ca e Carbonato de Ca) o anel de osteoblastos em vermelho adjacente ao osso lamelar marcado em tons de verde e, principalmente, áreas entremeadas no osso lamelar denotando presença de fosfato de cálcio e carbonato de cálcio, corados em castanho (Figura 36).

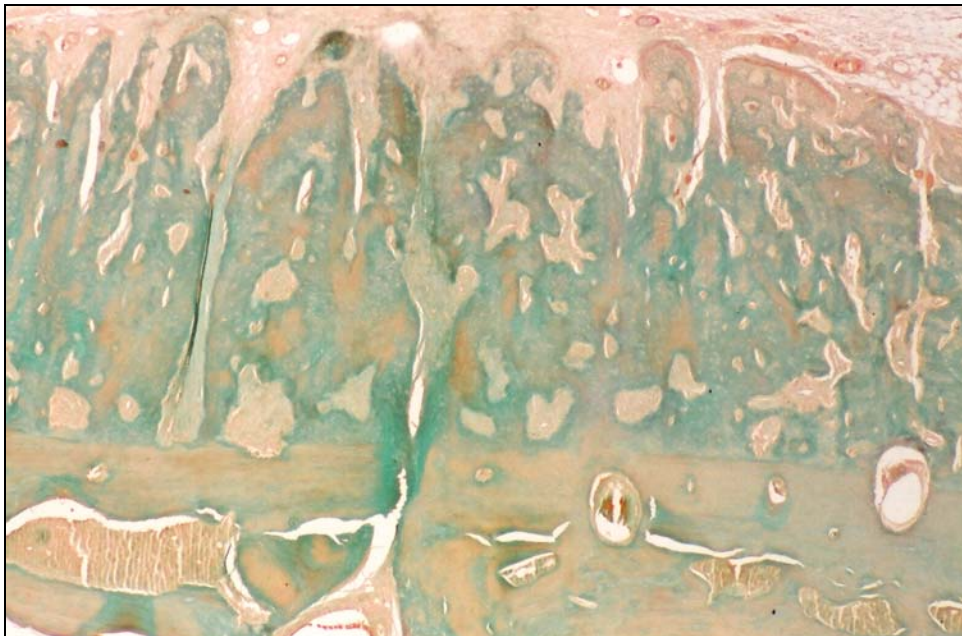


FIGURA 33 – Alizarina 4.2 corando carbonato de cálcio e fosfato de cálcio. (90 dias, Alizarina 4.2 40X).

4.7.3 Picrosirius red (evidencia osteóide) – Grupo VI -120 dias.

Observa-se o corte sem luz polarizada, onde o colágeno total é corado em bordô escuro, não se diferencia o colágeno jovem e osteóide. O periósteo cobre o implante e a cortical aparece corada em tom mais claro (Figura 37). Sob luz polarizada observa-se a marcação do colágeno jovem em tom amarelo birrefringente e, em tom vermelho birrefringente, o osteóide. Em tom verde observa-se o osso compacto, tanto na cortical como na área do implante, de maneira organizada, disposta em direção paralela ou concêntrica em torno de um canal vascular (Figura 38).

