

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**LETICIA KIRST POST**

**ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO DE DIFERENTES SUPERFÍCIES SOBRE A RESPOSTA TECIDUAL  
PERIMPLANTAR EM REGIÕES COM BAIXA DENSIDADE ÓSSEA: MODELO ANIMAL COELHO**

**Porto Alegre  
2009**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

LETICIA KIRST POST

ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO DE DIFERENTES SUPERFÍCIES SOBRE A  
RESPOSTA TECIDUAL PERIMPLANTAR EM REGIÕES COM BAIXA DENSIDADE  
ÓSSEA: MODELO ANIMAL COELHO

Porto Alegre  
2009

LETICIA KIRST POST

ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO DE DIFERENTES SUPERFÍCIES SOBRE A  
RESPOSTA TECIDUAL PERIMPLANTAR EM REGIÕES COM BAIXA DENSIDADE  
ÓSSEA: MODELO ANIMAL COELHO

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira

Co-orientadores: Profa. Dra. Cristina Braga Xavier

Prof. Dr. Roberto Hübler

Porto Alegre  
2009

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P857a Post, Leticia Kirst

Análise comparativa do efeito de diferentes superfícies sobre a resposta tecidual perimplantar em regiões com baixa densidade óssea: modelo animal coelho / Leticia Kirst Post. – Porto Alegre, 2009.

66 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, PUCRS.

Orientador: Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira.

1. Implantodontia. 2. Osseointegração (Odontologia). 3. Tíbias de Coelhos.

4. Coelhos - Experiências. 5. Animais - Experiências. 6. Implantes Dentários

Osseointegrados. I. Oliveira, Marília Gehardt de. II. Título.

CDD 617.69

**Bibliotecário Responsável**  
Ginamara Lima Jacques Pinto  
CRB 10/1204

*DEDICATÓRIA*

*A Deus, que concedeu-me uma maravilhosa família e permitiu-me viver,  
experimentar, crescer, enfim chegar até aqui.*

*Aos meus pais, Darci e Marisa, pelos ensinamentos de vida, pelo exemplo e  
pela dedicação irrestrita, e ao meu irmão Alex pela amizade e companheirismo.*

*AGRADECIMENTOS*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

*À Profª. Drª. Marília Gerhardt de Oliveira, orientadora desta pesquisa, um agradecimento muito especial por sua dedicação e envolvimento em todas as etapas deste trabalho. Seu dinamismo científico é um exemplo e um incentivo para os que têm o privilégio de contigo trabalhar.*

*À Profª. Drª. Cristina Braga Xavier, co-orientadora desta pesquisa, minha gratidão, pelo carinho, incentivo e paciência me ajudando incondicionalmente nesta pesquisa. Tua determinação, sinceridade e profissionalismo são características marcantes e singulares.*

*Ao Prof. Dr Roberto Hübler, co-orientador e idealizador desta pesquisa, pelo incentivo e, sobretudo, pela confiança depositada em mim.*

*A Prof. Drª. Adriana Etges pelo carinho, empenho e disposição em todos os momentos em que busquei sua ajuda. Muito obrigada pelos valiosos ensinamentos.*

*Ao Fábio, uma pessoa especial, que me fez acreditar que sonhos podem se tornar realidades.*

*Aos colegas Carla, Danilo, Renato e Graziela pela amizade e convívio, momentos que deixam saudades.*

*Às minhas amigas que se encontram distantes, Cristina e Fernanda, que sempre me ajudam a superar os momentos difíceis e que, assim como eu, acreditam que a distância não separa amizades especiais.*

## AGRADECIMENTOS

---

*Ao CNPQ, pelos recursos financeiros.*

*À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Ministério da Educação, pela oportunidade de crescimento profissional, através dos cursos de Mestrado e Doutorado.*

*Aos professores do mestrado e do doutorado pelo conhecimento transmitido e amizade.*

*Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da FO/PUCRS Ana, Marcos e Davenir, sempre prestativos e eficientes.*

*À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade da docência e por permitir realizar grande parte do experimento em seus departamentos.*

*Aos médicos veterinários, Isabel Cristina Pereira e Milton Oliveira Amado, e aos funcionários do Biotério da UFPel pela amizade, atenção e apoio oferecidos.*

*Aos acadêmicos de odontologia da FO/UFPel, Ana, Rita, Caco e Rafael, pela amizade e disposição incansável durante a fase experimental desta pesquisa.*

*A todos aqueles que direta, ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.*

*Feliz daquele que consegue aprender a causa  
das coisas.  
(Virgílio)*

*RESUMO*

## RESUMO

---

As possibilidades de modificação das propriedades de superfície dos implantes são muito grandes, tanto com relação aos aspectos químico e biológico quanto aos morfológico e topográfico. Pesquisas recentes têm-se dedicado a buscar uma superfície que otimize o processo de osseointegração em regiões com baixa densidade óssea. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes superfícies implantares sobre a resposta tecidual em regiões com baixa densidade óssea. Foram utilizados para este estudo 8 coelhos machos da raça Nova Zelândia. Em cada animal foram inseridos, cirurgicamente, 4 implantes cilíndricos, sendo na tibia direita as amostras dos grupos G1 (superfície usinada) e G2 (tratamento com ataque ácido de rotina) e na tibia esquerda as amostras dos grupos G3 (superfície com camada porosa de titânio) e G4 (superfície com camada porosa de titânio mais tratamento com ataque ácido inovador) O experimento foi repetido, de forma idêntica, em todos os animais. Durante todo o período de observação (30 dias), os animais permaneceram saudáveis, com cicatrização normal na região operada, sem evidência de infecção ou deiscência de sutura. Todos os implantes obtiveram estabilidade ao tecido perimplantar, mesmo após o processo de descalcificação óssea. Em alguns grupos da amostra a neoformação óssea cobriu a porção coronal não submersa dos implantes. Os resultados da análise histológica evidenciaram que a interface óssea com os implantes dos grupos G1 e G2 foi caracteristicamente linear e regular e com G3 e G4 mais irregular. De modo geral, os implantes do grupo G3 melhor contribuíram para a dinâmica do reparo ósseo.

**Descritores:** implantes dentários, osseointegração, pesquisa, tibia, efetividade de tratamento<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> DeCS/MeSH - Descritores em Ciências da Saúde/ medical Subject Headings, disponível em <http://www.decs.bvs.br>, acessado em 15 de agosto de 2009.

*ABSTRACT*

## ABSTRACT

---

The possibilities of changing implant surface properties are numerous, both in terms of chemical and biological aspects and also of surface morphology and topography. Recent studies have focused on establishing an implant surface with characteristics that optimize osseointegration in sites with low bone density. The aim of the present study was to carry out clinical and histological assessments of the influence of different implant surfaces on the response of peri-implant tissues with low bone density. Eight male New Zealand rabbits were used in the study. The following implant surfaces were assessed: cast titanium (G1), acid-etched titanium (G2), titanium coated with titanium plasma spray (G3), and titanium coated with new acid-etched porous titanium coating (G4). Animals were sacrificed 30 days after surgery. Following clinical assessment of implant stability in the alveolar bone, tibia bone fragments containing the implants were prepared and submitted to histological analysis. Clinical assessment results showed that all implants achieved stability in peri-implant tissues. In some specimens, new bone formation was observed, as well as tissue migration to the coronal, non-submerged area of the implant. Our findings suggest that the implant surface G3 was the one that most contributed to bone regeneration, with minimum foreign body reaction observed in peri-implant tissues.

**Descriptors:** dental implants, osseointegration, research, tibia, Efetividade de tratamento<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> DeCS/MeSH – Descritores em Ciências da Saúde/ Medical Subject Headings, disponível em <http://www.decs.bvs.br> > Acesso em: 15 de agosto de 2009.

*LISTAS DE FIGURAS*

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Alojamento dos coelhos.....	36
Figura 2 - Esquema do guia cirúrgico.....	37
Figura 3 - Infiltração local .....	38
Figura 4 - Adaptação do guia cirúrgico ao do tecido ósseo .....	38
Figura 5 - Esquema da primeira perfuração óssea.....	39
Figura 6 - Esquema -Limite da perfuração óssea .....	40
Figura 7 - Esquema - Chave manual inserindo implante na loja óssea .....	40
Figura 8 - Sutura contínua.....	41
Figura 9 - Esquema - 1º teste clínico de estabilidade do implante .....	42
Figura 10 - Esquema -Processo de individualização dos espécimes .....	42
Figura 11 - Esquema - 2º teste clínico de estabilidade do implante.....	43
Figura 12 - Espécime seccionado e removido o implante .....	44
Figura 13 - Esquema - Corte no sentido longitudinal do espécime.....	44
Figura 14 - A - Grupo G1 - Região cervical - Osso trabecular neoformado.....	50
Figura 14 - B - Grupo G1 - Região medial - Presença de tecido conjuntivo denso.....	50
Figura 14 - C - Grupo G1 - Região apical - Presença de Barreira óssea .....	50
Figura 14 - D - Grupo G2 - Região cervical.....	50
Figura 14 - E - Grupo G2 - Região medial.....	50
Figura 14 - F - Grupo G2 - Região apical.....	50
Figura 14 - G - Grupo G3 - Região cervical.....	50
Figura 14 - H - Grupo G3 - Região medial - Interfase óssea irregular.....	50
Figura 14 - I - Grupo G3 - Região apical - Osso trabecular neoformado.....	50
Figura 14 - J - Grupo 4 - Região cervical - Interface osso trabecular neoformado	50
Figura 14 - L - Grupo 4 - Região medial - Interface osso trabecular/osso compacto.....	50
Figura 14 - M - Grupo 4 - Região apical - Interface óssea irregular e presença material enegrecido.....	50

*LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

UFPel - Universidade Federal de Pelotas

CEUA - Comitê de Ética em estudos em animais

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Anima

FO - Faculdade de Odontologia

Kg - quilograma

g - grama

mg - miligrama

ml - mililitro

m - metro

cm - centímetro

mm - milímetro

nm - nanômetro

h - hora.

