



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA  
BUCOMAXILOFACIAL  
NÍVEL DOUTORADO**

**TAIANE COUTINHO DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO  
CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO (CFC) REFORÇADO POR  
FIBRAS IMPLANTADO SUPRA-CORTICALMENTE EM FÊMUR DE  
RATOS**

Porto Alegre

2009



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA  
BUCOMAXILOFACIAL  
NÍVEL DOUTORADO**

**TAIANE COUTINHO DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO  
CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO (CFC) REFORÇADO POR  
FIBRAS IMPLANTADO SUPRA-CORTICALMENTE EM FÊMUR DE  
RATOS**

**Orientador:** Prof. Dr. Claiton Heitz

**Co-orientador:** Prof. Dr. Marcos Antonio Torriani

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Etges

**Linha de Pesquisa:** Biocompatibilidade de Materiais

**Porto Alegre**

**2009**

**TAIANE COUTINHO DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO  
CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO (CFC) REFORÇADO POR  
FIBRAS IMPLANTADO SUPRA-CORTICALMENTE EM FÊMUR DE  
RATOS**

**Linha de Pesquisa:** Biocompatibilidade de Materiais

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2009

## AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar os meus passos e me proteger sempre.

À minha família pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Muito obrigada!

Aos meus pais, pelo amor e incentivo a cada momento, permitindo assim a realização deste trabalho.

À minhas irmãs, pelo apoio e amizade incondicional.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do seu Reitor Prof. Dr. Joaquim Clotet.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES) pela viabilização da bolsa de estudo, possibilitando a confecção deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia PUCRS na pessoa do seu diretor, Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho.

Ao Prof. Dr. Cláiton Heitz, meu orientador. Agradeço os votos de confiança e auxílio nessa jornada.

À Profa. Dr<sup>a</sup>. Adriana Etges e Prof. Dr. Marcos Torriani, meus co-orientadores, pela incansável ajuda e apoio na realização deste trabalho.

Aos professores do Depto. de Cirurgia, Traumatologia e Prótese Buco-Maxilo-Faciais da Faculdade de Odontologia de Pelotas, pela amizade e incentivo durante toda minha carreira.

Aos colegas de Pós-Graduação, Roger, Vinícius, Hed, Lênilson, Paulo e André, pelo companheirismo e amizade construída nestes anos.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, Ana Prestes, Davenir Brush, Marcos Correia e Carlos Minossi, pela atenção e disponibilidade.

Aos funcionários do Biotério da UFPel, cuja colaboração foi fundamental na realização deste trabalho.

Ao Prof. Milton Amaral diretor do Biotério da UFPel pela constante ajuda na execução da parte experimental deste trabalho.

Aos funcionários e professores do Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca pela inestimável ajuda na confecção das lâminas.

A todos o meu muito obrigada!

## RESUMO

Este estudo analisa histologicamente o efeito do Cimento de Fosfato de Cálcio (CFC) reforçado com fibras de náilon, carbono e polipropileno utilizado como implante supra-cortical em fêmur de ratos. Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, com cerca de 300g cada. Sendo confeccionadas placas de CFC com fibras, no tamanho de 2 mm de espessura por 6 mm de diâmetro, os quais foram aparafusados no fêmur dos animais. E estes foram eutanasiados em 30, 60, 90 e 120 dias após o implante sendo as peças removidas e submetidas ao processo de rotina para confecção de lâminas, coradas com Hematoxilina e Eosina. Foram avaliados nos diferentes tempos a biocompatibilidade, o grau de reabsorção do material e a sua capacidade de osteocondução. Em todos os tempos estudados os cortes histológicos revelam formação de tecido conjuntivo denso, pouco celularizado, apresentando discretamente vascularizado e discreto infiltrado inflamatório mononuclear. No entorno do implante, observam-se discretas áreas de reabsorção, e indução de hialinização das fibras colágenas periféricas. O tecido apresenta inclusão do material do implante. Aos 120 dias chama a atenção a formação de material osteóide, O grau de reabsorção óssea na periferia do implante foi menor não apresentando significância estatística. Podendo-se concluir que: O CFC com fibras é biocompatível, promove a osteocondução e neoformação óssea contornando o cimento. O CFC com fibras, na forma de placas pré-fabricadas é adequado para ser utilizado como implante e substituto ósseo, dentro dos parâmetros deste experimento.

**Palavras-chave:** Biomateriais; Substitutos ósseos; Cimento de Fosfato de Cálcio.

## ABSTRACT

This study examines histologically the effect of cement Calcium Phosphate (CFC) reinforced with nylon fibers, polypropylene and carbon used as implant supra-cortical femur of rats. We used 20 male Wistar rats, approximately 300g each. Being prepared plates CFC with fibers, on the size of 2mm thick and 6 mm in diameter, which were tightened in the femur of animals. These were euthanized at 30, 60, 90 and 120 days after the implant. These pieces were removed and subjected to a routine process for preparing slides slides, stained with Hematoxilyn and Eosin. The biocompatibility, the degree material's resorption and its ability to osteoconduction were evaluated at the different times. At all diferents times studied, the histological sections showed formation of dense tissue, few cellularized, showing slightly vascularized and discrete mononuclear infiltration. In the area around the implant, there are discrete reabsorption areas, and hyalinization induction of collagen fibers peripheral. The tissue includes the material of the implant. After 120 days, may be observed a formation of osteoid material. The degree of bone reabsorption in the periphery of the implant was less, and without statistical significance. Can be concluded that: The CFC with fiber is biocompatible promotes bone conduction and bone neofomation rounding the cement. CFC with fibers in the form of prefabricated plates is suitable for use as implants and bone substitute, within the parameters of this experiment.

**Keywords:** Biomaterials. Bone replacements. Calcium Phosphate Cement.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Divulsão dos tecidos até exposição da diáfise do fêmur.....	28
<b>Figura 2</b>	Placa de CFC reforçada por fibras aparafusada no fêmur do rato.....	28
<b>Figura 3</b>	Visão lateral da placa de CFC reforçada por fibras aparafusada no fêmur .	29
<b>Figura 4</b>	Sutura em pontos isolados.....	29
<b>Figura 5</b>		
A –	Referente ao corte histológico do grupo experimental de 30 dias.....	33
B -	Referente ao corte histológico do grupo experimental de 60 dias.....	33
C -	Referente ao corte histológico do grupo experimental de 90 dias .....	33
D -	Referente ao corte histológico do grupo experimental de 120 dias .....	33
E -	Referente ao corte histológico do grupo experimental de 120 dias.....	33
F–	Referente ao corte histológico do grupo experimental de 120 dias .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BET	Área Superficial Específica
BMSCs	Células Estromais da Medula Óssea
BMP	Proteína(s) Morfogenética(s) Óssea(s)
$\beta$ -TCP	Fosfato $\beta$ -Tricálcio poroso
Ca	Cálcio
Céls	Células
DBM	Matriz Óssea Desmineralizada
CDDB	Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca
CFC	Cimento de Fosfato de Cálcio.
CMC	carboximetilcelulose
CSD	Sulfato de cálcio diidratado
DCPD	Fosfato dicálcico diidratado
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
FOP-UFPeI	Faculdade de Odontologia -Universidade Federal de Pelotas
g	grama
HA	hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e Eosina
Kg	Quilograma
IM	Osso Intramembranoso
mL	mililitro
mm	milímetros
PMMA	Polimetilmetacrilato
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PVPI	Polivinilpirolidona iodada
TTCP	Fosfato tetracálcico

SCG	Sulfato de Cálcio Granular
SC	Sulfato de Cálcio
SI	Silício
VB	Vidro bioativo
60S	Vidro bioativo com 60% de silício
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
®	marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3 REVISTA DA LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 MATERIAIS UTILIZADOS COMO SUBSTITUTOS DE TECIDO ÓSSEO .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO.....</b>	<b>19</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 PROBLEMA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 HIPÓTESES .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....</b>	<b>27</b>
<b>4.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS .....</b>	<b>30</b>
<b>4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA .....</b>	<b>30</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo tem a função primordial e essencial no metabolismo do cálcio, sendo o maior reservatório do organismo desse elemento, além de servir de ancoragem para origem e inserção dos músculos e realizar a proteção de estruturas nobres. Os tecidos mineralizados do esqueleto possuem um importante papel na locomoção e na função estrutural de suporte do corpo, possuindo certa resistência à quebra, flexibilidade e elasticidade estrutural (FEINBERG et al., 1997).

Muitas vezes procedimentos cirúrgicos em tecido ósseo, como remoção de cistos, principalmente de grandes proporções, enucleação de lesões tumorais, tratamento de processos inflamatórios crônicos, exodontias, bem como fraturas e o próprio processo de envelhecimento levam à perda de estrutura calcificada e à formação de espaços intra-ósseos (PETERSON et al., 2000; ROBERTS; GARETTO, 2000).

Em virtude disso, são inúmeras as pesquisas em busca de materiais alternativos para recuperar e/ou manter o volume e a qualidade óssea em regiões que perderam suas conformações anatômicas adequadas (SANTOS, 2002).

Os enxertos ósseos podem ser classificados de acordo com sua origem em autógenos, quando removidos do próprio indivíduo, homólogos, também conhecidos como enxertos halogênicos ou aloenxertos, formados por materiais tratados e processados, de indivíduo da mesma espécie, os heterólogos, chamados de enxertos xenógenos ou xenoenxertos, são obtidos de indivíduos de diferentes espécies, e os aloplásticos, também conhecidos como enxertos sintéticos, divididos na classe dos polímeros e das biocerâmicas (NASR et al., 1999).

Muitos autores recomendam a utilização dos auto-enxertos devido à resposta imunológica favorável, não possuir potencial de transmissão de doenças e, acima de tudo, possuir propriedades osteogênicas (ALDERMAN, 1969; PETERSON et al., 2000; PRADO; SALIM, 2004), porém muitas são as desvantagens, como: necessidade de cirurgia adicional em área doadora, aumento da morbidade, complicações pós-operatórias, aumento do tempo cirúrgico, dificuldade de uma conformação exata ao defeito ósseo e, em alguns casos, a indisponibilidade da quantidade óssea necessária (CONSTANTINO et al., 1991; MUTING et al., 1993).

