

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO

GISELA GRANDI

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COMPARATIVA
ENTRE O CIMENTO DE α -TCP E OS GRÂNULOS DE β -TCP/HA
NO REPARO ÓSSEO DE
CALOTAS CRANIANAS DE RATOS**

**Porto Alegre
2007**

GISELA GRANDI

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COMPARATIVA ENTRE
O CIMENTO DE α -TCP E OS GRÂNULOS DE β -TCP/HA NO
REPARO ÓSSEO DE CALOTAS CRANIANAS DE RATOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva

Porto Alegre
2007

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus,
pela orientação,
pela saúde,
pelo perdão.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, **Erasmus Grandi** e **Elizabeth P. Grandi**, grandes incentivadores, que, com seu carinho, amor e dedicação sempre presentes, me deram alegria para eu seguir meu sonho. Agradeço por todos os nossos, ultimamente raros, mas lindos, momentos juntos, que sempre colaboram para meu crescimento, além das orientações e auxílio. Sem a sua ajuda este objetivo não seria alcançado. Amo vocês!

Ao meu irmão, **Eduardo Grandi**, pela companhia, pela amizade e pela compreensão.

À minha avó, **Antônia S. Pompermaier**, pelo amor, pela confiança e pelas constantes orações para que meus ideais possam ser alcançados com a ajuda de Deus.

Ao **Miguel Luciano Silva**, quem teve a idéia desse tema para essa dissertação, pelo exemplo de integridade, como profissional e como pessoa. Uma presença que tem sido importante em minha vida.

Aos meus tios, tias, primos e primas pelo incentivo e vibração com minhas conquistas.

À **Simone Marja Rodrigo**, minha dupla querida, com a qual pude contar sempre que precisei durante o mestrado.

Às amigas **Lisiane Cachapuz**, **Alessandra Barreto**, **Raquel Ourique** e **Sabrina Fernandes**, pela amizade, pela alegria e pelos momentos de descontração.

À amiga e sócia, **Karine Bettiol**, pela esperança, pela confiança e pela amizade tão cara.

À equipe **Remião Treinamento Físico**, pela amizade e por me proporcionar, através da corrida, uma vida mais saudável e muito mais feliz.

À orientadora, Profa. Dra. **Daniela Nascimento Silva**, principalmente pela paciência.

Aos colegas e amigos de mestrado **Angelo L. Freddo, André L. F. Gondim, Carlos Alberto Martins, Daniel Gaziri, Giuliano H. M. Luchi e Gleisse Wantovski**.

À equipe da clínica odontológica Sorrentino Delvaux. **Ana Paula S. Delvaux, Alexandre Delvaux, Kathrein Tapia, Karine Bittiol, Larissa P. Leite, Renata C. Severo, Ingrid Jost, Margareth B. Delvaux, Fabiane Oliveira, Roselândia Souza, Adrieli B. Trisch, Luísa Pires e Sérgio Delvaux**. Pela grande ajuda que recebi no dia-a-dia desses dois anos de mestrado.

AGRADECIMENTOS

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS**, representada pelo Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Joaquim Clotet**, ao qual expresso meu respeito.

À **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, representada pelo seu excelentíssimo Diretor, **Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, por capacitar a realização do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial – CTBMF.

Aos professores de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Mestrado da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Dr. **Cláiton Heitz**, Dr. **Rogério Belle**, Dr. **Gilson Correia Beltrão**, Dra. **Marília Gerhardt de Oliveira**, Dr. **Rogério Miranda Pagnoncelli** e Dra. **Suzana Rizatto**.

Aos professores, **Denise Cantareli Machado**, **Elaine Bauer Veck**, **João Feliz**, **Marta Sisson** e **Betina Steren dos Santos**.

Ao professor, **Nivaldo Almeida Fonseca**, pela colaboração nas consultorias estatísticas.

Aos professores da Disciplina de Patologia Dr. **Manoel Sant'Ana Filho** e Me. **Fábio Luiz Dal Moro Maito** pelas orientações, que já iniciaram desde o tempo da graduação, e que foram fundamentais na leitura das lâminas.

Às professoras Dras. **Maria Martha Campos** e **Fernanda Bueno Morrone**, além de todos os amigos feitos no biotério da Faculdade de Biociências.

À professora Dra. **Nilza Pereira da Costa**, pela dedicação na coordenação da pós-graduação em Odontologia da PUCRS e pela excelência das aulas ministradas.

Aos professores e colegas da **Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre**, em especial ao professor **Dr. João Carlos B. Wagner**, onde fiz minha especialização e

onde vi muitas portas se abrirem para minha carreira profissional.

Aos colegas e funcionários do **Hospital de Pronto Socorro de Canoas**.

Aos funcionários do **Hospital São Lucas da PUCRS**.

Aos funcionários da **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, em especial à funcionária **Vanessa M. S. Stamatto**, pela confecção das lâminas.

Ao **Ministério da Educação**, por meio da **CAPES**.

Ao Prof. Dr. **Luís Alberto dos Santos** e Disciplina de Biomateriais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, pela disponibilização do cimento α -TCP, pelos artigos emprestados e por toda a ajuda prestada.

À **EINCO S.A.** empresa de biomateriais que cedeu a cerâmica β -TCP/HA para a realização dessa pesquisa.

“Deus...

Não permitas que eu seja o carrasco que sangra as ovelhas, nem uma ovelha nas mãos dos algozes.

Ajuda-me a dizer sempre a verdade na presença dos fortes e jamais dizer mentiras para ganhar os aplausos dos fracos.

Meu Deus...

Se me deres a fortuna, não me tires a felicidade; se me deres força, não me tires a sensatez; se me for dado prosperar, não permita que eu perca a modéstia, conservando apenas o orgulho da dignidade.

Ajuda-me a enxergar o outro lado das coisas, para não enxergar a traição dos adversários, nem acusá-los com maior severidade do que a mim mesma.

Não me deixa ser atingida pela ilusão da glória quando bem sucedida, e nem pelo desespero quando sentir insucesso. Lembra-me que a experiência de um fracasso poderá proporcionar um progresso maior.

Ó, Deus...

Faz-me sentir que o perdão é maior índice de força, e que a vingança é prova de fraqueza.

Se me tirares a fortuna, deixa-me a esperança; se me faltar a beleza da saúde, conforta-me com a graça da fé.

Quando me ferir a ingratidão e a incompreensão dos meus semelhantes, cria em minha alma a força da desculpa e do perdão.

E, finalmente, Senhor,

Se eu te esquecer,

Rogo-te mesmo assim, nunca te esqueças de mim.

Amém”.

Autor desconhecido.

RESUMO

Os defeitos ósseos podem decorrer de fatores como patologias, traumas e cirurgias. Dependendo de sua extensão, o reparo ósseo não acontece de forma espontânea, necessitando o uso de enxertos. Os biomateriais têm sido uma alternativa viável como substitutos ósseos. Dentre eles, destacam-se as biocerâmicas pela sua biocompatibilidade, atoxicidade e propriedades osteocondutoras. Este estudo analisou comparativamente dois tipos de biocerâmicas, cimento de α -fosfato tricálcico (α -TCP) e grânulos de β -fosfato tricálcico-HA (β -TCP/HA), inseridas em defeitos ósseos críticos confeccionados em calotas cranianas de 50 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos, com peso corporal médio de 300 a 400g. Os animais foram divididos em dois grupos com 25 animais: grupo- α e grupo- β /HA. Na calota craniana de cada animal, foram confeccionadas duas cavidades medindo 4 mm de diâmetro cada. A cavidade esquerda foi preenchida pelo material correspondente de cada grupo e a cavidade direita foi preenchida por coágulo sanguíneo autógeno, correspondendo ao grupo controle. Os animais foram mortos aos 7, 21, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório. Os ossos parietais contendo as cavidades foram removidos e as peças operatórias submetidas a processamento histológico pela técnica de HE. Com auxílio do *software* Image Pro Plus 6.2, foi realizada análise histomorfométrica que permitiu mensurar a área de osso neoformado dos defeitos nos diferentes períodos de observação. Os resultados, expressos em porcentagem média de área do defeito preenchido por osso neoformado, no grupo α -TCP foram: 1,6% (\pm 2,37) aos 7 dias, 5,24% (\pm 5,58) aos 21 dias, 24% (\pm 14,5) aos 60 dias, 30,21% (\pm 6,84) aos 90 dias e 50,59% (\pm 5,42) aos 120 dias. No grupo β -TCP/HA, os resultados foram de 1,94% (\pm 3,10) aos 7 dias, 2,53% (\pm 1,19) aos 21 dias, 12,47% (\pm 3,87) aos 60 dias, 26,84% (\pm 2,80) aos 90 dias e 38,82% (\pm 8,76) aos 120 dias de pós-operatório. No grupo controle, as médias dos resultados foram de 0,15% aos 7 dias, 10,12% aos 21 dias, 15,10% aos 60 dias, 18,94% aos 90 dias e 48,50% aos 120 dias. Conclui-se que o cimento α -TCP e os grânulos β -TCP/HA promovem osteocondução; o cimento α -TCP é mais solúvel e apresenta maior porcentagem de área de neoformação óssea. Os grânulos β -TCP/HA são reabsorvidos mais lentamente, o que parece promover manutenção do volume da região implantada.

Palavras-Chave*: Cicatrização, Reparo, Tecido ósseo, Substitutos ósseos, Biomateriais, Fosfatos

ABSTRACT

Osseous defects can be the result of pathologies, traumas and surgeries. Depending on its extension, the bone repair does not occur spontaneously therefore, fillings are necessary. Biomaterials have been a viable alternative as bone substitutes. Among them, emphasis is given on bioceramics due to their biocompatibility, atoxicity and osteoconduction properties. This study has comparatively analyzed two types of bioceramics, α -tricalcium phosphate (α -TCP) and β -tricalcium phosphate-HA (β -TCP/HA) inserted in critical osseous defects performed on 50 rat calvariae (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) male, adults, with an average body weight of 300 to 400 g. The animals were divided in two groups with 25 animals each: α - group and β /HA group. On the calvaria of each animal, two cavities were made measuring 4 mm of diameter each. The left cavity was filled with the correspondent material of each group and the right one was filled with autogenous bloodclot corresponding to the control group. The animals were sacrificed 7, 21, 60, 90 and 120 days after surgery. The parietal bones containing the cavities were removed and the parts were submitted to a histological processing by the HE technique. By using software Image Pro Plus 6.2, a histomorphometric analysis was performed which allowed the measurement of the defect neoformed bone area in different observation periods. The results expressed in mean percentage of the defect area filled by the neoformed bone, in the α - TCP group were: 1,6% (\pm 2,37) on day 7 , 5,24% (\pm 5,58) on day 21 , 24% (\pm 14,5) on day 60 , 30,21% (\pm 6,84) on day 90 and 50,59% (\pm 5,42) on day 120. In the β - TCP/HA group, the results were 1,94% (\pm 3,10) on day 7 , 2,53% (\pm 1,19) on day 21, 12,47% (\pm 3,87) on day 60, 26,84% (\pm 2,80) on day 90 and 38,82% (\pm 8,76) on day 120 post-surgery. In the control group , the mean results were 0,15% on day 7, 10,12% on day 21, 15,10% on day 60, 18,94% on day 90 and 48,50% on day 120. The study concluded that the cements α -TCP e β -TCP/HA promote osteoconduction; the cement α -TCP is more biosoluble and presents a higher percentage of bone neoformation area, and the β -TCP/HA is reabsorbed more slowly promoting volume maintenance of the implanted area.

Key words*: Healing, Repair, Bone Tissue, Bone substitutes, Biomaterials, Phosphate

*National Library of Medicine – Medical Subject Headings, available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | Página |
|------------------|--|--------|
| QUADRO 1: | Distribuição da população de acordo com o grupo e com o período de morte do animal..... | 39 |
| FIGURA 1 | A) Incisão dermo-periosteal. B) Descolamento do perióstio e exposição da calota..... | 40 |
| FIGURA 2 | Representação esquemática da calota craniana do rato. Defeitos ósseos (cavidade Experimental e cavidade Controle), confeccionados nos ossos parietais..... | 41 |
| FIGURA 3 | A) Defeitos confeccionados na calota craniana. B) α - TCP inserido na cavidade experimental. C) β -TCP/HA inserido na cavidade experimental..... | 42 |
| FIGURA 4 | Solução fisiológica 0,09% e pó do cimento α -TCP..... | 42 |
| FIGURA 5 | β -TCP/HA da marca Osteosynt®..... | 42 |
| FIGURA 6 | Preparo das peças para inserção em parafina. A) Corte longitudinal separando as cavidades entre si. B) Corte longitudinal dos defeitos ao longo de seus maiores diâmetros..... | 44 |
| FIGURA 7 | Programa Image ProPlus®, usado para medir área do defeito (circundada pela linha amarela) e neoformação óssea..... | 45 |
| FIGURA 8 | Montagem das diferentes imagens da mesma lâmina, obtidas pelo Image ProPlus®..... | 45 |
| FIGURA 9 | Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) – 7 dias . Na cavidade esquerda, observa-se presença de material e, na cavidade direita, tecido mole em seu interior, em ambos os grupos..... | 48 |
| FIGURA 10 | Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) – 21 dias . Nas cavidades experimentais observa-se presença de material, em ambos os grupos..... | 49 |
| FIGURA 11 | Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) – 60 dias . Nas cavidades experimentais, observa-se formação de tecido ósseo e presença de grânulos mais evidentes no grupo β -TCP/HA..... | 49 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| FIGURA 12 | Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) – 90 dias . Em ambos os grupos, a cavidade esquerda mostra grande área de neoformação óssea. As cavidades controle ainda estavam aparentes, porém em menor diâmetro..... | 50 |
| FIGURA 13 | Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) – 120 dias . As cavidades experimentais estão imperceptíveis e as cavidades controle pouco evidentes..... | 50 |
| GRÁFICO 1: | Comparação da área de neoformação óssea (em %) entre o grupo α -TCP e o grupo controle (coágulo sangüíneo)..... | 52 |
| GRÁFICO 2: | Comparação da área de neoformação óssea (em %) entre o grupo β -TCP/HA e o grupo controle (coágulo sangüíneo)..... | 53 |
| GRÁFICO 3: | Comparação da área de neoformação óssea (em %) entre os grupos α -TCP e β -TCP/HA, nos diferentes períodos de observação..... | 54 |
| FIGURA 14 | Grupo α -TCP, 7 dias. Defeito ósseo contendo cimento em seu interior. BD – borda do defeito. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 55 |
| FIGURA 15 | Grupo β , 7 dias. Áreas de cimento envolvidas por tecido conjuntivo. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 55 |
| FIGURA 16 | Grupo α , 21 dias. Área de tecido ósseo imaturo em torno de área de cimento. ON – osso neoformado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 56 |
| FIGURA 17 | Grupo β -TCP/HA, 21 dias. Borda do defeito ósseo, várias áreas de cimento circundadas por tecido celular e osso neoformado. BD – borda do defeito ósseo. ON – osso neoformado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 56 |
| FIGURA 18 | Grupo α , 60 dias. Borda do defeito ósseo aparente com região de tecido ósseo neoformado. BD – borda do defeito ósseo. ON – osso neoformado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 57 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| FIGURA 19 | Grupo β -TCP/HA, 60 dias. Percebe-se áreas de neoformação óssea em meio ao cimento. ON – área de neoformação óssea. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 57 |
| FIGURA 20 | Análise comparativa do volume de tecido nos defeitos de 60 dias. A) Grupo α -TCP: presença de área de neoformação óssea e volume de tecido igual ou menor do que o tamanho do defeito. B) Grupo β -TCP/HA: presença de grande quantidade de cimento no interior do defeito, com volume excedendo o tamanho do defeito..... | 58 |
| FIGURA 21 | Grupo α TCP, 90 dias. Maior porcentagem de área de osso neoformado. BD – borda do defeito. ON – área de osso neoformado. Linha de reversão (setas). Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 59 |
| FIGURA 22 | Grupo β TCP/HA, 90 dias. Grande área de tecido ósseo neoformado entremeada por tecido fibroso e ilhas de cimento. BD – borda do defeito. ON – área de osso neoformado. Linha de reversão (setas). Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 59 |
| FIGURA 23 | Grupo α , 120 dias. Grande área de tecido ósseo confundindo-se com a borda do defeito. BD – borda do defeito. ON – área de neoformação óssea. Linha de reversão (setas). Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 60 |
| FIGURA 24 | Grupo β , 120 dias. Ilhas de osso neoformado entremeadas por áreas de cimento. ON – osso neoformado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X..... | 60 |
| GRÁFICO 4: | Evolução da neoformação óssea nos grupos α -TCP e β -TCP/HA, ao longo dos períodos de observação..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| TABELA 1: Comparação da área de neoformação óssea (média e desvio padrão), entre o grupo α -TCP o grupo controle (coágulo sangüíneo), de acordo com os períodos de observação..... | 51 |
| TABELA 2: Comparação da área de neoformação óssea (média e desvio padrão), entre o grupo- β -TCP/HA e o grupo controle (coágulo sangüíneo), de acordo com os períodos de observação..... | 53 |
| TABELA 3: Comparação da área de neoformação óssea (média e desvio padrão) entre os grupos experimentais α -TCP e β -TCP/HA, e acordo com os períodos de observação..... | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------|---|
| % | - Porcento |
| α | - Alfa |
| β | - Beta |
| μm | - Micrometro(s) |
| ® | - Marca registrada |
| °C | - Graus Celsius |
| ABNT | - Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| ACP | - Fosfato de cálcio amorfo |
| ANVISA | - Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| BMP | - Proteína(s) morfogenética(s) óssea(s) |
| C | - Carbono |
| Ca | - Cálcio |
| CDHA | - Hidroxiapatita deficiente em cálcio |
| CFC (s) | - Cimento (s) de fosfato de cálcio |
| CSD | - Sulfato de cálcio diidratado |
| CTBMF | - Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial |
| d | - Diâmetro |
| DC | - Defeito crítico |
| DCP | - Cimento de fosfato dicálcico |
| DCPD | - Fosfato dicálcico diidratado |
| DFDBA | - Osso desmineralizado liofilizado humano |
| FDDBA | - Osso mineralizado liofilizado humano |

| | |
|------|---|
| FGF | - Fator de crescimento de fibroblastos |
| Fig. | - Figura |
| FO | - Faculdade de Odontologia |
| g | - Grama(s) |
| HA | - Hidroxiapatita |
| HE | - Hematoxilina e Eosina |
| IGF | - Fator de crescimento semelhante à insulina |
| Kg | - Quilograma(s) |
| m | - Metro(s) |
| ml | - Mililitro(s) |
| mm | - Milímetro(s) |
| MO | - Microscópio óptico |
| Na | - Sódio |
| P | - Fósforo |
| pH | - Potencial de hidrogênio |
| PHA | - Hidroxiapatita precipitada |
| PDGF | - Fator de crescimento derivado das plaquetas |
| ppm | - Partes por milhão |
| RS | - Rio Grande do Sul |
| SF | - Solução(ões) fisiológica(s) |
| TGF | - Fator de transformação do crescimento |
| TCP | - Fosfato tricálcico |
| TTC | - Fosfato tetracálcico |

| | |
|----------------|---|
| TNT | - Tecido não tecido |
| O ₂ | - Oxigênio |
| OCP | - Fosfato octacálcico |
| PUCRS | - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul |

SUMÁRIO

| | Página |
|---|-----------|
| RESUMO..... | |
| ABSTRACT..... | |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... | |
| LISTA DE TABELAS..... | |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2 REVISTA DA LITERATURA..... | 23 |
| 2.1 TECIDO ÓSSEO..... | 23 |
| 2.1.1 Histologia Óssea..... | 23 |
| 2.1.2 Dinâmica do Tecido Ósseo..... | 25 |
| 2.2 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO..... | 26 |
| 2.3 SUBSTITUTOS ÓSSEOS..... | 27 |
| 2.4 FOSFATO DE CÁLCIO..... | 29 |
| 2.4.1 Microestrutura..... | 31 |
| 2.4.2 Propriedades Químico-Mecânicas..... | 31 |
| 2.4.3 Interação com o Tecido Ósseo..... | 32 |
| 2.4.4 Alfa Fosfato Tricálcico (α-TCP)..... | 33 |
| 2.4.5 Beta Fosfato Tricálcico (β-TCP)..... | 35 |
| 2.4.6 Hidroxiapatita (HÁ) | 35 |
| 3 METODOLOGIA..... | 38 |
| 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 38 |
| 3.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA..... | 38 |
| 3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA..... | 39 |
| 3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO..... | 39 |
| 3.5 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS OPERATÓRIAS..... | 43 |
| 3.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA – HISTOMORFOMETRIA..... | 43 |
| 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 46 |
| 4 RESULTADOS..... | 47 |
| 4.1 DESCRIÇÃO DA OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICAS DOS DEFEITOS ÓSSEOS..... | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.1 Análise macroscópica – 7 dias..... | 47 |
| 4.1.2 Análise macroscópica – 21 dias..... | 47 |
| 4.1.3 Análise macroscópica – 60 dias..... | 47 |
| 4.1.4 Análise macroscópica – 90 dias..... | 48 |
| 4.1.5 Análise macroscópica – 120 dias..... | 48 |
| 4.2 RESULTADOS DA HISTOMORFOMETRIA – GRUPOS EXPERIMENTAIS X GRUPO CONTROLE (COÁGULO SANGÜÍNEO)..... | 50 |
| 4.2.1 Grupo α-TCP X Coágulo Sangüíneo..... | 50 |
| 4.2.2 Grupo β-TCP/HA X Coágulo sangüíneo..... | 52 |
| 4.3 RESULTADOS DA HISTOMORFOMETRIA – GRUPO α -TCP X GRUPO β -TCP/HÁ..... | 53 |
| 4.3.1 Grupo-α-TCP X Grupo-β-TCP/HA - 7 dias..... | 54 |
| 4.3.2 Grupo-α-TCP X Grupo-β-TCP/HA - 21 dias..... | 55 |
| 4.3.3 Grupo-α-TCP X Grupo-β-TCP/HA - 60 dias..... | 56 |
| 4.3.4 Grupo-α-TCP X Grupo-β-TCP/HA - 90 dias..... | 58 |
| 4.3.5 Grupo-α-TCP X Grupo-β-TCP/HA - 120 dias..... | 59 |
| 4.4 ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA AO LONGO DOS PERÍODOS DE OBSERVAÇÃO..... | 60 |
| 4.4.1 Grupo α-TCP..... | 60 |
| 4.4.2 Grupo β-TCP/HA..... | 61 |
| 4.4.3 Grupo Controle..... | 61 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 62 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 68 |
| REFERÊNCIAS..... | |
| APÊNDICE..... | |
| APÊNDICE A - Ficha de Coleta de Dados – HISTOMORFOMETRIA..... | |
| ANEXOS..... | |
| ANEXO A — Aprovação do Projeto de Dissertação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS..... | |
| ANEXO B – Aprovação do Projeto de Dissertação pelo CEP..... | |

1 INTRODUÇÃO

A perda de tecido ósseo pode ocorrer por diversos fatores, como trauma seguido de fraturas, patologias e procedimentos cirúrgicos. Muitas vezes, devido à perda de substância óssea, não há reparo completo, resultando em um defeito que pode implicar em comprometimento da estética e perda parcial ou total da função da estrutura lesada. Essas alterações são especialmente importantes quando acometem o esqueleto craniofacial, pois, além de proteger diversas estruturas nobres, os ossos do crânio e da face contribuem para a composição estética do indivíduo.

Com o intuito de instituir, recuperar e/ou manter volume e qualidade óssea em regiões que perderam suas conformações anatômicas, diversas pesquisas têm procurado desenvolver ou aperfeiçoar novos e promissores materiais biocompatíveis, que favoreçam o reparo dos defeitos ósseos.

Na literatura mundial, existe unanimidade em designar o enxerto autógeno como o melhor e mais bem aceito material para tratamento dos defeitos ósseos. Contudo, a necessidade de uma cirurgia adicional em área doadora, diferente da área receptora, torna-se um inconveniente para muitos pacientes que não aceitam a intervenção em outras regiões do corpo. Além disso, em muitos casos, a quantidade de enxerto disponível não é suficiente para o preenchimento da área receptora (MACEDO et al., 2004).

As desvantagens ou limitações do enxerto autógeno estimulam a busca por materiais alternativos, substitutos ósseos que mantenham ou auxiliem a capacidade regenerativa do tecido ósseo de forma relativamente inalterada, e os enxertos aloplásticos ou sintéticos vêm sendo apresentados como uma alternativa viável.

O preenchimento de defeitos ósseos por enxertos aloplásticos é facilitado pela osteocondução, uma vez que o material fornece um suporte que guiará a formação óssea. Para isso, algumas condições devem ser cumpridas: esse suporte deve ser constituído por um material bioinerte ou bioativo; sua forma e dimensões devem favorecer o crescimento ósseo pelo seu interior e a deposição óssea deve ocorrer por substituição (SHIRATORI et al., 2005). Os materiais osteocondutores não têm capacidade de induzir a citodiferenciação de osteoblastos, mas preenchem a falha, orientando as novas células originadas por proliferação das osteoprogenitoras, provenientes das margens do defeito, a promoverem a neoformação de tecido ósseo (COOK e RUEGER, 1996).

Dentre as vantagens encontradas nos enxertos aloplásticos, podem-se destacar a disponibilidade comercial em grande quantidade, características de fácil manipulação, além da possibilidade de uma integração física e/ou química no meio inserido (SANTOS, 2002).

O fosfato tricálcico e a hidroxiapatita são substitutos ósseos aloplásticos da classe das biocerâmicas que têm larga aplicação na área biomédica. Nos últimos anos, têm sido usados em cirurgias ósseas, apresentando uma série de vantagens de utilização em ortopedia e traumatologia, sendo as mais destacadas a biocompatibilidade e a bioatividade, que permitem a osteocondução dos tecidos, e o endurecimento *in situ*, que oferece maior facilidade de manipulação e aplicação no caso de cimentos de fosfato de cálcio (LIKE e MONROE, 1991).

Os materiais α e β -TCP têm sido usados isoladamente, associados entre si ou combinados com hidroxiapatita (HA) (CHOW, 1998). A HA, o α -TCP e o β -TCP possuem formulação química semelhantes, diferindo na estrutura cristalina de seus grânulos, que leva os materiais a apresentarem características de absorção diferentes. O índice de solubilidade do β -TCP é menor do que o do α -TCP, isso implica na permanência do β -TCP por mais tempo no organismo (CHOW, 1998; LI et al., 2006).

No momento, o cimento α -TCP utilizado nesta pesquisa encontra-se em fase de testes laboratoriais pré-clínicos, enquanto o β -TCP/HA já vem sendo comercializado, com autorização da ANVISA, para uso em humanos.

Diante do exposto, o presente estudo propõe-se a avaliar microscopicamente o efeito do cimento α -TCP e dos grânulos β -TCP/HA, no reparo ósseo em defeitos críticos em calota craniana de ratos, com relação à condutibilidade óssea.

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um dos mais resistentes do corpo humano. Constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos no crânio. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada para manter constante sua concentração nos líquidos corporais. A hidroxiapatita e o colágeno são responsáveis pela dureza e resistência do tecido ósseo, permitindo que ele resista à compressão e à tensão (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.1.1 Histologia óssea

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células e material intercelular calcificado, a matriz óssea. As células componentes do tecido ósseo são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (ROSS et al., 1993).

Os osteoblastos são células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, que é composta por colágeno do tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Quando em intensa atividade sintética, são cubóides, apresentando citoplasma muito basófilo; porém, em estado pouco ativo, tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática diminui. Os osteoblastos se comunicam por prolongamentos citoplasmáticos, que se

tornam mais evidentes quando estão envolvidos pela matriz. Uma vez aprisionado pela matriz recém sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O osteoblasto pertence a uma linhagem de células, da qual participam as células progenitoras do osteoblasto e os osteócitos, os quais constituem o estágio final da diferenciação das células desta linhagem. As osteoprogenitoras são células mesenquimais pluripotentes, indiferenciadas e primitivas. Elas possuem alta capacidade proliferativa e são capazes de se especializar em células ósseas maduras, condroblastos ou mesmo fibroblastos, de acordo com a natureza ou o grau do estímulo que recebem. São comumente achatadas e encontradas inicialmente em tecidos conjuntivos perivasculares e nas superfícies dos tecidos ósseos, endóstio e perióstio (CARVALHO e BUZATO, 2005).

Os osteócitos encontram-se no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem canalículos com seus prolongamentos. Como não existe difusão de substâncias através da matriz óssea, a nutrição dos osteócitos depende destes canalículos presentes na matriz. Eles possibilitam a passagem de nutrientes e permitem a comunicação dos osteócitos com seus vizinhos, com perióstio e endóstio e com os canais vasculares da matriz. Estes canais estabelecem contatos através de junções comunicantes permitindo o fluxo intercelular de íons e pequenas moléculas, como hormônios, que controlam o crescimento e o desenvolvimento dos ossos. Os osteócitos são células achatadas com características ultra-estruturais que indicam pequena atividade sintética, mesmo assim, são essenciais para a manutenção da matriz óssea, pois sua morte é seguida por reabsorção da matriz (ROSS et al., 1993, JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas, com partes dilatadas que contêm de seis a 50 ou mais núcleos e que derivam da fusão dos monócitos do sangue circulante. Frequentemente, nas áreas de reabsorção do tecido ósseo, encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos, localizadas em depressões da matriz, escavadas pela ação enzimática e conhecidas como lacunas de Howship. Os osteoclastos secretam ácido (hialuronidase), colagenase e outras enzimas que atacam a matriz e liberam íons cálcio. Também participam da eliminação dos restos de tecido ósseo que se formam durante a reabsorção do osso (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo cortical é de revestimento, podendo estar coberto externamente por cartilagem articular ou periósteo. O periósteo possui uma camada externa constituída por fibras colágenas e fibroblastos e, uma porção celular, mais profunda, constituída por células osteoprogenitoras. As estruturas fibrosas que aderem o periósteo à superfície óssea são denominadas fibras de Sharpey (KESSEL, 2001; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo esponjoso compreende a medula óssea, depositada em espaços constituídos por uma rede de placas finas e irregulares, denominadas trabéculas, separadas por espaços intercomunicantes. Nestes espaços, a medula óssea é vermelha, nos ossos jovens, e amarela, nos adultos. As trabéculas são recobertas pelo endósteo e, assim como o periósteo, o endósteo contém células da série osteogênica responsáveis pelo crescimento, reparo ósseo e remodelamento contínuos (ROSS et al., 1993; YOUNG e HEATH, 1994).

2.1.2 Dinâmica do tecido ósseo

Os osteoblastos são capazes de secretar sua matriz e formar tecido ósseo por dois diferentes processos de ossificação: intramembranosa e endocondral; ambas resultam em um tecido histologicamente semelhante. A ossificação intramembranosa ocorre a partir de um tecido mesenquimal vascularizado. As células mesenquimais indiferenciadas que compõem este tecido se diferenciam em osteoprogenitoras e, posteriormente, em osteoblastos. Certas regiões do tecido ósseo em formação não calcificam, correspondendo às regiões do endósteo e do periósteo (TEN CATE, 1985; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A ossificação endocondral, por outro lado, ocorre, sobretudo, em ossos longos e inicia-se pela formação de um molde cartilaginoso, em área pouco vascularizada, onde o osso será formado, uma vez que as células mesenquimais, em condições de baixas tensões de oxigênio, diferenciam-se preferencialmente em condroblastos (CARVALHO e BUZATO, 2005).

O tecido ósseo sofre três processos ao longo da vida: o modelamento, que se caracteriza pela aquisição de forma; o reparo, que responde ao processo cicatricial; e o remodelamento onde ocorre um processo ósseo contínuo que reduz seu ritmo durante o envelhecimento (SCHWAN e SOUZA, 2000). Segundo Carvalho e Buzato (2005), a modelação pode ser precedida ou não por um molde de cartilagem e envolve tanto formação óssea (atividade de osteoblastos), quanto reabsorção

(atividade de osteoclastos). A remodelação é um processo fisiológico dinâmico cujo objetivo é manter constantes os níveis iônicos do sangue, tornando disponíveis as reservas de cálcio e fósforo e colaborando para a homeostase mineral.

Na presença de um defeito ósseo, como uma fratura, por exemplo, o osso pode ser completamente reconstituído pela reativação de processos que só ocorrem na embriogênese. Imediatamente após a ocorrência do defeito, forma-se um coágulo e uma rede de fibrina que preenche o espaço do defeito. Células inflamatórias migram para o local e liberam mediadores químicos e fatores de crescimento capazes de ativar as células osteoprogenitoras e de revestimento ósseo. A formação óssea estará na dependência da formação de uma ampla rede vascular e de estabilidade mecânica dos fragmentos ósseos (CARVALHO e BUZATO, 2005).

Christian (1996) afirmou que a cicatrização de uma fratura pode, na verdade, não ser absolutamente um processo de consolidação, mas um processo de regeneração óssea. Consolidação significa tornar novamente inteiro ou sólido, significa curar. Na pele ou órgão interno, a consolidação deixa uma cicatriz produzida por tecido conjuntivo novo, que substitui o tecido lesado. Regeneração, por outro lado, significa formar-se novamente, tomar novamente uma forma.

O osso, quando lesado, tem a capacidade de regenerar e retornar à estrutura tecidual original, sem a formação de tecido cicatricial (HOLLINGER et al., 1997; REMEDIOS, 1999). Apesar desse potencial, a regeneração necessita de auxílio em várias ocasiões, como nas uniões retardadas, nas não-uniões, em fraturas múltiplas ou cominutivas, nas osteotomias e no preenchimento de cavidades ou defeitos segmentares extensos (COOK e RUEGER, 1996).

Existem controvérsias na literatura quanto à terminologia para designar o processo de reparação do tecido ósseo frente à perda tecidual. O presente estudo seguirá as definições preconizadas por Mitchell et al. (2006). De acordo com os autores, a regeneração ou reparo é o processo pelo qual o tecido lesado é substituído por células parenquimais nativas, ocorrendo proliferação do mesmo tipo de célula. A regeneração envolve a restituição de tecidos idênticos aos que foram perdidos, como por exemplo, o reparo ósseo, onde o tecido pode ser completamente reconstituído após lesão tecidual.

2.2 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO

Defeitos críticos são aqueles cujas dimensões não permitem cicatrização espontânea ao longo da vida. O padrão e o tempo de reparo variam de acordo com a espécie animal e com a localização anatômica, havendo, portanto, diferença no tamanho do defeito ósseo considerado crítico. A capacidade regenerativa da calvária de animais experimentais como ratos e coelhos, pode ser considerada melhor do que em humanos. Devido à grande área de inserções musculares, o suprimento sangüíneo da calvária de humanos é inferior comparando-se à calvária de animais. Como resultado, defeitos pequenos na calvária de humanos adultos não reparam espontaneamente (SIROLA, 1960; SCHMITZ e HOLLINGER, 1986).

Turnbull e Freeman (1974) observaram que defeitos de 2 mm de diâmetro, confeccionados em calvária de ratos Wistar, falharam na cicatrização em um período de 12 semanas.

Mulliken e Glowacki (1980) testaram e avaliaram diferentes implantes ósseos em defeitos experimentais de 4 mm em parietais de ratos, sendo que alguns dos implantes testados não apresentaram reparo completo dos defeitos ósseos em um período de 6 meses.

Tagaki e Urist (1982) determinaram que defeitos de 8 mm criados em calvárias de ratos Sprague-Dawley reduziram para 5 mm em 4 semanas e não obtiveram mais cicatrização ao longo de 12 semanas.

2.3 SUBSTITUTOS ÓSSEOS

Para manter ou auxiliar a capacidade reparativa do tecido ósseo, podem ser utilizados substitutos ósseos osteoindutores e osteocondutores (HOLLINGER et al., 1997). Uma das vantagens desses substitutos ósseos é não produzir trauma adicional ao paciente, o que ocorre na obtenção de enxerto autógeno. O material osteoindutor estimula as células indiferenciadas da ferida a converterem-se fenotipicamente em osteoblastos, responsáveis pela neoformação óssea. Por outro lado, os osteocondutores não têm capacidade de induzir a citodiferenciação de osteoblastos, mas preenchem a falha, orientando as novas células originadas por proliferação de células osteoprogenitoras das bordas do defeito a promoverem a neoformação de tecido ósseo (COOK e RUEGER, 1996; KEATING e McQUEEN, 2001).

Para Carvalho e Buzato (2005) osteoindução é a habilidade em induzir o osso hospedeiro a produzir novo tecido ósseo, levando à transformação do tecido

conjuntivo mesenquimal em tecido ósseo, enquanto a osteocondução consiste na habilidade de guiar e conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte (arcabouço), que será reabsorvida e substituída por tecido ósseo.

O processo de osteoindução pode ser exemplificado pelo uso de células-tronco na formação óssea. Zago e Covas (2006) explicaram que a medula óssea contém, além das células-tronco hematopoiéticas e endoteliais, uma população rara de células-tronco multipotenciais capaz de suportar a hematopoiese e se diferenciar em diversas linhagens celulares, como adipócitos, condrócitos e osteócitos. Essas células têm sido denominadas de células-tronco mesenquimais, cuja diferenciação osteogênica requer a presença de indutores para adquirirem a morfologia de osteoblastos e passarem a expressar fosfatase alcalina e depositar matriz extracelular rica em cálcio.

