

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA  
E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

JULIANA GONÇALVES GÖELZER

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL E DA  
GENOTOXICIDADE A DISCOS DE  
POLI (ÁCIDO L/D-LÁCTICO)  
IMPLANTADOS EM CALOTA CRANIANA DE RATOS

PORTO ALEGRE

2010

JULIANA GONÇALVES GÖELZER

Avaliação da resposta tecidual e da genotoxicidade a discos de poli (ácido L/D-láctido)  
implantados em calota craniana de ratos

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

Orientador Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira

Porto Alegre

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação ( CIP )**

G595a Göelzer, Juliana Gonçalves  
Avaliação da resposta tecidual e da genotoxicidade a discos de poli (ácido L/D-láctido) implantados em calotas cranianas de ratos / Juliana Gonçalves Göelzer. – Porto Alegre, 2010.  
**93 f. : il.**

**Diss. (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, PUCRS.**  
**Orientação: Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira**

1. Odontologia. 2. Tecido Ósseo. 3. Cicatrização – Odontologia. 4. Materiais Biocompatíveis. 5. Toxicidade. 6. Animais – Experiências. I. Oliveira, Rogério Belle de II. Título.

**CDD 617.52**

**Ficha Catalográfica elaborada por  
Sabrina Vicari  
CRB 10/1594**



## **AGRADECIMENTOS**

---

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira, pela amizade, confiança, convivência agradável, conhecimento e experiência transmitidos. Agradeço pela dedicação e disponibilidade, mas principalmente pelo auxílio na idealização e na superação dos empecilhos para que este trabalho se realizasse. Muito obrigada pelo exemplo de profissionalismo, ética e moral.

Aos meus pais, Roberto e Rejane, pela educação e valores que me ensinaram, pelo carinho e compreensão dados ao longo da minha vida, pelo esforço incansável para que eu realizasse minha formação profissional e pelo amor incondicional!

Ao meu marido Fabrício, pelo apoio, amizade, companheirismo e amor verdadeiro, mesmo nos momentos de ausência.

Aos meus irmãos e familiares, pelo apoio nessa caminhada e por confiarem em mim e no meu trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS em nome do Prof Dr José Antonio Poli de Figueiredo, agradeço as oportunidades proporcionadas durante a realização do curso de Mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro disponibilizado através da bolsa, indispensável para a realização deste curso.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, representada por seu diretor, Professor Dr. Marcos Túlio M. de Carvalho, pela excelente estrutura e qualidade de ensino proporcionada.

A todos os professores do curso de Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e do Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, pelos ensinamentos e convivência que contribuíram para o meu aprimoramento profissional.

Ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, seus professores e a funcionária Vanessa Stamatto, pelo processamento das amostras, confecção das lâminas, auxílio na avaliação histológica e paciência durante a execução desta pesquisa.

À Faculdade de Farmácia, pela utilização das dependências do Vivário e ao funcionário Juliano Soares pelo auxílio no manejo e cuidados dos animais.

Aos colegas de mestrado, Alessandro, Cristina, Felipe, Fernando, Roberta, Vinícius, Waneza e demais contemporâneos de pós-graduação, pela convivência e troca de experiência durante o curso.

Aos amigos Rafael Avelar, Fabiano Azambuja e André Weissheimer pelas enriquecedoras conversas e discussões de casos clínicos no Bar da Odonto durante e após o almoço.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação Ana, Carlos, Davenir e Marcos, pela atenção dada durante o curso.

Enfim, agradeço a todos os demais que contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa suficientemente vitoriosa!



**RESUMO**

---

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a reação tecidual local, em calota craniana de ratos, frente à implantação de discos de poli (ácido L/D-láctico) e avaliar a sua toxicidade genética, pela indução de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC) na medula óssea de ratos. Foram utilizados 25 ratos Wistar, machos, com 200 e 300 gramas. 20 animais sofreram procedimento cirúrgicos e tiveram os discos implantados, e 5 animais receberam medicação pós-operatória da mesma maneira, servindo como grupo controle para genotoxicidade. Com uma broca trefina 4,1mm foram realizadas duas ostectomias circulares, uma em cada osso parietal. Na perfuração direita foi inserido um disco de poli(ácido L/D-láctico), e a do lado esquerdo foi preenchida por coágulo sanguíneo (grupo controle). Os animais foram eutanasiados nos tempos apropriados (15, 30, 90 e 120 dias após a cirurgia), por inalação de isoflurano. Nos 20 animais operados foi retirada a calota craniana e fixada em formalina tamponada a 10%. As amostras foram submetidas à descalcificação e após emblocados em parafina e submetidos a cortes de 6 µm, no sentido transversal, na porção de maior diâmetro dos discos. As lâminas obtidas foram submetidas à técnica histoquímica de coloração HE. Para avaliação da genotoxicidade, ambos os fêmures de cada animal foram removidos e o conteúdo da medula óssea extraído diretamente sobre uma lâmina com uma gota de soro bovino fetal, e homogeneizada. Com este material foi feito um esfregaço. As lâminas foram secas, fixadas em metanol e coradas uma lâmina de cada fêmur com Giemsa e a outra com Acridine Orange. Os resultados obtidos foram submetidos a avaliação estatística pela Análise de Variância (ANOVA). Na avaliação histológica, no período de 15 e 30 dias, em ambos os grupos o defeito ósseo foi bem evidenciado, não sendo observados neoformação óssea, episódios de reabsorção óssea nem reação de corpo estranho. Nos períodos de 90 e 120 dias, no grupo controle, observou-se neoformação nas bordas do defeito. No grupo experimental, houve neoformação óssea nas bordas do defeito e migrando abaixo do local ocupado pelo disco e ausência de infiltrado inflamatório. Quanto a avaliação de genotoxicidade, não foi detectada redução significativa ( $p < 0,05$ ) da frequência de EPC em relação ao controle negativo nem aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos EPC com micronúcleos. Pode-se concluir que o material utilizado neste estudo é biocompatível e bem tolerado pelos tecidos estudados, sendo considerado negativo para mutagenicidade cromossômica no ensaio realizado.

Descritores<sup>1</sup>: cicatrização óssea, genotoxicidade, materiais biocompatíveis

---

<sup>1</sup>Descritores em Ciência da Saúde (DeCS): disponível em <http://decs.bvs.br/>.





**ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

The aim of present study was to evaluate the local tissue reaction in the skull of rats using the implantation of disks of poly (lactic L/D-acid) and evaluate its genotoxicity, through the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes (PCE) in the bone marrow of mice. It used 25 male Wistar rats, with 200 and 300 grams. 20 animals underwent surgical procedures and had the discs implanted, and 5 animals received postoperative medication in the same way, serving as a control group for genotoxicity. With a 4.1 mm trephine drill, two osteotomies circular were done, one in each parietal bone. On the right drilling a disc of poly (lactic L/D-acid ) was inserted, and on the left one it was filled by blood clot (control group). The animals were killed at the appropriate times (15, 30, 90 and 120 days after surgery), by inhalation of isoflurane. In the 20 operated animals the skull was removed and fixed in formalin 10%. The samples were subjected to decalcification and then to paraffin-embedded and subjected to cuts of 6 microns in the transverse direction, at the portion of larger diameter discs. The slides obtained were subjected to histochemical technique of staining EH. To evaluate the genotoxicity, both femurs of each animal were removed and the contents of the bone marrow extracted directly on a slide with a drop of fetal calf serum, and mixed. It was made a smear with this material. The slides were dried, fixed in methanol and stained one section of each femur with Giemsa and the other with Acridine Orange. The results were subjected to statistical evaluation by analysis of variance (ANOVA). In histological evaluation, between 15 and 30 days, the bone defect was made clear in both groups, and it is not observed bone formation and resorption episodes or foreign body reaction. In periods of 90 and 120 days in the control group, it was noticed a new formation at the edges of the defect. In the experimental group, there was new bone formation at the edges of the defect and migrating below the site occupied by the disk and the absence of inflammatory infiltrate. Regarding to the evaluation of genotoxicity it was not detected a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the frequency of EPC in relation to negative control or significant increase ( $p < 0.05$ ) in the EPC with micronuclei. It can be concluded that the material used in this study is biocompatible and well tolerated by the tissues studied, and found negative for chromosomal mutagenicity when tested.

Keywords: bone healing, genotoxicity, biocompatible materials.



## **LISTA FIGURAS**

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fases do ciclo celular.....	30
Figura 2.	Estágios da mitose.....	31
Figura 3.	Discos de poli (ácido L/D-láctico).....	42
Figura 4.	Tricotomia e antissepsia.....	44
Figura 5.	Incisão bicoronal e defeito ósseo sendo criado na calota craniana do rato com broca tipo trefina.....	45
Figura 6.	Ostectomia realizada e defeito ósseo criado na calota craniana do rato.....	46
Figura 7.	Defeito ósseo preenchido com discos de poli (ácido L/D-láctico).....	46
Figura 8.	Sutura.....	47
Figura 9.	Defeito controle aos 15 dias de observação.....	55
Figura 10.	Defeito experimental aos 15 dias de observação.....	55
Figura 11.	Defeito controle aos 30 dias de observação.....	56
Figura 12.	Defeito experimental aos 30 dias de observação.....	57
Figura 13.	Defeito controle aos 90 dias de observação.....	58
Figura 14.	Defeito experimental aos 90 dias de observação.....	58
Figura 15.	Defeito controle aos 120 dias de observação.....	59
Figura 16.	Defeito experimental aos 120 dias de observação.....	60
Figura 17.	Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilo em medula óssea de ratos. Grupo controle negativo. Lâminas coradas em Giemsa.....	61
Figura 18.	Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilo em medula óssea de ratos. Grupo controle negativo. Lâminas coradas em <i>Acridine Orange</i> .....	61
Figura 19.	Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilo em medula óssea de ratos, no grupo em que discos de poli(ácido L/D-láctico) estiveram implantados por um período de 90 dias. Lâminas coradas em Giemsa.....	62
Figura 20.	Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilo em medula óssea de ratos, no grupo em que discos de poli(ácido L/D-láctico) estiveram	

implantados por um período de 90 dias. Lâminas coradas em <i>Acridine Orange</i> .....	62
Figura 21. Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilo em medula óssea de ratos, no grupo em que discos de poli(ácido L/D-láctico) estiveram implantados por um período de 120 dias. Lâminas coradas em Giemsa.....	63
Figura 22. Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilo em medula óssea de ratos, no grupo em que discos de poli(ácido L/D-láctico) estiveram implantados por um período de 120 dias. Lâminas coradas em <i>Acridine Orange</i> .....	63



## **LISTA DE TABELAS**

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Organização dos grupos para avaliação histológica.....	40
Tabela 2	Organização dos grupos para avaliação de genotoxicidade.....	40
Tabela 3	Distribuição das amostras a serem obtidas, em cada grupo.....	49
Tabela 4	Ensaio de Micronúcleos. Número de Eritrócitos Policromatófilos (EPC) em 1000 eritrócitos, média e desvio padrão por grupo.....	64
Tabela 5	Ensaio de Micronúcleos. Número de Eritrócitos Policromatófilos com micronúcleos (mEPC) em 1000 eritrócitos, média e desvio padrão por grupo.....	65



## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CCE	Comissão Científica e de Ética
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPC	Eritrócito policromático ou policromatófilo
FO	Faculdade de Odontologia
g	Grama
HE	Hematoxilina-Eosina
Kg	Quilograma
mEPC	Eritrócito policromatófilo com micronúcleo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
PCL	Policaprolactona
PDLA	Poli (D-ácido láctico)
PDLLA	Poli (DL-ácido láctico)
PDO	Poli (p-dioxanona)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLLA	Poli (ácido L-láctico)
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PVP-I	Polivinilpirrolidona-iodo
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas



## SUMÁRIO

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1	POLÍMEROS BIORREABSORVÍVEIS.....	23
2.2	POLÍMEROS MAIS UTILIZADOS.....	24
2.3	TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	28
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>33</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
4.1	RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA.....	37
4.2	CARACTERIZAÇÃO.....	37
4.3	PROBLEMAS.....	38
4.4	HIPÓTESES.....	38
4.5	CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA.....	39
4.6	ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS.....	39
4.7	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	41
4.8	CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL UTILIZADO.....	42
4.9	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA AVALIAÇÃO TECIDUAL.....	43
4.10	PREPARO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	48
4.11	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA REAÇÃO TECIDUAL POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	49
4.12	CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E ESTUDO MICROSCÓPICO.....	50
4.13	PROCESSAMENTO PARA AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE...	51
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1	RESULTADOS DESCRITIVOS DA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	54
<b>5.1.1</b>	<b>Período de avaliação 15 dias.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Período de avaliação 30 dias.....</b>	<b>56</b>

<b>5.1.3</b>	<b>Período de avaliação 90 dias.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Período de avaliação 120 dias.....</b>	<b>59</b>
<b>5.2</b>	<b>RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Proporção de Eritrócitos Policromatófilos (EPC).....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Avaliação de Micronúcleos.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>



## **INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

Em cirurgia bucomaxilofacial, a fixação rígida de fraturas e osteotomias é necessária para promover estabilização e subsequente cicatrização ao longo dos segmentos ósseos (HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005). O titânio, sob a forma de placas e parafusos, tem sido utilizado como primeira escolha para os casos de fraturas e correção de deformidades faciais. Testes clínicos e laboratoriais têm provado a excelente biocompatibilidade deste material (SCHLIEPHAKE *et al.*, 1993) e ausência de efeitos citotóxicos e genotóxicos (PIOZZI *et al.*, 2008). Além de oferecer rigidez e formas adequadas que favorecem o reparo ósseo (HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005), diminuindo o período de fixação maxilo-mandibular e permitindo abertura de boca precoce no período pós-operatório (ARAÚJO *et al.*, 2001).

O principal problema que persiste com este material é sua aplicabilidade em crianças e adolescentes em fase de crescimento. Estudos demonstram que a rigidez da fixação com titânio ao longo do tempo causará modificações no padrão do crescimento ósseo localmente (ARAÚJO *et al.*, 2001; CILASUN *et al.*, 2006). Além disso, também em adultos, há a possibilidade de atrofia óssea (BERGSMA *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 2004), presença e palpabilidade em regiões anatômicas proeminentes (HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005; CILASUN *et al.*, 2006), aumento do risco de infecção secundária (SUZUKI *et al.*, 2004; HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005), afrouxamento ou extrusão da placa, sensibilidade ao frio, migração da placa ou de parafusos, interferência com imagens radiográficas e tratamento radioterápico, distorção de imagem de ressonância magnética, reações alérgicas, complicações fisiológicas ou psicológicas, migração intracraniana em operações crânio-orbitárias (SUZUKI *et al.*, 2004).