O material de enxerto ideal teria as qualidades descritas do osso autógeno sem as desvantagens relacionadas com o sítio doador (BECKER et al., 1995). Até o presente momento não existe tal material. Entretanto, diversos materiais e técnicas têm sido propostos.

Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são tolerados de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo (MIRCH et al., 1989).

Muitos são os biomateriais disponíveis para utilização como implantes ósseos, tais como: os cimentos ósseos baseados no polimetilmetacrilato (PMMA), o cimento de fosfato de cálcio, cimento de fosfato de zinco, as biocerâmicas, hidroxiapatita, alumina, zircônia, vidros bioativos, vitrocerâmicas, entre outros; porém todos apresentando vantagens e desvantagens, as quais devem ser consideradas conforme os objetivos de seu uso.

Dentre as vantagens encontradas nos implantes aloplásticos, podem-se destacar a disponibilidade comercial em grande quantidade, a ausência de necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para remoção de material da área doadora, fácil manipulação, redução do tempo operatório, possibilidade de confecção de uma peça individual sob medida, além de boas chances de favorecer uma união física e química com o meio inserido (OUSTERHOUT; STELNICKI, 1996).

As cirurgias de remodelação e reconstrução ósseas usam materiais como a cerâmica à base de fosfato de cálcio e o cimento de fosfato de cálcio. Essa cerâmica, conhecida como “osso sintético”, tem como principal característica a biocompatibilidade, o que favorece o crescimento ósseo para o local onde ele se encontra. Por ser encontrada na forma de blocos e grânulos, não permite modelações, dificultando assim a sua adequação ao local do implante. O cimento de fosfato de cálcio convencional não impõe essa limitação, pois se trata de uma pasta passível de modelagem, obtida a partir da mistura de um pó de fosfato de cálcio com uma solução aquosa. Apesar de apresentar essa vantagem sobre a cerâmica de fosfato de cálcio e de ser absorvível, dando lugar a um novo tecido ósseo, o cimento

de fosfato de cálcio convencional tem uma baixa resistência mecânica, que é de cerca de um quinto do osso cortical (osso denso) humano (SANTOS, 2002).

Com o objetivo de aumentar a resistência mecânica e tenacidade desse material, fazendo com que ele mantenha suas propriedades positivas Santos, em 2002, criou um cimento de fosfato de cálcio de dupla-pega, resultado da adição de sistema de polimerização *in situ* ao cimento tradicional, permitindo um aumento de 150% na resistência mecânica que, ainda, com a adição de fibras obteve um aumento da tenacidade à fratura para valores similares aos do osso cortical humano.

A incorporação de fibras ao cimento de fosfato de cálcio contribui para aumentar a capacidade de suportar esforços. A carga é transferida através da matriz para a fibra, ampliando a resistência a impactos. Estas fibras utilizadas para o reforço do cimento de fosfato de cálcio são materiais comerciais e de uso cotidiano, como microfibras de náilon e polipropileno, utilizadas na confecção de roupas, e fibras de carbono, empregadas na indústria aeronáutica (SANTOS, 2002).

Composições mais resistentes de CFC estenderiam consideravelmente o campo de aplicações potenciais, onde além da aplicação em cirurgias odontológicas e craniomaxilofaciais, podem ter grande valia em ortopedia e neurocirurgia, como alternativa para consolidação de fraturas múltiplas de ossos longos, fixação de próteses articulares cimentadas e substituição de discos intervertebrais e corpos vertebrais.

Em vista disso, este trabalho visa avaliar histologicamente os efeitos das placas de cimento de fosfato de cálcio com adição de fibras de náilon, carbono e polipropileno implantadas supracorticalmente em fêmur de ratos, verificando sua biocompatibilidade, capacidade osteocondutora e o grau de reabsorção do material,

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Descrever histologicamente o comportamento do CFC associado com fibras utilizado como implante ósseo supracortical.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Avaliar a biocompatibilidade do CFC com fibras de náilon, carbono e polipropileno, em contato com cortical óssea;
- b) Avaliar o grau de reabsorção do CFC com fibras de náilon, polipropileno e carbono em contato com a cortical óssea;

### 3 REVISTA DA LITERATURA

#### 3.1 MATERIAIS UTILIZADOS COMO SUBSTITUTOS DE TECIDO ÓSSEO

Em 1995, Begley et al. realizaram um estudo comparando as propriedades osteoindutivas de seis diferentes substitutos de transplante ósseo: Pyrost<sup>®</sup>, coral natural, Callopat<sup>®</sup>, Surgibone<sup>®</sup>, Surgibone<sup>®</sup> desmineralizado e osso de rato desmineralizado. Os materiais foram implantados heterotopicamente, na musculatura abdominal de ratos, e os resultados foram avaliados histologicamente em 3 e 6 semanas pós-implante. Os resultados mostraram que ambos, o osso desmineralizado de rato e Surgibone desmineralizado foram menos osteoindutivos do que podia se basear pela literatura. Os enxertos mineralizados não apresentaram sinal de nova formação óssea e demonstraram padrões variáveis de reabsorção. Uma camada do que parecia uma calcificação muito densa foi vista ao redor do implante de coral. As reações inflamatórias mais intensas foram demonstradas com os xenoimplantes Surgibone e Surgibone desmineralizado, indicando reações imunes persistentes. Coral e Pyrost não provocaram qualquer reação inflamatória, e isto foi atribuído às quantidades insignificantes de proteína presente nestes materiais.

No mesmo ano Yamaguchi et al. avaliaram blocos de hidroxiapatita no preenchimento de defeitos ósseos em 7 pacientes, defeitos estes formados por curetagem de tumor ósseo ou remoção de dentes para colocação de implantes. A observação radiográfica foi realizada de 78 à 109 meses. A formação óssea ao redor dos blocos HA atingiu o ponto máximo dentro de 1 ano após o implante, e então desapareceu gradualmente. Porém, formas de blocos HA foram raramente modificadas em todos os casos. Nunca foi observada uma zona clara ao redor dos blocos HA. Os blocos foram biocompatíveis e demonstraram um caráter resistente à degradação.

Krishnan e Johnson (1997) citam diferentes materiais que podem ser utilizados como enxertos na reconstrução de fraturas da parede inferior orbitária, como os aloplásticos, os alogênicos e os autógenos, sendo que, para os autores, os últimos são mais bem tolerados pelos tecidos ao redor da região receptora.

Snyders Jr. et al., (1993) relataram que o sulfato de cálcio possui a habilidade de se moldar ao formato do defeito ósseo, adquirindo, com firmeza, a forma do osso, além de ser resistente ao deslocamento e possuir a habilidade de aumentar a cicatrização óssea, através da atração dos íons de cálcio. Os autores realizaram um estudo com a utilização do sulfato de cálcio hemiidratado granular de grau médio (SCG) isolado, dextran (polissacarídeo de alto peso molecular) isolado, SCG + dextran e coágulo sangüíneo (controle), para preenchimento de cavidades confeccionadas em calota craniana de ratos. Na análise microscópica pôde-se observar uma maior formação de tecido fibroso em relação ao tecido ósseo em todos os grupos e, nenhum defeito apresentou completo reparo ósseo após os 135 dias. Os melhores resultados da restauração da espessura do osso craniano original, por tecido de reparo fibro-ósseo, foram encontrados nas cavidades preenchidas somente com SCG, pelo dextran isolado e por último, o controle (coágulo sangüíneo). Para os autores os materiais de preenchimento utilizados não somente preveniram o colapso do defeito durante a fase de cicatrização, mas também, agiram como um suporte e uma fonte de veículo para o crescimento teciduo

Em um estudo de casos realizado por Baptista et al., 1997 no período compreendido entre março e julho de 1995, oito pacientes foram submetidos à cirurgia com a utilização de enxerto ósseo liofilizado para tratamento de diferentes lesões ósseas, Na avaliação dos resultados os autores consideraram parâmetros clínicos (dor, deformidade, fistulização) e radiográficos (integração ou não do enxerto). Consideraram como bom resultado os pacientes que não apresentavam dor ou deformidade, além de integração total do enxerto; regular aqueles com ou sem dor, mas com integração parcial do enxerto; mau, os pacientes com dor e sem sinais de integração, ou com complicações do procedimento, como a fistulização. No entanto, os resultados não foram animadores, sendo que, dos oito pacientes avaliados, quatro (50%) evoluíram com fistulização, um (12,5%) com reabsorção do enxerto, um (12,5%) sem integração e dois (25%), com integração e sem complicações. Baseados nisso, os autores afirmam que, a melhor alternativa é o enxerto ósseo autólogo e quando não existe a disponibilidade deste, os melhores resultados são obtidos com o enxerto homólogo e até mesmo heterólogo.

Bakr et al. (2000), pesquisaram a osteogenicidade da matriz óssea desmineralizada (DBM) preparada á partir do osso intramembranoso (IM) e,

avaliaram quantitativamente o novo osso formado pelos enxertos ósseos autógenos IM com ou sem DBM. Foram criados quarenta e dois defeitos em 42 coelhos brancos da Nova Zelândia. Vinte e um defeitos foram enxertados com osso IM sozinho, e os outros 21 defeitos foram enxertados com IM-DBM<sub>im</sub> composto. Em onze coelhos, 22 defeitos foram utilizados como controles, onde 11 defeitos foram deixados vazios (controle passivo) e os outros 11 defeitos foram preenchidos com colágeno de pele de coelho (controle ativo). Os tecidos foram removidos nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 14 para análise qualitativa e quantitativa. Foram identificadas as células envolvidas na cicatrização dos enxertos ósseos compostos IM e IM-DBMIM. A análise quantitativa foi realizada através da análise de imagem sobre 100 seções de tecidos removidos após 14 dias. Aproximadamente mais 204% de osso novo foi formado em defeitos enxertados com IM-DBM<sub>IM</sub> composto do que naqueles enxertados com osso IM sozinho ( $P < .0001$ ). Nenhum osso foi formado ao longo dos defeitos nos controles ativo ou passivo. Os autores concluíram que, DBMIM aumenta significativamente a osteogenicidade dos enxertos ósseos IM.