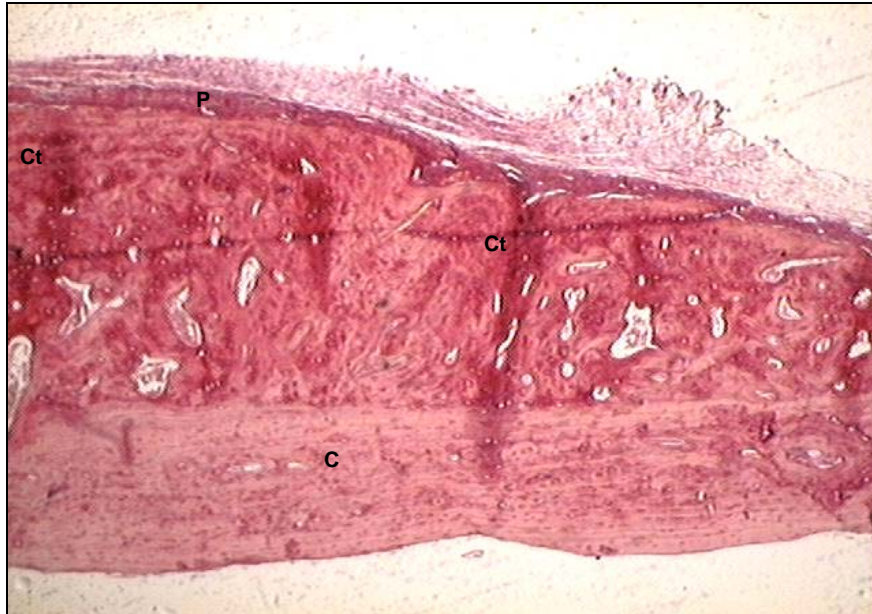


FIGURA 34 – Perióstio (P), colágeno total (Ct), cortical (C) (120 dias, picosirius red 40X).

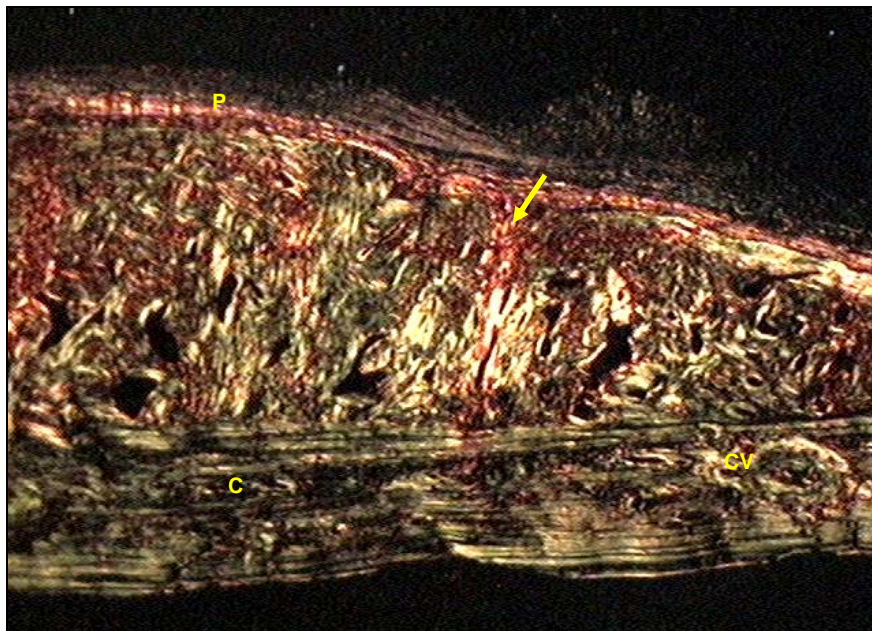


FIGURA 35 – Picosirius red sob luz polarizada: Osteóide (seta), perióstio (P), colágeno jovem amarelo birrefringente, canal vascular (CV), cortical (C) (120 dias, picosirius red sob luz polarizada 40X).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Espécimes analisados em HE.

15 dias HE.

A adaptação inicial do implante sólido à cortical resulta em estratificação centrípeta, constituída por três camadas distintas: fibrosa, granulosa e fibrinosa. Nesta fase, ainda não é evidente a neoformação óssea. Estas três camadas são resultantes do processo de osteoindução e estão presentes em todos os grupos, a partir dos 15 dias, com exceção do grupo de 120 dias, onde já ocorreu substituição do implante por tecido ósseo neoformado. Esta estratificação foi observada tanto na parte superior, na interface periósteo/implante, como na inferior, na interface cortical/implante.

Holland et al ³⁸, trabalhando com cimento em fase pastosa, demonstraram que o CaO, do pó do cimento, ao ser preparado com H₂O, é convertido em Ca(OH)₂ que, em contato com os fluidos tissulares, dissocia-se em íons Ca⁺⁺ e (OH)⁻. Os íons Ca⁺⁺, reagindo com o CO₂ dos tecidos, originam a granulações de CaCO₃. Junto a estas granulações, acumula-se fibronectina permitindo a adesão e diferenciação celular. A deposição de fibronectina na superfície e no interior do implante, leva ao fenômeno de adesão celular permitindo assim a diferenciação das células precursoras de osteoblastos e osteoclastos.