Em algumas das situações clínicas supracitadas, a remoção das placas e parafusos é indicada (SCHLIEPHAKE *et al.*, 1993; EDWARDS *et al.*, 2001). Em relação à incidência e aos fatores associados à remoção de placas, observou-se que 84% das placas removidas o foram devido a sintomas como dor, deiscência e infecção, das quais 72% foram removidas após 1 ano da sua inserção (BHATT *et al.*, 2005).

Todas as desvantagens relacionadas ao uso do titânio como material para fixação óssea conduziram a inúmeros estudos e pesquisas na tentativa de desenvolver uma alternativa para o uso do titânio. Para tal, foram desenvolvidos os materiais reabsorvíveis, sob a forma de miniplacas e parafusos, que podem ser utilizados na fixação interna de fraturas e osteotomias.

Este estudo teve por objetivo avaliar, histologicamente, a reação tecidual local, em calota craniana de ratos, frente à implantação de discos de poli (ácido L/D-láctico) e avaliar a sua toxicidade genética, pela indução de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC) na medula óssea de ratos.



**REVISTA DE LITERATURA**

---



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 POLÍMEROS BIORREABSORVÍVEIS

Em 1960 iniciaram-se as pesquisas e em seguida a produção dos primeiros materiais reabsorvíveis aprovados na indústria médica, sob a forma de materiais para sutura, obtidos a partir do ácido láctico e ácido glicólico (GILDING e REED, 1979). Desde então, muitos outros dispositivos a partir de polímeros foram aceitos para o uso na área biomédica. Na cirurgia bucal e maxilofacial, só a partir de 1970 as pesquisas focaram os materiais reabsorvíveis, como o ácido poli-L-láctico (PLLA), para a fixação interna de fraturas (CUTRIGHT *et al.*, 1971).

Os biomateriais temporários podem ser biodegradáveis, quando forem polímeros ou dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Serão bioabsorvíveis os materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular. Serão biorreabsorvíveis os materiais poliméricos ou dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, por exemplo, materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo. A biorreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixo peso molecular) sem efeitos colaterais residuais. Os materiais poliméricos biorreabsorvíveis são os compostos utilizados preferencialmente em dispositivos temporários (SANTOS e WADA, 2007).

Os polímeros compõem uma classe ampla de biomateriais, e na área biomédica existem várias pesquisas sendo desenvolvidas para o uso de materiais poliméricos. Esses materiais devem ser biocompatíveis e possuir propriedades mecânicas adequadas para que se possa implantar no corpo humano. Atualmente existe um grupo promissor de polímeros biocompatíveis que vem sendo utilizado em sistemas biológicos, baseado em poliésteres derivados do poli( $\alpha$ -hidróxi ácidos). Os principais polímeros desse grupo são o poli(L-ácido láctico) (PLLA), o poli(D-ácido láctico) (PDLA), o poli(DL-ácido láctido) (PDLLA), o poli(ácido glicólico)(PGA), a policaprolactona (PCL) e a poli(p-dioxanona) (PDO) (CHEN *et al.*, 2003; SANTOS e WADA, 2007).

Inicialmente os polímeros possuem um peso molecular estável. Porém, em seu processo de degradação, o polímero é quebrado em unidades menores por hidrólise simples e há a diminuição do seu peso molecular. Os produtos de sua decomposição podem ser eliminados do corpo por vias metabólicas, como a via do ciclo do ácido cítrico, ou diretamente por excreção renal (SANTOS e WADA, 2007).

## 2.2 POLÍMEROS MAIS UTILIZADOS

O poli(ácido láctico) (PLA) foi um dos primeiros polímeros pesquisados. Atualmente, ele é de grande interesse tecnológico devido às suas aplicações no campo ambiental, como plástico biodegradável, e na área biomédica, como material biocompatível. Ele pode ser utilizado de forma pura, ou mesmo em associações (CHEN *et al.*, 2003).

Outro polímero muito usado, sendo o primeiro a ser fabricado sob a forma de miniplacas e parafusos, é o poli (ácido L-láctico) (PLLA). Este polímero biorreabsorvível é resistente às forças mecânicas mastigatórias e tem um tempo de degradação consideravelmente longo, de 2 a 6 anos. Quanto à biocompatibilidade, não há diferença estatisticamente significativa entre parafusos de PLLA e parafusos metálicos, não sendo observados sinal inflamatório ou reação de corpo estranho durante o acompanhamento de 36 a 51 meses, em coelhos (PIHLAJAMÄKI *et al.*, 2006). Quando avaliado clínica e radiograficamente este sistema foi capaz de promover relativa estabilidade no tratamento de pacientes que necessitaram de fixação de fraturas do processo condilar da mandíbula (SUZUKI *et al.*, 2004).

Os implantes de PLLA apresentam capacidade mecânica de resistir a esforços musculares, mantendo a redução e fixação dos segmentos ósseos, permitindo assim a cicatrização normal do osso. Contudo o tempo de degradação dos implantes de PLLA, que inicialmente era estimado de 12-18 meses, tem se mostrado muito maior (TAMS *et al.*, 1995). Bergsma *et al.* (1995) estudaram a causa de edema presente em alguns pacientes após 3,3 a 5,7 anos de implantação do PLLA para a fixação de fraturas instáveis de zigoma. O material excisado demonstrou remanescentes de material PLLA parcialmente degradado, circunscrito por cápsula fibrosa e áreas de material de corpo estranho. Na investigação ultraestrutural, os autores observaram cristais de PLLA internalizado por várias células, e concluíram que o PLLA se degrada vagarosamente em partículas com alta cristalinidade, e que a taxa de degradação intra e extracelular destas partículas é muito baixa, pois após 5,7 anos de implantação, estas partículas ainda estavam incompletamente reabsorvidas.

Em humanos, há o relato de reações adversas ao PLLA, o que sugere que este polímero possui uma segunda fase de degradação, mais lenta e que está relacionada às

complicações clínicas. Esta fase está relacionada à cristalinidade do material e depende do peso molecular inicial e níveis de monômeros residuais do material, o que varia de acordo com cada fabricante (WALTON e COTTON, 2007). Bergsma *et al.* (1995) relataram que as partículas não degradadas de PLLA podem induzir e manter um edema clinicamente detectável, sugerindo que estas partículas podem já não ser consideradas como completamente biocompatíveis.

Na tentativa de aprimorar as propriedades dos polímeros, algumas associações entre polímeros diferentes são realizadas. Uma associação de polímeros bem conhecida e comercialmente disponível é o Sistema LactoSorb® (Walter Lorenz Surgical, Jacksonville, FL, USA), que é constituído de 82% de ácido poli-L-láctico (PLLA) e 18% de ácido poli-glicólico (PGA). Esta combinação de polímeros possui baixa cristalinidade, fácil degradação, metabolização e excreção pelo corpo, via sistema urinário. Este sistema é capaz de manter a rigidez por 2 meses e tem reabsorção total em 9 a 12 meses, a maior parte através de hidrólise (HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005).

Testes mecânicos em mandíbulas de ovelhas comprovaram que não havia diferença significativa na estabilidade das osteotomias sagitais de ramo mandibular fixadas com parafusos bicorticais de titânio ou com parafusos bicorticais do LactoSorb® (CILASUN *et al.*, 2006). Estudos em coelhos demonstraram que este material, quando comparado ao titânio, proporcionava estabilidade suficiente para permitir o reparo ósseo mandibular, e que o processo de reabsorção do material não causava reação inflamatória aguda ou crônica ou reação de corpo estranho durante o período estudado (HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005).

Em um estudo clínico multicêntrico com 1883 pacientes utilizando-se o LactoSorb® para fixação óssea em cirurgia craniofacial de crianças e adolescentes, Eppley *et al.* (2004) encontraram apenas 0,4 % de infecção pós-operatória (8 pacientes), 0,3 % (5

pacientes) tiveram falha do dispositivo reabsorvível com deslocamento ósseo no pós-operatório imediato, porém a maioria dos casos com história de trauma associado; e 0,7% (12 pacientes) apresentaram reação de corpo estranho tardia. Os autores concluem que a fixação com placas e parafusos reabsorvíveis em reconstruções cranianas em pacientes pediátricos é tão segura e efetiva como os aparatos metálicos, e que a maior vantagem é a eliminação da necessidade por um segundo procedimento.

Edwards *et al.* (2001) avaliaram o uso do sistema LactoSorb® em 20 casos de cirurgia ortognática. Os autores não fizeram uso de *splint* pós-operatório e observaram, após 12 a 25 meses, que não houve nenhuma complicação pós-operatória nem instabilidade oclusal. Os autores concluíram que este material pode ser usado como alternativa ao titânio pois possui excelente estabilidade óssea e oclusal e mais importante, devido à característica menos rígida do material quando comparado ao titânio, ele permitiria um pequeno grau de flexão do material e micromovimentação óssea, o que permitiria pequenos e precoces ajustes e refinamentos oclusais e sugere uma melhor acomodação da articulação têmporo-mandibular.

Em 2003, num estudo com elementos finitos, Cox *et al.* concluíram que o sistema reabsorvível testado possui adequada força e rigidez para a aplicação com sucesso na fixação interna rígida de fraturas do ângulo mandibular.

Suzuki *et al.* (2004) avaliaram clínica e radiograficamente a capacidade do sistema reabsorvível à base de PLLA em fixar fraturas do processo condilar da mandíbula, e observaram que todas as fraturas tiveram boa redução anatômica e estabilidade a longo prazo, sem evidências de reabsorção do processo condilar.

Já Laughlin *et al.* (2007) avaliaram a performance do sistema reabsorvível em permitir o reparo de fraturas de mandíbula e restabelecimento da função, comparando a

fixação metálica, e concluíram que os dois sistemas permitiram adequada união óssea dos segmentos fraturados.

Peltoniemi *et al.* (1999) avaliaram a biocompatibilidade e degradação de parafusos de PLLA e PGA comparados com parafusos de titânio em osteotomias no osso frontal em ovelhas, em contato com a duramater. Os autores não observaram reação de corpo estranho, porém observaram que a degradação dos parafusos compostos de PGA foi consideravelmente mais rápida do que os parafusos compostos de PLLA.

As vantagens da utilização de compostos biorreabsorvíveis são inúmeras em relação a outros procedimentos cirúrgicos mais tradicionais. Dispositivos de fixação interna, utilizados em cirurgias ortopédicas, perdem sua função de manter os tecidos unidos quando a recomposição estrutural óssea se conclui. Implantes biorreabsorvíveis para fixação interna apresentam a vantagem de eliminar uma segunda intervenção cirúrgica para a sua remoção. A utilização de polímeros biorreabsorvíveis ainda se encontra em estudo porém seu emprego é bastante promissor. Novos compostos são desenvolvidos e avaliados a cada ano e suas perspectivas de utilização são imensas (MIKI e IMAI, 1996; PELTONIEMI *et al.*, 1999; MOLLAOLGU *et al.*, 2003; SHIKINAMI *et al.*, 2005; SANTOS e WADA, 2007).

A grande dificuldade do emprego de fixação interna rígida com materiais reabsorvíveis é o custo, já que todos os materiais disponíveis no mercado nacional são importados.

A crescente aplicabilidade destes materiais biologicamente degradáveis, como material para fixação de fraturas craniomaxilofaciais em crianças e adultos, vem abrindo caminho para as cirurgias de deformidades faciais, que também irão se beneficiar do desenvolvimento destes materiais.

## 2.3 TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

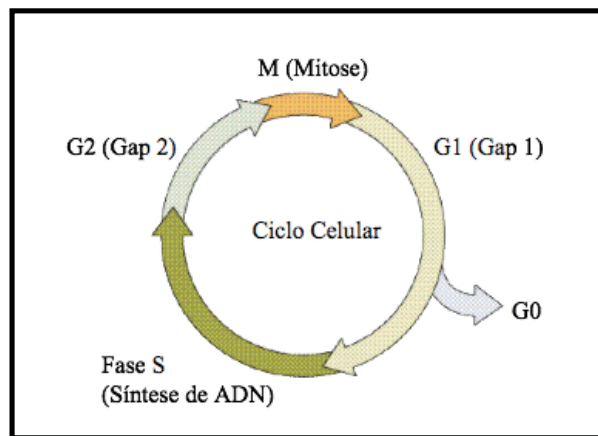
O padrão internacional (ISO 10993) coloca exigências específicas para a biocompatibilidade, inclusive padrões para testes baseados na natureza de contato e na duração da implantação do biomaterial. Tais padrões estipulam que todos os materiais que entrarem em contato por mais de trinta dias com a mucosa, osso, ou tecido dental, como também todos os dispositivos de implante cujo contato exceder 24 horas, têm de sofrer prova de genotoxicidade (CHAUVEL-LEMBRET *et al.*, 2001).

A genotoxicidade é uma especialidade relativamente recente que se situa na interface entre toxicologia e genética, por isso também é denominada de genética toxicológica. Visa ao estudo dos processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química, o DNA (ácido desoxirribonucléico), processo este classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético a níveis celulares ou orgânicos, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese. Estas três especialidades são agrupadas em uma área de estudo, pois um mesmo processo ou produto pode produzir os três efeitos (a mutagênese, a carcinogênese e a teratogênese) (HENRIQUES *et al.*, 2003).

Inúmeras técnicas que detectam danos no DNA têm sido utilizadas para identificar substâncias com atividade genotóxica. O teste de micronúcleos em eritrócitos policromatófilos (EPC) é um teste padrão de mutagenicidade cromossômica (HENRIQUES *et al.*, 2003).