Segundo Den Boer et al. (2003), vários tipos de compostos de hidroxiapatita têm sido testados como carreadores para a osteocondução, apresentando resultados satisfatórios, semelhantes aos encontrados com o uso de enxertos autógenos. Os substitutos ósseos devem apresentar características como biocompatibilidade, atoxicidade e resistência à deformação, para serem implantados no organismo. Resistência ou não à reabsorção é uma condição que varia conforme a aplicação desejada e, caso sejam reabsorvíveis, estes biomateriais devem ser metabolizados pelo organismo ou excretados por uma via normal fisiológica (OUSTERHOUT e STELNICKI, 1996; VALÉRIO et al., 2004; KNABE et al., 2005).

Os enxertos autógenos, também denominados autólogos ou auto-enxertos, são compostos por enxertos removidos do próprio indivíduo, constituídos por osso cortical e/ou medular, provenientes de regiões variadas, como crista ilíaca, calota craniana, fíbula, tibia, além de regiões faciais como mento, triângulo retro-molar e regiões edentadas (NASR et al., 1999). As vantagens dos enxertos autógenos reafirmam seu potencial como um ótimo material para reconstruções e preenchimentos ósseos. No entanto, há dificuldade para dar ao enxerto a forma da região receptora, a quantidade de osso disponível é limitada e seu uso repercute, na maioria das vezes, em acesso a um novo sítio operatório, além do leito receptor (MULLIKEN e GOWACKI, 1980; OUSTERHOUT e STELNICKI, 1996; MACEDO et al., 2004).

Os enxertos aloplásticos, também chamados sintéticos, são divididos na classe dos polímeros e das biocerâmicas. Essas últimas são formadas por cálcio e fósforo em proporções similares a do osso. Os materiais biocerâmicos são o fosfato tricálcico, a hidroxiapatita e o vidro bioativo (NASR et al. 1999).

Estes biomateriais devem possuir determinadas características como: biocompatibilidade, não serem alergênicos, nem carcinogênicos, possuírem resistência à deformação, além da resistência ou não à reabsorção conforme a aplicação desejada (SANTOS, 2002; VALÉRIO et al., 2004).

Hench e Wilson (1993) classificaram os biomateriais de acordo com o seu comportamento fisiológico:

- a) Biotoleráveis: materiais isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso. O material induz a formação dessa camada por meio da liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais;
- b) Bioinertes: materiais também tolerados pelo organismo, em que formação de envoltório fibroso é mínima. O material não libera componentes em quantidade mínimas. São exemplificados pela alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono;
- c) Bioativos: ocorrem ligações de natureza química entre 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 fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio;
- d) Absorvíveis: materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo, como o fosfato tricálcico (TCP) e o poli ácido láctico.

2.4 FOSFATO DE CÁLCIO

Desde seu surgimento no mercado, no início dos anos 80, os fosfatos de cálcio, especialmente a hidroxiapatita, foram consideradas os materiais por excelência para a remodelação e reconstrução de defeitos ósseos. Isto se deve principalmente às suas propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e

osteocondutividade, o que denota que, ao serem implantadas no sítio, não induzem resposta imunológica, são capazes de ligar-se diretamente ao tecido ósseo e permitem o crescimento do osso ao longo de sua superfície (LeGEROS, 1988).

Podem ser encontrados nas formas de pó e líquido, blocos ou grânulos. Os cimentos de fosfato de cálcio (CFCs) constituídos por pó e líquido, ao serem misturados, formam uma pasta que endurece espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal como resultado da precipitação de um ou vários fosfatos de cálcio. Os blocos são fabricados com formas pré-determinadas e normalizadas. Os granulados apresentam o risco de migrarem além do sítio de implantação podendo alcançar o tecido mole e provocar reações granulomatosas e até mesmo sua expulsão para fora do organismo. As características que determinam os CFCs como biomateriais atrativos para a reconstrução ou remodelação óssea são: facilidade de manipulação e moldagem sem ter de dar forma prévia ao enxerto, adaptando-se totalmente à forma da cavidade óssea e obtendo um íntimo contato entre o osso e o cimento desde os primeiros estágios da implantação. Além disso, os CFCs diferenciam-se dos outros cimentos ósseos não aquecendo durante o processo de endurecimento, evitando assim a necrose tecidual no sítio receptor (DRIESENS et al., 1997).

De acordo com Santos (2002) esses materiais reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituto de partes danificadas do sistema ósseo, dentre as quais estão, além das já citadas por Driessens et al. (1997): preparação realizada durante o ato cirúrgico, biocompatibilidade e bioatividade. O autor cita como principal desvantagem dos CFCs sua baixa resistência mecânica que, no melhor dos casos, consegue igualar-se à do osso trabecular, ou a um quinto do osso cortical.

Segundo Chow (1998), a cimentação pode ocorrer distintamente em diferentes sistemas de cimentos que contenham fosfato de cálcio como o componente majoritário. Esses sistemas podem ser divididos em categorias: (1) cimentos compostos por fosfatos e água ou que haja na solução usada como líquido um cálcio ou um fosfato; o endurecimento desse cimento é resultado da formação de um ou mais fosfatos de cálcio compondo o cimento; (2) cimentos que contenham essencialmente fosfato de cálcio em seu componente sólido e que no componente líquido haja um ácido orgânico; (3) cimentos similares ao anterior, mas o líquido é uma solução de polímero; o endurecimento desse cimento é resultado da formação

de hidroxiapatita ou uma formação complexa de fosfato de cálcio e solução de polímero; (4) cimentos compostos por fosfato de cálcio e polímeros, onde o fosfato de cálcio age como preenchimento e não atua no mecanismo de endurecimento. Dentre os cimentos incluídos na primeira categoria destacam-se, por ordem decrescente de índice de Ca/P: Cimento de fosfato tetracálcico (TTCP), alfa fosfato tricálcico (α -TCP), beta fosfato tricálcico (β -TCP), fosfato de cálcio amorfo (ACP), fosfato octacálcico (OCP), fosfato dicálcico (DCP) e fosfato monocálcico monoidratado. O autor ainda classificou os cimentos de fosfato de cálcio de acordo com sua aplicação e função no organismo. Implantes de cimento que sofrerão carga, como, por exemplo, enxertos alveolares, que receberão carga oclusal durante a mastigação, e implantes de cimento que não sofrerão carga, ou seja, serão usados somente para preenchimento de defeitos ou modelamento de estruturas ósseas. Em algumas dessas aplicações os implantes devem permanecer no organismo do indivíduo para o resto de sua vida, enquanto que, em outros casos, o material poderá ser reabsorvido desde que seja simultaneamente substituído por tecido ósseo.

2.4.1 Microestrutura

Os CFCs apresentam-se na forma de cristais que são resultado de reações em série. O primeiro cimento ósseo de fosfato de cálcio a ser sintetizado foi o tipo cristalino, cujo resultado foi um precipitado de hidroxiapatita; desde então, muitas outras formas cristalinas têm sido sintetizadas. Os principais tipos de cimento que podem ser obtidos de precipitados cristalinos de fosfato de cálcio são o cimento de hidroxiapatita, de fosfato dicálcico diidratado (DCPD), de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) ou hidroxiapatita carbonada em composições variáveis. Sistemas mais complexos também são possíveis, por exemplo, α -fosfato tricálcico e carbonato de cálcio (CaCO_3), em que ambos, DCPD e CDHA precipitam (DRIESSENS et al., 1998).

2.4.2 Propriedades químico-mecânicas

Os fosfatos de cálcio, de modo geral, são materiais que podem ser facilmente fabricados sob várias composições (denso, micro ou macroporosos), tamanhos e formas, de acordo com sua aplicação específica. Suas características principais

constituem relativamente baixa tensão superficial e baixa resistência à fadiga (CHOW, 1988).

Os índices de absorção do fosfato de cálcio são ajustados a vários tipos de aplicação: preenchimento, revestimento, cimento ósseo e regeneração tecidual. As taxas de solubilidade de um fosfato de cálcio de uma fase não podem ser variadas ou moduladas, já, se duas fases do fosfato de cálcio forem combinadas, esses valores podem ser aumentados. Fosfato de cálcio bifásico, composto por β -TCP e HA, têm sido intensamente investigado, devido aos seus índices de biodegradação, bioatividade e osteocondutividade (SANTOS, 2002).

A solubilidade e/ou índice de absorção do α -TCP são muito maiores que os do β -TCP. No entanto, a combinação de ambos pode levar à formação de um fosfato de cálcio altamente solúvel (LI et al., 2006).

Segundo Santos (2002), os principais parâmetros que determinam a resistência dos cimentos são a porosidade total, a distribuição de tamanho de poros, a presença de defeitos no sistema e a homogeneidade ou heterogeneidade do sistema.

Quanto maior a proporção de poros pequenos para uma dada porosidade total, mais resistente será o material (MINDESS, 1985). Os poros na massa atuam como concentradores de tensão, e uma redução de seu tamanho reduzirá também a magnitude do campo de intensidade de esforço associado (ALFORD e McN, 1981). Shima et al. (1979) observaram que a presença de poros tornava o cimento mais frágil, para corrigir essa limitação reduziu-se o tamanho dos grânulos do cimento.

Os CFCs são tão estáveis no organismo que o tempo para serem substituídos por osso é muito longo. Para acelerar a reabsorção e substituição do cimento, muitos autores têm aperfeiçoado a macroporosidade do material, aumentando o tamanho e a quantidade dos poros. Em estudo experimental, Fernández et al. (2005) adicionaram sulfato de cálcio diidratado (CSD) ao cimento α -TCP no intuito de aumentar sua porosidade, facilitando sua substituição por tecido ósseo ao longo do tempo. Ocorreu uma dissolução do CSD, deixando espaços, ou porosidades, no interior do cimento de fosfato de cálcio. Essas porosidades permitem que as células osteoprogenitoras penetrem no interior do cimento, acelerando o processo de integração óssea.

2.4.3 Interação com o tecido ósseo

Genericamente, os CFCs são reabsorvidos devido a atividade osteoclástica, formando, ao mesmo tempo, novo tecido ósseo na interface osso-cimento. Desta forma os CFCs não atuam como substitutos permanentes do osso, apenas temporários, sendo lentamente substituídos por tecido ósseo neoformado. Este comportamento típico tem sido denominado de osteotransdutividade. A velocidade com que esse fenômeno ocorre depende fortemente, dentre outros fatores, do tipo de CFC, do sítio de implantação e da idade do indivíduo receptor (DRIESSENS et al., 1998).

Kurashina et al. (1997) avaliaram a ação do CFC com implantação de uma pasta de α -TCP, fosfato dicálcico dibásico e fosfato monóxido de tetracálcio em tecido mole e em tecido ósseo. Os resultados histológicos no tecido ósseo revelaram que a massa de cimento apresentou contato direto com o osso neoformado, o qual apresentou-se claramente diferenciado do osso mais distante do cimento. À análise microrradiográfica, os achados histológicos foram confirmados: contato direto entre cimento e osso, sem intervenção de tecido mole. Quanto ao período, não houve diferença entre as análises de 3 e 6 meses, a não ser no grau de maturação do osso neoformado. Os autores concluíram ser esse um material promissor como substituto ósseo embora haja necessidade de mais estudo na área.

Segundo Driessens et al. (1986), dois tipos de reabsorção do fosfato de cálcio e seus cimentos podem ser distinguidos: um material pode ser biorreabsorvível devido à falta de estabilidade nos fluidos corporais, sem considerações de atividade celular. Essa forma de biorreabsorção pode ser chamada de passiva em comparação com o tipo ativo, mediado por atividade celular. Também se espera uma reabsorção passiva em cimentos de fosfato de cálcio diidratado, no entanto, de CFCs dos tipos OCP e CDHA espera-se apenas um tipo ativo de reabsorção, ou seja, a atividade dos osteoclastos é necessária e suficiente para fazê-los reabsorver. É questionável que cimentos do tipo PHA sejam bioabsorvíveis, uma vez que não é evidenciada atividade osteoclástica.

2.4.4 Cimento de Alfa Fosfato Tricálcico (α -TCP)

Os estudos de Kessler et al. (2002) sobre o efeito do cimento α -TCP no reparo ósseo, utilizando ovelhas como modelo animal, demonstraram presença de osteocondução com formação homogênea de osso, além de trabeculado ósseo servindo como pontes conectando as extremidades dos defeitos ósseos. A superfície

de osso neoformado apresentou-se delineada por osteoblastos. Formação de osteóide resultante da atividade dessas células foi observada muito raramente. Percebeu-se uma matriz residual de cerâmica degradada em pequenas partículas distribuídas entre o trabeculado ósseo. Não foram identificadas células gigantes multinucleadas nas sessões de 100 μ m observadas.

Nagase et al. (1991) e Kosino et al. (1992) revelaram que esse cimento é conhecido por elevar seu pH quando dissolvido em água, esse aumento de pH resulta na presença de células inflamatórias em torno do cimento por várias semanas após sua implantação.

A presença de sulfato de cálcio hemihidratado na composição do cimento de α -TCP permite redução no tempo de presa, aumento nos valores do pH e ocorrência de poros no cimento para facilitar a osteocondução (SANTOS, 2002). De acordo com Driessens et al. (1997), o α -TCP acrescido de sulfato de cálcio hemiidratado cumpre com o requisito referente ao pH, entre 6,5 e 8,0, para permitir atividade celular. Dentre outras propriedades, esse cimento não incha nem desintegra quando exposto a fluidos corporais depois de 3 ou 4 minutos do início da mistura; não apresenta retração nem expansão e não há liberação de calor durante a pega.

Segundo Hirakata (2003), o α -TCP não tem aplicabilidade como biomaterial devido à sua solubilidade, a qual é marcadamente mais alta do que o β -TCP. O cristal de α -TCP na fase de cimento demanda muitos dias para realizar sua transformação em hidroxiapatita, portanto, os cristais permanecem no tecido por um longo período de tempo.

Santos (2002) pesquisou a inserção de fibras poliméricas ou cerâmicas na composição do cimento, com a finalidade de melhorar suas propriedades mecânicas, obtendo um novo tipo de cimento de fosfato de cálcio, o de dupla-pega, que apresentou valores de resistência à compressão 150% superiores à composição sem o sistema de polimerização introduzido. Os resultados demonstraram que as fibras adicionadas aumentam mais acentuadamente a resistência à tração e a tenacidade à fratura dos cimentos, sendo obtidos valores próximos aos do osso cortical humano. A avaliação biológica *in vivo* e *in vitro* demonstrou a biocompatibilidade dos compósitos obtidos, ampliando a gama de possíveis

aplicações médicas e odontológicas no reparo de defeitos amplos e o uso em locais solicitados por carga.

Jansen et al. (1995) inseriram um cimento bifásico composto por 85% de α -TCP e 15% de β -TCP em 16 defeitos cirúrgicos criados em tíbias de cabras. Exames radiográficos e de espectroscopia mostram que após três meses de implantação, o α -TCP foi transformado em hidroxiapatita. Avaliação histológica revelou que a presença do cimento estimulou o crescimento de osso quando comparado com cavidades não preenchidas. Observou-se reabsorção ativa e remodelamento das partículas de cimento, que não promoveu reação inflamatória. Após seis meses da implantação, nenhuma alteração na composição do cimento ocorreu. Todo o material inserido encontrou-se envolvido por tecido ósseo maduro.

2.4.5 Beta fosfato Tricálcico (β -TCP)

O grânulo β -TCP combina a propriedade de solubilidade ativa com a osteocondutividade, sendo que o processo de absorção é exatamente o mesmo que também favorece a neoformação óssea. Por essa razão, essa combinação deve ser chamada de “propriedades biológicas de osteocondutividade”. Com base no seu envolvimento natural na renovação mineral do osso, espera-se a mesma osteocondutividade com materiais de fosfato de cálcio do tipo OCP e CDHA (DRIESENS et al., 1998).

Para Shiratori et al. (2005), qualquer tipo de defeito ósseo envolve a liberação de fatores e indutores de crescimento. O osso é rico em fatores de crescimento, e muitos deles podem ser encontrados no próprio tecido, como: IGF (*insulin like growth factor*), TGF (*transforming growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*), além de alguns fatores de indução óssea, como: osteogenina e BMP (*bone morphogenetic protein*). O β -TCP, por sua vez, é um composto inorgânico, no qual não existem fatores ou indutores de crescimento. Idealmente, o material usado em osteocondução deveria permitir uma deposição direta de osso em sua superfície e ser substituído por tecido ósseo. Isso só seria possível se esse material fosse reabsorvido ou substituído durante a fase de remodelação do processo de reparo ósseo. Por definição, somente materiais bioativos estabelecem ligações químicas com o osso. O β -TCP mostra comparável habilidade osteogênica na presença de células maduras. Os resultados deste estudo

demonstraram que o β -TCP promoveu formação óssea devido a outros fatores, que não a osteoindução. O β -TCP parece contribuir, primeiramente, para a formação de um núcleo de calcificação no interior do defeito e promove osteogênese em torno de si. Depois disso, é reabsorvido e substituído por osso. No entanto, não se observou células fagocitárias, sugerindo que a reabsorção tenha ocorrido por meio de fluidos. Isso acontece devido a uma reabsorção aguda, quando o fluxo sangüíneo se anexa à superfície do material envolvendo-o por tecido de granulação ósseo. Uma lenta reabsorção óssea provavelmente ocorre por células que tenham capacidade fagocitária em um longo período de tempo.

Ohura et al. (1996), em estudo experimental em fêmur de coelhos, relataram a dificuldade em distinguir microscopicamente os grânulos de cimento incorporados ao tecido ósseo do tecido ósseo puro. Após o desaparecimento do cimento, a remodelação do osso neoformado ocorreu em 16 semanas. O volume ósseo na cavidade com grânulos do cimento β -TCP foi mantido, o que não foi observado na cavidade sem o material. Isso sugere que os grânulos que não foram reabsorvidos mantiveram o estímulo à formação óssea.

Kitsugi et al. (1995) analisaram quatro tipos de cerâmicas de fosfato de cálcio: β -pirofosfato de cálcio, β -TCP, hidroxiapatita e fosfato de tetracálcio. Os materiais foram inseridos em perfurações realizadas em tíbias de ratos e observados após 2, 4, 8 semanas e 6 meses após a operação. À análise sob microscopia eletrônica observou-se que a adesão óssea do material na interface material/osso não variou entre as diferentes proporções molares entre o cálcio e o fosfato. Substâncias amorfas, microcristais de forma agulhada foram observados na superfície da cerâmica após duas semanas da operação. As cerâmicas apresentaram direta continuidade com os cristais ósseos após 4 e 8 semanas e 6 meses, ficando menores com o decorrer do tempo. Não foram observadas fibras colágenas na interface material/tecido, nem adesão química ou mecânica entre o tecido ósseo e as cerâmicas.