O início do processo de osteogênese é explicado pela dissolução, em meio aos fluidos tissulares, dos íons Ca⁺⁺, fosfato e hidroxila, formando hidroxiapatita conforme demonstrado por Sarkar et al ³⁵, em estudo *in vitro*, usando cimentos em fase pastosa. O processo continua não somente na superfície do implante como em seu interior, pois sua natureza porosa permite a penetração e adesão das células indiferenciadas (osteocondução) levando à precipitação de íons Ca⁺⁺, fosfato e hidroxila com subsequente precipitação de hidroxiapatita. A formação de tecido ósseo é um processo dinâmico e contínuo; a mineralização do tecido ósseo acontece pela mineralização das fibrilas de colágeno da matriz óssea não mineralizada (osteóide)^{41, 42, 43}.

30 dias HE.

As faixas de fibrina e de tecido de granulação apresentam-se mais espessas comparando-se com os 15 dias. É evidente a neoformação óssea lamelar, evidenciada pelas trabéculas circundadas por osteoblastos. Isto significa que os osteoblastos sofreram diferenciação celular, estão aderidos ao implante e secretam

matriz óssea não mineralizada (osteóide), processo fisiológico da osteogênese ^{42, 43}. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Yokoyama et al ³⁶, aos trinta dias.

45 dias HE.

O aspecto aos 45 dias é semelhante ao de 30 dias. Ocorreu maior deposição de tecido ósseo neoformado, circundando todo o implante, bem como é evidente a deposição centrípeta. A área do implante está parcialmente preenchida pela substituição do cimento por tecido ósseo lamelar neoformado. Este padrão lamelar também foi observado por Yokoyama ³⁶, trabalhando com implantes sólidos de *cimento de fosfato de Ca* apostos em calotas cranianas de ratos.

Os osteócitos apresentam-se nucleados, significando que o osso é viável, ao contrário da ausência nuclear observada na necrose óssea.

O padrão da estratificação observado nas lâminas de 45 dias (Figura 20) sugere fortemente o fenômeno de metaplasia óssea, que vai completar-se aos 120 dias, com a compactação óssea total.

60 dias HE.

Observa-se relação de contato direto entre o osso neoformado e a cortical externa, sem presença de fibrose, o que caracteriza a osteointegração, confirmando os resultados obtidos por Saidon et al ⁹. A osteointegração foi definida, histologicamente, como “a ancoragem direta de um implante por formação de tecido ósseo sem o crescimento de tecido fibroso na interface osso/implante” ⁴⁴.

Ao mesmo tempo, o fenômeno de osteocondução⁴⁴ continua ativo, centripetamente, como demonstrado pela figura 23, bem como a flagrante diminuição da área do implante por substituição por osso lamelar.

90 dias HE.

Surgem evidências de um padrão de neoformação óssea caracterizado por osso lamelar em trabéculas perpendiculares à cortical e ao perióstio. Este padrão colunar perpendicular não foi previamente descrito na literatura, (Figura 24). A área referente ao implante aparece quase totalmente preenchida por tecido ósseo neoformado. Confirma-se o fenômeno da integração óssea sem fibrose ⁴⁴, observada anteriormente na interface cortical/osso neoformado.

O perióstio apresenta-se bem vascularizado, adjacente à interface perióstio/osso neoformado, sugerindo suprimento de células osteoprogenitoras

(Figura 24). Subjacente ao periosteio, observa-se camada de tecido conjuntivo vascularizado, com anel de osteoblastos circundando as lamelas ósseas neoformadas. O fenômeno da osteotransdução²⁶ começa a ficar claro neste período onde acontece a neoformação de tecido ósseo lamelar por metaplasia óssea (Figura 26).

O osso neoformado próximo à interface com a cortical externa apresenta canais vasculares, sugerindo osso maduro e saudável⁴¹ (Figuras 24 e 25).