Para Baptista et al. (2003), os substitutos ósseos como hidroxapatita e sulfato de cálcio, entre outros, encontram-se em fase de experimentação quanto as suas propriedades biomecânicas, de osteointegração e osteoindução, não sendo ainda uma alternativa definitiva. Os autores citam como uma boa opção os enxertos homólogos (aloenxertos), devido ao advento dos bancos de tecidos e da ampliação e melhora das técnicas de preservação.

Kosaka et al. (2004) relatam que enxertos autógenos de costela, crista íliaca e calota craniana são descritos na literatura, contudo complicações como dor no sítio doador, cicatrizes e dores associadas aos movimentos de respiração e caminhadas, tem sido um fator negativo.

Ainda em 2004, Mazzonetto et al. realizaram um estudo para verificar a cicatrização óssea de alvéolos de ratas com osteoporose utilizando o vidro bioativo (PerioGlas<sup>®</sup>). Ratas ovariectomizadas receberam uma baixa dieta de Ca a partir do dia da cirurgia até o dia do sacrifício enquanto animais simuladamente operados foram alimentados com uma comida padrão de laboratório. Duas semanas após a cirurgia, os incisivos superiores foram extraídos e os alvéolos em ambos os grupos foram parcialmente preenchidos com PerioGlas<sup>®</sup>. Os animais foram sacrificados em 1, 2, 3 e 9 semanas após a extração do dente e a fração relativa de volume dos

componentes de cicatrização (osso trabecular, tecido conectivo e vestígios de coágulo) foi estimada em secções histológicas de parafina por um método histométrico diferencial de contagem de ponto. As partículas de PerioGlas<sup>®</sup> persistiram dentro do alvéolo dentário durante todos os períodos experimentais e, como o reparo ósseo prosseguiu, elas foram progressivamente cercadas por osso trabecular recentemente formado, que em alguns casos estabeleceu um contato estreito com suas superfícies. A fração de volume do osso trabecular neoforado, comparada à fração de volume do tecido conectivo e vestígios de coágulo foi maior nos alvéolos de animais ovariectomizados implantados com PerioGlas<sup>®</sup>, do que naqueles dos grupos de ovariectomizados não implantados.

Miranda et al. (2005) realizaram um estudo em coelhos comparando enxerto ósseo autógeno proveniente de crista ilíaca e enxerto ósseo inorgânico Osteosynt, constituído de hidroxapatita sintética e fosfato de cálcio, nos aspectos histológicos e radiográficos. Os autores afirmam que tanto na avaliação radiográfica quanto histológica o grupo de animais que recebeu enxerto ósseo inorgânico (Osteosynt) apresentou processo de reparação mais rápido, afirmando que este pode ser usado como rotina propiciando uma cicatrização óssea precoce.

Ainda em 2005, Silveira observou o reparo ósseo com a utilização de dois biomateriais de forma isolada e associada entre si em cavidades confeccionadas em calota craniana de ratos, num período máximo de 120 dias. Os materiais usados foram o vidro bioativo (PerioGlas<sup>®</sup>) isolado, o sulfato de cálcio (Capset<sup>®</sup>) também isolado, a associação dos dois materiais e um grupo controle onde as cavidades eram apenas preenchidas por coágulo sanguíneo. O autor concluiu que todos os materiais possuem biocompatibilidade, porém o PerioGlas<sup>®</sup> isolado interfere de forma negativa no processo de reparo ósseo enquanto o Capset<sup>®</sup> realiza manutenção do espaço e permite a migração de células osteogênicas, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a associação dos dois materiais, apresentando maior capacidade de osteoindução do que as formas isoladas. No grupo controle onde as cavidades eram apenas preenchidas por coágulo não houve reparo espontâneo das lesões.

Conz et al. (2005) realizaram caracterização de seis hidroxapatitas disponíveis no mercado para utilização na área médico-odontológica como material de enxerto ósseo. A caracterização físico-química foi realizada por meio de

microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho e área superficial específica (BET). Os resultados mostraram que apenas um dos produtos teve a caracterização perfeitamente de acordo com a especificação do fabricante. Os parâmetros de cristalinidade, área superficial e composição podem ser usados para estimar a biodegradabilidade da hidroxiapatita e como critério de controle de qualidade desses materiais.

Xie et al. (2007) pesquisaram a eficácia e segurança de um material derivado dos ossos humanos no reparo de defeitos segmentais críticos do osso em um modelo do macaco rhesus. Ossos humanos congelados foram processados químicamente e fisicamente em um material parcialmente desmineralizado e desproteínizado. O material foi pré-semeado com células tronco da medula óssea (alôgenicas). O material sozinho e o osso com células tronco foram respectivamente implantados para recobrir os defeitos críticos de 2.5 cm de comprimento em rádio direitos e esquerdos de 15 macacos. Nas semanas 1, 2, 3, 6 e 12 pós-implante, os enxertos foram coletados de três animais e avaliados para a expressão local de marcadores osteogênicos, características histológicas e roentgenográficas, e reações imunes. Mostrou-se que os defeitos foram bem reparados com ambos os tratamentos visto que os defeitos ósseos em 2 animais adicionais não tratados permaneceram no mesmo tamanho após 12 semanas. Nos raios implantados com os ossos tratados com células tronco, os processos de reparo foram aproximadamente 3 semanas mais rápidos e novos ossos foram formados em múltiplos pontos. Não houve efeito tóxico observável nem uma rejeição imune declarada nos animais. Estas observações reunidas sugerem que os blocos de osso alôgenico ou xenogênico e com células tronco da medula óssea (alôgenicas) podem fornecer um método ideal para reparar grandes defeitos segmentais do osso.

### **3.2 CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO**

Brown e Chow (1985) desenvolveram o primeiro cimento de fosfato de cálcio, quando misturaram pós de fosfato tetracálcico (TTCP) e fosfato dicálcico (DCPD) e observaram que davam pega quando adicionavam água, devido a

dissolução dos fosfatos de cálcio constituintes e à precipitação de finos cristais de hidroxiapatita, cujo entrelaçado proporciona a resistência mecânica do material resultante.

Segundo Lemaitre et al. (1987), os cimentos de fosfato de cálcio devem possuir os requisitos necessários aos cimentos biomédicos para a aplicação clínica, tais como: ausência de toxicidade, perfeita adesão ao tecido duro, ausência de propriedades alergênicas ou carcinogênicas, fácil manipulação, dar pega e endurecer *“in vivo”* dentro de um tempo razoável, resistência mecânica apropriada e permanente, reabsorbilidade, condutor e estimulador da formação de novo tecido ósseo e tempos de pega e endurecimento controláveis.

Segundo Mirtchi et al. (1990), o termo “cimento de fosfato de cálcio” foi introduzido por Gruninger e colaboradores no final da década de 80, onde os quais preconizavam a formulação desse cimento misturando-se um sal de fosfato de cálcio com água ou com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir em temperatura ambiente ou corporal dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio e ocorrendo a pega pelo intercruzamento dos cristais deste precipitado.

De acordo com Driessens et al. (1997), os requisitos ideais de um cimento de fosfato de cálcio para preparações ósseas são: tempo requerido para a mistura deve ser curto (1 minuto ou menos); tempo de pega deve ser tal que permita a manipulação apropriada do material sem ser demasiadamente longo (a pega deve iniciar-se por volta de 5 min e finalizar-se entre 15 e 20 min); o tempo de preparo da massa (tempo durante o qual se pode moldar o material sem afetar sua resistência final) deve ser próximo ao tempo de pega inicial, por volta de 5 min; o tempo de coesão (momento a partir do qual o cimento não se incha nem se desintegra em contato com os fluidos corporais) deve ser mais curto que o tempo de preparo e de pega inicial; a resistência a compressão final deve ser pelo menos similar a do tecido reparado; não deve ser produzido calor durante a pega; e por fim o pH deve ser neutro (6,5- 8,5) durante e depois da pega, para evitar efeitos citotóxicos.

A substituição de silício (Si) nas estruturas de cristal da cerâmica de fosfato de cálcio (CaP) tal como hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcio (TCP) geram materiais com superior desempenho biológico. Silício, um elemento essencial, necessário para o osso saudável e para tecidos conectivos, influencia a atividade biológica de

materiais à base de fosfato de cálcio, através da modificação das propriedades do material e por efeitos diretos sobre os processos fisiológicos no tecido esquelético (PIETAK et al., 1997).

Santos (2002) afirma o cimento de fosfato de cálcio com fibras de náilon, polipropileno e carbono, por ele desenvolvido obteve a conjugação de três características distintas: a bioatividade da cerâmica, a maleabilidade do cimento e a elevada propriedade mecânica, o que possibilitou o desenvolvimento de tecnologia para obtenção de formulações de cimento de fosfato de cálcio, técnica dominada por poucos países, a partir de matérias-primas nacionais, permitindo futuramente, uma redução de preços ao consumidor. Além disso o CFC utilizado caracteriza-se por ser uma modificação do  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) em sua composição através da adição de um sistema de polimerização *in situ* baseado na acrílamida e de redutor de líquido, poliacrilato de amônia, resultando em um novo tipo de cimento de fosfato de cálcio, o cimento de fosfato de cálcio de dupla-pegada.

O efeito do fosfato de cálcio bifásico (HA) e do vidro bioativo (60S) foi avaliado por Valério et al., (2004), através da viabilidade celular, nos osteoblastos que produzem matriz óssea extracelular, secreção de colágeno e atividade da fosfatase alcalina. Para isto foram utilizados osteoblastos isolados de calvária de ratos neonatais, possuindo de 1 a 5 dias de vida. Foi observada uma maior produção de colágeno (cerca de 25%) no grupo do vidro bioativo, uma igual produção de fosfatase alcalina e uma proliferação de 35% a mais de osteoblastos na presença dos produtos iônicos da dissolução do vidro bioativo, quando comparado aos produtos de dissolução da HA e de um controle. Houve também a presença de vacúolos nas células cultivadas no vidro bioativo. Além da presença de cálcio nas células desse grupo, foi observado uma concentração oito vezes maior de íons de Si, havendo uma relação entre o conteúdo do óxido de silício e os vacúolos formados. Concluíram que osteoblastos, na presença dos produtos iônicos do VB, apresentam alta proliferação e secreção de colágeno quando comparado ao controle e à HA, e o aumento de atividade parece estar relacionado ao Si contido na dissolução, sendo que as células observadas com vacuolização não têm relação com morte celular.