Segundo informações do fabricante, a utilização da biocerâmica de última geração bifásica micro-macro porosa de β -TCP/HA para preencher e reconstituir espaços e estruturas perdidas, vem demonstrando, cada vez mais, ser um procedimento útil, efetivo, simples e com vantagens importantes, comparada a alternativas com o uso de outros materiais aloplásticos, inclusive de fosfatos de cálcio e materiais orgânicos, e mesmo enxertos autógenos. Seu uso dispõe

previsibilidade, ausência de reações indesejáveis, eliminação de maiores riscos com outras intervenções, com mutilações, morbidade de áreas doadoras, contaminações, perda de volume, maior tempo cirúrgico, além dos riscos de transmissão de doenças infecto-contagiosas, auto-ímmunes e degenerativas. Pelos resultados obtidos no uso desta biocerâmica, avaliados desde 1985, quando seu uso, mesmo em situações mais críticas como grandes osteólises, pseudoartroses, fraturas com significantes perdas de substância, sujeitas a esforços mecânicos, tumores, cistos, osteotomias, fixação de prótese e outras condições ocorrentes na área médica e odontológica, na presença ou não de processos infecciosos e mesmo no tratamento de osteomielites de difícil solução, concluem-se serem efetivos. Esta biocerâmica tem propiciado boa remineralização, boa incorporação e condições fisiológicas com resistência mecânica e anatomia desejável na presença de condições orgânicas mínimas exigíveis e técnicas indicadas, para uma neoformação óssea previsível (EINCOBIO, 2007).

2.4.6 Hidroxiapatita (HA)

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio hidratado que apresenta similaridade com a fase mineral dos tecidos ósseos, sendo um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos. Favorece o crescimento ósseo para os locais em que se encontra, estabelecendo ligações de natureza química entre material e tecido ósseo e permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas. A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipólo, fazendo com que moléculas de água e, também, proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual (SANTOS, 2002).

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi realizado junto ao Programa de Pós-Graduação em CTBMF, da Faculdade de Odontologia da PUCRS, dentro da Linha de Pesquisa Biomateriais. Todos os procedimentos adotados durante as técnicas envolvendo os animais estão de acordo com o que preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, em cumprimento à Constituição do Estado, Lei nº 11.915, artigo 82, inciso IV, de 21 de maio de 2003. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS, protocolado sob o número 0908/07 (ANEXO A) e pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS, sob o registro CEP 07/03730 (ANEXO B).

3.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Esta pesquisa foi desenvolvida dentro do paradigma tradicional quantitativo, classificado como estudo experimental verdadeiro, duplo cego, grupo controle e só pós-teste, com o seguinte delineamento (CAMPBELL e STANLEY, 1979):

R X_{α} O₁ O₂ O₃ O₄ O₅...

R X_{β} O₁ O₂ O₃ O₄ O₅...

R X_c O₁ O₂ O₃ O₄ O₅...

Onde: **R** – Randomizado

O – Observação

X_{α} – α -fosfato tricálcico

$X_{\beta/HA}$ – β -fosfato tricálcico/HA

X_c – Coágulo sanguíneo

3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população foi constituída por 50 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, machos, adultos, com peso corporal médio de 300 a 400g.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 25 animais: **Grupo- α -TCP** e **Grupo- β -TCP/HA**. Na calota craniana de cada animal, foram confeccionadas duas cavidades. A cavidade esquerda de cada calota foi preenchida pelo cimento ou grânulo de fosfato de cálcio correspondente, de acordo com o grupo experimental α -TCP ou β -TCP/HA, enquanto a cavidade direita de ambos os grupos não recebeu material, sendo preenchida por coágulo sangüíneo autógeno, correspondendo ao **Grupo Controle**. O reparo ósseo foi observado de acordo com o período de morte dos animais: 7, 21, 60, 90 e 120 dias após o procedimento cirúrgico (Quadro 01).

| Período de observação | Grupo α | Grupo β |
|-----------------------|----------------|---------------|
| 7 dias | 5 ratos | 5 ratos |
| 21 dias | 5 ratos | 5 ratos |
| 60 dias | 5 ratos | 5 ratos |
| 90 dias | 5 ratos | 5 ratos |
| 120 dias | 5 ratos | 5 ratos |

Quadro 01 – Distribuição da população de acordo com o grupo experimental e com o período de morte do animal.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério da Faculdade de Biociências da PUCRS. Após a pesagem em balança de precisão, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina¹ 50 mg/Kg (0,05 ml/100 g) e Cloridrato de Xilazina² 5 mg/Kg (0,025 ml/100 g), por via intramuscular. Os ratos foram tricotomizados, com auxílio de aparador elétrico de pêlos³, na região superior da cabeça, compreendida entre os pavilhões auriculares externos.

A anti-sepsia da região tricotomizada, incluindo a pelagem em torno dessa área, foi realizada com digluconato de clorexidina a 2%, seguida pela colocação de um campo cirúrgico de TNT, fenestrado, estéril, com dimensões de 20 X 20 cm,

¹ Dopalen[®], Agribbrands Brasil Ltda, www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Dopalen.pdf

² Anasedan[®], Agribbrands Brasil Ltda, www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Anasedan_Pet.pdf

³ Aparador Elétrico de Barba e Bigode. Panasonic[®] - ER389K

confeccionado para expor a cabeça do animal e cobrir o restante do corpo, como barreira para controle de infecção. O procedimento cirúrgico ocorreu de forma independente, sobre uma bancada coberta com campo cirúrgico estéril descartável e com troca de material cirúrgico para cada espécime. Foi utilizado como anestesia local Cloridrato de Lidocaína a 2% com Norepinefrina 1:50.000⁴, sob infiltração anestésica subcutânea, com finalidade de hemostasia e analgesia trans-operatória adicional, além de controle de dor no pós-operatório imediato.

Após infiltração anestésica, foi realizada uma incisão coronal linear, com lâmina de bisturi n.º15, montada em cabo de bisturi Bard Parker n.º3, medindo cerca de 1,5 cm de extensão, compreendida entre as orelhas, sempre com apoio em base óssea. Após esse procedimento, o perióstio foi divulsionado com descolador de Molt e afastado juntamente com os demais tecidos, expondo a superfície externa da calota craniana. Com auxílio de uma seringa descartável de 20 ml, irrigou-se a região com soro fisiológico a 0,9%, secando-se posteriormente com gaze estéril (Figura 1).

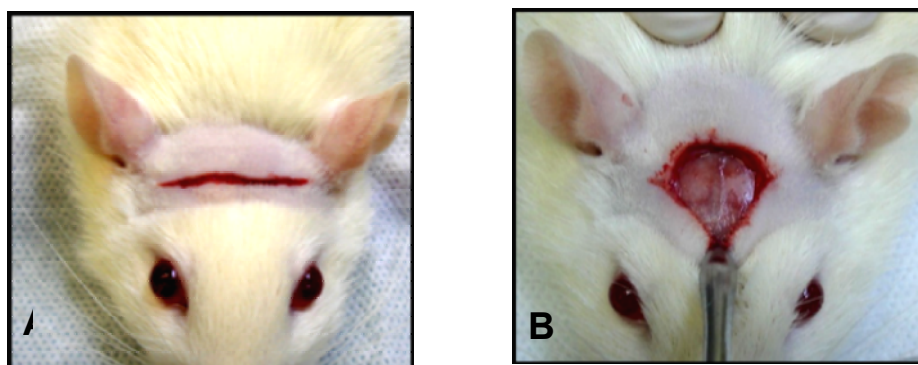


Fig 1. A) Incisão dermo-periosteal. B) Descolamento do perióstio e exposição da calota.
FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

Os locais de confecção das cavidades foram demarcados com o auxílio de uma sonda exploradora, preservando a sutura sagital mediana. As duas cavidades, direita e esquerda, foram distribuídas lateralmente à sutura sagital mediana, nos ossos parietais, com distância de 4 mm entre si, medida com o auxílio de um compasso cirúrgico analógico⁵. Estes defeitos ósseos foram confeccionadas com o auxílio de um motor elétrico em baixa rotação e brocas cilíndricas multilaminadas

⁴ Probem[®] – Lidostesim 2%

⁵ Compasso cirúrgico analógico Quinelato[®], www.quinelato.com.br/odonto/imagens/compasso1.gif

com diâmetro de 4 mm, correspondente ao tamanho dos defeitos ósseos criados (Figura 2).

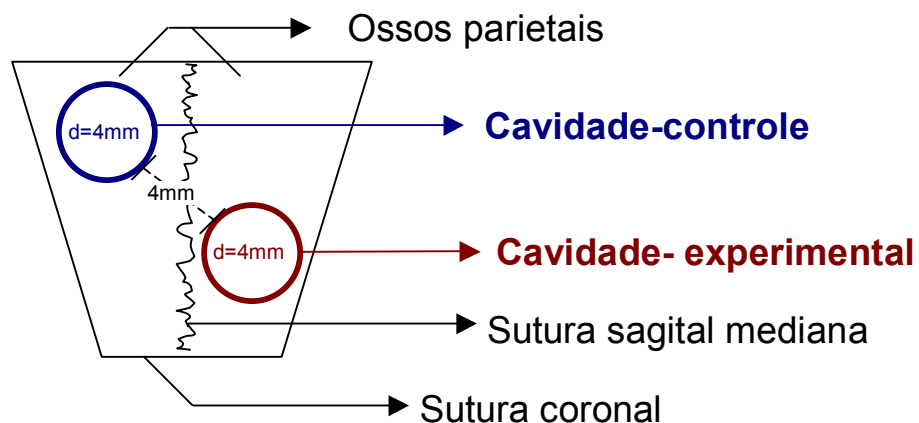


Fig. 2. Representação esquemática da calota craniana do rato. Defeitos ósseos (cavidade Experimental e cavidade Controle), confeccionados nos ossos parietais.
FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

A broca foi pressionada levemente com movimentos intermitentes no sentido superoinferior, permitindo a confecção do defeito ósseo, com rompimento das corticais externa e interna da calota craniana, sem lesar as meninges. Após a confecção das cavidades, essas foram irrigadas abundantemente com solução fisiológica para remoção dos resíduos gerados no processo de confecção dos defeitos e secadas com gaze estéril. Procedendo-se com a inserção de α -TCP ou β -TCP/HA nas cavidades do lado esquerdo, em seu respectivo grupo experimental. Os materiais foram inseridos com auxílio da cureta alveolar de Lucas. As cavidades-controle foram confeccionadas no lado direito da calota, da mesma forma que as experimentais, porém sem a inserção de material, sendo preenchidas por coágulo (Figura 3).

O cimento α -TCP utilizado nesta pesquisa foi sintetizado pelo Labiomat–Laboratório de Biomateriais, da Faculdade de Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Figura 4). Conforme recomendação do fabricante⁶, (SANTOS, 2002) foi adicionada solução contendo acelerador (2,5% de Na_2HPO_4) ao pó (constituído por 75% de α -TCP e 15% de sulfato de Ca hemiidratado) até obtenção da consistência de cimento, sendo então, inserido na cavidade experimental- α .

⁶ Labiomat, disponível em www.ufrgs.br/engmat/laboratorios.htm



Fig. 3. A) Defeitos confeccionados na calota craniana. **B)** Cimento α -TCP inserido na cavidade experimental. **C)** Grânulos β -TCP/HA inseridos na cavidade experimental.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.



Fig. 4. Solução aceleradora e pó do cimento α -TCP.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.



Fig. 5 A e B: β -TCP/HA da marca Osteosynt®.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

No Grupo- β -TCP/HA, a cavidade esquerda foi preenchida com biocerâmica Osteosynt®, produzido pela EINCO Biomaterial Ltda.⁷, em forma de grânulos porosos, com dimensões de 60-80 mesh, constituída por 65% de HA e 35% de β -TCP (Figura 5). O material foi inserido na cavidade experimental β , onde se misturou com sangue presente na loja cirúrgica, de acordo com informações do fabricante (ENCOBIO, 2007).

Os tecidos moles foram reposicionados, cuidando para que o periósteo recobrisse as cavidades, e o couro cabeludo suturado com fio nylon 5-0⁸, com pontos simples interrompidos, com o auxílio de um porta-agulha Mayo Hegar e uma pinça Adson Brown. A região foi limpa com gaze umedecida em soro fisiológico, para remoção dos resíduos de sangue, e os animais foram colocados na posição de decúbito ventral em suas gaiolas correspondentes para recuperação da anestesia. O

⁷ EINCO Biomaterial Ltda, Belo Horizonte-MG, Brasil. www.eincobio.com.br

⁸ Mononylon® Somerville SA

controle da dor pós-operatória foi realizado com Paracetamol⁹ gotas injetado no músculo da pata traseira, imediatamente após o término do procedimento e após 12 horas.

3.5 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS OPERATÓRIAS

Após o período de observação pós-operatório previsto para cada grupo, os animais foram mortos por meio de inalação em câmara de isofluorano.

Para obtenção da peça operatória foi realizada uma incisão na região mais posterior dos tecidos moles da cabeça, com de lâmina de bisturi n.º15, montada em cabo Bard-Parker n.º3, com o intuito de não danificar a região óssea de interesse. O tecido mole da sobre a calota craniana foi removido com o auxílio de tesoura Metzenbaum e pinça Adson Brown, promovendo uma ampla visualização da calota, incluindo os ossos parietais. Procedeu-se com a remoção da calota craniana por meio de osteotomia, utilizando-se um disco diamantado em baixa rotação e sob irrigação constante de solução fisiológica a 0,9%. A linha de osteotomia respeitou uma distância de 4 a 5 mm da área dos defeitos. Realizadas as quatro linhas de osteotomia em torno dos defeitos ósseos, removeu-se a calota com o auxílio de um descolador de Molt e uma pinça Adson Brown.

Após exame macroscópico local, as peças operatórias foram imediatamente armazenadas em recipientes plásticos, com a finalidade de evitar as alterações *post mortem* dos tecidos. Este material identificado foi mergulhado em formalina neutra tamponada a 10%, para fixação e conservação.

Os animais foram descartados em sacos plásticos e enviados para incineração, conforme protocolo do Biotério da Faculdade de Biociências da PUCRS.

3.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA - HISTOMORFOMETRIA

Após fixação em formol por um período superior a 24 horas e inferior a 72 horas, iniciou-se a etapa de confecção e análise das lâminas histológicas, realizada no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS. As peças foram descalcificadas em solução de ácido nítrico a 5% (10ml) durante aproximadamente 72 horas, seguindo-se a sua desidratação, em concentrações sucessivas de álcool (de 80% até 100%). Os defeitos foram separados entre si e

9 Tylenol® JANSSEN-CILAG Farmacêutica.

divididos ao meio (Figura 6); foi realizado o processamento histológico de rotina para confecção das lâminas, sendo incluídas em parafina, divididas em secções com 6µm de espessura em micrótomo¹⁰ a partir do maior diâmetro do defeito, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e observadas em microscópio¹¹ óptico de luz. As lâminas foram codificadas de modo que o observador não teve conhecimento sobre a que grupo pertenciam.

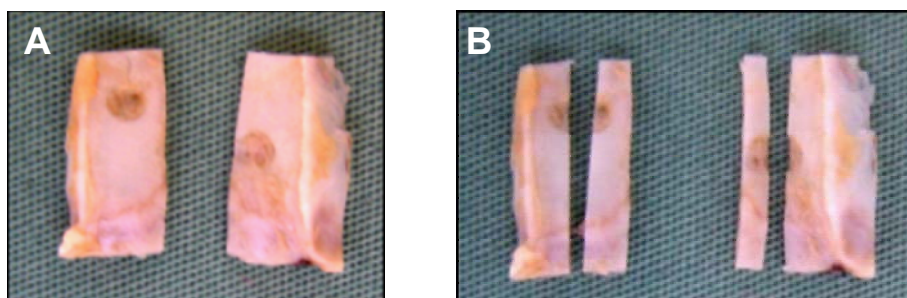


Fig. 6. Preparo das peças para inserção em parafina. **A)** Corte longitudinal separando as cavidades entre si. **B)** Corte longitudinal dos defeitos ao longo de seus maiores diâmetros.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

A avaliação foi realizada pela mesma examinadora, previamente calibrada. Para calibração, supervisionada por Patologista experiente, a cada 20 lâminas observadas, a examinadora repetia a observação de 10 lâminas, comparando as medidas obtidas entre ambas as observações e aplicando o teste *Kappa* intraexaminador a fim de verificar a veracidade das medidas. Para quantificar o grau de concordância para os resultados dos testes *Kappa* aplicados, utilizou-se a porcentagem de concordância recomendados por Landis e Koch (1977), em que foram aceitos apenas os seguintes valores: 0,61 a 0,80, representando importante concordância, e 0,81 a 1,0, representando quase concordância completa (SIEGEL, 1975). Caso essas concordâncias não fossem obtidas, a análise das lâminas era repetida.

As imagens histológicas em aumento de 40X foram capturadas do microscópio pelo computador, de modo que as lâminas foram analisadas por meio do programa *Image Pro Plus*, versão 6.2®¹² (Figura 7). Esse programa permitiu a tomada da medida da área total e da área de neoformação óssea de cada defeito,

10 Micrótomo Leica – Jung RM 2055.

11 Microscópio Olympus BX 50.

12 Media Cybernetics, USA.

sendo que a medida em micrometros da área de neoformação óssea foi transferida para um valor percentual da medida da área total do defeito. O programa não permite apresentar a imagem do defeito em sua totalidade, portanto, as imagens foram analisadas em três ou quatro partes (Figura 8).