120 dias HE.

O osso neoformado preenche toda a área anteriormente ocupada pelo implante. O osso apresenta-se compacto, com presença de canais vasculares, marginados por osso em forma concêntrica, osteoblastos na periferia e osteócitos no interior do tecido ósseo mineralizado, características de osso normal e sadio.

O periosteio apresenta-se menos vascularizado quando comparado com as fases anteriores. A camada osteogênica do periosteio continua presente; porém, a camada fibrosa é mais fina, estrutura esta compatível com o periosteio normal não estimulado^{41, 42} (Figura 29).

5.2 Outras colorações.

Hematoxilina fosfotúngstica.

Utilizou-se esta coloração para corar fibrina⁴⁵. O grupo selecionado III (45 dias), onde os estratos apresentam-se bem distintos. A fibrina é uma glicoproteína de baixo peso molecular e estabelece ligação (adesão celular) com outras moléculas, principalmente colágeno. Além de favorecer a adesão celular, promove a diferenciação das células ósseas. É encontrada em estágios de remodelação tecidual e cicatrização de feridas⁴¹.

Inicialmente, o periosteio está em contato direto como o implante. Por estímulo do periosteio e do próprio material implantado (fonte de íons cálcio e fosfato)^{7, 8, 38}, ocorre a formação de fibrina que, pelo mecanismo acima citado, promove diferenciação e crescimento celular^{7, 30, 32, 35, 38}. A rede de fibrina adere aos cristais amorfos do cimento (Figura 32).

Estes resultados estão acordes com Mitchell et al¹², sugerindo que, mesmo sendo pequena a solubilidade do cimento sólido, ocorre diluição superficial do material, estimulando assim os osteoblastos a sintetizarem citocinas. Parece

confirmada a possibilidade levantada por estes autores de que a microestrutura cristalina do cimento possa fornecer o estímulo para a adesão e crescimento celular.

Mesmo não sendo o ensaio de biocompatibilidade objetivo deste trabalho, a adesão celular mediada pela fibrina corrobora o conceito de não aderência de células à superfície de materiais tóxicos, conforme demonstrado por Abdullah et al ³² em estudo específico da toxicidade do material.

Alizarina 4.2.

Alizarina 4.2 é uma coloração pH dependente que pode diferenciar a formação de oxalato de cálcio, carbonato de cálcio e fosfato de cálcio. Oxalato de cálcio cora-se em tom laranja em pH 7, mas não se cora em pH 4.2. O carbonato de cálcio e o fosfato de cálcio coram-se em castanho, tanto em pH 7 como em pH 4.2 ⁴⁶. Utilizou-se para pesquisa destes componentes do tecido ósseo, componentes estes presentes na HA. A lâmina selecionada foi do grupo **V**, fase em que o implante foi quase totalmente substituído por tecido ósseo neoformado. É evidente a presença de carbonato de cálcio e fosfato de cálcio, componentes do osso normal e da HA, comprovando que a estrutura do implante sólido é fonte de íons capazes de estimular a formação óssea, acorde com Mitchell et al ^{8, 12} (Figura 36).

Picrosirius red.

O tecido ósseo é inicialmente produzido na forma de matriz não calcificada, composta de fibras colágenas casualmente orientadas, finas, curtas, associadas à substância fundamental amorfa: este material é chamado osteóide.

Utiliza-se o picrosirius red para marcação de colágeno total. Porém, quando utilizado sob luz polarizada, o osteóide mostra-se como uma rede tridimensional casualmente orientada, fina, curta, fracamente birrefringente, contra um fundo negro⁴⁷. Observa-se na figura 38 que colágeno jovem e osteóide ainda estão presentes na área do implante, mesmo aos 120 dias, indicando processo de deposição de matriz óssea não mineralizada, o qual posteriormente é mineralizada, originando osso compacto, processo normal de formação de tecido ósseo saudável ^{41, 42}.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Pela análise dos resultados obtidos no presente trabalho, parece lícito concluir que:

1. O cimento Portland, em forma de corpos de prova sólidos, justapostos à cortical externa e sob o perióstio em calotas cranianas de ratos, integrou-se totalmente e foi substituído por osso lamelar compacto. O osso neoformado tem aspecto normal, como sugere a presença de osteócitos nucleados, canais vasculares, integridade do perióstio e do endóstio. Ocorreu contato direto, sem fibrose - osteointegração – na interface osso neoformado/cortical externa.
2. O cimento Portland apresentou osteotransdutividade, que pode ser atribuída principalmente à sua atividade osteoindutora e osteocondutora, similar ao processo de remodelação óssea.
3. Embora não sendo objetivo deste trabalho a investigação da biocompatibilidade do material, a presença de fibrina é evidência de atoxicidade, pois ocorreram osteoindução e osteocondução, seguidas de adesão e diferenciação celular.
4. O cimento Portland em estado sólido tem potencial para ser usado como substituto ósseo.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS¹⁵

1. Wucherpfennig AL, Green DB. Mineral Trioxide vs Portland cement: Two biocompatible filling materials. *J Endod* 1999; 25. Abstract: 308.
2. Associação Brasileira de Cimento Portland. Guia básico de utilização do cimento Portland. Boletim técnico 106. 7 ed. São Paulo 2002: 1-27.
3. Gobbo, LA. Os compostos do clínquer Portland: sua caracterização por difração de raios-X e quantificação por refinamento de Rietveld. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de Geociências 2003: 4-34.
4. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993; 19: 541-544.
5. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999; 25: 197-205.
6. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993; 19: 591-595.
7. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biom Mat Res* 1997; 37: 432-439.
8. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1998; 24: 543-547.
9. Saidon J, Jianing He, Qiang Zhu, Safavi K, Spangberg, Larz SW. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 483-489.
10. Ribeiro DA, Duarte MAH, Matsumoto MA, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility in Vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular end white Portland cements. *J Endod* 2005; 31: 605-607.
11. Torreira MG, dos Santos AA, Rodriguez Cobos MA, Fuentes Boquete I, Crespo Abelleira A. The osteoinductive potential of MTA (Mineral trioxide aggregate): a histologic study in rabbits. *Eur J Anat* 2004; 8: 101-105.
12. Mitchell PJC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999; 20: 167-173.
13. Keiser K, Johnson C, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2000; 26: 288-291.

¹⁵ As referências seguem as normas do ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) – (Vancouver).

14. Duarte MAH, Demarchi ACCO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99: 648-650.
15. Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end-filling materials. *J Endod* 1995; 21: 537-539.
16. Asrari M, Lobner D. In vitro neurotoxic evaluation of root-end-filling material. *J Endod* 2003; 29: 743-746.
17. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: A scanning electron microscope study. *J Endod* 2004; 30: 25-29.
18. Torabinejad et al. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end-filling in monkeys. *J Endod* 1997; 23: 225-228.
19. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, sealapex and dycal. *Braz Dent J* 2000; 11: 3-6.
20. Al-Hezaimi et al. Effect of White-colored mineral trioxide aggregate in different concentrations on *Candida albicans* in vitro. *J Endod* 2005; 31: 684-686.
21. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end-filling material. *J Endod* 1995; 21: 109-112.
22. Shin S, Chen I, Li D, Nah H, Kim S. Biocompatibility and mitogenic effect of several root-end-filling materials in osteoblast and odontoblast cultures. *J Endod* 2003; 29: abstract: 306.
23. Holland et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2001; 12: 3-8.
24. Torabinejad M, Pitt Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam PS, Tang HM. Tissue reaction to implanted root-end-filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. *J Endod* 1998; 24: 468-471.
25. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kariyawasam PS. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: A preliminary report. *J Endod* 1995; 21: 569-571.
26. Driessens FCM, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. *Proc Instn Mech Engrs* 1998; 212: 427-435.

27. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; 21: 349-353.
28. Funteas UR, Wallace JA, Fochtman FW. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod* 2002; 28: Abstract: 259
29. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pitt Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mat* 2005; 21: 297-303.
30. Islam I, Chng HK, Jin Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod* 2006; 32: 193-197.
31. Pelliccioni et al. Evaluation of osteoblast-like cell response to ProRoot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. *J Mat Sci: Mat Med* 2004; 15: 167-173.
32. Abdullah D, Pitt Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials* 2002; 23: 4001-4010.
33. Schwarz R, Mauger M, Clement D, Walker W. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Ass* 1999; 130: 967-975.
34. Cintra LTA et al. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *J Endod* 2006; 32: 556-559.
35. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; 31: 97-100.
36. Yokoyama A, Yamamoto S, Kawasaki T, Kohgo T, Nakasu M. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials. *Biomaterials* 2002; 23: 1091-1101.
37. Guarnieri R, Bovi M. Maxillary sinus augmentation using prehardened calcium sulfate: A case report. *Int J Per Rest Dent* 2002; 22: 503-508.
38. Holland R, Souza V, Delgado RJM, Murata SS. Agregado de trióxido mineral (MTA): composição, mecanismo de ação, comportamento biológico e emprego clínico. *Rev Ciên Odont* 2002; 5: 7-21.
39. Safavi K, Nichols FC. Secretion of PGE₂ from monocytes exposed to MTA or Portland cement. *J Endod* 2000; 26: Abstract: 540.
40. Normas para a Prática didático-científica da vivisseção de animais. Lei 6638 de 08 de maio de 1979. (on line) available: <http://www.ufrgs.br/bioetica/lei6638.htm>. março 18, 2006.

41. Buckwalter et al. Bone Biology. Part II: Formation, form, modeling, remodeling and regulation of cell function. In: Instructional Course Lectures. J Bone Joint Surg 1996; 45: 1256-1289.
42. Kalfas IH. Principles of bone healing. Neurosurg Focus 2001; 10: 1-4.
43. Davies, JE. In vitro modeling of Bone/implant interface. Anat Rec 1996, 245: 426-445.
44. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J 2001; 10: S96-S101.
45. Hematoxilina fosfotungstica – P.T.A.H. (on line): available: <http://www.bio-optica.it/pdf/10017.pdf>. Agosto 18, 2006.
46. Moe et al. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. Kidney Int 2002; 61: 638-647.
47. Junqueira LC, Assis Figueiredo MT, Torloni H, Montes GS. Differential histologic diagnosis of osteoid. A study on human osteosarcoma collagen by the histochemical Picrosirius-polarization method. J Pathol 1986; 148: 189-196.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO A



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 29 de setembro de 2005.
PARECER N. 78/05/CEPA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR, em reunião realizada no dia 26 de setembro do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Implantes de cimento de fosfato de cálcio", sob o registro no CEPA /PUCPR nº 107

O experimento classificado como de categoria C será realizado com o número de 50 Ratos Wistar, os quais após o experimento serão eutanasiados.

O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Paulo Henrique Couto Souza".

Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza
Secretário do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR

Ilmo Sr.

Wilson Denis Benato Martins

ANEXO B

Normas para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de Animais

Brasil

Lei 6638, de 08 de maio de 1979

Art. 1 - Fica permitida, em todo o território nacional, a vivissecção de animais, nos termos desta Lei.

Art. 2 - Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3 - A vivissecção não será permitida:

I - sem o emprego de anestesia; II - em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competente;

III - sem supervisão de técnico especializado;

IV - com animais que não tenham permanecido mais de 15 (quinze) dias em biotérios legalmente autorizados;

V - em estabelecimento de ensino de 1o. e 2o grau e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

Art. 4 - O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizagem cirúrgico, quando, durante ou após a vivissecção, receber cuidados especiais.

Parágrafo 1 - Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas;

Parágrafo 2 - Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30 (trinta) dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

Art. 5 - Os infratores desta Lei estarão sujeitos:

I - às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto-lei 3.688, de 03/10/41, no caso de ser a primeira infração;

II - à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência.

Art. 6 - O Poder Executivo, no prazo de 90 (noventa) dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

I - o órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstrações com animais vivos;

II - as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;

III - órgão e autoridades competentes para fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

Art. 7 - Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 8 - Revogam-se as disposições em contrário.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)