No mesmo ano, Stanton et al. reportaram um caso clínico de utilização de Cimento ósseo de fosfato de cálcio injetável (Norian)<sup>®</sup> utilizado na reconstrução de

um grande defeito ósseo em mandíbula resultante da enucleação de um ceratocisto odontogênico. Após três anos de acompanhamento os autores afirmam que havia indícios radiográficos de integração e bons resultados clínicos, demonstrando que este cimento pode ser uma boa alternativa na reconstrução de defeitos ósseos.

Uma avaliação *in vivo* do cimento de fosfato de cálcio de dupla pega com e sem fibras, foi realizada por Santos et al. (2005), através do implante destes materiais em raios de coelhos, observando-se ao final de 12 semanas que o cimento de fosfato de cálcio de dupla pega é biocompatível, apresentando absorção parcial do material, tanto do CFC com e sem fibras, com formação de tecido conjuntivo de espessura reduzida junto a todos os implantes. Os autores observaram ainda que parte das fibras liberadas pela absorção do cimento foram envoltas por tecido fibrosos, exceto as fibras de carbono; entretanto, nenhum processo inflamatório foi observado.

Para Alves et al. (2005) o desafio atual é colocar o cimento ósseo de fosfato de cálcio no local de enxerto pelo método menos invasivo possível. Os autores testaram formulações de cimento ósseo injetável pela incorporação de aditivos, buscando, no entanto preservar propriedades como reduzido tempo de cura, limitada dissolução em meio líquido e resistência mecânica. Os aditivos avaliados em conjunto com o fosfato tricálcico foram: CMC (carboximetilcelulose), polímero de agar (polissacarídeo de algas marinhas) e glicerina ( $C_3H_8O_3$ ) em concentrações de 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6 e 10% em peso. Os resultados demonstraram que todas as formulações estudadas apresentaram redução da resistência mecânica a compressão e aumento da porosidade com o aumento da quantidade de aditivos. Os resultados apontam que as formulações com 1% de CMC e 1% de agar são promissoras para a composição de cimento injetável.

Em 2005, Xu e Simon realizaram um estudo sobre o Cimento de fosfato de Cálcio (CPC), levando em consideração a baixa resistência que limita sua utilização para aplicações apenas de não-esforço, e sua falta de macroporosidade que dificulta a infiltração celular, o desenvolvimento ósseo e a fixação do implante. O objetivo deste estudo foi desenvolver fortes e macroporosos suportes de CPC, por meio da incorporação de quitosan e manitol solúvel em água, examinando a biocompatibilidade do novo transplante com uma linha celular de osteoblastos e um teste enzimático. Os autores concluíram que substancial reforço e macroporosidade

foram conferidos à um enxerto de hidroxiapatita moldável, biocompatível, de rápida fixação, e reabsorvível. O material altamente poroso pode facilitar o encravamento ósseo e a fixação do implante in vivo. Além disso, o aumento de duas à três vezes na resistência pode auxiliar a ampliar o uso de CPC para reparos maiores em localizações de comportamento moderado de esforço.

Ainda em 2005, Carey et al. realizaram um estudo a fim de desenvolver um Cimento de Fosfato de Cálcio (CPC) pré-misturado com rápido endurecimento quando imerso em uma solução fisiológica, visando diminuir o tempo de cirurgia e melhorar as propriedades do enxerto. Os CPCs pré-misturados foram formulados utilizando o seguinte método: CPC pré-misturado = CPC pó + líquido não aquoso + agente de gelação + acelerador de endurecimento. Três CPCs pré-misturados foram desenvolvidos: CPC-monohidrato de fosfato de monocálcio (MCPM), CPC-chitosan, e CPC-tartarico. Os autores afirmaram que, as pastas endureceram rapidamente uma vez imersas em solução fisiológica e formaram hidroxiapatita. Os cimentos tiveram forças semelhantes àsquelas do osso poroso e da hidroxiapatita sinterizada porosa e apresentaram não citotoxicidade similar ao CPC convencional não-pré-misturado.

Em 2006, Lerouxel et al. avaliaram a reconstrução de defeitos realizados em tecido ósseo irradiado de ratos, utilizando um fosfato de cálcio injetável (ICPS) e transplante de medula óssea (BM) A irradiação externa foi feita para 12 dos 27 ratos congênitos. Três semanas depois, quatro defeitos ósseos foram criados por animal e foram mantidos vazios ou somente com ICPS, transplante BM sozinho ou com uma mistura de BM e ICPS. Três semanas após o implante, os espécimes de osso foram estudados sob microscopia ótica e por microscopia eletrônica. Defeitos irradiados preenchidos com ICPS sozinho não foram acompanhados pela formação de novo osso. O transplante BM associado com ICPS aumentou significativamente a degradação cerâmica ( $p < 0.01$ ) e o crescimento ósseo ( $p < 0.01$ ) nas áreas irradiadas. Demonstrando que os resultados são evidências para o significado do BM em direcionar o reparo ósseo em animais irradiados.

Wong e Rabie (2006) compararam a quantidade de novo osso produzido por Naringin<sup>®</sup> na matriz de colágeno àquele produzido por enxertos ósseos e matriz de colágeno. Naringin<sup>®</sup> é um flavonóide normalmente disponível em frutas cítricas e é também um inibidor da reductase HMG-CoA. Foram criados 20 defeitos ósseos, de

5 mm x 10mm no osso parietal de 14 coelhos. No grupo experimental, 5 defeitos foram enxertados com solução de Naringin<sup>®</sup> misturada com matriz de colágeno e 5 defeitos foram transplantados com osso endocondral autógeno. Nos grupos de controle, 5 defeitos foram enxertados com matriz de colágeno sozinha (controle ativo) e 5 foram deixados vazios (controle passivo). Os animais foram sacrificados no décimo quarto dia e os defeitos foram dissecados e preparados para a avaliação histológica. Seções em série foram cortadas através de cada defeito. Foi feita a análise quantitativa da nova formação óssea sobre 150 seções (50 seções para cada grupo) utilizando a análise de imagem. Um total de 284% e 490% de mais osso novo estava presente nos defeitos enxertados com Naringin<sup>®</sup> na matriz de colágeno do que naqueles transplantados com osso e colágeno, respectivamente. Nenhum osso foi formado no grupo passivo de controle. Concluíram que, Naringin<sup>®</sup> na matriz de colágeno tem o efeito de aumentar a nova formação de osso localmente, e pode ser utilizado como um material de enxerto ósseo.

Ainda em 2006, OGOSE et al. avaliaram o material fosfato beta-tricálcio disponível comercialmente ( $\beta$ -TCP, Osferion<sup>®</sup>) como enxerto em osso humano, com relação aos aspectos histológicos, por meio da rotineira coloração de eosina e hematoxilina, impregnação de prata, imunohistoquímica e hibridização *in situ*. Os autores verificaram que Osferion<sup>®</sup> proporciona bioreabsorção precoce pelos osteoclastos, invasão vascular de macro-poros e ligação celular osteoblástica sobre a superfície da cerâmica, 14 dias após o transplante. A proeminente formação óssea e a conexão óssea direta entre o osso pré-existente e Osferion<sup>®</sup> foram evidentes 28 dias após o transplante. Quase toda a superfície TCP foi coberta por osso lamelar. Adicionalmente, revestimento ativo osteoblástico e ligação das células gigantes semelhantes à osteoclastos não foram observadas 72 semanas após o enxerto. A impregnação de prata revelou a presença de fibrilas de colágeno dentro de microporos de Osferion<sup>®</sup>.

Zorica et al. (2007) realizaram um trabalho avaliando a capacidade de regeneração óssea do compósito de Fosfato de Cálcio Bifásico/Poly-DL-Lactide-Coglycolide (BCP/PLGA). A pesquisa foi realizada em 30 mulheres em fase de pós-menopausa, com idade de 46 a 62 anos, com diagnóstico de osteoporose e defeitos nos ossos alveolares, causados por extrações dentárias, enucleação de cistos com alterações periapicais ou trauma. O compósito (BCP/PLGA) foi implantado nestes

defeitos, sendo que após 24 semanas houve um aumento significativo da densidade óssea, quando comparada com o grupo controle. Segundo os autores, os resultados indicam um aumento direto da osteoregeneração e da atividade osteoblástica, conferindo ao compósito (BCP/PLGA) a preferência como material para substituição óssea, devido suas características osteocondutivas.

Okuda et al., (2007) analisaram a reação das células ósseas à um fosfato  $\beta$ -tricálcio poroso recentemente desenvolvido e composto de partículas em formato de vareta (RS  $\beta$ -TCP),  $\beta$ -TCP composto de partículas convencionais sem formato de vareta (C $\beta$ -TCP), e hidroxiapatita (HA). Os autores utilizaram implantação *in vivo* e sistemas *in vitro* de osteoclastogênese. O implante dos materiais dentro do fêmur de coelho mostrou que RS $\beta$ -TCP e C $\beta$ -TCP eram bioreabsorvíveis, mas HA não. Até 12 semanas após o implante, a bioreabsorção de RS $\beta$ -TCP e C $\beta$ -TCP acompanhados pela formação de osso novo ocorreu satisfatoriamente. Nas 24 semanas após o implante, muito do RS $\beta$ -TCP tinha sido absorvido, e a osteogênese ativa foi preservada na região. Porém, nos espécimes implantados com C $\beta$ -TCP, a quantidade de tecido ósseo recentemente formado foi diminuído, e um tecido medular dominou a região. A HA implantada não foi bioreabsorvível durante o período experimental. Quando os osteoclastos foram gerados sobre discos RS $\beta$ -TCP, C $\beta$ -TCP, ou HA, foi formada uma aparente lacuna de reabsorção sobre RS $\beta$ -TCP, C $\beta$ -TCP, mas não sobre discos de HA. A quantificação da concentração de cálcio na comunicação da cultura apresentou uma liberação precoce e mais constante de cálcio do RS $\beta$ -TCP do que do C $\beta$ -TCP. Segundo eles, estes resultados demonstraram que a micro-estrutura de  $\beta$ -TCP afeta a atividade de células ósseas e a subsequente reposição óssea.