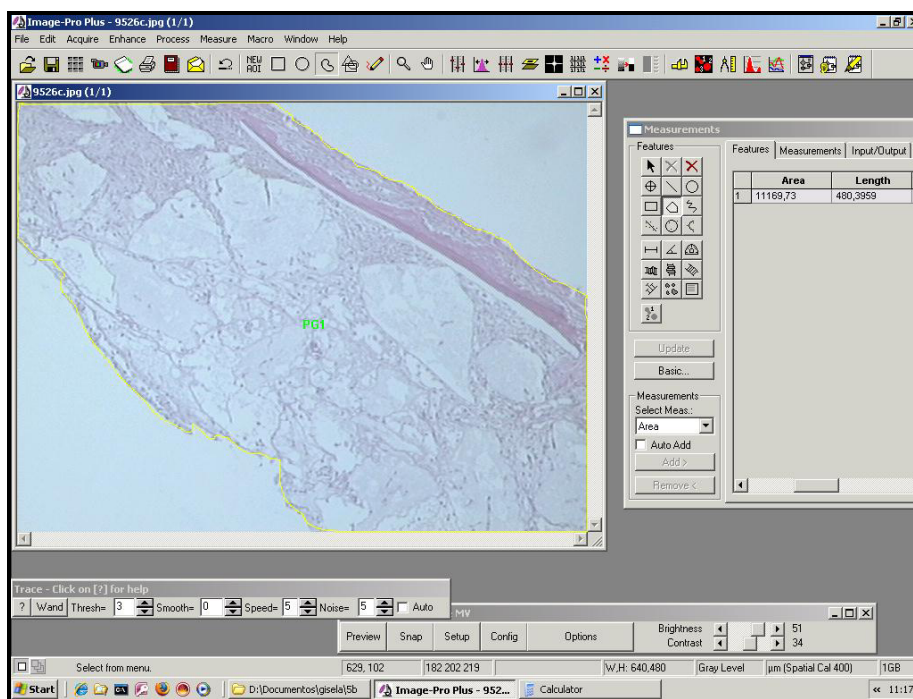


Fig. 7. Programa Image ProPlus®, usado para medir área do defeito (circundada pela linha amarela) e neoformação óssea.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

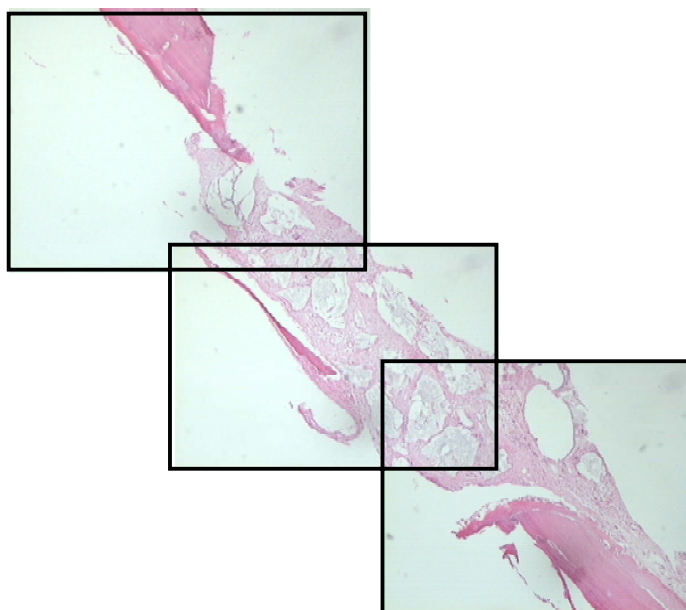


Fig. 8. Montagem das diferentes imagens da mesma lâmina, obtidas pelo Image ProPlus®.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

Os valores foram registrados em ficha de coleta de dados, elaborada especificamente para este fim (APÊNDICE A).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizando ferramentas do programa Image Pro Plus 6.2®, obteve-se a medida da área total do defeito ósseo e a área de neoformação óssea, calculando a porcentagem de osso neoformado presente em cada defeito.

Na comparação entre os grupos: experimental X controle e experimental X experimental, os valores percentuais das áreas de neoformação óssea foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão), sendo apresentada sob a forma de tabelas e gráficos. Foi utilizado o teste de comparações de médias *t* Student, adotando um nível de significância de 0,05. O teste *t* compara dois grupos, calcula a diferença entre cada conjunto de pares e analisa se estas diferenças são significativas (ARANGO, 2001; MOTTA e WAGNER, 2003).

Para processamento e análise dos dados, foi utilizado o *software* estatístico SPSS®, versão 10.0¹³, no sistema operacional Microsoft Windows.

13 SPSS – Statistic Packet of Social Science. Produzido por SPSS® Inc. Chicago. www.spss.com.

4 RESULTADOS

4.1 DESCRIÇÃO DA OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA DOS DEFEITOS ÓSSEOS

Após a morte dos animais e a remoção de suas calotas cranianas, foi possível observar macroscopicamente o padrão de ossificação dos defeitos ósseos, em cada período de observação, e comparar os grupos experimentais com o grupo controle, de forma descritiva, como segue.

4.1.1 Análise macroscópica – 7 dias

Aos 7 dias de observação, tanto no grupo α -TCP quanto no grupo β -TCP/HA, nota-se tecido mole no interior da cavidade controle e presença de material no interior do defeito experimental. Áreas de ossificação não foram constatadas macroscopicamente (figura 9)

4.1.2 Análise macroscópica – 21 dias

Neste período de observação, em ambos os grupos, α -TCP e β -TCP/HA, percebe-se redução no tamanho do defeito nas cavidades controle e presença de tecido mole no seu interior. Nota-se ainda, em muitos espécimes, presença de material no interior do defeito experimental (figura 10).

4.1.3 Análise macroscópica – 60 dias

Na figura 11 é possível perceber formação de tecido ósseo no interior das cavidades experimentais, em ambos os grupos. No grupo α -TCP, defeito ósseo

apresenta-se com aspecto mais semelhante ao tecido ósseo adjacente. No grupo β -TCP/HA, é mais evidente a presença de fosfato de cálcio no interior da cavidade experimental. Apesar de se mostrarem mais evidentes do que as cavidades experimentais, as cavidades-controle apresentam diâmetro mais reduzido.

4.1.4 Análise macroscópica – 90 dias

Em ambas as cavidades experimentais, os defeitos mostram grande quantidade de osso neoformado, estando marcadamente mais discretos do que os defeitos controle. Ainda é mais perceptível a presença de grânulos no grupo β -TCP/HA do que cimento no grupo α -TCP. As cavidades controle ainda estavam aparentes, no entanto menores do que nos períodos de observação anteriores (figura 12).

4.1.5 Análise macroscópica – 120 dias

Em alguns espécimes, tanto do grupo α -TCP quanto do grupo β -TCP/HA, as cavidades experimentais estavam imperceptíveis a olho nu, enquanto os seus controles permaneciam evidentes, embora com dimensões reduzidas. Em nenhum dos grupos foi observada a presença de material no interior das cavidades experimentais, neste período de observação (figura 13).

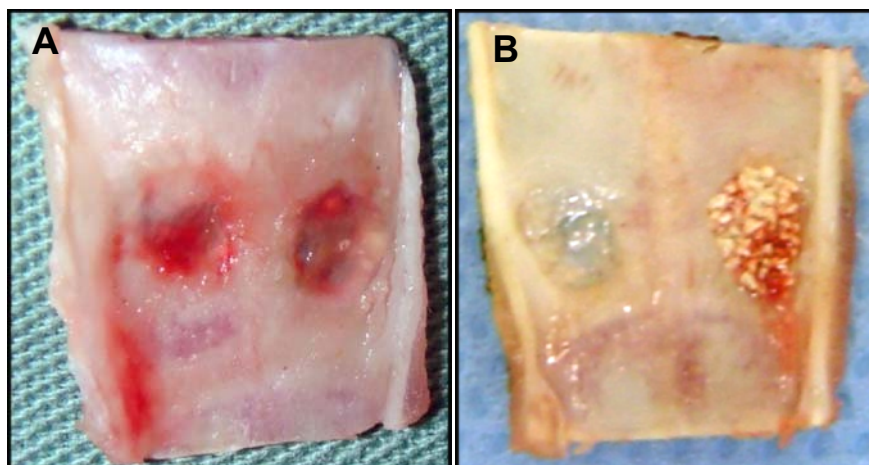


Fig. 09: Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) - 7 dias. Na cavidade esquerda, observa-se presença de material e, na cavidade direita, tecido mole em seu interior, em ambos os grupos.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

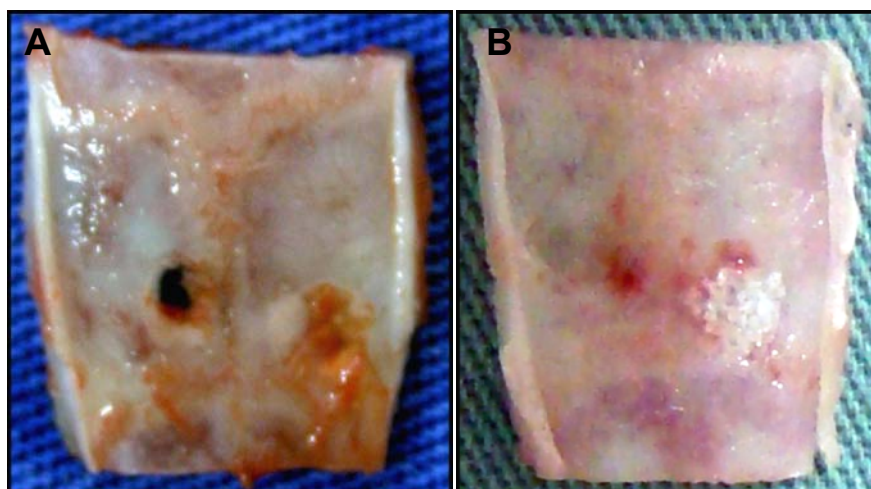


Fig. 10: Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) - 21 dias. Nas cavidades experimentais observa-se presença de material, em ambos os grupos.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

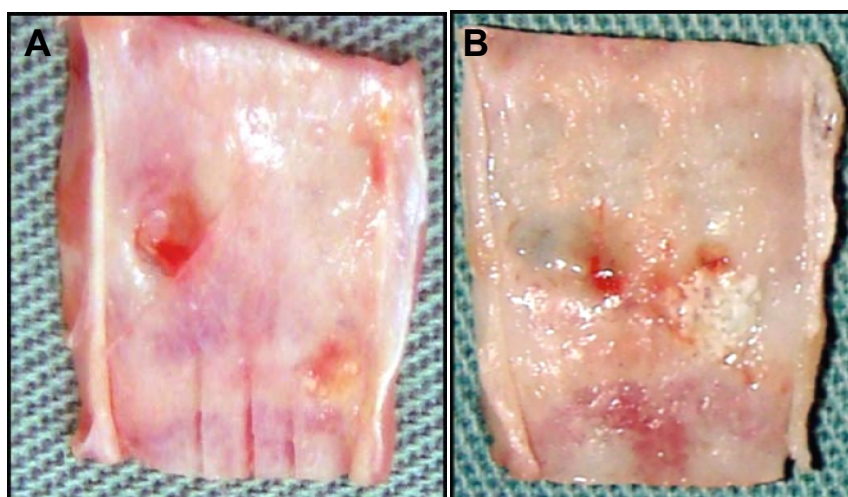


Fig. 11: Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) - 60 dias. Nas cavidades experimentais, observa-se formação de tecido ósseo e presença de grânulos mais evidentes no grupo β -TCP/HA.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

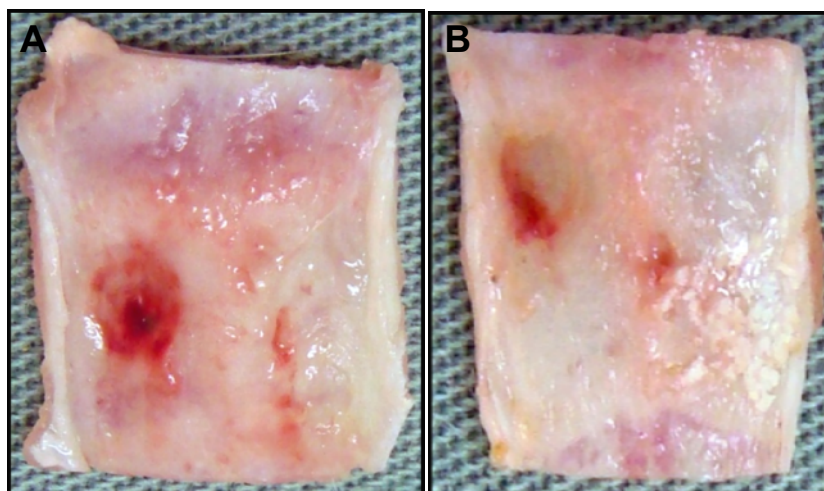


Fig. 12: Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) - 90 dias.

Em ambos os grupos, a cavidade esquerda mostra grande área de neoformação óssea. As cavidades controle ainda estavam aparentes, porém em diâmetro reduzido.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

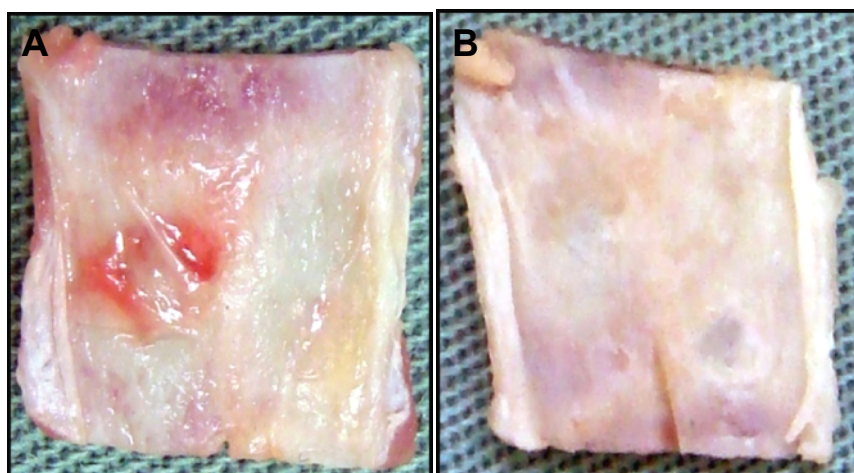


Fig. 13: Peças operatórias dos grupos α -TCP (A) e β -TCP/HA (B) – 120 dias. As cavidades experimentais estão imperceptíveis e as cavidades controle pouco evidentes.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

4.2 RESULTADOS DA HISTOMORFOMETRIA – GRUPOS EXPERIMENTAIS X GRUPO CONTROLE (COÁGULO SANGÜÍNEO)

4.2.1 Grupo α -TCP X Coágulo Sangüíneo

Comparando-se o grupo α -TCP com o grupo controle (coágulo sangüíneo), nota-se maior área de neoformação óssea no grupo experimental (tabela 1 e gráfico

1). Aos 7 dias, a média de osso neoformado no grupo α -TCP foi de 1,06% , enquanto que no grupo controle a média de osso neoformado foi igual a 0,15%.

No 21° dia de observação, a média do grupo α -TCP foi de 5,24% de osso neoformado, sendo que no grupo controle houve uma média de 10,12%.

Aos 60 dias, os valores são superiores no grupo experimental em relação ao grupo controle, sendo a média de neoformação óssea no grupo α -TCP de 24% , e no grupo controle de 15,10%.

Observa-se que, aos 90 dias, houve um aumento significativo da neoformação óssea no grupo α -TCP, apresentando valores médios de 30,32%, enquanto o grupo controle demonstrou um leve aumento na quantidade de osso, perfazendo um valor médio de 18,94%, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Aos 120 dias, os valores médios de área de neoformação óssea foram próximos entre o grupo α -TCP e o grupo controle, apresentando 50,59% e 48,50%, respectivamente, não representando diferença significativa estatisticamente.

Tabela 1: Comparação da área de neoformação óssea (média e desvio padrão), entre o grupo α -TCP e o grupo controle (coágulo sanguíneo), de acordo com os períodos de observação.

| Período de Observação | Grupo α | | Coágulo sanguíneo | | p |
|-----------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| | Média (%) | Desvio Padrão (%) | Média (%) | Desvio Padrão (%) | |
| 7 dias | 1,06 | 2,37 | 0,15 | 0,33 | 0,444 |
| 21 dias | 5,24 | 3,36 | 10,12 | 8,01 | 0,061 |
| 60 dias | 24 | 14,5 | 15,10 | 11,70 | 0,275 |
| 90 dias | 30,32 | 6,94 | 18,94 | 8,58 | 0,022* |
| 120 dias | 50,59 | 5,42 | 48,50 | 14,40 | 0,688 |

*Apresenta diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

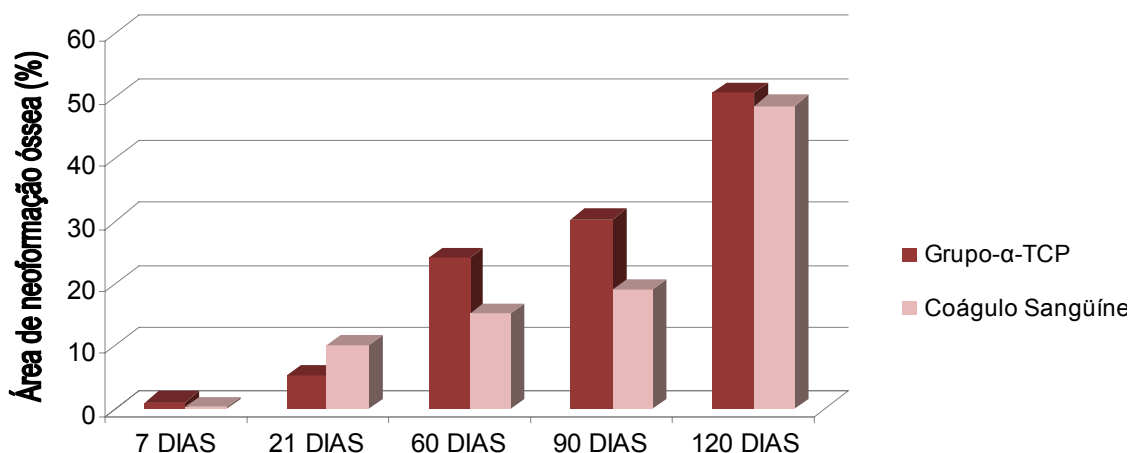


Gráfico 1: Comparação da área de neoformação óssea (em %) entre o grupo α -TCP e o grupo controle (coágulo sangüíneo).

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia - CTBMF – FO/PUCRS, 2007.

4.2.2 Grupo β -TCP/HA X Coágulo sangüíneo

Os resultados expressos na tabela 2 e no gráfico 2 demonstram que, no 7º dia de observação, o grupo β -TCP/HA apresentou uma média de 1,94% de área de neoformação óssea, enquanto a cavidade contendo coágulo sangüíneo apresentou apenas 0,15% de osso neoformado.

Aos 21 dias, observa-se aumento de neoformação óssea em ambos os grupos, sendo mais significativo no grupo controle, que expressa 10,12% de área óssea no interior da cavidade, ao passo que o grupo experimental β -TCP/HA revela média de 2,53%.

Aos 60 dias, as áreas de osso neoformado evoluíram para os valores médios de 12,47% para o grupo experimental e 15,10% para o grupo controle.

No 90º dia de experimento, a neoformação óssea foi mais lenta no grupo controle, que apresentou valores médios de 18,94%, comparado a 26,84% de osso neoformado demonstrado pelo grupo β -TCP/HA.

Ao final do período do experimento, aos 120 dias, as cavidades contendo coágulo sangüíneo apresentaram maior área de neoformação óssea do que o grupo β -TCP/HA, revelando médias de 48,50% e 38,82%, respectivamente.