Quanto às fases de divisão celular, o ciclo celular pode ser dividido em G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, fase S, G<sub>2</sub> e mitose. O período G<sub>0</sub> ocorre entre duas divisões celulares, quando a célula

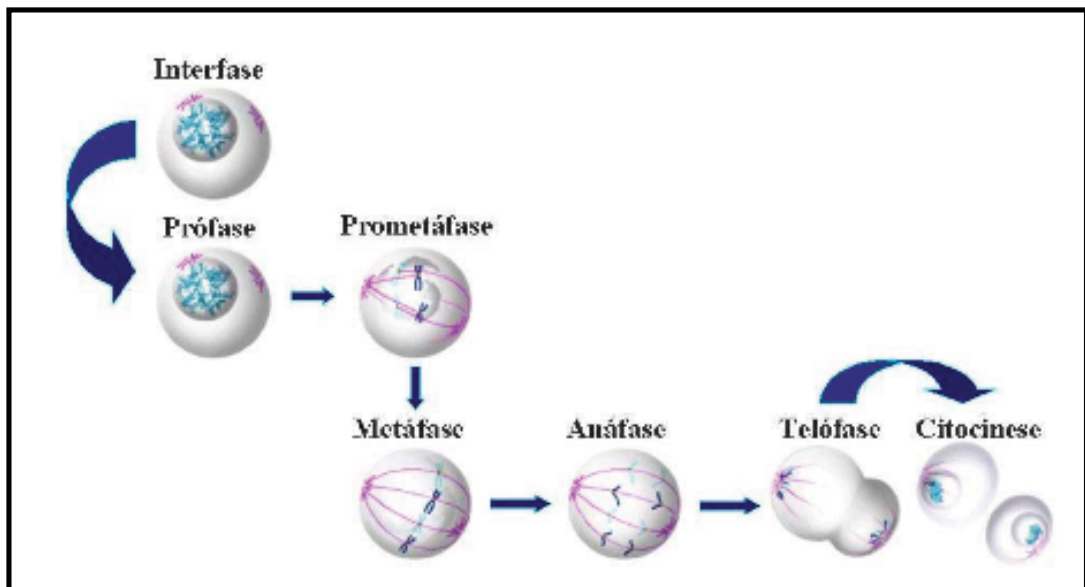
não se divide, como ocorre com a maioria dos linfócitos e eritrócitos presentes no sangue periférico (ZAGO et al., 2001).



**Figura 1.** Fases do ciclo celular (Zago et al., 2001).

A célula depende de estímulos externos para sair da fase G0 e dar continuidade ao ciclo celular. A fase de mitose é a mais importante, está dividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. Na metáfase os cromossomos estão localizados na placa equatorial da célula no seu estado mais condensado. Nesta fase são estudadas as aberrações cromossômicas instáveis, bem como é possível estudar o cariótipo na investigação de doenças hematológicas. Na anáfase as cromátides irmãs são separadas, e cada uma migra para as extremidades opostas das células que darão origem às células filhas. Na telófase ocorre a reconstituição da membrana nuclear e a divisão do citoplasma (citocinese), que dá origem às duas células filhas. Os micronúcleos, que resultam das aberrações cromossômicas instáveis ou de perdas de cromossomos inteiros, podem ser visualizados nesta etapa (ALBERTS et al., 1997).





**Figura 2.** Estágios da mitose (Alberts *et al.*, 1997)

Os micronúcleos são pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico dois núcleos são reconstituídos, um em cada polo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos cromossômicos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este também pode constituir um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo (HENRIQUES *et al.*, 2003; VILLELA *et al.*, 2003).

Os micronúcleos são estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir à perda do material genético (cromossomos inteiros ou fragmentados). O teste de micronúcleos, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (HENRIQUES *et al.*, 2003; VILLELA *et al.*, 2003).

A presença de micronúcleo pode ser tomada como indicação da existência prévia de aberração cromossômica. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes (MALUF *et al.*, 2001; HENRIQUES *et al.*, 2003). Processos físicos, químicos ou biológicos que interfiram no processo de ligação do cromossomo às microfibrilas do fuso (aneugênicos), e aqueles que quebram cromossomos (clastogênicos), podem induzir à perda de material genético, levando à genotoxicidade ou mutagenicidade. A análise de micronúcleos é usada como avaliação indireta de aberrações cromossômicas, apresenta alta correlação com a análise de aberrações cromossômicas, e uma vez que o eritrócito policromático (EPC) tem um ciclo preciso e uma idade limitada, o micronúcleo presente em EPC é sempre resultado de um evento recente (SCHMID, 1976; HENRIQUES *et al.*, 2003).

Com relação à avaliação de genotoxicidade para os polímeros biorreabsorvíveis de fixação óssea, apenas encontram-se trabalhos na literatura mostrando a ausência de efeitos citotóxicos do PLLA em nível de cultura celular (ISAMA e TSUCHIYA, 2003), porém ainda não há dados sobre a avaliação de micronúcleos relacionados ao uso de polímeros a base de PLLA.



**PROPOSIÇÃO**

---

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo avalia a histologia da reação tecidual local em calota craniana de ratos, frente à implantação de discos de poli (ácido L/D-láctico) e avalia também sua toxicidade genética pela indução de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC) na medula óssea dos mesmos

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o infiltrado inflamatório relacionado aos discos de poli (ácido L/D-láctico), em calota craniana de ratos, nos períodos de 15, 30, 90 e 120 dias de implantação, principalmente quanto ao contato direto com a duramáter;

- Avaliar se há reação inflamatória do tipo corpo estranho à implantação deste biomaterial;

- Avaliar a neoformação óssea nos defeitos induzidos na calota craniana;

- Avaliar se em 90 ou 120 dias haverá algum grau de reabsorção (degradação) do material testado;

- Investigar a toxicidade genética do poli (ácido L/D-láctico) pela indução de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC) na medula óssea de ratos.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

Esta pesquisa foi submetida à avaliação e à aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CCE-FO-PUCRS) e protocolado sob o número 072/08 (Anexo 1) bem como pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS) sob o registro 08/00066, ofício 020/09 (Anexo 2). Nesta pesquisa foram adotados os Princípios Éticos em Experimentação Animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Anexo 3), instituição filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science* e a Lei Arouca (Anexo 4). Foram utilizados instrumentais e materiais cirúrgicos dentro das normas de biossegurança padronizados para todos os grupos e esterilizados por autoclave a 135°C, equipamentos de proteção individual, além de sedativos, anestésicos e analgésicos para uso veterinário, e os materiais em teste embalados e esterilizados.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO

Esta pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, da Faculdade de

Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), como parte integrante da linha de pesquisa Diagnóstico e Terapêutica Aplicada.

#### 4.3 PROBLEMAS

a) Qual é a reação tecidual local desencadeada pela implantação de discos de poli (ácido L/D-láctico) em defeitos ósseos criados na calota craniana de ratos?

b) A implantação de discos de poli (ácido L/D-láctico) poderá induzir mutagenicidade?

#### 4.4 HIPÓTESES

a) os discos de poli (ácido L/D-láctico) implantados em calotas cranianas de ratos não desencadeiam reação inflamatória ou reação de corpo estranho quando avaliado histologicamente.

b) os discos de poli (ácido L/D-láctico) não desencadeiam mutagenicidade.



#### 4.5 CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA

Para composição da amostra desta pesquisa foram utilizados vinte e cinco (25) ratos albinos, da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, machos, com peso variando entre 200 e 300 gramas (g), clinicamente sadios e idade média de vida de 8 semanas.

Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) e mantidos durante todo o período experimental no Vivário da Faculdade de Farmácia da PUCRS (Sala 108, Bloco E, Prédio 12).

#### 4.6 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Para a avaliação da reação tecidual, 20 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 5 animais cada, de acordo com o período de eutanásia (15, 30, 90 e 120 dias). Cada animal fez parte do grupo experimental e do grupo controle ao mesmo tempo (Tabela 1).

Para a análise de genotoxicidade, dos 20 animais já operados, foram avaliados os grupos 90 e 120 dias de implantação, além dos 5 animais do grupo controle negativo (Tabela 2).

**Tabela 1.** Organização dos grupos para avaliação histológica. Dados da pesquisa (2009).

Grupo Experimental e Grupo Controle			
15 dias	30 dias	90 dias	120 dias
5 animais	5 animais	5 animais	5 animais

**Tabela 2.** Organização dos grupos para avaliação de genotoxicidade. Dados da pesquisa (2009).

	15 dias	30 dias	90 dias	120 dias
Grupo Controle	-	-	-	5 animais
Grupo Experimental	-	-	5 animais	5 animais

Os períodos de tempo de observação escolhidos foram 15, 30, 90 e 120 dias. Como o metabolismo do rato é muito rápido (LIEBSCHNER, 2004), o objetivo desta pesquisa era avaliar os resultados em períodos iniciais (15 e 30 dias) e tardios (90 e 120 dias).

Durante todo o período em que a pesquisa aconteceu, os animais ficaram alojados sob condições satisfatórias, em estante ventilada fechada (Estante ALE 9902.001 2 portas, Marca Alesco), com controle de temperatura e umidade, luz fria, entrada e saída de ar filtrado. Receberam alimentação do tipo sólida adequada aos mesmos e água *ad libitum* durante todo o experimento. Os mesmos foram mantidos em gaiolas tipo caixa plástica padronizadas, etiquetadas e identificadas com o número do grupo a que

pertencem, data de nascimento, peso, data da cirurgia, data do óbito, nome do pesquisador e orientador responsável pelo experimento.

Os procedimentos de manipulação e alimentação foram realizados diariamente, durante todo o período do experimento, seguindo a dieta padrão do Vivário, trocando-se a serragem e lavando-se as gaiolas com água corrente e sabão a cada 48 horas, de acordo com a rotina do Vivário.

#### 4.7 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para que os animais pudessem ser incluídos nesta pesquisa deveriam:

- ser da raça proposta;
- estar em bom estado nutricional;
- chegar ao final do período de observação com bom estado de saúde.

Os critérios para a exclusão dos animais foram a presença de complicações (infecções, necrose, deiscência de sutura, debilitação do estado geral) trazendo problemas e desconforto ao animal durante o período do experimento e no momento da morte dos mesmos.

Não houve nenhum animal excluído deste estudo. Porém houve o óbito espontâneo de um animal 7 dias antes da sua eutanásia.

#### 4.8 CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL UTILIZADO

Foram utilizados nesta pesquisa 20 discos de poli(ácido L/D-láctico) (95/5%), fabricados e fornecidos pela empresa NeoOrtho (NeoOrtho®, Curitiba, Paraná, Brasil). Os discos possuem 4 milímetros de diâmetro e 2 milímetros de espessura. O material ainda não possui um nome comercial (Figura 3).



**Figura 3.** Discos de poli(ácido L/D-láctico) (95/5%). NeoOrtho®, Curitiba, Paraná, Brasil  
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

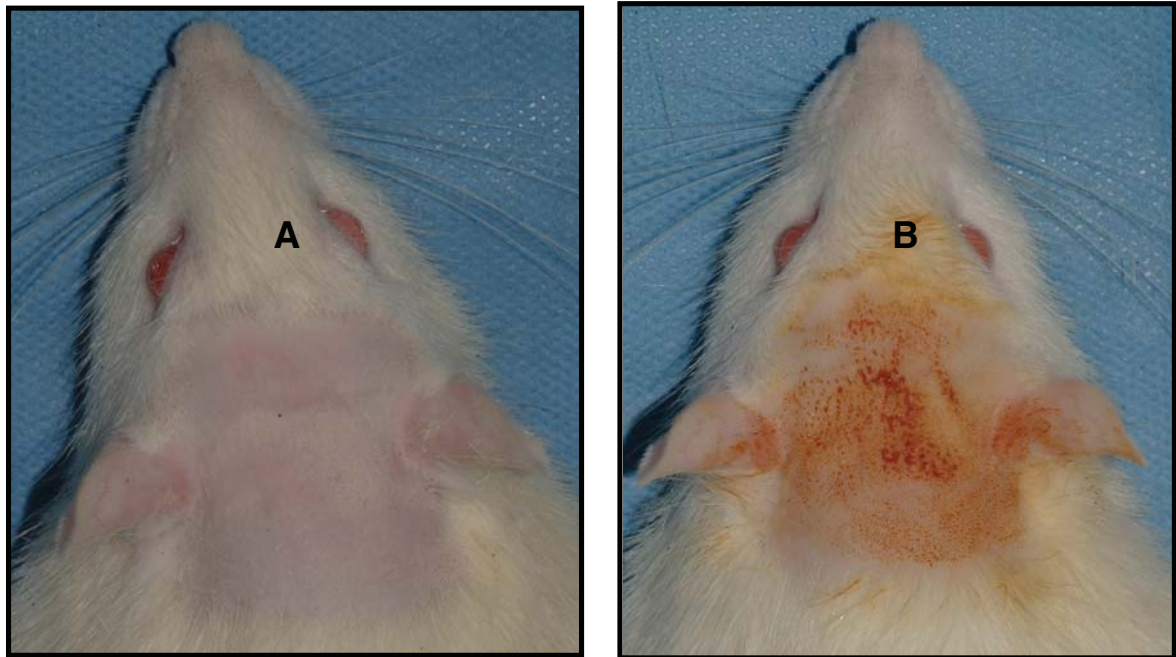
#### 4.9 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA AVALIAÇÃO TECIDUAL

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Aplicada (sala 148), da Faculdade de Farmácia da PUCRS, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Martha Campos e da Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente separado do ambiente de criação (Sala 108, Bloco E, Prédio 12). Assim sendo, os animais não foram expostos à tensão de ruídos, odores ou até mesmo visão dos procedimentos realizados.

Após a pesagem, os 25 animais foram submetidos à anestesia geral com Cloridrato de Ketamina (Dopalen®) 50mg/Kg (0,5ml/100g) e Cloridrato de Xilazina (Anasedan®) 5mg/Kg (0,025ml/100g) intraperitoneal, de acordo com as orientações do fabricante. Com a indução anestésica, esperou-se a perda de consciência, ausência de movimento, desaparecimento dos reflexos palpebrais, ritmo respiratório constante e principalmente a analgesia.

Nesta etapa, somente 20 animais sofreram procedimentos cirúrgicos. Os outros 5 animais receberam medicação pós-operatória da mesma maneira que os animais que foram operados. Com isto, esperou-se que os 5 animais que fizeram parte do grupo controle para avaliação da genotoxicidade recebessem as mesmas medicações pré e pós-operatórias que os animais que receberam o material em teste.

Uma vez atingido o estado anestésico, cada animal foi colocado sobre uma prancha cirúrgica, em decúbito ventral e imobilizado. Realizou-se a epilação na região fronto-parietal. A tricotomia foi realizada com o uso de um depilador apropriado para ratos. A antissepsia da região epilada foi realizada com PVP-I aquoso (Figura 4).



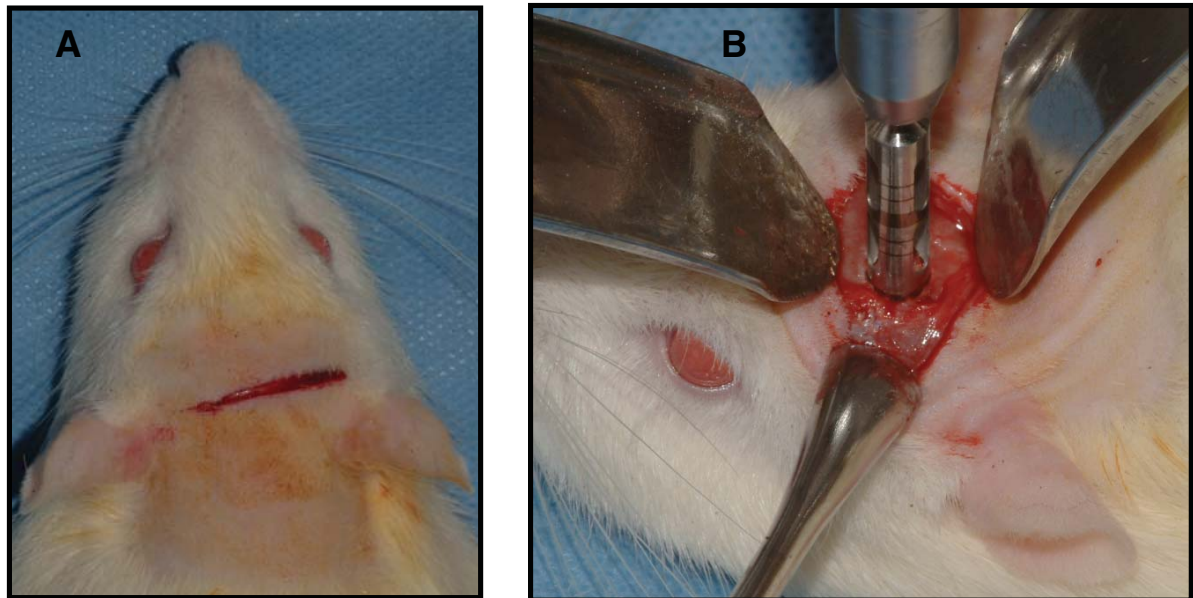
**Figura 4.** (A) Tricotomia e (B) Antissepsia  
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

A técnica operatória seguiu a mesma padronização para todos os animais, independente do grupo a que pertenciam e foi realizada por um único pesquisador, calibrado antecipadamente, com o intuito de proporcionar fidelidade nos procedimentos cirúrgicos realizados. Esta metodologia foi semelhante a outros trabalhos já realizados anteriormente na Faculdade de Odontologia – PUCRS (SAUERESSIG, 2005).

O acesso à calota craniana foi realizado por meio de uma incisão bicoronal, com 2,5 centímetros de extensão, realizada na pele e tecido subcutâneo, no centro da região fronto-parietal, com o uso de lâmina de bisturi número 15, montada em cabo de bisturi número 3 (Figura 5).

A pele e o tecido subcutâneo foram divulsionados com as pontas rombas de uma tesoura tipo *Metzemaum*, até que o periósteo estivesse exposto. Em seguida, o

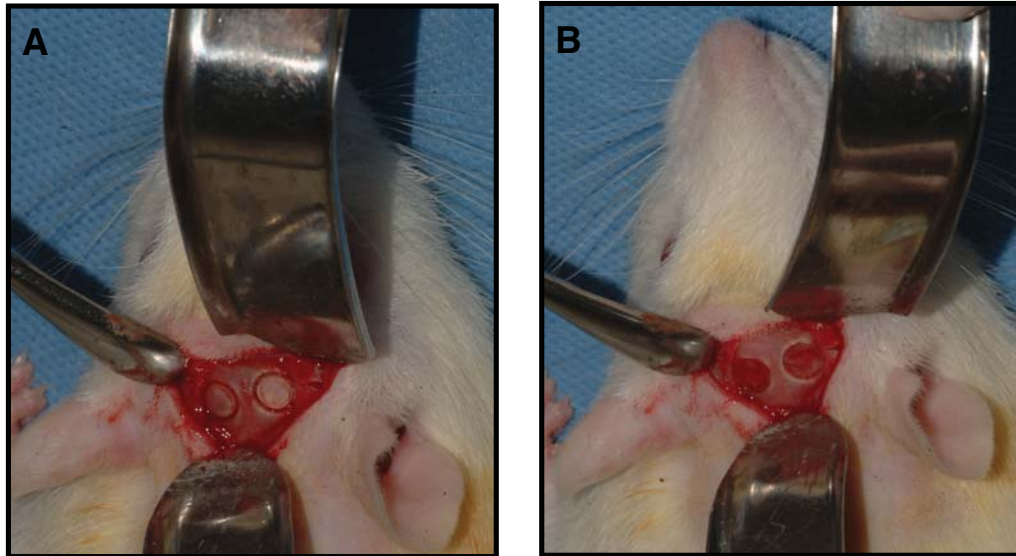
periósteo também foi incisado com a lâmina de bisturi número 15, montada em cabo de bisturi número 3.



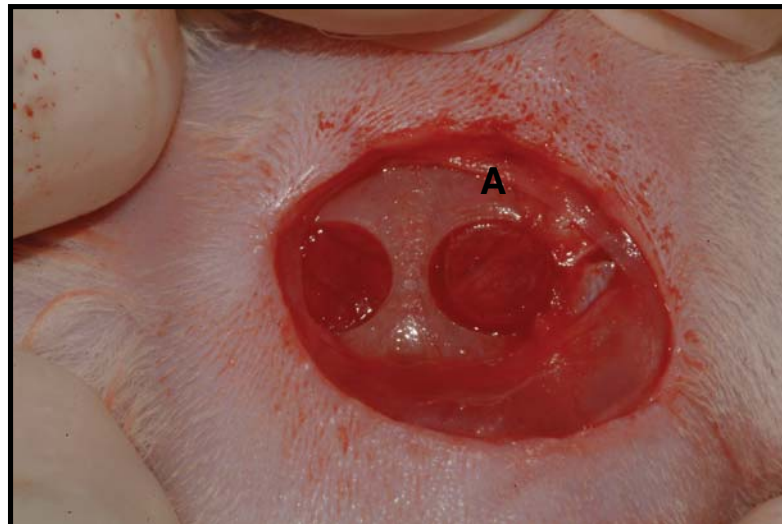
**Figura 5.** (A) Incisão bicoronal e (B) defeito ósseo sendo criado na calota craniana do rato com broca do tipo trefina  
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Após o descolamento do periósteo, foram realizadas duas ostectomias circulares, com broca do tipo trefina, de 4,1 milímetros de diâmetro, adaptada em peça de mão, montada em motor elétrico da Marca NSK com velocidade de 1200 rpm e irrigação constante com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (Figura 5). As perfurações da calota craniana foram realizadas uma em cada osso parietal, separadas pela sutura mediana parietal, na metade mais inferior destes e com aproximadamente 1 a 2 milímetros de profundidade (Figura 6). Na perfuração do lado direito foi inserido um disco de poli(ácido L/D-láctico), de tal maneira que fique em contato com a duramáter, inferiormente, e com o periósteo, superiormente. A perfuração do lado esquerdo foi

preenchida por coágulo sanguíneo do animal, servindo desta forma como grupo controle (Figura 7).



**Figura 6.** (A) Osteotomia realizada e (B) defeito ósseo criado na calota craniana do rato  
Fonte: Dados da pesquisa (2009).



**Figura 7.** (A) Defeito ósseo preenchido com discos de poli(ácido L/D-láctico)  
Fonte: Dados da pesquisa (2009).



A sutura dos planos anatômicos foi realizada com pontos interrompidos simples. Utilizou-se fio de nylon preto (5-0), de 45 centímetros de comprimento, montado em agulha atraumática semicircular de 1,5 centímetros de comprimento (Figura 8).



**Figura 8.** Sutura

Fonte: Dados da pesquisa (2009).

No pós-operatório imediato e nas primeiras 24 horas, administrou-se, intramuscular, o analgésico Tylenol® 200mg/mL, na dose de 80mg/Kg de peso corporal, de 12 em 12 horas. Após, foi diluído na água o analgésico Tylenol® 200mg/mL, na dose de 50mg/Kg de peso corporal, de 8 em 8 horas, durante os 2 dias seguintes de pós-operatório. Todos os animais foram acompanhados pela equipe da pesquisa durante o pré, trans e pós-operatório.

Ao final do procedimento os animais foram recolocados nas suas respectivas gaiolas do mesmo modo que no período pré-operatório. Foram examinados semanalmente, anotando-se as condições das feridas e suas complicações nas fichas individuais.

#### 4.10 PREPARO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A eutanásia dos animais foi realizada nos intervalos de tempo apropriados (15, 30, 90 e 120 dias após a cirurgia), por inalação contínua de isoflurano, até parada cardíaco-respiratória, evitando-se sofrimento e proporcionando uma manipulação mais correta, sob o ponto de vista bioético.

Após a constatação do óbito pela ausência dos sinais vitais, nos 20 animais operados para implantação dos discos de poli (ácido L/D-láctico) realizou-se o acesso à calota craniana através de uma incisão transversal linear na região cervical, na base do occipital, seguida pela dissecação da pele e tecido subcutâneo e retirada da calota craniana (periósteo e osso parietal) com o auxílio de brocas cilíndricas número 701 adaptadas em peça de mão, montadas em motor de baixa rotação, e sob irrigação constante com solução de cloreto de sódio 0,9%.

As amostras foram colocadas em vidros previamente preparados e identificados com etiquetas, contendo solução de formalina tamponada a 10%, e mantidas por um período mínimo de 48 horas, tempo necessário para a fixação, até o momento do seu processamento (Tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição das amostras a serem obtidas, em cada grupo. Dados da pesquisa (2009).

Amostras		Região defeito por trefina
Grupo 15 dias	Grupo Experimental	5 amostras
	Grupo Controle	5 amostras
Grupo 30 dias	Grupo Experimental	5 amostras
	Grupo Controle	5 amostras
Grupo 90 dias	Grupo Experimental	5 amostras
	Grupo Controle	5 amostras
Grupo 120 dias	Grupo Experimental	5 amostras
	Grupo Controle	5 amostras

Cada recipiente foi identificado com a região, sítio ou órgão, o número código do animal e o grupo a que pertencem. Os restos mortais foram destinados ao lixo sanitário da PUCRS.

#### 4.11 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA A AVALIAÇÃO DA REAÇÃO TECIDUAL POR MICROSCOPIA ÓPTICA

O processamento histológico das amostras foi realizado no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, seguindo a rotina laboratorial padronizada. Para a avaliação através de Microscopia Óptica, as amostras passaram por um período de fixação (no mínimo 48 horas) em formalina tamponada 10% (pH 7,0). As amostras contendo tecido ósseo foram submetidas à descalcificação por solução de ácido nítrico aquoso a 5%, trocada diariamente, por 2 a 4 dias, e após procedeu-se ao corte da

peça na região central do defeito/disco em duas porções. Após as amostras foram submetidas ao processo de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os espécimes foram então emblocados em parafina e submetidos a cortes de 6  $\mu\text{m}$  em Micrótomo (Leica 2645), no sentido transversal ou longitudinal da calota, na porção de maior diâmetro dos discos de poli(ácido L/D-láctico). Em seguida, todas as lâminas obtidas foram submetidas à técnica histoquímica de coloração hematoxilina-eosina (H&E), e após o término do processamento estavam prontas para avaliação ao Microscópio Óptico.

As lâminas foram codificadas de modo que o observador não tivesse conhecimento do grupo a que pertenciam.

#### 4.12 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E ESTUDO MICROSCÓPICO

Para a avaliação da reação tecidual aos discos de poli(ácido L/D-láctico), foi realizada análise descritiva dos seguintes elementos (FIGUEIREDO *et al.*, 2001):

- infiltrado inflamatório
- polimorfonucleares neutrófilos
- neoformação vascular
- macrófagos
- fibroplasia

- neoformação óssea

Cada elemento foi descrito da seguinte forma: (1) ausência (nenhuma ou até 2 células no campo), (2) presença em quantidade discreta e relacionada ao material teste (presença de células em até 20% do campo) e (3) presença em quantidade moderada a intensa e relacionada ao material teste (células em mais de 20% do campo). As lâminas foram avaliadas nos aumentos de 40 vezes, 100 e 200 vezes.

#### 4.13 PROCESSAMENTO PARA AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE

O processamento das amostras para avaliação da genotoxicidade foi realizado pelo Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica - ROYAL, Unidade Genotox - Royal (Anexo 5). Após a constatação do óbito dos animais, ambos os fêmures de cada animal foram removidos e o conteúdo da medula óssea foi extraído com instrumento adaptado para tal, semelhante a um calcador, diretamente sobre uma lâmina com uma gota de soro bovino fetal, e homogeneizada. Com este material foi feito um esfregaço, obtendo-se duas lâminas de cada fêmur. As lâminas foram secas, fixadas em metanol e coradas uma lâmina de cada fêmur com Giemsa e a outra com *Acridine Orange*. Após a coloração, as lâminas foram enxaguadas em água destilada, secas e analisadas.

Uma série de campos ao acaso foram observados com objetiva de imersão, no aumento de 100 vezes. Foi determinada, em microscópio óptico, a relação EPC em 1000 eritrócitos (500 por lâmina) nas lâminas coradas com Giemsa. As lâminas coradas com *Acridine Orange* foram analisadas em microscópio de fluorescência, sendo avaliados

2.000 EPC de cada animal, sendo 1.000 EPC de cada lâmina, registrando-se a frequência de micronúcleos por lâmina e por animal. Todas as lâminas do ensaio foram analisadas pelo mesmo técnico.

#### 4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização dos testes estatísticos, utilizou-se o software SPSS 11.0 for Windows.

Os resultados obtidos foram tabulados e analisados utilizando o teste de heterogeneidade Qui-quadrado (ZAR, 1974). O grupo de controle negativo foi considerado como padrão normal, e todos os outros comparados com ele, separadamente e combinados. Estes foram analisados pelo teste *Dunnet's Multipli Comparison Test* e o nível de significância mínimo foi de 5%. No caso de ocorrer heterogeneidade dentro dos grupos, o teste utilizado seria o teste de Kruskal-Wallis (SOKAL e ROLF, 1969). Foi considerada a mutagenicidade quando as lâminas do grupo com poli(ácido L/D-láctico) apresentaram o dobro da frequência de EPC com micronúcleos que as lâminas do controle negativo em, pelo menos, um grupo teste ou quando o aumento de mutações nas lâminas do grupo com poli (ácido L/D-láctico) foi estatisticamente significativo, pelo menos com a significância de  $p < 0,05$ .



**RESULTADOS**

---

## **5 RESULTADOS**

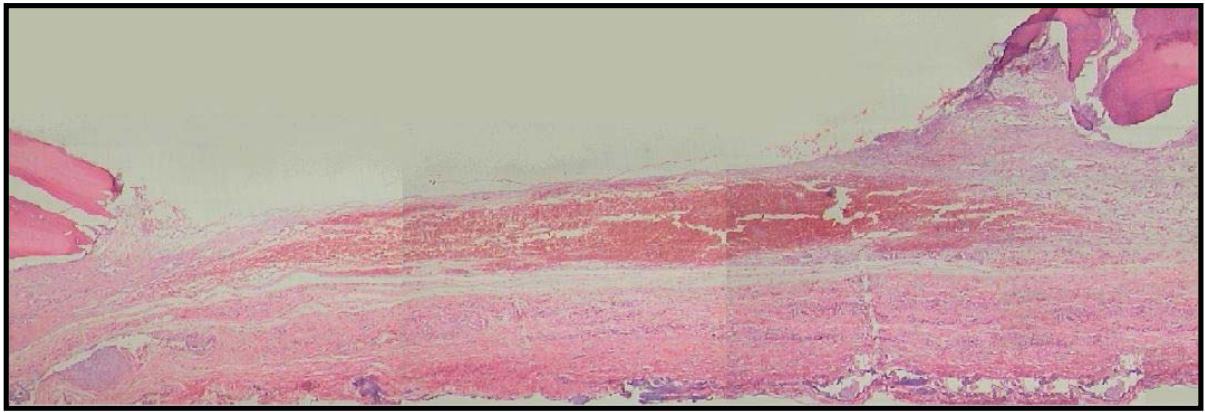
Durante todo o período de observação desta pesquisa, os animais permaneceram saudáveis, com cicatrização normal e sem evidências de infecção da região operada ou deiscência de sutura.

### **5.1 RESULTADOS DESCRITIVOS DA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA**

#### **5.1.1. Período de avaliação 15 dias**

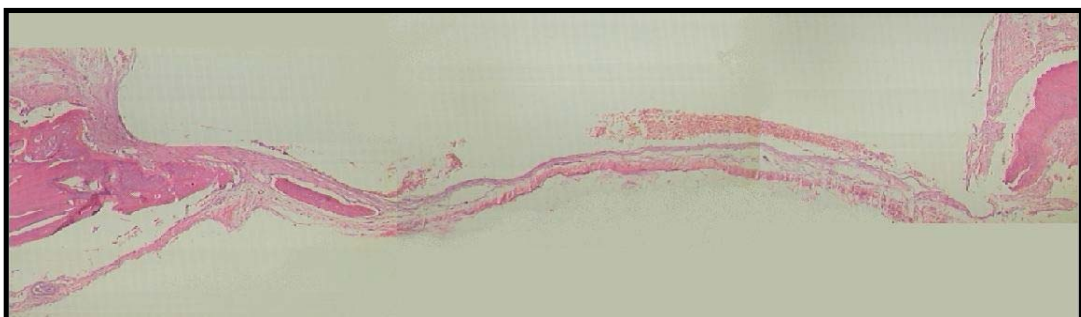
Grupo controle: o defeito ósseo apresentou-se nítido e bem evidenciado. Não houve neoformação óssea em nenhuma região do defeito. Observou-se na área central do defeito, área de contato com a duramáter, a formação de uma grande quantidade de tecido conjuntivo desorganizado, infiltrado inflamatório crônico discreto, alguns vasos sanguíneos neoformados e muitas hemácias (hemorragia) dentro do tecido de granulação. Nos campos estudados, não foram observados episódios de necrose óssea, somente processo de remodelamento ósseo por reabsorção nas bordas do defeito devido à ostectomia (Figura 9).





**Figura 9.** Defeito controle aos 15 dias de observação. Observação do coágulo preenchendo o defeito. Coloração HE (40X).  
Fonte: Dados da pesquisa (2009)

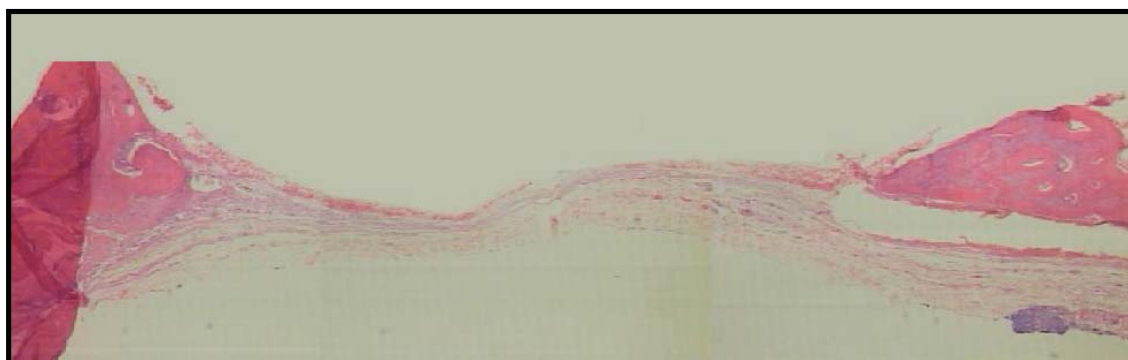
Grupo experimental: o defeito ósseo ocupado pelo disco de poli (ácido L/D-láctico) apareceu nítido e bem evidenciado. Não se observou neoformação óssea nas bordas do defeito. Notou-se que abaixo do disco de poli (ácido L/D-láctico) formou-se uma fina camada de tecido conjuntivo em contato com a duramáter, ainda desorganizado, com fibras colágenas mais frouxas, infiltrado inflamatório crônico discreto e poucas hemácias (hemorragia) no tecido conjuntivo. Nos campos estudados, não foram observados episódios de necrose, nem reação de corpo estranho (Figura 10).



**Figura 10.** Defeito experimental aos 15 dias de observação. Observação do espaço ocupado pelo disco de poli(ácido L/D-láctico). Coloração HE (40X).  
Fonte: Dados da pesquisa (2009)

### 5.1.2. Período de avaliação 30 dias

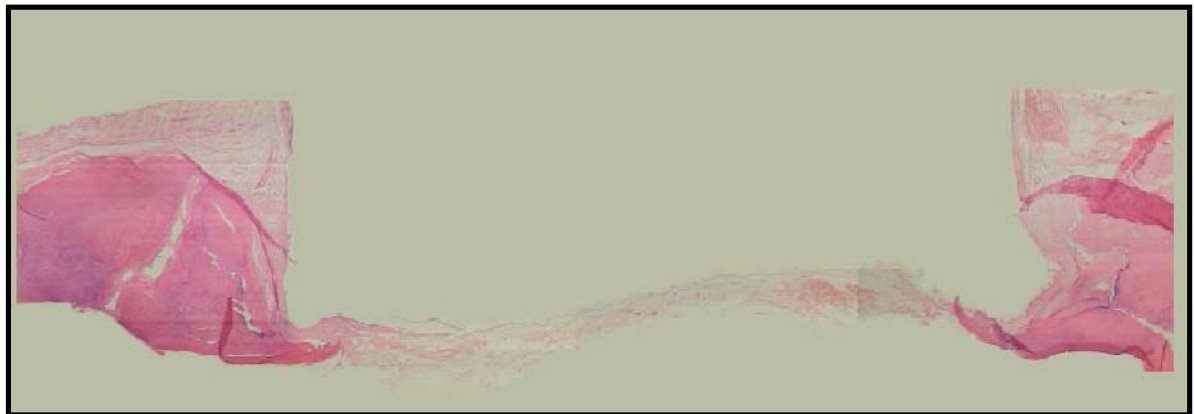
Grupo controle: o defeito ósseo apresentou-se nítido e bem evidenciado. Não há neoformação óssea em nenhuma região do defeito. Observou-se na área central do defeito, área em contato com a duramáter, a formação de uma menor quantidade de tecido conjuntivo, porém mais organizado, com fibras colágenas em arranjo paralelo, ausência de infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos neoformados e hemácias acima do tecido conjuntivo. Nos campos estudados, não foram observados episódios de reabsorção óssea nem reação de corpo estranho (Figura 11).



**Figura 11.** Defeito controle aos 30 dias de observação. Observação do tecido conjuntivo fibroso preenchendo o defeito. Coloração HE (40X).  
Fonte: Dados da pesquisa (2009)

Grupo experimental: o defeito ósseo ocupado pelo disco de poli (ácido L/D-láctico) apareceu nítido e bem evidenciado. Observou-se a neoformação óssea nas bordas do defeito, migrando abaixo do local ocupado pelo disco de poli (ácido L/D-láctico) seguindo a delimitação dada pela duramáter. Notou-se que abaixo do disco formou-se uma fina camada de tecido conjuntivo, ainda desorganizado, com fibras colágenas mais frouxas,

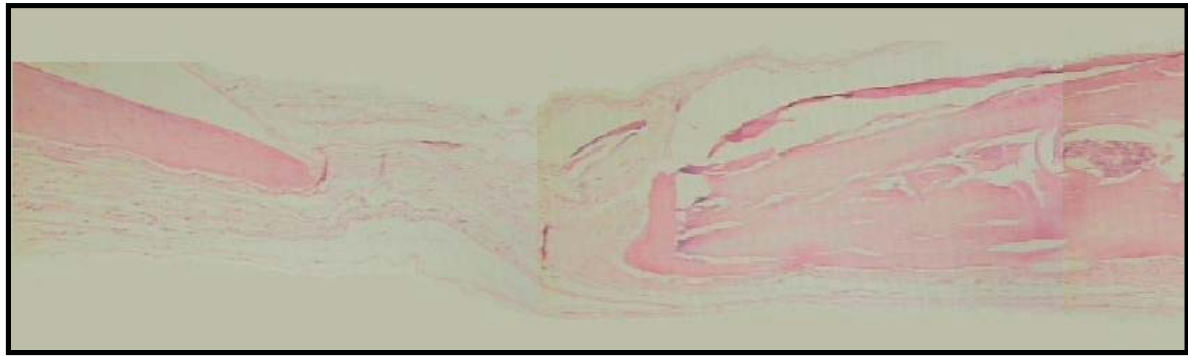
infiltrado inflamatório crônico discreto e poucas hemácias (hemorragia) no tecido conjuntivo (Figura 12).



**Figura 12.** Defeito experimental aos 30 dias de observação. Observação do espaço ocupado pelo disco de poli(ácido L/D-láctico). Coloração HE (40X).  
Fonte: Dados da pesquisa (2009)

### 5.1.3. Período de avaliação 90 dias

Grupo controle: o defeito ósseo apresentou-se nítido e bem evidenciado. Neste período as lâminas avaliadas já mostravam neoformação óssea nas bordas do defeito. O tecido ósseo neoformado apresentou-se bem celularizado. Observou-se na área central, em contato com a duramáter, a presença de tecido conjuntivo organizado, com fibras colágenas distribuídas de forma paralela e organizada, ausência de infiltrado inflamatório e vascularização normal (Figura 13).



**Figura 13.** Defeito controle aos 90 dias de observação. Observação do tecido conjuntivo fibroso preenchendo o defeito e da diminuição do diâmetro do defeito. Coloração HE (40X).  
Fonte: Dados da pesquisa (2009)

Grupo experimental: o defeito ósseo ocupado pelo disco de poli (ácido L/D-láctico) apareceu nítido e bem evidenciado. Houve neoformação óssea nas bordas do defeito e migrando abaixo do local ocupado pelo disco de poli (ácido L/D-láctico) em contato com a duramáter. O tecido ósseo neoformado apresentou-se bem celular. Notou-se que abaixo do disco formou-se uma fina camada de tecido conjuntivo organizado e com fibras colágenas mais frouxas, ausência de infiltrado inflamatório e hemácias (Figura 14).



**Figura 14.** Defeito experimental aos 90 dias de observação. Observação do espaço ocupado pelo disco de poli(ácido L/D-láctico) e da neoformação óssea abaixo do disco. Coloração HE (40X).  
Fonte: Dados da pesquisa (2009)

#### 5.1.4. Período de avaliação 120 dias

Grupo controle: o defeito ósseo apresentou-se nítido e bem evidenciado. Neste períodos as lâminas avaliadas já mostravam neoformação óssea nas bordas ósseas, com redução visível do diâmetro do defeito. O tecido ósseo neoformado apresentou-se bem celularizado. Observou-se na área central do defeito a presença de tecido conjuntivo organizado, com fibras colágenas distribuídas de forma paralela e organizada, ausência de infiltrado inflamatório e vascularização normal (Figura 15).



**Figura 15.** Defeito controle aos 120 dias de observação. Observação do tecido conjuntivo fibroso preenchendo o defeito e da diminuição do diâmetro do defeito pela neoformação óssea nas margens do defeito. Coloração HE (40X).

Fonte: Dados da pesquisa (2009)

Grupo experimental: o defeito ósseo, ou seja, local ocupado pelo disco de poli (ácido L/D-láctico) apareceu nítido e bem evidenciado. Houve neoformação óssea nas bordas do defeito e migrando abaixo do local ocupado pelo disco. O tecido ósseo neoformado apresentou-se bem celular. Notou-se que abaixo do disco de poli (ácido L/D-láctico), em contato com a duramáter, formou-se uma fina camada de tecido conjuntivo

organizado e com fibras colágenas mais frouxas, ausência de infiltrado inflamatório e hemácias (Figura 16).

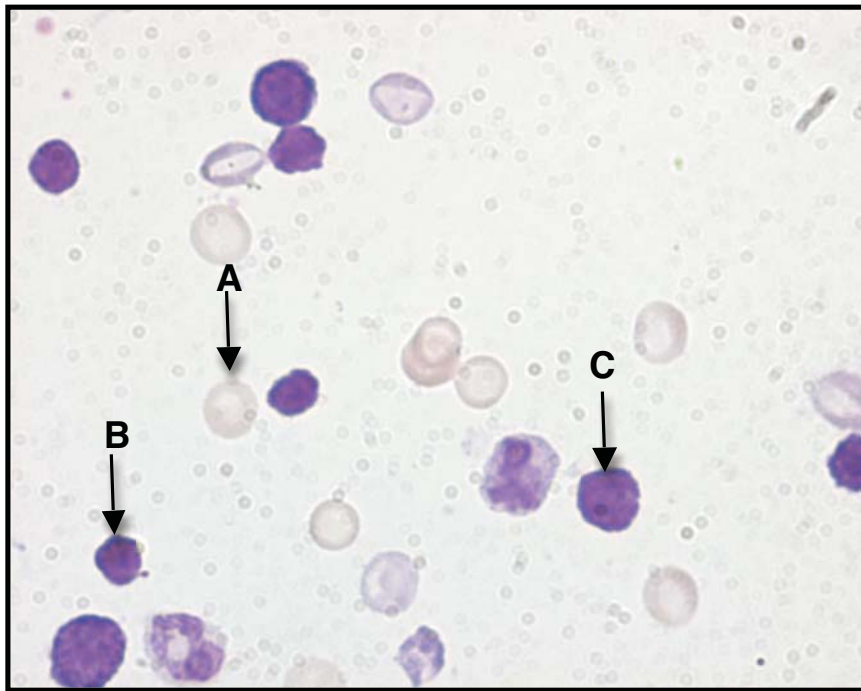


**Figura 16.** Defeito experimental aos 120 dias de observação. Observação do espaço ocupado pelo disco de poli(ácido L/D-lático) e da neoformação óssea abaixo do disco. Coloração HE (40X).

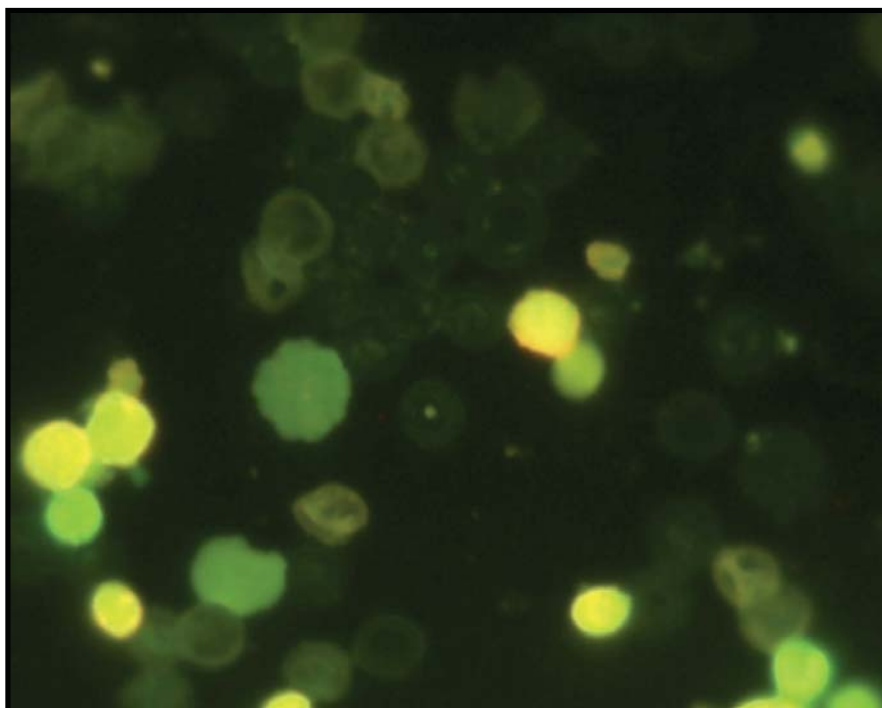
Fonte: Dados da pesquisa (2009)

## 5.2 RESULTADO DA AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE

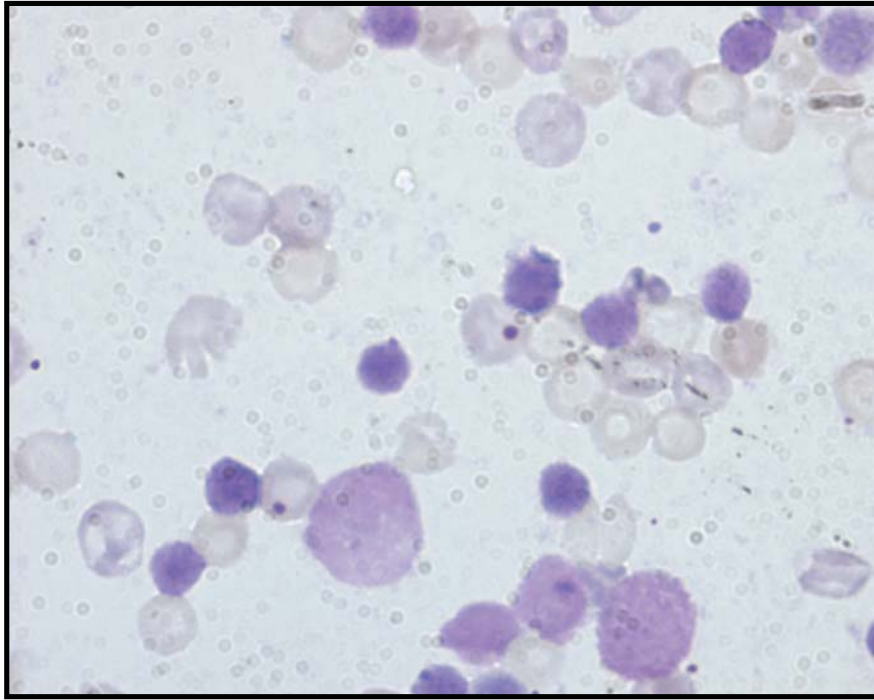
Para a avaliação da capacidade de discos de poli(ácido L/D-lático) implantados em ratos induzir mutações cromossômicas, foi realizado o Teste de Micronúcleos em eritrócitos policromatófilos (EPC) da medula óssea. Para tal, realizou-se este teste em 5 ratos do grupo 90 dias, 5 ratos do grupo 120 dias e 5 animais em que não foram inseridos nenhum disco, que fizeram parte do grupo controle negativo. Analisou-se a proporção de eritrócitos policromatófilos (EPC) e presença de micronúcleos. Para tal, utilizou-se as colorações das lâminas com Giemsa (Figuras 17, 19 e 21) e com *Acridine Orange* (Figuras 18, 20 e 22).



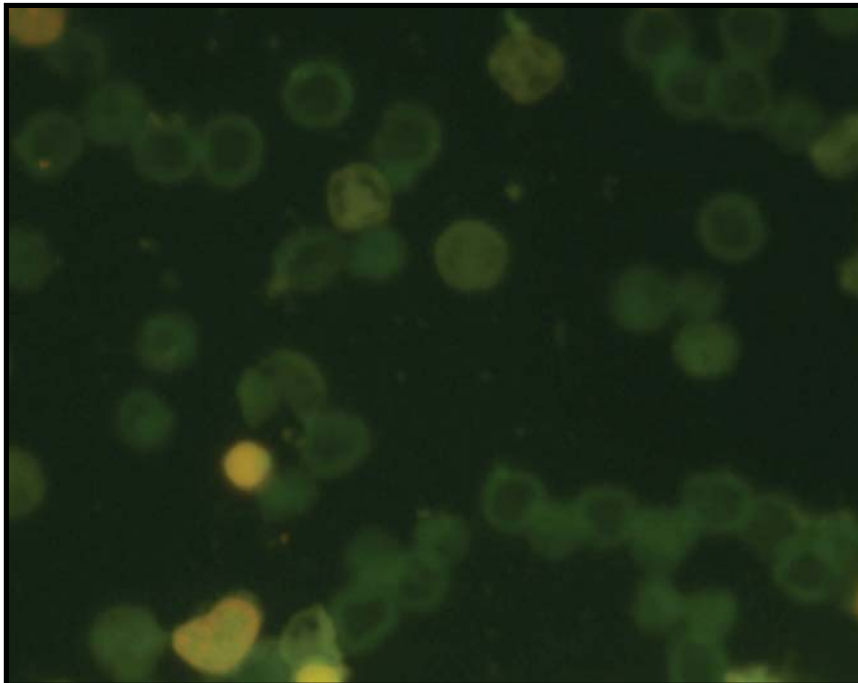
**Figura 17.** Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilos em medula óssea de ratos, no grupo em que nenhum disco de poli(ácido L/D-láctico) foi implantado. Grupo controle negativo. Lâminas coradas com Giemsa. (A) eritrócito normocromático; (B) eritrócito policromatófilo; (c) eritrócito policromático micronucleado. Fonte: Dados da pesquisa (2009)



**Figura 18.** Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilos em medula óssea de ratos, no grupo em que nenhum disco de poli(ácido L/D-láctico) foi implantado. Grupo controle negativo. Lâminas coradas com *Acridine Orange*. Fonte: Dados da pesquisa (2009)

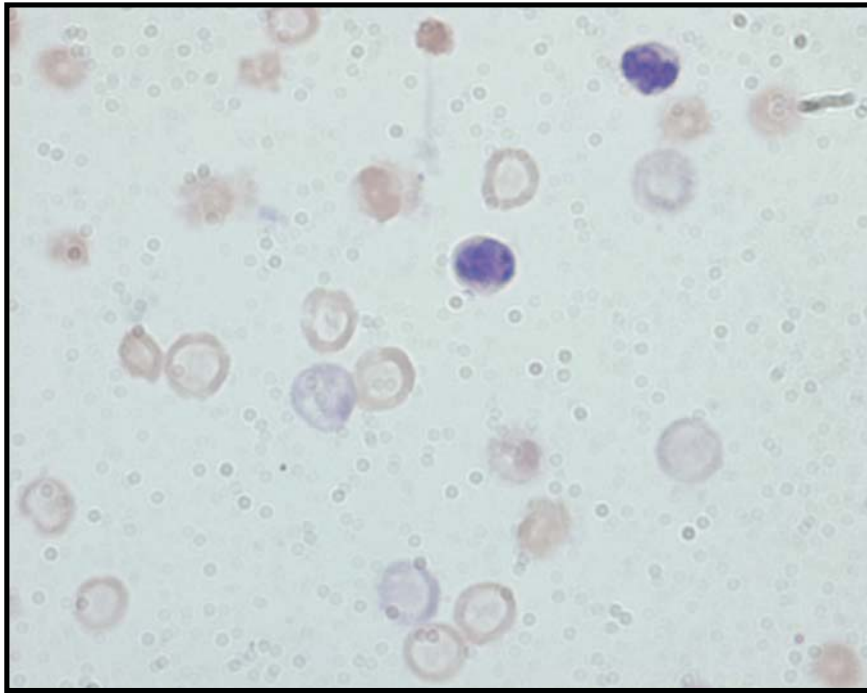


**Figura 19.** Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilos em medula óssea de ratos, no grupo em que discos de poli(ácido L/D-láctico) estiveram implantados por um período de 90 dias. Lâminas coradas com Giemsa. Fonte: Dados da pesquisa (2009)

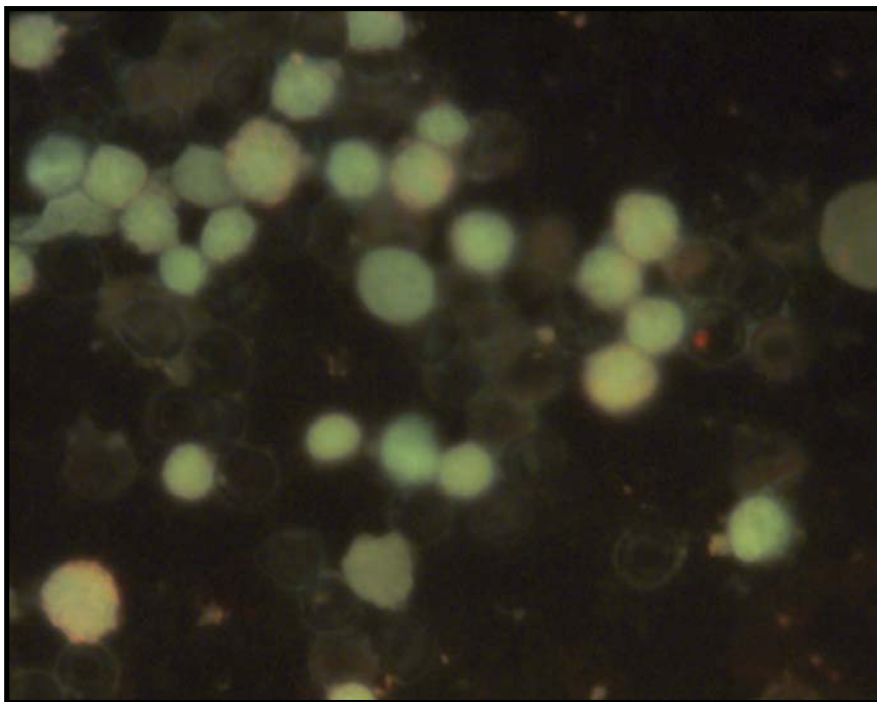


**Figura 20.** Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilos em medula óssea de ratos, no grupo em que discos de poli(ácido L/D-láctico) estiveram implantados por um período de 90 dias. Lâminas coradas com *Acridine Orange*. Fonte: Dados da pesquisa (2009)





**Figura 21.** Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilos em medula óssea de ratos, no grupo em que discos de poli(ácido L/D-láctico) estiveram implantados por um período de 120 dias. Lâminas coradas com Giemsa.  
Fonte: Dados da pesquisa (2009)



**Figura 22.** Avaliação da presença de eritrócitos policromatófilos em medula óssea de ratos, no grupo em que discos de poli(ácido L/D-láctico) estiveram implantados por um período de 120 dias. Lâminas coradas com *Acridine Orange*.  
Fonte: Dados da pesquisa (2009)

### 5.2.1 Proporção de Eritrócitos Policromatófilos (EPC)

Para a avaliação da proporção de eritrócitos policromatófilos (EPC) foram contados, de cada animal, 1000 eritrócitos. A redução nos mesmos pode significar toxicidade sobre a medula óssea, e pode produzir, eventualmente, falsos negativos. Os números referentes aos EPC em 1000 eritrócitos são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Ensaio de Micronúcleos. Número de Eritrócitos Policromatófilos (EPC) em 1000 eritrócitos, média e desvio padrão por grupo.

Grupo	Fêmuress	Número de EPC em 1000 eritrócitos					Por grupo Média ± dp
		Individual					
C -	A	359	300	330	303	281	626,4 ± 40,4
	B	305	320	324	330	280	
	Σ	664	620	654	633	561	
90 dias	A	270	300	340	321	-	617,0 ± 46,8
	B	280	342	315	300	-	
	Σ	550	642	655	621	a	
120 dias	A	375	350	378	290	300	668,2 ± 50,1
	B	300	353	350	322	323	
	Σ	675	703	728	612	623	

a- óbito espontâneo uma semana antes do abate.

De acordo com a avaliação estatística realizada, não foi detectada redução significativa ( $p < 0,05$ ) da frequência de EPC em relação ao controle negativo em nenhum grupo (ANOVA, *Dunnett's Multiple Comparison Test* e *Student t-tests*).

## 5.2.2 Avaliação dos Micronúcleos

Para a avaliação da presença de micronúcleos (mEPC), foram analisados 2.000 eritrócitos policromatófilos (EPC) por animal. Foram analisados 1000 EPC por lâmina, de cada animal foram analisadas duas lâminas diferentes. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Ensaio de Micronúcleos. Número de Eritrócitos Policromatófilos com micronúcleos (mEPC) em 1000 eritrócitos, média e desvio padrão por grupo.

Grupo	Fêmuress	mEPC em 2000 EPC					Por grupo Média ± dp
		Individual					
C -	A	3	0	1	4	4	5,0 ± 3,2
	B	4	1	2	5	1	
	Σ	7	1	3	9	5	
90 dias	A	4	2	0	0	-	2,7 ± 2,3
	B	2	1	1	1	-	
	Σ	6	3	1	1	a	
120 dias	A	6	7	2	3	3	8,8 ± 4,3
	B	5	7	4	0	7	
	Σ	11	14	6	3	10	

a- óbito espontâneo uma semana antes do abate.

De acordo com a análise estatística realizada, nenhuma diferença entre os grupos foi detectada, não foi detectado aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos EPC com micronúcleos, a frequência não dobrou e não houve correlação dose-resposta (ANOVA, *Dunnett's Multiple Comparison Test e Student t-tests*).



**DISCUSSÃO**

---

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente inúmeras pesquisas demonstram resultados positivos em relação ao uso dos materiais reabsorvíveis para a fixação interna rígida dos segmentos ósseos osteotomizados. Estudos *in vitro* (TAMS *et al.*, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2001; COX *et al.*, 2003; CILASUN *et al.*, 2006) e estudos *in vivo*, acompanhamentos clínicos e radiográficos (BERGSMA *et al.*, 1995; PELTONIEMI *et al.*, 1999; EDWARDS *et al.*, 2001; EPPLEY *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2004; PIHLAJAMÄKI *et al.*, 2006; LAUGHLIN *et al.*, 2007; WALTON e COTTON, 2007) comprovam suas qualidades biomecânicas em conter os segmentos ósseos durante o período de consolidação/cicatrização, além da ausência de reação tecidual inflamatória e de corpo estranho. Estudos de citotoxicidade e cultura celular (ISAMA e TSUCHIYA, 2003) foram desenvolvidos para entender o efeito sistêmico induzido pelos polímeros reabsorvíveis, principalmente o PLLA, em nível celular.

A principal indicação para o uso de placas e parafusos reabsorvíveis são crianças e jovens em fase de crescimento. Neste grupo, o uso destes polímeros elimina os riscos potenciais do metal e a necessidade de um segundo procedimento para remoção deste dispositivo de fixação (EDWARDS *et al.*, 2001; EPPLEY *et al.*, 2004; CILASUN *et al.*, 2006;). Diversos estudos já documentam o uso destes polímeros em crianças, principalmente na cirurgia craniofacial. O surgimento de complicações documentadas nesta população é limitado. Em um estudo retrospectivo de 1883 craniossinostoses em crianças de até 2 anos de idade, foram observadas poucas complicações e a taxa de complicações que necessitou de reparação ficou em 0,3%. Este trabalho documenta a segurança e o longo tempo de uso de fixação reabsorvível, e conclui que a fixação óssea reabsorvível para calotas cranianas em crescimento rápido tem menor potencial de

complicações que o tradicional uso de placas metálicas, parafusos e fios (EPPLEY *et al.*, 2004).

Existem disponíveis no mercado diversos materiais para fixação óssea reabsorvíveis e as associações de polímeros são várias. Cada associação possui uma particularidade na biomecânica ou no tempo de reabsorção do material. Os relatos na literatura de algumas reações adversas ao PLLA, relacionadas a uma possível segunda fase de degradação, mais lenta e relacionada à cristalinidade do material, depende basicamente do peso molecular inicial e níveis de monômeros residuais do material, o que varia de acordo com cada fabricante (WALTON e COTTON, 2007). Desta forma, é muito importante a realização de estudos *in vitro* e *in vivo*, tanto em nível celular como em nível sistêmico, avaliando o grau de toxicidade dos materiais a serem utilizados.

Quanto à reação tecidual local, foi observado, neste trabalho, que nos períodos precoces do contato dos discos de poli(ácido L/D-láctico), implantados em defeitos ósseos criados em calotas cranianas de ratos, ocorreu a formação de um tecido conjuntivo fibroso, e inicialmente desorganizado, circunscrevendo o material. Já no grupo controle, este tecido conjuntivo preenchia toda a área central do defeito ósseo.

Nos períodos de 15 e 30 dias ainda podiam ser vistas hemácias no interior do tecido conjuntivo que preenchia o defeito ósseo, porém estas provavelmente eram originadas do trauma resultante da realização da ostectomia. Porém a presença dos discos de poli(ácido L/D-láctico) serviu como um tampão compressivo, contendo esse sangramento tecidual, pois no grupo controle negativo a quantidade de hemácias nos tecidos era visivelmente maior do que no grupo onde os discos foram inseridos.

Durante todo o período em que o estudo ocorreu, observou-se a presença de infiltrado inflamatório de baixa intensidade característico de processos de reparo ósseo

normais. Quando este esteve presente, foi discreto, com menos de 20 células do tipo linfo-plasmocitárias por lâmina avaliada, tanto no grupo controle quanto no grupo em que os discos foram inseridos e somente nos grupos até 30 dias. Estes dados concordam com os estudos de Hochuli-Vieira *et al.* (2005) e Pihlajamäki *et al.* (2006), que relataram não encontrar complicações inflamatórias com o uso dos materiais reabsorvíveis para fixação, nem reação de corpo estranho.

No período do estudo não foram observadas células gigantes multinucleadas nem macrófagos, dado este que concorda com os achados de Walton e Cotton (2007), que só observaram estas células num período mais avançado da pesquisa, ao final do primeiro ano de implantação do material. Os autores comentam que a primeira reação tecidual encontrada ocorre nos primeiros 3 meses, e após o material testado passa por um período não reativo. E a segunda reação tecidual está associada aos sinais iniciais de degradação estrutural do PLLA, porém isso só começa a acontecer após um ano da implantação do material.

Quanto ao reparo ósseo, durante os períodos mais tardios da pesquisa (90 e 120 dias), não foi observada degradação dos discos de poli(ácido L/D-láctico), e a área ocupada pelo disco se manteve a mesma. Porém ocorreu uma neoformação óssea nas margens do defeito, migrando sob o disco inserido. Este osso neoformado apresentou-se celularizado, contendo numerosos osteoblastos. Esses achados também concordam com o trabalho de Walton e Cotton (2007), que relataram que nos primeiros 3 meses observaram o material testado sendo circunscrito por um novo osso. Mollaoglu *et al.* (2003) concluem que em 60 dias os parafusos de LactoSorb® induziram à formação óssea sem causar reações adversas de resposta tecidual, porém no período estudado o material não apresentou biodegradação significativa, concordando com nossos resultados.

Hochuli-Vieira *et al.* (2005) observaram que, após 60 dias de estudo, o dispositivo biorreabsorvível à base de PLLA utilizado para fixação interna rígida de fraturas mandibulares em coelhos permitiu o reparo ósseo, similar aos grupo fixado com titânio. Os resultados da presente pesquisa não permitem associações com resistência mecânica do dispositivo à base de PLLA, visto que se realizou apenas o estudo histológico, mas demonstram que não há processo inflamatório relacionado ao uso do dispositivo de fixação à base de PLLA que cause o impedimento do adequado reparo ósseo na calota.

Quanto ao contato dos discos de poli(ácido L/D-láctico) com a duramáter, tecido crítico, não houve nenhuma complicação do tipo convulsão pós-operatória, perda de capacidade motora dos animais ou déficit de alimentação. O tecido conjuntivo que se formou em contato com a duramáter não apresentou infiltrado inflamatório nem reação de corpo estranho. Estes achados concordam com os de Peltoniemi *et al.* (1999) que avaliaram o contato de parafusos de PLLA e PGA em contato com a duramáter, e observaram que logo em seguida, se formou um tecido conjuntivo entre o ápice dos parafusos e a dura, e que esta se manteve contínua durante todo o estudo. Este é um trabalho crítico do ponto de vista de risco de morte do animal se o material não for biologicamente tolerado. Impurezas em nível ultraestrutural, pH e toxicidade em nível celular poderiam ser determinantes para a sobrevivência dos animais utilizados nesta pesquisa, já que o material testado foi inserido em contato direto com a duramáter.

A implantação de forma crítica do ponto de vista cirúrgico sobre a duramáter não está descrita na literatura de forma consensual, pois foi encontrado apenas um trabalho publicado (PELTONIEMI *et al.*, 1999). Com este presente trabalho demonstra-se que a formulação presente no disco de poli(ácido L/D-láctico) é biologicamente aceita, mesmo em contato direto com a duramáter.



Nos períodos avaliados por este estudo, até 120 dias, não pôde ser observada a degradação do material. Estudos mostram que esta somente ocorre após o primeiro ano de implantação (BERGSMA *et al.*, 1995; WALTON e COTTON, 2007). Walton e Cotton (2007) relataram que após o primeiro ano ocorre a redução da massa do polímero, sendo substituído por um tecido fibroso relativamente avascular contendo macrófagos e ocasionalmente células gigantes multinucleadas na superfície do material testado. Bergsma *et al.* (1995) relataram que após 5,7 anos de implantação, remanescentes do PLLA degradado estavam circunscritos por uma cápsula fibrosa densa, e a avaliação ultraestrutural mostrou cristais de PLLA internalizado por várias células.

Bergsma *et al.* (1995) e Walton e Cotton (2007) concordam que os dispositivos fabricados à base de PLLA somente, embora biocompatível, degrada de forma muito lenta, e os cristais resultantes desta degradação apresentam excessiva longevidade de degradação intra e extracelular.

Porém as associações do PLLA com outras substâncias ou sua modificação laboratorial têm conseguido solucionar este problema. Estudos incorporando o ácido glicólico (PGLA) mostram taxa de biodegradação mais rápida. Já a incorporação de hidroxiapatita ao PLLA mostra que os discos foram totalmente substituídos por osso num período de 4 a 6 anos (SHIKINAMI *et al.*, 2005), e a incorporação de proteínas ósseas bovinas morfogenéticas (BMP) ao PGLA demonstrou que após 4 semanas houve completa substituição por osso novo, demonstrando o potencial osteoindutivo desta associação (MIKI e IMAI, 1996).

Quanto ao possível potencial genotóxico dos polímeros reabsorvíveis, este trabalho demonstrou que até os 120 dias de implantação de discos de poli(ácido L/D-láctico) *in vivo* não foi detectada redução significativa da frequência dos eritrócitos policromatófilos

(EPC) nem o aumento significativo de micronúcleos nos EPC, o que poderia significar toxicidade sobre a medula óssea.

A ausência de genotoxicidade encontrada neste trabalho concorda com os resultados de Isama e Tsuchiya (2003). Quanto ao efeito nas culturas celulares, os autores observaram que o PLLA não afetou a proliferação de *mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells*, porém partículas de baixo peso molecular de PLLA aumentaram a diferenciação destas células, o que demonstrou que a osteocondutividade do PLLA implantado é baseada no efeito aumentado que estas partículas possuem.



**CONCLUSÕES**

---

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada, pode-se concluir que a implantação de discos de poli(ácido L/D-láctico) implantados em defeitos ósseos criados em calota craniana de ratos e em contato direto com a duramáter, nos períodos 15, 30, 90 e 120 dias não resultou em reação tecidual local compatível com reação de corpo estranho ou reabsorção óssea inflamatória, demonstrando que o material utilizado neste estudo é biocompatível e bem tolerado pelos tecidos estudados.

No período de tempo estudado não foi observada a neoformação óssea completa dos defeitos ósseos, tanto no grupo controle quanto no grupo experimental, sob os discos de poli(ácido L/D-láctico). De acordo com a metodologia empregada, não foi possível observar a degradação dos discos de poli(ácido L/D-láctico) implantados em defeitos ósseos em calotas cranianas de ratos.

Os discos de poli(ácido L/D-láctico) implantados e mantidos em ratos por 90 e 120 dias não induziram sinais de toxicidade genética nem reduziram a produção de eritrócitos na medula óssea, quando avaliados pela frequência de EPC, com a técnica empregada e nos tempos estudados. Não houve aumento na formação de EPC micronucleados em nenhum dos grupos testados. Também, a frequência de micronúcleos não dobrou e não houve correlação dose-dependente. Conclui-se que, de acordo com o delineamento experimental definido e conduzido, e o protocolo de avaliação de micronúcleos proposto, o material testado foi considerado negativo para mutagenicidade cromossômica no ensaio realizado.



## **REFERÊNCIAS**

---

## REFERÊNCIAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas; 1997. 1294p.

Araújo MM, Waite PD, Lemons JE. Strength analysis of Le Fort I osteotomy fixation: titanium versus resorbable plates. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 59: 1034-1039.

Bhatt V, Chhabra P, Dover MS. Removal of Miniplates in Maxillofacial Surgery: a follow-up study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63: 756-760.

Bergsma JE, Bruijn WC, Rozema FR, Bos and Boering RRM. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials*. 1995; 16: 25-31.

Chauvel-Lembret DJ, Auroy P, Tricot-Doleux S, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the capacity of the SCGE assay to assess the genotoxicity of biomaterials. *Biomaterials*. 2001; 22: 1795-1801.

Chen CC et al. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. *Biomaterials*. 2003; 24: 1167-1173.

Cilasun U, Uckan S, Dolanmaz D, Saglam H. Immediate mechanical stability of sagittal split ramus osteotomy fixed with resorbable compared with titanium bicortical screws in mandibles of sheep. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 44: 534-537.

Cox T, Kohn MW, Impelluso T. Computerized analysis of resorbable polymer plates and screws for the rigid fixation of mandibular angle fractures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61: 481-487.

Cutright D, Hunsuck E, Beasley J. Fracture reduction using a biodegradable material, polylactid acid. *J Oral Surg.* 1971; 29: 393-397.

Edwards RC, Kiely KD, Eppley BL. Fixation of bimaxillary osteotomies with absorbable plates and screws: experience in 20 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 59: 271-6.

Eppley BL et al. Resorbable PLLA-PGA plate and screw fixation in pediatric craniofacial surgery: clinical experience in 1883 patients. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 114(4): 850-6.

Figueiredo JAP, Pesce HF, Gioso Ma, Figueiredo MAZ. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J.* 2001; 34: 377-385.

Gilding DK, Reed AM. Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/poly (lactic acid) homo and copolymers: 1. *Polymer.* 1979; 20: 1459-1464.

Henriques JAP, Erdimann B, Silva J. *Genética Toxicológica.* Rio Grande do Sul: Ed. Alcance; 2003.

Hochuli-Vieira E, Cabrini Gabrielli MA, Pereira Filho VA, Gabrielli MFR, Padilha JG. Rigid internal fixation with titanium versus bioresorbable miniplates in the repair of mandibular fractures in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 3: 167-173.

Isama K, Tsuchiya T. Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials.* 2003; 24: 3303-3309.

Laughlin R, Block MS, Wilk R, Malloy RB, Kent JN. Resorbable plates for the fixation of mandibular fractures: a prospective study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65: 89-96.

Liebschner MAK. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials.* 2004; 25: 1697-1714.

Maluf SW, Passos DF, Bacelar A, Speit G, Erdtmann B. Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay. *Environ Mol Mutagen.* 2001; 38: 311-5.

Miki T, Imai Y. Osteoinductive potential of freeze-dried, biodegradable, poly(glycolic acid-co-lactic acid) disks incorporated with bone morphogenetic protein in skull defects of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 25: 402-406.

Mollaolgu N, Çetiner S, Alpaslan C, Gültekin SE, Alpar R. The early tissue response to titanium and LactoSorb screws. *Dent Traumatol.* 2003; 19: 139-144.



Peltoniemi HH, Hallikainen D, Toivonen T, Helevirta P, Waris T. SR-PLLA and SR-PGA miniscrews: biodegradation and tissue reactions in the calvarium and dura mater. *J Craniomaxillofac Surg.* 1999; 27: 42-50.

Pihlajamäki H, Böstman O, Tynninen O, Laitinen O. Long-term tissue response to bioabsorbable poly-L-lactide and metallic screws: an experimental study. *Bone.* 2006; 39: 932-937.

Piozzi R, Ribeiro DA, Padovan LEM, Nary Filho H, Matsumoto MA. Genotoxicity and cytotoxicity in multiple organs induced by titanium miniplates in Wistar rats. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Feb 19. [*Epub ahead of print*]

Santos Jr AR, Wada MLF. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2007; 17(4): 308-317.

Saueressig F. Avaliação microscópica do processo de reparo ósseo na presença de enxerto ósseo humano liofilizado mineralizado e demineralizado e membrana de cortical bovina em calota craniana de ratos [Dissertação]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2005. 121 p. Mestrado em Odontologia.

Schliephake H, Reiss G, Urban R, Neukam FW, Guckel S. Metal release from titanium fixtures during placement in the mandible: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993; 8: 502-511.

Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Chemical Mutagens Principles and Method for their Detection. Vol. 4, N. York: Ed hollaender A., Plenum Press; 1976. 31-53p.

Shikinami Y, Matsusue Y, Nakamura T. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites or raw hydroxyapatite particules/poly L-lactide (F-u-HA/PLLA). Biomaterials. 2005; 26: 5542-5551.

Sokal RR, Rolf FJ. Biometry. The Principles and Practice of Statistic in Biological Research. W.H. Freeman/and Co., San Francisco; 1969. 859p.

Suzuki T, Kawamura H, Kasahara T, Nagasaka H. Resorbable Poly-L-lactide Plates and Screws for the Treatment of Mandibular Condylar Process Fractures: A Clinical and Radiologic Follow-Up Study. J Oral Maxillofac Surg. 2004; 62: 919-924.

Tams J, Joziase CAP, Bos RRM, Rozema FR, Grijpma DW, Pennings AJ. High-impact poly(L/D-lactide) for fracture fixation: in vitro degradation and animal pilot study. Biomaterials. 1995; 16: 1409-1415.

Villela L, Sureda A, Canals C, Sanz MA Jr, Martino R, Valcarcel D, Altes A, Briones J, Gomez M, Brunet S, Sierra J. Low transplant related mortality in older patients with hematologic malignancies undergoing autologous stem cell transplantation. Haematologica. 2003; 88: 300-5.

Walton M, Cotton NJ. Long-term in vivo degradation of poly-L-lactide (PLLA) in bone. *J Biomater Appl.* 2007; 21:395-411.

Zago MA, Falcão RP. Pasquini R. *Hematologia: fundamentos e prática.* São Paulo: Atheneu; 2001. 1043p.

Zar J. *Biostatistical Analysis.* Prentice - Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J., USA; 1974. 619p.



ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E ÉTICA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA PUCRS



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

---

Porto Alegre 03 de dezembro de 2008

**O Projeto de: Dissertação**

**Protocolado sob nº:** 0072/08  
**Intitulado:** Estudo das propriedades biológicas de discos de polilactina (PLLS) em ratos  
**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira  
**Pesquisadores Associados** Juliana Gonçalves Göelzer  
**Nível:** Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 03 de dezembro de 2008.

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

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

## ANEXO 2 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 020/09 - CEUA

Porto Alegre, 05 de março de 2009.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00066, intitulado: **"Avaliação histológica da resposta tecidual a discos de poli (ácido L/D – láctico) em ratos"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,

Profa. Dr. Anamaria Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira  
Faculdade de Odontologia  
N/Universidade

PUCRS

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar sala 314- CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

## ANEXO 3 - PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

### Princípios éticos na experimentação animal

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

*Postula-se:*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Legislação**. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica>. Acesso em: 21 março 2009.

**ANEXO 4 - LEI AROUCA**  
**LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008.**

**CAPÍTULO I**

**DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES**

Art. 1º A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

§ 1º A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I – estabelecimentos de ensino superior;

II – estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 2º O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo **Chordata**, subfilo **Vertebrata**, observada a legislação ambiental.

Art. 3º Para as finalidades desta Lei entende-se por:

I – filo **Chordata**: animais que possuem, como características exclusivas, ao menos na fase embrionária, a presença de notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único;

II – subfilo **Vertebrata**: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral;

III – experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas;

IV – morte por meios humanitários: a morte de um animal em condições que envolvam, segundo as espécies, um mínimo de sofrimento físico ou mental.

Parágrafo único. Não se considera experimento:

I – a profilaxia e o tratamento veterinário do animal que deles necessite;

II – o anilhamento, a tatuagem, a marcação ou a aplicação de outro método com finalidade de identificação do animal, desde que cause apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro;

III – as intervenções não-experimentais relacionadas às práticas agropecuárias.

**CAPÍTULO II**

**DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA**

Art. 4º Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Art. 5º Compete ao CONCEA:

I – formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II – credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;

III – monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;

IV – estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V – estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI – estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;



VII – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8º desta Lei;

VIII – apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;

IX – elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

X – assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Art. 6º O CONCEA é constituído por:

I – Plenário;

II – Câmaras Permanentes e Temporárias;

III – Secretaria-Executiva.

§ 1º As Câmaras Permanentes e Temporárias do CONCEA serão definidas no regimento interno.

§ 2º A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia.

§ 3º O CONCEA poderá valer-se de consultores **ad hoc** de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 7º O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por:

I – 1 (um) representante de cada órgão e entidade a seguir indicados:

a) Ministério da Ciência e Tecnologia;

b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

c) Ministério da Educação;

d) Ministério do Meio Ambiente;

e) Ministério da Saúde;

f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil – CRUB;

h) Academia Brasileira de Ciências;

i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;

j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental;

l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica;

II – 2 (dois) representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

§ 1º Nos seus impedimentos, o Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia será substituído, na Presidência do CONCEA, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério.

§ 2º O Presidente do CONCEA terá o voto de qualidade.

§ 3º Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público.

### CAPÍTULO III

#### DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUAs

Art. 8º É condição indispensável para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs.

Art. 9º As CEUAs são integradas por:

I – médicos veterinários e biólogos;

II – docentes e pesquisadores na área específica;

III – 1 (um) representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País, na forma do Regulamento.

Art. 10. Compete às CEUAs:

I – cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II – examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV – manter cadastro dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa, enviando cópia ao CONCEA;

V – expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros;

VI – notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras.

§ 1º Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições desta Lei na execução de atividade de ensino e pesquisa, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

§ 2º Quando se configurar a hipótese prevista no § 1º deste artigo, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 e 20 desta Lei.

§ 3º Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 4º Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento.

§ 5º Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

#### CAPÍTULO IV DAS CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E USO DE ANIMAIS PARA ENSINO E PESQUISA CIENTÍFICA

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei.

§ 1º (VETADO)

§ 2º (VETADO)

§ 3º (VETADO)

Art. 12. A criação ou a utilização de animais para pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas no CONCEA.

Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento no CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA.

§ 1º A critério da instituição e mediante autorização do CONCEA, é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição.

§ 2º Na hipótese prevista no § 1º deste artigo, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e centros de criação sob seu controle.

Art. 14. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º O animal será submetido a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento.

§ 2º Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos a eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios vigentes de segurança, desde que destinados a pessoas idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 5º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.

§ 6º Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA.

§ 7º É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares ou de relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.

§ 8º É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º Em programa de ensino, sempre que forem empregados procedimentos traumáticos, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10. Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula.

Art. 15. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão.

Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

## CAPÍTULO V DAS PENALIDADES

Art. 17. As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão às suas disposições e ao seu regulamento, às penalidades administrativas de:

- I – advertência;
- II – multa de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R\$ 20.000,00 (vinte mil reais);
- III – interdição temporária;
- IV – suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;
- V – interdição definitiva.

Parágrafo único. A interdição por prazo superior a 30 (trinta) dias somente poderá ser determinada em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, ouvido o CONCEA.

Art. 18. Qualquer pessoa que execute de forma indevida atividades reguladas por esta Lei ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA será passível das seguintes penalidades administrativas:

- I – advertência;
- II – multa de R\$ 1.000,00 (mil reais) a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais);
- III – suspensão temporária;
- IV – interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta Lei.

Art. 19. As penalidades previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas de acordo com a gravidade da infração, os danos que dela provierem, as circunstâncias agravantes ou atenuantes e os antecedentes do infrator.

Art. 20. As sanções previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo de correspondente responsabilidade penal.

Art. 21. A fiscalização das atividades reguladas por esta Lei fica a cargo dos órgãos dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde, da Educação, da Ciência e Tecnologia e do Meio Ambiente, nas respectivas áreas de competência.

CAPÍTULO VI  
DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 22. As instituições que criem ou utilizem animais para ensino ou pesquisa existentes no País antes da data de vigência desta Lei deverão:

I – criar a CEUA, no prazo máximo de 90 (noventa) dias, após a regulamentação referida no art. 25 desta Lei;

II – compatibilizar suas instalações físicas, no prazo máximo de 5 (cinco) anos, a partir da entrada em vigor das normas estabelecidas pelo CONCEA, com base no inciso V do **caput** do art. 5º desta Lei.

Art. 23. O CONCEA, mediante resolução, recomendará às agências de amparo e fomento à pesquisa científica o indeferimento de projetos por qualquer dos seguintes motivos:

I – que estejam sendo realizados sem a aprovação da CEUA;

II – cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 24. Os recursos orçamentários necessários ao funcionamento do CONCEA serão previstos nas dotações do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 25. Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 (cento e oitenta) dias.

Art. 26. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 27. Revoga-se a [Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979](#).

Brasília, 8 de outubro de 2008; 187º da Independência e 120º da República.

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA

*Tarso Genro*

*Reinhold Stephanes*

*José Gomes Temporão*

*Miguel Jorge*

*Luiz Antonio Rodrigues Elias*

*Carlos Minc*

Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm). Acesso em 17 dezembro 2009.

## ANEXO 5



GENOTOX-ROYAL

RELATÓRIO FINAL

Estudo GT00603

P. 1 / 13

### TÍTULO DO ESTUDO

## PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE LÂMINAS DE MICRONÚCLEOS EM MEDULA ÓSSEA DE RATOS

Estudo:	GT00603
Sistema Teste:	Ratos ( <i>Rattus norvegicus</i> )
Data de início:	17/06/09
Data do final:	22/10/09

### RESPONSABILIDADES TÉCNICAS

Responsabilidades:	Assinatura:	Data:
Diretor de Estudo: <b>Juliana da Silva</b>		
Pesquisadora: <b>Mônica Fagundes Acioli</b>		
Gerente: <b>Miriam Benicio da Fonseca</b>		
	Analistas: Roseli Oliveira de Cândido	



GENOTOX-ROYAL

RELATÓRIO FINAL

Estudo GT00603

P. 2 / 13

### 1. IDENTIFICAÇÃO DAS PARTES

Contratante:  
Neoortho Produtos Ortopédicos S/A

Endereço:  
Rua Ângelo Domingos Durigan, 607  
CEP: 82.020-340 - Cascatinha – Curitiba – Paraná

Laboratório Contratado:  
**Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica – ROYAL  
UNIDADE GENOTOX-ROYAL**

Endereço:  
Centro de Biotecnologia  
Av. Bento Gonçalves, 9500,  
Campus do Vale - UFRGS,  
Setor 4, Prédio 43.421, Sala 112/114  
CEP 91501-970 - Porto Alegre - RS



## **8. CONCLUSÕES**

Os discos de PLLA e PLDA (ácido polilático e ácido poliglicólico) implantados e mantidos em ratos, em condições fora das responsabilidades do GENOTOX-ROYAL, não induziram sinais de toxicidade nem reduziram a produção de eritrócitos na medula óssea, avaliados pela frequência de PCE/NCE. Não houve aumento na formação de PCE micronucleados em nenhum dos grupos testados. Também, a frequência de micronúcleos não dobrou e não houve correlação dose-resposta.

Conclui-se que, de acordo com o delineamento experimental definido e conduzido pela Mestranda Juliana Goelzer e o protocolo de avaliação de micronúcleos proposto pelo GENOTOX-ROYAL, o implante em questão, foi considerada negativa para mutagenicidade cromossômica no ensaio realizado.

Porto Alegre, de 19 outubro de 2009.

---

Dra. Juliana da Silva - CRB 09077-03 D

---

## **9. QUALIDADE E REGISTRO DE SEGURANÇA**

Todos os procedimentos técnicos e seus resultados estarão à disposição para análise por parte da contratante. Este relatório será confidencialmente arquivado por um prazo de cinco anos.

As lâminas e as Guias com os registros dos dados brutos gerados a partir da análise das mesmas serão arquivadas juntamente com o Relatório Final, na pasta relativa ao estudo, na sala de arquivos do GENOTOX-ROYAL.

As informações fornecidas pela contratante ficarão arquivadas na pasta relativa ao estudo, na sala de arquivos do GENOTOX-ROYAL.

Os formulários referentes ao Uso, Limpeza e Manutenção Rotineiras, e Manutenção Não Rotineira de equipamentos utilizados durante a realização desta análise serão arquivadas na sala de arquivos do GENOTOX-ROYAL.