Yuan et al., (2007) realizaram um estudo para avaliar o reparo de defeitos ósseos com células estromais da medula óssea e fosfato de  $\beta$ -tricálcio poroso. O defeito segmental mandibular de 30 mm de comprimento através de enxerto ósseo composto de células estromais da medula óssea (BMSCs) induzidas osteogenicamente e semeadas sobre fosfato  $\beta$ -tricálcio poroso ( $\beta$ -TCP,  $n=5$ ). O reparo de defeitos foi comparado com aqueles tratados com  $\beta$ -TCP sozinho ( $n = 6$ ) ou com segmento mandibular autólogo ( $n = 4$ ). No grupo de BMSCs/  $\beta$ -TCP, foi observada uma nova formação óssea de 4 semanas pós-operação, e foi obtida a união óssea após 32 semanas, o que foi detectado por exame radiográfico e

histológico. Ao contrário, a mínima formação óssea com conexão quase fibrosa foi observada no grupo tratado com  $\beta$ -TCP sozinho. O mais importante é que o osso construído com BMSCs/  $\beta$ -TCP obteve uma propriedade biomecânica satisfatória em termos de resistência à carga de flexão, deslocamento da curvatura, esforço de flexão, em 32 semanas pós-operação, resultado muito próximo àqueles de mandíbula contralateral desdentada e osso de autoenxerto ( $p > 0.05$ ). Baseado nestes resultados, os autores concluíram que o osso construído de BMSCs induzidas osteogenicamente e de  $\beta$ -TCP biodegradável podem reparar bem os defeitos mandibulares segmentais de tamanho crítico.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este trabalho foi realizado após aprovação pelo CEEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal) da Universidade Federal de Pelotas, Protocolo 027/2006 (Anexo 4) em observância da lei 6638, de 08 de maio de 1979 (Anexo 1) bem como dos princípios éticos na experimentação animal, COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Anexo 2). Foi também aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS, protocolado sob o número 0009/09 (Anexo 6).

### **4.2 PROBLEMA**

- O CFC com fibras de náilon, carbono e polipropileno, no formato de placas pré-fabricadas é adequado para a utilização como implante para aumento de volume ósseo?
- Qual o comportamento histológico desse material em contato com o tecido ósseo cortical?

### **4.3 HIPÓTESES**

- O CFC é uma alternativa viável como implante para aumento de volume ósseo, conferindo volume e compatibilidade celular.
- O CFC apresenta biocompatibilidade e propriedades osteocondutivas.

### **4.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA**

Foram utilizados 20 ratos, machos, da espécie *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, com aproximadamente três meses de vida e 300g de peso corporal médio,

procedentes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas, onde também foram realizados os experimentos.

Os modelos biológicos foram distribuídos em quatro grupos, (para avaliação em 30, 60, 90 e 120 dias), contendo cinco animais cada (n=5 por grupo). Todos foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, onde placas de Cimento de Fosfato de Cálcio com incorporação de fibras de náilon, carbono e polipropileno de 2mm de espessura por 6mm de diâmetro, confeccionadas pela Promm, foram implantadas no fêmur dos ratos visando a posterior avaliação histológica do implante.

#### 4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após anestesia geral realizada com Cloridrato tiletamina associado ao cloridrato de zolazepam (Zoletil 50<sup>®</sup>) 20mg/Kg, injetados intraperitonealmente utilizando seringa e agulha descartáveis para aplicação de insulina (Injex<sup>®</sup>). Os animais foram submetidos à tricotomia da região coxofemural direita por arrancamento dos pêlos. A anti-sepsia da região foi realizada com PVPI.

Com um cabo de bisturi n<sup>o</sup> 3 (Duflex<sup>®</sup>) montado com lâmina de aço inox n<sup>o</sup> 15 (BD<sup>®</sup>), uma incisão contínua (longitudinal, de aproximadamente 2 cm de extensão) foi realizada na pele da região lateral do fêmur direito. Os tecidos subcutâneo e muscular foram divulsionados com o auxílio de uma tesoura romba (Quinelato<sup>®</sup>), permitindo, assim, acesso ao periósteo, o qual foi incisado e descolado com um descolador tipo *Molt* ( Quinelato<sup>®</sup>) permitindo acesso direto à face exposta da diáfise do fêmur (Fig.1).

A placa de CFC com fibras, previamente confeccionada, foi instalada sobre o osso cortical, com broca acoplada (Promm, sistema 1.5) a um micromotor (Driller<sup>®</sup>) baixa rotação, sob refrigeração constante com solução fisiológica estéril de Cloreto de Sódio a 0,9%, fixada com o auxílio de um microparafuso de titânio sistema 1.5 da Promm<sup>®</sup> <sup>1</sup> com 5 mm de comprimento. (Fig.2 e 3) Em seguida, os tecidos incisados e divulsionados foram reaproximados e suturados com fio de nylon 4-0 Ethicon<sup>®</sup> (Fig. 4).

---

<sup>1</sup> Promm - Indústria e Comércio de Materiais Cirúrgico LTDA.



Figura 1. Divulsão dos tecidos até exposição da diáfise do fêmur.  
Fonte: Programa de Pós graduação em Odontologia-CTBMF-FO/PUCRS, 2009.



Figura 2: Placa de CFC reforçada por fibras aparafusada no fêmur do rato.  
Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia- CTBMF- FO/PUCRS, 2009.

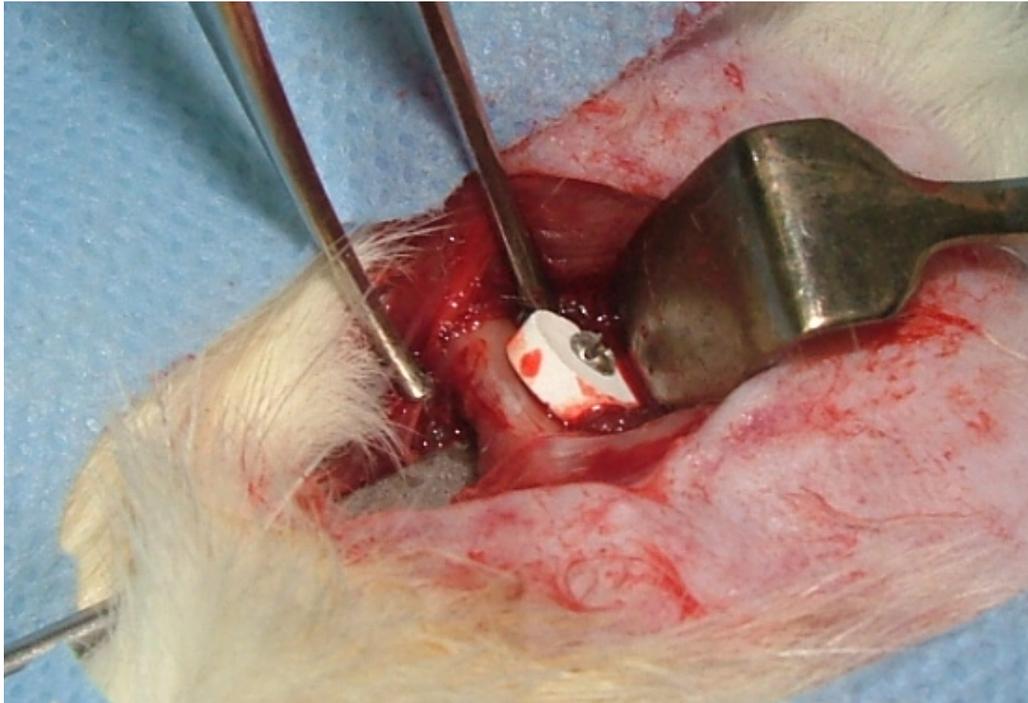


Figura 3: Visão lateral da placa de CFC reforçada por fibras aparafusada no fêmur do rato.  
Fonte: Pós Graduação em Odontologia –CTBMF- FO/PUCRS, 2009.



Figura 4: Sutura em pontos isolados.  
Fonte: Pós Graduação em Odontologia- CTBMF- FO/PUCRS, 2009

#### 4.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS

Os animais foram eutanasiados aos 30, 60, 90 e 120 dias após a cirurgia, pela injeção intraperitoneal de Cloridrato tiletamina associado ao Cloridrato de zolazepam (Zoletil 50<sup>®</sup>) 50mg/kg (que se constitui em dose letal), de acordo com a Resolução do CRMV n° 714 de 20 de 06 de 2002.

A remoção das peças foi realizada após dissecação e localização da região, segmentando a área de interesse com tesoura de tecido, e com disco flexível diamantado de dupla face, com margem de segurança de 5 mm, acoplado em micromotor, utilizando-se refrigeração constante (solução fisiológica de Cloreto de Sódio 0,9%).

As peças foram acondicionadas em vidros previamente preparados e etiquetados, contendo solução de formalina tamponada a 10%. As amostras, foram encaminhadas ao Laboratório do Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca (CDDDB), da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), para processo de rotina na preparação de lâminas.

#### 4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras foram processadas no Laboratório do Centro de Diagnóstico de Doenças da boca, CDDDB (Anexo 3), onde foram analisadas histologicamente.

Após a fixação em formalina tamponada 10% (pH 7.0) por 24 horas, os espécimes, compostos de tecido ósseo e tecido mole, foram descalcificados em solução de ácido nítrico a 5% sob agitação e temperatura ambiente. Posteriormente, iniciou-se o processamento de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os espécimes foram processados submetidos à microtomia<sup>2</sup>, com cortes no sentido longitudinal. Foi selecionado somente o primeiro corte em que apareceu o tecido ósseo, a placa e o tecido mole, para cada peça.

