

FERNANDO LUIZ ZANFERRARI

**COMPORTAMENTO DE IMPLANTES DE CIMENTO
PORTLAND EM FASE SÓLIDA:
ANÁLISE DIMENSIONAL E HISTOMORFOMÉTRICA**

**CURITIBA
2011**



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

FERNANDO LUIZ ZANFERRARI

**COMPORTAMENTO DE IMPLANTES DE CIMENTO
PORTLAND EM FASE SÓLIDA:
ANÁLISE DIMENSIONAL E HISTOMORFOMÉTRICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Wilson Denis Martins

**CURITIBA
2011**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

Zanferrari, Fernando Luiz
Z28c Corportamento de implantes de cimento portland em fase sólida : análise
2011 dimensional e histomorfométrica / Fernando Luiz Zanferrari ; orientador, Wilson
 Denis Martins. – 2011.
 84 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2011.
Bibliografia: 69-73

1. Cimentos dentários. 2. Cimento portland. 3. Osseointegração. 4.
Odontologia. I. Martins, Wilson Denis. II. Pontifícia Universidade Católica do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



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

TERMO DE APROVAÇÃO

FERNANDO LUIZ ZANFERRARI

COMPORTAMENTO DE IMPLANTES DE CIMENTO PORTLAND EM FASE SÓLIDA: ANÁLISE
DIMENSIONAL E HISTOMORFOMÉTRICA

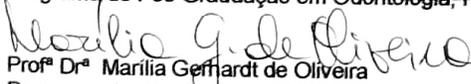
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do
Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Estomatologia**.

Orientador (a):


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


Prof. Dr. Marina de Oliveira Ribas
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Luciana Reis Azevedo Alanis
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Marília Gerhardt de Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS


Prof. Dr. Maria Ângela Naval Machado
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 01 de junho de 2011.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é fruto da dedicação e superação de minha família, esposa Maria Luiza, meus filhos João Pedro e Gabriela, meu pai Gentil, minha mãe Maria Sini, meu irmão Alexandre, que souberam compreender os momentos de ausência e que com amor deram-me forças para a conclusão desta etapa em minha vida.

A vocês meu eterno muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilson Denis Martins que me acolheu como filho e mostrou o caminho da Ciência e da Pesquisa, orientando de maneira singular o desenvolvimento deste trabalho, instigando o senso crítico e fazendo com que meu crescimento não ficasse limitado somente à pesquisa científica, mas fazendo de mim uma pessoa melhor, ensinando-me a ser paciente, comedido e principalmente tolerante com as adversidades que eventualmente encontramos pelo caminho.

A Prof^a. Dr^a. Marina de Oliveira Ribas, presente em todas as fases deste trabalho, desde seu início durante o Mestrado e que agora tem sua continuidade no Doutorado, sempre auxiliando com senso crítico, ético, moral e principalmente como uma amiga presente nas fases mais difíceis desta caminhada.

A Prof^a. Dr^a. Luciana dos Reis Azevedo Alanis por sua sempre irretocável ética e respeito por seus colegas e alunos, a quem devo respeito e gratidão por sempre me incentivar e por acreditar no meu potencial. Obrigado por me tornar uma pessoa de senso crítico mantendo sempre o respeito por tudo e por todos. Minha sincera gratidão e admiração.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
3. PROPOSIÇÃO	27
4. MATERIAL E MÉTODO	29
4.1 DA AMOSTRA SELECIONADA	30
4.2 MÉTODO	31
4.2.1 DOS CORPOS DE PROVA	31
4.2.2 DOS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	32
4.2.3 DO CRONOGRAMA DE MORTE DOS ANIMAIS	33
4.2.4 DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ESPÉCIMES	33
4.2.5 DA ANÁLISE MACROSCÓPICA	34
4.2.6 DA ANÁLISE MICROSCÓPICA	35
4.2.7 DA ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5. RESULTADOS	39
5.1 GRUPO I – 90 DIAS	41
5.1.1 Análise macroscópica e microscópica descritiva	41
5.2 GRUPO II – 150 DIAS	43
5.2.1 Análise macroscópica e microscópica descritiva	43
5.3 GRUPO III – 240 DIAS	45
5.3.1 Análise macroscópica e microscópica descritiva	45

5.4	GRUPO IV – 300 DIAS	47
5.4.1	Análise macroscópica e microscópica descritiva	47
5.5	GRUPO V – 500 DIAS	49
5.5.1	Análise macroscópica e microscópica descritiva	49
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6.	DISCUSSÃO	59
7.	CONCLUSÕES	66
8.	REFERÊNCIAS	68
9.	ANEXOS	74
	Anexo A	75
	Anexo B	76
	Anexo C	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABCP	Associação Brasileira de cimento Portland
Al_2O_3	Óxido de alumínio
BiO	Óxido de Bismuto
CP	Cimento portland
Ca^{++}	Íon cálcio
$Ca(OH)_2$	Hidróxido de cálcio
$CaCO_3$	Carbonato de cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CO_2	Gás carbônico
FDA	Food and Drug Administration
Fe_2O_3	Óxido de ferro
IRM	Material restaurador intermediário
K_2O	Óxido de potássio
MTA	Mineral Trióxido Agregado
MgO	Óxido de magnésio
Na_2O	Óxido de sódio
$(OH)^-$	Íon hidroxila
SO_3	Óxido de enxofre
SiO_2	Óxido de Silício

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Cimento portland branco manipulado e acondicionado no molde.	31
FIGURA 2. Corpo de prova de CP branco na forma de calota esférica.	32
FIGURA 3. Acesso a calvária, aposição subperióstea do implante de CP e sutura	33
FIGURA 4. Remoção em bloco, espécime contendo o corpo de prova de CP, secção do corpo de prova na porção mediana após a descalcificação.	34
FIGURA 5. Visão macroscópica dos corpos de prova de CP na região da calvária; (A) 90 dias, (B) 150 dias, (C) 240 dias, (D) 300 dias e (E) 500 dias.	34
FIGURA 6. Desenho esquemático para análise do volume e da área superficial do corpo de prova de CP.	35
FIGURA 7– Análise das medidas da espessura e diâmetro dos corpos de prova no Programa Image-Pro Plus®. A figura é representativa de todos os grupos avaliados.	36
FIGURA 8. Área de tecido ósseo neoformado marcada e mensurada no Image-Pro Plus. A figura é representativa de todos os grupos avaliados.	37
FIGURA 9. (A) Corpo de prova (CoP) de CP; (B) Corpo de prova (CoP), na área em destaque a interface osso/CoP (O/CoP) HE 4X; (C) Osteócitos (seta), deposição de matriz óssea mineralizada e tecido ósseo neoformado (ON)- HE 200X; (D) Fosfato de cálcio evidenciado na cor castanha alaranjada (setas) Alizarina 4.2 100X.	42
FIGURA 10. (A) Corpo de prova de CP; (B) Corpo de Prova (CoP) com interface osso/CoP sem formação de fibrose-HE 4X; (C) na área em destaque infiltração de tecido de granulação (TG), faixa de fibrina (FI), células indiferenciadas (CI) e neoformação óssea lamelar (ON)- HE 100X. Em (D) áreas de fosfato de cálcio que posteriormente sofrerão mineralização sendo coradas por alizarina 4.2 (seta) 200X.	44
FIGURA 11. (A) Corpo de prova CP; (B) Corpo de prova de CP substituído por Tecido ósseo neoformado, tecido de granulação, células Indiferenciadas sem a formação de fibrose – HE 4X; (C) no detalhe o tecido ósseo neoformado apresentando lamela óssea com osteoblastos nucleados vitais mostrando franca atividade celular de neoformação óssea – HE 100X. (D) No detalhe fosfato de cálcio confirmando a fase mineral do tecido ósseo vital neoformado (setas) – Alizarina 4.2 100X.	46

FIGURA 12. (A) Corpo de prova de CP; (B) Corpo de prova substituído por Tecido ósseo neoformado, mantendo parcialmente a forma de calota esférica- HE 4X; (C) no detalhe a interface entre corpo de prova/tecido ósseo neoformado mostrando proliferação celular, osteoblastos produzindo osteóide (seta), células indiferenciadas no interior do corpo de prova mostrando osteocondução e osteoindução do CP – HE 200X; (D) alizarina 4.2 - corando fosfato de cálcio (setas) 100X.

48

FIGURA 13. (A) Corpo de prova de CP; (B) corpo de prova totalmente substituído por tecido ósseo lamelar neoformado com a interface osso neoformado/calvária sem a formação de fibrose – HE 4X; (C) no detalhe pequenas áreas residuais de CP que estão em processo de osteotransdução e interface corpo de prova/calvária (Cal) demonstrando osteointegração e ausência de fibrose (setas)– HE 200X; (D) Fosfato de cálcio corado na calvária e no interior do osso lamelar neoformado – Alizarina 4.2 4X.

50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição dos grupos em relação ao período de tempo.	30
TABELA 2. Estatística descritiva das variáveis em função dos tempos Experimentais.	52
TABELA 3. Média geral dos grupos (n= 100 animais) referentes à perda de volume perda de área superficial e área superficial de tecido ósseo neoformado. (V inicial= 16,56036637mm ³) e (S inicial = 22,25504236mm ²).	53

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Múltiplas comparações entre as variáveis dependentes	54
GRÁFICO 2. Percentual de perda volumétrica em função do tempo	55
GRÁFICO 3. Percentual de perda de área superficial em função do tempo	56
GRÁFICO 4. Percentual de tecido ósseo neoformado	57

RESUMO

Zanferrari, Fernando Luiz. **Comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica**, Prof.Dr. Wilson Denis Martins. Curitiba: PUCPR 2010, Doutorado em Odontologia, área de concentração em Estomatologia.

Objetivos: O objetivo deste trabalho foram avaliar a estabilidade dimensional do cimento Portland branco quanto ao seu volume e área superficial, mensurar a quantidade de tecido ósseo neoformado por meio de histomorfometria após implantação subperiosteal de corpos de prova de cimento Portland em forma de calota esférica sólida e avaliada após períodos de tempo de 90, 150, 240, 300 e 500 dias. *Método:* Corpos de prova de cimento Portland em fase sólida, na forma de calota esférica, foram implantados na região subperiosteal da calvária de 100 ratos *Wistar*. Após os períodos de tempos experimentais os animais foram mortos. Os espécimes foram removidos em bloco da região da calvária contendo o corpo de prova e foram processados histologicamente para exame microscópico. As lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina e Alizarina 4.2. Para análise estatística dos resultados foram utilizados testes de normalidade de Shapiro-Wilk, teste de homogeneidade de variância de Levene, a análise de variância para dados, (ANOVA), utilizada foi o modelo paramétrico de Tukey HSD e Games-Howell, Para a avaliação do grau de associação entre as variáveis utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson (2-tailed). *Resultados:* Quando avaliados macroscopicamente, os corpos de prova de cimento Portland apresentaram fixação, manutenção parcial de sua forma de calota esférica, consistência semirrígida e fibrosa, que ao final de 500 dias apresentou consistência rígida com formação de tecido ósseo em toda a extensão do corpo de prova de cimento Portland. Quando avaliados microscopicamente, os corpos de prova de CP apresentaram características claras de neoformação óssea com substituição do CP por tecido ósseo lamelar neoformado. Nos períodos de tempo experimentais ocorreram perdas volumétricas e de área superficial, demonstrando que os corpos de prova sofreram processos de dissolução *in vivo*. Como resultado geral, os dados referentes às grandezas dimensionais estudadas (volume e área superficial), mostraram a taxa de 65,32% (10,81mm³) de perda volumétrica em relação ao volume inicial do corpo de prova pré-estabelecido; a perda de área superficial mostrou taxa de 31,04% (6,91mm²) em relação à área superficial inicial do corpo de prova. Na análise histomorfométrica os dados gerais mostram uma taxa de neoformação óssea de 4,91% (1,09mm²). *Conclusões:* Os corpos de prova de CP não são indicados para implantes de aumento de volume ósseo, pois ocorrem perdas volumétricas, perdas de área superficial e a quantidade de tecido ósseo lamelar neoformado é insuficiente.

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

ABSTRACT

Zanferrari, Fernando Luiz. Behavior of portland cement implants in solid phase: dimensional analysis and histomorphometric Prof.Dr. Wilson Denis Martins. Curitiba: PUCPR 2010, Doctor of Dentistry, with a concentration in stomatology.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the dimensional stability of white Portland cement as its volume and surface area, measure the amount of new bone by histomorphometry after subperiosteal implantation of samples of Portland cement in the form of solid spherical cap and evaluated after periods of 90, 150, 240, 300 and 500 days. **Methods:** Specimens of Portland cement solid phase in the form of spherical cap were implanted in the subperiosteal region of the calvaria of 100 rats. After the period of time the experimental animals were killed. The specimens were removed in bloc in the region of the skull containing the sample and were histologically processed for microscopic examination. The slides were stained with hematoxylin and eosin and Alizarin 4.2. Statistical analysis was performed using tests of normality Shapiro-Wilk, test of homogeneity of variance Levene, the data for analysis of variance (ANOVA) was used as the model parametric Tukey HSD and Games-Howell; for the evaluation the degree of association between the variables used the Pearson correlation coefficient (2-tailed). **Results:** When assessed macroscopically, the samples of Portland cement showed fixation, partial maintenance of the spherical cap shape, fibrous consistency and that the end of 500 days showed consistence with rigid bone formation over the entire length of the sample of cement Portland. When evaluated microscopically, samples of CP showed clear characteristics of bone formation to replace the CP by lamellar bone tissue formation. In the experimental periods there were losses of surface area and volume, showing that the samples were partially dissolved *in vivo*. As a general result, the data concerning the quantities studied dimensional (volume and surface area), showed the rate of 65.32% (10.81 mm³) of volumetric loss in relation to the initial volume of the specimen pre-established, and the loss of surface area showed a rate of 31.04% (6.91 mm²) in relation to initial surface area of the specimen. Histomorphometry data show an overall rate of bone formation of 4.91% (1.09 mm²). **Conclusions:** The samples of Portland cement are not suitable for grafting to increase bone volume, because occur volume loss, loss of surface area and the amount of newly formed lamellar bone tissue is insufficient.

Keywords: Portland cement; Bioactivity; osteoinduction; Osteoconduction; Osteotransduction;Osteointegration

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um dos tecidos do organismo capaz de regenerar-se. Quando ocorre uma fratura, coloca-se um implante ou realiza-se um enxerto para aumento ósseo, o que se pretende é a regeneração óssea, ou seja, um processo de remodelação óssea onde o osso neoformado é semelhante ao preexistente. O osso é um tecido dinâmico em constante formação e reabsorção no qual a remodelação consiste de reabsorção de uma quantidade determinada de osso processada pelos osteoclastos assim como a formação de matriz osteóide pelos osteoblastos e sua posterior mineralização. A atuação terapêutica nos campos da cirurgia bucomaxilofacial, traumatologia, ortopedia e implantodontia baseiam-se nos princípios biológicos da regeneração óssea nos quais estão envolvidos células, matriz extracelular e eventos osteoindutores e osteocondutores¹.

A parte inorgânica dos tecidos duros consiste de vários componentes, dentre eles o fosfato de cálcio $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$, principalmente sob a forma de estrutura de apatita. Devido à similaridade química com os tecidos biológicos calcificados, o cimento de fosfato de cálcio é largamente utilizado como biomaterial por ser biocompatível e promover osteoindução, osteocondução e osteointegração².

Os eventos existentes entre enxertos ósseos e o osso hospedeiro são definidos pelos fenômenos da osteoindução, osteocondução e osteointegração. Osteoindução caracteriza-se pelo recrutamento e estimulação de células primitivas, indiferenciadas e pluripotentes que se desenvolverão em células formadoras de osso; osteocondução é definido como crescimento de tecido ósseo na superfície, poros ou canais de um biomaterial e que está diretamente interligada ao fenômeno da osteoindução, pois células indiferenciadas somente transformam-se em osteoblastos produtores de matriz óssea desde que estejam aderidos à superfície do biomaterial; osteointegração é descrita histologicamente como o contato direto entre o biomaterial e osso sem a formação de fibrose nesta interface³; osteotransdução^{4,5} caracteriza-se pelo comportamento *in vivo* do biomaterial, que após a osteointegração, é lento e gradualmente substituído por osso neoformado.

Persiste, porém, a necessidade de um material biocompatível que ao mesmo tempo possa ser manipulado e utilizado sob as formas injetáveis, moldáveis ou em blocos. O campo de aplicação encontra-se tanto na clínica médica como odontológica, visando acelerar a cicatrização óssea em fraturas, preencher ou

reconstruir defeitos ósseos resultantes de ressecções oncológicas ou perda traumática de substância e utilização em cirurgias plásticas estéticas⁶.

Na constante procura pelo material ideal e desde a introdução do Mineral Trióxido Agregado (MTA) por Lee; Monsef; Torabinejad⁷ como material para reparação de perfuração lateral em endodontia, a sua utilização expandiu-se em várias aplicações, principalmente no selamento de canais radiculares e no tratamento de insucessos de origem endodôntica e periodontal.

O MTA consiste de uma mistura em forma de pó sendo constituída principalmente de partículas hidrofílicas de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, óxido de silicato e óxido de bismuto (BiO)⁸.

Em estudo realizado por Estrela et al⁹ os autores comprovaram que a constituição do MTA era a mesma do cimento Portland (CP), sendo que somente não estava presente em sua formulação o óxido de bismuto.

As propriedades biológicas deste material despertaram interesses na comunidade científica, que prontamente iniciou pesquisas para outras formas de utilização deste material, sendo que estas pesquisas foram realizadas somente com o material em sua forma de gel coloidal e sendo colocado em contato com os fluídos corporais, sejam em humanos ou em modelos animais, sendo que a pesquisa em sua forma sólida ainda não é amplamente estudada. O MTA não apresenta neurotoxicidade, apresenta aderência e crescimento celular, biocompatibilidade, toxicidade e irritação tissular mínima, não é mutagênico, apresenta atividade antimicrobiana, antifúngica e mitogênica¹⁰.

Em estudo preliminar, demonstrou-se que o cimento Portland em forma de corpos de prova sólidos, justapostos à cortical externa e sob o periósteo em calotas cranianas de ratos, avaliados em intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias, integrou-se totalmente e foi substituído por osso lamelar compacto. O osso neoformado apresentou aspecto normal, como sugere a presença de osteócitos nucleados, canais vasculares, integridade do periósteo e do endósteo. Ocorreu contato direto, sem formação de fibrose, na interface osso neoformado/cortical externa. Este cimento apresentou osteotransdutividade, que pode ser atribuída principalmente à sua atividade osteoindutora e osteocondutora, similar ao processo de remodelação óssea¹¹.

Diante das constantes pesquisas comparativas entre MTA e CP, bem como dos resultados promissores destes materiais, torna-se justificável o desenvolvimento

de pesquisas visando à utilização do cimento Portland como substituto ósseo em casos de cirurgia estética e reconstrutiva, nas áreas da Odontologia e Medicina^{12-14, 17,19,21,22,24,26-29,32,33,36-38,43,45-47,49,54}.

A proposição deste trabalho foi avaliar a estabilidade dimensional do CP em relação ao seu volume, área superficial e mensurar a quantidade de tecido ósseo neoformado por meio de histomorfometria, após implantação subperiosteal de corpos de prova de CP, em forma de calota esférica sólida e avaliada após períodos de tempo entre 90, 150, 240, 300 e 500 dias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOCOMPATIBILIDADE E MECANISMO DE AÇÃO.

O MTA foi inicialmente desenvolvido e apresentado para uso em endodontia em 1993 por Lee et al ^{7,12} como um material biocompatível para reparos em perfurações laterais nos tratamentos endodônticos.

Em estudo realizado por Holland et al ^{13,14}, os autores avaliaram o mecanismo de ação dos materiais por meio de reações do tecido subcutâneo de ratos ao implante de tubos de dentina obturados com MTA, CP e hidróxido de cálcio. Os animais foram mortos após 7 e 30 dias sendo avaliados histologicamente por luz polarizada e coloração de Von Kossa para tecidos mineralizados. Os resultados foram similares para os três materiais estudados; foi observado tecido irregular em forma de ponte, sendo possível determinar que o mecanismo de ação dos materiais estudados foi similar para os três materiais. Este mecanismo implica em uma reação sendo que o óxido de cálcio do pó do MTA, ao reagir com água, converte-se em hidróxido de cálcio. Uma vez em contato com os fluidos tissulares, dissocia-se em íons Ca^{++} e $(\text{OH})^-$. Os íons cálcio reagem com o gás carbônico dos tecidos e originam os grãos de calcita. Junto dessas granulações, ocorre acúmulo de fibrina, que permite a adesão e diferenciação celular e em consequência ocorre formação de uma ponte de tecido duro. O comportamento do hidróxido de cálcio pró-análise em contato com o tecido pulpar produz cauterização superficial, determinando a ocorrência de zona de necrose pela penetração de íons hidroxila. Essa área cauterizada eliminaria eventual contaminação superficial (pelo pH 12,5) bem como a porção pulpar superficial mais alterada. A deposição das granulações de calcita e consequente formação da ponte de tecido duro ocorreriam a partir do limite entre a zona de necrose e o tecido pulpar vital.

Um estudo marcante para a compreensão do mecanismo de ação do MTA foi de Sarkar et al ¹⁵ pois elucidou uma lacuna existente quanto à formação da fase de fosfato de cálcio presente no MTA e consequentemente no cimento portland, pois a reação básica de formação de hidroxiapatita apresentava o componente fosfato $(\text{PO}_4)_3$ e como se pode observar tanto MTA como CP não apresentavam íon fosfato em sua composição química. Por meio deste estudo foi possível observar que o íon fosfato é proveniente dos fluidos tissulares que apresentam em sua composição o

fosfato de potássio e fosfato de sódio, entre outros componentes. Observaram que o material apresenta uma camada apatítica na sua superfície, em proximidade com tecidos calcificados, forma uma união química com os mesmos. Devido à exposição do MTA aos fluidos biológicos sintéticos, forma-se uma camada de hidroxiapatita. A firme união com o osso reflete esta união química. Os autores concluíram que o MTA não é um material inerte quando colocado em um meio que simula as condições bucais e sim é um material bioativo, que em contato com os fluidos tissulares, dissolve-se liberando os principais componentes catiônicos e induzindo a precipitação de hidroxiapatita em sua superfície. O sucesso clínico do MTA está relacionado com as reações físico-químicas processadas pelo material em contato com os fluidos tissulares.

Khilusov et al ¹⁶ estudaram o potencial de diferenciação de células mesenquimais em células ósseas e constataram que a indução do potencial osteogênico, ou seja, osteoindução está diretamente relacionado com a taxa entre cálcio e fosfato do meio tissular; o sucesso da osteogênese depende da superfície rugosa e porosa do biomaterial que está em contato com os fluídos tissulares, onde ocorre adesão celular, migração e diferenciação osteogênica de células precursoras levando a metaplasia da medula óssea e tecido conjuntivo em osso maduro.

Camilleri ¹⁷ avaliou a composição química do MTA e relatou que o mecanismo de hidratação do MTA é composto de duas reações separadas. A produção de hidróxido de cálcio pelo MTA explicaria a semelhança de reações tissulares entre MTA e hidróxido de cálcio. Tem sido demonstrado que o MTA libera íons cálcio por vários dias após iniciar o mecanismo de hidratação e de presa do material. As bases físico-químicas das propriedades biológicas do MTA são atribuídas à produção de hidroxiapatita quando íons cálcio são liberados se o MTA entra em contato com fluidos tissulares. Quando em contato com os fluídos tissulares uma fase de fosfato de cálcio amorfo forma-se inicialmente e posteriormente se transforma em fase de apatita, pobremente cristalina. O fosfato de cálcio amorfo é a chave que precede a formação biológica da apatita em calcificação esquelética.

Em outro estudo de Camilleri ^{18,19}, o autor apresenta que o mecanismo de hidratação do MTA é diferente do CP. No MTA o óxido de bismuto está associado ao silicato de cálcio hidratado o qual é lixiviado do cimento MTA e posteriormente decomposto. O MTA produz altas concentrações de íons cálcio provenientes do hidróxido de cálcio que é subproduto da hidratação e também decomposição do

silicato de cálcio hidratado, levando assim a uma diminuição da liberação de cálcio com o passar do tempo. No cimento portland não existe óxido de bismuto e, portanto não ocorre a fase de associação do óxido de bismuto com o silicato de cálcio hidratado. O óxido de bismuto afeta a precipitação do hidróxido de cálcio. Os principais produtos da reação de hidratação do MTA e do CP são os silicatos de cálcio hidratado e os hidróxidos de cálcio. A perda de cálcio dos cimentos MTA e CP ocorre pela progressiva dissolução do hidróxido de cálcio, seguida de progressiva descalcificação do monossulfato, seguido da dissolução de etringita ($\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12}\cdot 26\text{H}_2\text{O}$) e por último ocorre dissolução do silicato de cálcio hidratado. Os relatos deste estudo afirmam que o óxido de bismuto diminui o crescimento celular e a proliferação celular.

Em estudo comparativo do MTA com CP, Gandolfi et al ²⁰ avaliaram a morfologia da superfície dos cimentos em tempo real de presa bem como monitoraram a transformação química nas superfícies logo após a manipulação. Observaram que os cimentos possuem propriedades hidráulicas e tomam presa espontaneamente ao entrar em contato com a água, liberam cálcio durante a hidratação e induzem a formação de depósitos de apatita quando imersos em solução contendo fosfatos. A bioatividade do MTA e CP está relacionada com a formação de uma camada de apatita em sua superfície que gradualmente libera íons cálcio e ao reagir com o meio que contém fosfatos forma hidroxiapatita. A rápida formação de nanopartículas de apatita após 24 horas de imersão em solução fosfatada suporta o comportamento biológico dos cimentos quando em contato com o tecido ósseo. O requisito fundamental para a bioatividade de um biomaterial é a formação biologicamente ativa de uma camada de apatita semelhante ao osso em sua superfície em um ambiente biológico. A bioatividade fornece significativa vantagem clínica e está diretamente relacionada com a ótima biocompatibilidade, osteocondutividade e osteoindutividade. Os cimentos hidráulicos com propriedades bioativas devido à formação de apatita e calcita têm importante aplicação clínica em odontologia, aumentando a regeneração óssea e a cicatrização pulpar. Estes dados explicariam o excelente comportamento clínico do MTA do CP. Demonstraram a possibilidade de monitorar em tempo real a transformação dinâmica e moldável da superfície dos cimentos em constante interação ativa com o meio, bem como a única propriedade bioativa do cimento de silicato de cálcio que tem a habilidade para produzir esférulas de fosfato de cálcio que são precursores de depósitos de apatita

em sua superfície. Esta propriedade torna este cimento excelente material para uso clínico em contato com o tecido ósseo e sangue.

A microestrutura da superfície do MTA foi estudada por Namazikhah et al ²¹, verificando que a microestrutura de todos os espécimes expostos a variados pHs revelou variadas formas de microcanais, depressões causadas por bolhas de ar, poros, formações assimétricas cristalinas em forma de lâminas, isto tudo em uma matriz parcialmente coberta por estrutura em forma de gel. Isto demonstra a natureza porosa do material que assegura sua osteocondutividade proporcionando o crescimento e adesão celular em sua estrutura porosa.

A aplicação clínica, inconvenientes e mecanismo de ação foram revisados por Parirokh e Torabinejad ²² relatando que o MTA é um material bioativo e tem a habilidade de criar o meio ambiente ideal para a cicatrização. Neste ponto o MTA promove proliferação, migração e diferenciação onde as células semelhantes a osteoblastos produzem matriz colágena. Relatam que o mecanismo de ação do MTA é semelhante ao do hidróxido de cálcio. Existem inúmeros estudos realizados *in vitro* para o MTA sendo que os estudos em animais ainda são escassos, principalmente nos desenhos de aplicações clínicas. Ressaltam que os principais inconvenientes do MTA são a potencial descoloração do material, presença de elementos tóxicos em sua composição, longo tempo de presa, alto custo, ausência de solvente, o que dificulta a remoção após a reação de presa. Em relação ao mecanismo de ação, os autores relatam que um dos produtos da reação do MTA é a hidroxiapatita que pode liberar íons cálcio e fósforo continuamente, um processo requerido pelo metabolismo ósseo. A partir do momento que o MTA é colocado em contato direto com os tecidos humanos, ele aparece como um material que:

- A) Forma hidróxido de cálcio que libera íons cálcio para adesão e proliferação celular.
- B) Cria um ambiente antimicrobiano pelo seu pH alcalino.
- C) Modula a produção das citocinas.
- D) Estimula a diferenciação e migração de células produtoras de tecido duro.
- E) Forma hidroxiapatita (ou apatita carbonatada) na superfície do MTA e promove selamento biológico.

Reyes-Carmona et al ²³ estudaram a sinalização molecular inflamatória e a habilidade do MTA em promover biomineralização. Apresentaram o conceito de bioatividade de um material como sendo a capacidade de estimular respostas

específicas via reações bioquímicas e biofísicas que resultam na formação de camada de apatita. As respostas do hospedeiro frente aos biomateriais são dependentes da resposta imune inata e não específica que ocorre nos tecidos circundantes. Os biomateriais podem provocar uma cascata inflamatória compreendendo o recrutamento de neutrófilos e macrófagos e promovendo adesão, reação de corpo estranho e podem formar cápsula fibrosa. Citocinas e fatores de crescimento secretados pelas células inflamatórias são os mensageiros moleculares que promovem eventos inflamatórios e cicatrização de feridas. Citocinas inflamatórias como interleucinas 1 β , fator de necrose tumoral e prostaglandinas tem importante papel no desenvolvimento da resposta inflamatória. O fator de crescimento endotelial vascular é uma glicoproteína com a habilidade de aumentar a permeabilidade vascular, uma importante alteração vascular observada durante a inflamação. Entretanto o fator de crescimento endotelial vascular também tem papel crítico na angiogênese e neovascularização por meio da participação em importantes processos biológicos, como a reparação tecidual. O processo de biomineralização ocorre simultaneamente com a resposta inflamatória aguda. Os autores sugerem que quando o MTA é implantado, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorre na interface MTA/tecido. Subsequentemente, isto ativa eventos celulares e teciduais nos processos inflamatórios e de biomineralização e culmina com a formação de camada semelhante à apatita que permite a integração do biomaterial com o ambiente tissular.

Bozeman et al ²⁴ avaliaram e quantificaram o montante e tipo de cristal formado pelo MTA branco, MTA cinza e o novo material Dentalcreto ao longo do tempo, bem como analisaram a concentração de vários elementos liberados destes materiais em solução. Observaram que o MTA não é inerte; é biocompatível e bioativo. Concluíram que o íon cálcio é liberado em maior quantidade, sendo que a precipitação de hidroxiapatita é o principal cristal formado durante a liberação do íon cálcio na solução tamponada de fosfato. A atividade osteogênica do MTA é devida a liberação de íons cálcio em abundância o qual interage com os grupos fosfatos da solução tampão para formar hidroxiapatita. Concluíram ainda que o MTA branco produz menos hidroxiapatita (0,47%) em sua superfície do que o MTA cinza (0,82%). Observaram que o

declínio de liberação de íons cálcio é devido à reação de presa que ocorre no interior do MTA sendo esta reação composta de duas fases fundamentais;

- A) Reação de consumo de íons hidroxila do MTA.
- B) Reação de precipitação de fosfato de cálcio.

Devido ao fato do CP ser o ingrediente ativo do MTA, Tay et al ²⁵ estudaram as fases de fosfato de cálcio produzidas pela interação do CP, componente do MTA com solução tampão de fosfato. Observaram que durante o processo de reação do CP forma-se β -tricálcio fosfato. Essa formação depende dos fluidos existentes em contato com o CP. Inicialmente é formada uma fase de fosfato de cálcio amorfa que posteriormente é mineralizada formando a fase de apatita, que basicamente é composta de fosfato de cálcio. A fase de fosfato de cálcio amorfa é a chave intermediária que precede a formação biológica da apatita em calcificação esquelética. Assim a manifestação de bioatividade do MTA pode ser atribuída à capacidade de indução de mineralização do CP, constituinte do MTA. Os autores acreditam que o fosfato de cálcio amorfo em adição com o hidróxido de cálcio fornece íons cálcio, fosfato e hidroxila para a precipitação de fosfato de cálcio. As estruturas cristalinas formadas durante a reação de presa do MTA e CP são pH dependentes, que levam a uma reação autocatalítica transformando a fase de fosfato de cálcio amorfo em fase de apatita. As soluções salinas tamponadas são geralmente compostas por cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio, fosfato de potássio em pH 7,3. A taxa de formação de cálcio e fósforo é processada por reação de substituição do sódio e cloreto por cálcio e fósforo. Quando estudada *in vivo* a bioatividade do MTA é determinada pela habilidade de produzir hidroxiapatita na presença de soluções contendo fosfatos. Quando estudada *in vitro* a bioatividade do MTA é determinada pela habilidade de formar apatita carbonatada (dahlita) na presença de soluções contendo fosfatos.

Na busca constante para elucidar as características similares do MTA e CP os autores Reyes-Carmona et al ²⁶ analisaram as interações do CMTA, MTA branco, MTA BIO e CP branco com e sem adição de cloreto de cálcio após imersão em solução tampão de fosfato. Concluíram que todos os cimentos são bioativos, que inicialmente liberam fosfato de cálcio amorfo que atua como precursor durante a formação de apatita carbonatada, ocorrendo assim a precipitação espontânea promovendo a biomineralização, processo que leva a formação de camada de

hidroxiapatita. A camada precipitada é formada basicamente de cálcio e fósforo. O valor total de cálcio liberado pelo MTA BIO foi (36,89mg/L), do Proroot MTA® (20,08mg/L) e CP (15,92mg/L). Os valores de liberação de cálcio foram maiores do quinto dia ao décimo quinto dia e após ocorreu decréscimo até o vigésimo quinto dia, quando a taxa de liberação permaneceu estável até o fim do experimento. A apatita carbonatada é também conhecida como apatita biológica e representa a fase mineral do tecido ósseo. Os mecanismos envolvidos na mineralização não são totalmente conhecidos, mas existem inúmeros estudos sugerindo o envolvimento de proteínas não colágenas no processo. Este experimento forneceu evidências do processo de biomineralização promovido pela interação do MTA e CP com a solução de fosfato tamponada no qual existe a formação de camada de apatita na interface cimento-dentina-MTA.

Para que a compreensão do mecanismo de biodegradação do CP seja elucidada é de importância fundamental o estudo realizado por Lu et al ²⁷, os autores estudaram o mecanismo de biodegradação do cimento de fosfato de cálcio quando implantado em defeitos ósseos criados em fêmur de coelhos. Os resultados mostraram que ocorre diminuição do volume do biomaterial da periferia para o centro. A perda de volume da periferia para o centro ocorre na ausência de formação de partículas livres ou fagocitose visível. Não ocorrem sinais de rejeição, necrose ou infecção e o tecido ósseo adjacente ao implante mostra-se com morfologia normal. O implante de cimento de fosfato de cálcio inicia a biodegradação e é substituído por tecido ósseo trabeculado na sua periferia após duas semanas da implantação. De quatro até vinte e quatro semanas o tecido ósseo neoformado torna-se lamelar e este em contato direto com o cimento, associando tecido osteóide e numerosos osteoblastos. A biodegradação do cimento continua e paralelamente ocorre a formação do novo osso até 24 semanas, aonde cerca de 60% do implante de cimento de fosfato de cálcio é reabsorvido. A biodegradação é influenciada pela combinação de três processos:

- A) Físico – abrasão, fratura ou desintegração, forma da partícula, porosidade, (sendo que o aumento da porosidade aumenta a biodegradação), área da superfície;
- B) Químico – dissolução - aumento de cálcio e fósforo localmente na superfície, depende da composição e substituição iônica do material;

C) Biológico – diminuição do pH causado pela atividade celular e fatores de mediação celular, tipo de osso, modelo animal, níveis de hormônios e pela substituição do cimento de fosfato de cálcio por tecido ósseo lamelar neoformado.

Investigando a resposta celular ao MTA, Koh et al²⁸ estudaram a ação do MTA na produção de citocinas em osteoblastos humanos e na adesão das células à superfície do material, utilizando meio de cultura para osteoblastos (MG-63). Observaram crescimento celular na superfície do MTA em seis horas e aumento deste crescimento até 144 horas. Os ensaios de ELISA demonstraram níveis elevados de interleucinas (IL-1 α , IL-1 β e IL6) na presença do MTA. Os níveis de citocinas aumentados demonstraram-se favoráveis para a estimulação da atividade de osteoclastos; porém, o MTA apresentou-se como um estimulador de osteoblastos e pareceu ser a fase de fosfato de cálcio responsável pelo comportamento de estimulação de crescimento e adesão celular. A formação de osteóide é característica de neoformação de tecido ósseo e usado como indicativo da produção de matriz mineralizada.

Ao examinar a reação tissular quando o MTA, amálgama, material restaurador intermediário (IRM) e super EBA, foram implantados em tíbia e mandíbula de porcos, Torabinejad et al²⁹ concluíram que tanto no amálgama, como no IRM e super EBA, ocorre fibrose e intenso infiltrado inflamatório. Ao avaliar o MTA observaram que este foi o único material que apresentou contato direto com o osso do animal sendo comprovada sua biocompatibilidade e osteointegração.

A resposta celular ao MTA foi estudada por Koh et al³⁰ que investigaram a citomorfologia de osteoblastos na presença do MTA e examinaram a produção de citocinas. As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular secretada como resultado de estimulação celular que interagem com os receptores celulares, levando a modificação na síntese do RNA celular, proteínas e no comportamento celular. As citocinas estão diretamente relacionadas com o processo de coordenação do metabolismo ósseo. As interleucinas estudadas foram (IL-12, IL-1 β , IL-6), além do fator estimulador da colônia de macrófagos. A citomorfologia foi observada em microscopia eletrônica de varredura e os resultados foram: diferenças marcantes na morfologia celular entre as células cultivadas na presença do MTA, sendo que estas células apresentavam morfologia normal, aparência achatada e estavam aderidas ao cimento, em contato direto com o mesmo. As células controle

criaram em confluência e as células na presença do IRM estavam arredondadas e esparsas, indicando que o IRM é tóxico, ou seja, não existe adesão celular e conseqüentemente não ocorrem proliferação e diferenciação celular.

O teste ELISA mostrou níveis elevados de todas as interleucinas, em todos os períodos de tempo quando as células cresceram na presença do MTA. Quando as células cresceram sozinhas, sem estarem em contato com o cimento, os níveis de interleucinas não foram detectados. O fator estimulador de macrófagos foi produzido pelas células independentemente do material que estava sendo testado, mostrando que o MTA atua como substrato biologicamente ativo para as células ósseas e estimula a produção de interleucinas. A formação óssea pode ser dividida em duas fases. A primeira envolve o recrutamento e diferenciação de precursores de osteoblastos. A segunda é a produção e mineralização da matriz óssea por osteoblastos perfeitamente desenvolvidos. As citocinas envolvidas na formação óssea podem ser divididas em dois grupos. O primeiro inclui as citocinas que estimulam a proliferação de células ósseas, mas inibem osteoblastos perfeitamente desenvolvidos (IL-1 e fator estimulador de macrófagos). O segundo estimula ambos, proliferação de precursores de osteoblastos e atividade de osteoblastos perfeitamente desenvolvidos (IL-6).

Ao investigar a biocompatibilidade do MTA em 3 formas variantes do cimento, Mitchell et al.³¹ observaram a citomorfologia, crescimento celular e a produção de citocinas (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-11 e fator estimulador de colônias de macrófagos – principais citocinas envolvidas no fenômeno de remodelação óssea). Os resultados demonstraram que ocorreu crescimento celular com as três variantes do MTA e muitas destas áreas estavam totalmente recobertas ao final do segundo dia. O crescimento celular também foi observado nos materiais para enxerto sintético, o que foi pobremente observado no hidróxido de cálcio. A expressão da IL-6 foi representativa somente com o MTA e uma variedade de enxerto ósseo sintético. A expressão da IL-8 somente foi observada no MTA. Não foram observadas expressões da IL-1 α e IL-11 em nenhum dos materiais estudados. O fator estimulador de colônias de macrófagos é importante na maturação e desenvolvimento de osteoclastos, atraindo osteoclastos para os locais de reabsorção e controlando o seu funcionamento. Relataram ainda que a solubilidade do MTA é pequena, mas é possível que ocorra diluição superficial do material que estimule os osteoblastos a sintetizarem IL-6 e IL-8. Existe a possibilidade de que a

microestrutura cristalina do MTA possa fornecer estímulo necessário para adesão, crescimento celular e expressão de citocinas. A IL-8 também estimula a angiogênese. A proliferação de vasos sanguíneos é de fundamental importância para a cicatrização do tecido conjuntivo e provavelmente explica porque o MTA tem sucesso *in vivo*, pois neste estudo somente o MTA produziu IL-8.

Holland et al ³² avaliaram a resposta tecidual pulpar em cachorros após pulpotomia e subsequente proteção com MTA e CP. Concluíram que o mecanismo de ação do MTA e do CP é similar, ambos apresentam óxido de cálcio em sua composição e formam hidróxido de cálcio quando reagem com água. A reação do cálcio proveniente do hidróxido de cálcio reagindo com o dióxido de carbono dos tecidos pulpares produz cristais de calcita (CaCO_3). Observaram a formação de uma rede extracelular de fibrina em contato direto com os cristais e os achados suportam a tese de que os cristais de calcita e fibrina formam o passo inicial para a formação de barreira de tecido duro. O estudo confirma a similaridade do MTA com CP e reafirma a condição de que o CP poderá ser utilizado como material seguro em odontologia.

Saidon et al ³³ estudaram a reação celular do MTA e CP com relação aos efeitos citotóxicos *in vitro* e a reação tecidual do MTA e CP em implantes ósseos na fase pastosa em mandíbulas de porcos. Observaram que devido ao alto pH dos materiais quando manipulados tanto MTA quanto CP causam desnaturação de células adjacentes bem como desnaturação de proteínas. Quando o material toma presa o pH muda e as injúrias celulares cedem. Os autores classificaram a reação em dois tipos: tipo I, onde ocorreu aposição de osso neoformado em contato direto com o material; tipo II, onde ocorreu formação de osso neoformado separado do material por fina camada de tecido conjuntivo fibroso. A resposta tipo I, constatada após 12 semanas, demonstra osteointegração do material. A análise microscópica demonstrou que o osso neoformado em contato direto com o CP é sadio.

O potencial osteoindutivo do MTA foi estudado por Torreira et al ³⁴ que investigaram a resposta óssea após implantação do MTA em mandíbula de coelho. Foram realizados defeitos ósseos críticos em mandíbulas de coelhos e preenchidos com MTA na fase pastosa sendo a morte dos animais executada após 30 dias. Em nenhuma das amostras foi encontrada evidência de processo inflamatório importante. A implantação do material na fase pastosa em defeitos ósseos resultou em regeneração óssea após quatro semanas da cirurgia. Porém, os autores não

consideraram significativa a quantidade de osso neoformado, considerando-a limitada.

Pelliccioni et al ³⁵ estudaram a citotoxicidade do MTA cinza, amálgama e super EBA usando modelo de células osteoblásticas MG63 e Saos-2. Os autores encontraram crescimento celular nas culturas sugerindo que o MTA não destrói a população celular adjacente e que células ósseas podem iniciar a deposição de tecido ósseo próximo ao material. Ao mesmo tempo os autores apresentam a fórmula do Proroot MTA[®]: pó - cimento Portland (silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, aluminoferrita tetracálcico) - 75%; óxido de Bi – 20%; sulfato de Cálcio dihidratado (gesso) – 5%; traços de elementos (sílica cristalina, óxido de cálcio, potássio e sulfato de sódio) – acima de 0,6% e líquido: água., confirmando que o principal componente do MTA é cimento portland em sua grande maioria com cerca de 75% do volume do pó.

Comparando a biocompatibilidade do MTA e do CP branco Ribeiro et al ³⁶ avaliaram o efeito genotóxico em células de linfoma em ratos encontrando que o CP branco e o MTA não têm efeitos citotóxico e não induzem danos ao DNA. O estudo apresenta argumento adicional para que o CP possa ser utilizado como material seguro na prática odontológica.

Moghaddame-Jafari et al ³⁷ avaliaram o efeito do Proroot MTA[®] na apoptose e no ciclo celular de células pulpares de ratos onde foram expostas de 0 a 100mg de MTA por 24 horas. Concluíram que o MTA induz proliferação celular e não induz apoptose. Esses achados sugerem que o potencial mecanismo explicaria o efeito regenerativo observado no complexo dentino-polpa quando o MTA é usado como capeador pulpar direto. Além de não causar morte celular o MTA aumenta a proliferação de células pulpares indiferenciadas levando a posterior diferenciação em odontoblastos.

Com o objetivo de determinar se células de tecido ósseo alveolar de humanos podem aderir, espalhar-se e proliferar-se em contato com o MTA, Al-Rabeah et al ³⁸ coletaram células de tecido ósseo alveolar, após cirurgia bucal e cultivaram por 3 a 4 semanas em soro bovino fetal na presença do MTA. A microscopia eletrônica de varredura mostrou adesão e crescimento celular no MTA após 24 horas e proliferou formando uma camada semelhante a matriz em 7 dias. O estudo enfatiza que o modelo de coleta de tecido ósseo alveolar humano durante cirurgias periodontais

pode ser bem aceito para realização de cultivo de células visando o estudo de proliferação e diferenciação celular.

Cintra et al ³⁹ estudaram o MTA na fase pastosa implantando em alvéolos de dentes recém extraídos em ratos. Após 30 dias, constataram a presença de tecido mineralizado em contato direto com o material, confirmando o fenômeno da osteointegração. O tecido conjuntivo estava bem organizado, porém o tecido ósseo não apresentava completa cicatrização por se tratar de um tempo pós operatório muito curto. Os autores sugerem um período mais longo de observação, para melhor avaliação da mineralização óssea completa.

Em estudo realizado por Kuratate et al ⁴⁰, foi investigado o processo reparativo após exposição pulpar de molares superiores de ratos. Realizaram capeamento pulpar com MTA e analisaram por meio de Imunohistoquímica a atividade de Nestin, osteopontina e proliferação celular. Os achados mostraram que o MTA induz o processo reparativo de dentina, processo este similar ao ocorrido com o hidróxido de cálcio que promove proliferação, migração e diferenciação de células progenitoras antes da secreção de matriz colágena para posterior calcificação. Nestin é utilizado como marcador de odontoblastos diferenciados. Em dentes maduros Nestin é observado somente em odontoblastos funcionais capazes de secretar matriz dentinária. No tecido ósseo a Osteopontina é detectada principalmente na interface da matriz celular e linha cementária e acredita-se que seja a responsável pelos eventos iniciais durante o processo de remodelação óssea, assim como a regulação de adesão de células ósseas, da função dos osteoclastos e da regulação da matriz de mineralização. Além disso, a osteopontina liga íons cálcio que posteriormente serão utilizados no processo de mineralização da matriz colágena depositada pelos osteoblastos. Os resultados mostram marcação positiva para Nestin e Osteopontina, comprovando assim o processo reparativo na dentinogênese em resposta ao contato com o MTA envolvendo a proliferação e migração de células progenitoras, seguidas pela diferenciação em odontoblastos que primeiramente representam o processo natural de reparo do tecido pulpar exposto.

Em estudo comparativo de biocompatibilidade *in vitro* entre dois tipos de cimento Portland de presa rápida, cimento ionômero de vidro, MTA e cimento Portland não modificado Abdullah et al ⁴¹ observaram as características da superfície dos cimentos Portland de presa rápida, citomorfologia em cultura de células de

osteosarcoma na presença dos materiais testados, avaliação do efeito destes materiais na expressão de marcadores de remodelação óssea. A microscopia eletrônica de varredura mostrou a aderência de células saudáveis de osteosarcoma na superfície das variantes de cimento Portland de presa rápida, cimento Portland não modificado e MTA. Em contraste, observaram-se células arredondadas e mortas no cimento ionômico de vidro. Usando ELISA os níveis de interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-18 e osteocalcina foram significativamente altos nas variantes de cimento Portland de presa rápida comparado com os controles, porém não estatisticamente significativos comparados com o MTA. Materiais em contato direto com o osso devem atuar como materiais osteocondutores capazes de promover remodelação óssea normal. O estudo sustenta evidências de que as duas variantes do cimento Portland de presa rápida não apresentam toxicidade e tem potencial para promover cicatrização óssea. Acrescentam que o MTA é derivado do cimento Portland com propriedades químicas similares e apresenta formidáveis propriedades, tais como: biocompatibilidade, boa capacidade de selamento e a capacidade para promover regeneração do tecido original quando colocado em contato direto com a polpa dental e tecidos periradiculares.

Yokoyama et al ⁴² implantaram corpos de prova sólidos de cimento de fosfato de cálcio entre o periosteio e o osso parietal de ratos. Após 7 dias da cirurgia, numerosos capilares dilatados, células mesenquimais e infiltrado inflamatório leve foram vistos no periosteio que recobria o biomaterial, bem como ocorreu hipertrofia do periosteio. Na superfície do osso parietal ao redor do cimento foram observadas granulações de tecido com células mesenquimais e capilares e tecido ósseo neoformado em contato direto com o biomaterial. Observaram que o comportamento após 30 dias era a neoformação óssea oriunda do osso parietal, parcialmente aderida ao cimento. Muitas partes da superfície do material implantado, que estavam aderidas ao osso neoformado, apresentaram estruturas semelhantes a lamelas e formação de osso medular. Após 98 dias da cirurgia a resposta inflamatória havia desaparecido e tecido ósseo neoformado era observado em contato direto com o biomaterial na interface osso parietal/biomaterial.

Na procura por um biomaterial ideal para reconstrução em defeitos ósseos Kuemmerle et al ⁴³ realizaram estudo experimental para avaliar o cimento de fosfato de cálcio injetável como alternativa para cranioplastia. Foram criados defeitos ósseos em carneiros e posteriormente preenchidos com cimento de fosfato de cálcio

injetável. Avaliaram os resultados histológicos após 2, 4 e 6 meses. Observaram que a formação óssea era moderada e que a reabsorção do cimento ocorria de forma centrípeta. A reabsorção óssea ocorria mediada por macrófagos e osteoclastos posteriormente. Osteoblastos foram encontrados no cimento residual, demonstrando a biocompatibilidade e propriedades osteocondutivas. Os autores concluíram que os cimentos não são adequados para cranioplastia experimental como regeneradores em defeitos ósseos. Não ocorre suficiente substituição óssea e, além disso, a substituição é lenta.

A habilidade de formar apatita em solução supersaturada tem sido largamente utilizada como fator de comprovação para a bioatividade dos biomateriais. Porém Pan et al ⁴⁴ relatam que o rápido desenvolvimento de biomateriais apresenta desafios científicos e técnicos, pois o biomaterial deve restaurar e promover cicatrização em tecidos perdidos ou feridos. O biomaterial ideal para regeneração óssea deve ser tanto bioativo quanto reabsorvível e eventualmente substituído por tecido ósseo neoformado. Os autores relatam que a preocupação não é apenas o material em si como também as concentrações iônicas resultantes junto aos tecidos adjacentes, líquido e plasma, tanto em termos de bioatividade e biocompatibilidade: isto é, como a vitalidade dos osteoblastos é afetada bem, como seus papéis biológicos, potencial de toxicidade e destino final dos solutos. Assim, bioatividade e segurança são difíceis de prever a partir de estudos gerais *in vitro*. A formação óssea é determinada pela vitalidade dos osteoblastos, cuja atividade é regulada por vários hormônios e fatores locais como o estrogênio, o hormônio da paratireóide e proteína óssea morfogenética. A expressão destes fatores resulta na ocorrência de desmineralização e remineralização um processo de equilíbrio dinâmico e que de forma clara e decisiva isso também deve depender da bioquímica das células, as quais são influenciadas pelos solutos que são liberados decorrentes da dissolução dos implantes. É um sistema vivo e não química elementar. A formação do osso não é um processo químico aberto. Isso ocorre em grande vesículas especializadas ou zonas de contato cujo ambiente químico interno não tem qualquer relação com as condições fisiológicas externas. Apatita pode ser representado como $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$, onde X pode ser substituído por OH, F ou Cl. O principal e, portanto, o mais importante biomineral, é uma forma impura de hidroxiapatita com uma estrutura hexagonal, por vezes referido como apatita biológica. Em contraste com a hidroxiapatita estequiométrica

sintética ela é descrita como uma apatita deficiente em cálcio com várias substituições aleatórias nos locais de rede onde os ions comuns como F, Cl e CO₃ ocupam os lugares do ions hidroxila na formulação da apatita, formando desta maneira a fluoroapatita, cloroapatita e apatita carbonatada. Portanto a apatita é fundamentalmente fosfato de cálcio. A remodelação óssea é um processo que envolve tanto a reabsorção como a formação da matriz óssea localizada, regulada por uma série de fatores incluindo citocinas, hormônios e substâncias, tais como a osteoprotegerina. O pH extracelular regula o equilíbrio desses dois processos sendo que a acidose crônica sistêmica promove a reabsorção enquanto a alcalose promove a mineralização, ou seja, a atividade pró-mineralização de osteoblastos aumenta com aumento do pH extracelular enquanto que a atividade pró-reabsorção dos osteoclastos é aumentada em condições mais ácidas e isto é particularmente dependente da presença de carbonato no meio externo. A remodelação óssea é certamente um processo dependente do pH. Assim, o osso é formado pela mineralização de uma matriz orgânica (principalmente colágeno), por meio de nucleação e crescimento de um mineral muito semelhante a hidroxiapatita regulada pelos osteoblastos, responsáveis pela formação óssea e que são ativados em um ambiente alcalino, que têm a capacidade de proliferar para sintetizar a matriz orgânica medular e responder aos fatores de crescimento. Mesmo se uma camada de apatita é formada primeiramente sobre um biomaterial não quer dizer que a superfície será necessariamente colonizada pelos osteoblastos, ou, se for, que eles vão necessariamente formar osso. Em todo caso essa camada é suscetível de ser reabsorvida, mais cedo ou mais tarde, mesmo que seja propício para a célula subsequente ao crescimento ósseo e, portanto, o sucesso do biomaterial.

2.2 PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E ANTIBACTERIANAS.

Em 1995, Torabinejad et al⁸ publicaram as propriedades químicas e físicas do MTA apresentando a composição química como sendo de uma mistura em forma de pó constituída principalmente de partículas hidrofílicas de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, óxido de silicato e óxido de bismuto (BiO).

Estrela et al ⁹ estudaram o Proroot MTA^{®1} e o compararam com cimento Portland, pasta de hidróxido de cálcio, Sealapex^{®2} e Dycal^{®3} quanto à ação antimicrobiana, bem como sua formulação química. O cimento Portland apresentou componentes nas seguintes porcentagens: CaO (58,5%), SiO₂ (17,7%), Al₂O₃ (4,5%), MgO (3,3%), SO₃ (3,0%), Fe₂O₃ (2,9%), K₂O (0,9%), Na₂O (0,2%), sendo que a composição química do MTA era de 75% de cimento portland e 20% de óxido de bismuto, demonstrando assim que o MTA e o CP são similares em suas composições químicas bem como na ação antimicrobiana e de biocompatibilidade.

Segundo Goraieb et al, Gobbo et al e Barbosa et al, o cimento portland ⁴⁵⁻⁴⁷ pertence a uma classe de materiais chamados de aglomerantes hidráulicos onde estas substâncias endurecem quando misturadas com água sendo também resistentes à mesma. Este cimento é obtido por meio de calcinação da mistura de rochas calcárias e materiais silico-argilosos. O material utilizado para a fabricação deve conter em sua composição química os principais óxidos componentes do clínquer: CaO, SiO₂, Al₂O₃ e Fe₂O₃. O calcário e a argila são as matérias-primas mais comuns como fonte de CaO, SiO₂, Al₂O₃ sendo o minério de ferro a principal fonte de Fe₂O₃. No caso da fabricação de cimentos brancos, a presença de Fe₂O₃ é restringida. Os componentes do clínquer Portland podem ser subdivididos em três grupos distintos: Os silicatos cálcicos (silicato tricálcico e silicato dicálcico), a fase intersticial (aluminoferrita tetracálcico, aluminato tricálcico) e os compostos menos frequentes como MgO, CaO, K₂O e Na₂O. O gesso é o produto de adição final no processo de fabricação do cimento Portland, com a finalidade de regular o tempo de presa por ocasião das reações de hidratação.

Para a Associação Brasileira de Cimento Portland ⁴⁸, o cimento Portland branco apresenta matérias-primas com baixo teor de Fe₂O₃, Mn, por condições especiais durante a fabricação. No Brasil o cimento Portland branco atende a norma NBR 12989, sendo classificado em dois subtipos: cimento Portland branco estrutural e cimento Portland branco não estrutural, este último com o código de identificação (sigla+classe) CPB e pela norma brasileira NBR 12989. No Brasil, a qualidade do cimento Portland é aferida pela Associação Brasileira de Cimento Portland (ABCP) com base nas normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e nos

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

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

³ Dycal[®] - Dentsply - USA.

princípios do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).

Funteas; Wallace; Fochtman ⁴⁹ compararam quimicamente o MTA e CP observando que a diferença entre os dois materiais está apenas no acréscimo de Bi do MTA e que 14 elementos químicos eram os mesmos para os dois cimentos e não apresentavam diferenças quanto às quantidades, provando mais uma vez que MTA e CP são similares e que futuras investigações deveriam ser realizadas a fim de utilizar o CP com propósitos endodônticos.

A composição química do MTA e suas fases constituintes foram estudadas por Camilleri et al ⁵⁰, a constituição foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e as fases do material por difração de Raio-X. Concluíram que os principais constituintes, silicato tricálcico e silicato dicálcico, reagem com a água para produzir um sal hidratado pobremente cristalizado e Ca(OH)_2 . A interpretação dos autores é que o MTA na fase sólida pode ser considerado como Ca(OH)_2 contido em uma matriz de silicato. A presença de Ca(OH)_2 justifica seu pH alcalino (12,5) que possivelmente contribui para sua biocompatibilidade. Concluíram ainda que as versões comerciais do MTA possuem composições similares ao cimento Portland comum, com exceção da adição de compostos de Bismuto.

Após inúmeras dificuldades enfrentadas quanto à coloração do MTA, pois sua cor inicialmente era cinza e não era compatível esteticamente com procedimentos de reparo de perfurações em regiões anteriores, o mesmo MTA foi lançado no mercado odontológico na versão branca, sendo que Asgary et al ⁵¹ avaliaram as diferenças químicas entre o MTA cinza e MTA branco e observaram que as concentrações de óxido de alumínio, óxido de magnésio e particularmente óxido de ferro são consideravelmente menores no MTA branco do que no MTA cinza e que as altas concentrações de óxido de ferro são as responsáveis pela coloração cinza do MTA.

Islan et al ⁵² avaliaram as propriedades físicas e mecânicas do MTA e CP, compararam o pH, radiopacidade, tempo de presa, solubilidade, modificações dimensionais e resistência à compressão. A radiopacidade do cimento Portland é muito menor do que a do ProRoot MTA[®]; a resistência à compressão do cimento Portland é menor após 28 dias. O principal constituinte do ProRoot MTA[®] é o cimento Portland. O cimento Portland pode ser facilmente esterilizado tanto por gás como por autoclave, entretanto não existem sugestões de que o cimento Portland

esteja pronto para ser usado na clínica em seu estado nativo. Algumas modificações devem ser feitas no CP bem como extensivos testes para que seja seguro usar o CP como material médico e aprovado pela FDA.

Em estudo realizado por Parirokh e Torabinejad ⁵³, os autores efetuaram extensa revisão de literatura onde avaliaram os aspectos físicos, químicos e antibacterianos do MTA comparando principalmente com o CP. Concluíram que MTA e CP são materiais bioativos e que influenciam o meio ambiente em que estão envolvidos, apresentam condutividade para formação de tecidos duros, apresenta indução para formação de tecidos duros e biocompatibilidade. Nesta revisão os autores destacam o CP como um material barato e de similaridade química com o MTA que está sendo largamente estudado como substituto para o MTA. Na maioria dos estudos as diferenças encontradas quanto as propriedades químicas, físicas, antimicrobianas, selamento, tempo de presa, expansão, solubilidade, resistência à compressão, resistência à flexão, pH, radiopacidade, tamanho de partículas, porosidade, microdureza e resistência a fraturas, entre o MTA e CP são mínimas, porém os autores colocam algumas razões para que o CP não seja utilizado na clínica odontológica como substituto para o MTA:

- A) O CP é amplamente manufaturado em todo o mundo e seria impossível o controle de qualidade, composição e biocompatibilidade deste material.
- B) O CP tem quantidades de arsênio que seriam seis vezes acima da quantidade apresentada pelo MTA e devido à solubilidade do CP ser maior do que a do MTA alguns tipos de CP liberariam maior quantidade de substâncias tóxicas nos tecidos adjacentes e, portanto sua segurança em longo prazo é questionável.
- C) A alta solubilidade de alguns tipos de CP é uma questão de preocupação, pois seria possível que o CP sofreria maior degradação após aplicação clínica e colocaria em risco a capacidade de selamento do material.

A resistência à compressão de alguns tipos de CP é significativamente menor quando comparada ao MTA após 28 dias da sua reação de hidratação. A resistência à compressão é importante para o uso deste material em capeamento pulpar e

reparo de perfurações, sendo necessária estabilidade contra a pressão exercida pela oclusão.

- D) Os relatos na literatura são controversos quando abordam a expansão sofrida pelos cimentos durante a reação de presa. Alguns estudos relatam que a expansão do CP é maior do que do MTA enquanto outros estudos relatam que a expansão sofrida pelo CP é menor do que o MTA cinza e menor ainda do que o MTA branco.
- E) No CP ocorre queda da resistência à tensão e na resiliência, o que não ocorre em grande quantidade com o MTA.
- F) A liberação de cálcio no MTA branco é maior do que o ocorrido no CP branco, sendo que o mecanismo de hidratação dos dois materiais é diferente. É importante salientar que a completa cicatrização somente ocorrerá se as quantidades apropriadas de elementos e moléculas de sinalização estiverem presentes nos tecidos após a injúria.
- G) MTA é manufaturado em laboratórios como material médico sobre controle rigoroso em termos de composição e prevenção de contaminação. É aprovado pela FDA para uso em seres humanos.

Os autores relatam que se o CP for destinado para uso clínico, o material deverá ser esterelizado, a quantidade de metais tóxicos deverá ser detectada e o tamanho das partículas deverão ser similares e mais uniformes. A respeito das similaridades entre CP e MTA, não é seguro usar o CP, pois não foi formulado para uso em seres humanos como um material médico bioativo como o MTA.

Para compreender melhor as características químicas e físicas que ocorrem na superfície do MTA, Tingey et al ⁵⁴ estudaram a reação de presa do MTA na presença de soro fetal bovino e em água esterilizada. Observaram que existe diferença de morfologia na superfície do MTA quando imerso em soro fetal bovino e água esterilizada. Os resultados demonstram que quando imersos em soro fetal bovino o MTA apresenta homogeneidade química e morfológica formando quase que totalmente cristais de cálcio de forma globular o que proporciona melhor adesão celular para que ocorra o processo de diferenciação celular. Quando imerso em água esterilizada a superfície do MTA forma cristais de silicato e de cálcio hexagonais, apresentando assim diversas morfologias e sendo, portanto heterogênea a sua superfície, tanto química quanto morfológicamente. A micro

topografia das superfícies afeta a adesão celular, proliferação, diferenciação *in vitro*. Sendo assim os autores sugerem que sejam realizados mais estudos *in vivo* da reação de presa do MTA em contato com os fluidos dos tecidos vivos para melhor compreensão do mecanismo de ação do mesmo, o que pode levar a resultados clinicamente relevantes.

O efeito do óxido de bismuto nas propriedades do MTA foi estudada por Coomaraswamy et al ⁵⁵ observando que ao adicionar óxido de bismuto na composição do CP ocorre diminuição da estabilidade mecânica por introdução de falhas e aumenta a porosidade deixando mais água que não tenha reagido no CP. As falhas no cimento que já tomou presa provavelmente exacerba a existência de rachaduras, o aumento da porosidade aumenta a solubilidade bem como a degradação do CP e isto poderá afetar o material a longo prazo quando comparado com o CP puro sem óxido de bismuto. A porosidade nos sistemas de cimentos portland pode ser resultado de duas fontes.

- A) De água adicionada para formar a pasta de cimento que não é consumida na reação de presa;
- B) Do ar aprisionado na pasta do cimento resultante de aglomerados de pó parcialmente seco e bolhas de ar.

O óxido de bismuto não participa da reação de presa do CP bem como não tem efeito sobre a reação de hidratação do CP.

2.3 APLICAÇÕES CLÍNICAS.

Em extensa revisão de literatura Parirokh et al ²² encontraram recomendações para o uso do MTA em pulpotomias, perfurações de furca, apexificação, perfurações laterais, capeamento pulpar, reabsorções internas e externas, como cimento endodôntico, cirurgias de apicectomia.

As aplicações clínicas do MTA como material experimental e potencial material restaurador em endodontia foram apresentadas em 1999 por Torabinejad et al ⁵⁶, que descreveram procedimentos de aplicação para o MTA em capeamento pulpar em pulpites reversíveis, apexificação, reparos em perfurações laterais cirúrgicas e não cirúrgicas.

Em artigo publicado por Qin et al⁵⁷ os autores sugerem a hipótese de que o MTA poderia ser utilizado como novo medicamento para evitar a recidiva do Tumor ósseo de células gigantes. Este tumor é localmente agressivo com alta taxa de recorrência local. O tratamento cirúrgico pode causar extensa morbidade e recorrência local bem como causar comprometimento pulmonar. Embasados no excelente resultado do MTA como agente reparador de perfurações radiculares, ótima ação biológica e como agente estimulador para regeneração óssea, regeneração de ligamento periodontal e como formador de tecido ósseo, os autores sugerem a hipótese de que o MTA pode ser utilizado como terapia anti-recorrência do tumor ósseo de células gigantes. Os autores baseiam-se principalmente no fato de que na presença de MTA as células crescem rapidamente e produzem mais expressão gênica para matriz mineralizada secretada pelos osteoblastos. Diante desse mecanismo de ação os autores sugerem a aplicação de MTA em tumores ósseos de células gigantes para induzir a produção de tecido ósseo, inibindo assim a recidiva de casos. O MTA seria a terapia de primeira escolha no caso de recidiva deste tumor após cirurgia.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O Objetivo deste trabalho foi investigar, por meio de análise dimensional e histomorfométrica, o comportamento do cimento Portland na fase sólida, quando utilizado como enxerto para aumento ósseo, após implantação subperiosteal e avaliado nos períodos de tempo entre 90, 150, 240, 300 e 500 dias.

As grandezas dimensionais investigadas foram:

- Volume do corpo de prova de CP;
- Área superficial do corpo de prova de CP.

Na análise histomorfométrica foi avaliada:

- Área superficial de tecido ósseo neoformado por osteotransdução no corpo de prova de CP.

4. MATERIAL E MÉTODO

4. MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da PUCPR com parecer favorável de aprovação nº 35.07/CEUA-PUCPR (ANEXO A). Para a manutenção e aclimatação dos animais em biotério foram observadas e seguidas as normas constantes no documento referente à manutenção/aclimatação de animais em laboratório com padronização elaborada pela Universidade Federal do Paraná e seguida pelo biotério da PUCPR (ANEXO B). O modelo animal adotado para a pesquisa foi baseado no modelo animal de doença ⁵⁸. A pesquisa segue o paradigma tradicional quantitativo sendo experimental e descritiva.

4.1 DA AMOSTRA SELECIONADA

Constituída de 100 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) – *Rodentia* – *Mammalia*, linhagem Wistar, machos, adultos, pesando entre 250g +/- 50g, alimentados com ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em cinco grupos de vinte animais em cada grupo (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos grupos em relação ao período de tempo.

Grupos	I	II	III	IV	V
Morte/Animais	90 dias	150 dias	240 dias	300 dias	500 dias
Número de Animais	20	20	20	20	20

Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

4.2 MÉTODO

4.2.1 DOS CORPOS DE PROVA

Para a obtenção de cada corpo de prova foram manipuladas porções de cimento portland branco⁴, na proporção de 0,12 mg de pó para 0,05 mL de água destilada, em placa de vidro esterilizada, até a obtenção de consistência pastosa, sendo então acondicionado em moldes pré-estabelecidos em elastômero Optosi^{®5} e Xantopren^{®6} na forma de calotas esféricas (Figura 1).

Os corpos de prova apresentaram medidas uniformes para implantação em todos os grupos a serem testados:

- a) Diâmetro - $D = 6,06\text{mm}$
- b) Maior espessura - $h = 1,10\text{mm}$

Os corpos de prova foram mensurados com paquímetro digital Mitutoyo^{®7} e foram padronizados para que todos os animais recebessem o corpo de prova com as mesmas medidas (Figura 2). Para realização dos procedimentos cirúrgicos de implantação subperiosteal os corpos de prova foram esterilizados em óxido de etileno.

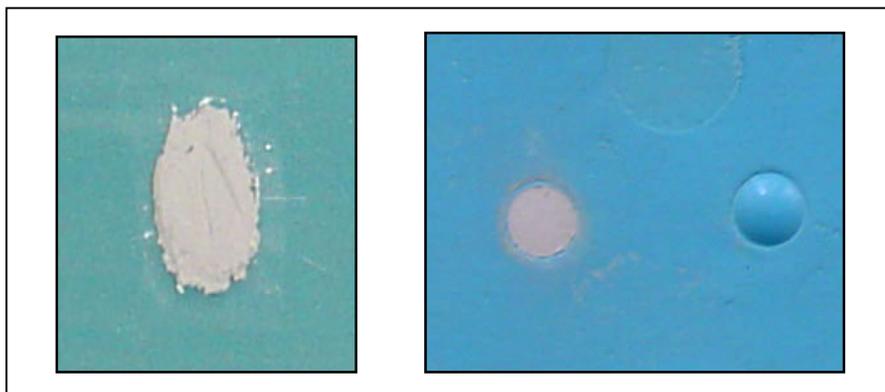


Fig. 1- Cimento portland branco manipulado e acondicionado no molde.

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

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

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

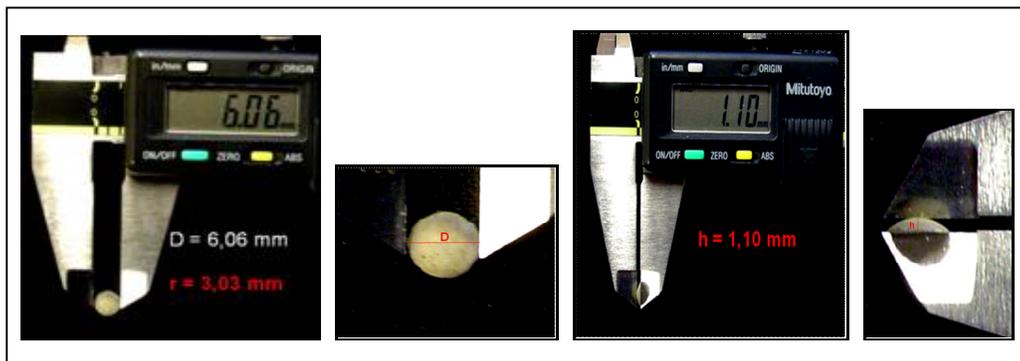


Fig. 2 – Corpo de prova de CP branco na forma de calota esférica.

4.2.2 DOS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Para anestesia dos animais foram utilizados cloridrato de Ketamina^{®8} e cloridrato de Tiazina^{®9} na proporção de (5:1), sendo 0,1mL/100g de peso do animal administrado por via intramuscular.

Após anestesia dos animais foi processada a tricotomia da calvária, assepsia da região a ser operada, realizada incisão de 2,5cm com lâmina 15 em sentido sagital, realizada divulsão do couro e tecido subcutâneo tendo acesso ao periósteo. Em seguida realizou-se incisão parasagital no periósteo, descolamento e afastamento do periósteo e acesso os ossos da calvária. Após o acesso, foi implantado o corpo de prova em contato direto com a calvária do animal sendo que neste momento não existiu estimulação óssea para provocar sangramento na calvária, sendo o contato do corpo de prova com a calvária livre de sangramento. Realizou-se sutura com fio mononylon 4-0^{®10} e administrada solução antiinflamatória e analgésica de Banamine^{®11} 0,1mL por via intramuscular no pós-operatório imediato. As suturas foram removidas após sete dias (Figura 3).

⁷ Mitutoyo[®] - Japan.

⁸ Vetanarcol[®] - Konig – Argentina.

⁹ Rompun[®] - Bayer – Alemanha.

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

¹¹ Schering-Plough[®] - USA.



Fig. 3 – Acesso a calvária, aposição subperiosteia do corpo de prova de CP e sutura.

4.2.3 DO CRONOGRAMA DE MORTE DOS ANIMAIS

Os animais foram mortos nos tempos pós-cirúrgicos estabelecidos em 90, 150, 240, 300 e 500 dias, por meio de injeção em dose letal de cloridrato de Ketamina[®] e cloridrato de Tiazina[®] sendo a dose estabelecida em 0,2mL/100g administrado por via intraperitoneal.

4.2.4 DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ESPÉCIMES

A obtenção dos espécimes foi realizada por meio de osteotomia e remoção em bloco da região da calvária contendo o corpo de prova de CP, em seguida fixados em solução de formalina a 10% e descalcificados por 30 dias em ácido fórmico a 30% para posterior processamento histológico. No momento da secção, na porção central dos corpos de prova, os mesmos foram mensurados em seu maior diâmetro, assegurando-se assim a exata medida da porção central do corpo de prova (Figura 4); foram então incluídos em parafina, processados e os cortes histológicos com espessura de 4µm foram realizados na porção central da região da calvária contendo o corpo de prova de CP branco. Foram utilizados os corantes hematoxilina e eosina e alizarina 4.2.

O corante alizarina 4.2⁵⁹ foi utilizado para evidenciar a formação de fosfato de cálcio e carbonato de cálcio. Este corante está disponível para estudos nos pH 4,2 e 7,1. Pode corar oxalato de cálcio, fosfato de cálcio e carbonato de cálcio. O oxalato de cálcio não é corado com alizarina 4.2, sendo que fosfato de cálcio e carbonato de cálcio coram-se, em tons de laranja, com alizarina 4.2.

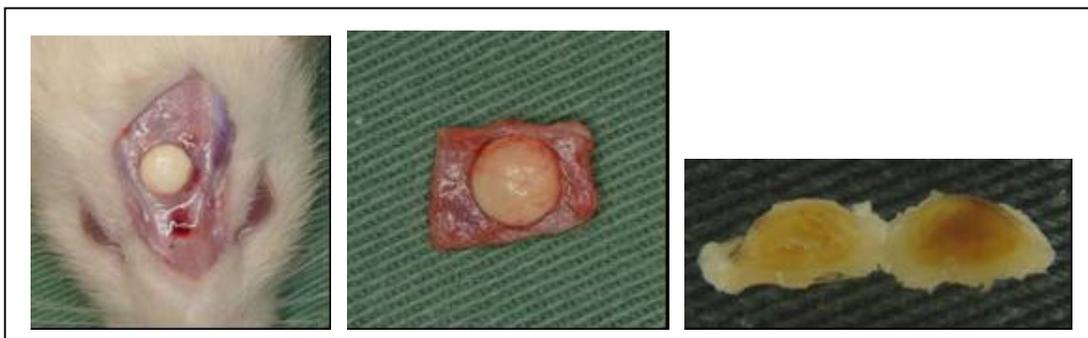


Fig. 4– Remoção em bloco, espécime contendo o corpo de prova de CP, secção do corpo de prova na porção mediana após a descalcificação.

4.2.5 DA ANÁLISE MACROSCÓPICA

Observou-se o corpo de prova na região da calvária, procurando assegurar que todos estivessem recobertos pelo periósteo, observou-se a consistência e se apresentavam fixação denotando assim a osteointegração. As imagens da figura 5 são representativas de cada um dos 5 grupos nos períodos de tempo de 90, 150, 240, 300 e 500 dias.

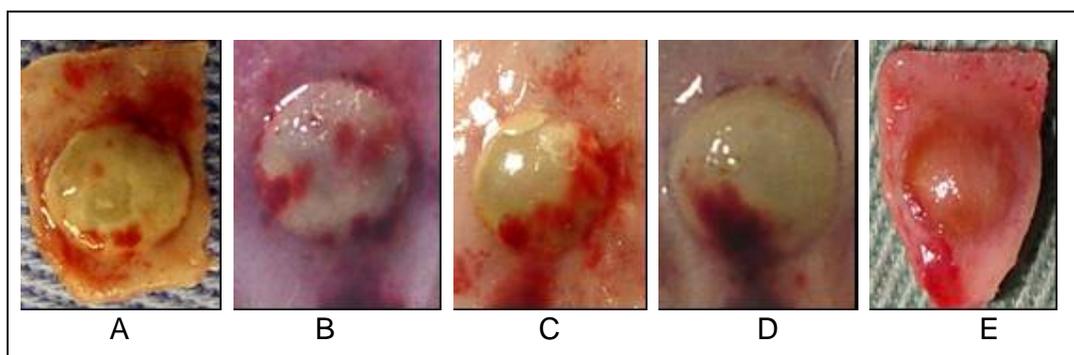


Fig.5 – Visão macroscópica dos corpos de prova de CP na região da calvária; (A) 90 dias, (B) 150 dias, (C) 240 dias, (D) 300 dias e (E) 500 dias.

4.2.6 DA ANÁLISE MICROSCÓPICA

Para a análise microscópica foi utilizada microscopia de luz com equipamento Olympus BX50^{®12} acoplado ao sistema de imagens com câmera Sony^{®13} (CCD – Íris color vídeo câmera) utilizando-se o programa Image-Pro Plus^{®14}. As imagens capturadas das lâminas de cada um dos 20 animais de cada grupo foram analisadas no programa Image-Pro Plus[®] com aumentos de 4X, 40X, 100X, 200X, 400X.

Para a análise do volume final do corpo de prova foi estabelecida a fórmula do volume da calota esférica dada por: $1/6 \cdot \pi \cdot h (3r^2 + h^2)$. Para a análise da área superficial final do corpo de prova foi estabelecida a fórmula da área superficial da calota esférica dada por: $2\pi \cdot D \cdot h$ onde D é dado por $(2 \cdot r)$ (Figura 6).

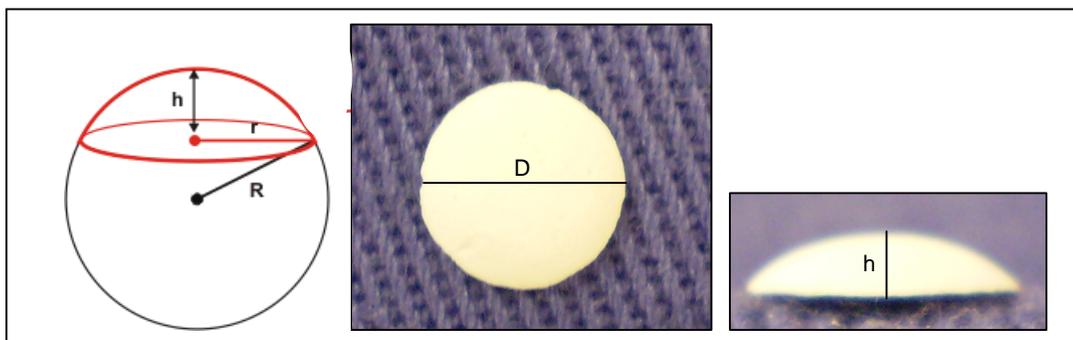


Fig.6 – Desenho esquemático para análise do volume e da área superficial do corpo de prova de CP.

Estabelecidas as fórmulas de volume e área superficial da calota esférica e sendo conhecidas as medidas de $h = 1,10\text{mm}$ e $D = 6,06\text{mm}$, as mesmas foram transferidas para a planilha de dados da Microsoft Excel^{®15}, onde foi calculado o volume inicial e área superficial inicial do corpo de prova, resultando em medidas padronizadas para volume e área superficial, as quais foram utilizadas como referência inicial para posterior comparação com os dados colhidos das mensurações realizadas microscopicamente no programa Image-Pro Plus[®] calibrados no aumento de 4X para a fórmula dada. (Figura7).

¹² BX50 – Japan.

¹³ CCD – Íris color vídeo camera – Japan.

¹⁴ Image-Pro Plus 6.0 – Media Cybernetics – Silver Spring – USA.

¹⁵ Microsoft Office Enterprise Excel – 2007 – USA.

Os valores para volume inicial e área superficial inicial dos corpos de prova de CP ficaram estabelecidos:

a) $V_{\text{inicial}} = 16,56036637 \text{mm}^3$

b) $S_{\text{inicial}} = 22,25504236 \text{mm}^2$

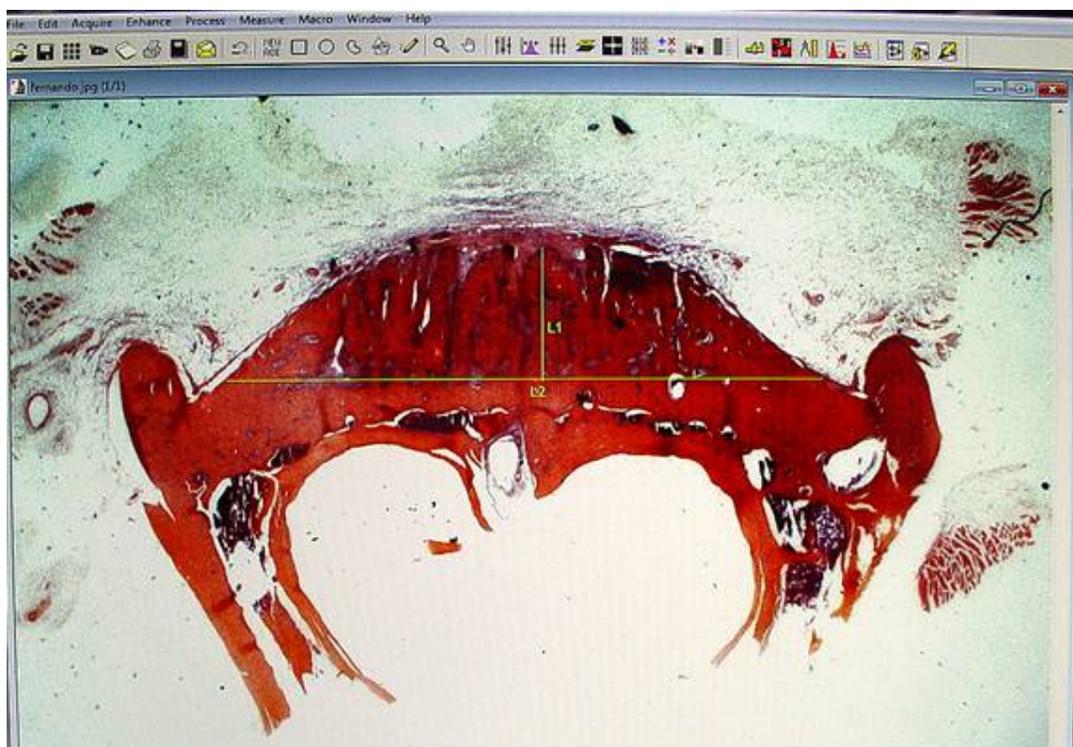


Fig.7 – Análise das medidas da espessura e diâmetro dos corpos de prova no programa Image-Pro Plus®. A figura é representativa de todos os grupos avaliados.

O tecido ósseo neoformado foi quantificado pela análise morfométrica. As aferições foram realizadas pela análise da área de cada lâmina utilizando a função de contagem e comparação de classes pelo programa Image Pro Plus®, resultando em uma porcentagem de neoformação de tecido ósseo por lâmina estudada. Marcaram-se em verde todas as estruturas características de neoformação óssea (Figura 8). As regiões de neoformação óssea foram posteriormente adicionadas na planilha do Microsoft Excel® para comparação com os dados de área superficial inicial previamente estabelecida.

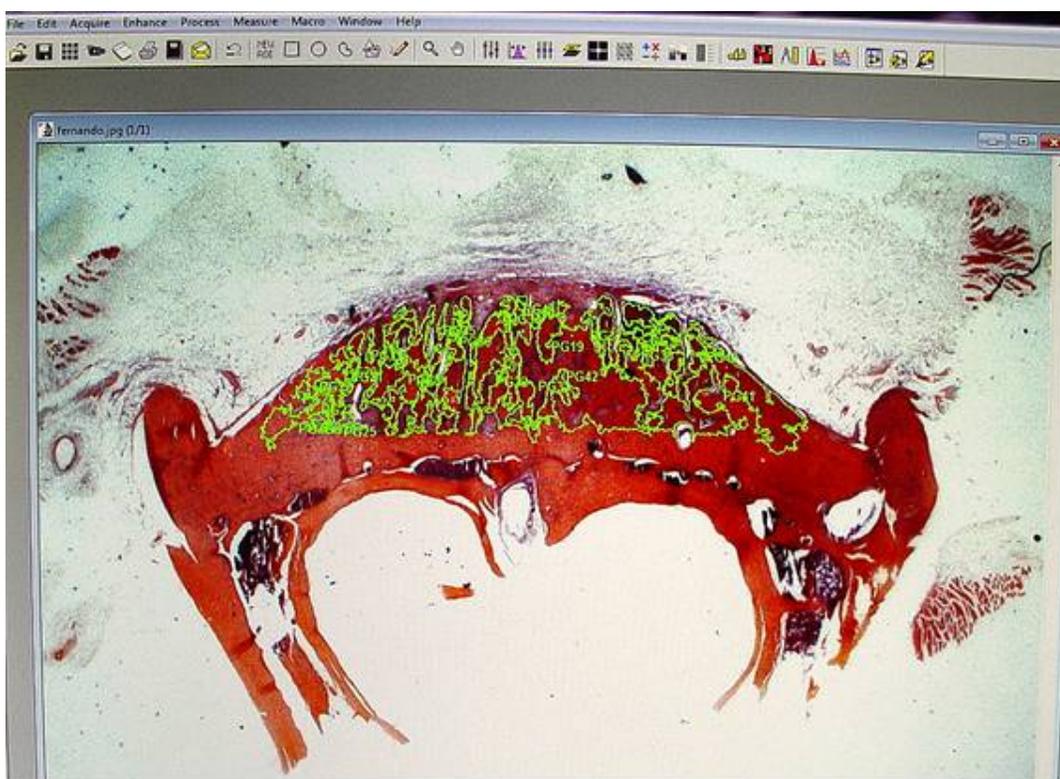


Fig.8 – Área de tecido ósseo neoformado marcada e mensurada no Image-Pro Plus. A figura é representativa de todos os grupos avaliados.

Os dados referentes ao volume final dos corpos de prova, dentro dos tempos estabelecidos para cada grupo, foram registrados em mm^3 , a área superficial final registrada em mm^2 e a área superficial de tecido ósseo neoformado registrada em mm^2 . Posteriormente todos os dados foram também analisados em valores percentuais. Os valores referentes às mensurações efetuadas em cada uma das lâminas, referentes aos 20 animais de cada grupo, estabelecidos dentro do período de tempo de 90, 150, 240, 300 e 500 dias, estão dispostos no ANEXO C.

4.2.7 DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados foram utilizados testes de normalidade de Shapiro-Wilk, teste de homogeneidade de variância de Levene, a análise de variância para dados, (ANOVA), utilizada foi o modelo paramétrico de Tukey HSD e Games-Howell, sendo considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), fazendo-se comparações entre o volume final, área superficial final e área superficial de tecido ósseo neoformado entre os grupos nos cinco períodos de tempo experimentais. Para a avaliação do grau de associação entre as variáveis utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson (2-tailed).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os dados obtidos foram decorrentes das análises microscópica e macroscópica em 20 lâminas por grupo nos períodos de tempo de 90, 150, 240, 300 e 500 dias, totalizando 100 lâminas coradas com hematoxilina e eosina e 100 lâminas coradas em Alizarina 4.2.

Os dados são descritos da seguinte forma:

- Análise macroscópica descritiva dos corpos de prova, implantados na região subperiosteal da calvária dos animais, nos períodos de tempo experimentais;
- Análise microscópica descritiva do comportamento dos corpos de prova de CP, nos períodos de tempo experimentais;
- Análise estatística do volume, da área superficial e da área de tecido ósseo neoformado nos períodos de tempo experimentais. Os valores obtidos para cada uma das lâminas estão expressos nos quadros de 1 a 5 do anexo C;

5.1 GRUPO I – 90 DIAS

5.1.1 Análise macroscópica e microscópica descritiva

Na análise macroscópica observou-se a fixação do corpo de prova com recobrimento pelo perióstio, mantendo a forma de calota esférica e denotando osteointegração. Observa-se que o corpo de prova não se encontra em sua forma sólida como quando foi implantado na calvária do animal, pois a consistência apresentou-se com certa resiliência (Figura 9 A).

Na análise microscópica observou-se o íntimo contato do corpo de prova com o tecido ósseo da calvária, sem formação de fibrose na interface osso/implante denotando processo de osteointegração. O endóstio e perióstio apresentam-se preservados. Na parte inferior nota-se a formação de tecido de granulação, faixas de fibrina e área de neoformação óssea com deposição de osteóide e mineralização da matriz óssea neoformada. Os osteócitos apresentam-se aglomerados (seta), sendo aprisionados pela matriz em mineralização, na parte inferior da interface osso/implante, denotando que a direção de neoformação óssea é centrípeta. Os osteócitos apresentam-se nucleados mostrando vitalidade e funcionalidade celular (Figura 9 B e 9 C). Todos os espécimes deste grupo mostraram padrões histológicos similares. Na coloração Alizarina 4.2, observou-se a marcação de áreas de tecido ósseo em neoformação na cor castanha alaranjada, denotando a existência de formação de fosfato de cálcio que é marcado por este corante em específico, mostrando a viabilidade do tecido ósseo neoformado (Figura 9 D).

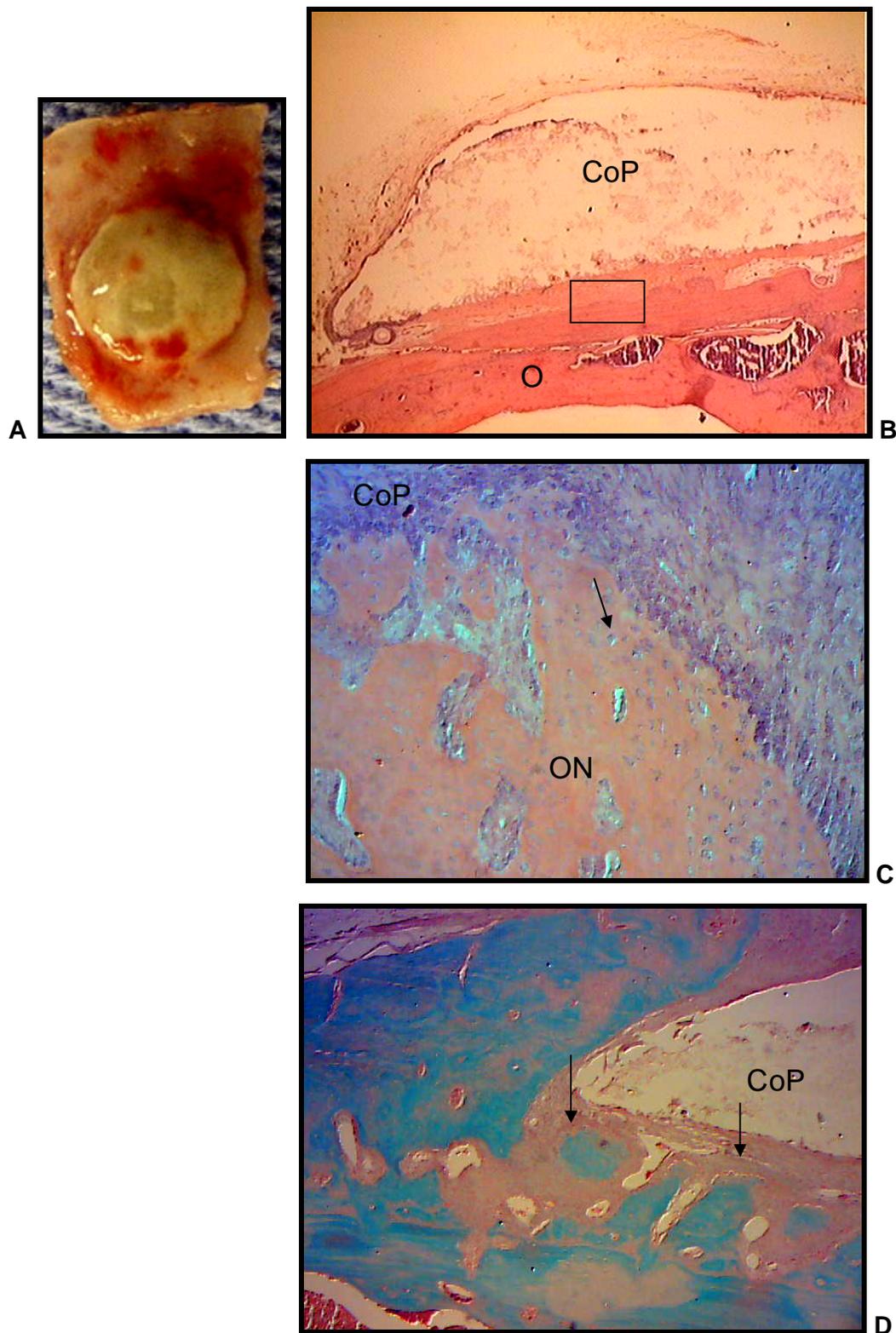


Fig.9 – (A) Corpo de prova (CoP) de CP; (B) Corpo de prova (CoP), na área em destaque a interface osso/CoP (O/CoP) HE 4X; (C) Osteócitos (seta), deposição de matriz óssea mineralizada e tecido ósseo neoformado (ON)-HE 200X; (D) Fosfato de cálcio evidenciado na cor castanha alaranjada (setas) Alizarina 4.2 100X.

5.2 GRUPO II – 150 DIAS

5.2.1 Análise macroscópica e microscópica descritiva

Pela análise macroscópica observou-se fixação do corpo de prova, recobrimento pelo periósteeo, ausência de deslocamento. A forma de calota esférica foi mantida, sendo que a consistência do corpo de prova não era sólida. Observaram-se porções do corpo de prova de CP com resiliência, mescladas com áreas de consistência fibrosa (Figura 10 A).

Na microscopia observou-se área de deposição de fibrina mais extensa e de maior espessura, sendo acompanhada por infiltração de tecido de granulação, bem como penetração de células indiferenciadas para o interior do corpo de prova no sentido da periferia para o centro, mantendo-se o padrão centrípeto de formação de tecido ósseo lamelar neoformado. Observou-se íntimo contato do corpo de prova com a calvária do animal, sem a formação de fibrose, denotando o fenômeno da osteointegração. Todos os espécimes deste grupo mostraram padrões histológicos similares, variando apenas a espessura das faixas de fibrina e do tecido de granulação, bem como na quantidade de tecido ósseo lamelar neoformado (Figura 10 B e 10 C).

Observou-se a formação de fosfato de cálcio na interface osso /corpo de prova, denotando que esta região posteriormente será calcificada e formará tecido ósseo lamelar. (Figura 10 D).

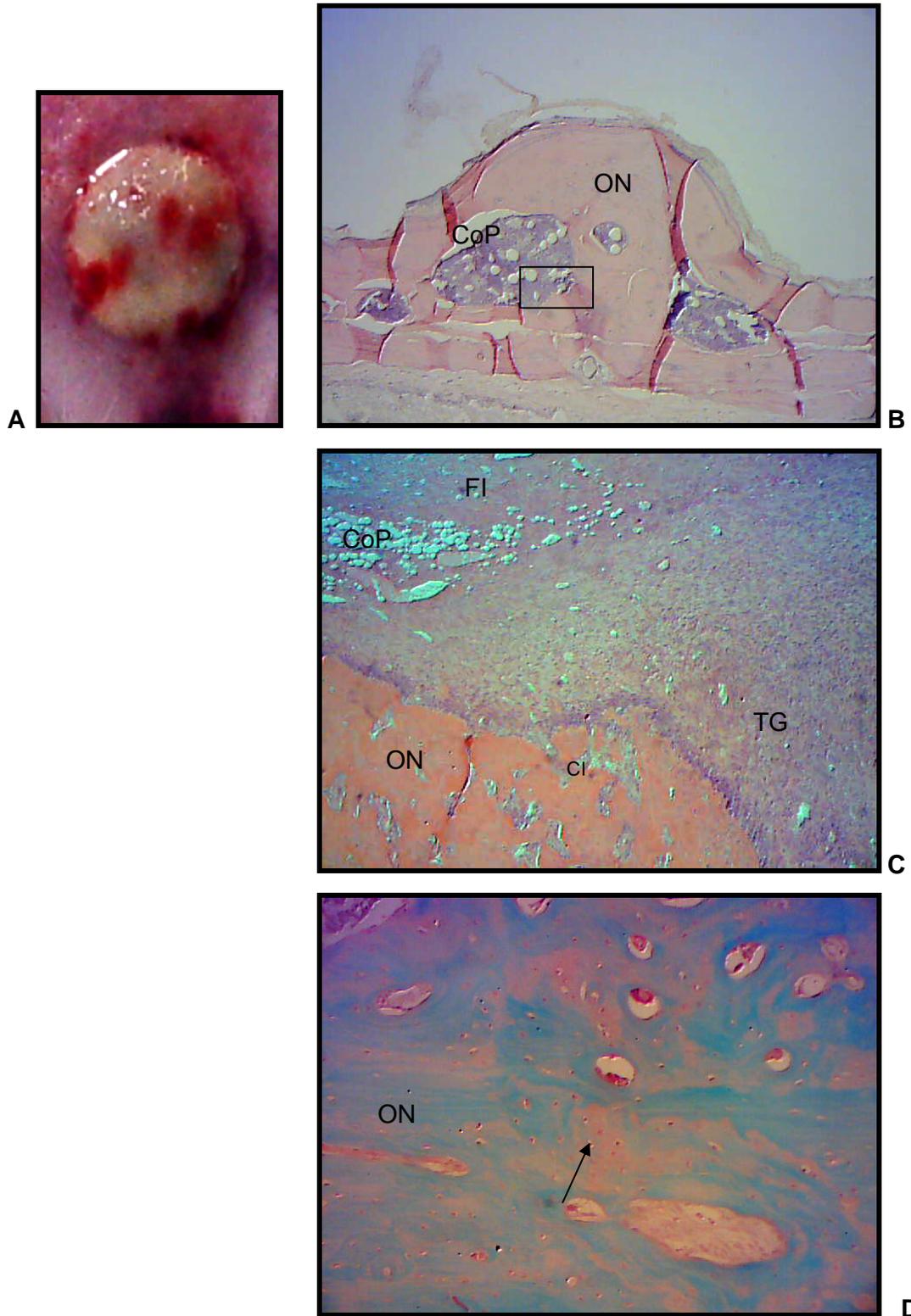


Fig.10 – (A) Corpo de prova de CP; (B) Corpo de Prova (CoP) com interface osso/CoP sem formação de fibrose-HE 4X; (C) na área em destaque infiltração de tecido de granulação (TG), faixa de fibrina (FI), células indiferenciadas (CI) e neoformação óssea lamelar (ON)-HE 100X. Em (D) áreas de fosfato de cálcio que posteriormente sofrerão mineralização sendo coradas por alizarina 4.2 (seta) 200X.

5.3 GRUPO III – 240 DIAS

5.3.1 Análise macroscópica e microscópica descritiva

Na macroscopia verificou-se a transformação do corpo de prova, apresentando pequenos resíduos de CP e áreas de substituição do CP por tecido semelhante ao osso do animal. Os corpos de prova apresentaram-se fixos na calvária dos animais, denotando a osteointegração. Esses fenômenos sugerem a bioatividade do material bem como sua capacidade de osteocondução, osteoindução e osteotransdução (Figura 11 A).

Na microscopia observou-se a substituição do corpo de prova de CP por tecido ósseo neoformado, manutenção parcial da forma de calota esférica do corpo de prova, sem a formação de fibrose, apresenta tecido de granulação, áreas de formação de fibrina, observando-se lamelas de tecido ósseo neoformado com osteoblastos nucleados e vitais, produzindo osteóide que será posteriormente mineralizado formando a fase mineral do osso (Figura 11 B e 11 C). O padrão de neoformação centrípeto é mantido, sendo a área de contato entre osso/corpo de prova a primeira a ser biotransformada. Todos os espécimes deste grupo apresentaram o mesmo padrão de biotransformação, guardando diferenças relacionadas apenas quanto à quantidade de tecido ósseo neoformado.

A bioatividade do corpo de prova de CP é confirmada pela presença de formação de fosfato de cálcio, corado com alizarina 4.2 e que denota a transformação do CP em osso lamelar neoformado. Confirmam-se, portanto, os fenômenos de osteoindução, osteocondução, osteointegração e osteotransdução (Figura 11 D).

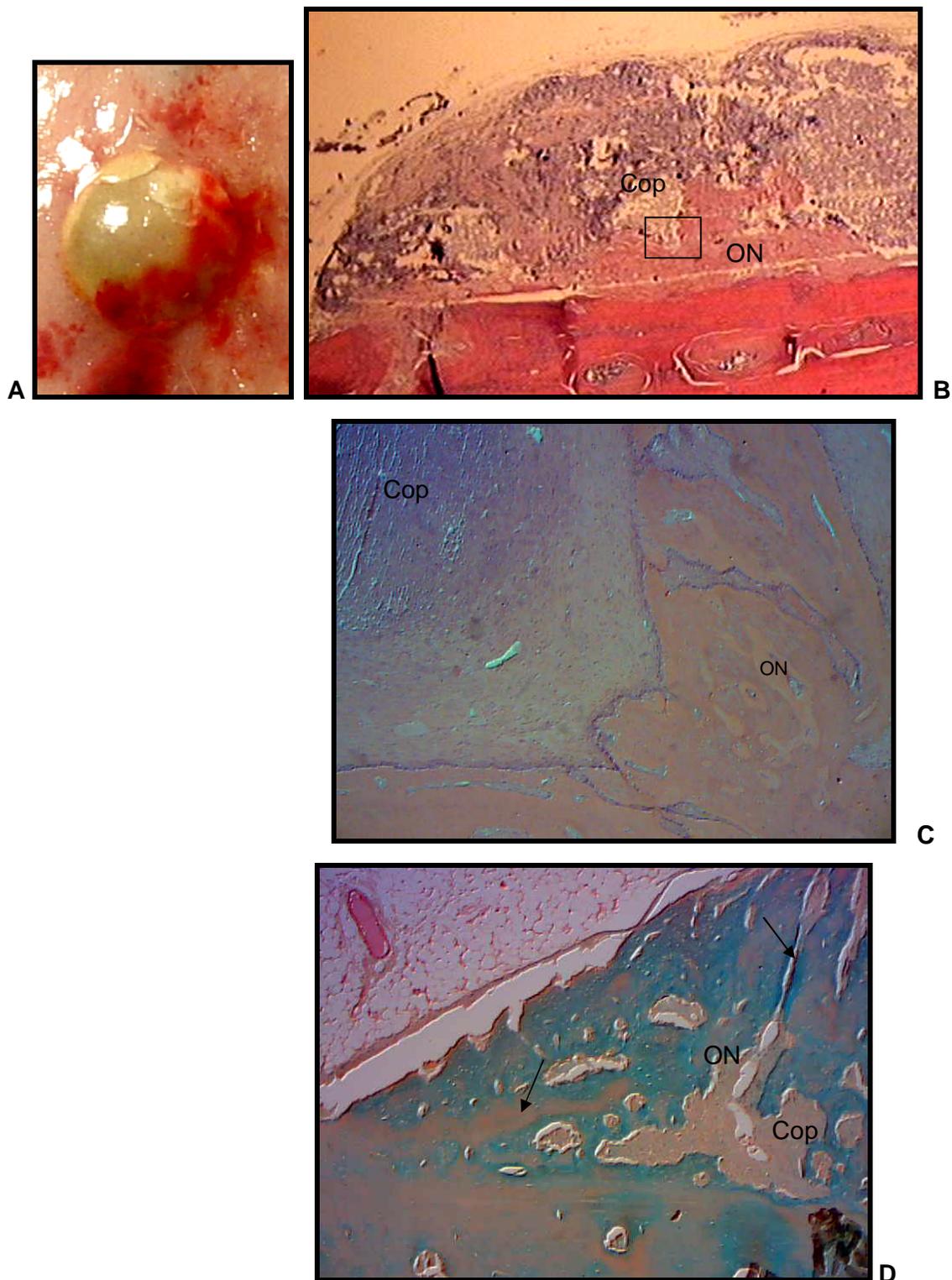


Fig.11 – (A) Corpo de prova CP; (B) Corpo de prova de CP substituído por tecido ósseo neoformado, tecido de granulação, células indiferenciadas sem a formação de fibrose – HE 4X; (C) no detalhe o tecido ósseo neoformado apresentando lamela óssea com osteoblastos nucleados vitais mostrando franca atividade celular de neoformação óssea – HE 100X. (D) No detalhe fosfato de cálcio confirmando a fase mineral do tecido ósseo vital neoformado (setas) – Alizarina 4.2 100X.

5.4 GRUPO IV – 300 DIAS

5.4.1 Análise macroscópica e microscópica descritiva

Na análise macroscópica observou-se a ausência de cristais de CP, confirmando a transformação do biomaterial em tecido semelhante ao osso do animal. O corpo de prova apresentou-se fixo (Figura 12 A).

Pela análise microscópica observou-se a substituição do corpo de prova de CP por tecido ósseo neoformado com características lamelares, apresentando osteoblastos nucleados, vitais, produção de osteóide, proliferação de células indiferenciadas para o interior do corpo de prova, mostrando a osteoindução e osteocondução do CP. Observa-se claramente a interface corpo de prova/osso neoformado, com a presença de osteoblastos produtores de osteóide, osteócitos aprisionados na matriz mineralizada, presença de vasos mostrando a vitalidade do osso neoformado bem como a neoformação vascular. O padrão centrípeto é preservado, sendo que as áreas residuais de CP estão em sua maioria na parte central do corpo de prova, sendo o restante do corpo de prova substituído por osso lamelar neoformado (Figuras 12 B e 12 C).

O fosfato de cálcio, corado em tom castanho alaranjado, é observado disperso nas áreas de neoformação óssea (Figura 12 D), que posteriormente será mineralizado transformando-se em hidroxiapatita, principal componente do tecido ósseo.

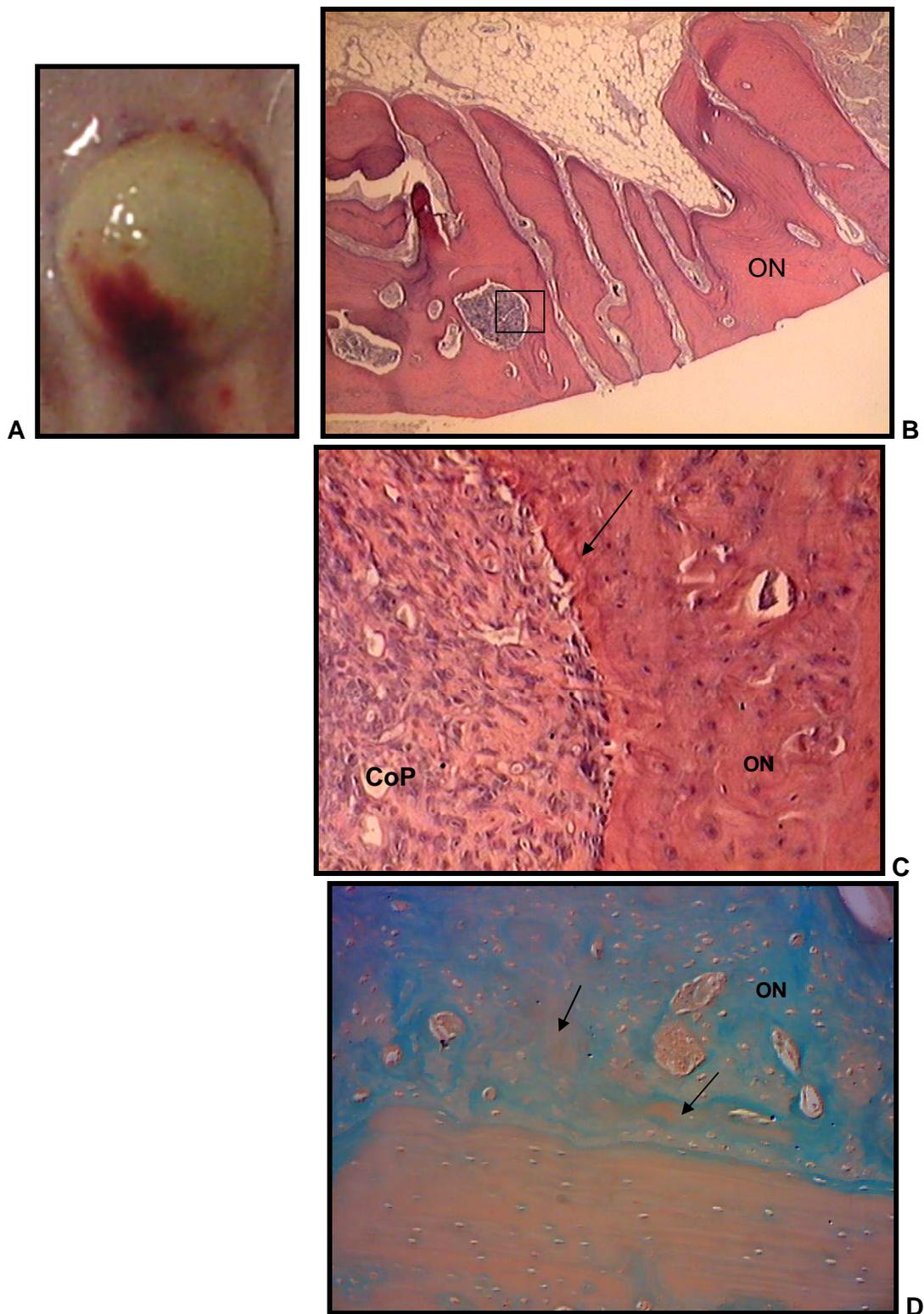


Fig.12 – (A) Corpo de prova de CP; (B) Corpo de prova substituído por tecido ósseo neoformado, mantendo parcialmente a forma de calota esférica- HE 4X; (C) no detalhe a interface entre corpo de prova/tecido ósseo neoformado mostrando proliferação celular, osteoblastos produzindo osteóide (seta), células indiferenciadas no interior do corpo de prova mostrando osteocondução e osteoindução do CP – HE 200X; (D) alizarina 4.2 - corando fosfato de cálcio (setas) 200X.

5.5 GRUPO V – 500 DIAS

5.5.1 Análise macroscópica e microscópica descritiva

Pela análise macroscópica observou-se a fixação do corpo de prova, manutenção parcial da forma de calota esférica. O corpo de prova de CP apresentou diminuição de seu volume (Figura 13 A).

Na análise microscópica observou-se o íntimo contato da interface osso neoformado/calvária (seta) mostrando o fenômeno da osteointegração; mostra-se ainda a completa substituição do corpo de prova por tecido ósseo neoformado, confirmando o fenômeno da osteotransdução e tendo o osso neoformado as características de vitalidade, neoformação vascular, preservação do perióstio e endóstio. O osso neoformado é do tipo lamelar, com presença de osteócitos nucleados, denotando vitalidade e viabilidade celular. No detalhe mostra-se a franca proliferação celular, diferenciação celular e neoformação vascular, penetrando áreas do corpo de prova de CP que estão em fase final de biotransformação. Como observado na análise macroscópica, confirmou-se a diminuição do volume do corpo de prova com manutenção parcial da forma de calota esférica (Figuras 13 B e 13 C).

Na coloração com Alizarina 4.2 observou-se a marcação do fosfato de cálcio, tanto na região da calvária do animal como na região do corpo de prova de CP (setas) (Figura 13 D).

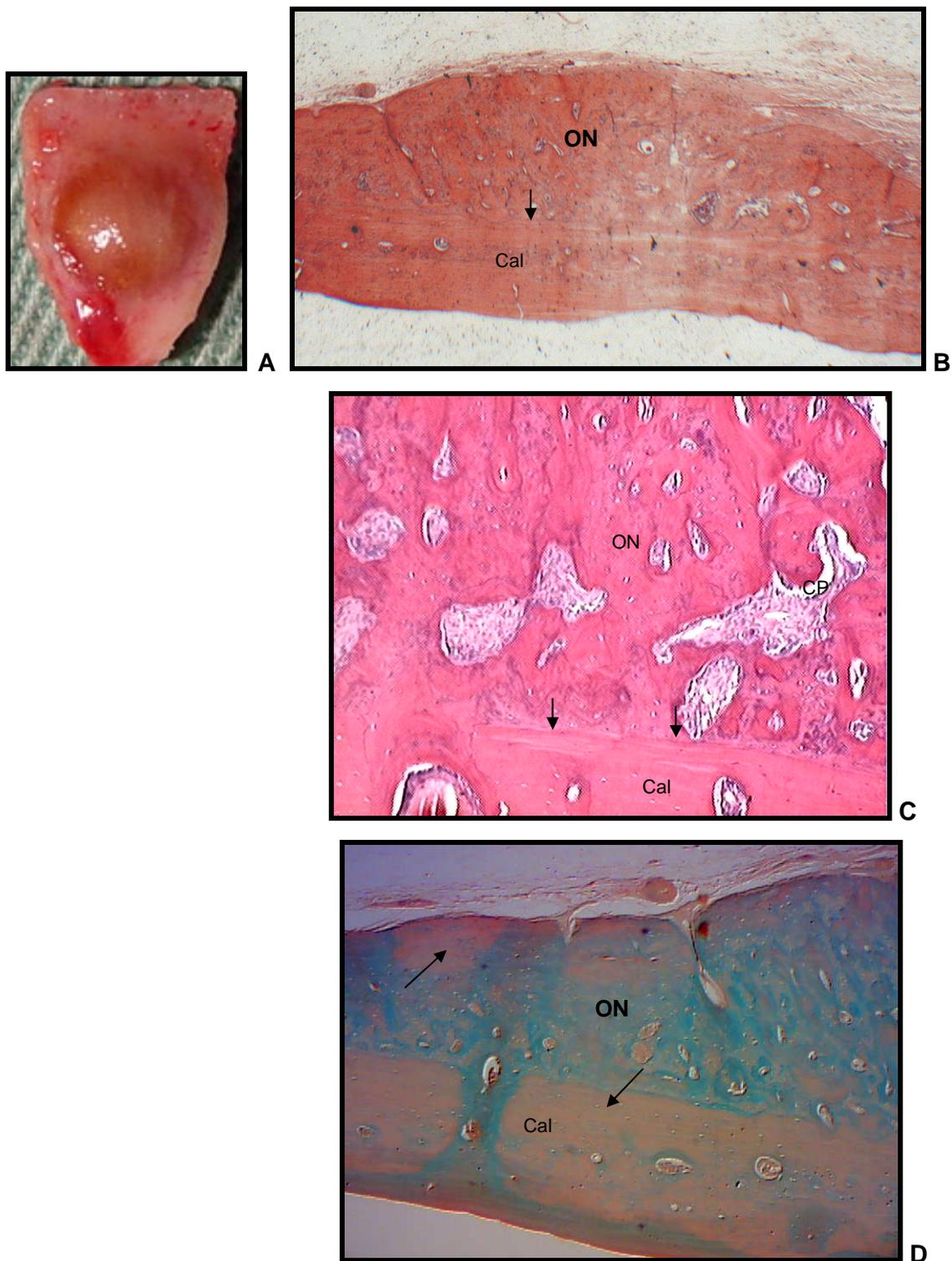


Fig.13 – (A) Corpo de prova de CP; (B) corpo de prova totalmente substituído por tecido ósseo lamelar neoformado com a interface osso neoformado/calvária sem a formação de fibrose – HE 4X; (C) no detalhe pequenas áreas residuais de CP que estão em processo de osteotransdução e interface corpo de prova/calvária (Cal) demonstrando osteointegração e ausência de fibrose (setas)– HE 200X; (D) Fosfato de cálcio corado na calvária e no interior do osso lamelar neoformado – Alizarina 4.2 100X.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para os percentuais de perda de volume, perda de área superficial e área superficial de tecido ósseo neoformado, nos tempos experimentais, demonstrou que não ocorre distribuição normal da variável de porcentagem de tecido ósseo neoformado nos grupos II, III e V ($p < 0,05$).

O teste de Levene demonstrou que as variâncias não eram homogêneas para o percentual de área de tecido ósseo neoformado ($p < 0,05$).

Na estatística descritiva observou-se que a média da perda de volume dos corpos de prova de CP dos grupos I, II, III, IV e V, em relação ao volume inicial pré-estabelecido ($V_{\text{inicial}} = 16,56036637\text{mm}^3$) variou de 52,11% ($8,63\text{mm}^3$) a 79,09% ($13,10\text{mm}^3$), sendo constatada que a média geral de perda de volume foi de 65,32% ($10,81\text{mm}^3$).

A média da perda de área superficial dos corpos de prova de CP dos grupos I, II, III, IV e V, em relação a área superficial pré-estabelecida ($S_{\text{inicial}} = 22,25504236\text{mm}^2$) variou de 17,65% ($3,93\text{mm}^2$) a 40,33% ($8,98\text{mm}^2$), sendo constatada que a média geral de perda de área superficial foi de 31,04% ($6,91\text{mm}^2$).

A Média de área superficial de tecido ósseo neoformado, em relação a área superficial inicial pré-estabelecida ($S_{\text{inicial}} = 22,25504236\text{mm}^2$), variou de 1,97% ($0,44\text{mm}^2$) a 12,79% ($2,85\text{mm}^2$), sendo constatada que a média geral da área superficial de tecido ósseo neoformado foi de 4,91% ($1,09\text{mm}^2$).

Os dados comprovaram as análises macroscópicas e microscópicas onde se verificava a diminuição do volume e da área superficial dos corpos de prova de CP e também que a proporção de tecido ósseo neoformado era menor do que a perda de área e volume nos tempos experimentais.

Os valores referentes à estatística descritiva encontram-se na tabela 2 e os valores referentes às médias gerais das variáveis encontram-se na tabela 3.

Tabela 2 – Estatística descritiva das variáveis em função dos tempos experimentais.

	Grupo	Média	Mediana	Desvio Padrão
Perda de volume (mm ³)	I	8,63	8,33	2,55
	II	8,86	8,54	1,64
	III	11,08	11,22	1,83
	IV	13,10	13,07	1,25
	V	12,42	12,59	1,31
% de perda de volume	I	52,11	50,32	15,37
	II	53,50	51,59	9,92
	III	66,92	67,78	11,04
	IV	79,09	78,95	7,57
	V	75,01	76,00	7,92
Perda de área (mm ²)	I	6,02	5,56	3,45
	II	3,93	4,09	2,23
	III	6,98	6,78	2,47
	IV	8,98	7,98	2,46
	V	8,64	8,27	2,02
% de perda de área	I	27,06	25,00	15,52
	II	17,65	18,36	10,04
	III	31,36	30,45	11,09
	IV	40,33	35,86	11,05
	V	38,83	37,18	9,08
Área osso neoformado (mm ²)	I	0,44	0,43	0,13
	II	0,60	0,59	0,22
	III	0,88	0,83	0,24
	IV	0,70	0,68	0,20
	V	2,85	2,78	2,03
% de osso neoformado	I	1,97	1,95	0,60
	II	2,68	2,64	0,98
	III	3,96	3,75	1,08
	IV	3,16	3,04	0,91
	V	12,79	12,51	9,12

Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

Tabela 3 – Média geral dos grupos (n= 100 animais) referentes à perda de volume, perda de área superficial e área superficial de tecido ósseo neoformado. (V inicial= 16,56036637mm³) e (S inicial = 22,25504236mm²).

Perda de Volume	65,32%	(10,81mm ³)
Perda de área superficial	31,04%	(6,91mm ²)
Área superficial de tecido ósseo neoformado	4,91%	(1,09mm ²)

Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

Apesar de três tempos da variável área de osso neoformado não apresentar distribuição normal, observou-se que a média e a mediana (Tabela 2) são valores próximos indicando distribuição simétrica, sendo recomendada a aplicação do teste ANOVA para comparar as médias nos tempos experimentais. O teste indica que houve diferenças estatísticas significativas entre as médias dos grupos experimentais para todas as variáveis estudadas ($p < 0,05$).

Os testes de Tukey HSD e Games-Howell demonstraram que nas múltiplas comparações entre as variáveis dependentes dos grupos existem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Gráfico 1).

A) PORCENTAGEM DE PERDA VOLUMÉTRICA

O grupo IV apresentou as maiores médias de perda volumétrica (79,09%) em relação aos grupos estudados.

Apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo I ($p=0,000$), ao grupo II ($p=0,000$) e ao grupo III ($p=0,0048$).

B) PORCENTAGEM DE PERDA DE ÁREA

O grupo IV apresentou as maiores médias de perda de área (40,33%) em relação aos grupos estudados.

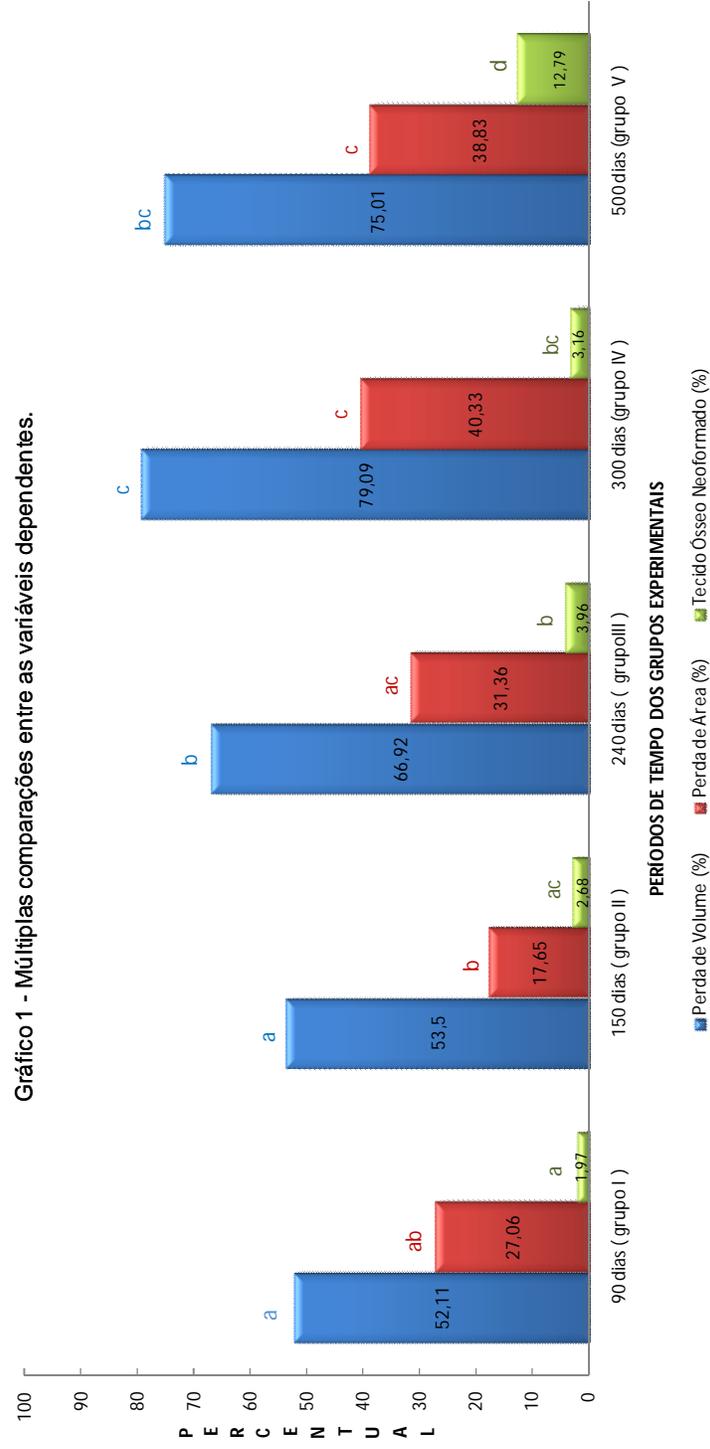
Apresentou relação direta com a perda volumétrica bem como diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo I ($p=0,0041$) e ao Grupo II ($p=0,000$)

C) PORCENTAGEM DE ÁREA DE TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO

O grupo V apresentou as maiores médias de porcentagem de tecido ósseo neoformado (12,79%) em relação aos grupos estudados.

Apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado a todos os outros grupos: Grupo I – ($p=0,0003$), Grupo II – ($p=0,0007$), Grupo III – ($p=0,0030$), Grupo IV – ($p=0,0012$).

Gráfico 1 - Múltiplas comparações entre as variáveis dependentes.

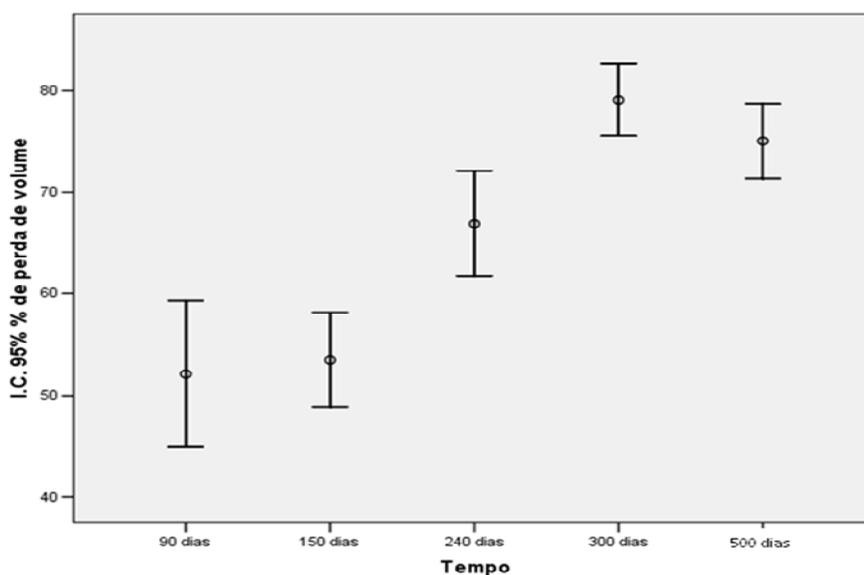


Letras iguais denotam que não houve diferença estatisticamente significativa durante os períodos de tempos experimentais (p>0,05).

Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

A) Os dados referentes a porcentagem de perda de volume entre os grupos mostraram que o grupo I é igual ao II ($p= 0,9941$), o grupo III é igual ao V ($p=0,1295$), o grupo IV é igual ao V ($p=0,7503$). Nos demais tempos experimentais houve diferenças estatísticas significantes, uma vez que $p<0,05$ conforme mostra o gráfico de intervalo de confiança (Gráfico 2).

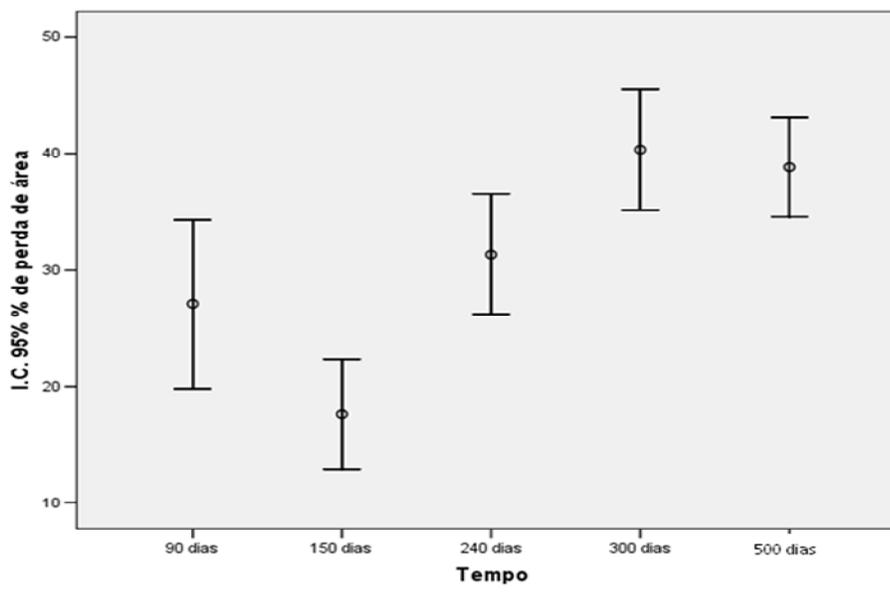
Gráfico 2 – Percentual de perda volumétrica em função do tempo



Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

B) Os dados referentes a porcentagem de perda de área superficial entre os grupos mostraram que o grupo I é igual ao grupo II ($p=0,0833$) e ao grupo III ($p=0,7652$). O grupo IV é igual ao grupo III ($p=0,1107$) e igual ao grupo V ($p=0,9940$). O grupo V é igual ao grupo III ($p=0,2544$). Nos demais tempos experimentais houve diferenças estatísticas significantes, uma vez que $p<0,05$ conforme mostra o gráfico de intervalo de confiança (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Percentual de perda de área superficial em função do tempo

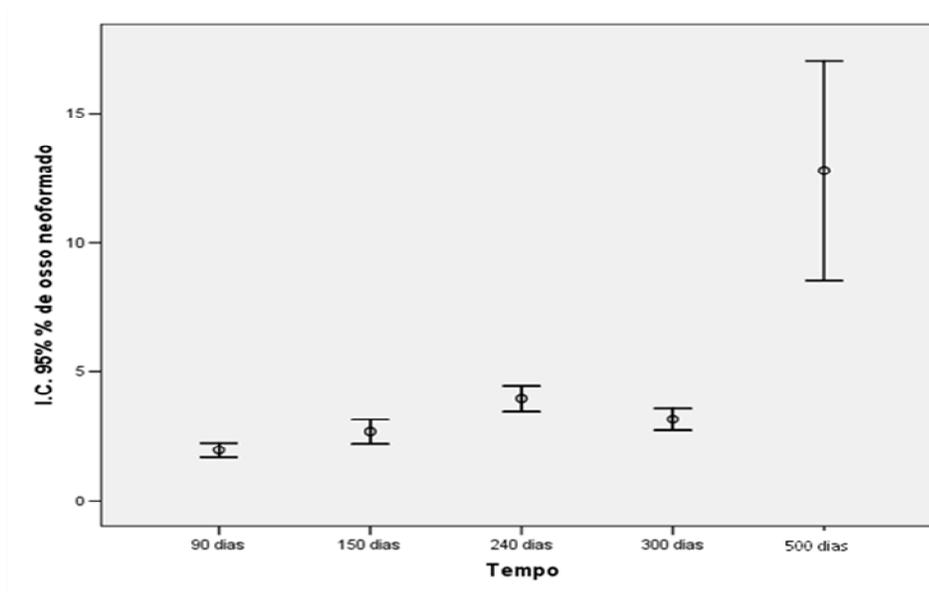


Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

Para a análise da área superficial de tecido ósseo neoformado, foi utilizado o teste de Games-Howell.

C) Os dados referentes a porcentagem de tecido ósseo neoformado mostraram que o grupo I é igual ao grupo II ($p=0,0692$). O grupo III é igual ao grupo IV ($p=0,1011$). O grupo IV é igual ao II ($p=0,5168$). Nos demais tempos experimentais houve diferenças estatísticas significantes, uma vez que $p<0,05$ conforme mostra o gráfico de intervalo de confiança (gráfico 4).

Gráfico 4 – Percentual de tecido ósseo Neoformado



Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

Estes resultados demonstraram que em relação à perda de área superficial e de volume, os grupos apresentaram similaridade de comportamento dentro dos tempos experimentais e que existe relação direta e progressiva das variáveis (área superficial e volume), quando avaliada a perda de volume e de área superficial. Dentro deste contexto o grupo IV (300 dias) foi o que apresentou a maior perda de volume (79,09%) e de área (40,33%) (Gráficos 2 e 3). Quanto à porcentagem de neoformação óssea, o grupo V (500 dias) foi o que apresentou a maior taxa de neoformação óssea (12,79%) quando comparado com os outros grupos experimentais (Gráfico 4), sendo este o único grupo que apresentou diferença estatisticamente significativa com todos os outros grupos por apresentar a maior taxa de tecido ósseo neoformado.

O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para medir o grau de associação entre as variáveis e demonstrou que a correlação entre a perda de volume e a perda de área superficial é positiva, estatisticamente significativa e forte (0,749177355); que a correlação entre área de tecido ósseo neoformado e perda de área superficial é positiva, estatisticamente significativa, porém fraca (0,308248727); que a correlação entre área de tecido ósseo neoformado e perda de volume é positiva, estatisticamente significativa e fraca (0,169675604).

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O cimento portland branco foi o material de escolha utilizado nesta pesquisa por ser similar ao MTA Branco e por ser o principal componente do MTA com 75% de seu conteúdo no ProRoot MTA[®] e 80% no MTA-Ângelus^{®9, 14}. O CP branco é composto de materiais ricos em carbonatos principalmente o carbonato de cálcio que é fundamental em sua constituição, pois suas partículas são menores proporcionando maior plasticidade ao cimento^{15, 17,51}. Partindo deste princípio, os corpos de prova para o experimento surgiram da necessidade da obtenção de um material que se moldasse facilmente e mantivesse sua forma quando inserido em contato com os fluídos tissulares dos animais experimentais. A forma de calota esférica do corpo de prova surgiu como molde similar aos enxertos de mento que são materiais utilizados em aumento de tecido ósseo para dar forma e volume em cirurgias estéticas e reparadoras da região do mento⁶⁰.

Quando avaliados macroscopicamente, os corpos de prova de CP apresentaram fixação, ausência de mobilidade, manutenção parcial de sua forma de calota esférica, que ao final de 500 dias apresentou formação de tecido ósseo em toda a extensão do corpo de prova de CP, sugerindo que os processos de osteoindução, osteocondução, osteointegração e osteotransdução se realizaram^{3,4,5}. Quando avaliados microscopicamente, observou-se que os corpos de prova de CP apresentaram características de neoformação óssea com substituição do CP por tecido ósseo lamelar neoformado^{4, 5}. Nos grupos experimentais de 90, 150, 240, 300 e 500 dias ocorreram perdas volumétricas e de área superficial demonstrando que os corpos de prova sofreram processos de dissolução *in vivo*, com biotransformação demonstrando que o CP apresenta biocompatibilidade e bioatividade^{7, 8, 9, 10, 23, 24, 35}. Embora ainda não se compreenda completamente o mecanismo de ação do CP e MTA *in vivo* e *in vitro*, Holland et al¹⁴ sugerem que este mecanismo de ação esteja vinculado ao processo de dissolução dos cimentos *in vivo* onde o óxido de cálcio do pó do CP e MTA, ao ser preparado com água é convertido em hidróxido de cálcio e quando entra em contato com os tecidos vivos dissocia-se em íons Ca^{++} e $(\text{OH})^-$. Estes íons reagem com o gás carbônico existente nos tecidos vivos e formam o carbonato de cálcio que é um dos principais componentes minerais do tecido ósseo.

No estudo da biodegradação dos cimentos de fosfato de cálcio, CP e MTA, Bozeman et al²⁴ e Lu et al²⁷ concluíram que ao reagir com componentes iônicos dos fluídos tissulares, os cimentos apresentam a formação de uma fase de fosfato de cálcio amorfo; concluíram ainda que o íon cálcio é liberado em maior quantidade, sendo que a hidroxiapatita é o principal cristal formado durante a liberação do íon cálcio na solução tamponada de fosfato bem como nos tecidos vivos. A atividade osteogênica do MTA é devida à liberação de íons cálcio em abundância, os quais interagem com os grupos fosfato da solução tampão para formar hidroxiapatita. Ao observarmos a diminuição do volume do corpo de prova de CP, bem como a diminuição da área superficial, compreendemos que a perda destas propriedades dimensionais é resultante do processo de dissolução dos componentes iônicos dos cimentos quando entram em contato com os tecidos vivos, visto que o declínio de liberação de íons cálcio é devido à reação de dissolução que ocorre no interior dos cimentos, sendo esta reação composta das fases de consumo de íons hidroxila e precipitação de fosfato de cálcio.

Estes achados mostram o grupo IV como sendo o que apresenta a maior perda volumétrica e de área, sendo que a quantidade de tecido ósseo neoformado não é diretamente proporcional à perda volumétrica e de área. O coeficiente da correlação de Pearson nos mostra que a relação entre área de tecido ósseo neoformado e perda de área e volume é positiva, estatisticamente significativa, porém fraca, pois a dissolução do corpo de prova acarreta a diminuição da liberação de íons cálcio e em consequência a neoformação óssea apresenta-se diminuída em relação aos outros grupos estudados. Em seu estudo Pan et al⁴⁴ declararam que o osso é formado pela mineralização de uma matriz orgânica (principalmente colágeno), por meio de nucleação e crescimento de um mineral muito semelhante à hidroxiapatita, regulada pelos osteoblastos responsáveis pela formação óssea e que são ativados em um ambiente alcalino, tendo a capacidade de proliferar para sintetizar a matriz orgânica medular e responder aos fatores de crescimento. Mesmo se uma camada de apatita é formada primeiramente sobre um implante, não quer dizer que a superfície será necessariamente colonizada pelos osteoblastos, ou, se for, que eles vão necessariamente formar osso. Em todo caso essa camada é suscetível de ser reabsorvida, mais cedo ou mais tarde, mesmo que seja propício para a célula o subsequente crescimento ósseo e, portanto, o sucesso do implante.

Na microscopia de luz dos espécimes estudados observamos o padrão de evolução histológico que se inicia com a formação de camadas distintas de fibrina e áreas granuladas, que são as responsáveis pela adesão e posterior diferenciação celular.

Observou-se a formação centrípeta de tecido ósseo neoformado, sendo que a substituição inicia-se da base do material em contato com a calvária do animal, para posteriormente processar a substituição na parte superior em direção ao centro do corpo de prova. Esses dados confirmam as observações de Yokoyama et al⁴² que observaram o fenômeno de produção de osso lamelar em implantes de fosfato de cálcio obedecendo a direção centrípeta.

No estudo atual observou-se que o tecido ósseo neoformado é do tipo lamelar compacto, com a presença de osteócitos nucleados aprisionados na matriz óssea mineralizada, com a formação de vasos, denotando a viabilidade e vitalidade óssea; as lamelas ósseas apresentam osteoblastos secretores de osteóide, que é fonte de comprovação do processo de neoformação óssea. Nos tempos experimentais, observou-se que a diminuição do volume do corpo de prova de CP não é diretamente proporcional a área de tecido ósseo neoformado, pois existe maior dissolução do corpo de prova e menor formação de tecido ósseo como demonstram os dados estatísticos, sendo que a maior taxa de perda de volume encontra-se no grupo IV (300 dias) (79,09%) e a maior taxa de neoformação óssea encontra-se no grupo V (500 dias) (12,79%).

A neoformação óssea está relacionada com a disponibilidade de íons cálcio presentes no interior do corpo de prova, pois estes íons estimulam a osteoindução e osteocondução que resultará em diferenciação celular e posteriormente produção de tecido ósseo neoformado. Na medida em que se processa a dissolução dos corpos de prova, a disponibilidade de íons cálcio diminui e posteriormente diminui a neoformação óssea. Estes resultados estão em acordo com Koh et al²⁸, Koh et al³⁰, Mitchell et al³¹ e Abdullah et al⁴¹.

Demonstrou-se que a média geral de perda de volume dos corpos de prova de CP foi 65,32% mostrando similaridade com os resultados de Lu et al²⁷, que estudando cimentos de fosfato de cálcio implantados em defeitos ósseos, observou que de 4 até 24 semanas, o tecido ósseo neoformado torna-se lamelar e está em contato direto com o cimento, associando tecido osteóide e numerosos osteoblastos, ocorrendo a biodegradação do cimento e paralelamente neoformação de tecido

ósseo até 24 semanas, sendo que 60% do cimento de fosfato de cálcio é reabsorvido.

No processo de biodegradação do CP e sua respectiva biocompatibilidade e bioatividade, os resultados suportam a tese de que o CP não causa apoptose e sim, promove proliferação celular como encontrado nos estudos de Moghaddame-Jafari et al ³⁷ que concluíram que o MTA induz proliferação celular e não induz apoptose. Além de não causar morte celular, o MTA aumenta a proliferação de células indiferenciadas levando a posterior diferenciação celular. Estes achados podem sugerir que o CP segue o mesmo processo de indução, pois o principal componente do MTA é o CP que foi objeto deste estudo em sua forma básica, sem a mistura de óxido de bismuto.

Observando os dados estatísticos, fica claro que a maior quantidade de osso neoformado está relacionada com o maior tempo de permanência do corpo de prova de CP em contato com a calvária do animal. Encontrou-se que a maior porcentagem de tecido ósseo neoformado está descrita no grupo V (500 dias), com a formação de 12,79% de tecido ósseo substituído pelo processo da osteotransdução; e que a menor taxa de neoformação óssea está no grupo I (90 dias) com 1,97% de neoformação óssea. Esses dados sugerem que a quantidade de tecido ósseo neoformado é insuficiente para o propósito de aumento ósseo, no caso de enxertos de cimento ou defeitos ósseos, onde é necessária a formação de grandes quantidades de tecido ósseo e a manutenção da forma do corpo de prova.

Embora o estudo tenha sido realizado com CP em fase sólida, encontrou-se similaridade com os estudos de Kuemmerle et al ⁴³ que realizaram estudo experimental para avaliar o cimento de fosfato de cálcio injetável como alternativa para cranioplastia. Foram criados defeitos ósseos em carneiros e posteriormente preenchidos com cimento de fosfato de cálcio injetável. Avaliaram os resultados histológicos após 2, 4 e 6 meses e observaram que a formação óssea era moderada e a reabsorção do cimento ocorria de forma centrípeta, concluindo que os cimentos não são adequados para cranioplastia experimental, como regeneradores em defeitos ósseos, pois não ocorre suficiente substituição óssea e, além disso, a substituição é lenta.

Um dado importante observado nas análises histológicas, por meio da coloração de Alizarina 4.2, foi a comprovação da formação da fase de fosfato de cálcio, no processo de osteotransdução do CP, que posteriormente formará tecido

ósseo lamelar. Esses dados são evidentes, pois o fosfato de cálcio cora-se em tom castanho-alaranjado e foram observados durante todos os períodos dos tempos experimentais, sendo que a matriz óssea em fase de mineralização apresenta fosfato de cálcio amorfo, que posteriormente irá se mineralizar formando a hidroxiapatita, principal componente mineral do tecido ósseo.

Esses dados estão em acordo com Sarkar et al¹⁵ e Pan et al⁴⁴ que mostraram a formação da fase de fosfato de cálcio na biotransformação dos cimentos de fosfato de cálcio, MTA e CP. Estes autores afirmaram que o processo de neoformação óssea é determinado pela vitalidade dos osteoblastos, cuja atividade é regulada por vários hormônios e fatores locais como o estrogênio, o hormônio da paratireóide e a proteína ossea morfogenética. A expressão destes fatores resulta na ocorrência de desmineralização e remineralização, um processo de equilíbrio dinâmico e que de forma clara e decisiva isso também deve depender da bioquímica das células, as quais são influenciadas pelos solutos que são liberados decorrentes da dissolução dos corpos de prova. É um sistema vivo e não química elementar. Apatita pode ser representado como $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$, onde X pode ser substituído por OH, F ou Cl. O principal e, portanto, o mais importante biomineral, é uma forma impura de hidroxiapatita com uma estrutura hexagonal, por vezes referido como apatita biológica. Em contraste com a hidroxiapatita estequiométrica sintética ela é descrita como uma apatita deficiente em cálcio com várias substituições aleatórias nos locais de rede, onde os íons comuns como F, Cl e CO_3 ocupam os lugares do íon hidroxila na formulação da apatita, formando desta maneira a fluoroapatita, cloroapatita e apatita carbonatada. Portanto a apatita é fundamentalmente fosfato de cálcio.

Desta maneira a formação do fosfato de cálcio presente neste estudo, reafirma o fato de que o CP pode ser utilizado como biomaterial, sendo necessários mais estudos *in vivo* para elucidação de processos bioquímicos e fisiológicos que ainda encontram-se obscuros em alguns pontos.

Em extensa revisão de literatura, Parirokh e Torabinejad²² abordaram alguns aspectos relativos à utilização do CP como material seguro para uso na clínica odontológica. Chegaram à conclusão que MTA e CP são materiais bioativos e que influenciam o meio ambiente em que estão envolvidos, apresentam condutividade para formação de tecidos duros, apresentam indução para formação de tecidos duros e apresentam biocompatibilidade. Nesta revisão, os autores destacam o CP

como um material barato e de similaridade química com o MTA e que está sendo largamente estudado como substituto para o MTA.

No estudo atual observamos que o CP não produziu áreas de necrose nos tecidos adjacentes, não apresentou transformações displásicas nas células como osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células pluripotentes e indiferenciadas.

Estatisticamente, os dados obtidos na variável de porcentagem de neoformação óssea, encontraram o grupo V (500 dias) como sendo o que apresenta diferença estatisticamente significativa com todos os outros grupos quando avaliada a neoformação óssea, isso reafirma a característica de biocompatibilidade e bioatividade do CP, pois este tempo de permanência do corpo de prova de CP em fase sólida e em contato com tecidos vivos foi até o momento o mais longo já estudado.

Foi observado nesta pesquisa que o cimento Portland foi capaz de estimular respostas específicas, bioquímicas e biofísicas, que resultaram na formação de tecido ósseo lamelar pelo processo de osteotransdução confirmando-se a capacidade osteoindutora e osteocondutora do cimento Portland, bem como sua bioatividade.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais do trabalho parece lícito concluir que:

1. O cimento Portland não é indicado para enxertos de aumento de volume ósseo, pois ocorrem perdas volumétricas, perdas de área superficial e a quantidade de tecido ósseo lamelar neoformado é insuficiente.
2. Houve formação óssea pelo processo de osteotransdução do implante em tecido ósseo, porém a quantidade de tecido ósseo lamelar neoformado foi menor que o volume depositado.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS¹⁶

1. Hernandez-Gil IFT, Garcia MAA, Pingarrón MC, Jerez LB. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología Del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006; 11: E47-51.
2. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and Medical significance of Calcium Phosphates. Angew.Chem Int Ed 2002; 41: 3130-46.
3. Heymann D, Passuti N. Bone substitutes: new concepts. Eur J Orthop Surg Traumatol 1999; 9: 179-
4. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J 2001; 10: S96-S101.
5. Driessens FCM, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. Proc Instn Mech Engrs 1998; 212: 427-435..
6. Schliephake H, Gruber R, Dard M, Wenz R, Scholz S. Repair of calvarial defects in rats by prefabricated hydroxyapatite cement implantes. J Biomed Mater Res 2004; 69A: 382-390
7. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. J Endod 1993; 19: 541-544.
8. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod 1995; 21: 349-353.
9. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hidroxide paste, sealapex and dycal. Braz Dent J 2000; 11: 3-6.
10. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral Trioxide Aggregate: A comprehensive literature review – Part II: Leakage and Biocompatibility investigations. JOE 2010; 36, 2: 190-202.
11. Zanferrari FL. Reações ósseas a implantes de cimento portland em fase sólida. Tese Mestrado http://www.biblioteca.pucpr.br/tede/tde_arquivos/4/TDE-2007-04-13T070344Z-553/Publico/FernandoOdonto1.pdf
12. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. JOE 1993; 19, 12: 591-95.
13. Holland et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hidroxide. Braz Dent J 2001; 12: 3-8.

¹⁶ As referências seguem as normas do ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) (Vancouver).

14. Holland R, Souza V, Mérida Delgado RJ, Murata SS. Agradado de trioxide mineral (MTA): composição, mecanismo de ação, comportamento biologic e emprego clinic. *Revista Ciências Odontológicas* 2002; 5: 7-21.
15. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; 31: 97-100.
16. Khlusov IA, Karlov AV, Sharkeev YP, Pichugin VF, Kolobov YP, Shashkina GA, Ivanov MB, Legostaeva EV, Sukhikh GT. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow in situ: role of physicochemical properties of artificial surfaces. *Cell technologies in biology and medicine* 2005; 3: 144-152.
17. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent* 2008; 11, 4:141-143.
18. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* 2008; 41: 408-417.
19. Camilleri J. Characterization and chemical activity of portland cement and two experimental cements with potential for use in dentistry. *International Endodontic Journal* 2008; 41:791-799.
20. Gandolfi MG et al. Environmental scanning electron microscopy connected with energy dispersive X-ray analysis and raman techniques to study proroot mineral trioxide aggregate and calcium silicate cements in wet conditions and in real time. *JOE* 2010; 36, 5: 851-857.
21. Namazikhah MS, Nekoofar MH, Sheykhrezae MS, Salariyeh S, Hayes SJ, Bryant ST, Mohammad MM, DummerPMH. The effect of pH on surface hardness and microstructure of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* 2008; 41: 108-116.
22. Parioikh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate. A comprehensive literature review –Part III: Clinical applications, drawbacks and Mechanism of action. *JOE* 2010; 36, 3:400-413.
23. Reyes-Carmona JF, Santos AS, Figueiredo CP, Baggio CH, Felipe MCS, Felipe WT, Cordeiro MM. Host-Mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. *JOE* 2010; 36, 8: 1347-1353.
24. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *JOE* 2006; 32, 5: 425-428.
25. Tay FR, Pashley DH, Rueggeberg FA, Loushine RJ, Weller RN. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *JOE* 2007; 33, 11: 1347-1351.

26. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *JOE* 2009; 35, 5: 731-736.
27. Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust JP. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res (appl Biomater)* 2002; 63: 408-412.
28. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomater Res* 1997; 37: 432-439.
29. Torabinejad M, Pitt Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam PS, Tang HM. Tissue reaction to implanted root-end-filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. *JOE* 1998; 24, 7: 468-471.
30. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *JOE* 1998; 24, 8: 543-547.
31. Mitchell PJC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999; 20: 167-173.
32. Holland R, Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with Mineral Trioxide Aggregate or Portland cement. *Braz Dent J* 2001; 12, 2: 109-113.
33. Saidon J, Jianing He, Qiang Zhu, Safavi K, Spangberg, Larz SW. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95, 4: 483-489.
34. Torreira MG, dos Santos AA, Rodriguez Cobos MA, Fuentes Boquete I, Crespo Abelleira A. The osteoinductive potential of MTA (Mineral trioxide aggregate): a histologic study in rabbits. *Eur J Anat* 2004; 8, 3: 101-105.
35. Pelliccioni et al. Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. *J Mat Sci: Mat in Med* 2004; 15: 167-173.
36. Ribeiro DA, Duarte MAH, Matsumoto MA, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *JOE* 2005; 31, 8: 605-607.
37. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, Macdonald NJ, Nor JE. Effect of Proroot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation *in vitro*. *JOE* 2005; 31, 5: 387-391.
38. Al-Rabeah E, Perinpanayagam H, MacFarland D. Human alveolar bone cells interact with Proroot and tooth-colored MTA. *JOE* 2006; 32, 9: 872-875.

39. Cintra LTA et al. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *JOE* 2006; 32, 6: 556-559.
40. Kuratate M, Yoshida K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of Nestin, Osteopontin and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *JOE* 2008; 34, 8: 970-974.
41. Abdullah D, Pitt Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials* 2002; 23: 4001-4010.
42. Yokoyama A, Yamamoto S, Kawasaki T, Kohgo T, Nakasu M. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials. *Biomaterials* 2002; 23: 1091-1101.
43. Kuemmerle JM, Oberle A, Oechslin C, Bohner M, Frei C, Boecken I, Rechenberg BV. Assessment of suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty – an experimental study in sheep. *Journal of cranio-maxillofacial surgery* 2005; 33: 37-44.
44. Pan H, Zhao X, Darvell BW, Lu WW. Apatite-formation ability – Predictor of bioactivity? *Acta biomaterialia* 2010, doi:10.1016/j.actbio.2010.05.013.
45. Goraieb K, Lopes AS, Sato CA, Segatelli MG, Pacheco e Silva V, Verzoto JC, Bueno MIMS. Characterization of portland cements by X-ray spectrometry allied to chemometrics. *Journal of Chemometrics* 2006; 20: 455-463.
46. Gobbo, LA. Os compostos do clínquer Portland: sua caracterização por difração de raios-X e quantificação por refinamento de Rietveld. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de Geociências 2003: 4-34.
47. Barbosa, AVH, Cazal C, Nascimento DCA, Valverde DFS, Valverde RS, Sobral APV. Propriedades do cimento portland e sua utilização na odontologia: Revisão de literatura. *Pesq Bras Odontoped clin integr* 2007; 7 1: 89-94.
48. Associação Brasileira de Cimento Portland. Guia básico de utilização do cimento Portland. Boletim técnico 106. 7 ed. São Paulo 2002: 1-27.
49. Funteas UR, Wallace JA, Fochtman FW. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Aust End Journal* 2003; 29: 43-44.
50. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pitt Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mat* 2005; 21: 297-303.
51. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *JOE* 2005; 31, 2: 101-103.

52. Islam I, Chng HK, Jin Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod* 2006; 32: 193-197.
53. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate. A comprehensive literature review –Part I: Chemical, physical and antibacterial properties. *JOE* 2010; 36, 1:16-27.
54. Tingey MC, Bush P, Levine MS. Analysis of mineral trioxide aggregate surface when set in the presence of fetal bovine serum. *JOE* 2008; 34, 1: 45-49.
55. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic portland cement-based (MTA-like) system. *JOE* 2007; 33, 3: 295-298.
56. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999; 25: 197-205.
57. Qin H, Cai J, Fang J, Xu H, Gong Y. Could MTA be a novel medicine on the recurrence therapy for GCTB? *Medical Hypotheses* 2010; 74: 368-369.
58. Fagundes mDJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta cirurgica brasileira* 2004; 19, 1: 59-65.
59. Moe et al. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002; 61: 638-647.
60. Pitanguy I, Martello L, Caldeira AML, Alexandrino A. Augmentation Mentoplasty: A critical analysis. *Aesth Plast Surg* 1986; 10: 161-169.

9. ANEXOS

9. ANEXOS

ANEXO A



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa
Núcleo de Bioética

Curitiba, 04 de Abril de 2007.

PARECER N. 35.07/CEUA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética No Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em reunião realizada no dia 2 de abril do corrente ano avaliou o pedido de emenda ao Projeto Intitulado "Implantes de cimento de fosfato de cálcio", sob o registro no CEUA /PUCPR nº 107.

Foi autorizado a prorrogação do prazo da pesquisa, bem como a aprovação de 150 animais experimentais (ratos wistar)

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

APROVADO

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

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mário Antonio Sanches", is written over the typed name.

Prof. Dr. Mário Antonio Sanches
Coordenador do Núcleo de Bioética

ANEXO B

DOCUMENTO REFERENTE À MANUTENÇÃO / ACLIMATAÇÃO DE ANIMAIS EM LABORATÓRIO

Os textos referentes à ética e bem-estar animal apontam para a necessidade da conscientização crescente quanto às nossas responsabilidades na manutenção de animais de experimentação. Assim, alguns trechos citados abaixo reforçam tal necessidade.

I) RESPONSABILIDADE E ÉTICA:

1) “Tendo o homem sido dotado com as faculdades da razão e da reflexão, ele é responsável por suas ações e é dever do mesmo respeitar, preservar e cuidar de tudo o que a natureza oferece. O princípio ético de reverência pela vida exige que o homem proteja seus amigos animais. Nós, humanos, temos responsabilidade moral para com os animais, do mesmo modo que para com as crianças ou pessoas que não sejam capazes de valer-se por si mesmas. Nossa cultura considera que temos o direito de utilizar animais para experimentação, porém temos que saber que não podemos abusar desse direito”. (Manual 1 - pág. 11)

2) “Nossa obrigação é, pois, a de criar os animais de experimentação em um ambiente de bem-estar para que possam atingir a plenitude de suas funções fisiológicas e psicológicas, evitando que passem por estresse desnecessariamente. O bem-estar dos animais de laboratório é essencial tanto para o bem-estar dos mesmos quanto para a validade das pesquisas, já que animais cujos estados fisiológicos e psicológicos são desconhecidos, ou submetidos ao estresse, tornam os resultados das pesquisas não confiáveis e as aplicações médicas deficientes....” (Manual 1 - pág. 13)

3) “O animal de laboratório deve ser visto como um reagente biológico. Tudo que o circunda, de uma ou de outra forma, pode exercer influências nas características deste reagente. Esta interferência reflete-se principalmente na resposta do animal a determinados experimentos. A manutenção de condições ambientais estáveis, portanto, irá assegurar a reprodução dos resultados experimentais, uma vez que resultados diferentes poderão ser obtidos para idênticos parâmetros experimentais com animais em diferentes condições ambientais...”

Dessa forma vários documentos e leis reiteram a importância do cuidado e bem-estar na manutenção e experimentação animal, conforme citado a seguir:

II) LEGISLAÇÃO

1) “No Brasil, em 1934, surgiu o Decreto Federal nº 24.645 que assegurava proteção a todos os animais, sem exceção. Esse decreto somente em 1979 passou à forma da lei 6.638 (Diário Oficial da União – 8/5/79), estabelecendo normas para práticas didático-científicas da vivisseção de animais, regulamentando o registro dos Biotérios e Centros de Experimentação, e estabelecendo penalidades para os infratores...” (Manual 1 - pág. 13)

2) “Animais precisam ser tratados com alimentação e espaço apropriados e atenção veterinária, em construções limpas e adequadamente ventiladas e com temperatura

controlada.” (encarte sobre animais em pesquisa da “The American Physiological Society”)

3) Princípios éticos na experimentação animal: – “Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência” (COBEA).

4) LEI 6.638 (8/5/1979):

* Capítulo I – Art. 3º

“VIII – Centro de criação: locais aonde são mantidos os reprodutores das diversas espécies animais, dentro de padrões genéticos e sanitários preestabelecidos para utilização em atividades de ensino e pesquisa”.

IX – Biotério: local dotado de características próprias onde são criados OU MANTIDOS animais de qualquer espécie, destinados ao campo da ciência e tecnologia voltado à saúde humana.

“X – Laboratório de experimentação animal: local provido de condições ambientais adequadas, bem como de equipamentos e materiais indispensáveis à realização de experimentos em animais, QUE NÃO PODEM SER DESLOCADOS PARA UM BIOTÉRIO”.

* Capítulo III – Art. 14º - Parágrafo 10 – “Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, eram consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pela Organização Mundial de Saúde ou pela Organização Pan-Americana de Saúde.”

* Capítulo VI – Art. 22º - “Qualquer pessoa que, por ação ou omissão, interferir nos centros de criação, biotérios e laboratórios de experimentação animal, de forma a colocar em risco a saúde pública e o meio ambiente, estará sujeita às correspondentes responsabilidades civil e penal”.

Art. 23º - II – “Compatibilizar suas instalações físicas no prazo máximo de cinco anos, a partir da entrada em vigor das normas estabelecidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), com base no art. 52 V desta lei”.

Tendo em vista que é de cunho ético e legal a adequada manutenção dos animais de experimentação, além dos aspectos legais já citados, diversos documentos demonstram que os biotérios são os locais apropriados para a criação e manutenção desses animais e que nestes locais são inúmeros os cuidados e condições necessários para que o bem-estar e a saúde dos animais sejam efetivamente mantidos. Do que está descrito abaixo percebe-se o quanto instalações provisórias para manutenção dos animais experimentais são impróprias e precárias, podendo levar ao risco da saúde animal e humana, além de trazer mascaramentos nos resultados experimentais.

III) MANUTENÇÃO ADEQUADA DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

1) Quanto a barreiras e ventilação: “Caso o biotério de criação esteja localizado próximo a centros de pesquisa, especial atenção deve ser dispensada às barreiras sanitárias. Iniciemos pela definição, de acordo com o ILAR (1976): “Barreira sanitária é um sistema que combina aspectos construtivos, equipamentos e métodos operacionais que buscam estabilizar as condições ambientais das áreas restritas, minimizando a probabilidade de patógenos ou outros organismos indesejáveis contatarem a população animal de áreas limpas””.

“A própria distribuição do ar no biotério pode funcionar como barreira sanitária. Quando devidamente instalados e em condições de operação, os filtros de

ar irão reter os contaminantes, além do que podemos estabelecer gradientes de pressão nas salas, pela modificação na relação das vazões de insuflação ou exaustão...”

“Como a ventilação ou climatização de biotérios deve ser efetuada com 100% de tomada de ar externo, equipamentos de condicionamento de ar de pequeno porte, tipo residencial (de parede ou janela), tendem a ser obsoletos quanto ao controle de poluentes, embora possam resfriar ou aquecer o ambiente. Este fato ocorre porque estes equipamentos renovam apenas uma pequena quantidade de ar, o que leva ao acúmulo de amônia.” No máximo, “o suprimento de ar não pode exceder a 50% de ar reciclado, ou seja, com pelo menos 50% de ar totalmente fresco”.

Animais devem ocupar apenas 50% da área total de biotérios ou dos locais aonde sejam mantidos!

2) Quanto à influência de ruídos: “O camundongo CBA capta sons de baixa intensidade, da ordem de 10dB... O ouvido humano não é um bom indicador para as condições de ruído que poderiam prejudicar os animais no interior do biotério, pois o homem pode, simplesmente, não estar ouvindo um determinado som... A influência do som nos animais de laboratório pode ser dividida em dois grandes grupos: 1) efeitos auditivos, relacionados a lesões experimentais provocadas por ruídos de intensidade e frequência variadas e 2) efeitos não auditivos, associados ao estresse. Neste último encontram-se os principais efeitos para animais no biotério.”

3) Quanto a alojamento, higiene e limpeza:

“Todo o estágio de limpeza em um biotério como troca de gaiolas, limpeza de estantes, etc., geram aerossóis de alta quantidade de bactérias, portanto, a limpeza do material deve ser em áreas separadas das salas de criação.”

“O microambiente do animal é de extrema importância, pois os animais confinados em gaiolas ou jaulas estão certamente em um ambiente diferente de seu *habitat* natural. Deve-se, portanto, promover a maior limpeza e higiene possível para que o animal fique confortável e não venha a desenvolver doenças e contusões. A degradação dos excretos por bactérias no interior das caixas gera a produção de amônia que provoca alterações inflamatórias no epitélio traqueal.”

“No sistema convencional de alojamento dos animais, lembramos que o intervalo entre trocas de cama deve ser compatível com o número de animais alojados. Elevações extremas ao nível de amônia estão relacionadas ao aumento exagerado da umidade, como p.ex., vazamento de bebedouros”

“Como coelhos e alguns roedores, por exemplo, cobaias e hamsters, produzem urina com altas concentrações de proteínas e minerais, estes minerais e os compostos orgânicos na urina muitas vezes aderem às superfícies das gaiolas, o que exige tratamento com soluções ácidas antes da lavagem”

“A intensidade dos odores animais, principalmente de amônia não deve ser a única forma de avaliar a eficiência do programa de higienização. Para alteração da frequência de trocas das camas ou de lavagens das gaiolas deve-se basear em fatores como a concentração de amônia, a aparência da gaiola, a condição da cama e o número e o tamanho dos animais alojados na gaiola”. Além disso, “índices de desempenho animal como saúde, reprodução, crescimento, comportamento, atividade e uso de espaço podem ser usados para avaliar a adequação do alojamento”

“As trocas frequentes de cama e a lavagem das gaiolas, juntamente com as práticas de manejo, como baixa densidade de animais dentro da sala e temperatura ambiental e umidade mais baixa, também podem reduzir a concentração de gases tóxicos ou causadores de odor no ar da sala de animais”

“O material descartado deve ter um destino adequado, ficar em locais livres de tráfego de pessoas e carrinhos e assegurar um tempo mínimo do descarte ao destino final. Este material atrairá moscas e outros insetos devendo a área ao redor ser regularmente lavada e desinfetada.”

“Antes da introdução de animais ou após o término dos testes, em biotérios de experimentação as salas devem sofrer uma descontaminação. Esse processo deve ser iniciado por uma limpeza geral, incluindo o teto, parede e piso, seguido do uso de um desinfetante na forma de aerossol. Pode ser usado o formaldeído ou ácido peracético ou qualquer desinfetante disponível, permitindo-se o contato por pelo menos 24 horas. Após a aplicação, a porta da sala deve ser vedada, com fitas adesivas, afixando-se um cartaz na mesma com a data da descontaminação e o dia em que a sala será liberada para uso.”

4) Níveis de amônia e sua relação com a ventilação:

Em biotérios ou salas de manutenção de animais, um contaminante de ar em ambiente de alta densidade populacional é a amônia, resultante da decomposição de excrementos. Rigorosa atenção à higiene e prevenção de superlotação, em número de gaiolas por sala e animais por gaiola, é extremamente importante na redução dos níveis de amônia que predispõem as infecções respiratórias. A troca de Mara valha nas caixas minimiza este problema, embora a troca excessiva seja um fator estressante, o que acaba aumentando a produção de feromônio e amônia. Por outro lado, a falta de troca faz com que haja um aumento da concentração de amônia e outros odores acima dos níveis toleráveis na sala, prejudicando tanto os animais como os técnicos. Assim, cada local/biotério deve definir qual é a melhor rotina de limpeza de suas salas.

Um estudo realizado em ratos para avaliar os efeitos da exposição ambiental de amônia concluiu que baixas concentrações de amônia (menos de 100 ppm) produziram pouquíssimas alterações na concentração de amônia sanguínea. No entanto, exposição a concentrações maiores (até 1157 ppm) provocou aumento linear e significativo na concentração sanguínea de amônia. Estes achados sugerem que a concentração ambiental de amônia encontrada em salas com animais pode causar mínimos efeitos em ratos saudáveis.

A ventilação deve prover suprimento de oxigênio necessário para remover os odores desagradáveis, principalmente a amônia produzida pela atividade de bactérias urease-positiva nas fezes e urina, o poluente desprendido de equipamentos e da forração de gaiolas, bem como diluir contaminantes gasosos e ainda ajustar a temperatura e umidade do ar. Recomendam-se 15 a 20 trocas de ar fresco (renovação de 100% de ar) por hora na sala dos animais. Ventilação deficiente favorece enfermidades respiratórias e contaminação por odores de animais de espécies diferentes.

Fatores ambientais que afetam os animais incluem alimentação, água, luz e qualidade interna do ar (IAQ). Sistemas de ventilação e de calor podem otimizar a IAQ, sendo que três controladores são usados para padronizar o IAQ nas salas: sistema de exaustão local (LED), ventilação e sistema de limpeza. Há dois tipos de ventilação: fluxo recirculante e fluxo simples. O tipo de ventilação e os fatores de mistura do ar definem a taxa de ventilação. A ventilação requerida é expressa em

ACH (troca de ar por hora), e pode ser calculada exatamente por um engenheiro mecânico, seguindo as seguintes fórmulas:

$$\text{ACH recomendada} = \frac{Q \text{ [exhaust airflow, ft}^3\text{/min.]} \times 60}{V[\text{volume, ft}^3]}$$

$$\text{ACH requerida} = \text{ACH recomendada} \times \text{Fator de mistura}$$

OBS: Fator de mistura varia de 1 (1 para perfeita mistura) a 10 (pobre mistura).

O Prof. Dr. José Bernardino Merussi (Presidente da Comissão de edificação em Biotérios – COBEA) em e-mail ao CEEA – UFPR, citou que: “O acúmulo de amônia no ambiente (ACA) é inversamente proporcional à taxa de renovação de ar/hora (TRA/H) até o número de 20, de acordo com BESCH. Dessa forma, para uma situação imaginária de TRA/H = 0, a ACA tende ao infinito; para uma TRA/H = 20 o acúmulo de vapores de amônia se estabiliza num nível que vai depender da taxa de geração de amônia. Para TRA/H > 20, os níveis de vapor de amônia diminuem muito pouco, o que caracteriza curvas assintóticas, de geração/equilíbrio quando analisadas num gráfico cartesiano (x = TRA/H; y = níveis NH₃). Além disso, na TRA/H = 20, temos uma expressão da relação custo/benefício, pois como a queda dos níveis é praticamente desprezível, em TRA/H > 20, não compensa aumentar TRA/H.”

Ainda citado pelo Prof. Merussi, tem-se, quanto aos valores de amônia aceitáveis para os animais e técnicos – “... não existem níveis seguros para o contato com amônia. Via de regra: pouca amônia, poucas lesões pulmonares, muita amônia, muitas lesões pulmonares. A relação é direta. Isso é válido para os animais. Para os técnicos, a situação é mais ou menos a mesma. Só que devemos analisar outros aspectos. 1. O técnico não fica 24 horas/dia na sala de animais. A legislação trabalhista prevê que trabalho em local com vapores de amônia é permitido nas seguintes condições: 8 horas/dia; 5 dias/semana e, níveis de amônia não superiores a 20 ppm. Fora destas condições, o técnico tem direito trabalhista de se recusar a trabalhar. O que prejudica a saúde dos técnicos não é a amônia. Eles (assim como nós) estamos respirando coisas muito piores que a amônia, principalmente se vivermos em grandes centros urbanos. O que realmente prejudica os técnicos são os materiais alergênicos gerados pelos animais”.

Há alguns sistemas especiais para o controle atmosférico de biotérios, como o **BSC** (Biosafety Cabinets), **ATS** (Animal Transfer Station) e **CEU** (Capture Exhaust Units), sendo o último o mais eficiente. As diferenças operacionais do BSC e ATS são, numericamente, 99.9%/99% de redução pessoal e 99.8%/98% de redução ambiental de contaminantes, respectivamente. Exemplificando, uma sala com 15 ACH, ventilação simples e com fator de mistura de 2, equipada com sistema de recirculação ATS e outros equipamentos, vai requerer 36 minutos para a exaustão. A mesma sala equipada com sistema de ventilação de passagem simples, com BSC e outros LED que provocam exaustão, vão requerer 2 minutos. Por outro lado, uma

sala com 15 ACH, com ventilação de recirculação, com um fator de mistura de 8 e equipada com sistema ATS vai requerer 144 minutos para exaustão. A mesma sala equipada com EVC e sistema BSC, mais LED, vai requerer 7 minutos. Assim, o sistema de exaustão e ventilação são fatores determinantes da qualidade do ar nas salas de manutenção de animais.

Segundo o Prof. Merussi acima citado: “atualmente, existem dois métodos de ventilação de salas de animais”. O método tradicional, denominado de ventilação geral diluidora (VGD), veio de método empregado para conforto humano e consiste na ventilação da sala, com insuflação de ar pelo forro e exaustão por dutos instalados nas laterais verticais (paredes) da sala. O volume de ar depende do cálculo da carga térmica da sala e a verificação do fator TRA/H. O método mais moderno, o de ventilação microambiental (VMA), renova o ar apenas do interior das caixas de animais, com inúmeras vantagens. Isso depende do projeto com o qual você queira trabalhar.

Em vista do acima exposto, a sugestão seria: “Tendo em vista o alto custo da construção convencional de biotérios, sua edificação próxima ao laboratório permite que se utilize a área de biotério em sistema de rodízio, ou seja, um determinado trabalho experimental deve ser agendado...” (Manual 1 - pág. 15).

No entanto, caso não seja possível a utilização do Biotério como área de experimentação em todos os protocolos experimentais com animais a serem desenvolvidos pelo Setor de Ciências Biológicas, as seguintes recomendações feitas pela Organização Mundial de Saúde devem ser observadas, sendo o procedimento correto segundo a Lei 6.638 (8/5/1979), já citada neste documento.

Segundo a **Organização Mundial de Saúde**, os laboratórios de trabalho em áreas de saúde podem ser divididos em grupos de risco, sendo que a construção, projeção e design das salas podem mudar conforme o Grupo de Biossegurança 1, 2, 3 ou 4. Salas de manutenção e biotérios podem ser enquadrados como Níveis 1 ou 2, segundo a presença de microrganismos contaminantes:

Grupo de risco 1 (nenhum ou baixíssimo risco individual e para a comunidade)

Microrganismos que podem causar esporadicamente doenças em animais ou humanos.

Grupo de risco 2 (moderado risco individual e baixo risco para a comunidade)

Patógenos que podem causar doenças humanas ou animais, mas o perigo para laboratoristas ou comunidade é improvável.

Salas para Animais – Risco de Biossegurança Níveis 1 e 2

As seguintes precauções devem ser tomadas:

1. Sinais e/ou tabelas de biorriscos devem ser identificados e colocados nas portas e devem-se identificar os agentes infecciosos em uso;
2. As salas devem ser projetadas de modo a facilitar a limpeza e manutenção;
3. Portas devem abrir para dentro e terem sistema de auto-fechamento;
4. Aquecimento, ventilação e temperatura devem ser adequados;
5. Se ventilação mecânica é provida, o fluxo de ar deve ser voltado para dentro, o sistema de exaustão deve descartar o ar para fora, e não deve recircular para nenhuma parte do edifício;
6. Acesso restrito a pessoas autorizadas;
7. Nenhum animal que não os de experimentação poderão ser admitidos;
8. Deverá haver programa de controle de artrópodes e roedores;

9. Janelas se presentes, devem ser seguras, resistentes e, se hábeis para serem abertas deverão ter tela à prova de artrópodes;
10. Depois do uso, superfícies deverão ser descontaminadas com desinfetantes efetivos;
11. Cabines de segurança biológicas (Classes I ou II) e gaiolas de isolamento com suporte de ar deverão filtrar ar, que deverá ser provido para trabalho que envolve a geração de aerossóis;
12. Uma autoclave deverá estar próxima;
13. Material das camas dos animais deverá ser removido de maneira a minimizar a geração de aerossóis e poeira;
14. Todo material de lixo e cama deverá ser descontaminado antes do descarte;
15. Uso de material perfurante deve ser restrito ao máximo, e deve ser colocado em contêineres especiais e tratado como material infectante;
16. Material para autoclave ou incineração deverá ser transportado seguramente em containers fechados;
17. Gaiolas de animais deverão ser descontaminadas após o uso;
18. Carcaças animais deverão ser incineradas;
19. Roupas de proteção e equipamentos deverão ser vestidos na sala, e removidos à deixa-la. Luvas deverão estar disponíveis para uso corriqueiro;
20. Pias para higienização das mãos deverão estar disponíveis, e os manipuladores devem lavar as mãos antes de trabalhar com os animais;
21. Todas as lesões, mesmo pequenas, deverão ser reportadas e anotadas;
22. Comida, bebida e cosméticos devem ser proibidos em salas de animais;
23. Todas as pessoas devem ser apropriadamente treinadas;
24. Menores de 16 anos não devem ser autorizados a entrar ou trabalhar nas áreas de laboratórios nestes níveis de risco.

ANEXO C

Quadro 1 - Valores referentes ao Grupo I – 90 dias.

Diâmetro	Altura	Volume (mm ³)	Área (mm ²)	Perda Vol. (mm ³)	% Perda Vol.	Perda ÁR. (mm ²)	% Perda ÁR.	Á ON µ ² *	Á ON mm ²	% ON	Animal
6,06	1,1	16.56036637	22.25504236								
4,841	0,413	3.837729419	8.355756813	12.72263695	76.82581814	13.89928555	62.45454545	507523,723	0,507523723	2,280488686	r3
5,845	1,032	14.42098896	20.8792761	2.139377411	12.91865991	1.375766255	6.181818182	715258,462	0,715258462	3,213916426	r4
3,898	0,465	2.827220294	9.40781336	13.73314607	82.92779138	12.847229	57.72727273	419938,111	0,419938111	1,886934674	r5
5,245	0,962	10.85878943	19.46304613	5.701576937	34.42905072	2.791996223	12.54545455	663772,755	0,663772755	2,982572418	r6
4,758	0,863	8.00872926	17.46009232	8.551637106	51.63917825	4.794950035	21.54545455	570440,608	0,570440608	2,563197134	r7
5,008	0,868	8.891279868	17.56125161	7.669086499	46.30988427	4.693790752	21.09090909	578262,955	0,578262955	2,598345785	r8
4,922	0,857	8.482686729	17.33870118	8.077679637	48.77717955	4.916341175	22.09090909	534617,284	0,534617284	2,40222991	r10
4,791	1,007	9.611658175	20.37347969	6.948708192	41.95986956	1.881562672	8.454545455	307166,755	0,307166755	1,380211954	r11
5,101	0,734	7.707147549	14.85018281	8.953218818	53.46028356	7.404859548	33.27272727	409938,134	0,409938134	1,84200114	r12
5,193	0,879	9.664225096	17.78380203	6.896141271	41.64244388	4.471240328	20.09090909	434595,827	0,434595827	1,952797123	r13
4,893	0,908	8.928793827	18.37052587	7.63157254	46.08335571	3.884516484	17.45454545	455779,371	0,455779371	2,047982492	r14
4,509	0,655	5.376655141	13.25186613	11.18371123	67.532994	9.003176227	40.45454545	254391,881	0,254391881	1,14307525	r15
4,024	0,744	4.94658853	15.05250138	11.61377784	70.12995715	7.202540981	32.36363636	355018,222	0,355018222	1,595226	r16
5,125	0,793	8.440494848	16.04386235	8.119871519	49.03195581	6.211180004	27.90909091	378929,333	0,378929333	1,702667319	r17
4,789	0,982	9.340081086	19.86768327	7.220285281	43.59979194	2.387359089	10.72727273	254852,904	0,254852904	1,145146794	r18
4,511	1,006	8.572107832	20.35324783	7.988258534	48.23720899	1.901794529	8.545454545	323088,111	0,323088111	1,451752398	r19
4,836	0,767	7.280394667	15.51783408	9.27997117	56.0372867	6.737208277	30.27272727	432221,444	0,432221444	1,942102529	r20
5,137	0,752	8.015524802	15.21435623	8.544841565	51.59814328	7.040686128	31.63636364	463509,557	0,463509557	2,082717029	r21
5,091	0,645	6.705365387	13.04954756	9.85500098	59.50958992	9.205494794	41.36363636	224617,663	0,224617663	1,009288859	r22
4,816	0,714	6.693846043	14.44554568	9.866520324	59.57911863	7.809496682	35.09090909	504300,842	0,504300842	2,266007109	r23

Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

Quadro 2 - Valores referentes ao Grupo II – 150 dias.

Diâmetro	Altura	Volume (mm ³)	Área (mm ²)	Perda Vol. (mm ³)	% Perda Vol.	Perda ÁR. (mm ²)	% Perda ÁR.	Á ON µ ² *	Á ON mm ²	% ON	Animal
6,06	1,1	16.56036637	22.25504236								
4,635	0,932	8.286647975	18.85609043	8.273718391	49.96096227	3.398951924	15.27272727	369075,033	0,369075033	1,65839	r1
5,272	0,857	9.683438902	17.33870118	6.876927464	41.52642105	4.916341175	22.09090909	699694,124	0,699694124	3,14398	r2
5,077	0,745	7.757531574	15.07273323	8.802834793	53.15603393	7.182309125	32.27272727	657742,182	0,657742182	2,9547	r6
4,687	0,9	8.145824635	18.20867102	8.414541731	50.81325994	4.046371338	18.18181818	576576,835	0,576576835	2,59077	r7
4,528	0,991	8.48855009	20.04976998	8.071816276	48.74177357	2.205272379	9.909090909	359798,044	0,359798044	1,6167	r8
4,245	0,798	5.913081897	16.14502164	10.64728447	64.29377366	6.11002072	27.45454545	613692,666	0,613692666	2,75754	r9
4,538	0,965	8.274503299	19.5237417	8.285863068	50.03429806	2.731300653	12.27272727	527662,066	0,527662066	2,37098	r10
4,306	0,83	7.005703844	16.79244105	9.554662522	57.6096101	5.462601306	24.54545455	600640,965	0,600640965	2,6989	r11
4,721	0,899	8.248853385	18.18843916	8.311512981	50.18918542	4.066603195	18.27272727	743561,511	0,743561511	3,34109	r12
4,092	0,837	5.810749216	16.93406405	10.74961715	64.91171097	5.320978309	23.90909091	335713,732	0,335713732	1,50848	r14
4,561	1,025	8.937298282	20.73765311	7.623068085	46.03200144	1.517389252	6.818181818	1062585,67	1,06258567	4,77458	r15
3,587	0,882	4.815728718	17.8444976	11.74463765	70.92015592	4.410544758	19.81818182	446289,144	0,446289144	2,00534	r16
4,301	1,065	8.369049506	21.54692737	8.191316861	49.46337949	0.708114984	3.181818182	789934,488	0,789934488	3,54946	r17
3,599	0,887	4.877173352	17.94565688	11.68319301	70.54912165	4.309385475	19.36363636	415520,746	0,415520746	1,86709	r18
4,222	1,042	7.886353408	21.08159467	8.674012959	52.37814651	1.173447688	5.272727273	386015,971	0,386015971	1,73451	r20
4,843	1,076	10.56290824	21.7694778	5.997458126	36.21573336	0.485564561	2.181818182	417538,237	0,417538237	1,87615	r21
4,678	0,718	6.364086589	14.5264731	10.19627978	61.57037563	7.728569255	34.72727273	454100,475	0,454100475	2,04044	r22
4,977	1,037	10.54993144	20.98043539	6.010434928	36.29409395	1.274606971	5.727272727	1100058,274	1,100058274	4,94296	r23
4,567	0,897	7.72497213	18.14797545	8.835394236	53.35264958	4.107066908	18.45454545	777960,668	0,777960668	3,49566	r24
4,603	0,735	6.323363573	14.87041467	10.23700279	61.81628212	7.384627692	33.18181818	604206,099	0,604206099	2,71492	r25

Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

Quadro 3 - Valores referentes ao Grupo III – 240 dias.

Diâmetro	Altura	Volume (mm ³)	Área (mm ²)	Perda Vol. (mm ³)	% Perda Vol.	Perda ÁR. (mm ²)	% Perda ÁR.	Á ON µ ² *	Á ON mm ²	% ON	Animal
6,06	1,1	16.56036637	22.25504236								
3,296	1,055	5.115600635	21.34460881	11.44476573	69.10937523	0.910433551	4.090909091	817946,131	0,817946131	3,675329	r1
4,642	0,799	7.028171947	16.16525349	9.532194419	57.56028706	6.089788863	27.36363636	876161,712	0,876161712	3,936913	r3
3,546	0,687	3.562071777	13.89928555	12.99829459	78.4903806	8.355756813	37.54545455	854786,565	0,854786565	3,840867	r4
4,876	1,005	9.914743256	20.33301597	6.64562311	40.12968652	1.922026385	8.636363636	906245,485	0,906245485	4,072091	r6
4,929	0,766	7.543464601	15.49760222	9.016901766	54.44868529	6.757440134	30.36363636	1591922,911	1,591922911	7,153089	r7
4,677	0,828	7.409771879	16.75197734	9.150594488	55.25599063	5.503065019	24.72727273	767621,954	0,767621954	3,449205	r8
4,889	0,765	7.415024589	15.47737037	9.145341777	55.22427206	6.777671991	30.45454545	1173102,756	1,173102756	5,271177	r9
3,678	0,714	3.983575679	14.44554568	12.57679069	75.94512349	7.809496682	35.09090909	480619,119	0,480619119	2,159597	r11
4,556	0,776	6.570086925	15.69992079	9.990279442	60.32643977	6.555121567	29.45454545	898448,663	0,898448663	4.037057	r12
3,648	0,525	2.819417261	10.62172476	13.74094911	82.9749101	11.6333176	52.27272727	731551,322	0,731551322	3.281276	r13
3,485	0,672	3.363942983	13.5958077	13.19642338	79.68678405	8.659234665	38.90909091	788339,385	0,788339385	3.542296	r14
4,261	0,769	5.720996985	15.55829779	10.83936938	65.45368104	6.696744564	30.09090909	850531,611	0,850531611	3.821748	r16
4,468	0,687	5.555482922	13.89928555	11.00488344	66.45313999	8.355756813	37.54545455	684377,175	0,684377175	3.075156	r17
3,886	0,758	4.723089108	15.33574737	11.83727726	71.47956148	6.919294988	31.09090909	965654,154	0,965654154	4.339035	r19
3,954	0,776	5.008926051	15.69992079	11.55144032	69.75353117	6.555121567	29.45454545	725979,615	0,725979615	3.26209	r20
3,597	0,606	3.195550506	12.26050515	13.36481586	80.70362433	9.994537204	44.90909091	107442,853	1,07442853	4.827863	r21
3,657	0,733	4.055794218	14.82995095	12.50457215	75.50903085	7.425091405	33.36363636	798465,523	0,798465523	3.587796	r22
4,212	0,815	5.961431448	16.4888632	10.59893492	64.00181423	5.766079156	25.90909091	1222002,942	1,222002942	5.490904	r23
4,541	0,765	6.429171373	15.47737037	10.13119499	61.17736029	6.777671991	30.45454545	766584,235	0,766584235	3.444542	r24
4,162	0,599	4.187187949	12.11888216	12.37317842	74.715608	10.1361602	45.54545455	663743,726			

Quadro 4 - Valores referentes ao Grupo IV – 300 dias.

Diâmetro	Altura	Volume (mm ³)	Área (mm ²)	Perda Vol. (mm ³)	% Perda Vol.	Perda Á. (mm ²)	% Perda Á.	Á ON µ ² *	Á ON mm ²	% ON	Animal
6,06	1,1	16.56036637	22.25504236								
3,105	0,729	2,962862687	14,74902353	13,59750368	82,10871293	7,506018832	33,72727273	1135914,136	1,135914136	5,104075	r1
3,486	0,747	3,783053792	15,11319695	12,77731257	77,15597766	7,141845411	32,09090909	665007,329	0,665007329	2,98812	r2
3,443	0,708	3,481670651	14,32415454	13,07869572	78,97588391	7,930887822	35,63636364	526649,692	0,526649692	2,366429	r3
2,275	0,501	1,084107387	10,1361602	15,47625898	93,45360263	12,11888216	54,45454545	803772,756	0,803772756	3,611643	r4
4,195	0,798	5,780838125	16,14502164	10,77952824	65,0923295	6,11002072	27,45454545	757509,112	0,757509112	3,403764	r5
3,052	0,512	1,9431086	10,35871062	14,61725777	88,266512	11,89633173	53,45454545	334522,977	0,334522977	1,503133	r7
4,079	0,756	5,165806599	15,29528366	11,39455977	68,8020583	6,959758701	31,27272727	654589,335	0,654589335	2,941308	r8
3,202	0,535	2,23423157	10,82404333	14,3261348	86,50856195	11,43099903	51,36363636	546551,862	0,546551862	2,455856	r9
3,886	0,575	3,509375712	11,6333176	13,05099066	78,80858651	10,62172476	47,72727273	687724,289	0,687724289	3,090195	r10
4,363	0,703	5,437069652	14,22299525	11,12329671	67,16818015	8,032047106	36,09090909	502585,611	0,502585611	2,2583	r11
2,406	0,842	2,226654908	17,03522333	14,33371146	86,55431372	5,219819026	23,45454545	516744,376	0,516744376	2,32192	r12
3,563	0,534	2,741881741	10,80381147	13,81848463	83,44310941	11,45123089	51,45454545	552170,403	0,552170403	2,481102	r14
3,807	0,711	4,234840958	14,38485011	12,32552541	74,42785465	7,870192252	35,36363636	570823,072	0,570823072	2,564916	r17
3,517	0,684	3,490026046	13,83858998	13,07034032	78,92542974	8,416452383	37,81818182	656329,243	0,656329243	2,949126	r18
3,849	0,761	4,65807019	15,39644294	11,90229618	71,87217911	6,858599418	30,81818182	785146,238	0,785146238	3,527948	r20
3,715	0,791	4,546141344	16,00339864	12,01422502	72,54806299	6,251643717	28,09090909	759198,873	0,759198873	3,411357	r21
2,554	0,73	2,073615305	14,76925538	14,48675106	87,47844547	7,487844527	33,63636364	777421,695	0,777421695	3,493238	r22
3,911	0,45	2,750725297	9,10433551	13,80964107	83,38970747	13,15070685	59,09090909	854406,383	0,854406383	3,839159	r23
4,088	0,574	3,866004658	11,61308574	12,69436171	76,65507772	10,64195662	47,81818182	1177713,075	1,177713075	5,291893	r24
4,114	0,486	3,290269729	9,832682351	13,27009664	80,131661	12,42236001	55,81818182	788562,226	0,788562226	3,543297	r25

Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

Quadro 5 - Valores referentes ao Grupo V – 500 dias.

Diâmetro	Altura	Volume (mm ³)	Área (mm ²)	Perda Vol. (mm ³)	% Perda Vol.	Perda Á. (mm ²)	% Perda Á.	Á ON µ ² *	Á ON mm ²	% ON	Animal
6,06	1,1	16.56036637	22.25504236								
2,478	0,783	2,139449686	15,84154379	14,42091668	87,08090366	6,41349857	28,81818182	699614,023	0,699614023	3,14362	r1
3,011	0,699	2,667445705	14,14206783	13,89292066	83,89259243	8,112974532	36,45454545	569661,363	0,569661363	2,559696	r2
4,264	0,756	5,6240283	15,29528366	10,93633807	66,03922778	6,959758701	31,27272727	1068572,502	1,068572502	4,801485	r3
3,117	0,639	2,574619517	12,92815642	13,98574685	84,45312465	9,326885934	41,90909091	1652039,374	1,652039374	7,423214	r4
4,279	0,674	5,006550254	13,63627141	11,55381611	69,76787745	8,61877095	38,72727273	1708237,401	1,708237401	7,675732	r5
3,998	0,844	5,612500366	17,07568705	10,947866	66,10883937	5,179355312	23,27272727	1313488,696	1,313488696	5,901982	r6
3,207	0,695	2,982774629	14,0611404	13,57759174	81,98847439	8,193901959	36,81818182	1407512,851	1,407512851	6,324467	r7
3,515	0,687	3,503018429	13,89928555	13,05734794	78,84697505	8,355756813	37,54545455	1858968,235	1,858968235	8,35302	r8
4,079	0,622	4,190037037	12,58421486	12,37032933	74,69840374	9,670827497	43,45454545	6885819,671	6,885819671	30,94049	r9
3,556	0,764	4,027315836	15,45713851	12,53305053	75,68099795	6,797903848	30,54545455	3464879,325	3,464879325	15,56896	r10
4,065	0,793	5,406921852	16,04386235	11,15344451	67,35022806	6,211180004	27,90909091	1551879,155	1,551879155	6,973157	r11
3,651	0,713	3,922057564	14,42531382	12,6383088	76,31660147	7,829728539	35,18181818	2120568,131	2,120568131	9,528484	r12
3,861	0,512	3,067570967	10,35871062	13,4927954	81,47643054	11,89633173	53,45454545	4146373,111	4,146373111	18,63116	r13
4,624	0,614	5,276618598	12,42236001	11,28374777	68,13706605	9,832682351	44,18181818	5336526,332	5,336526332	23,97895	r14
3,795	0,658	3,870593809	13,3125617	12,68977256	76,62736606	8,942480657	40,18181818	4485623,776	4,485623776	20,15554	r15
4,954	0,646	6,367087476	13,06977942	10,19327889	61,55225474	9,185262937	41,27272727	6831645,658	6,831645658	30,69707	r16
5,895	0,455	6,258567607	9,205494794	10,30179876	62,20755345	13,04954756	58,63636364	5834641,689	5,834641689	26,21717	r17
3,973	0,712	4,602427695	14,40508196	11,95793867	72,20817709	7,849960395	35,27272727	1679546,659	1,679546659	7,546814	r18
3,135	0,697	2,867391039	14,10160411	13,69297533	82,68521979	8,153438246	36,63636364	2667456,673	2,667456673	11,98585	r19
3,765	0,494	2,813021147	9,994537204	13,74734522	83,01353313	12,26050515	55,09090909	1643145,636	1,643145636	7,383251	r20

Fonte: dados da pesquisa comportamento de implantes de cimento portland em fase sólida: análise dimensional e histomorfométrica – PUCPR 2011.

*Á ON – área de tecido ósseo neoformado