H.E. - Hematoxilina e Eosina

n° – número

pH – potencial Hidrogeniônico

UFPel – Universidade Federal de Pelotas

® – marca registrada

x – vezes

% – por cento

°C – graus Celsius

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

HNO<sub>3</sub> - Ácido Nítrico

HF- Ácido Fluorídrico

TiO<sub>2</sub> - Oxido de Titânio

Ti cp Titânio comercialmente puro

Fig. - Figura

SLA Jato de areia com granulação grande + ácido (HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

TPS Plasma spray de titânio

SL jato de areia com granulação grande

*SUMÁRIO*

## SUMÁRIO

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2</b>	<b>REVISTA DE LITERATURA</b> .....	23
2.1	REPARO ÓSSEO.....	23
2.2	OSSEOINTEGRAÇÃO.....	25
2.3	SUPERFÍCIE IMPLANTAR.....	27
<b>2.3.1</b>	<b>Técnica de Spray de Plasma de Titânio</b> .....	30
<b>2.3.2</b>	<b>Texturização por Tratamento Ácido</b> .....	31
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	34
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	34
3.2	PARADIGMA E MODELO DE PESQUISA.....	34
3.3	PROBLEMA.....	34
3.4	HIPÓTESES.....	35
3.5	CONFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS IMPLANTES SEGUNDO AS NORMAS TÉCNICAS.....	35
3.6	MODELO ANIMAL.....	36
3.7	CONFECÇÃO DO GUIA CIRÚRGICO.....	36
3.8	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	37
3.9	ANÁLISE CLÍNICA E HISTOLÓGICA.....	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	47
4.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS.....	47
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
	<b>ANEXO A</b> - Aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA - PUCRS.....	63
	<b>ANEXO B</b> - Normas para a Prática Didático-científica da Vivisseccção em Animais	64
	<b>ANEXO C</b> - Técnica Histoquímica de Coloração HE.....	65

## *INTRODUÇÃO*

## 1 INTRODUÇÃO

O método de reabilitação dentária com implantes osseointegrados tornou-se consagrado, previsível e confiável a partir de conceitos fundamentais definidos por Branemark et al. (1969) e Schroeder et al. (1976).

Atualmente, o maior desafio da implantodontia é aprimorar o processo de osseointegração, proporcionando ao implante dentário ancoragem precoce e duradoura estabilidade em função mastigatória, favorecendo, também, sua aplicação em osso regenerado ou de densidade inferior.

Com a criação de filetes de rosca e entalhes na superfície dos implantes foi possível acelerar o micromecanismo de ligação química osso-implante. Conseqüentemente, diversas técnicas de texturização foram testadas, com diferentes parâmetros e protocolos, visando desenvolver superfícies implantares capazes de otimizar o processo de osteogênese de contato. Pode-se citar como exemplos de tratamento de superfície: jateamento de partículas, imersão em ácidos, tratamento eletroquímico, bem como a associação das técnicas supracitadas.

Estudos avaliando a importância da topografia da superfície implantar no comportamento celular mostraram que o osso deposita-se indistintamente em superfícies porosas ou lisas, seja em implantes de cerâmica, titânio ou em ampla variedade de outras superfícies. Dessa forma, a porosidade não é condição necessária para que ocorra aposição óssea, mas desempenha um papel preponderante no percentual de aposição óssea sobre a superfície do implante e na velocidade com que tal deposição ocorre (BRUNETTE et al, 1988).

Com base nestes conceitos, a presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar, comparativamente, o efeito de diferentes superfícies sobre o reparo tecidual perimplantar em regiões com baixa densidade óssea.

## 2 REVISTA DE LITERATURA

### 2.1 REPARO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido de suporte e sustentação com propriedades mecânicas e biológicas singulares (SCHENK; BUSER, 2000). Apresenta um excelente comportamento mecânico e exibe um grande potencial para regeneração, sendo capaz de reparar fraturas ou defeitos com uma organização estrutural altamente semelhante, e, muitas vezes, sem deixar cicatriz. Porém, para que este processo ocorra, é necessário manter o suprimento vascular e a estabilidade mecânica.

Roberts e Garetto (2000) descrevem microscopicamente a composição do tecido ósseo como trançado, lamelar, fibroso e composto.

O osso trançado é um tecido altamente celular formado rapidamente (entre 30 a 50  $\mu\text{m}$  por dia) em resposta ao crescimento ou a uma lesão. Comparado com o osso maduro, ele tem conteúdo mineral relativamente baixo, orientação mais aleatória das fibras e força mínima, desempenhando um papel importante de estabilização no início da cicatrização dos implantes endósseos. Já que o osso trançado é mais maleável que o lamelar maduro, tolera melhor o micromovimento relativo associado à cicatrização da interface. Apesar de ser capaz de estabilizar o implante sem carga, o osso trançado não tem resistência para resistir às cargas funcionais.

O osso lamelar é o principal tecido de suporte de carga do esqueleto humano adulto, pois é o componente principal do osso cortical e trabecular maduro.

Nos adultos, as lamelas são formadas em um ritmo relativamente lento (1,0  $\mu\text{m}$  por dia), possuem uma matriz altamente organizada e são densamente mineralizadas.

O osso fibroso é característico das inserções de ligamentos e tendões ao longo das estruturas formadoras de osso. É composto por fibras colágenas e é formado de maneira adjacente ao ligamento periodontal.

O osso composto é um osso lamelar depositado em uma matriz trançada e, durante a cicatrização óssea o retículo trançado altamente poroso captura vasos

sanguíneos ao longo da superfície endóssea ou periosteal. Em seguida, lamelas de alta qualidade preenchem o espaço paravascular do retículo trançado, resultando em um osso composto, com forças para suportar cargas. A compactação lamelar do osso composto é um passo importante na aquisição da estabilização de um implante, durante o processo de osseointegração.

Quando há necessidade de regeneração óssea, as células progenitoras ósseas (células osteogênicas), que se originam a partir das células mesenquimatosas indiferenciadas, diferenciam-se em osteoblastos que finalmente produzem o “osso”. Os osteoblastos emitem prolongamentos citoplasmáticos que entram em contato entre si, porém, entre os osteoblastos e seus prolongamentos, há amplos espaços denominados “espaço intercelular”. Os osteoblastos produzem e secretam compostos orgânicos para o espaço intercelular. As secreções orgânicas dos osteoblastos são classificadas em componente fibroso (colágeno tipo 1) e componente amorfo (constituído de proteoglicanas, proteínas não-colagênicas e glicoproteínas). Uma vez formada a matriz osteóide, inicia-se um processo de mineralização ou calcificação por intermédio de deposição, principalmente de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita.

Para Puelo e Nanci (1999) os osteoblastos que ficam aprisionados na matriz mineralizada são chamados de osteócitos, enquanto os que migram para a superfície do osso, quando formam a matriz orgânica, tornam-se componentes celulares das membranas que recobrem a superfície de todos os ossos. Contudo, o processo de remodelamento ósseo é dinâmico e permanente.

O osso compacto é submetido a trocas constantes, e sua perda pode se dar na superfície óssea ou na intimidade do tecido ósseo como consequência da atividade osteoclástica. Os osteoclastos são originados das células do sistema monocítico-fagocitário, que derivam dos monócitos que migram para os espaços extravasculares a partir do sangue circulante. Quando o osso entra em fadiga ou está necrótico, os osteoclastos agrupam-se em um arranjo chamado de “cunha de corte” e entram em atividade até que todo o tecido necrosado tenha sido removido ou delimitado. À medida que os osteoclastos aprofundam-se no interior do tecido ósseo vão produzindo túneis de erosão (reabsorção), que são invadidos por capilares sanguíneos acompanhados por células progenitoras ósseas. As células progenitoras que se localizam ao redor da periferia de um capilar, seja no interior de um túnel de erosão seja na medula óssea ou no perióstio, denominam-se células

perivasculares. Após penetrarem no túnel de erosão, as células perivasculares separam-se dos capilares e aderem às paredes do túnel, diferenciando-se em osteoblastos e iniciando, de imediato, a deposição de matriz osteóide. Por sua vez, a matriz osteóide se mineraliza, aparecendo osso novo e ordenado em uma porção do túnel. Mas, conforme o osso é depositado, alguns osteoblastos ficam presos no interior da matriz mineralizada e transformam-se em osteócitos. Nessa situação, o vaso sanguíneo que penetrou originalmente no túnel de erosão fica rodeado por tecido ósseo, formando, assim, um novo canal haversiano. Este novo canal está revestido por osteoblastos e/ou células progenitoras ósseas que continuam o revestimento endotelial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1982; ROBERTS et al., 1987).

## 2.2 OSSEOINTEGRAÇÃO

A osseointegração caracteriza-se por uma conexão direta, estrutural e funcional entre osso ordenado e vital com a superfície do implante (em âmbito de microscopia óptica), estável e capaz de suportar as forças mastigatórias (BRANEMARK et al., 1977).

Lausmaa (1996) publicou um artigo sobre biomateriais e superfície dos implantes, mais especificamente a respeito dos aspectos microscópicos e dos fenômenos que ocorrem na interface do tecido hospedeiro com o implante. Foi relatado pelo autor que as respostas biológicas que ocorrem em níveis celulares e macroscópicos são consequência das interações moleculares e que os métodos de preparação poderiam, por sua vez, ser avaliados em combinação com técnicas analíticas, para mostrar em detalhes as superfícies dos implantes com diferentes aplicações. Em relação à textura de superfície, afirmou que anatomicamente uma superfície lisa e outra rugosa provocam diferentes áreas de contato com biomoléculas, células, o que produz diferentes perturbações e tipos de uniões das unidades biológicas que podem influenciar na sua conformação e função. O pesquisador salientou que o processo de osseointegração se distingue em três fases. A primeira fase compreende a migração de células osteogênicas diferenciadas para a superfície do implante. A segunda consiste na formação de osso por meio da mineralização da matriz interfacial e, a terceira é o remodelamento

ósseo ao redor do implante. Já Davies (1998) em seus estudos relata que os resultados do tratamento na implantodontia dentária são criticamente dependentes do desenho da superfície do implante, o qual otimiza a resposta biológica durante cada um dos três mecanismos distintos de integração.

Cunha et al. (2006) realizaram um estudo implantando parafusos odontológicos de titânio em seis tíbias de coelhos, cada uma com um parafuso. Após 60 dias as amostras (tíbia - parafuso) foram removidas cirurgicamente para a realização dos testes de torção e tração. Os testes de torção e tração foram aplicados na direção de inclusão dos parafusos, baseados nas imagens radiográficas das tíbias. Os resultados obtidos mostraram que os testes instrumentados de tração apresentam vantagens significativas em relação aos testes de torção, exibindo o mesmo resultado qualitativo, mas com um erro de medida muito menor, que provavelmente está associado à reprodutibilidade do ensaio padronizado. Além disso, relatam que todo material implantável deveria apresentar uma adequada osseointegração para que sua fixação seja satisfatória e possibilite o desenvolvimento adequado da função do implante.