A seguir, todas as lâminas obtidas foram submetidas à técnica de coloração histoquímica de hematoxilina-eosina (HE), para tal, foram submetidos a dois banhos de xilol, de 5 minutos cada. Após, sofreram desidratação em dois banhos de álcoois,

---

<sup>2</sup> Micrótomo Leica RM 2165.

absoluto e a 96º, de cinco minutos cada e lavagem em água corrente, por 10 minutos. Coloração com a hematoxilina por incubação de oito minutos e a lavagem em água corrente, por 10 minutos. A coloração com eosina é feita pela a incubação por 2 minutos, seguida de lavagem das lâminas em água corrente, por 5 minutos. O processo de desidratação das amostras é iniciado com imersão destas por 1 minuto em álcool 96º, 2 minutos em álcool absoluto e 3 banhos em xilol, sendo de 5 minutos cada. A partir deste momento, as lâminas foram montadas com Entellan<sup>®3</sup>.

A análise microscópica e a descrição histológica das secções dos fêmures e tecidos moles adjacentes dos ratos foram feitas utilizando-se um microscópio óptico<sup>4</sup>, em aumentos de 40X, 100X e 400X, no Laboratório de Histopatologia do CDDB – FO/UFPel.

Para avaliação dos resultados, procedeu-se uma análise descritiva. Houve calibração da pesquisadora pela patologista responsável, as quais obedeceram aos critérios de identificação das características envolvidas no processo de reparo, tais como: densidade, vascularização e celularidade do tecido conjuntivo, tipo e densidade do infiltrado inflamatório, reabsorção do implante e possibilidade de osteocondução.

---

<sup>3</sup> Entellan, Merk KGaA, Darmstadt, Germany.

<sup>4</sup> Microscópio óptico Olympus BX® 50 F3.

## 5 RESULTADOS

Todos os tempos mostraram semelhança entre os aspectos observados, assim como: densidade, vascularização e celularidade do tecido conjuntivo, tipo e densidade do infiltrado inflamatório, reabsorção do implante e possibilidade de osteocondução.

- **Figura 5A. 30 dias:** Os cortes histológicos revelam formação de tecido conjuntivo denso, pouco celularizado, apresentando discretamente vascularizado e discreto infiltrado inflamatório mononuclear. No entorno do implante, observam-se discretas áreas de reabsorção, além de indução de hialinização das fibras colágenas periféricas. O tecido apresenta inclusão do material do implante.
- **Figura 5B. 60 dias:** Os cortes histológicos revelam formação de tecido conjuntivo denso, discretamente vascularizado contornando o material do implante. Hialinização das fibras colágenas da periferia é observada.
- **Figura 5C. 90 dias:** Os cortes histológicos revelam formação de tecido conjuntivo denso, apresentando vascularização e celularidade discreta. Indução de hialinização das fibras colágenas periféricas é observada, além de lacunas de reabsorção do implante.
- **Figura 5D. 120 dias:** Os cortes histológicos revelam formação de tecido conjuntivo denso apresentando intensa colagenização periférica, além da presença de lacunas de reabsorção do material do implante.
- **Figura 5E. 120 dias:** Sugere formação de material osteóide e inclusão do material exógeno (implante) no tecido em reparo em íntimo contato com o implante e tecido ósseo adjacente.
- **Figura 5F. 120 dias:** Intensa hialinização das fibras colágenas na proximidade do implante e inclusão do material exógeno, são observadas, bem como, formação de material osteóide.

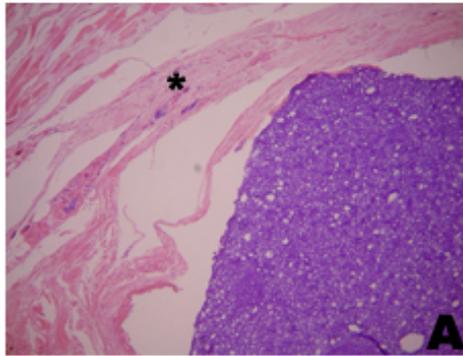


Figura 5A. Observa-se presença de tecido conjuntivo denso pouco vascularizado e celularizado apresentando inclusão de material do implante (\*).

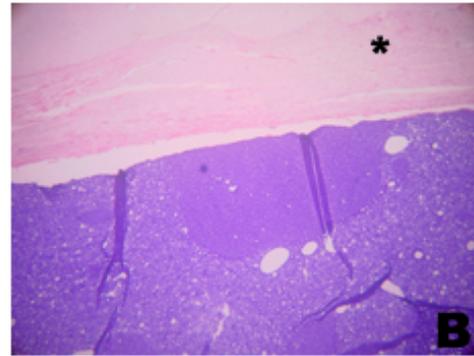
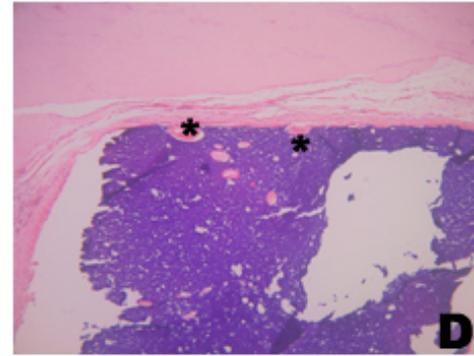
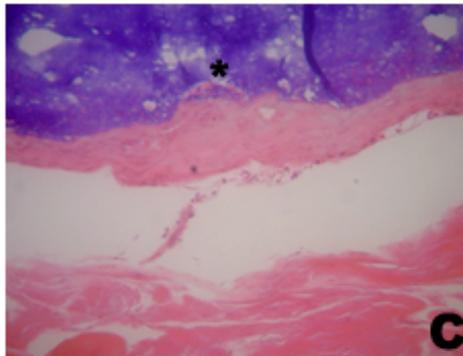
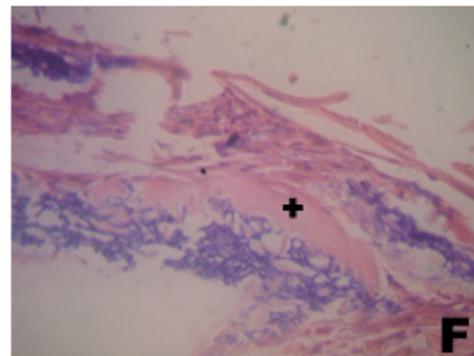
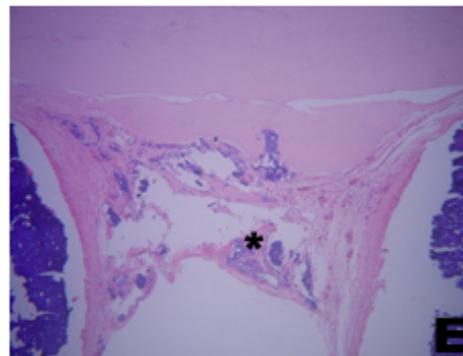


Figura 5B. Observa-se presença de hialinização intensa das fibras colágenas na periferia do implante (\*).



Figuras 5C e 5D. Formação de lacunas de reabsorção do material do implante (\*).



Figuras 5E e 5F. Observa-se nítida inclusão do material do implante junto ao tecido conjuntivo denso (\*), além de sugerir formação de material osteoide (+).

Figura 5: Cortes histológicos  
**A e B:** Magnificação de 200X;  
**C e F:** Magnificação de 400X;  
**D e E:** Magnificação de 100X

## 6 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, o cimento de fosfato de cálcio com fibras mostra-se bioacompátível, como afirma Santos (2002). Ser bioacompátível significa que o material e seus possíveis produtos de degradação são tolerados pelos tecidos envoltórios e não causam prejuízo ao organismo a curto e longo prazo (PETERSON, 2000).

Sabe-se que, paralelamente à bioacompátibilidade, é importante que o implante permita o desempenho imediato e com êxito da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Esta característica está embutida no conceito de biofuncionalidade (RAVAGLIOLI, 1992). Nesse conceito estão incorporados, também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante agressivo - mesmo aos materiais considerados extremamente inertes quimicamente, levando à redução da eficiência do implante.

Quanto à permanência ou reabsorção do material nos períodos de 30 a 120 dias, observou-se em todos os grupos estudados, ausência de células gigantes atuando na superfície, o que justifica o baixo índice de degradação do material utilizado, o que é expresso por pequenas áreas de reabsorção nas bordas do implante, porém de forma praticamente insignificante, não havendo diminuição do volume da placa enxertada.

A osteocondução, representada pela neoformação óssea contornando o implante aos 120 dias é sugerida no presente estudo pela presença de material semelhante à osteóide, principalmente em áreas de proximidade com o tecido ósseo preexistente. Lemaitre et al. (1987) relataram que os cimentos de fosfato de cálcio devem possuir os requisitos necessários aos cimentos biomédicos para a aplicação clínica, tais como: ausência de toxicidade, perfeita adesão ao tecido duro, ausência de propriedades ou alergênicas ou carcinogênicas, fácil manipulação, e endurecer *in vivo* dentro de um tempo razoável, ter resistência mecânica apropriada e permanente, reabsoribilidade, ser condutor e estimulador da formação de novo tecido ósseo e apresentar tempos de pega e endurecimento controláveis.

Em 2005, Xu e Simon em seu estudo sobre o Cimento de fosfato de Cálcio, já levaram em consideração a baixa resistência que limita sua utilização para

aplicações apenas de não-esforço, e sua falta de macroporosidade que dificulta a infiltração celular, o desenvolvimento ósseo e a fixação do implante. Características que diferem das encontradas neste trabalho, com exceção da resistência a qual não foi alvo do presente estudo. No entanto, Santos (2002) afirma que a incorporação de fibras ao cimento de fosfato de cálcio contribui para aumentar a capacidade de suportar esforços. A carga é transferida através da matriz para a fibra, ampliando a resistência a impactos. Estas fibras utilizadas para o reforço do cimento de fosfato de cálcio são materiais comerciais e de uso cotidiano, como microfibras de náilon e polipropileno, utilizadas na confecção de roupas, e fibras de carbono, empregadas na indústria aeronáutica.