Tabela 2: Comparação da área de neoformação óssea (média e desvio padrão), entre o grupo β -TCP/HA e o grupo controle (coágulo sangüíneo), de acordo com os períodos de observação.

| Período de Observação | Grupo β | | Coágulo sangüíneo | | p |
|-----------------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| | Média (%) | Desvio Padrão (%) | Média (%) | Desvio Padrão (%) | |
| 7 dias | 1,94 | 3,10 | 0,15 | 0,33 | 0,269 |
| 21 dias | 2,53 | 1,19 | 10,12 | 8,01 | 0,017* |
| 60 dias | 12,47 | 3,87 | 15,10 | 11,70 | 0,535 |
| 90 dias | 26,84 | 2,8 | 18,94 | 8,58 | 0,021* |
| 120 dias | 38,82 | 8,76 | 48,50 | 14,40 | 0,134 |

*Apresenta diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

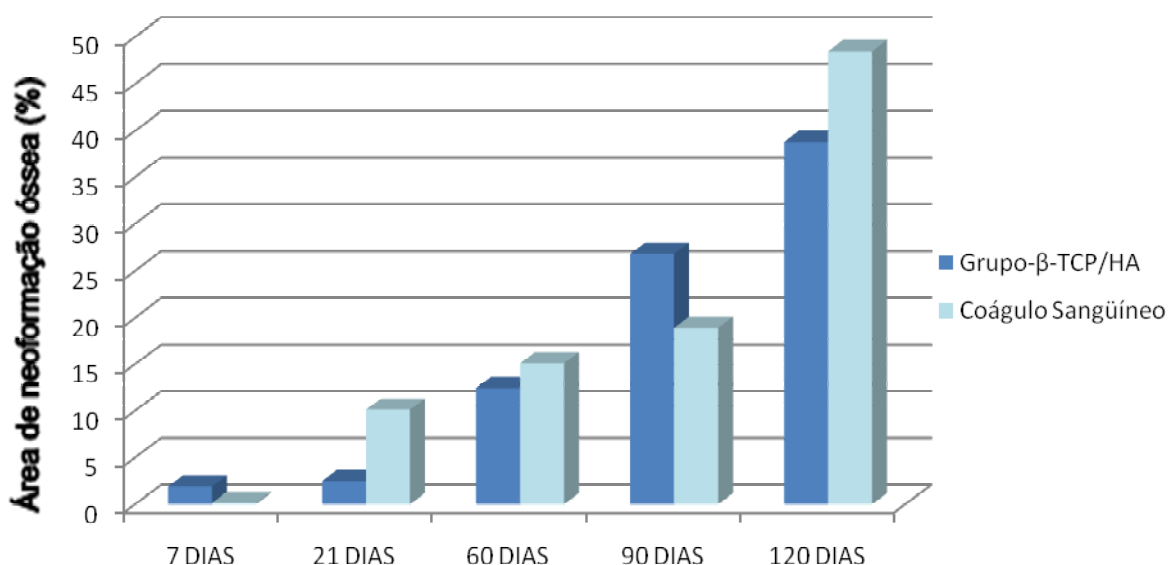


Gráfico 2: Comparação da área de neoformação óssea (em %) entre o grupo β -TCP/HA e o grupo controle (coágulo sangüíneo).

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia - CTBMF – FO/PUCRS, 2007.

4.3 RESULTADOS DA HISTOMORFOMETRIA – GRUPO α -TCP X GRUPO β -TCP/HA

Os resultados da comparação do reparo ósseo entre os grupos experimentais α -TCP e β -TCP/HA estão representados na tabela 3 e no gráfico 3.

Tabela 3: Comparação da área de neoformação óssea (média e desvio padrão) entre os grupos experimentais α -TCP e β -TCP/HA, de acordo com os períodos de observação.

| Período de Observação | Grupo α | | Grupo β | | p |
|-----------------------|----------------|-------------------|---------------|-------------------|--------|
| | Média (%) | Desvio Padrão (%) | Média (%) | Desvio Padrão (%) | |
| 7 dias | 1,06 | 2,37 | 1,94 | 3,10 | 0,629 |
| 21 dias | 5,24 | 5,58 | 2,53 | 1,19 | 0,004* |
| 60 dias | 24 | 14,5 | 12,47 | 3,87 | 0,159 |
| 90 dias | 30,32 | 6,84 | 26,84 | 2,8 | 0,354 |
| 120 dias | 50,59 | 5,42 | 38,82 | 8,76 | 0,043* |

*Apresenta diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

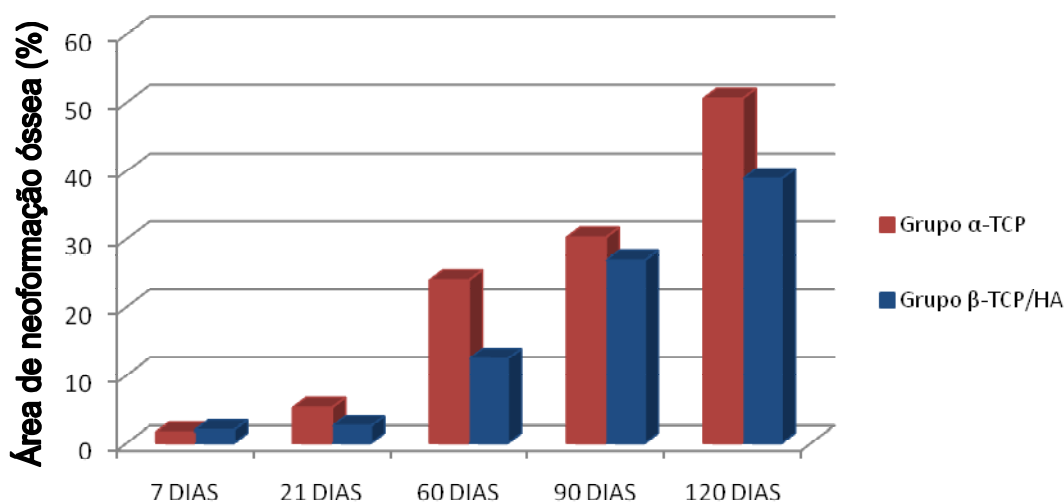


Gráfico 3 Comparação da área de neoformação óssea (em %) entre os grupos α -TCP e β -TCP/HA, nos diferentes períodos de observação.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

4.3.1 Grupo- α -TCP X Grupo- β -TCP/HA - 7 dias

Comparando-se os grupos α -TCP e β -TCP/HA, aos 7 dias, observa-se uma média de neoformação óssea de 1,06% e 1,94%, respectivamente. Esta diferença não foi estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$ (tabela 3).

Células do infiltrado inflamatório estiveram presentes em ambos os grupos experimentais α -TCP (Figura 14) e β -TCP/HA (Figura 15), onde também se observou tecido conjuntivo frouxo. Nos cortes histológicos podem ser observados os

limites dos defeitos ósseos, assim como é perceptível a presença de material em seu interior.

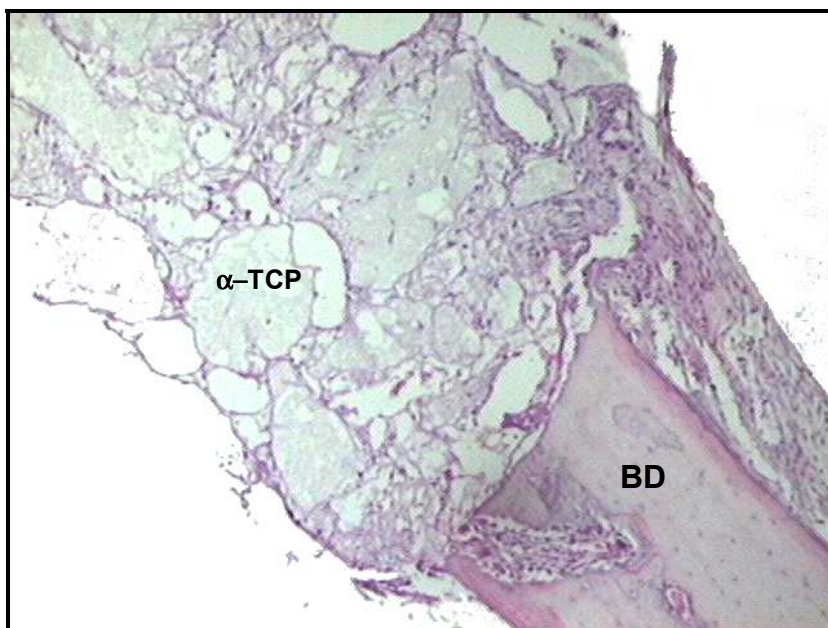


Fig. 14: Grupo α -TCP, 7 dias. Defeito ósseo contendo cimento em seu interior. BD – borda do defeito. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

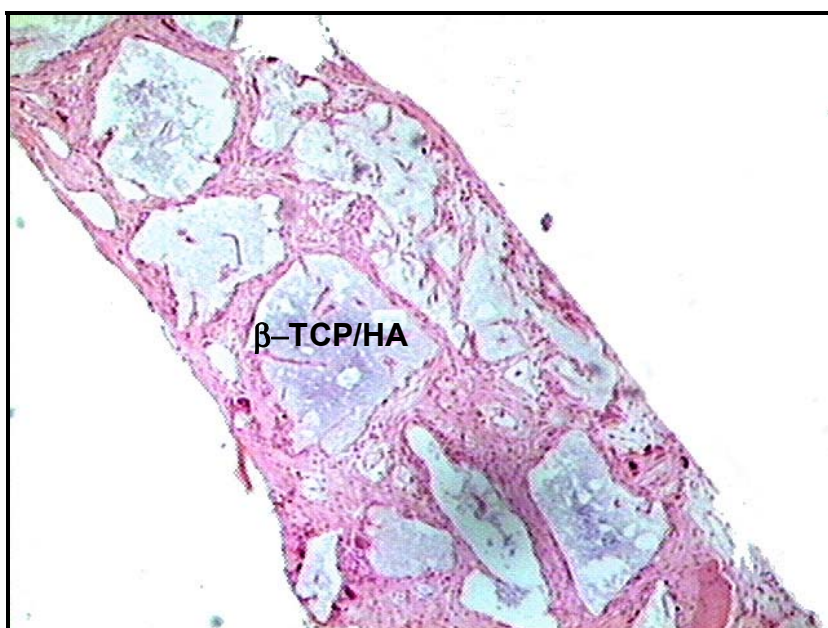


Fig. 15: Grupo β -TCP/HA, 7 dias. Áreas de grânulos envolvidas por tecido conjuntivo. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

4.3.2 Grupo- α -TCP X Grupo- β -TCP/HA - 21 dias

Os grupos α -TCP e β -TCP/HA, no pós-operatório de 21 dias, apresentam média de 5,24% e 2,53% de neoformação óssea, respectivamente. Esta diferença é estatisticamente significativa, conforme demonstra a tabela 3. O padrão do tecido conjuntivo é mais organizado, havendo linhas de tecido ósseo imaturo em torno das

áreas de material em ambos os grupos. As figuras 16 e 17 ilustram o processo de reparo, em cada um dos grupos.

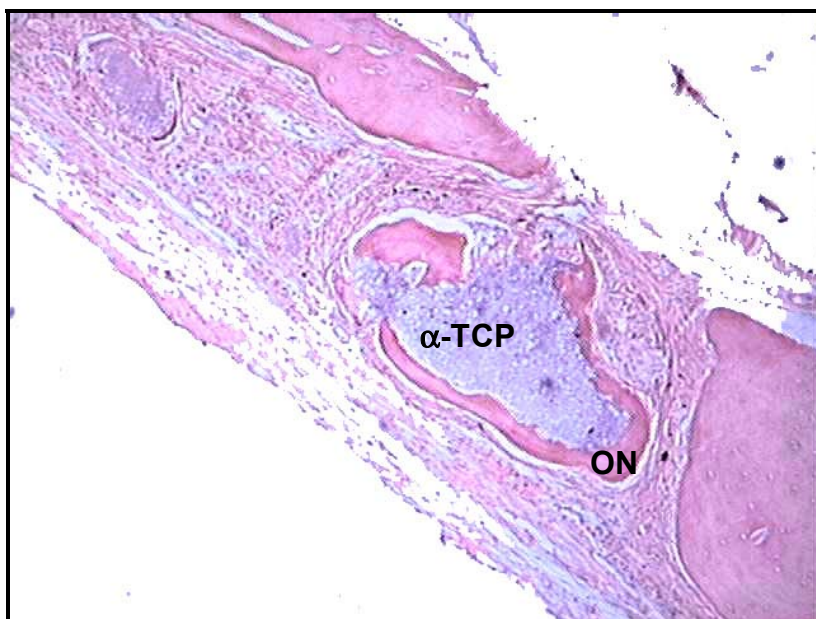


Fig. 16: Grupo α , 21 dias. Área de tecido ósseo imaturo em torno de área de cimento. ON – osso neoformado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

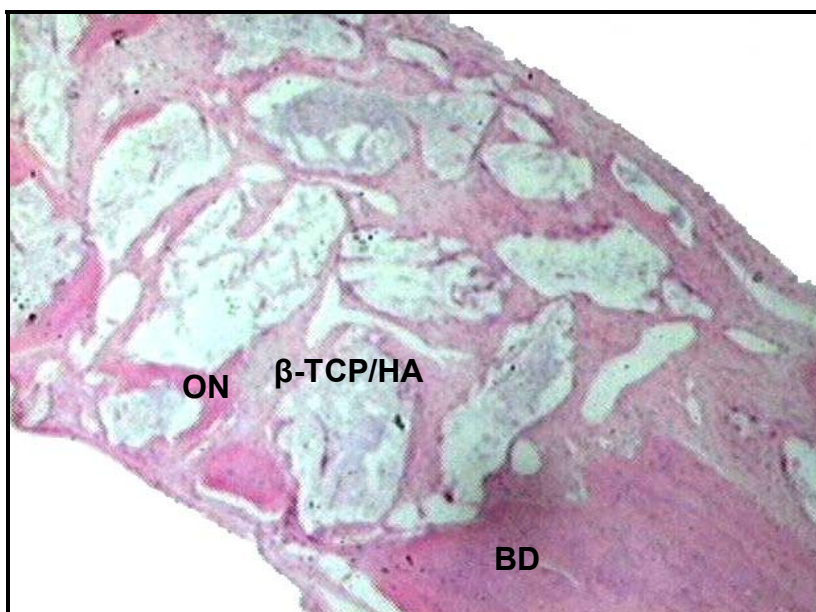


Fig. 17: Grupo β -TCP/HA, 21 dias. Borda do defeito ósseo, várias áreas de grânulos circundadas por tecido celular e osso neoformado. BD – borda do defeito ósseo. ON – osso neoformado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

4.3.3 Grupo- α -TCP X Grupo- β -TCP/HA - 60 dias

Aos 60 dias de observação, o grupo α -TCP apresentou média de 24% de área de neoformação óssea nos defeitos críticos, enquanto o grupo β -TCP/HA apresentou menor área de osso neoformado, média de 12,47%, sem diferença estatisticamente significativa no teste de comparação entre os grupos (tabela 3). Na

figura 18 percebe-se área de neoformação óssea na borda do defeito do grupo α -TCP, enquanto na figura 19, pode-se observar presença de tecido ósseo imaturo em torno das ilhas de β -TCP/HA.

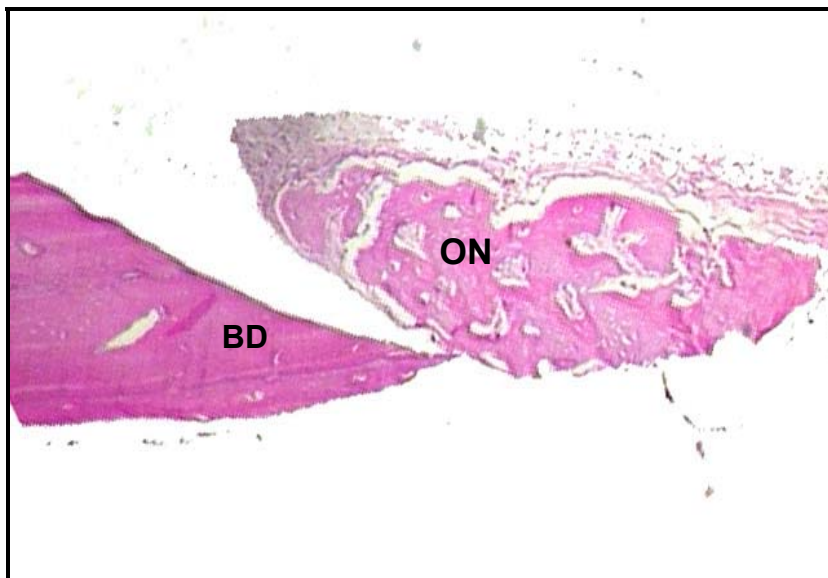


Fig. 18: Grupo α -TCP, 60 dias. Borda do defeito ósseo aparente com região de tecido ósseo neoformado. BD – borda do defeito ósseo. ON – osso neoformado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

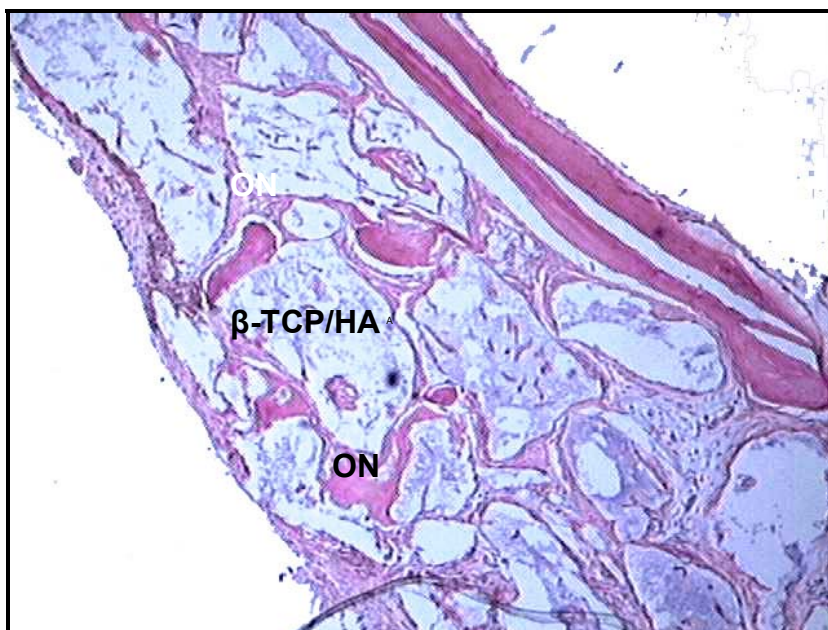


Fig. 19: Grupo β -TCP/HA, 60 dias. Percebe-se áreas de neoformação óssea em meio ao cimento. ON – área de neoformação óssea. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

Já aos 60 dias, percebeu-se maior volume de tecido nos defeitos contendo os grânulos β -TCP/HA, devido à permanência do material do interior do defeito (Figura 20), que se manteve até o último período de observação.