Gil et al. (2006) caracterizam bem o processo de osseointegração dos implantes, relacionando-o ao processo de reparo ósseo. Relata ainda que qualquer tipo de trauma (fratura, osteotomia, inserção de implantes) inicia um processo de reparo ósseo pré-programado, fazendo com que o osso retorne à sua forma original. Os eventos de reparo assemelham-se aos de formação óssea. A inserção cirúrgica dos implantes resulta em um grau de contato osso-implante. A área de interface consiste em osso, tecido medular e hematoma junto a fragmentos ósseos do processo de fresagem. Em um processo de reparo de um defeito ou de uma fratura óssea, células inflamatórias e mesenquimais migram dos vasos adjacentes e da medula para a área de interface. O hematoma é substituído por vasos em proliferação e tecido não-mineralizado. Este clássico sinal de reação de corpo estranho poderia indicar uma encapsulação óssea do implante. Entretanto, a quantidade dessas células diminui com o tempo e passa a haver um aumento na superfície de contato osso-implante. Os pesquisadores acrescentam que, na fase inicial do reparo, o osso imaturo é formado por osteoblastos na junção da superfície óssea trabecular e endostal do osso cortical circundando o implante. Próximo ao implante, a reabsorção seguida de neoformação cortical resulta em um aumento do número de células ósseas secundárias e formação óssea medular, no espaço entre

o implante e a superfície cortada do osso. O novo osso formado na superfície do implante leva a uma condensação óssea tanto nas espiras quanto na superfície implantar; conseqüentemente, a quantidade de osso formado e o grau de contato osso-implante aumentam com o tempo. Em uma fase mais tardia do reparo, o osso lamelar substitui o primário.

A manifestação clínica da osseointegração dos implantes é a ausência de mobilidade, assim, atingir e manter tal estabilidade são pré-requisitos para o sucesso em longo prazo (VASCONCELOS, 2002). Os autores relatam, ainda, que, após a cicatrização inicial, a estabilidade secundária é determinada pela resposta biológica ao trauma cirúrgico, pelas condições de cicatrização e pelo material que constitui o implante. A formação óssea e o remodelamento na superfície perimplantar conduzem a um aumento do grau de contato osso-implante. Por outro lado, após uma cirurgia traumática ou aplicação de carga antes do tempo, após infecção ou uso de um material não-biocompatível, a resposta do tecido pode ser uma reabsorção óssea. A diminuição da estabilidade do implante, em alguns casos, pode levar ao encapsulamento fibroso e à total perda de estabilidade, com perda do implante.

### 2.3 SUPERFÍCIE IMPLANTAR

Os efeitos da topografia da superfície dos implantes sobre o comportamento celular foram estudados (DAVIES, 2003). Nesse trabalho especificamente, o autor procurou entender e explicar os mecanismos pelos quais a topografia das superfícies dos implantes pode influenciar as células. Afirmou que a topografia das superfícies que estão em contato com as células varia notavelmente nos implantes dentais, existindo princípios de comportamento celular. Esses princípios foram observados pela primeira vez em culturas celulares e explicaram, até certo ponto, as interações das células com os implantes. São eles: guia de contato (que alinha as células e as fibras colágenas com as ranhuras ou sulcos finos, como os que são produzidos na superfície dos implantes lisos); rugofilia (que descreve a tendência dos macrófagos em preferir superfícies rugosas); efeito da teoria dos centros (que pode explicar a orientação das células do tecido conjuntivo e as fibras aderidas às superfícies porosas) e haptotáxis (fenômeno definido pelo autor como sendo o

comportamento celular que ocorre quando se confrontam as células com materiais que diferem em suas propriedades adesivas e que pode estar relacionado com a formação de cápsulas ao redor dos implantes com baixa de superfície). Para o especialista, o comportamento das células em contato com os implantes é modificado pela superfície topográfica.

Cunha et al. (2007) realizaram um estudo com o objetivo de estimar a osseointegração de filmes porosos de titânio em contato com a cortical óssea de ovinos e analisar o comportamento do processo de osseocondução desses filmes, como também, avaliar a adesão destes filmes porosos de titânio depositados sobre superfícies modificadas de discos de titânio. Dessa forma, as técnicas de fluorescência de raios X e espectroscopia por energia dispersiva de raios X foram aplicadas para verificar a composição química dos implantes, filme de titânio e implantes osseointegrados. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi usada para caracterizar a morfologia dos discos de Ti, filme de titânio e a interface tecido ósseo/filme de titânio/metal-base. Testes de tração foram aplicados para avaliar a osseointegração dos filmes de titânio e a adesão destes aos discos. Os filmes de titânio atacados com ácido fluorídrico apresentaram os maiores valores de tensão de ruptura da interface osso-filme quando comparados aos filmes somente depositados, indicando aumento da osseointegração. Os valores de adesão dos filmes de titânio para as superfícies modificadas foram maiores que os valores de adesão na superfície somente usinada.

Buser et al. (1991) realizaram um estudo avaliativo da osseointegração de implantes inseridos em tíbias e fêmures de cobaias. Para tanto, utilizaram implantes cilíndricos ocos com seis diferentes tipos de superfície visando avaliar a influência de tais características na osseointegração. Os resultados alcançados demonstraram uma correlação positiva entre o percentual de contato ósseo medular ao implante e a crescente rugosidade obtida pelos diferentes tratamentos das diferentes superfícies testadas. Histologicamente, evidenciaram que as três superfícies que mais rapidamente receberam aposição de células ósseas nos períodos avaliados (três e seis semanas) foram, respectivamente, a superfície de hidroxiapatita e uma superfície alternativa jateada com areia e atacada com ácido, seguidas pela já consagrada superfície com plasma de titânio.

O crescimento ósseo ao redor da superfície do implante ocorre por meio de um processo gradual de mineralização direcionado ao implante, não tendo o início

em sua superfície. Com base nisto, a superfície usinada do titânio pode ser considerada como uma superfície permissiva para a mineralização gradual do osso, mas não como uma superfície osseointegradora. Para que a osseointegração ocorra de maneira mais acelerada, os implantes devem induzir respostas positivas das células ao redor do implante e dos tecidos, assim como assegurar a adesão celular (LARSSON et al, 1996).

Inúmeros autores têm discutido a dimensão da rugosidade ideal, a qual favoreceria tanto uma maior retenção do implante ao osso quanto uma resposta óssea de melhor qualidade. A rugosidade pode ser considerada em diferentes níveis: macroestrutural, microestrutural e ultraestrutural, sendo que todos eles exercem diferentes efeitos sobre os tecidos (ELLINGSEN, 1998). O autor salienta que, idealmente, uma superfície deveria sempre suscitar o perfeito controle de adsorção protéica e adesão celular, assim como propiciar condições para o crescimento, diferenciação e síntese protéica celular subsequente. A superfície ideal precisa representar um balanço entre maior área superficial, pequena liberação de íons e relativa homogeneidade da estrutura da superfície (MASUDA et al, 1998).

A topografia, a química e a energia de superfície desempenham um papel essencial na adesão de osteoblastos sobre o biomaterial (ANSELME, 2000).

Sendo a adesão celular a primeira fase das interações entre célula-material, a qualidade desta primeira fase irá influenciar na capacidade das células de proliferarem e se diferenciarem em contato com o implante. Quando um material de implante é inserido no organismo, torna-se rapidamente coberto por várias camadas de proteínas. As proteínas aderem à superfície do implante e, presumivelmente, controlam, por meio de processos enzimáticos, a adesão inicial de células, determinando, portanto, o tipo de interface com o implante.

A interação da força de adesão e a rugosidade superficial do implante foram investigadas por Ronold et al. (2003). Os pesquisadores relataram que é notório que a rugosidade superficial pode aumentar o torque de instalação e, portanto, aumentar a estabilidade inicial de um implante. Entretanto, não está claramente identificado se o maior torque é atribuível a um aumento no diâmetro do implante ou à maior resistência do osso por causa da maior rugosidade. A força de adequação surge quando um implante é colocado em uma perfuração de pequeno diâmetro dentro do osso. Os pesquisadores discutiram a interação da força de adequação e os efeitos da rugosidade superficial e buscaram desenvolver um protocolo de procedimentos

clínicos baseados nessa teoria. Concluíram que, quando uma perfuração um pouco menor que o diâmetro do implante é preparada, a força de adequação aumenta o torque de instalação. Além disso, a estabilidade pode ser induzida. Portanto, uma superfície mais rugosa do implante não deveria ser vista como um exclusivo mecanismo para fornecer um nível apreciável de estabilidade inicial. Um implante de grau de rugosidade menor, com uma mesma média de diâmetro, é igualmente eficaz.

Apesar de o titânio ser extensivamente usado como biomaterial, ainda há dúvidas quanto à sua resposta biológica. Uma das propriedades analisadas, sem resposta conclusiva, tem sido a influência da qualidade, composição e espessura da camada superficial de óxido que recobre o implante. Alguns trabalhos mostraram que a cicatrização em volta dos implantes de titânio usinados ocorre mediante um processo de mineralização gradual em direção ao implante, ou seja, o mecanismo que envolve a osseointegração não inicia na superfície do implante (SENNERBY; ERICSON, 1993; DELIGIANNI et al., 2001).

Diferentes métodos de tratamento podem ser utilizados para modificar as propriedades topográficas de uma superfície, destacando-se recobrimento com hidroxiapatita, jateamento com diversas substâncias, tratamento com plasma spray de titânio, ataque ácido ou, ainda, uma associação destas técnicas (RONOLD et al., 2003). Tais tratamentos, por alterarem a topografia destas superfícies em escala micrométrica ou nanométrica, podem promover o aumento da área efetiva de contato do tecido com o implante, também aumentando a retenção mecânica (BASTOS et al., 2003; BUSER et al., 1998; GIAVARESI et al., 2003).

### **2.3.1 Técnica de *Spray* de Plasma de Titânio**

Neste processo, é usado, basicamente, um dispositivo de aceleração de partículas acoplado a uma fonte de calor. Partículas minúsculas de titânio são expelidas em velocidade ultrassônica, passando através de uma fonte de calor gerada pela ionização de gases por uma corrente elétrica. O titânio adere à superfície usinada do implante no momento em que as partículas altamente aquecidas chocam-se contra a superfície do implante e solidificam-se

instantaneamente, provocando sua deformação definitiva e a conseqüente incorporação. A nova camada metálica é oxidada imediatamente após a incorporação do titânio à superfície do implante, obtendo-se as mesmas características de óxidos superficiais dos implantes sem texturização de superfície (AMARANTE; LIMA, 2000). Do ponto de vista mecânico, essa técnica confere melhoras no acabamento superficial do implante pela eliminação de pequenos defeitos gerados na usinagem, como trincas e saliências (FERNÁNDEZ et al., 2003).

No caso da técnica de plasma spray de titânio a ausência de flancos pontiagudos as distingue das superfícies texturizadas por subtração (PIATELLI et al., 1993).

### **2.3.2. Texturização por Tratamento Ácido**

Na técnica de texturização por tratamento ácido, os implantes metálicos usinados são imersos em ácidos, na sua forma pura ou em solução, e mantidos por um intervalo de tempo determinado, criando-se pequenas rugosidades ou retenções nas superfícies. O tempo de aplicação do ácido e sua temperatura, juntamente com a concentração, determinarão a profundidade das rugosidades criadas. Todavia, em comparação com as rugosidades formadas pela técnica de jateamento, são de profundidade menor, sendo chamadas de microrretenções (GUÉHENNEC et al., 2006; NAGEM FILHO et al., 2007; TEIXEIRA, 2004).

Um pré-tratamento ácido é frequentemente utilizado para a remoção de óxidos e contaminantes, com o objetivo de oferecer uma superfície limpa e uniforme. Para tanto, é recomendada a utilização de um combinado de ácidos composto de 10-30% (em volume) de HNO<sub>3</sub> e 1-3% (em volume) de HF em água destilada (LIU et al., 2004). Esse duplo ataque ácido proporciona a formação de uma topografia específica, capaz de fixar estruturas de fibrina, promovendo a adesão de células osteogênicas e, assim, promover a aposição óssea (GUÉHENNEC et al., 2006).

A mencionada técnica apresenta as seguintes vantagens: controle do grau de porosidade da superfície (padronização da temperatura concentração e tempo de aplicação dos ácidos), baixo custo e associação aos métodos de limpeza das impurezas superficiais geradas pela usinagem (LIU et al., 2004).

Recentemente, os métodos de ataque ácido têm sido melhorados com a finalidade de aumentar a adesão celular e a formação óssea na superfície dos implantes. Um exemplo são os ataques ácidos realizados em temperaturas elevadas, os quais têm a capacidade de gerar uma superfície com microporos homogêneos, que resultam em uma elevada área de contato implante/osso (GUÉHENNEC et al., 2006). Porém, o ataque ácido em geral acarreta a formação de uma fina camada óxida (< 10nm) na superfície do titânio, a qual, quando em contato com o ar, aumenta sua espessura de maneira bastante lenta, de 3 para 6nm em um período de 400 dias. O óxido é predominantemente  $TiO_2$ , mas resíduos oriundos do ataque ácido podem ser observados, sobretudo compostos químicos contendo flúor (LIU et al., 2004).

Não obstante, há possibilidade de os tratamentos químicos reduzirem as propriedades mecânicas do titânio. O ataque ácido pode acarretar uma fragilização do titânio, causado pela incorporação de hidrogênio ao material, proveniente das reações do ácido fluorídrico com o óxido de titânio, resultando em microtrincas na sua superfície, as quais podem reduzir a resistência à fadiga do implante (LIU et al., 2004; GUÉHENNEC et al., 2006).

Assim, muitos fabricantes têm utilizado o ataque ácido em combinação com outras técnicas de tratamento superficial para obtenção de implantes com superfícies híbridas, objetivando obter características simultâneas de macro e microrretenção (CHO; JUNG, 2003; LIU et al., 2004; TEIXEIRA, 2004; GUÉHENNEC et al., 2006; SILVA et al., 2009).

*METODOLOGIA*

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto desta pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob protocolo de nº. 08/00020 (Anexo A).

Neste trabalho foram observadas as Normas para a Prática Didático-científica da Vivisseção em Animais, que consta na Lei 6.638 de Março de 1979, respeitando-se também os Princípios Éticos na Pesquisa Experimental, determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Anexo B).

#### **3.2 PARADIGMA E MODELO DE PESQUISA**

A presente investigação foi desenvolvida dentro do paradigma tradicional, quantitativo, em uma abordagem experimental, com grupo controle e pós-teste (CAMPBELL e STANLEY, 1979), tendo sua metodologia baseada nas pesquisas CAMPANHA et al. (2007) e CUNHA et al. (2007).

#### **3.3 PROBLEMA**

- Considerando-se a técnica utilizada para a remoção dos implantes, o reparo tecidual perimplante é dependente do tipo de superfície implantar utilizada?

### 3.4 HIPÓTESES

- O reparo tecidual perimplante independe do tipo de superfície implantar utilizada.
- O processo de reparo tecidual é favorecido quando de implantes com superfícies texturizadas em relação com implante dentário usinado.

### 3.5 CONFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS IMPLANTES SEGUNDO AS NORMAS TÉCNICAS

Para garantir a validade desta pesquisa, os implantes empregados foram avaliados previamente de acordo com normas técnicas exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Food and Drug Administration (FDA) para implantes comerciais utilizados em seres humanos.

A confecção e a caracterização dos implantes, como também, os ensaios para adequação às normas técnicas foram realizados e são de responsabilidade do Laboratório de Materiais e Nanociências – Grupo de Estudos de Propriedades de Superfícies e Interfaces do Centro de P&D em Física da Faculdade de Física da PUCRS.

Para o estudo foram produzidos 32 implantes cilíndricos, feitos de titânio comercialmente puro (Baumer S. A, de São Paulo, Brasil), conforme descrito pela norma NBR-ISO 5832-2, que foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: G1 - usinados; G2 - tratados com ataque ácido de rotina na indústria de implantes; G3 - revestidos com camada porosa de titânio e G4 - revestidos com camada porosa de titânio mais tratamento com ataque de um ácido desenvolvido pela equipe do físico Prof. Dr. Roberto Hübler, coordenador do GEPSI-LMN-TECNO PUC (em processo de depósito de patente por ser inovação).

### 3.6 MODELO ANIMAL

O modelo animal escolhido para este estudo foi o coelho da raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagus cuniculus*, da ordem Lagomorpha, gênero *Oryctolagus*. Foram utilizados oito coelhos, machos, adultos (idade entre 8 e 10 meses), pesando entre 4,5 e 5,5 Kg. Os animais selecionados foram obtidos e mantidos, até o final do experimento, junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os procedimentos de manipulação e alimentação foram realizados, seguindo a rotina do Biotério. Durante todo o experimento, os animais permaneceram em alojamento com temperatura, umidade e iluminação controladas, e em gaiolas padrão, devidamente identificadas (Figura 1).



Figura 1 - Alojamento dos coelhos

### 3.7 CONFECÇÃO DO GUIA CIRÚRGICO

Utilizando-se uma lâmina de silicone, com 2mm de espessura, foram confeccionados 16 guias cirúrgicos idênticos, um para cada pata do animal. Dessa forma, a distância entre os dois implantes como também a sua localização no leito ósseo foram padronizadas (Figura 2).

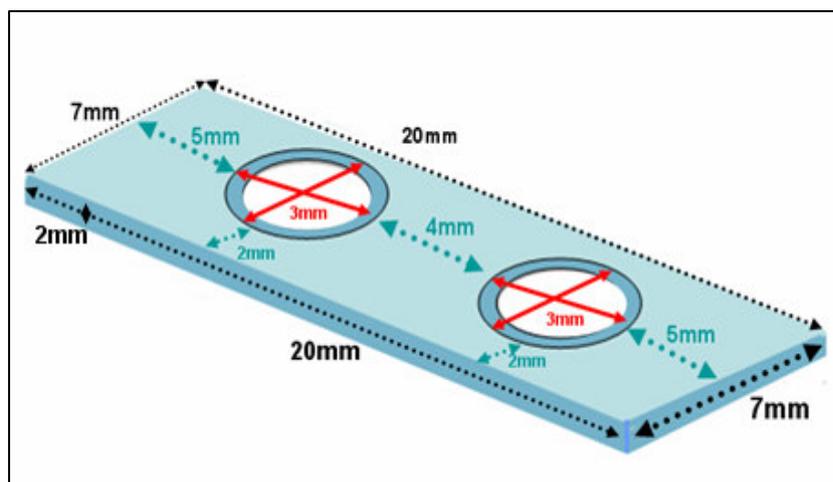


Figura 2 – Esquema do guia cirúrgico

### 3.8 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para a realização desta pesquisa foram obedecidos os princípios de biossegurança e controle de infecção.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário da UFPEL.

As cirurgias ocorreram de forma independente, sobre uma bancada protegida por um campo de mesa estéril descartável e trocado, juntamente com os materiais e instrumentais cirúrgicos, a cada animal.

Na sala de pré-anestesia, após a aferição do peso, os animais foram anestesiados com Zoletil® 50mg de peso, na dose de 5mg/kg e de Xilazina®, 3mg/kg ministradas nesta sequência, por via intraperitoneal. Eventualmente, doses complementares de manutenção, correspondendo a um terço da dose inicial, foram administradas.

Após um tempo médio de indução anestésica de 4 minutos procedeu-se a tricotomia, na parte interna das patas posteriores do animal, com a utilização de uma tosquiadeira recarregável (Oster®). O animal era então transferido para a sala cirúrgica.

A anti-sepsia da pele foi realizada com digluconato de clorexidina a 2% (Periogard<sup>®</sup>, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda., São Bernardo do Campo/SP, Brasil) e os campos cirúrgicos estéreis isolaram a área operatória.

Visando vasoconstricção local foi injetado 1,8ml de lidocaína a 2%, com epinefrina 1:50.000 (Figura 3).



Figura 3 – Infiltração local

Foi realizada a incisão da pele, com lâmina de bisturi nº 15, e em seguida do periósteo. A exposição do tecido ósseo subjacente (face medial da tíbia) foi realizada com descolamento do periósteo através de descolador de Molt, o qual auxiliou, também, no afastamento e na manutenção do guia cirúrgico em posição (Figura 4).



Figura 4 - Adaptação do guia cirúrgico ao do tecido ósseo

Com a região óssea exposta e o guia cirúrgico em posição, iniciou-se a preparação da loja óssea, com o escalonamento gradual das brocas, numa sequência lógica pré-estabelecida, na velocidade de 800 rotações por minuto e torque de 30 newtons. Utilizou-se um motor para implantes (Driller BLM 600 PLUS) e um contra-ângulo (Anthogyr) o qual tinha redução de 16 para 1 rpm. Todas as perfurações contavam com abundante irrigação externa com soro fisiológico.

A primeira broca utilizada foi a “esférica” de 2,0mm de diâmetro, apenas para romper a cortical externa e demarcar, com o auxílio do guia cirúrgico, a localização exata para implantação dos cilindros de titânio. (Figura 5).

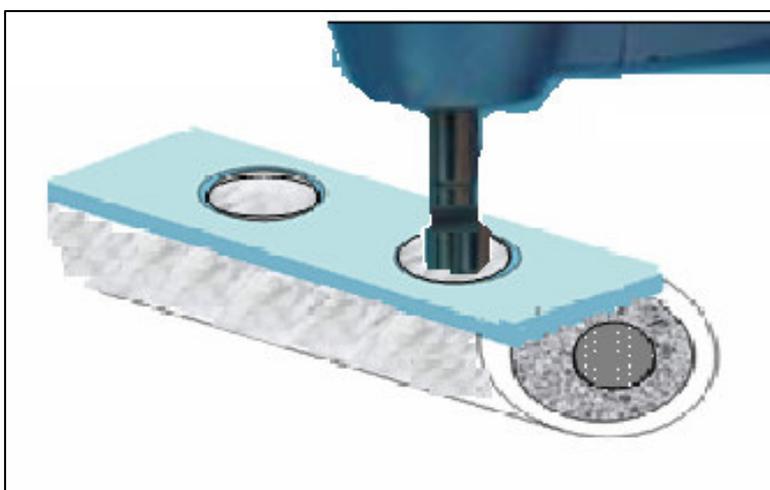


Figura 5 - Esquema da primeira perfuração óssea.

Em seguida com o uso da broca helicoidal, com 1,8mm de diâmetro, a perfuração óssea foi realizada até que a broca tocasse na segunda cortical, com o cuidado de não perfurá-la.

A profundidade do leito ósseo era de aproximadamente 6mm, isto é, do tamanho exato dos implantes, que foram confeccionados propositadamente com este comprimento, visando uma ancoragem monocortical. A terceira broca utilizada foi uma broca helicoidal, com 2,0mm de diâmetro, nessa mesma profundidade, o que possibilitava uma estabilidade inicial baixa, já que os implantes foram confeccionados intencionalmente com um diâmetro especial de 2,0mm (Figura 6).

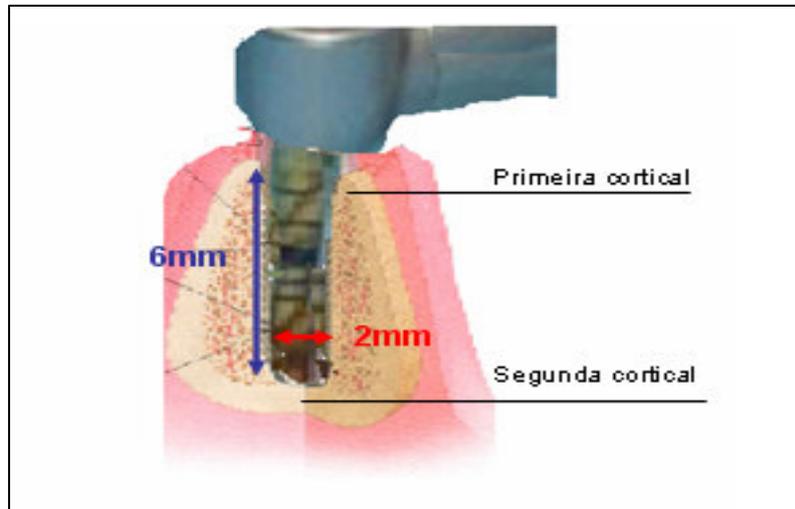


Figura 6 - Esquema -Limite da perfuração óssea

Ao final da sequência de brocas, os implantes foram, então, inseridos por intermédio de uma chave manual, específica para tal, que foi utilizada também para verificar possível capacidade de um implante girar livremente ou até mesmo se deslocar da loja óssea após sua implantação (Figura 7).

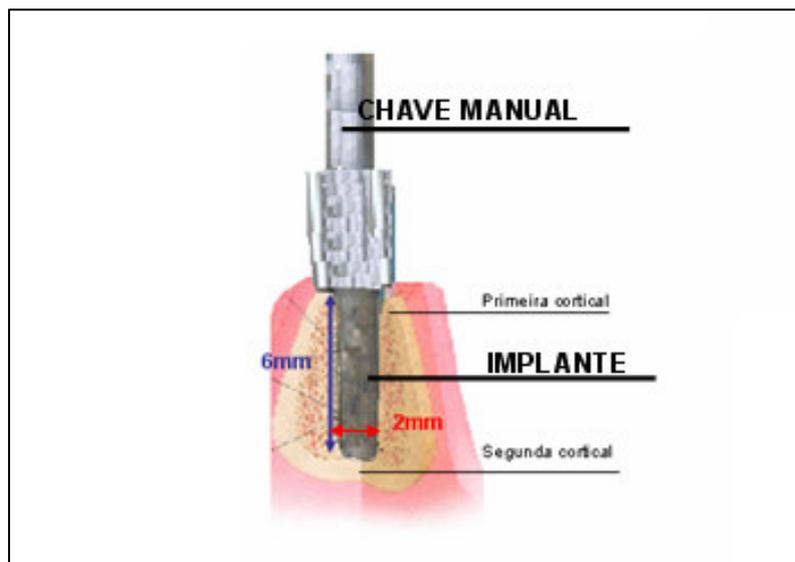


Figura 7 - Esquema - Chave manual inserindo implante na loja óssea

Dessa forma, uma vez instalados os implantes apresentavam uma ancoragem monocortical estável.

Após irrigação abundante, com soro fisiológico, para a limpeza do leito operatório, a ferida cirúrgica foi fechada em um plano tecidual, com sutura no local com fio de nylon, 4-0, de modo contínuo (Figura 8).



Figura 8 - Sutura contínua

O procedimento foi repetido de forma idêntica para todos os animais: a região medial da tíbia direita recebeu os implantes G1e G2 e da tíbia esquerda G3 e G4.

No período pós-operatório, os espécimes permaneceram no biotério da UFPel, sob cuidados dos pesquisadores e orientação de médicos-veterinários.

A morte dos animais ocorreu após um período de 30 dias da colocação dos implantes. O procedimento foi realizado nas instalações do biotério da UFPel por meio da técnica de overdose anestésica, correspondendo a 5 vezes a dose terapêutica, ocasionando o óbito por parada cardiorrespiratória.

Após a constatação da morte dos animais, pelos sinais vitais, os locais das implantações foram acessados com uso de bisturi e lâmina 11, expondo toda a tíbia.

### 3.9 ANÁLISE CLÍNICA E HISTOLÓGICA

Imediatamente após dissecação e obtenção da peça anatômica em estudo realizou-se a primeira avaliação visual, como também, o primeiro teste clínico de estabilidade do implante. Este teste foi padronizado da seguinte forma: uma chave manual, desenvolvida para a inserção dos implantes, foi utilizada para realizarem-se movimentos de rotação sobre a porção coronal do implante, avaliando-se, dessa forma, se os implantes giravam em seu leito ósseo (Figura 9).

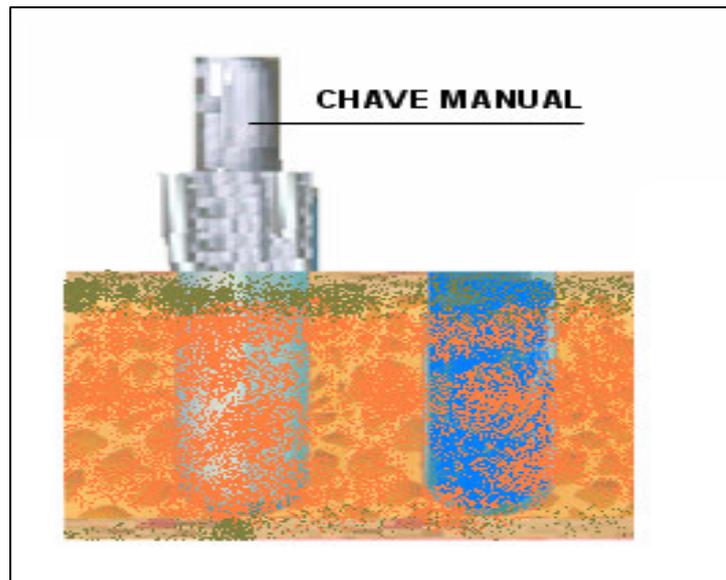


Figura 9 - Esquema - 1º teste clínico de estabilidade do implante

Imediatamente as avaliações iniciais, cada tíbia foi cuidadosamente osteotomizada, com margem de segurança mínima de 2mm de cada lado do implante, utilizando-se uma máquina de corte (Labcut 1010, Extec, USA) com disco de diamante de dupla face 0.16 mm (série 15 HC-Buehler, USA), sob refrigeração constante com soro fisiológico (Figura 10).

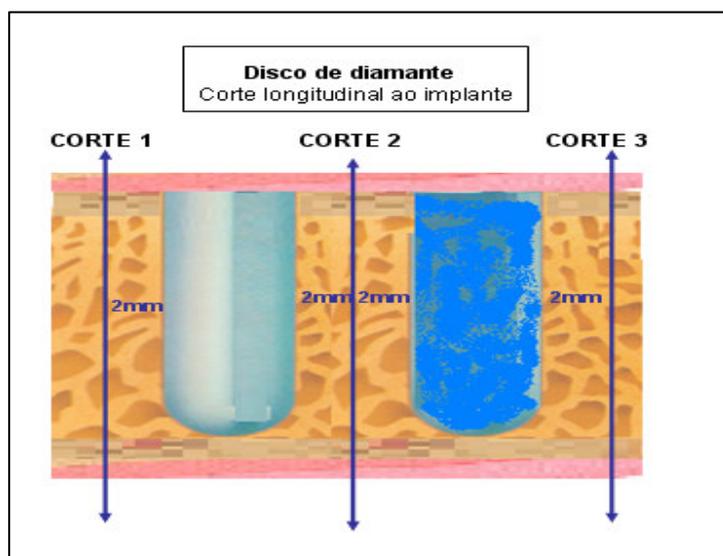


Figura 10 - Esquema -Processo de individualização dos espécimes

Após a individualização dos espécimes em estudo, realizou-se a segunda avaliação visual, como também, o segundo teste clínico de estabilidade do implante conforme a padronização do estudo (Figura 11).



Figura 11 - Esquema - 2º teste clínico de estabilidade do implante

Na sequência, os espécimes em estudo foram enviados para o Laboratório do Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca (CDDDB) da UFPel. Salienta-se que até o momento da preparação dos espécimes para análise histológica cada recipiente foi identificado com o número do animal e do grupo experimental, após cada espécime foi registrado no livro do Laboratório do CDDDB, recebendo um número de registro, sem o conhecimento dos pesquisadores sobre a que grupo pertencia.

Após o período de fixação (24 horas) em formalina tamponada a 10% (pH 7,0), os espécimes foram descalcificados em solução de ácido fórmico a 20%, sob agitação e temperatura ambiente.

Com os espécimes descalcificados, realizou-se a terceira avaliação visual, como também, o terceiro teste clínico de estabilidade do implante conforme a padronização do estudo. Na sequência, os espécimes foram seccionados com lâmina de bisturi número 15, no sentido longitudinal em relação aos cilindros de titânio, que logo em seguida foram removidos dos seus leitos (Figura 12).



Figura 12 - Espécime seccionado e removido o implante

O processamento de desidratação, diafanização e inclusão em parafina do tecido ósseo foi realizado em um processador de tecido (processador modelo PT Mono 2000, marca LUPE). Os espécimes emblocados em parafina foram submetidos ao corte de 6  $\mu\text{m}$  em micrótomo (Micrótomo Leica RM 2645), com cortes no sentido longitudinal para possibilitar a análise histológica de toda a região tecidual perimplantar (Figura 13).

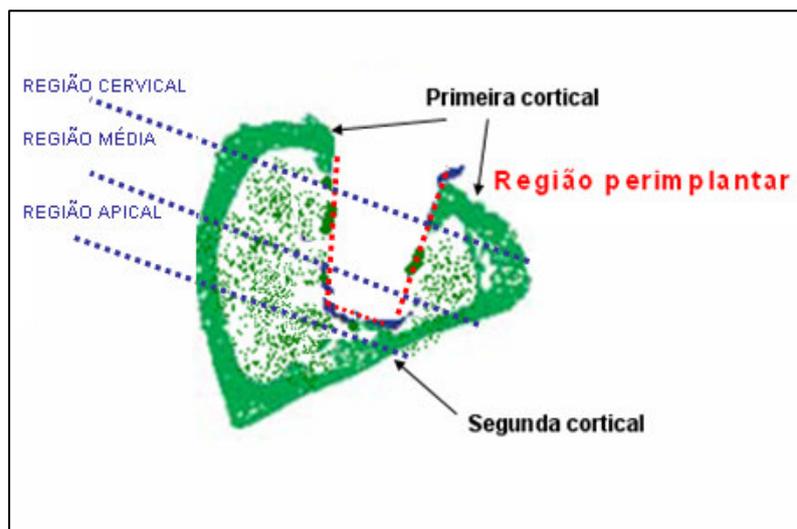


Figura 13 - Esquema - Corte no sentido longitudinal do espécime

Foram selecionados dois cortes referentes à porção mais central do implante. Em seguida, todas as lâminas obtidas foram submetidas à Técnica Histoquímica de coloração Hematoxilina-Eosina (ANEXO C).

A análise histológica das secções das tíbias dos coelhos foi realizada utilizando-se um microscópio óptico (microscópio óptico Olympus Bx® 50 F3), em aumentos de 40, 100 e 400x, no Laboratório de Patologia do CDDB - UFPel.

A avaliação foi realizada por meio da análise descritiva e comparativa das lâminas, coradas com a técnica HE realizada por dois examinadores calibrados (resultados foram consensuais, atingindo um grau de concordância de 90%).

*RESULTADOS*

## 5 RESULTADOS

Durante todo o período de observação, os animais permaneceram saudáveis, com cicatrização normal na região operada, sem evidência de infecção ou deiscência de sutura.

Ao teste de estabilidade, imediatamente após dissecação e obtenção da peça anatômica em estudo, todos os o implantes estavam firmemente fixados ao tecido ósseo. Ao exame clínico observou-se a presença de crescimento ósseo sobre a região do implante em três amostras do grupo G3 e cinco do grupo G4.

Após a individualização das amostras, o teste de estabilidade e a análise visual revelaram a presença do implante firmemente fixado ao tecido ósseo da tíbia em todos os grupos, como também, após o processo de descalcificação óssea.

A principal técnica de coloração de tecidos para o estudo de Histologia básica é a técnica HE (Hematoxilina-Eosina). Através dessa técnica, podemos diferenciar porções basófilas e acidófilas do tecido estudado. A hematoxilina é basófila, ou seja, tem afinidade por substâncias básicas. Sendo assim, ela costuma corar o núcleo e o Retículo Endoplasmático Rugoso, locais onde há grande quantidade de proteínas (básicas pelo seu grupamento amina). A eosina é acidófila, tendo afinidade pelo citoplasma, fibras colágenas e outras substâncias ácidas das células. Dessa forma, na análise histológica, sob microscopia de luz, da região de interface com o implante foram alvos de observação às áreas de tecido com plastos vazios, linhas de osteoblastos ativos e linhas basofílicas de aposição.

### 4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS

Por questões didáticas, as amostras foram fracionadas em: cervical, medial e apical, correspondendo, respectivamente, à porção externa e superior do implante, à lateral (mais extensa) e ao contato com a estrutura medular do osso ou inferior do implante.

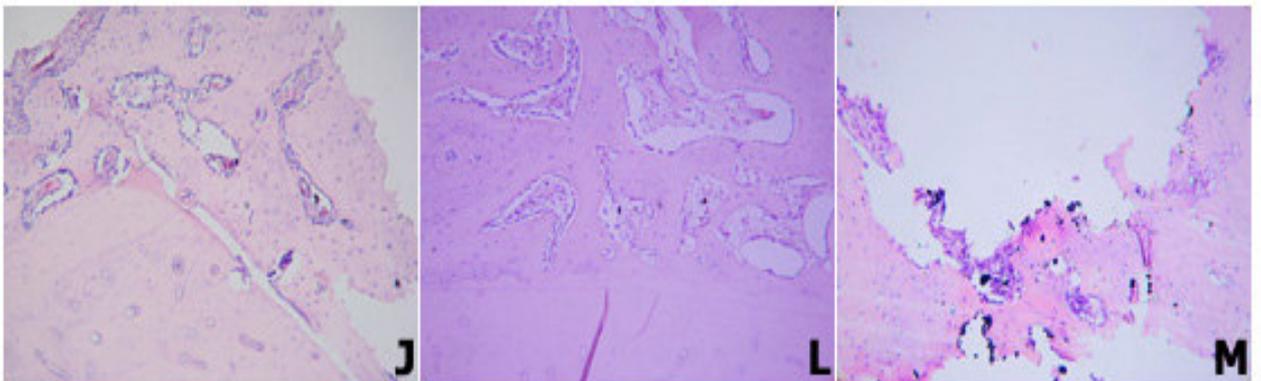
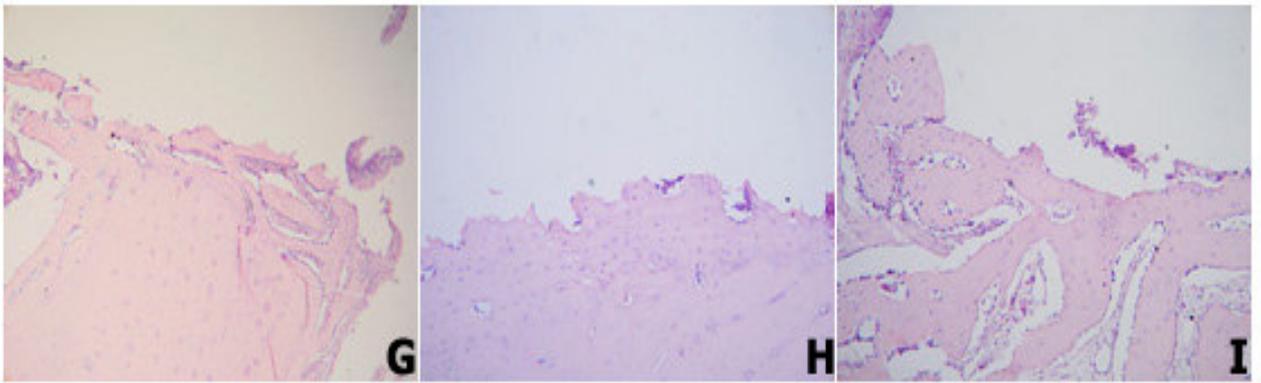
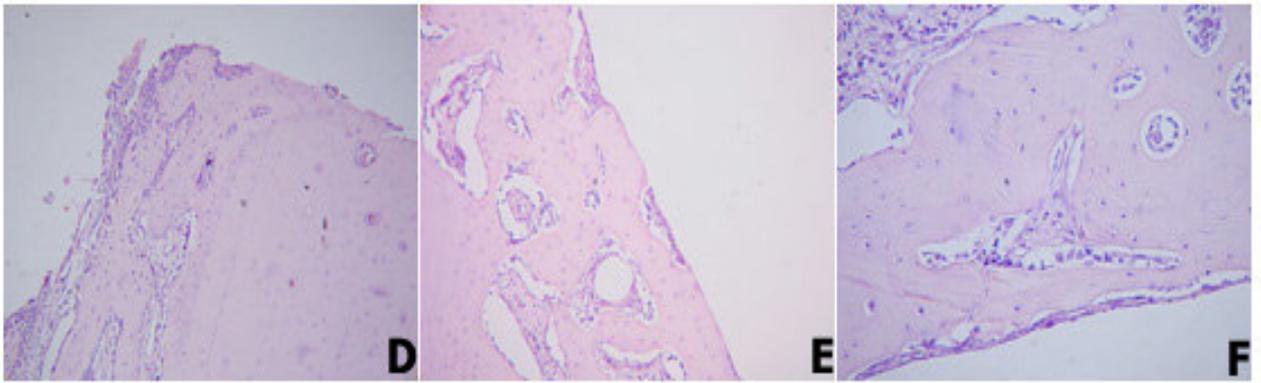
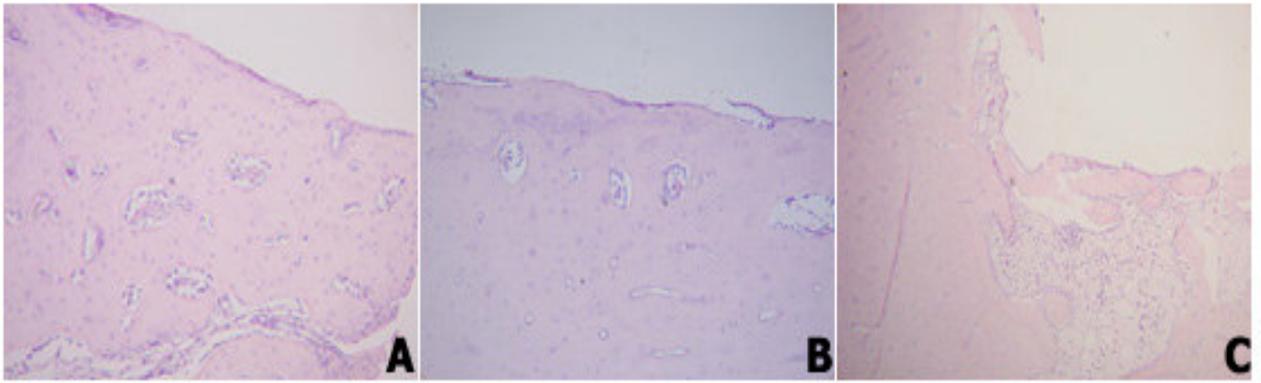
Na **Região cervical** dos espécimes do **grupo G1** a interface óssea com implante apresenta-se de forma regular e linear. É possível, também, observar formação de osso trabecular, apresentando osteoblastos ativos na periferia das

trabéculas, entremeadas por tecido conjuntivo ora denso ora reticular, o qual se encontra ricamente vascularizado e celularizado (exemplo - Fig. 14A). Na **Região cervical** do **grupo G2** os espécimes apresentam uma maior formação de tecido ósseo trabecular rico em osteoblastos ativos com também fibroblastos sustentados por tecido conjuntivo denso associado à intensa vascularização (exemplo - Fig. 14D). Nos espécimes do **grupo G3**, na **Região cervical**, verifica-se a formação de osso trabecular, o qual mostra osteoblastos ativos na periferia da trabécula, como visto nos espécimes do **grupo G2**, porém, evidencia-se uma vantagem deste grupo em relação a amostra dos grupos **G1 e G2**, à presença mais sutil de tecido conjuntivo denso celularizado (Exemplo - Fig. 14G). Na **Região cervical** do **grupo G4** a formação de osso trabecular com osteoblastos ativos na periferia da matriz assemelha-se com a formação óssea do **grupo G3** (Exemplo - Fig. 14G).

Na **Região medial** dos espécimes do **grupo G1** a formação óssea é intercalada por áreas de compactação do osso e por áreas trabeculares, ambas com alto grau de maturação. Nas duas formas de ossificação observa-se a presença de osteócitos enclausurados na matriz. O osso compacto apresenta vascularização correspondente aos canais de Havers. O osso trabecular apresenta osteoblastos ativos na periferia das trabéculas e tecido conjuntivo denso de permeio, moderadamente vascularizado (exemplo – Fig.14B). Também na Figura 14B pode ser observado um filete de tecido conjuntivo denso no limite osso/implante que foi uma característica observada em 2 unidades amostrais. Na **Região medial** dos espécimes do **grupo G2** há o predomínio de osso compacto, ricamente vascularizado (canais de Havers) e a presença de inúmeros osteoplastos contendo osteócitos no interior (Exemplo – Fig. 14E). Na **Região medial** das amostras do **grupo G3** observa-se que em todos os espécimes a formação óssea apresenta-se, ora compacta ora trabecular. Na região em que o tecido ósseo é mais compacto pode ser observada a vascularização correspondente aos canais de Havers. Na Figura 14H evidencia-se a interface óssea irregular observada em todos os espécimes dos grupos **G3 e G4**. Na **Região medial** do **grupo G4** há variação de osso compacto e trabecular em toda a extensão da interface implante/tecido ósseo como observado no **grupo G3** (Exemplo- Fig. 14L). Nas duas formas de ossificação são observados osteócitos enclausurados na matriz, como também a presença de partículas de material enegrecido inerte.

Na **Região apical** dos espécimes do **grupo G1**, porção correspondente à inserção na medula óssea hematopoiética, verifica-se formação de osso trabecular, ricamente celularizado (osteoblastos ativos e fibroblastos) e vascularizado, na proximidade do tecido ósseo preexistente, alcançando na maior parte das amostras o implante. Na Figura 14C pode ser observado leve infiltrado inflamatório mononuclear que está presente, além de tecido adiposo e medular próprios da área, em 10 unidades amostrais. Na **Região apical** dos espécimes dos **grupos G2, G3 e G4** observa-se também a formação de osso trabecular com osteoblastos ativos na periferia da matriz entremeada por tecido conjuntivo denso, ricamente vascularizado e com inúmeros fibroblastos, como também, leve infiltrado inflamatório mononuclear e tecido hematopoiético, próprios da área (Exemplo - Fig. 14F, 14I e 14M). Em 2 espécimes deste grupo observou-se a presença mais significativa de fibroblastos na proximidade do osso preexistente, no limite da interfase osso/ implante. (Figura 14F). Na **Região apical** dos espécimes do **grupo G3** e do **grupo G4** a interface osso/implante é irregular e apresenta em sua extensão a presença de material exógeno enegrecido compatível com partículas provenientes da superfície rugosa do implante. Na Figura 14M pode ser observado que o material enegrecido não provoca reação tecidual adversa (Figura 14M).

**Figura 14**



*DISCUSSÃO*

## 6 DISCUSSÃO

Estudos em humanos estão geralmente limitados ao controle de parâmetros clínicos e radiográficos, assim como exames histológicos de eventuais implantes extraídos em razão de fracassos (AMARANTE; LIMA, 2000). Já os resultados de estudos *in vitro* são de difícil extrapolação para as situações clínicas (SILVA et al., 2009). Assim, as metodologias aplicadas aos estudos *in vivo*, quando em animais, desempenham um papel fundamental para elucidar e aprimorar fenômenos que ocorrem no organismo humano (SCHENK; BUSER, 2000).

Sabe-se que, a comparação entre o osso da tíbia de um coelho e o osso alveolar humano não pode ser interpretada como um modelo de estudo perfeito, mas, por outro lado, quando sistemas de implantes semelhantes produzem resultados parecidos, pode-se extrapolar a interpretação para um resultado positivo (JOOS et al., 2006).

É primordial considerar que, para se obter uma osseointegração segura, tem-se de respeitar alguns fatores: a biocompatibilidade do material; o desenho do implante; a superfície do implante; o acesso cirúrgico; as condições físicas e emocionais do paciente; o status biomecânico e o tempo (STORY et al., 1998; VASCONCELOS, 2002; JOOS et al., 2006).

O tecido ósseo de baixa qualidade e/ou em quantidade insuficiente são os maiores desafios no tratamento com implantes osseointegrados, pois o enbricamento mecânico osso-implante é consideravelmente comprometido e pode ocasionar uma interação fibro-óssea. Esta condição instalada condena o processo de osseointegração (BRANEMARK; HANSSON; ADELL et al., 1977). Dessa forma, características como superfície química, carga, textura e porosidade são estudadas para avaliar as opções que influenciam positivamente na resposta ósseas *in vivo* (ROBERTS et al., 1987; BRENTTEL et al., 2006; JOOS et al., 2006).

Atualmente, na prática odontológica utilizam-se implantes cilíndricos ou cônicos que apresentam roscas. Todavia, tem sido demonstrado que implantes cilíndricos, sem roscas, inseridos sob pressão, também alcançam a osseointegração (BRENTTEL et al., 2006; CAMPANHA et al; 2007).

Na presente pesquisa, a escolha por implantes cilíndricos sem rosca foi para evitar interferência nos resultados do estudo, em relação à adesão e/ou à

estabilidade dos implantes (BRENTTEL et al., 2006). A estabilidade do cilindro foi conseguida na interfase entre o colo do implante e a cortical óssea externa, sendo que, no caso dos grupos G3 e G4, os implantes apresentavam superfície rugosa que lhes proporcionou aumentar o contato com o osso do alvéolo cirúrgico de forma semelhante aos implantes em forma de rosca. Portanto, independente do desenho, a microtextura da superfície desempenha um papel de destaque na formação e na remodelação óssea na interface osso-implante (SENNERBY, ERICSON; 1993; RONOLD et al., 2003). Fatores como dimensão das rugosidades, presença de contaminantes e limpeza da superfície (LARSSON et al., 1996) são também considerados importantes para a resposta biológica de curto e longo prazos. Porém, há autores que recomendam proporcionar um máximo de contato do implante com o osso durante a sua colocação, reduzindo o risco de tecido fibroso na interface (BRANEMARK et al., 1977; VASCONCELOS et al., 2002).

No presente estudo, foi escolhido o período de 30 dias para avaliação do reparo tecidual e da biocompatibilidade, pois inúmeros artigos evidenciam que os eventos iniciais que ocorrem na interface osso-implante são determinantes para o sucesso ou o fracasso dos implantes dentários (DEPORTER, et al., 1986; COOK, RUST-DAWICKI, 1995; STORY et al., 1998; ANSELME, 2000; FROSCH et al., 2002; NGUYEN et al., 2004).

Entre as opções para aumentar a superfície de contato osso-implante está a confecção de rugosidades por jateamento e/ou ataque ácido. Estas formas de texturização de superfícies objetivam otimizar a fixação do implante com máxima intimidade ao osso e também sua estabilidade imediata. Assim, neste estudo procurou-se comparar, experimentalmente, a influência de uma nova superfície (G4) sobre o reparo do tecido perimplante como também sua atuação frente a implantes com superfícies semelhantes às utilizadas na clínica odontológica (G1, G2 e G3).

Conforme estudos que descrevem o processo de regeneração óssea, pode-se observar que, dependendo da anatomia da superfície implantar ser lisa ou rugosa, provoca diferentes áreas de contato com biomoléculas, células, o que produz diferentes perturbações e tipos de uniões das unidades biológicas que podem influenciar tanto sua conformação quanto função.

Nos grupos G3 e G4, pode-se observar a presença de partículas de titânio. Pesquisadores propõem, para evitar o deslocamento de partículas ou fragmentos de metal, agregadas pelo processo de usinagem, durante o atrito da colocação

intraóssea, um tratamento mecânico e/ou químico, para, com isto, evitar ou minimizar esta intercorrência (BUSER et al; 1998).

Conforme relato de Davies (1998), o osso deposita-se indistintamente em superfícies porosas ou lisas, porém uma superfície mais texturizada irá proporcionar, mais rapidamente, aposição de células ósseas. Além disto, Silva et al. (2009) relatam que o comportamento celular pode ser modificado pelas características da superfície do implante.

Durante a avaliação histológica da região apical, que corresponde à porção do implante em contato com a estrutura medular do osso, foi possível observar que, dependendo da superfície implantar em contato com este tecido, verificou-se predomínio de determinadas populações celulares em detrimento de outras.

*CONCLUSÃO*

## 7 CONCLUSÃO

Com base na metodologia aplicada e nos resultados obtidos neste experimento, concluiu-se que a superfície implantar do grupo G3 (implantes usinados e revestidos com camada porosa de titânio) melhor contribuiu para a dinâmica do reparo ósseo, com mínima reação de corpo estranho aos tecidos perimplantares. No mais das vezes, a interface óssea com o implante do grupo G1 apresentou-se de forma linear e regular. Já nos grupos experimentais G3 e G4, esta interface foi caracteristicamente irregular, própria de implantes com superfície porosa e se apresentou com camada de neoformação óssea mais espessa, na relação com o grupo experimental G2, considerando-se a metodologia empregada nesta pesquisa.

*REFERÊNCIAS*

## REFERÊNCIAS<sup>3</sup>

AMARANTE, E. S.; LIMA, L. A. de. Optimization of implant surfaces: titanium plasma spray and acid-etched sandblasting. Current state. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, p. 166-173, 2000.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667-681, 2000.

**ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS**. NBR ISO 5832-2: implantes para cirurgia – materiais metálicos parte 2: titânio puro. Rio de Janeiro, 2001.

BASTOS, I.; VANZILLOTTA, P.; SOARES, G. Caracterização morfológica e topográfica da superfície de implantes dentários. **Rev. Br. Odont**, v. 60, p. 47-50, 2003.

BRANEMARK, P. I.; HANSSON, B. O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O.; OHMAN, A. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw: experience from a 10-year period. **Scan J Plast Reconstr Surg**, Supl. 16, 1977.

BRENTEL A S, VASCONCELLOS L M R de, OLIVEIRA M V, GRAÇA M L de A. Histomorphometric analysis of pure titanium Implants with porous surface versus rough Surface. **J Appl Oral Sci**. v.14; p. 213-218, 2006.

BUSER, D.; SCHENK, R. K.; STEINEMANN, S.; FIORELLINI, J. P.; FOX, C. H.; STICH, H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **J Biomed aterials Res.**, v. 25, p. 889-902, 1991.

BUSER, D.; NYDEGGER, T.; HIRT, H.; COCHRAN, D. L.; NOLTE, L. P. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. **Int J of Oral and Maxillofac Implants**, v. 13, p. 611-19, 1998.

CAMPANHA, B. P.; GALLINA, C.; GEREMIA, T.; VALIATI, R.; OLIVEIRA, M. G. LLLT como alternativa para implantes sem estabilidade inicial. **Clin Oral Implants Res**, v. 6, p. 128-132, 2007.

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

---

<sup>3</sup> Referências e citações conforme normas da ABNT NBR 6023, NBR 14724 e NBR10520, disponível em <http://webapp.pucrs.br/bcmodelos>

CHO, S. A.; JUNG, S. K. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. **Biomaterials**, v.24, n.26, p.4859-4863, 2003.

COOK, S. D.; RUST-DAWICKI, A. M. In vivo evaluation of a CSTi dental implant: a healing time course study. **J Oral Implantology**, v. 2,n.3, p. 182-190, 1995.

CUNHA, A ; RENZ, R. P.; BLANDO, E ; HÜBLER, R ; MACHADO, R ; LANES, R; OLIVEIRA, R. Osseointegration evaluation of odonthological screws implanted in rabbit tibias using torsion and traction TESTS. In: IV COLAOB, 2006, Caxambu - MG. IV COLAOB, 2006.

CUNHA, A ; RENZ, RP ; WANTOWSKI, G. ; OLIVEIRA; BLANDO, E; HÜBLER, R. Surgical Procedure Using Sheep as an Animal Model to Evaluate Osseointegration. *Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica / Journal of Dental Clinics and Research*, v. 3, p. 59-62, 2007.

DAVIES, J. E. Mechanisms of endosseous integration. **Int J Prosthodon**, v. 11, p. 65-74, 1998.

DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **J Dent Educ**, v.67, n. 8, p.932-949, 2003.

DELIGIANNI, D.D.; KATSALA, N. D.; KOUTSOUKOS, P. G.; MISSIRLIS, Y. F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. **Biomaterials**, v. 22, p. 87-96, 2001.

DEPORTER, D. A.; WATSON, P. A.; PILLIAR, R. M.; MELCHER, A. H.; WINSLOW, J.; HOWLEY, T.P. A histological assessment of the initial healing response adjacent to porous-surfaced, titanium alloy dental implants in dogs. **J Dent Res**, v. 65, n. 8, p. 1064-1070, 1986.

ELLINGSEN, J. E.; Surface configurations of dental implants. **Periodontology 2000**, v. 17, p. 36-46, 1998.

FERNÁNDEZ, E.; et al. Materials in dental implantology. In: NATALI, A.N. **Dental Biomechanics**. Londres: Taylor & Francis, 2003. p.69-87.

FROSCH, K. H.; BARVENCIK, F.; LOHMANN, C. H.; VIERECK, V.; SIGGELKOW, H.; BREME, J. et al., Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants. **Cells Tissues Organs**, v. 170, p. 214-227, 2002.

GIAVARESI, G.; FINI, M.; CIGADA, A.; CHIESA, R.; RONDELLI, G.; RIMONDINI, L.; TORRICELLI, P.; ALDINI, N. N.; GIARDINO, R. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. **Biomaterials**, v. 24, p. 1583-1594, 2003.

GIL, F.J., et al. The effect of shot blasting and heat treatment on the fatigue behavior of titanium for dental implant applications. **Dental Materials**, In Press, Corrected Proof, 2006.

GUÉHENNEC, L. L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, v.23, n.7, p.844-854, 2006.

JOOS, UHP; WIESMANN, T; SZUWART, MEYER, U. Mineralization at the interface of implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** V. 35, p. 783–790, 2006.

JUNQUEIRA, L. A.; CARNEIRO. *Histologia Básica*. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1982.

[LARSSON, C](#); [THOMSEN, P](#); [ARONSSON, B O](#). Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and eletropolished implants with different oxide thicknesses. **Biomaterials**, v.17, p.605-616, 1996.

LAUSMAA, J. Surface spectroscopic characterization of titanium implants materials. **Journal of electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v.18, p. 343-361, 1996.

LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: Reports**, v.27, n.3-4, p.49-121, 2004.

MASUDA, T.; YLIHEIKKILÄ, P. K.; FELTON, D. A.; COOPER, L. F. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies. **Int J Oral and Maxillofac Implants**, v. 13, p. 17-29, 1998.

NAGEM FILHO, H.; FRANCISCONI, P. A. S.; CAMPI JUNIOR; FARES, N. H. Influência da textura superficial dos implantes. **Odonto Ciência**, v.22, n.5, p.82-86, 2007.

NGUYEN, H. Q.; DEPORTER, D. A.; PILLIAR, R. M.; VALIQUETTE, N; YAKUBOVICH, R. The effect of sol-gel formed calcium phosphate coatings on bone ingrowth and osteoconductivity of porous-surfaced Ti alloy implants. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 865-76, 2004.

PIATELLI, A.; TRISI, P.; EMANUELLI, M. Bone reactions to hydroxylapatite-coated dental implants in humans: Histologic study using SEM, light microscopy and laser scanning microscopy. **Int. J. Oral and Maxillofac. Implants**, v. 8, p. 69-74, 1993.

PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface, **Biomaterials**, v. 20, p. 2311-21 1999.

ROBERTS; W.E; GARETTO, D. In: MISCH, C. E. **Implantes Dentários Contemporâneos**. São Paulo: Santos, 2000.

ROBERTS, W. E.; TURLEY, P. K.; BREZNIAK, N.; FIELDER, P. J. Implants: Bone physiology and metabolism. **CDA J**, v.15 (10), p.54-61, 1987.

RONOLD, H. J.; LYNGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E. Analysin the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test. **Biomaterials**, v. 24, p. 4559-4564, 2003.

SCHENK, R.; BUSER, D. Osseointegration: a reality. **Periodontology 2000**, v. 17, p. 22-35, 2000.

SENNERBY, L.; ERICSON, L. E. Early tissue response to titanium implants inserted in rabbit cortical bone. **J Mater Sci Mater Med**, v. 4, p. 494-502, 1993.

SILVA, TSN, MACHADO DC, VIEZZER C, SILVA JÚNIOR NA, OLIVEIRA MG. Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation. An experimental study. **Acta Cir Bras**. v.24, n. 3, p.201-205, 2009.

STORY, J. B.; WAGNER, W. R.; GAISSER, D. M.; COOK, S. D.; RUST-DAWICKI, A. M. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. **J Oral Maxillofac Implants**. V. 13, p. 749-57, 1998.

TEIXEIRA, E.R. **Superfícies dos implantes – o estágio atual**. In: DINATO, J. C. *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Médicas, 2004. p.63-80.

VASCONCELOS, L. W. **Oseointegração em diferentes qualidades ósseas**. In: Gomes, L. A. *Implantes osseointegrados: técnica e arte*. São Paulo:Santos, 2002.

*ANEXOS*

## ANEXO A

1



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



Ofício 030/08-CEUA

Porto Alegre, 07 de maio de 2008.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00020, intitulado: "Avaliação do efeito da LLLT no processo de osseointegração de implantes de Ti".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

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

Atenciosamente,

  
Prof. Dra. Anamária Feijó  
COORDENADORA DO CEUA-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Prof Roberto Hübler  
N/Universidade

PUCRS

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

## ANEXO B

### NORMAS PARA PRÁTICA DIDÁTICO-CIENTÍFICA DA VIVISSECÇÃO DE ANIMAIS

Lei 6638, de 08 de maio de 1979.

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

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

Art. 3º - A vivissecção não será permitida:

- I - sem o emprego de anestesia; II - em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competente;
- III - sem supervisão de técnico especializado;
- IV - com animais que não tenham permanecido mais de 15 (quinze) dias em biotérios legalmente autorizados;
- V - em estabelecimento de ensino de 1o. e 2o grau e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

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

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

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

Art. 5º - Os infratores desta Lei estarão sujeitos:

- I - às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto-lei 3.688, de 03/10/41, no caso de ser a primeira infração;
- II - à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência.

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

- I - o órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstrações com animais vivos;
- II - as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;
- III - órgão e autoridades competentes para fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

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

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

## ANEXO C

### **Técnica Histoquímica de Coloração Hematoxilina-Eosina**

Dois banhos de xilol de 5 minutos cada. Hidratação em dois banhos de álcoois, absoluto e a 96°, de 5 minutos cada um e lavagem em água corrente por 10 minutos. Coloração com o corante hematoxilina por incubação de 8 minutos e lavagem em água corrente também por 10 minutos. Coloração com eosina com a incubação por 2 minutos. Em seguida, lavagem em água corrente por 5 minutos. Desidratação das amostras iniciando com 1 minuto em álcool a 96°, dois minutos em álcool absoluto e três banhos em xilol, sendo de 5 minutos cada um. Montagem das lâminas com lamínula e Entellan® (Entellan, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).