Grandes avanços no campo dos biomateriais têm ocorrido e, em função do aumento da população e da expectativa de vida, além do aumento dos acidentes e, por consequência dos traumatismos decorrentes, estes materiais têm sido cada vez mais pesquisados como substitutos de perdas teciduais.

Os cimentos de fosfato de cálcio estão sendo objeto de intenso estudo nos últimos anos, devido à sua potencial utilidade em aplicações biomédicas (CHOW, 1991, DRIESSENS et al., 1997)

Cabe ressaltar que um material biocompatível e resistente como o Fosfato de Cálcio, pode ser considerado de grande valia, já que uma opção ainda bastante utilizada são os auto-enxertos, devido à resposta imunológica. Porém estes apresentam limitações, como estado do paciente, localização e tamanho do defeito ósseo, além claro, das desvantagens de uma segunda intervenção cirúrgica para remoção do enxerto, complicações pós operatórias, aumento do tempo cirúrgico, conformação exata ao defeito e, em alguns casos a indisponibilidade da quantidade de osso necessária (CONSTANTINO et al., 1991; MUTING et al., 1993).

Segundo Santos (2002) os cimentos de fosfato de cálcio reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituto de partes danificadas do osso, dentre as quais estão: não é necessário dar forma ao preenchimento; mínima cavidade do preenchimento; preparação realizada durante o ato cirúrgico; ótimo contato entre osso e implante; biocompatibilidade e bioatividade.

O autor se refere ao cimento de fosfato de cálcio na forma pura e pastosa, e ainda resalta que a principal desvantagem desses cimentos é a baixa resistência mecânica, que no melhor dos casos consegue igualar-se à do osso trabecular, ou a

um quinto do osso cortical. Esse fato foi corrigido com a adição de fibras de náilon, polipropileno e carbono (mesma composição do material utilizado no presente estudo), aumentando a resistência à compressão em até 149%.

Neste trabalho foram observadas características favoráveis do cimento de fosfato de cálcio, como um ótimo contato entre o osso e o implante, a baixa degradação do material nos tempos estudados, biocompatibilidade e bioatividade, demonstradas pelos resultados, principalmente pela discreta de resposta inflamatória mononuclear inicial, ausência de infiltrado aos 120 dias e pela sugestão de formação de material osteóide.

É importante ressaltar que material bioativo é aquele em que ocorrem ligações de natureza química entre o material e tecido ósseo (osteointegração). Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio (SANTOS, 2002).

Assim há uma crescente necessidade na realização de trabalhos experimentais utilizando o cimento de fosfato de cálcio com fibras, verificando todas suas vantagens em tempos de estudo mais prolongados.

## 7 CONCLUSÕES

- 1) O cimento de fosfato de cálcio com fibras se mostrou biocompatível neste estudo, pelo fato de desde os 30 dias de experimento até aos 120 dias não apresentar diferença significativa quanto ao infiltrado inflamatório presente, o que aponta para a possibilidade de sua utilização *in vivo*;
- 2) Pode-se observar a pouca significância de sua reabsorção ao final de 120 dias, o que indica sua estabilidade no caso de ser utilizado como substituto ósseo;
- 3) A sugestão de formação de matriz osteóide observada contornando o implante e na proximidade com o tecido ósseo preexistente aos 120 dias, mostra seu efeito osteocondutivo;
- 4) Dentro dos parâmetros e limites deste experimento, pode-se afirmar que o cimento de fosfato de cálcio na forma de placas pré-fabricadas é adequado para ser utilizado como implante e substituto ósseo.

## 8 REFERÊNCIAS

BAKR, A.; RABIE, M. and MEI, L. Basic fibroblast growth factor up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor during healing of allogeneic bone graft. **Archives of Oral Biology**, Volume 49, Issue 12, December 2004, Pages 1025-1033.

BAKR, A.; RABIE, M. BDS, Cert Ortho, MS, PhD, Siew Han Chay BDSb and Alice M.K. Wong BDS. Healing of autogenous intramembranous bone in the presence and absence of homologous demineralized intramembranous bone. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**. Volume 117, Issue 3, March 2000, Pages 288-297.

BAPTISTA et al. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. **Acta Ortop. Bras**, v.11, n.4, out/dez, 2003.

BAPTISTA, P.P.R.; POLESELLO, G.; GUIMARÃES, R.P.; FERNANDES, M.L. Emprego do enxerto ósseo liofilizado em lesões ósseas. **Rev. Bras. de Ortopedia**, Nov, 1997.

BECKER, W. et al. A comparison of EPTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factors and insulin-like growth factor- I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 63, n. 11, p. 929-939, Nov. 1992.

BEGLEY, C.T.; DOHERTY, M.J.; R. A. B. MOLLAN and D. J. WILSON. Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. **Biomaterials**, Volume 16, Issue 15, October 1995, Pages 1181-1185.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**, v.31, p. D37-47, 2000.

BROWN, W. E.; CHOW, L.C.U. S. **Patent 4, 518, 430**, 1985. In: SANTOS, L. A. Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para uso na área médico-odontológica. 2002. 274f. (Doutorado em Engenharia Mecânica)-Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, são Paulo.

CAREY, L. E.; XUA, H. H. K.; SIMON, C. G.; TAKAGIA, S. J. and CHOWA, L. C. Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. **Biomaterials**, Volume 26, Issue 24, August 2005, Pages 5002-5014.

CONSTANTINO, P.D.; FRIEDMAN, C.D. Soft Tissue augmentation replacement in the head and neck: general considerations. **Otolaryngol. Clin. North Am**, v.27, n.1, p. 1-12, 1991.

DRIESENS, F.C.M. et al. Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. **Journal of Materials Science: Materials in medicine**, v.5, p.164-170, 1994.

FEINBERG, S.E.; STEINBERG, B.; HELMAN, J.I. healing of traumatic injuries. In: FONSECA, R.J.; WALKER, R.V. Oral and Maxillofacial trauma. V. 1, 2. ed. **Philadelphia: saunders Company**, 1997, p. 13-49.

FURASTÉ, Pedro Augusto. **Normas técnicas para o trabalho científico: elaboração e formatação**. 14. ed. Porto Alegre: s.n., 2006.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em saúde: leis, normas e diretrizes**. 2 ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

HERCULIANI, P. P. et al. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Revista Brasileira de Implantodontia**, Niterói, v. 1, n. 1, p. 7-14, abr./jun.2000.

KOSAKA, M. et al. Orbital wall reconstruction with boné grafts from the outer córtex of the mandible. **J. cranio-maxillo-fac. Surg., Stuttgart**, vol.32, p. 374-380, 2004.

KRISHNAN, V.; JOHNSON, J. V. Orbital floor reconstruction with autogenous mandibular symphyseal bone grafts. **J. oral maxillofac. Surg., Edinburgh**, vol.8, p. 525-529, 2000.

LEMAITRE, J.; MIRTCHI, A.; MORTIER, A. Calcium phosphate cement for medical use: state of the art and perspectives of development. **Sil. Ind. Ceram. Sci. Technol.**, v. 52, p. 141-146, 1987.

LEROUXEL, E.; WEISS, P.; GIUMELLIB, B.; MOREAUD, A.; PILETA, P.; GUICHEUX, J.; CORRE, P.; BOULER, J-M.; DACULSI, G.; AND MALARD, O. **Biomaterials**, Volume 27, Issue 26, September 2006, Pages 4566-4572.

MAZZONETTO, J.; BRENTGANI, T. L. G. and LAMANO-CARVALHO, T. L. **Archives of OralBiology**, Volume 49, Issue 9, September 2004, Pages 755-762.

MERUSSI, J. L. B. ; LAPICHIK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual ara técnicos em bioterismo**. 2 ed. São Paulo: H. A. Rotschild, 1996. p. 15-25.

MIRANDA, E. S. et al. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. **Acta Ortop Brás**, v.13, n. 5, p. 245-248, 2005.

MIRTCH, A.; LEMAITRE, J.; MUTING, E. Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of á-tricalcium phosphate-mono calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v. 10, p.634-638, 1989.

\_\_\_\_\_. Microstructure and strength development in calcium phosphate biocements. **Advanced Materials and Processes**, v.2, p. 797-802, 1990.

MUTING, E.; MIRTCH, A.; LEMAITRE, J. Bone repair of defecs filled with a phosphocalcic hydraulic cement an in vivo study. **Journal of materials science: Materials in medicine**, v.4, p. 337-344, 1993.

NARY FILHO, H.; OKAMOTO, T. Avaliação da biocompatibilidade de implantes de Hapset (hidroxiapatita associada ao sulfato de cálcio) em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. **Journal of Applied Oral Science: Revista FOB, Bauru**, v.1, n. 1/2., p. 55-64, jan/jun. 1996.

NASR, H. F.; AICHELMANN-REIDY, M. E.; YUKNA, R.A. Bone and bone substitutes. *Periodontology* 2000, Copenhagen, v.19, p.74-86, Feb. 1999.

OGOSE, A.; KONDO, N.; UMEZU, H.; HOTTA, T.; KAWASHIMA, H.; TOKUNAGA, K.; ITO, T.; KUDO, N.; HOSHINO, M.; GU, W. and ENDO, N. Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion®) in human bones **Biomaterials**, Volume 27, Issue 8, March 2006, Pages 1542-1549.

OKUDA, T.; IOKUC, K.; YONEZAWAB, I.; MINAGID, H.; KAWACHIC, G.; GONDAA, Y.; MURAYAMAE, H.; SHIBATAA, Y.; MINAMIF, S.; KAMIHIRAG, S.; KUROSAWA H.; AND IKEDAA, T. The effect of the microstructure of  $\beta$ -tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. **Biomaterials**. Volume 28, Issue 16, June 2007, Pages 2612-2621.