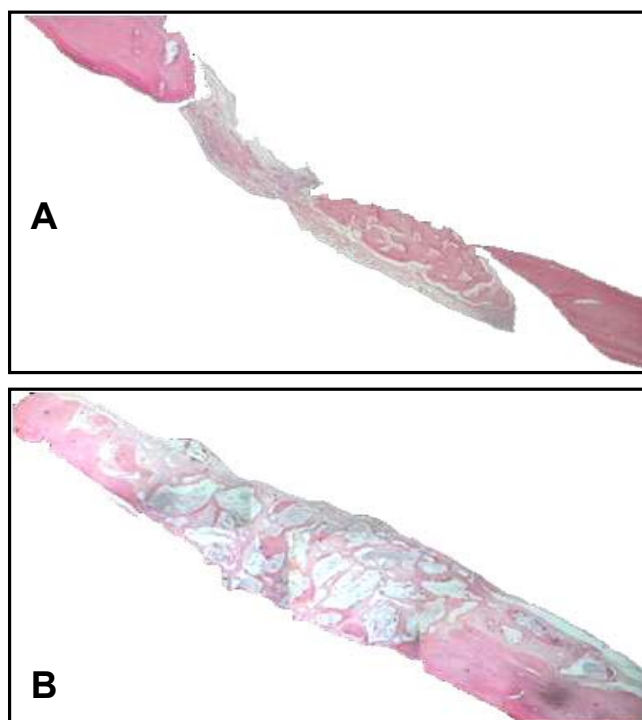


Fig. 20: Análise comparativa do volume de tecido nos defeitos de 60 dias. **A)** Grupo α -TCP: presença de área de neoformação óssea e volume de tecido igual ou menor do que o tamanho do defeito. **B)** Grupo β -TCP/HA: presença de grande quantidade de grânulos no interior do defeito, com volume excedendo o tamanho do defeito.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

4.3.4 Grupo- α -TCP X Grupo- β -TCP/HA - 90 dias

Mensurando-se as áreas de neoformação óssea nos grupos experimentais aos 90 dias de pós-operatório, obteve-se para o grupos α -TCP uma média de 30,21% de osso neoformado e média de 26,84%, para grupo β -TCP/HA, sendo o valor de p igual a 0,354, o que não confere significância estatística (tabela 3).

No grupo α -TCP, percebe-se uma linha de reversão entre a borda do defeito (tecido ósseo maduro) e o tecido ósseo neoformado, que se apresenta mais corado e com maior número de lacunas. Há ilhas de tecido ósseo em meio ao tecido conjuntivo, que já se apresenta organizado (figura 21). No grupo β -TCP/HA, aos 90 dias, existem ilhas de material envolvidas por tecido ósseo imaturo, além de haver área de neoformação óssea nas bordas do defeito (figura 22).

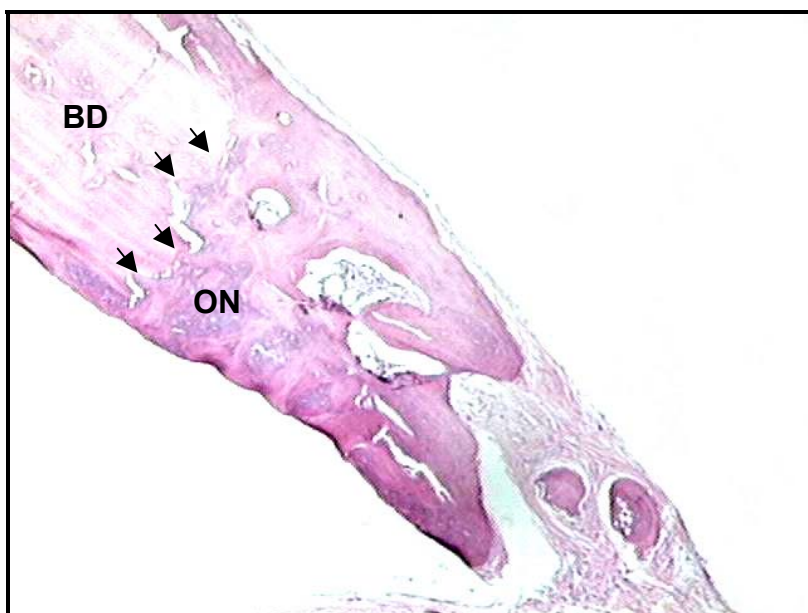


Fig. 21: Grupo α TCP, 90 dias. Maior porcentagem de área de osso neoformado. BD – borda do defeito. ON – área de osso neoformado. Linha de reversão (setas). Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.
FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

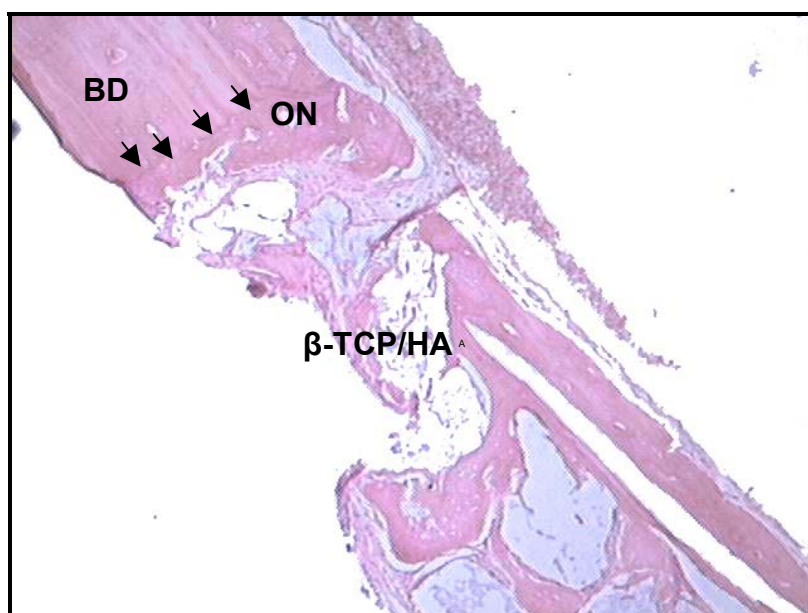


Fig. 22: Grupo β TCP/HA, 90 dias. Grande área de tecido ósseo neoformado entremeada por tecido fibroso e ilhas de cimento. BD – borda do defeito. ON – área de osso neoformado. Linha de reversão (setas). Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.
FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

4.3.5 Grupo- α -TCP X Grupo- β -TCP/HA - 120 dias

Ao final do experimento, aos 120 dias de observação, o grupo α -TCP apresentou uma área média de neoformação óssea igual a 50,59%, maior que o observado no grupo β -TCP/HA, o qual revelou média de 38,82%, com valor de $p=0,043$, representando haver diferença estatística nessa comparação (tabela 3). No grupo α -TCP há predomínio de uma área de tecido ósseo imaturo, a qual pode ser diferenciada das bordas do defeito (tecido maduro) por uma linha irregular (figuras 23). No grupo β -TCP/HA evidenciam-se ilhas de material circundadas por tecido

ósseo neoformado que, por sua vez, também está presente nas bordas do defeito (figura 24).

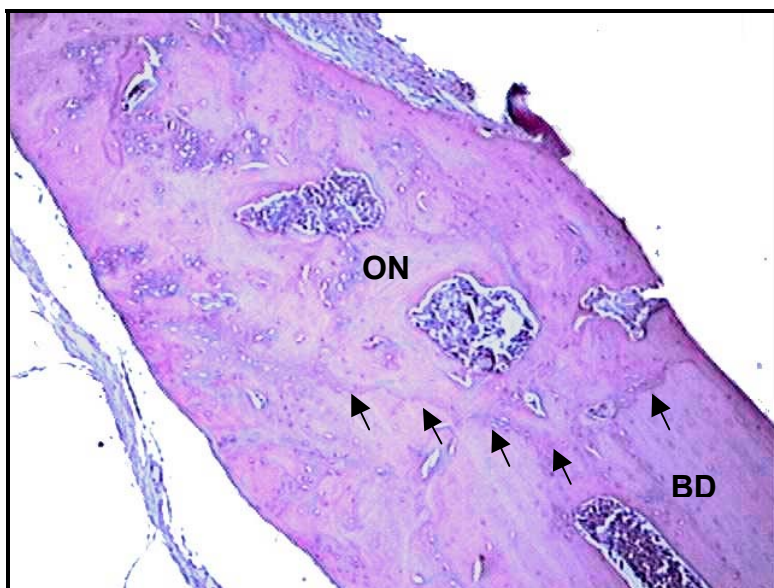


Fig. 23: Grupo α -TCP, 120 dias. Grande área de tecido ósseo confundindo-se com a borda do defeito. BD – borda do defeito. ON – área de neoformação óssea. Linha de reversão (setas). Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

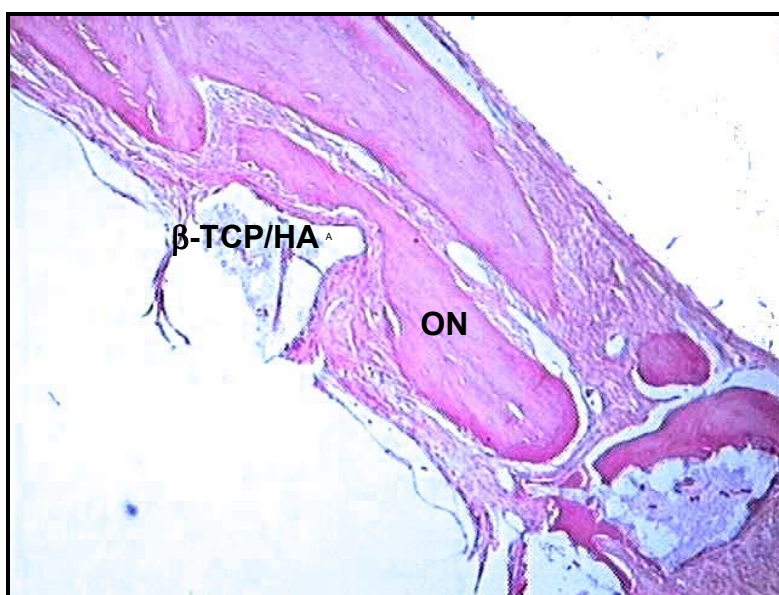


Fig. 24: Grupo β -TCP/HA, 120 dias. Ilhas de osso neoformado entremeadas por áreas de cimento. ON – osso neoformado. Corte histológico corado em HE, observado à microscopia de luz. Aumento de 40X.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF/FOPUCRS, 2007.

4.4 ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA AO LONGO DOS PERÍODOS DE OBSERVAÇÃO

4.4.1 Grupo α -TCP

Comparando os valores de área de neoformação óssea nos defeitos experimentais do grupo α -TCP ao longo dos cinco períodos pré-determinados,

observou-se uma evolução gradual, ou seja, as médias de neoformação óssea aumentaram proporcionalmente com o tempo. A evolução maior foi percebida entre os períodos de 21 e 60 dias e entre 90 e 120 dias (gráfico 4).

4.4.2 Grupo β -TCP/HA

No grupo β -TCP/HA, não foi observado um aumento da neoformação óssea significativo entre 7 e 21 dias. Observou-se uma progressão nos valores da área de formação óssea acentuada no intervalo de 21 a 120 dias (gráfico 4).

4.4.3 Grupo Controle

O grupo controle apresentou evolução nos valores de neoformação óssea no período entre 7 e 21 dias, estabilizou entre 21 e 90 dias e teve seu maior aumento entre 90 e 120 dias.

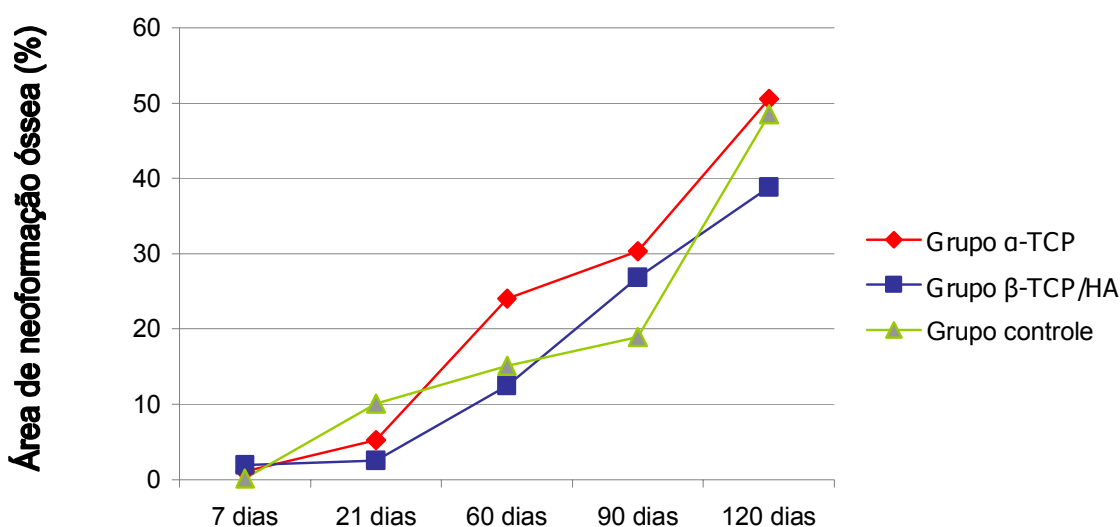


Gráfico 4- Evolução da neoformação óssea nos grupos α -TCP, β -TCP/HA e grupo controle, ao longo dos períodos de observação.

FONTE: Programa de Pós Graduação em Odontologia – CTBMF- FO/PUCRS, 2007.

5 DISCUSSÃO

Diversos biomateriais são constantemente estudados para substituir o tecido ósseo, a fim de fornecer uma alternativa viável para o enxerto autógeno que, apesar de ser o melhor e mais bem aceito substituto ósseo, possui desvantagens, principalmente quanto à morbidade e à quantidade de enxerto disponível. Estes substitutos ósseos devem apresentar propriedades de biocompatibilidade, atoxicidade, resistência à deformação, resistência ou não à reabsorção, conforme a aplicação desejada e, caso sejam reabsorvíveis, devem ser metabolizados pelo organismo ou excretados através de uma via normal fisiológica (OUSTERHOUT e STELNICKI, 1996; VALÉRIO et al., 2004; KNABE et al., 2005).

Mesmo apresentando propriedades de regeneração, o osso pode necessitar de auxílio em várias ocasiões, como nas uniões retardadas, nas não-uniões, em fraturas múltiplas ou cominutivas, nas osteotomias e no preenchimento de cavidades ou defeitos segmentares extensos que não cicatrizam por completo espontaneamente, também chamados defeitos críticos (COOK e REUGER, 1996). Levando em consideração a importância do esqueleto e as condições para sua regeneração, principalmente do esqueleto facial, justifica-se a busca por materiais que preencham falhas dessa estrutura e que conduzam o tecido ósseo a reparar-se.

As biocerâmicas de fosfato de cálcio continuam sendo pesquisadas e, cada vez mais, são utilizadas em procedimentos para reconstrução tecidual. Há uma grande variedade de tipos de fosfato de cálcio ofertados para uso na Odontologia, Medicina e Medicina Veterinária, sendo que suas características e propriedades físico-químicas induzem uma resposta biológica peculiar e, portanto, requerem

indicação e aplicação específicas. Desde o seu surgimento no mercado, as cerâmicas de fosfato de cálcio, especialmente a hidroxiapatita, foram consideradas os materiais por excelência para a remodelação e reconstrução de defeitos ósseos. Essa preferência se deve às suas propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, o que denota que, ao serem inseridas no leito receptor, não induzem resposta imunológica; são capazes de ligar-se diretamente ao tecido ósseo e permitem o crescimento do osso ao longo de sua superfície (LEGEROS, 1998). As características observadas em ambos os fosfatos estudados corroboram com as propriedades conceitualmente necessárias, uma vez que não geraram reação inflamatória exacerbada, não foram encapsulados ou rejeitados pelo organismo e permitiram a osteocondução (KURASHINA, 1995; OHURA, 1996; SANTOS, 2002).

A evolução do fenômeno de osteotransdutividade gerado pelos CFCs depende fortemente do tipo de material, do sítio de implantação e da idade do indivíduo receptor, entre outros fatores (DRIESSENS, 1998). Sabe-se, no entanto, que os CFCs são tão estáveis no organismo que o tempo para serem substituídos por osso é muito longo (FERNÁNDEZ et al., 2005).

No presente estudo foram confeccionadas duas cavidades de 4 mm de diâmetro, conforme preconizado por Mulliken (1980), considerando as dimensões da calota craniana do modelo animal selecionado, observando que no grupo controle os defeitos não repararam em um período de 120 dias de observação (16 semanas), sendo considerado defeito crítico (SCHMITZ e HOLLINGER, 1986).

Os períodos de observação desta pesquisa foram determinados com base nos relatos de Mulliken (1980), Schmitz e Hollinger (1986), Parker (1995) e Marzouk (2007). No intuito de padronização de estudos realizados para obtenção de resultados com relação à osteogênese, Schmitz e Hollinger (1986) determinaram como suficiente, o período de observação de 12 semanas da cicatrização dos defeitos ósseos em calota craniana de ratos. Ainda assim, o presente estudo acompanhou o processo até a 16ª semana, como indica Marzouk (2007), a fim de observar por mais 30 dias o comportamento dos fosfatos de cálcio no processo de reparo ósseo. Testando a interação de CFCs com o tecido ósseo, Kurashina (1997) revelou que, quanto ao período, não houve diferença na quantidade de osso neoformado entre as análises de 12 e 24 semanas, a não ser no seu grau de maturação. Já o estudo em questão observou aumento significativo na área de

neoformação óssea entre os períodos de 12 e 16 semanas em ambos os grupos experimentais, sugerindo que o processo de reparo encontrava-se em evolução.

Acredita-se que a comparação entre o α -TCP e o β -TCP/HA ao longo do tempo é importante, uma vez que permite verificar qual dos materiais gera osteocondução mais rapidamente permitindo obter previsibilidade no manuseio do osso neoformado. O fator tempo é essencial na aplicação clínica dos CFCs em humanos, particularmente em casos de perdas ósseas e dentárias, nas quais o defeito ósseo é preenchido com o intuito de posterior colocação de implantes dentários. Saber o momento ideal da inserção dos implantes sobre esses materiais é essencial para o prognóstico da reabilitação.

A análise histomorfométrica utilizada permitiu detectar a presença de osso no defeito e quantificar o tamanho da área de neoformação. A importância desse tipo de análise é confirmada nos estudos de Marzouk et al. (2007) e Eski et al. (2007), que relatam ser a análise quantitativa essencial para estudos que objetivam avaliar a efetividade de novas modalidades terapêuticas na neoformação óssea.

Os resultados obtidos neste estudo revelam, ao final do experimento, maior quantidade de área de osso neoformado nas cavidades em que o cimento α -TCP foi inserido, apresentando relevância estatística para esses dados. Li et al. (2006) asseguraram ser a solubilidade e/ou índice de absorção do α -TCP maiores que os do β -TCP. Hirakata (2003) questionou a aplicabilidade do α -TCP devido à sua intensa solubilidade, também a considerando mais alta do que a do β -TCP. Quando o cristal de α -TCP é misturado com água, na fase de cimento, demanda mais tempo para realizar sua transformação em hidroxiapatita, portanto, os cristais permanecem no tecido, favorecendo a condução óssea. Talvez essa maior proporção de neoformação óssea encontrada no grupo α -TCP também ocorra no grupo β -TCP/HA em um período de tempo mais prolongado. De acordo com Driessens et al. (1998), os CFCs não atuam como substitutos permanentes do osso, sendo lentamente substituídos por tecido ósseo.

Com relação ao grupo β -TCP/HA, aos 21 dias, a porcentagem média de neoformação óssea foi significativamente maior no grupo controle. Aos 90 dias, a relação entre o grupo β -TCP/HA e seu controle se inverteu, havendo maior porcentagem de neoformação óssea no grupo teste. A baixa solubilidade do material o mantém por mais tempo na cavidade, e suas propriedades de osteocondução

tornaram-se evidentes após o 21° dia do experimento. Ohura (1996) relatou a dificuldade em distinguir microscopicamente os grânulos incorporados ao tecido ósseo do tecido ósseo puro. Kitsugi et. al. (1995) relataram haver direta continuidade entre tecido ósseo neoformado e grânulos de diferentes cerâmicas, entre elas o β -TCP, após 4 semanas da sua inserção em defeitos realizados em fêmures de ratos. Essa observação também foi percebida neste estudo, onde há uma íntima relação entre tecido ósseo e material, não havendo interposição de tecido conjuntivo entre ambos.

Comparando os defeitos preenchidos por cimento α -TCP com os defeitos controle, observou-se, aos 90 dias, maior neoformação óssea nas cavidades experimentais, corroborando os estudos de Jansen et al. (1995) e Kessler et al. (2002), cujos relatos afirmam haver maior neoformação óssea em presença do cimento. Neste mesmo período de observação, a média de neoformação óssea de 26,84% no grupo β -TCP/HA foi maior que o no grupo controle (18,94%), sendo esta diferença estatisticamente significativa; e menor que no grupo α -TCP (30,32%), mas sem significância estatística. Doernberg et al. (2006) avaliaram macroscopicamente a presença de cilindros de β -TCP em arcabouços ósseos e encontraram valores semelhantes na porcentagem de tecido ósseo neoformado na superfície do material foi de 20,8% em seis semanas (90 dias). Os autores observaram o reparo ósseo por um período de tempo maior e obtiveram média de neoformação óssea de 70,8% em 12 semanas e 100% em 24 semanas, demonstrando a capacidade osteocondutiva desse material. Na presente análise, o aspecto macroscópico revela o defeito preenchido por tecido ósseo, sem grânulos aparentes.

No presente estudo, após 120 dias, houve maior quantidade de material remanescente no defeito do grupo β -TCP/HA. Chow (1998) e Li et. al.(2001) expuseram que o β -TCP apresenta baixos níveis de solubilidade. Segundo informações do fabricante dos grânulos β -TCP/HA, a hidroxiapatita foi inserida com a finalidade de reduzir a solubilidade da biocerâmica (ENCOBIO, 2007). Jansen et al. (1995) testaram uma mistura de α -TCP associado a β -TCP/HA em defeitos realizados em tíbias de cabras. Após seis meses, o composto apresentava-se com 85% de HA e aproximadamente 15% de β -TCP. Isso demonstra a baixa solubilidade do grânulo β -TCP, além da capacidade do α -TCP em transformar-se em hidroxiapatita.

Analisando a ação do cimento α -TCP em modelo animal, Kessel et al. (2002) observaram osteocondução com formação homogênea de osso através dos implantes de cimento e presença de trabeculado ósseo servindo como pontes conectando as extremidades dos defeitos ósseos. A superfície de osso neoformado apresentou-se delineada por osteoblastos. Formação de osteóide, resultante da atividade dessas células, foi observada muito raramente. A matriz residual de cerâmica apresentou-se degradada em pequenas partículas distribuídas entre o trabeculado ósseo. Os autores expuseram que não foram identificadas células gigantes multinucleadas nas sessões de 100 μ m observadas. Do mesmo modo, na presente pesquisa, não foram observadas células osteoclásticas no cortes histológicos estudados, sugerindo que o cimento seja reabsorvido de outra forma, que não a fagocitária.

Os fabricantes do β -TCP/HA relatam que este material é osteoindutor pela sua capacidade de permitir a deposição de proteínas próprias do indivíduo, da quimiotaxia, da capilaridade e das tensões superficiais dos micro-poros de sua geometria, pois a osteogênese é geométrico-dependente, o que também caracteriza a osteoindução intrínseca do produto (EINCOBIO, 2007). Segundo Ducheyne (1981), os enxertos β -TCP são osteocondutores e simultaneamente remodelados por neoformação óssea após algum tempo. Para Shiratori (2005), o β -TCP é um composto inorgânico, no qual não existem fatores ou indutores de crescimento e expõem que a liberação de fatores e indutores de crescimento está presente em qualquer tipo de defeito ósseo. A partir das observações dos resultados, acredita-se que a osteoindução não é propriedade intrínseca do β -TCP/HA. Estes grânulos permitem a formação de um arcabouço para a deposição das células osteoindutoras presentes no organismo.

A descrição histológica da relação entre osso e cimento de α -TCP revela áreas de cimento envolvidas por tecido ósseo neoformado, presença de tecido ósseo imaturo, derivado do osso presente no leito receptor, invadindo áreas de cimento e apresentando contato direto com o mesmo, semelhante ao observado por Kurashina et al. (1997).

Na análise dos defeitos confeccionados no presente estudo, observa-se que o volume do preenchimento das cavidades contendo grânulos de β -TCP/HA foi mantido, o que não ocorreu nas cavidades controle, preenchidas com coágulo

sangüíneo. Isso sugere que os grânulos que não foram reabsorvidos continuaram servindo de arcabouço para a formação óssea. Levando em consideração a alta solubilidade do α -TCP, percebe-se que ele não apresenta a mesma capacidade de manutenção de volume do β -TCP/HA, no entanto, a área de osso neoformado foi mais significativa no cimento α -TCP.

Este estudo apresentou médias de neoformação óssea superiores no grupo α -TCP. Atribui-se esses resultados à conformação da estrutura cristalina do cimento α -TCP, uma vez que seus cristais apresentam uma estrutura aberta, com porosidades resultantes da presença do sulfato de cálcio hemiidratado (SANTOS, 2002), o que permite a formação de matriz osteóide em meio aos cristais. Já os grânulos β -TCP/HA, por possuírem uma estrutura em que os cristais são maiores e menos solúveis (HIRAKATA, 2003), mantiveram-se por mais tempo no interior do defeito. Isso proporcionou neoformação óssea, embora em menor quantidade do que no primeiro grupo, e manteve volume tecidual no interior do defeito.

A partir dos resultados obtidos e dos relatos da literatura, acredita-se que ambos os materiais possuem características necessárias para o uso clínico. É importante, contudo, ter conhecimento do objetivo que se pretende alcançar com a aplicação de cada um destes materiais. Nos casos em que se deseja maior volume ósseo, sem maiores exigências quanto à qualidade óssea, como por exemplo nas correções de defeitos com comprometimento estético, o β -TCP/HA pode ser indicado. Já os casos em que o objetivo é a formação mais precoce de tecido ósseo somente, por exemplo, enxertia prévia à colocação de implantes dentários, o cimento α -TCP oferece neoformação óssea mais rapidamente. Sendo assim, estes materiais apresentam indicações específicas de acordo com seu grau de solubilidade no tecido e com a rapidez com que promovem a condutibilidade óssea.

6 CONCLUSÕES

Frente aos Resultados obtidos, a partir da Metodologia descrita, pode-se concluir que:

- a) os cimentos α -TCP e β -TCP/HA promovem osteocondução;
- b) o cimentos α -TCP apresentou maior porcentagem de área de neoformação óssea do que os grânulos β -TCP/HA, sendo que a quantidade de osso neoformado não preencheu todo o volume do defeito ósseo, nos períodos de tempos observados;
- c) o cimento α -TCP é mais bioabsorvível que os grânulos β -TCP/HA que são reabsorvidos mais lentamente, permanecendo por mais tempo no interior do defeito ósseo, mantendo seu volume.

REFERÊNCIAS¹⁴

ALFORD, N.; McN, A. Theoretical argument for the existence of high strength cement pastes. **Cem. Concr. Res.**, v. 11, p. 605-610, 1981.

ARANGO, H. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.

CAMPBELL , D.T.; STANLEY, J.C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1979.

CARVALHO, H.F.; BUZATO, C.B.C. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole, 2005, p.34 – 49.

CHRISTIAN, C. A. General Principles of Fracture Treatment. In: CANALE, S. T.; DAUGHERTY, K.; JONES, L. (Ed.). **Campbell's Operative Orthopaedics**. 9ª ed. St. Louis: Mosby, 1996. v.3, cap.46, p.1993-2041.

CHOW, L.C. Calcium Phosphate Materials: Reactor Response. **Adv Dent Res**, v.2, n.1, p.181-4, august, 1998.

COOK, S.D.; RUEGER, D.C. Osteogenic protein-1: biology and applications. **Clin. Orthop.Relat Resar**, n.324, p.29-38, março,1996.

DEN BOER, F.C.; WIPPERMANN, B.W.; BLOKHUIS, T.J. et al. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. **J. Orthop. Res.**, v.21, p.521-528, 2003.

DRIESENS, F.C.M., et al. **Bull Soc Chim Belg**, v.95, p.337, 1986.

DRIESENS, F. C. M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. **Anal. Quim. Int. Ed.**, v.93, p.S38 - S43, 1997.

DRIESENS FC, PLANELL JA, BOLTONG MG, KHAIROUN I, GINEBRA MP. Osteotransductive Bone Cements. **Proc Inst Mech Eng [H]**. v.212, n.6, p.427-35, 1998.

14 A presente pesquisa obedeceu às normas de elaboração de trabalho científico da ABNT NBR 6023, **NBR 14724**,

DOERNBERG, V.M.C. et. al. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. **Biomaterials**, n.27, p.5186-5198, 2006.

DUCHEYNE, P.; DE GROOT, K. *In vivo* surface activity of a hydroxyapatite alveolar bone substitute. **J Biomed Mater Research**. v.15, p.441-45, 1981.

EINCOBIO - HOME PAGE OSTEOSYNT®, **Descrição da biocerâmica fosfocálcica bifásica micro-macroporosa de β -TCP/HA**. Disponível em: <http://www.eincobio.com.br>. Acesso em: 27 out 2007.

ESKI, M. et al. Assessment of Distraction Regenerate Using Quantitative Bone Scintigraphy. **Ann Plast Surg**, v.58,n.3, p.328 – 34, 2007.

FERNÁNDEZ, E. et al. Modulation of porosity in apatitic cements by the use of α -tricalcium phosphate – calcium sulphate dehydrate mixtures. **Biomaterials**, v.26, p.3395-3404, 2005.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to bioceramics**. Singapore:Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993, p.1-15.

HIRAKATA, L.M. Development and Evaluation of Apatite with Modification by α -Tricalcium Phosphate. **The University of Tokushima, Department of Dental Engineering**, 3-18-15, Kuramoto, Tokushima 770-8504, Japan.

HOLLINGER, J.O.; BREKKE, J.; GRUSKIN, E. et al. Role of bone substitutes. **Clin. Orthop.**, n.324, p.55-65, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: Junqueira, L. C., Carneiro, J. (ed.) **Histologia Básica**. 10^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.488.

JANSEN, J.A. et al. Evaluation of tricalcium phosphate/ hidroxiapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study. **J. Mat. Sci. Mat. Med**, v.6, p.653-57, 1995.

KEATING, J.F.; McQUEEN, M.M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. **J. Bone Jt. Surg. Br.**, v.83, p.3-8, 2001.

KESSEL, R. G. Tecido conjuntivo: Osso e Formação Óssea. In: Kessel, R. G. (ed.). **Histologia Médica Básica**. A Biologia das Células, Tecidos e Órgãos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.129-146.

KESSLER, S. et al. Histomorphological, histomorphometrical and biomechanical analysis of ceramic bone substitutes in a weight-bearing animal model. **J Mat Sci.**, v.13, p.191-195, 2002.

KITSUGI, T.; YAMAMURO, T.; NAKAMURA, T.; OKA, M. Transmission electron microscopy observations at interface of bone and four types of calcium phosphate ceramics with different calcium phosphorus molar ratios. **Biomaterials**, v.16, p.1101-1107, 1995.

KNABE, C. et al. The effect of bioactive glass ceramics on the expression of bone-related genes and proteins *in vitro*. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v.16, p.119-127, 2005.

KOSINO, T.; TAKAHASHI, A.; KUBOTA, W. Bioactive Cement. **The Bone**, v.6, n.4, p.43-47, 1992.

KURASHINA, K.; et al. In vivo study of calcium phosphate cements: implantation of an α -tricalcium phosphate / dicalcium phosphate dibasic / tetracalcium phosphate monoxide cement paste. **Biomaterials**, v.18, n.7, p.539-544, 1997.

KURASHINA, K. et al. Calcium phosphate cement: in vitro and in vivo studies of the α -tricalcium phosphate – dicalcium phosphate dibasic – tetracalcium phosphate monoxide system. **Journal Mat. Sci Mat Med**, v.6, p.340-347, 1995.

LE GEROS, R.Z. Calcium Phosphate Materials in Restorativa Dentistry: a Review. **Adv. Dent. Res**, v.2, n.1, p.164-180, 1988.

LI, Y.; WENG, W.; TAM, K.C. Novel highly biodegradavel biphasic tricalcium phosphates composed of α - tricalcium phosphate and β - tricalcium phosphate. **Acta Biomaterialia**, p.1-4, 2006.

LIKE, X.; MONROE, E.A. Calcium Phosphate Dental Cements. **Mat Res Soc Symp Proc**, v.179, p.25-39, 1991.

MACEDO, N. L. et al. Bone defect regeneration with bioactive glass implantation in rats. **Journal of Applied Oral Science: Revista FOB**, Bauru, v.12, n.2, p.137-43, Abr/Jun, 2004.

MARZOUK, M.K.; GAMAL, A.Y.; AL-AWADY, A.A.; SHARAWY, M.M. Osteoconductive Effects of Vinyl Styrene Microbeads in Rat Calvarial Defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v.65, n.8, p.1505-16, 2007.

MINDESS, S. Relationships between strength and microstructure for cement-based materials: An overview. In: Very high strength concrete-based-materials, **Mat Res. Soc Symp Proc.**, v.42, p.53-68, J. F. Young, Ed., 1985.

MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **ROBBINS & CONTRAN - Fundamentos de Patologia**. 7^a Ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006, 848p.

MOTTA, V.; WAGNER, M. **Bioestatística**. Caxias do Sul: Educs, São Paulo: Robe Editorial, 2003, p.201.

MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J. Induced Osteogenesis for Repair and Construction in the Craniofacial Region. **Plast Reconstr Surg**, v.65, n.5, p.553-59, 1980.

NAGASE, M.; CHEM, R.B.; ARAYA, Y.; NAKAJIMA, T. Evaluation of a bone substitute prepared from α -tricalcium phosphate and an acid polysaccharide solution. **J Oral Maxillofac Surg**, v.49, p.1305-1309, 1991.

NASR, H. F., AICHELMANN-REIDY, M. E., YUKNA, R. A. Bone and bone substitutes. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 9, p.74-86, Fevereiro, 1999.

OHURA, K., et al. Resorption of, and bone formation from, new α - tricalcium phosphate – monocalcium phosphate cements: an in vivo study. **Journal of Biomed Mat Res**, v.30, p.193-200, 1996.

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.

PARKER, R. B. Injertos ósseos en cirurgia de pequenos animais. **Waltam Focus**, v.5, n.2, p.90-99, 1995.

REMEDIOS, A. Bone and bone healing. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.**, v.29, p.1029-1044, 1999.

ROSS, M. H.; REITH, E. J., ROMRELL, L. J. Osso. In: Ross, M. H., Reith, E. J., Romrell, L. J. (ed.). **Histologia: Texto e Atlas**. 2^a Ed. São Paulo: Panamericana, 1993. p.141-160.

SANTOS, L.A. Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica. **Tese Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, 2002.

SCHWAN, L.; SOUZA, A. C. A. Imobilização e osteoporose. In: Jeckel-Neto EA, Cruz IBMd (ed.). **Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento II**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000. p.253-274.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. **Clinical Orthopaedic an Related Research**, n.205, p.299-308, 1986.

SHIMA, T., et al. Anterior Cervical Disectomy and Interbody Fusion. An Experimental Study Using Syntetic Tricalcium Phosphate. **J Neurosurg**, v.51, p.533, 1979.

SHIRATORI, K.; MATSUZAKA, K.; KOIKE, Y.; MURAKAMI, S.; SHIMONO, M.; TAKASHI, I. Bone formation in β - tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: Morphometric analysis and expression of bone related protein m RNA. **Biomedical Research**, v.26, n.2, p.51-59, 2005.

SIEGEL, S. **Estatística Não-Paramétrica para as Ciências do Comportamento**. São Paulo, Ed. McGraw-Hill, 1975.

SIROLA, K. Regeneration in defects in the calvaria. An experimental study. **Annals of Medicine and Experimental Biology of Finland**, v.38 (suppl 2), n.1, 1960.

TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Ann. Surg.** v.196, n.100, 1982.

TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal**. Toronto, Canadá: Guanabara, 2a. ed, 1985, p: 95.

TURNBULL, R.S.; FREEMAN, E. Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. **J Periodont. Res**, v.9, n.39, 1974.

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

YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater Histologia Funcional**. 4^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 172-92.

ZAGO, A.Z.; COVAS, D.T. **Células-tronco a nova fronteira da medicina**. São Paulo. Ed. Atheneu, cap.3, 2006, p.35-42.

ANEXO A



Comissão Científica e de Ética Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 29 de janeiro de 2007

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob n°: 0092/06
Intitulado: Análise radiográfica e histológica do reparo em defeitos ósseos críticos preenchidos com cimento alfa - tricálcio fosfato: estudo em ratos
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva
Pesquisadores Associados: Gisela Grandi
Nível: Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 24 de novembro de 2006.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS

Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 0908/07-CEP

Porto Alegre, 08 de agosto de 2007.

Senhor(a) Pesquisador(a):

Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 07/03730, intitulado: "**Análise radiográfica e histológica do reparo em defeitos ósseos críticos preenchidos com cimento α -tricálcico fosfato: estudo em ratos**".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof Dr José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Profa Dra Daniela Nascimento Silva
N/Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000

Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

www.pucrs.br/prppg/cep