OUSTERHOUT, D. K.; STELNICKI, E. J. Plastic surgery's plastics. **Clinics in Plastic Surgery**, [S.l.], v.23, n.1, p.183-190, Jan. 1996.

PETERSON, L.J. et al. Reparação das feridas. In: HUPP, J.R. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.57-67.

PIETAK, A.M.; REIDA, J.W.; STOTTA, M.J.; SAYERA, M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med**, v-8, 1997, pg 201-216.

PRADO, R.; SALIM, M. **Cirurgia Bucomaxilofacial- Diagnóstico e Tratamento**, ed Medsi, Rio de Janeiro, 2004, cap. 19, p. 445-511.

PROLO, D. J.; RODRIGO, J. J. Contemporary bone-graft physiology and surgery. **Clin. Orthop.**, 200: 322, 1985.

RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. Bioceramics materials, properties, applications. **New York: Chapman & Hall**, 1992. In: SANTOS, L. A. Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para uso na área médico-odontológica. 2002. 274f. (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

RESOLUÇÃO do CRMV n° 714 de 20 de 06 de 2002. Disponível em: [www.crmvrj.com.br/new/legislacao/resolucoes.htm](http://www.crmvrj.com.br/new/legislacao/resolucoes.htm).

ROBERTS, W.E.; GARETTO, L. P. Fisiologia e Metabolismo Ósseos. In: misch, CE. **Implantes Dentários Contemporâneos**. Santos, São Paulo, 2<sup>a</sup> ed, 2000, cap. 17, p. 225-237.

SANAN, A.; HAINES S.J. Repairing holes in the head: A history of cranioplasty. **Neurosurgery**, v40, n.3, p. 588-603, 1997.

SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para uso na área médico-odontológica**. 2002. 274f. (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

\_\_\_\_\_. Cimento de fosfato de cálcio de dupla pega: avaliação *in vivo*. **Projeções**, v.23, p.47-53, jan./dez., 2005.

SILVEIRA, R.L. **Análise microscópica do processo de reparo ósseo frente ao vidro bioativo e barreira de sulfato de cálcio em calotas cranianas de ratos**. 2005. 171f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Faculdade de odontologia, PUCRS, Porto Alegre.

SNYDERS JR, R. V. et al. Enhancement of repair in experimental calvarial bone defects using calcium sulfate and dextran beads. **J Oral Maxillofac surg**, Philadelphia, v.51, p. 517-524, 1993.

STANTON, D.C.; CHOU, J.C.; CCARRASCO, L.R. Injectable calcium-phosphate bone cement (Norian) for reconstruction of a large mandibular defect: A case report. **J. Oral Maxillofac Surg.**, v.62, p.235-240, 2004.

TADIC, T.; EPPLE, M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. **Biomaterials**, Volume 25, Issue 6, March 2004, Pages 987-994.

VALERIO, P. et al. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. **Biomaterials**, v.25, n. 15, p. 2941-2948, July 2004.

WONG, R.W.K. AND RABIE, A. B. M. Efeito do enxerto de colágeno de naringin sobre a formação óssea. **Biomaterials** Volume 27, Issue 9, March 2006, Pages 1824-1831.

XIE, H.; YANGA, F.; DENG, L.; LUOA, J.; QINA, T.; LIA, X.; ZHOUA G-Q.; and YANGA, Z. The performance of a bone-derived scaffold material in the repair of critical bone defects in a rhesus monkey model. **Biomaterials** Volume 28, Issue 22, August 2007, Pages 3314-3324.

XU, H.H.K.; SIMON Jr. C.G. **Biomaterials** Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility, Volume 26, Issue 12, April 2005, Pages 1337-1348.

YAMAGUCHI, K.; HIRANO, T.; YOSHIDA G.; and IWASAKI, K. Degradation-resistant character of synthetic hydroxyapatite blocks filled in bone defects **Biomaterials**, Volume 16, Issue 13, September 1995, Pages 983-985.

YUAN, J.; CUIA, L.; ZHANGA, W.J.; LIUA, W.; AND CAO, Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous  $\beta$ -tricalcium phosphate. **Biomaterials**, Volume 28, Issue 6, February 2007, Pages 1005-1013.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

**Lei n.º 6.638 , de 08 de Maio de 1979<sup>5</sup>.**

**Estabelece normas para a prática Didático-Científico da vivissecção de animais e determina outras providências.**

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

**ART. 2º** - 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. 3º** - A vivissecção não será permitida:

1. Sem o emprego de anestesia;
2. Em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competente;
3. Sem a supervisão de técnico especializado;
4. Com animais que não tenham permanecido mais de quinze dias em biotérios legalmente autorizados;
5. Em estabelecimento de ensino de primeiro e segundo grau e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

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

1. Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas.
2. Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiência ou demonstrações somente poderão sair do biotério trinta dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

**ART. 5º** - Os infratores estão sujeitos:

1. Às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto Lei nº 3.688 de 03.10.1941, no caso de ser a primeira infração;

---

<sup>5</sup> Fonte: Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#topo#topo>. Acesso em: 21 março 2006.

2. À interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisa, no caso de reincidência.

**ART. 6º** - O poder Executivo, no prazo de noventa dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

1. O órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstração com animais vivos;
  2. As condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;
- III - Órgão e autoridades competentes para a fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

**ART. 7º** - Esta Lei entrará em vigor na data publicada.

**ART. 8º** - Revogam-se as disposições em contrário.

*Assinado:*

*João Figueiredo, Petrônio Portella, E. Portella e Ernani Guilherme Fernandes da Motta.*

## ANEXO 2

### Princípios éticos na experimentação animal<sup>6</sup>

A evolução contínua das áreas de conhecimento humano, com especial ênfase àquelas de biologia, medicina humana e veterinária, e a obtenção de recursos de origem animal para atender necessidades humanas básicas, como nutrição, trabalho e vestuário, repercutem no desenvolvimento de ações de experimentação animal, razão pela qual se preconizam posturas éticas concernentes aos diferentes momentos de desenvolvimento de estudos com animais de experimentação.

*Postula-se:*

**Artigo I** - É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona.

**Artigo II** - Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvaguardar das manobras experimentais e da dor que possam causar.

**Artigo III** - É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação animal

**Artigo IV** - É relevante considerar a importância dos estudos realizados através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana em animal, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

**Artigo V** - Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

**Artigo VI** - Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos "in vitro", utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

**Artigo VII** - Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros em seres humanos, salvo se demonstrados, cientificamente, resultados contrários.

---

<sup>6</sup> Fonte: Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#topo#topo>. Acesso em: 21 março 2006.

**Artigo VIII** - Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se confirmar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralisantes e não anestésicos.

**Artigo IX** - Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.

**Artigo X** - Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência.

**Artigo XI** - Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

**Artigo XII** - Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

## ANEXO 3

Porto Alegre, 25 de março de 2007.

À Comissão Científica e de Ética  
Faculdade de Odontologia  
PUCRS

Prezados Senhores:

Vimos, por meio desta, informar que a pesquisadora Taiane Coutinho de Oliveira solicitou apoio para a realização da sua pesquisa intitulada: **Avaliação histológica do comportamento do Cimento de Fosfato de Cálcio (CFC) enriquecido por fibras como implante supra-cortical em fêmur de ratos**, que será desenvolvida no Programa de Doutorado da Pós-Graduação de Odontologia da PUCRS, que uma vez aprovado pelo Comitê de Ética de sua instituição, poderá ser desenvolvida nas instalações do laboratório do Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca da UFPel.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. ADRIANA ETGES

## ANEXO 4



### Comissão Científica e de Ética Faculdade de Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 20 de agosto de 2009

#### O Projeto de: Tese

**Protocolado sob nº:** 0009/09  
**Intitulado:** Avaliação histológica do cimento de fosfato de cálcio (CFC) reforçado por fibras como implantes supra-cortical em fêmur de ratos  
**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Cláiton Heitz  
**Pesquisadores Associados:** Taiane Coutinho de Oliveira; Marcos Antonio Torriani; Adriana Etges  
**Nível:** Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 19 de agosto de 2009.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS*

**Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

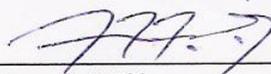
ANEXO 5

Pelotas, 10 de julho de 2009.

À Comissão Científica e de Ética  
Faculdade de Odontologia  
PUCRS

Prezados Senhores:

Vimos, por meio desta, informar que a pesquisadora Taiane Coutinho de Oliveira solicitou apoio para a realização da sua pesquisa intitulada: **Avaliação histológica do comportamento do Cimento de Fosfato de Cálcio (CFC) enriquecido por fibras como implante supra-cortical em fêmur de ratos**, que será desenvolvida no Programa de Doutorado da Pós-Graduação de Odontologia da PUCRS, que uma vez aprovado pelo Comitê de Ética de sua instituição, poderá ser desenvolvida nas instalações do Biotério da UFPel.



---

Prof. Milton Amado

Especialista em Ciência de Animais de Laboratório/USP  
Diretor do Biotério Central/UFPel

## ANEXO 6



De: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pres. da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Ao: Prof. Dr. Marcos Torriani

Senhor Professor:

Vimos, por meio deste, informar-lhe que seu projeto intitulado “**Avaliação histológica e histomorfométrica de um cimento de fosfato de cálcio com fibras em fêmeas de ratos**”, (Protocolo 027/2006) obteve parecer favorável pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPeI, o qual foi homologado em reunião realizada em 12/09/2007 (Ata 027/2007). Em anexo, estamos encaminhando o parecer do consultor. Outrossim, solicitamos que uma cópia do projeto seja encaminhada para o e-mail [ceea@ufpel.edu.br](mailto:ceea@ufpel.edu.br), para que seja armazenado no banco de dados da CEEA. Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente.

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva  
Presidente da CEEA

De: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

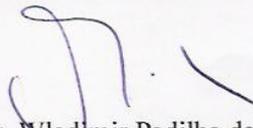
À: Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Prezados senhores:

Após avaliação do projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação histológica e histomorfométrica de um cimento de fosfato de cálcio com fibras em fêmeas de ratos**“, (Protocolo 012/2006), contatou-se que este segue as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, portanto, sou de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução.

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente.



Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva