UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**APLICAÇÃO DE UM VIDRO BIOATIVO
EM TÍBIAS DE COELHOS**

LORENA CECILIA VALENZUELA REYES

Dissertação apresentada à Área
Interunidades Bioengenharia - Escola de
Engenharia de São Carlos, Faculdades de
Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de
Química de São Carlos da Universidade
de São Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Bioengenharia

**ORIENTADOR: Prof. Dr.
João M. Domingos de Almeida
Rollo**

**São Carlos
2000**

A meus pais Víctor e Gladys
pelo apoio pleno, confiança e ensinamentos,

A meus irmãos Paola, Víctor Alexis e Rodrigo,
pelo carinho em todas as horas

A meu esposo Luiz,
pela paciência e ajuda nos momentos mais difíceis

Agradecimentos

Ao Professor Dr. João M. Domingos de Almeida Rollo, pela orientação deste trabalho.

A FAPESP (processo 98/11426-7) pela bolsa concedida.

A todos os funcionários e professores da Interunidades Bioengenharia e do Departamento de Engenharia de Materiais, Aeronáutica e Automobilística da EESC – USP, pela colaboração neste trabalho.

Aos colegas da Materiais e da Bioengenharia D. Elza, Regina, Ana, Eliete, Janete, Antônio Carlos, Eliezer, João, Pedro, André Paschoal, Euclides Castorino, Rosamel Muñoz, Isabel Buttignon, Rosana Vilarim, Mirian Vicente, Fernanda Gurgel, Adriana Simone, Daniela Carvalho, Luiz Otávio, Juracy Franca, Leandro Cintra, Marcos Shimano, Ana Crisci, Paulo de Tarso, Vitor Castania que tanto colaboraram em vários momentos deste trabalho.

Às Professoras Lisete Ramalho e Eleny Balducci Roslindo da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara pela colaboração pelas sugestões, ensinamentos e toda a atenção dispensada nos pilotos e na avaliação morfológica, respectivamente.

À Dra. Lucimar R. S. de Avó por toda a dedicação e ensinamentos durante a avaliação histopatológica.

Ao colega Carlos Alberto da Silva Bento pelo conhecimento e colaboração e nas realizações de MEV e EDX.

Ao Professor e amigo Jorge Oishi pelo encorajamento e pela ajuda na análise estatística.

Ao colega Orivaldo Lopes da Silva pelas sugestões e apoio durante este trabalho.

Aos colegas Mário Gazziro e José Silvano Cerqueira Lima pela colaboração e boas idéias em tantos momentos.

À amiga Marielza Ortega Roma pelo apoio e pelas palavras de carinho em todo este trabalho.

Agradecimentos Especiais

Ao amigo sempre presente Nelson Ferreira da Silva Júnior sem o qual este trabalho não seria concretizado.

Ao professor e colega Norberto Aranha pela amizade, conhecimento e disposição no decorrer deste trabalho.

SUMÁRIO

Índice de figuras.....	i
Índice de tabelas.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1. Biomateriais Usados em Ortopedia e Odontologia.....	4
3.2. Tipos de Ligação entre Material e Tecido.....	5
3.3. Vidros Bioativos.....	7
3.4. O Osso e a Osteogênese.....	10
4. Material e Métodos.....	16
4.1. Caracterização do Vidro Usado.....	16
4.1.1. Difração de Raios-X.....	16
4.1.2. Análise Térmica Diferencial.....	17
4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	17
4.1.4. Avaliação do Potencial de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	18
4.2. Procedimento Cirúrgico Experimental.....	19
4.2.1. Procedimento utilizado em estudo piloto.....	19
4.2.1.1. Escolha do veículo a ser utilizado.....	19
4.2.1.2. Cirurgias no estudo piloto.....	20
4.2.2. Procedimento cirúrgico final.....	22
4.2.3. Métodos de avaliação.....	27
4.2.3.1. Radiografias.....	27
4.2.3.2. Microscopia de Luz Comum.....	28
4.2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia Dispersiva de raios-X.....	29

5. Resultados e Discussão.....	31
5.1. Resultados da Caracterização do Material.....	31
5.1.1. Difração de raios X e Análise Térmica Diferencial.....	31
5.1.2. Resultados do MEV.....	33
5.2. Procedimentos cirúrgicos.....	36
5.3. Procedimento cirúrgico final.....	37
5.3.1. Radiografias.....	38
5.3.2. Microscopia de luz comum.....	40
5.3.2.1. Perfurações não preenchidas com o material.....	40
5.3.2.2. Perfurações preenchidas com o material.....	43
5.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura e EDX.....	52
6. Conclusões.....	69
7. Referências Bibliográficas.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema da estrutura do osso tubular. A) periósteo; B) substância compacta do osso; C) cavidade medular; D) endósteo; 1) lamelas circunferenciais externas; 2) sistema haversiano; 3) extrato de células pouco diferenciadas; 4) extrato fibroso; 5) canal de Volkmann; 6) trabécula óssea do tecido esponjoso (ELISÉIEV et al, 1987, modificada)	12
FIGURA 2. Imagem de coelho utilizado no procedimento cirúrgico; aplicação da anestesia inicial.....	22
FIGURA 3. Imagem da tíbia de coelho utilizado no procedimento cirúrgico; tricotomia.....	23
FIGURA 4. Tíbia direita de coelho no momento da primeira incisão, a seta indica o tendão patelar antes da primeira incisão.....	24
FIGURA 5. Características técnicas do Modular e do Motor de Alta Rotação Cirúrgico.....	24
FIGURA 6. Detalhes da realização das perfurações; A) anestesia local durante o ato cirúrgico; B) seta indica local de perfuração preenchida com vidro; C) detalhe da perfuração proximal e marcação do local da distal.....	26
FIGURA 7. Posição de tomada das imagens radiográficas.....	27

- FIGURA 8. Tíbia esquerda de coelho, tracejado indica local de corte do osso para desmineralização.....28
- FIGURA 9. Curva de Difração de Raio X do vidro bioativo utilizado, não há presença de picos de cristalização.....32
- FIGURA 10. Curva da Análise Térmica Diferencial do material utilizado.....33
- FIGURA 11. MEV do vidro utilizado, setas indicam partículas de vidro.....34
- FIGURA 12. Radiografias de coelho sacrificado aos 15 dias após o implante. a) setas indicam perfurações no dia do implante; b) locais das perfurações imperceptíveis no dia do sacrifício.....39
- FIGURA 13. Radiografias de coelho sacrificado aos 45 dias após o implante. a) dia da cirurgia; b) aspecto de osso normal no dia do sacrifício.....40
- FIGURA 14. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho controle sacrificado aos 15 dias da perfuração. A) região com osteócitos; B) região com osteoblastos; setas amarelas indicam locais de angiogênese; organização inicial de lamelas de osso imaturo (MLC, HE, corte longitudinal, 160 x)..... 41
- FIGURA 15. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 30 dias da perfuração. A-1) tecido ósseo neo-formado; A-2) tecido ósseo antigo; seta azul indica espaço medular e a amarela tecido ósseo neofomado rico em porção celular (MLC, HE, corte longitudinal, 80 x); B). espaço do canal de Volkmann (MLC, TM, corte longitudinal, 160 x).....42

FIGURA 16. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias da perfuração. A) tecido ósseo neoformado; B) região rica em osteoblastos; seta azul indica espaço medular (MLC, HE, corte longitudinal, 160 x).....43

FIGURA 17. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 15 dias da perfuração. A) aumento 40x, dentro da circunferência, região do implante, fora da circunferência: osso maduro; B) aumento 80x, osso maduro; setas mostram partículas de vidro (MLC, HE, corte longitudinal)44

FIGURA 18. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 15 dias da perfuração; setas amarelas: espaços medulares; setas azuis: vidro, setas verdes: vaso sanguíneo (MLC, HE, corte longitudinal, 160x).45

FIGURA 19. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 15 dias da perfuração; setas amarelas: espaços medulares; setas azuis: vidro, setas verdes: vaso sanguíneo, (MLC, HE, corte longitudinal, 320x).....45

FIGURA 20. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 30 dias da perfuração; setas amarelas mostram organização do tecido neoformado; setas verdes indicam partículas de vidro; setas azuis indicam capilares; A) coloração TM; B) coloração HE (MLC, corte longitudinal, 160 x).....46

FIGURA 21. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 30 dias da perfuração; setas amarelas mostram organização do tecido neoformado; setas verdes indicam partículas de vidro; setas azuis indicam capilares (MLC, corte longitudinal, 320 x).....46

- FIGURA 22. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias do implante; setas amarelas mostram organização do tecido neoformado; setas verdes indicam partículas de vidro; setas azuis indicam capilares sanguíneos (MLC, corte longitudinal, 80 x).....47
- FIGURA 23. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias do implante; setas amarelas indicam organização do tecido neoformado; setas verdes indicam partículas de vidro rodeadas e cobertas por tecido osteóide; setas azuis indicam capilares sanguíneos (MLC, HE, corte longitudinal, 160 x).....48
- FIGURA 24. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias do implante; setas amarelas indicam organização do tecido neoformado; setas verdes indicam espaços medulares; setas azuis indicam capilares sanguíneos (MLC, HE, corte longitudinal, 160 x).....48
- FIGURA 25. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias do implante; seta amarela indica organização do tecido neoformado; seta verde indica espaço medular; setas azuis indicam capilares sanguíneos (MLC, HE, corte longitudinal, 320 x).....49
- FIGURA 26. Presença (sim) ou não de tecido osteóide e quantidade de vidro nas perfurações em tíbias de coelhos nos diferentes períodos de tempo de sacrifício.....51
- FIGURA 27. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 15 dias do implante; elipse indica região de perfuração com lamelas em início de organização com presença de vidro (100 x).....53

- FIGURA 28. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 15 dias do implante; setas indicam partículas de vidro bioativo no tecido ósseo em formação (500x).....54
- FIGURA 29. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 15 dias do implante; setas indicam partículas de vidro bioativo no tecido ósseo em formação (1000x).....54
- FIGURA 30. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante; elipse indica região de perfuração com lamelas em formação (100x).....55
- FIGURA 31. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante; elipse indica região de perfuração com lamelas em formação (500x).....55
- FIGURA 32. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante; região central: capilar com grande quantidade de hemácias (tecido bem irrigado) (1000x).....56
- FIGURA 33. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante; canal de Volkmann (2000x).....56
- FIGURA 34. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante; elipse indica região de implante (100x).....57
- FIGURA 35. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante; região central indica capilar com grande quantidade de hemácias (região bem irrigada) (500x).....57

-
- FIGURA 36. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante; detalhe de hemácias (5000x).....58
- FIGURA 37. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante; canal de Volkmann (2000x).....58
- FIGURA 38. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante, pontos para realização de EDX (500x).....59
- FIGURA 39. EDX dos cinco pontos da figura 38; quantidades de silício em porcentagem nos respectivos pontos: 1) 37.99; 2) 25.40; 3) 11.69; 4) 1.06* e 5) 16.20.....60
- FIGURA 40. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante (100x).....61
- FIGURA 41. EDX dos pontos 1, 2, 3 e 4 da figura 40. Os pontos 1 e 3 indicam a presença de silício; os pontos 2 e 4 não apresentam silício em sua composição.....62
- FIGURA 42. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante (500x). Os pontos de 1 a 5 foram escolhidos para a realização do EDX.....63
- FIGURA 43. EDX dos cinco pontos da figura 42. Em todos os pontos houve a presença de silício; quantidade de silício nos pontos em porcentagem: 1) 0.61, 2) 4.22 , 3) 2.55 , 4) 4.31 , 5) 3.84.....64

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do vidro bioativo utilizado (teor % m/m).....31

Tabela 2. Composição química do “Bioglass 45S5” (peso %).....31

Tabela 3. Caracterização da amostra observada para um padrão de partículas utilizadas.....34

Tabela 4. Resultado da avaliação de citotoxicidade.....35

Tabela 5. Quantidade de vidro bioativo presente nos cortes por tempo até o sacrifício; 0) não presença de vidro; 1) baixa presença de vidro; 2) média presença de vidro; 3) alta presença de vidro.....50

Tabela 6. Quantidade de silício presente nas amostras segundo o tempo de sacrifício do coelho a partir do implante do vidro bioativo (%).....65

RESUMO

REYES, L.C.V. (2000) *Aplicação de um vidro bioativo em tíbias de coelhos*. São Carlos. 76p. Dissertação (mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

Foi estudada a ação de preenchimento e de osteocondução em perfurações em tíbias de coelhos, que receberam a aplicação de um biovidro em pó cuja composição é (teor % m/m): 45,9 SiO₂, 23,9 Na₂O, 21,6 CaO e 7,54 P₂O₅. Foram realizadas perfurações nas tuberosidades das tíbias direitas de 24 coelhos, machos, adultos da raça Nova Zelândia, com peso entre 2,6 e 4,0 quilogramas. Foi utilizado sangue do próprio coelho misturado ao vidro para facilitar a colocação do material nas perfurações. Foram realizadas radiografias, microscopia de luz comum, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia dispersiva de raios-X buscando revelar a interação do vidro com o osso. A caracterização do material foi realizada por meio das técnicas de análise térmica diferencial, difração de raios-X, MEV e avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro* do material. Os resultados indicam que o material não sofreu rejeição pelo organismo dos coelhos e que houve formação de osso na região em que foi implantado o material. Foi observada a presença de células ósseas e de tecido osteóide bem irrigados.

Palavras-chave: biomateriais, vidro bioativo, osteocondução, coelho

ABSTRACT

REYES, L.C.V. (2000) *Bioactive glass application in rabbit tibiae*. São Carlos. 76p. Dissertação (mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

In this research were studied both filling and osteoconduction action in rabbit tibiae, which received a powder bioactive glass of the following composition (45,9% SiO₂, 23,9% Na₂O, 21,6% CaO, 7,54% P₂O₅, all in wt%). It was carried out in right tibiae tuberosity perforations of 24 New Zealand white, male, mature rabbits weighing between 2.6 e 4.0 Kg. There was used animal's autologous blood mixed with bioactive glass to facilitate its placed in tibia. It were observed in tibia tuberosity perforations findings by means of radiography, light microscopy, SEM and EDS to show bone tissue and bioactive glass interaction. Material characterization was made by chemical composition analysis, SEM, DTA, XRD analysis and evaluation of cytotoxicity potential *in vitro*. Results indicated that material was biocompatible and acted as a osteoconductive material. Both bone cells and osteoid tissue were found with satisfactory blood irrigation.

Keywords: biomaterials, bioactive glass, osteoconduction, rabbit.

1- INTRODUÇÃO

Implante é um dispositivo médico feito de um ou mais biomateriais que é intencionalmente inserido dentro do corpo, CONSENSUS CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS (1986). Os implantes podem ser classificados quanto à sua origem em: biológicos e sintéticos. Os biológicos incluem os biopolímeros tais como colágenos, seda, queratina, polissacarídeos ou mesmo tecidos naturais como pericárdio de bovinos. Os sintéticos recebem a designação especial de materiais biomédicos e biomateriais e podem ser compostos por metais e suas ligas, polímeros, cerâmicas e compósitos, ZAVAGLIA *et al* (1986).

Biomaterial é um material utilizado em um dispositivo médico com intenção de interagir com sistemas biológicos. Os biomateriais são usados em Odontologia e em Medicina, sendo que, na especialidade ortopédica vários tipos são utilizados para preenchimento e estabilização ósseos.

Podem ser citados como exemplo de materiais estudados e desenvolvidos nas áreas médica e odontológica os usados para preenchimento dental, lentes de contato, lentes artificiais, córneas, articulações, próteses de mama, linhas de sutura e vasos cardiovasculares.

Segundo BOSCHI (1996), para que os biomateriais consigam realizar as funções para as quais foram desenvolvidos, precisam possuir pelo menos duas propriedades importantes: a biocompatibilidade e a biofuncionalidade. Biocompatibilidade é a capacidade de um material de funcionar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica. Biofuncionalidade está relacionada ao conjunto de propriedades que dá a um determinado dispositivo a capacidade de desempenhar uma função desejada semelhante a qual está substituindo.

Para HENCH (1993), biocompatibilidade não é apenas a ausência de rejeição, mas envolve a interação entre o implante e o tecido adjacente. Deste enfoque, surgiram os conceitos de bioinércia e bioatividade. Bioinerte é aquele material que quando implantado não sofre rejeição. Bioativo é o material que interage com os tecidos adjacentes de forma semelhante à da parte natural que eles substituem. Os materiais sintéticos atualmente considerados bioativos são o biovidro e os compostos da família dos fosfatos de cálcio como a hidroxiapatita, BOSCHI (1996).

Cerâmicas bioativas, como a hidroxiapatita (HA), têm sido usadas quando restauração e aumento ósseo são desejados. No entanto, em algumas pesquisas verificou-se uma dificuldade na colocação e retenção das partículas de HA nos defeitos ósseos, OONISHI et al (1997), KAWAI et al (1997).

Outros materiais são estudados para superar as dificuldades da HA. Larry Hench e colaboradores (1972, 1973, 1974, 1975) iniciaram o estudo dos vidros bioativos e, após 3 décadas, sabe-se que eles são biocompatíveis e reagem com o osso criando uma fase de transição e uma fixação com razoável resistência.

O uso destes vidros seria necessário em situações ortopédicas e odontológicas especiais, nas quais o processo natural de reparação óssea tenha sido perturbado. Por exemplo: retardo na consolidação de fraturas, más formações congênitas, doenças ósteo-metabólicas e, principalmente, nas situações em que existe uma impossibilidade de contato entre as extremidades viáveis do osso, como em fraturas com perda óssea ou necrose de fragmentos, certos tipos de osteomielites em que predomina a osteólise e nas ressecções tumorais extensas.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é verificar se o vidro bioativo modificado utilizado, baseado no “Bioglass 45S5”, possui a capacidade de ser um material de preenchimento em perfurações ósseas e, se além disto, possui outro tipo de interação com o osso. Para isto foram realizadas cirurgias em tíbias de coelhos, as quais foram preenchidas com o vidro e analisadas por meio de radiografias, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz comum.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomateriais Usados em Ortopedia e Odontologia

É citado por D'ALESSIO et al (1999), e GINESTE et al (1999), que revestimentos, tanto biológicos quanto sintéticos podem ser usados a fim de proporcionar uma melhor fixação biológica do material implantado.

O sulfato de cálcio é um dos mais antigos biomateriais conhecidos. Ele é um dos principais componentes do “Gesso de Paris” e foi largamente utilizado em ortopedia e na prática peridontal, principalmente até a década de 60, antes da descoberta da hidroxiapatita, PELTIER (1961). Este composto pode ser utilizado principalmente quando considerado o preenchimento de espaços. A absorção do sulfato de cálcio, que ocorre num curto espaço de tempo (normalmente 15 dias), é, às vezes, seguida de regeneração óssea. Sob o ponto de vista clínico, este material não apresenta complicações, SMITH (1982). Considerando o curto espaço de tempo que este material leva para ser reabsorvido, acredita-se que não haja tempo suficiente para surgir um estímulo da regeneração óssea.

Superfícies de polímeros modificados por processos químicos e físicos têm levado a respostas celulares positivas, servindo inclusive, para o revestimento de outros materiais como, por exemplo, os metais a fim de melhorar a interação entre a superfície do implante com o organismo. Além de polímeros, cerâmicas podem ser utilizadas como revestimento para próteses metálicas, ROLLO (1978). No intuito de produzir um material que se ligasse ao osso, MARCOLONGO et al (1998) trabalharam com um

compósito de fibras de vidro bioativo com polímero. Este compósito foi colocado em tíbias e fêmures de coelhos e apresentou melhor fixação do que os outros polímeros sem fibras vítreas usados como controle. Foi observada também a parcial reabsorção das fibras vítreas bioativas.

Muitos estudos têm mostrado um resultado positivo em relação à biocompatibilidade da hidroxiapatita. No entanto, OONISHI et al (1997) e KAWAI et al (1997) relataram dificuldades na colocação e retenção da partícula de hidroxiapatita no defeito ósseo. OONISHI et al (1997) também reportaram uma desvantagem quando verificado o tempo necessário antes da completa restauração óssea.

OONISHI et al (1997) citam que muitas cerâmicas de fosfatos de cálcio têm sido estudadas por vários grupos de pesquisa que têm encontrado resultados favoráveis no que se refere à formação de osso quando utilizado o material poroso, o qual é invadido por trabéculas. YUAN et al (1999) mostraram a formação de osso em tecido mole, induzida por fosfatos de cálcio. Este estudo evidencia uma ocorrência importante – comum a muitos estudos com biomateriais – na qual dois materiais com a mesma composição final podem produzir uma resposta antagônica, dependendo do modo com o qual os materiais testados foram sintetizados. Pequenas diferenças no processo de síntese costumam ser determinantes no comportamento dos biomateriais.

Além das cerâmicas, vitro-cerâmicas e vidros vêm sendo estudados com bons resultados quando verificadas a biocompatibilidade e a biofuncionalidade, HENCH et al (1972).

3.2. Tipos de Ligação entre Material e Tecido

Alguns termos e definições relacionados a biomateriais aqui utilizados estão descritos em "Definições em Biomateriais" da Conferência

de Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais que aconteceu em Chester na Inglaterra de 03 a 05 de março de 1986.

O hospedeiro é o sistema vivente (um tecido vivo) no qual permanecerá um dado material.

Segundo HENCH (1998), dependendo do tipo de implante, pode haver quatro tipos diferentes de resposta do hospedeiro. Se o material é tóxico, o tecido ao seu redor morre. Se o material é não tóxico e biologicamente inativo (quase inerte), um tecido fibroso de espessura variável é formado. Se o material é não tóxico e biologicamente ativo (bioativo), uma ligação interfacial é formada. E, por último, se o material é não tóxico e se dissolve, o tecido ao seu redor o substitui.

Esse autor descreve ainda os tipos de ligação entre biocerâmicas e o sistema músculo-esquelético. Neste ponto vale afirmar que os materiais vítreos são, muitas vezes, didaticamente classificados juntamente com as cerâmicas quando são estudadas as propriedades relacionadas ao comportamento dos materiais em relação ao hospedeiro.

ZAVAGLIA et al (1996) descrevem, baseados nos tipos de ligação citados acima, a seguinte classificação dos biomateriais cerâmicos composta por: biocerâmicas inertes; biocerâmicas com superfície ativa e biocerâmicas absorvíveis.

As inertes possuem durabilidade, estabilidade e pouca ou nenhuma reatividade com os tecidos onde são implantados. Quase não há resposta fisiológica do organismo à presença desse material. São exemplos desta classe, a alumina e a zircônia.

As biocerâmicas com superfície ativa têm uma ligação química estável com o hospedeiro. São recomendadas nos locais onde há necessidade de estimular o crescimento ósseo ou de outros tecidos e, na forma de pó como preenchimento. Os exemplos típicos desta classe são a hidroxiapatita, o "Bioglass", o ceravital e outros vitro-cerâmicos.

As biocerâmicas absorvíveis têm como exemplo clássico o fosfato tricálcico e são usualmente biocompatíveis e de fácil absorção pelo

metabolismo natural. Inicialmente, ela tem baixa porosidade, mas esta vai aumentando, podendo haver crescimento do tecido dentro dos poros.

3.3. Vidros Bioativos

No início da década de setenta o biovidro começou a ser estudado. Primeiramente, o material foi usado numa forma composta: vitro-cerâmica. Placas desse material foram então testadas para a verificação de suas propriedades mecânicas e biológicas.

Em 1971 surgiram as primeiras evidências de que implantes vitro-cerâmicos fixaram-se firmemente ao osso, GREENLEE et al (1971).

Em 1972, o biovidro foi utilizado juntamente com cerâmicas tanto em estudos *in vitro* como em estudos *in vivo*. Foi, então testada sua capacidade como ligante e como cobertura para próteses metálicas em macacos a fim de aumentar sua capacidade de fixação. Foi usado também como substituto de um segmento do fêmur, mantendo-o funcional após a cirurgia, HENCH et al (1972).

Em 1973 foi estudado o comportamento histoquímico do biovidro e de suas interfaces quando ele se apresentava em solução ou ligado ao osso. Nesses estudos, verificou-se que implantes de biovitro-cerâmica são ligados ao osso por uma camada que se assemelha a um cimento e que serve como um local ativo para a ligação colágena seguida pela calcificação. Tal camada era rica em sílica, cálcio e fosfato. Também houve evidências de crescimento de osso novo em regiões adjacentes à superfície de implante do biovidro. Estas evidências também estiveram presentes nos casos em que o biovidro foi usado para cobrir a superfície de implantes metálicos em experimentos com animais, HENCH et al (1973).

Em 1974, o comportamento de implantes de diferentes composições de biovidros foi comparado ao de outros materiais ortopédicos. Verificou-se

uma elevada ossificação na interface osso – vidro, ao contrário da abundância de tecido fibroso presente nos outros materiais de implante. Foram também estudadas as propriedades químicas da superfície dos implantes de vidro, HENCH et al (1974).

Em 1975, além de um estudo *in vitro* analisando a superfície química de implantes ortopédicos de biovidro, foi realizado um estudo usando ratos com a mesma finalidade, HENCH et al (1975).

Após três décadas de estudo, são conhecidos vários tipos de vidros bioativos e muitos estudiosos em todo o mundo buscam novas características e propriedades para esta classe dentre os biomateriais. Sabe-se que o biovidro pode proporcionar uma fixação no osso por interação ou reação devido ao fato de ser um material que pode reagir com o osso criando uma fase de transição entre o tecido e o material e uma fixação com razoável resistência SMITH (1982). Os vidros bioativos formam uma fixação densa, não porosa e com superfícies ativas; eles têm fixação por ligação química com o osso (fixação bioativa). A biocompatibilidade do biovidro é um fato verificado por vários estudiosos que utilizaram o material, HENCH (1998).

O biovidro tem sido usado como cimento odontológico, HEYS et al (1982), como material de implante, SMITH (1982) e como material de reconstrução óssea, MOREAU & MAZIÈRE (1989).

Em um estudo *in vitro* utilizando osteoblastos de calvária de ratos, foram verificados três períodos distintos da expressão genética seguindo a adesão celular: proliferação celular e síntese da matriz extra-celular, maturação e organização da matriz e, mineralização da matriz. Neste estudo, verificou-se significativo aumento no tamanho e número dos depósitos minerais numa cultura de osteoblastos que tinha crescido num vidro modificado, DEE et al (1996).

Também tem sido estudada a função do biovidro como um carreador de proteínas, SÖDERLING et al (1996) ou, então, em formas modificadas para aumentar sua biocompatibilidade, GATTI et al (1996).

PAJAMAKI et al (1995) implantaram próteses de quadril cobertas por duas camadas de vidro bioativo em coelhos. Passadas oito semanas, verificaram que a camada superficial de vidro bioativo tinha sido reabsorvida nas áreas sem contato ósseo direto. Esta ocorrência foi explicada pela parcial cristalização da fase vítrea do material durante seu aquecimento na cobertura da prótese. Nas áreas com íntimo contato ósseo, o vidro foi ligado ao osso por meio de uma camada de fosfato de cálcio na superfície do revestimento. A camada de fosfato de cálcio é formada mesmo quando o fósforo não faz parte da composição do vidro, como ocorreu no estudo destes autores. Isto indica que o fosfato da camada cálcio fosfato provém do fluido corporal.

OONISHI et al (1997) observaram que o biovidro é mais fácil de ser manipulado e pode permitir a completa restauração óssea em duas semanas ao contrário das 12 semanas necessárias se usada a hidroxiapatita.

Alguns estudos em fêmur de coelhos mostraram que a quantidade de osso formado na interface do osso com a hidroxiapatita foi estatisticamente menor que na interface com biovidro, HEIKKILA et al (1996).

A condrogênese (formação de tecido cartilaginoso) ocorreu de maneira precoce nos casos em que foi usado biovidro em comparação com a hidroxiapatita, SUOMINEN et al (1996). Em um estudo realizado no maxilar de cachorros, verificou-se que o reparo ósseo ocorreu antes nos casos em que foi utilizado o biovidro, comparado com a hidroxiapatita, SCHEPERS & DUCHEYNE (1997).

Outros estudos *in vitro* indicam que a superfície de cerâmicas vítreas, especificamente da apatita-wollastonita contendo vidro cerâmica ("AW ceramic"), pode promover a diferenciação osteoblástica. Esta promoção seria explicada pelo aumento da formação de uma camada de apatita biológica na superfície cerâmica, OHGUSHI et al (1996).

Uma pesquisa *in vitro* de MARCOLONGO et al (1997) utilizando fibras vítreas e um compósito de destas mesmas fibras com polímeros,

sugeriu que ambos os biomateriais podem exibir bioatividade também *in vivo*.

Um estudo comparando o efeito osteogênico de um vidro bioativo e uma membrana de poli-tetrafluoretileno (PTFE) mostrou que o vidro bioativo aumenta o reparo de defeitos no osso cortical enquanto que o PTFE parece diminuir o reparo ósseo, TURUNEN et al (1995). Um outro estudo realizado pela mesma equipe, três anos mais tarde, comparou o efeito dos mesmos materiais, agora adjacentes a implantes de titânio e de vidros bioativos. Os resultados indicaram que os implantes cobertos com o vidro parecem aumentar a ósteo-integração nas áreas com defeitos ósseos, TURUNEN et al (1998).

Duas formulações de vidros bioativos foram usadas cobrindo implantes de uma liga de titânio (Ti6Al4V) para ortopedia. O estudo *in vitro* utilizando osteoblastos humanos indicou que os novos vidros foram efetivos na estimulação da diferenciação celular e crescimento ósseos, OLIVA et al (1998).

3.4. O Osso e a Osteogênese

O osso é classificado como um tecido conjuntivo especializado cuja estrutura colágena – mineralizada é a principal responsável pela sustentação do corpo. O tecido conjuntivo se apresenta constituído por três componentes: um fibroso, uma substância – base constituída por um tecido fluido, e uma porção celular, RIEGGER (1993). Um dos principais objetos neste estudo é a porção celular.

A porção inorgânica do osso é composta basicamente por cálcio e fosfato caracterizados como um cristal de hidroxiapatita com pequenas quantidades de outros elementos como os fluoretos que favorecem a cristalização e assim endurecem os ossos. No início, é depositado o fosfato de cálcio amorfo que, com a maturação, é transformado em hidroxiapatita cristalina.

Macroscopicamente, o osso é classificado em compacto e trabecular. O osso compacto é um tecido denso, bem vascularizado e mineralizado, o qual compõe o córtex dos ossos longos, HALL (1990). Já microscopicamente, o osso é classificado em osso imaturo ou fibroso, ou em osso maduro ou lamelar, JUNQUEIRA & CARNEIRO (1990). O osso imaturo é encontrado principalmente nos ossos dos fetos e nos processos em que há formação de ossos em adultos, ROSS et al (1993).

O componente celular do tecido conjuntivo é constituído por fibroblastos e fibrócitos, além das células ósseas específicas. As células que participam da osteogênese, ou seja, do processo de formação do osso são: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Osteócitos e osteoblastos são células uninucleadas de origem mesenquimal. Os osteoblastos são encontrados em maior número ao longo das superfícies formadoras de osso na vida adulta. Os osteócitos, encontrados dentro das lacunas, são simples osteoblastos incorporados pela matriz óssea. Os osteoclastos, com origem no monócito-macrófago, são células multinucleadas (seis a doze núcleos) encontradas ao longo da superfície do osso. Produzem depressões de reabsorção recortadas conhecidas como lacunas de Howship, local onde está sendo reabsorvido ativamente o osso mineralizado, COTRAN et al (1994).

Na figura 1 é apresentado um esquema modificado de um osso tubular, ELISEIEV et al (1987), como é o caso do fêmur e da tíbia. São evidenciados o sistema haversiano e o canal de Volkmann os quais são responsáveis pela nutrição dos ossos longos. Vale lembrar que nos ossos curtos e esponjosos a estrutura é diferente da apresentada, pois, não há necessidade de grande vascularização para transporte de nutrientes, uma vez que ele é feito célula a célula por difusão.

FIGURA 1. Esquema da estrutura do osso tubular. A) perioste; B) substância compacta do osso; C) cavidade medular; D) endoste; 1) lamelas circunferenciais externas; 2) sistema haversiano; 3) extrato de células pouco diferenciadas; 4) extrato fibroso; 5) canal de Volkmann; 6) trabécula óssea do tecido esponjoso (ELISÉIEV et al, 1987, modificada).

Nos humanos, a formação de osso novo pode ocorrer principalmente devido a dois motivos principais: o crescimento normal que acontece durante toda a vida aproximadamente até os 50 anos e o crescimento induzido pela ocorrência de uma fratura.

A geração, manutenção e reparo do tecido ósseo dependem de eventos celulares e moleculares que ocorrem em resposta a um complexo equilíbrio de estímulos locais e sistêmicos, DEE et al (1996).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de formação de tecido ósseo podem ocorrer de três maneiras distintas explicadas a seguir: osteogênese, osteocondução e osteoindução, GLOWACKI & SPECTOR (1990).

Osteogênese significa a formação do osso pelo transplante de osteoblastos e pré-osteoblastos viáveis que sintetizam osso nos novos sítios. Este conceito pode incluir também osteócitos que mantêm a viabilidade do tecido ósseo transplantado. Este mecanismo é exemplificado pelo enxerto de osso esponjoso autógeno, medula, periósteo e enxertos vascularizados.

Materiais osteocondutivos agem como uma malha onde vão crescer vasos, osteoblastos e pré-osteoblastos que migram das margens da perfuração óssea. No caso de implantes reabsorvíveis a malha será reabsorvida e substituída pela deposição do novo osso originado. Malhas não reabsorvíveis podem também formar treliças para o crescimento ósseo. Limitações ao uso do princípio da osteocondução se referem ao tamanho do defeito, à celularidade (grau, qualidade, ou condição das células que estão presentes), à vascularidade do hospedeiro e à regulação local de reabsorção e remodelamento.

Osteoindução é a conversão de células não esqueléticas em células esqueléticas por estímulos indutivos. O osso desmineralizado é um material osteoindutivo que tem sido usado em procedimentos ortopédicos, crânio-faciais e periodontais.

Dentre outros tipos de patologias ósseas, a fratura é uma causa importante de formação do osso. Os osteoblastos lesados no local da fratura ficam extraordinariamente ativos, proliferando em todas as direções, secretando grande quantidade de matriz protéica, provocando a deposição de osso novo, corrigindo a fratura em poucas semanas, GUYTON (1988).

O reparo de uma fratura depende dela ter ocorrido em um osso previamente normal ou em algum local de doença preexistente. Também são fatores importantes, neste reparo, a extensão e a natureza da fratura.

As fraturas podem ser completas ou incompletas (galho verde); fechadas (quando o tecido suprajacente continua intacto) ou expostas (abertas – quando a área da fratura se comunica com a superfície cutânea); e cominutivas (quando o osso é estilhaçado) ou com desvio (quando as extremidades do osso no local da fratura não estão alinhadas). As fraturas cominutivas e expostas consolidam-se lentamente e com resultado menos satisfatório, COTRAN et al (1994).

Nas fraturas abertas, uma possível infecção pode contribuir para a destruição óssea e para a deterioração do suprimento sanguíneo, além de estimular a fibrose, que interfere na consolidação, COTRAN et al (1994).

Em casos de defeitos ósseos extensos, produzidos por traumas, processos patológicos ou anomalias do desenvolvimento, o osso não se repara espontaneamente, havendo assim, a necessidade de uma tentativa cirúrgica para reparação da lesão, TAGA et al (1997).

A recuperação óssea após a fratura começa com o hematoma que envolve os fragmentos ósseos e os tecidos moles. O hematoma é invadido por uma frouxa malha de capilares e fibroblastos. As células que se proliferam e se diferenciam são nutridas pela extremidade final do perióstio, endóstio e medula óssea. A separação do perióstio estimula a proliferação de células no interior do mesmo e uma nova formação óssea começa em 48 horas (em jovens). O calo, substância formada pela proliferação de células no local de fratura, é composto pela combinação de osso e cartilagem, RIEGGER (1993). Com o passar do tempo, este calo é reabsorvido pelos osteoclastos e a fratura finaliza sua consolidação.

Em termos celulares, o novo osso é formado por osteoblastos, os quais ao amadurecerem tornam-se osteócitos. A reabsorção óssea ocorre devido aos osteoclastos. São estes, os três componentes celulares a serem verificados neste trabalho. A diferença fundamental entre osteoblastos e osteoclastos é a grande quantidade de enzimas lisossômicas produzidas no complexo de Golgi ao redor do núcleo celular dos osteoclastos. As células osteoprogenitoras estão localizadas nas camadas de endóstio (interno ao osso) e de perióstio (externo ao osso). Não há perióstio nos sítios de inserção dos ligamentos e tendões e nas superfícies onde a cartilagem articular é encontrada. Existe uma falta de atividade osteoprogenitora nesses lugares, RIEGGER (1993).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Fez-se um delineamento a respeito das análises necessárias para uma caracterização eficaz do vidro bioativo aqui estudado.

4.1. Caracterização do Vidro Usado

A análise química do vidro bioativo modificado previamente preparado foi realizada no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM / UFSCar – UNESP) por meio do método de solubilização ácida em forno de microondas, sistema fechado, com determinação dos elementos de interesse por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES). O equipamento utilizado para esta análise foi marca Jarrel Ash, modelo ATOMSCAN 25.

4.1.1. Difração de Raios-X

O ensaio de Difração de raios-X (DRX) foi efetuado no CCDM / UFSCar – UNESP em equipamento Siemens, modelo D 5000 Kristofollex utilizando um tubo de radiação de Cu com monocromador secundário de grafite. Usou-se a técnica de varredura contínua, com intervalo 2θ variando de 5° a 75° . Foi utilizada varredura passo a passo, com passo de $0,017^\circ$ e tempo de 6 segundos por exposição. Esta técnica permite identificar os

planos preferenciais de cristalização num determinado material, ou mesmo a presença de um material amorfo PADILHA & AMBRÓZIO (1985).

4.1.2. Análise Térmica Diferencial

Por meio da medida de Análise Térmica Diferencial (DTA) é possível obter os valores das temperaturas características do material: Temperatura de transição vítrea (T_g) e Temperatura de cristalização (T_c), SHACKELFORD (1996). A curva de DTA foi obtida no Instituto de Química da UNESP de Araraquara no equipamento *Thermal Analyst 3100, TA Instruments, modelo 2910*. No ensaio foram utilizados 40 mg de amostra do vidro na forma de pó, tendo como referência a α -alumina também na forma de pó e com a mesma massa. O aquecimento foi realizado a uma taxa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, até a temperatura de 1200°C .

4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise por MEV foi realizada para verificar as características morfológicas do material utilizado, uma vez que esta técnica permite a análise de superfícies irregulares, PADILHA & AMBRÓZIO FILHO (1985).

Foi utilizado um equipamento LEO modelo 440. As amostras foram preparadas por meio de dispersão do pó num meio volátil utilizando um aparelho de ultra-som. Amostras da mistura (vidro mais solvente) foram depositadas sobre uma fita adesiva de carbono colada ao suporte usado neste tipo de análise. Em seguida, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro a fim de torná-la condutora, GOLDSTEIN et al (1994).

Por meio desta técnica, uma superfície condutora elétrica e estável em vácuo pode ser analisada com boa profundidade de campo, PADILHA & AMBRÓZIO FILHO (1985).

As imagens obtidas foram analisadas pelo “software” de análise de imagem MOCHA para a obtenção do tamanho médio das partículas de vidro.

4.1.4. Avaliação do Potencial de Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro* foi feita por meio do Método de Difusão em Agar, usando a linhagem celular NCTC Clone 929 de tecido conjuntivo de camundongo (CCL1-ATCC-USA).

Neste método, a linhagem celular é semeada em placas de Petri e incubada por 48 horas em meio de cultura líquido numa temperatura de 37°C. Este meio é meio mínimo essencial de Eagles, com sais de Earle e sem L-glutamina de acordo com a norma ASTM F895-84 (reaprovada em 1995). Então, este meio é substituído por um meio de cobertura sólido que é composto de partes iguais de meio, duas vezes concentrado e agar com vermelho neutro. As amostras em pó foram colocadas dentro de um cilindro fixado sobre o meio de cultura e as placas foram novamente incubadas por 24 horas numa temperatura de 37°C.

Os dados observados são: índice de zona (IZ), índice de lise (IL) e índice de resposta (IR). O IZ é a área não corada pelo corante vital e o IL indica a porcentagem de células degeneradas. Ambos os índices são numericamente anotados e relacionados fornecendo o IR.

As amostras são testadas em quadruplicatas em placas separadas. O controle positivo é constituído de um fragmento de 0,5cm x 0,5cm de látex tóxico e o controle negativo é formado por discos de papel de filtro atóxico com 0,5cm de diâmetro.

4.2. Procedimento Cirúrgico Experimental

A metodologia cirúrgica utilizada neste trabalho passou por várias modificações até chegar a um procedimento fixo final. Estas mudanças envolveram principalmente o veículo a ser utilizado para a implantação do vidro bioativo; osso a ser operado; e o procedimento cirúrgico propriamente dito.

4.2.1. Procedimento utilizado em estudos piloto

O estudo piloto foi dividido em duas etapas de cirurgias e as principais características de cada etapa serão descritas a seguir.

4.2.1.1. Escolha do veículo a ser utilizado

A manipulação do material utilizado é grandemente dificultada quando se faz necessário o preenchimento de uma perfuração pelo fato dele ser essencialmente vidro moído.

Fez parte de nossa sistemática experimental, obter uma massa consistente do vidro com o auxílio de um meio intermediário (veículo) o qual possibilitaria a fácil mistura e posterior colocação do material no local do preenchimento ósseo.

Durante o trabalho piloto três meios foram testados para servirem como veículo: o sulfato de cálcio hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ um pó, facilmente miscível com ajuda de um solvente), SATO et al (1998); ágar-ágar (um meio gelatinoso de fácil obtenção em laboratórios biológicos) e sangue do próprio animal.

Os três meios se mostraram eficientes na função de formar uma “pasta” homogênea e de manuseio prático na mistura com vidro. Cabe citar que com o sulfato de cálcio foi usada água destilada como solvente no momento da mistura com o vidro. O sangue foi usado na segunda etapa das cirurgias piloto.

4.2.1.2. Cirurgias no estudo piloto

Numa primeira fase, foram utilizados 4 coelhos albinos e adultos da linhagem Nova Zelândia. Nos raios destes coelhos foi realizada uma cirurgia, através da qual foi provocada uma perfuração no osso compacto utilizando uma broca de uso odontológico acoplada a um motor de baixa rotação. Este tipo de motor é utilizado na tentativa de reduzir a necrose do tecido ósseo manipulado. Inicialmente foi escolhido o rádio do coelho pelo fato dele apresentar pouca mobilidade e por ser, juntamente com a tíbia e o fêmur, um dos ossos mais utilizados em estudos com biomateriais, WHEELER et al (1997), TURUNEN et al (1998); SATO et al (1998); MARCOLONGO et al (1998); FUJITA et al (1998); TURUNEN et al (1995).

As perfurações foram, inicialmente, preenchidas com o material de estudo através do auxílio de um porta-amálgama - instrumento utilizado por dentistas para preencher cavidades.

Em relação a assepsia e anestesia dos animais, o procedimento utilizado foi praticamente o mesmo a ser apresentado no item que descreve o método cirúrgico eleito como o melhor.

O animal foi posicionado em decúbito lateral para o ato cirúrgico. A área de trabalho não é irrigada com vasos de longo calibre. Fez-se uma incisão retilínea na face anterior do antebraço, sobre o rádio, de cerca de 3 cm. de extensão. O periósteo, incisado longitudinalmente, foi mantido aderente à musculatura adjacente, sendo afastado em bloco junto com ela,

expondo, assim, a diáfise do rádio. A perfuração foi realizada perpendicularmente ao eixo longitudinal da diáfise do rádio como citado anteriormente atravessando o endóstio e atingindo a medula. Durante todo o procedimento, o local de incisão foi limpo e umedecido com soro fisiológico para manter a assepsia do local e diminuir o risco de necrose no osso.

Os rádios esquerdos dos animais foram preenchidos com a mistura de vidro bioativo e sulfato de cálcio ou de agar-agar e vidro bioativo. Os rádios direitos formaram o grupo controle. O perióstio e a musculatura foram reposicionados e aponeurose e pele foram suturadas com fios de náilon 40 por pontos separados.

Após o ato cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com dois animais cada uma e conservados dentro das melhores condições de higiene possíveis até a data do sacrifício. Em dois animais foi implantado o vidro com o agar-agar e nos outros dois foi implantado o sulfato de cálcio com o vidro.

Foram realizadas radiografias dos rádios operados imediatamente após a colocação do material e antes do sacrifício. Dois animais foram sacrificados 45 dias após a cirurgia de implante, um foi sacrificado 30 dias após e o outro, 15 dias após o implante. Após os sacrifícios, os rádios dos animais foram desarticulados e, passaram por processo de rotina de preparo histológico. Foram feitos cortes de 7 micrometros (μm) de espessura os quais foram corados com hematoxilina e eosina, para análise histológica por microscopia de luz.

Numa segunda fase do estudo piloto, dois novos coelhos foram operados utilizando praticamente o mesmo procedimento cirúrgico com modificação do osso de rádio para a tíbia. Todo o processo radiográfico e histológico foi repetido.

Outra alteração foi em relação ao tipo de perfuração que agora não mais ultrapassou o endóstio e, por consequência, não atingiu o canal medular. Assim, houve a garantia de se trabalhar apenas em osso cortical sem a interação de outro tipo de tecido como, por exemplo, o medular. Nestas cirurgias foi utilizado o sangue como veículo.

4.2.2. Procedimento cirúrgico final

O material escolhido como veículo a ser misturado com o vidro em pó foi o sangue do próprio animal retirado no sítio cirúrgico. Nessa mistura foi percebida a homogeneidade e a facilidade necessárias no manuseio. Também foi considerado o fato da não rejeição a um material pertencente ao próprio animal.

Foi efetuado o procedimento cirúrgico em 24 coelhos machos, albinos, de idade adulta e da linhagem Nova Zelândia com peso variando entre 2,6 e 4,0 Kg, como apresentado na figura 2. Foram seguidos os princípios cirúrgicos de implante de biomateriais de acordo com Mendenhall, (1995). Todo o material cirúrgico foi lavado e posteriormente esterilizado em estufa. O vidro bioativo em pó aplicado nos coelhos foi previamente esterilizado em autoclave.

FIGURA 2. Imagem de coelho utilizado no procedimento cirúrgico; aplicação da anestesia inicial.

A indução anestésica foi feita mediante injeção intramuscular de uma mistura de Ketalar (cloridrato de cetamina – Parke Davis) e Rompum (cloridrato de xilidino-dihidro-tiazina – Parke Davis) em doses proporcionais ao peso de cada animal. Após a perda de consciência foi feita a tricotomia do membro a ser operado (figura 3) e a limpeza com solução anti-séptica Rifocina spray (rifamicina SV sal sódico – Hoechst Marion Roussel). Em seguida, o animal foi posicionado em decúbito ventral para o ato cirúrgico e, então, foram colocados campos cirúrgicos em volta da região a ser operada, garantindo a assepsia do local (figura 4).

FIGURA 3. Imagem da tíbia de coelho utilizado no procedimento cirúrgico; tricotomia.

Foi efetuada uma cirurgia na tíbia direita dos animais, através da qual foram provocadas duas perfurações, uma proximal e outra distal, distantes 1 cm uma da outra, na tuberosidade da tíbia, logo abaixo do tendão patelar (figura 4). Foi escolhida a tuberosidade da tíbia do coelho pelo fato dela ser de fácil acesso por não ter feixes musculares cobrindo-a e apresentar pequena irrigação sangüínea e pouca mobilidade.

FIGURA 4. Tíbia direita de coelho no momento da primeira incisão, a seta indica o tendão patelar antes da primeira incisão.

Para fazer as perfurações foi usado um modular modelo CIRUR VETER (M/G Ind. Médica Odontológica Ltda) acoplado a uma caneta odontológica, modelo Futura (Dent-Flex) com motor de alta rotação para cirurgias. Na caneta odontológica foi inserida uma broca de 1,5 mm de diâmetro. O modular possui um tanque reservatório para o uso de água ou soro fisiológico para a refrigeração da caneta, a qual pode ser esterilizada em estufa até 135° C. As principais características de funcionamento do Modular e da caneta com Motor de Alta Rotação Cirúrgico estão representadas na figura 5.

FIGURA 5. Características técnicas do Modular e do Motor de Alta Rotação Cirúrgico.

Dimensões do modular	100x150x200
Rpm máximo do motor	350.000
Pressão	0,28 N/mm ²
Reservatório	Inox 200 ml
Gabinete	Plástico
Pedal	Tipo bush-boton

Este equipamento permitiu a irrigação com soro fisiológico mantendo uma constante refrigeração no sítio cirúrgico. Foi também utilizada uma broca-serra para cortar o osso após o sacrifício.

Foi feita uma incisão retilínea na face anterior do joelho direito, sobre a tuberosidade da tíbia, de cerca de 3 cm. de extensão (figura 6 - A). O perióstio foi incisado longitudinalmente e mantido aderente ao tecido tendinoso adjacente, sendo, este bloco afastado a fim de expor a tuberosidade da tíbia. A perfuração foi realizada perpendicularmente ao eixo longitudinal da diáfise da tíbia. Durante todo o procedimento, o local de incisão foi limpo e umedecido com soro fisiológico, tomando os máximos cuidados com a limpeza e esterilização dos materiais em estufa e campo de trabalho. A cirurgia foi realizada sob condições assépticas convencionais.

Foi utilizada, como parâmetro anatômico para a realização da primeira perfuração, a porção distal da tuberosidade da tíbia direita de cada animal. A segunda perfuração foi realizada 1 cm acima da primeira, seguindo o sentido distal para proximal para assim, perfurar mais osso compacto do que esponjoso.

Cada perfuração teve aproximadamente 2 mm de diâmetro e o parâmetro para estabelecer o tamanho final de cada uma foi a broca, ou seja, quando a ponta da broca encaixava perfeitamente dentro da perfuração – tanto em diâmetro, quanto em profundidade – ela estava pronta. No início da realização das perfurações foi aplicada uma injeção local intramuscular de Citocaína 3% com Felipressina (cloridrato de prilocaína com felipressina – 0,03 UI/ml - Inovatec) (figura 6 - B, C). As perfurações foram lavadas com soro fisiológico.

Após a realização, as perfurações foram lavadas com soro fisiológico. As perfurações proximais foram preenchidas com a mistura do vidro bioativo com o sangue do próprio animal e as distais permaneceram vazias formando assim, o Grupo Controle. O perióstio foi reposicionado e a

aponeurose e a pele foram suturadas com fios de náilon 4-0 por pontos separados.

FIGURA 6. Detalhes da realização das perfurações; A) anestesia local durante o ato cirúrgico; B) seta indica local de perfuração preenchido com vidro; C) elipse indica perfuração distal.

Após o ato cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais dentro das melhores condições de higiene até a data do sacrifício com ração e água *ad libitum*. O sacrifício deu-se por meio de anestesia geral com Rompum (relaxante muscular) seguido de Ketalar (sedativo); estando o animal profundamente sedado, foi aplicado 1 ml de Zoletil 50 (Virbac) na cavidade cardíaca, monitorando o animal até o óbito.

4.2.3. Métodos de Avaliação

Os 24 coelhos foram divididos aleatoriamente em três grupos de 8 animais cada. Dessa maneira foi determinado o tempo de vida de cada animal desde o dia da cirurgia de implante até o sacrifício. O tempo de vida para cada grupo foi de 15, 30 e 45 dias respectivamente.

4.2.3.1. Radiografias

Foram tomadas radiografias das tíbias manipuladas logo após a colocação do material e também antes do sacrifício (figura 7). Para tanto foi utilizado um aparelho Dabi Atlante, modelo Spectro II, com o filme oclusal Kodak Ektaspeed Plus.

FIGURA 7. Posição de tomada das imagens radiográficas

4.2.3.2. Microscopia de Luz Comum

Após o sacrifício, a tíbia de cada animal foi desarticulada no joelho e tornozelo, sendo removidos, em seguida, os tecidos moles (figura 8). O osso foi então cortado num tamanho de cerca de 3 a 4 cm para colocação na solução fixadora. As amostras permaneceram 5 dias na solução fixadora e depois 30 dias na mistura de soluções desmineralizadoras, renovadas de 3 em 3 dias.

FIGURA 8. Tíbia esquerda de coelho, tracejado indica local de corte do osso para desmineralização.

Foi utilizado como fixador o formol de Lillie 10%, tamponado em pH 7.2, composto por: 100 ml de formol puro, 900 ml de H_2O deionizada, 6,5 g de Na_2HPO_4 e 4,0 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$. Como solução desmineralizadora foi utilizada a mistura (50 a 50%) das seguintes soluções em água destilada: ácido fórmico a 50% e nitrato de sódio a 20%.

Após a desmineralização as amostras de tecido ósseo foram submetidas aos processos de desidratação (pré diafanização), diafanização e, então, foram emblocados em parafina para a realização dos cortes das regiões lesadas a serem analisados, GOLDSTEIN (1994).

Foram confeccionados dois tipos de cortes longitudinais sendo um para a análise histológica por microscopia de luz comum (MLC) e, outro –

com maior espessura – para ser observado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), descrita no próximo item.

Para a análise por MLC foram feitos cortes seriados longitudinais de 7 µm de espessura que foram, posteriormente, desparafinizados com xilol, preparados para a hidratação em banhos em concentrações decrescentes de álcool, e hidratados em água destilada.

Prontos para o processo de coloração, uma parte dos cortes foi corada com hematoxilina e eosina (HE) e outra com tricômico de Masson, MICHALANY (1980). As colorações foram feitas alternadamente segundo a sequência dos cortes para posterior análise.

Os cortes foram analisados para a obtenção de um laudo histomorfopatológico. Buscaram-se assim, evidências de biocompatibilidade ou rejeição do material em relação ao osso e, por consequência, o caráter de interação do material utilizado com o hospedeiro.

Após a descrição do observado em cada lâmina, foram separadas e agrupadas todas as lâminas de cada coelho possibilitando a organização dos resultados. Estes dados foram submetidos a uma análise estatística, na qual foi aplicado o teste qui-quadrado para comparar a quantidade de vidro bioativo presente nas regiões osteotomizadas nos diferentes períodos de tempo de sacrifícios. Foram utilizados níveis de significância de 5%.

4.2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia Dispersiva de raios-X

Foram aplicadas também, as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia dispersiva de raios-X (EDX) aos cortes ósseos.

Um dos objetivos de uso do MEV é a análise de superfícies irregulares, como é a do osso, possibilitando uma análise qualitativa uma vez que uma análise quantitativa acurada de sua superfície é quase

impossível, pela dificuldade em padronizar as amostras biológicas. Pelo EDX é possível obter dados quantitativos, semiquantitativos e qualitativos a respeito dos elementos químicos presentes em pontos escolhidos na amostra analisada, GOLDSTEIN et al (1994).

Os cortes para a análise por MEV e EDX tiveram uma espessura que variou de 20µm a 22 µm e foram realizados após a fixação, desmineralização, desidratação explicadas no item anterior. Os cortes foram desparafinizados nas lâminas de vidro usando banhos de xilol, xilol e álcool absoluto, álcool 90°, álcool 70° e vários banhos de água destilada. Tal procedimento foi adotado para eliminar reagentes externos ao osso que pudessem colocar em dúvida os resultados destas análises. Os cortes foram então, secos em estufa a 57° C e colados sobre fita de carbono dupla face no suporte para análise por MEV e EDX.

Na análise de MEV foi usado o equipamento LEO modelo 440 e no EDX foi utilizado o equipamento OXFORD / MICROANALYSIS GROUP, modelo 7000060 com uma resolução de 133 eV.

Para a análise por MEV, algumas amostras foram metalizadas com carbono para melhorar a condutividade elétrica e outras foram mantidas sem metalização. As amostras inicialmente não metalizadas foram posteriormente cobertas com carbono para a realização do EDX.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados da caracterização do material

A composição do vidro bioativo modificado utilizado neste estudo (teor % m/m), obtida em análise química do material previamente preparado é apresentada na tabela 1. Na tabela 2 é apresentada a composição do “Bioglass 45S5”, HENCH (1998). A análise química mostrou a presença de uma maior quantidade do formador de rede P_2O_5 e, uma menor quantidade do modificador de rede CaO.

Tabela 1. Composição química do vidro bioativo utilizado (teor % m/m)

SiO_2	Na_2O	Cão	P_2O_5	C
45,9	23,9	21,6	7,54	0,15

Tabela 2. Composição química do “Bioglass 45S5” (peso %)

SiO_2	Na_2O	CaO	P_2O_5	C
45	24.5	24.5	6	—

5.1.1. Difração de raios X e análise térmica diferencial

Na análise de difração de raios-X apresentada na figura 9, o material apresentou espectro sem planos preferenciais de cristalização.

Houve apenas um halo indicando que o material não apresentou ordem a longa distância. Os vidros são materiais considerados amorfos e, portanto, com uma estrutura desordenada e sem planos preferenciais de cristalização. O espectro aqui apresentado coincidiu com os apresentados por KOKUBO (1990), HENCH (1993), WEN et al (1999) e LIN et al (2000) quando tratavam de vidros bioativos.

Na curva de DTA apresentada na Figura 10, foi verificada a presença da temperatura de transição vítrea (T_g) de 537°C e a temperatura de cristalização (T_c) de 799°C . SHACKELFORD (1996) indica o T_g como sendo uma das principais características dos materiais vítreos, acima da qual o vidro torna-se um líquido super resfriado e abaixo da qual, torna-se um sólido rígido (um vidro verdadeiro).

FIGURA 9. Curva de Difração de Raio X do vidro bioativo utilizado, não há presença de picos de cristalização.

FIGURA 10. Curva da Análise Térmica Diferencial do material utilizado

Somados os resultados obtidos pelos ensaios de DRX e DTA, foi permitido afirmar que o material aqui utilizado é amorfo e apresenta temperatura de transição vítrea, ou seja, é um vidro e não tem presença de fases cerâmicas, PADILHA & AMBRÓZIO (1985).

5.1.2. Resultados do MEV

A figura 11 apresenta a imagem de MEV mostrando o aspecto geral do vidro utilizado neste trabalho. Nela foi possível observar o aspecto irregular tanto na forma quanto no tamanho das partículas. Esta imagem foi utilizada na obtenção do tamanho médio das partículas do vidro, cujo resultado encontra-se na tabela 3.

FIGURA 11. MEV do vidro utilizado, setas indicam algumas partículas de vidro.

Tabela 3. Caracterização da amostra observada para um padrão de partículas utilizadas

Número de partículas	Mínimo (mm ²)	Mediana (mm ²)	Máximo (mm ²)
10	12,35	26,06	177,74

5.1.3. Resultados da avaliação do potencial de Citotoxicidade *in vitro*

O resultado da avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro* encontra-se na tabela 4. Nela foi evidenciado que a amostra não apresentou

efeito citotóxico para a linhagem celular estudada, ou seja, as células permaneceram viáveis mesmo na presença do vidro bioativo.

Tabela 4. Resultado da avaliação de citotoxicidade

AMOSTRA	RESULTADOS OBTIDOS NA LEITURA DAS PLACAS DE CULTURAS CELULARES											
	Nº 1			Nº 2			Nº 3			Nº 4		
	IZ	IL	IR	IZ	IL	IR	IZ	IL	IR	IZ	IL	IR
Controle Negativo	0	0	0/0	0	0	0/0	0	0	0/0	0	0	0/0
Controle Positivo	4	3	4/3	4	3	4/3	4	3	4/3	4	3	4/3
BIOVIDRO	0	0	0/0	0	0	0/0	0	0	0/0	0	0	0/0

Segundo PIZZOFERRATO et al (1995), a avaliação da citotoxicidade de um material deveria ser sempre um dos primeiros testes a ser realizado pelos estudiosos que tentam colocar novos biomateriais no mercado. Isto, por fornecer dados sobre a viabilidade e a morfologia das células que são avaliadas, o que permite verificar anormalidades nas células devido à presença do material. O uso de culturas celulares de mamíferos é importante uma vez que tais culturas são extremamente sensíveis a agentes tóxicos evidenciando com dados quantitativos o que ocorre com cada célula na placa de Petri.

5.2. Procedimentos cirúrgicos

Na primeira fase de cirurgias todos os cortes histológicos foram analisados e foi observada, juntamente com tecido ósseo, alta presença de tecido de dentro do canal medular. Isto ocorreu devido ao fato das perfurações terem sido feitas rompendo o endóstio e perfurando o canal medular. As radiografias foram analisadas e percebeu-se crescimento ósseo após o preenchimento com o vidro bioativo.

Após a realização destas primeiras cirurgias piloto e novas consultas à literatura disponível, foi decidida a mudança do sítio das perfurações que passou a ser a tuberosidade da tíbia logo abaixo ao tendão patelar. Optou-se por não mais ultrapassar o canal medular ao realizar as perfurações, e assim, retirar a influência do tecido medular no crescimento ou no não crescimento ósseo.

Na segunda fase de cirurgias tanto os resultados histológicos quanto os macroscópicos foram satisfatórios em termos de clareza na avaliação do crescimento ósseo.

Estas duas últimas cirurgias piloto foram importantes para estabelecer os padrões seguidos durante a etapa de cirurgias e de preparo de lâminas histológicas.

Nesse ponto cabe destacar um problema detectado no estudo piloto que apareceu ao fazer os primeiros cortes histológicos das cirurgias na primeira fase. A navalha do micrótomo utilizado ficou altamente “denteada” em toda a sua extensão devido, provavelmente, à rigidez do material cortado. Esta rigidez seria explicada não pela falta de desmineralização do osso mas, pela rigidez das partículas de vidro presentes nas peças ósseas. Nos cortes nos quais foi usado sangue como veículo não houve esta dificuldade. Este fato somado ao do ágar-ágar ser um polissacarídeo retirado das algas (isto é, uma substância orgânica) e ao do sulfato de cálcio ser reabsorvido rapidamente pelo organismo, SMITH (1982) ajudou a descartar os outros dois veículos testados.

O uso do sangue como veículo para a colocação do vidro bioativo foi tido como a melhor opção, mesmo não encontrando outros exemplos desta metodologia na literatura. Decidiu-se por esta opção uma vez que ao analisar as lâminas histológicas não houve presença de hemáceas ou outros componentes sanguíneos presos no osso novo. O outro fator determinante foi a menor dificuldade encontrada para realizar os cortes propriamente ditos já que com os outros veículos houve grande dificuldade para manter a navalha do micrótomo afiada, o que por sua vez provocou rugosidades nos cortes, inviabilizando-os.

5.3. Procedimento cirúrgico final

O coelho foi escolhido como animal de experimentação neste trabalho devido ao fato de ele ser usado em muitos estudos apresentados na literatura que trata de biomateriais, principalmente quando o objeto de estudo é o osso, FUJITA et al (1998), WHEELER et al (1997); MARCOLONGO et al (1998); SATO et al (1998); NEO et al (1998).

A anatomia da tíbia apresenta aspectos importantes que facilitam a aplicação do material usado no presente estudo. O fácil acesso à tuberosidade da tíbia devido à pouca vascularização e inervação, e ausência de feixes musculares permitiu que o procedimento cirúrgico fosse rápido e não provocasse maiores perdas aos coelhos.

Nenhum animal apresentou infecção no pós-operatório e não houve óbito de animais antes do tempo pré-determinado.

Optou-se por fazer as perfurações na mesma tíbia para promover a igualdade de condições fisiopatológicas tanto da perfuração controle quanto da perfuração preenchida com o vidro. Assim, foi possível obter os seguintes critérios de comparação: perfurações de um mesmo animal; perfurações de diferentes animais num mesmo tempo; e perfurações de diferentes animais em tempos distintos, sempre considerando as perfurações cheias com material e as vazias.

A escolha do equipamento para fazer as perfurações proporcionou dois aspectos positivos relacionados a irrigação: prevenção da necrose óssea e a limpeza do pó de osso que se acumula na periferia do local em que são feitas as perfurações, MALLUCHE & FAUGERE (1996).

5.3.1. Radiografias

A análise da evolução das perfurações pelas radiografias de todos os coelhos estudados mostrou não haver grandes diferenças entre as perfurações controle e as preenchidas com o vidro bioativo.

Imagens radiológicas obtidas durante este trabalho são mostradas nas figuras 12 e 13. Elas estão apresentadas aos pares, sendo a primeira, tomada no dia do implante do material e a segunda no dia do sacrifício.

A figura 12 mostra a tíbia direita de um coelho sacrificado aos 15 dias do implante. Neste intervalo de tempo foram observadas as maiores diferenças na ossificação quando se compara a perfuração com vidro bioativo e a controle. Na imagem radiológica a) foram observadas as perfurações no dia do implante. Na imagem radiológica b) foi indicada uma absorção do calo ósseo da perfuração preenchida com vidro (seta superior). Este fato se repetiu em todas as radiografias neste tempo de cirurgia. A seta inferior indica a presença do calo ósseo (região mais esbranquiçada), ainda em processo de absorção.

FIGURA 12. Radiografias de coelho sacrificado aos 15 dias após o implante. a) setas indicam perfurações no dia do implante; b) locais das perfurações imperceptíveis no dia do sacrifício.

Para o tempo de sacrifício de 30 dias as imagens observadas foram de ossificação em ambas as perfurações de cada tíbia. Estas imagens não serão aqui mostradas por serem muito parecidas com as imagens de 45 dias.

As imagens obtidas dos animais sacrificados aos 45 dias mostraram o aspecto de um osso normal, ou seja, as perfurações estavam inteiramente recuperadas.

A figura 12 é de coelho sacrificado aos 45 dias após o implante. A imagem observada nestes casos para as duas perfurações foi a mesma, indicando um processo de ossificação completado para ambas as perfurações.

FIGURA 13. Radiografias de coelho sacrificado aos 45 dias após o implante. a) dia da cirurgia; b) aspecto de osso normal no dia do sacrifício

5.3.2. Microscopia de luz comum

5.3.2.1. Perfurações não preenchidas com o material

Nos cortes histológicos de osso de coelhos sacrificados aos 15, 30 e 45 dias da cirurgia de realização das perfurações corados com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM), foi observado um processo seqüenciado de reparo/restauração do tecido ósseo. Este reparo foi caracterizado por tecido neoformado (tecido ósseo imaturo) com presença de matriz óssea organizada, lamelas ósseas em abundância e uma população significativa de osteócitos.

Considerando o conjunto de lâminas histológicas dos coelhos usados como controle, foi verificado um processo normal de ossificação

após lesão. Nele, foi possível observar alguns eventos do reparo ósseo como uma proliferação angioblástica que consiste no nascimento de novos vasos sanguíneos, a diferenciação de osteoblastos em osteócitos e, uma formação gradativa de novas lamelas ósseas.

Nas lâminas de coelhos sacrificados aos 15 dias foram verificadas a proliferação angioblástica e o início da diferenciação das células ósseas. Estes eventos são mostrados na figura 14. Nessa imagem o início da formação de lamelas é evidenciado apresentando muitos osteoblastos na periferia e alguns osteócitos dentro das lacunas. O tecido ósseo neoformado apresentou neste tempo o início da formação de vários espaços medulares com formas e tamanhos variáveis.

FIGURA 14. Fotomicrografia de tecido ósseo de tibia de coelho controle sacrificado aos 15 dias da perfuração. A) região com osteócitos; B) região com osteoblastos; setas amarelas indicam locais de angiogênese; organização inicial de lamelas de osso imaturo (MLC, HE, corte longitudinal, 160 x)

Nas lâminas histológicas de coelhos controles sacrificados aos 30 dias, foram vistas lamelas ósseas imaturas (delgadas), com tamanhos diferentes e contendo vários espaços medulares (figura 15-A). Foi possível ver estruturas como um canal de Volkmann (figura 15-B) e pontos bem vascularizados indicando que o processo de crescimento e organização ósseo ocorreu normalmente como ilustrado por ELISÉIEV *et al* (1987).

FIGURA 15. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 30 dias da perfuração. A-1) tecido ósseo neo-formado; A-2) tecido ósseo antigo; seta azul indica espaço medular e a amarela tecido ósseo neofomado rico em porção celular (MLC, HE, corte longitudinal, 80 x); B). espaço do canal de Volkmann (MLC, TM, corte longitudinal, 160 x)

Aos 45 dias foi verificado nas lâminas que osso primário (com mais células) estava sendo gradativamente transformado em osso secundário (mais mineralizado) como apresentado na figura 16. O tecido era bem irrigado por capilares sanguíneos e quatro das oito perfurações controles foram imperceptíveis, isto é, nelas não foi possível identificar o tecido perfurado do não perfurado. Nas outras quatro perfurações, foi verificada a presença de tecido osteóide, ou seja, tecido ósseo anterior ao tecido completamente calcificado.

FIGURA 16. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias da perfuração. A) tecido ósseo neoformado; B) região rica em osteoblastos; seta amarela indica espaço medular (MLC, HE, corte longitudinal, 160 x)

5.3.2.2. Perfurações preenchidas com o material

Considerando o fato do sangue ser usado como veículo para a introdução do vidro, é necessário afirmar que não foi percebida nenhuma reação do tecido hospedeiro ao meio escolhido. Aos 15 dias não foi mais possível perceber a presença do sangue coagulado, o qual foi totalmente reabsorvido pelo tecido, não restando resquícios de coágulos.

Em todos os tempos de permanência do material dentro do hospedeiro foi observado um processo de reparo de tecido ósseo avançado comparado ao grupo controle. Isto pode ser exemplificado pela presença de osteoblastos e maior quantidade de osteócitos logo aos 15 dias do implante. Aos 45 dias uma das oito perfurações preenchidas com vidro não foi

encontrada durante o exame das lâminas histológicas. Estes e outros eventos serão discutidos a seguir.

Aos 15 dias do implante o quadro histológico foi muito parecido com o das perfurações controle, ou seja, lamelas neoformadas com abundância de osteoblastos e osteócitos. A principal diferença esteve na quantidade de osteócitos já diferenciados que foi maior nas perfurações preenchidas do que nas controles (figuras 17, 18 e 18).

FIGURA 17. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 15 dias da perfuração. A) aumento 40 x, dentro da circunferência, região do implante, fora da circunferência: tecido ósseo maduro; B) aumento 80 x, osso maduro; setas mostram partículas de vidro (MLC, HE, corte longitudinal)

FIGURA 18. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 15 dias da perfuração; setas amarelas: espaços medulares; setas azuis: vidro, setas verdes: vaso sanguíneo (MLC, HE, corte longitudinal, 160 x)

FIGURA 19. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 15 dias da perfuração; grande quantidade de osteoblastos ao redor do vidro (MLC, HE, corte longitudinal, 320 x)

Aos 30 dias foram vistas perfurações preenchidas com tecido ósseo neoformado. A boa irrigação é repetida neste tempo e começa a ser visualizado o recobrimento das partículas vítreas por tecido ósseo (figuras 20 e 21).

FIGURA 20. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 30 dias da perfuração; setas amarelas mostram organização do tecido neoformado; setas pretas indicam partículas de vidro; setas azuis indicam capilares; A) coloração TM; B) coloração HE (MLC, corte longitudinal, 160 x)

FIGURA 21. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 30 dias da perfuração; setas amarelas mostram organização do tecido neoformado; setas pretas indicam partículas de vidro; setas azuis indicam capilares (MLC, corte longitudinal, 320 x)

As lâminas histológicas de coelhos sacrificados aos 45 dias do implante indicaram um total fechamento das perfurações preenchidas com vidro, assim como as controle, havendo um maior preenchimento por tecido osteóide em crescente organização (figuras 22 a 25).

A quantidade de osteócitos visualizada nos cortes diminuiu indicando uma maior mineralização do novo osso. A boa irrigação sanguínea observada nos tempos anteriores foi repetida (figura 23). A quantia de vidro bioativo vista nos cortes também diminuiu. Em quatro dos oito animais sacrificados a este tempo não foram encontrados resquícios do vidro bioativo em nenhum dos cortes das lâminas da perfuração preenchida com o mesmo (figura 24).

FIGURA 22. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias do implante; setas amarelas mostram organização do tecido neoformado; setas pretas indicam partículas de vidro; setas azuis indicam capilares sanguíneos (MLC, corte longitudinal, 80 x)

FIGURA 23. Fotomicrografias de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias do implante; setas amarelas indicam organização do tecido neoformado; setas pretas indicam partículas de vidro rodeadas e cobertas por tecido osteóide; setas azuis indicam capilares sanguíneos (MLC, HE, corte longitudinal, 160 x)

FIGURA 24. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias do implante; setas amarelas indicam organização do tecido neoformado; setas pretas indicam espaços medulares; setas azuis indicam capilares sanguíneos (MLC, HE, corte longitudinal, 160 x)

FIGURA 25. Fotomicrografia de tecido ósseo de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias do implante; seta amarela indica organização do tecido neoformado; seta verde indica espaço medular; setas azuis indicam capilares sanguíneos (MLC, HE, corte longitudinal, 320 x)

A análise estatística foi realizada a partir dos resultados das observações das lâminas histológicas. Na tabela 5 foi relacionada a quantidade de vidro bioativo presente nos cortes com o tempo de vida dos animais do dia da cirurgia para realização das perfurações até os dias dos sacrifícios. Nela foram agrupados os dados relacionados à quantidade de vidro bioativo observados em todos os cortes histológicos de cada animal estudado. Foi usada uma análise subjetiva com o objetivo de tornar o resultado quantitativo. Para tanto, a quantidade de vidro nos cortes foi dividida em quatro categorias: 0) não presença de vidro; 1) baixa presença de vidro; 2) média presença de vidro; 3) alta presença de vidro. Este critério visual foi obtido por meio de comparação de todos os cortes.

Tabela 5. Quantidade de vidro bioativo presente nos cortes por tempo até o sacrifício; 0) não presença de vidro; 1) baixa presença de vidro; 2) média presença de vidro; 3) alta presença de vidro

Quantidade de vidro	Tempo de vida do implante até o sacrifício (dias)		
	15	30	45
0	0	0	4
1	0	1	1
2	3	4	1
3	5	2	2

O teste qui-quadrado foi aplicado para os valores da tabela 6 e identificou-se uma associação estatisticamente significativa no sentido de que quanto maior o tempo de sacrifício, menor a quantidade de vidro ($p = 0,003676$) quando relacionados os grupos de 15 e 45 dias, ou seja, no grupo de 15 dias houve maior quantidade de vidro que no de 45 dias. Quando relacionados os grupos de 30 e 45 dias houve diferença significativa ($p = 0,004642$) indicando maior quantidade de vidro bioativo nos cortes de animais de trinta dias.

Estes resultados indicam a seguinte tendência: esta diminuição estaria relacionada com a “cobertura” do vidro bioativo pelo novo osso em crescimento. Este fato acentua a hipótese de que o material estaria funcionando como um osteocondutor, GLOWACKI & SPECTOR (1990).

A presença ou não presença de tecido osteóide nos diferentes tempos de sacrifício também foi analisada, uma vez que este tipo de tecido indica o preenchimento da região com novo osso. Os resultados desta análise estão representados na figura 26 na qual também é relacionada a quantidade de vidro nas perfurações.

Nesta figura, são evidenciados alguns aspectos importantes verificados neste trabalho. Um deles é a tendência, sem diferenças

estatísticas significativas, no sentido de que com o passar do tempo aumenta a presença de tecido osteóide nos cortes ósseos das lâminas observadas; aos 15 dias não há presença de tecido osteóide e aos 45 dias todas as lâminas tinham esse tecido em seus cortes. Outra relação que pode ser feita é a da quantidade de vidro bioativo presente nos cortes com a presença ou não de tecido osteóide. A quantidade de vidro diminui à medida que aumenta o predomínio de tecido osteóide.

FIGURA 26. Presença (sim) ou não de tecido osteóide e quantidade de vidro nas perfurações em tíbias de coelhos nos diferentes períodos de tempo de sacrifício

5.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura e EDX

O cuidado no preparo das amostras a serem analisadas por MEV e EDX é importante quando considerado que de um lado há um instrumento que irradia um feixe de elétrons e do outro um organismo ou tecido biológico. As amostras biológicas, são comumente moles, úmidas, tridimensionais, apresentam baixa condutividade elétrica e são muito sensíveis à radiação, GOLDSTEIN et al (1994).

Este conjunto de características faz com que haja grande preocupação no sentido de transformar uma amostra úmida e/ou orgânica em uma amostra seca que preserve sua tridimensionalidade e composição química permitindo analisá-la e examiná-la no vácuo do microscópio. Esta conversão pode ser separada em três fases distintas: fixação, desidratação e cobertura (metalização), GOLDSTEIN et al (1994).

Sendo o osso um material biológico, procurou-se seguir os passos citados na literatura em relação aos procedimentos de fixação e desidratação comuns ao preparo de materiais orgânicos hidratados para análise em microscopia de luz, MICHALANY (1980).

Estas técnicas pareceram-nos adequadas uma vez que permitiram a visualização da organização do trabeculado ósseo e de estruturas como células sangüíneas (figuras 27 a 38).

Em relação à metalização (terceira fase do preparo da amostra), foram utilizadas para o MEV amostras metalizadas e não metalizadas uma vez que o ruído que apareceu nestas últimas não dificultou a visualização das estruturas de interesse.

Já para a realização do EDX, foram utilizadas as amostras metalizadas no intuito de diminuir o ruído e melhorar a visualização dos pontos marcados no mapeamento da amostra para verificação dos elementos químicos presentes, em especial o silício (principal componente do vidro bioativo implantado).

A espessura de corte utilizada (20 – 22 μm) foi eleita na tentativa de localizar, aprisionadas no meio do corte, partículas do vidro implantado. Tal espessura pareceu adequada pois foi observada grande quantidade de vidro nos cortes, especialmente nos de coelhos sacrificados aos 15 dias do implante (figuras 27 a29).

Das imagens de microscopia eletrônica de varredura realizadas sem a metalização da amostra, destacamos as apresentadas nas figuras de 27 a 37. Nelas é possível observar a presença de trabéculas ósseas com incorporação do material.

FIGURA 27. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 15 dias do implante; elipse indica região de perfuração com lamelas em início de organização com presença de vidro (100x)

FIGURA 28. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 15 dias do implante; setas indicam partículas de vidro bioativo no tecido ósseo em formação (500x)

FIGURA 29. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 15 dias do implante; setas indicam partículas de vidro bioativo no tecido ósseo em formação (1000x)

FIGURA 30. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante; elipse indica região de perfuração com lamelas em formação (100x)

FIGURA 31. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante; setas indicam partículas de vidro (500x)

FIGURA 32. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante; região central: capilar com grande quantidade de hemácias (tecido bem irrigado) (1000x).

FIGURA 33. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante; canal de Volkmann (2000x).

FIGURA 34. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante; elipse indica região de implante (100x).

FIGURA 35. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante; região central indica capilar com grande quantidade de hemácias (região bem irrigada) (500x).

FIGURA 36. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante; detalhe de hemácias (5000x).

FIGURA 37. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante; canal de Volkmann (2000x).

Para as análises por EDX foram utilizadas amostras não metalizadas e metalizadas com carbono das quais foram obtidas as imagens representadas nas figuras 38, 40 e 42.

Devido aos componentes do vidro serem também componentes do osso, excetuando-se o silício, somente as quantidades deste último serão consideradas.

A figura 38 mostra um corte de osso metalizado de coelho sacrificado aos 30 dias do implante. Nessa imagem estão marcados cinco pontos escolhidos para a realização das análises químicas por EDX. Os resultados desta análise em cada ponto são apresentados na figura 39 (1 a 5). Neste tempo foi caracterizada a presença de silício no corte nas seguintes quantidades em porcentagem por ponto: 1) 37.99; 2) 25.40; 3) 11.69; 4) 1.06 e 5) 16.20.

FIGURA 38. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 30 dias do implante, pontos para realização de EDX (500x)

FIGURA 39. EDX dos cinco pontos da figura 38; quantidades de silício em porcentagem nos respectivos pontos: 1) 37,99; 2) 25,40; 3) 11,69; 4) 1,06* e 5) 16,20.

Na figura 40 é apresentada a imagem de amostra não metalizada de osso de coelho sacrificado após 45 dias do implante. Nela, foram marcados quatro pontos para a análise por EDX. Na figura 41 são mostrados os resultados desta avaliação nos quatro pontos. Nela foi possível perceber que nos pontos 2 e 4 não foi encontrado o elemento silício. Já nos pontos 1 e 3 houve presença de silício.

FIGURA 40. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante (100x)

FIGURA 41. EDX dos pontos 1, 2, 3 e 4 da figura 40. Os pontos 1 e 3 indicam a presença de silício; os pontos 2 e 4 não apresentam silício em sua composição.

Na figura 42 é apresentada uma imagem de amostra do local de implante em tuberosidade de tíbia de coelho sacrificado aos 45 dias do implante. Nela foram marcados 5 pontos para a realização do EDX. A figura 43 indica as quantidades de silício nos pontos, nela é possível perceber que mesmo havendo silício em todos os pontos, a quantidade dele é menor quando comparada às quantidades verificadas na amostra de 30 dias.

FIGURA 42. Microscopia eletrônica de varredura de animal sacrificado aos 45 dias do implante (500x). Os pontos de 1 a 5 foram escolhidos para a realização do EDX

FIGURA 43. EDX dos cinco pontos da figura 42. Em todos os pontos houve a presença de silício; quantidade de silício nos pontos em porcentagem: a) 0.61, b) 4.22 , c) 2.55 , d) 4.31 , e) 3.84.

Na tabela 6 são evidenciadas as quantidades, em porcentagem, de silício nos pontos das amostras presentes nas figuras 38 e 42 analisadas por EDX.

Tabela 6. Quantidade de silício presente nas amostras segundo o tempo de sacrifício do coelho a partir do implante do vidro bioativo (%)

30 dias	37,99	25,40	11,69	1, 06	16,20
45 dias	0,61	4,22	2,55	4,31	3,84

O resultado obtido dentro do tempo de sacrifício de 15 dias (início da formação de lamelas ósseas e abundância de osteócitos e osteoblastos) é positivo quando comparado ao de SATO *et al* (1998) que aplicaram hidroxiapatita misturada ao sulfato de cálcio (gesso) em tíbias de coelhas e ao final de duas semanas após a injeção do material não obtiveram crescimento ósseo. Estes pesquisadores verificaram o início do crescimento ósseo em 66% dos coelhos após quatro semanas do implante. Este crescimento foi caracterizado por pontes de ligação entre a hidroxiapatita e o osso cortical, fato que ocorreu aos 15 dias neste estudo com o vidro bioativo modificado. O sulfato de cálcio foi utilizado nesse estudo apenas como um veículo facilitador da colocação da hidroxiapatita no osso. O crescimento de novo osso foi observado em todos os coelhos somente oito semanas após o implante. Nesse estudo é citado que o tempo de permanência do sulfato de cálcio no osso é de 4,7 semanas. Considerando o fato do sulfato de cálcio ser apenas o veículo para o implante – como foi para nós o sangue do próprio animal – pode-se afirmar que nossos resultados foram favoráveis pois após duas semanas do implante não havia mais indícios de sangue coagulado nas regiões de implante.

TURUNEN *et al* (1995), num estudo comparando o efeito de um vidro bioativo com um polímero não reabsorvível (o PTFE) verificaram uma

maior quantidade de formação óssea em perfurações em coelhos preenchidas com vidro. A maior parte das partículas de vidro bioativo estava completamente coberta por osso novo. Uma maior quantidade de formação de novo osso nas perfurações corticais cobertas com o periósteo foi encontrada no grupo em que foi aplicado o vidro bioativo. Estes autores explicaram a ligação do osso com o biovidro como sendo baseada na formação da camada de fosfato de cálcio no vidro quando este é exposto ao fluido corpóreo. Estes autores afirmam que devido às propriedades osteocondutoras do vidro bioativo, foi encontrado mais osso no grupo em que foi aplicado o biovidro do que no grupo controle que permaneceu vazio. Os resultados de TURUNEN *et al* (1995) coincidem com os aqui encontrados e, portanto, reforçam a hipótese de que o biovidro age como um biomaterial osteocondutor capaz de facilitar o crescimento ósseo.

WHEELER *et al* (1998), comparando o efeito do tamanho de partículas na regeneração óssea em lesões no osso esponjoso, obtiveram maior ossificação nos casos em que foi usado um tamanho de partículas que variou de 90 a 710 μm do que naqueles em que foi usado um tamanho mais uniforme, que variou entre 300 e 360 μm . No trabalho aqui apresentado, utilizou-se uma grande variação no tamanho de partículas e assim, os resultados obtidos corroboram os de Wheeler.

KAWAI *et al* (1997) estudando o crescimento ósseo com a aplicação de hidroxiapatita, afirmam a importância das forças mecânicas durante os processos osteogênicos. Num estudo *in vitro*, eles encontraram uma maior fixação de células ósseas em tubos de ensaio que, ao invés de permanecerem estáticos, eram rodados uma vez por dia. A hipótese defendida por eles é a de que com a aplicação de forças mecânicas o tecido em formação se movimenta e libera espaços para o crescimento do osso novo. Nesse estudo é citada também a relação, ainda em estudos, entre os esforços mecânicos nas células osteogênicas que podem afetar os processos de diferenciação como a mineralização e os fatores de crescimento ósseo.

Neste estudo, os coelhos foram mantidos livres para a movimentação dos membros operados, no intuito de manter a aplicação de forças normais, as quais seriam as mesmas que agiriam se os animais não tivessem sido osteotomizados. É necessário considerar que uma vez que as partículas de vidro bioativo são incorporadas ao osso, elas passam a receber as mesmas forças recebidas pelo osso.

No trabalho de OONISHI *et al* (1997) foram comparadas às funções da hidroxiapatita e do biovidro como implantes ósseos em fêmures de coelhos. Grandes estudiosos de vidros e cerâmicas estudaram a interação implante-hospedeiro em diferentes tempos. Em uma semana após o implante em coelhos implantados com biovidro, houve presença de novo osso com arquitetura trabecular partículas de vidro incorporadas em sua estrutura. Houve uma proliferação óssea muito mais rápida onde fora implantado o vidro do que onde havia hidroxiapatita. Nesse estudo é concluído que uma vantagem do biovidro em relação a hidroxiapatita é que ele é incorporado no osso em crescimento como sendo um componente que seria usado pelo novo osso. As partículas de vidro seriam encontradas no osso neoformado até 8 ou 12 semanas após o implante e, passado esse tempo, elas desapareceriam. O tecido reparado formado seria osso e não um compósito de um osso reforçado com um material como ocorre com os grãos de hidroxiapatita.

Estes resultados corroboram os aqui obtidos uma vez que se observou a tendência da grande diminuição ou mesmo o desaparecimento das partículas de vidro bioativo no osso.

Esta tendência foi observada por meio das técnicas de análise por Microscopia de Luz Comum, Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia Dispersiva por Raios X. Todas estas técnicas foram utilizadas no trabalho de OONISHI *et al* (1997) e, embora tais pesquisadores tenham utilizado um diferente preparo de amostras, os resultados se confirmam. Os resultados da análise estatística que aqui foram apresentados, ressaltam a propriedade do vidro bioativo ser um material osteocondutor como definido por GLOWACKI & SPECTOR (1990),

superando, assim, as expectativas iniciais que pretendiam um material biocompatível para preenchimento ósseo.

No entanto, é preciso sempre considerar que mesmo com os resultados obtido nos coelhos em que foi aplicado o vidro bioativo, a taxa de proliferação óssea depende da espécie, do local do implante e do tamanho das partículas.

7. CONCLUSÕES

- Pela caracterização do material verificou-se que o material utilizado não apresenta fases cristalinas sendo, portanto, um vidro.
- O material não se mostrou citotóxico quando testado *in vitro*.
- Análises dos achados radiológicos e histológicos indicam que o material utilizado é biocompatível, não sofrendo rejeição do tecido hospedeiro (tíbia de coelhos).
- O vidro apresentou características de material de enchimento uma vez que constatamos sua presença no tecido hospedeiro.
- O vidro apresentou características de material osteocondutor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOSCHI, A.O., (1996), O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? In: Seminário Regional de Biomateriais 1, Santa Catarina (1996) *Anais*. Santa Catarina, UDESC. p.4-16.
- BRINK, M; TURUNEN, T; HAPPONEN, R-P; YLIURPO, A (1997) Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system $\text{Na}_2\text{O}-\text{K}_2\text{O}-\text{MgO}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 37, n. 1, p.114-121, Oct.
- CONSENSUS CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS, Chester, 1986; *Proceedings*. Amsterdam, D F WILLIAMS. Elsevier, 1987.
- COTRAN, R S; KUMAR, V; ROBBINS, S L. (1994) *Robbins, patologia estrutural e funcional*. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- D'ALESSIO L, TEGHIL R, ZACCAGNINO M, et al. (1999) Pulsed laser ablation and deposition of bioactive glass as coating material for biomedical applications. *Applied Surface Science*, v.139, p.527-532, Jan.
- DEE, K.C.; RUEGER, D.C.; ANDERSEN, T.T.; BIZIOS R. (1996) Conditions wich promote mineralization at the bone-implant interface: a model in vitro study. *Biomaterials*, v.17, n.2, p.209-15, Jan.
- ELISÉIEV, V. G., AFANÁSIEV, Y. I., KOTOVSKI, E. F. (1987). *Atlas de la estructura microscópica y ultramicroscópica de las células, tejidos y órganos*, 2.ed., Moscú, editorial Mir.
- FUJITA, H.; NAKAMURA, T.; TAMURA, J.; KOBAYASHI, M.; KATSURA, Y.; KOKUBO, T.; KIKUTANI, T. (1998) Bioactive bone cement: Effect of the

- amount of glass-ceramic powder on bone-bonding strength. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.40, n.1, p.145-152, Apr.
- GATTI, A M; VALDRÈ, G; TOMBESI, (1996) A. Importance of microanalysis in understanding mechanism of transformation in active glassy biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.31, n.4, p.475-80, Aug.
- GINESTE L, GINESTE M, RANZ X, et al, (1999). Degradation of hydroxylapatite, fluorapatite, and fluorhydroxyapatite coatings of dental implants in dogs. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.48, n.3, p.224-234 JUN.
- GLOWACKI, J.; SPECTOR, M, (1990). Tissue responses to bone-derived and synthetic materials. In: DAVIES, J. E.(1990) *The bone-biomaterial interface*, United States, Univesity of Toronto Press.
- GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; ECHILIN, P.; JOY, D. C.; ROMIG, A. D. Jr.; LYMAN, C. E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. (1994) *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis – a text for biologists, materials scientists, and geologists*, Cap. 12-13, 2.ed., United States of America Plenum Press.
- GREENLEE, T K; JR, M D; BECKHAM, A R; CREBO, A R; MALMBORG, J C. (1971) Glass-ceramic bone implants, a light microscopic study. In: *An investigation of Bonding mechanisms at the interface of a prosthetic material*, University of Florida, p.26-35.
- GUYTON, A C. (1988) *Fisiologia humana*. 6.ed., p.489, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- HALL, B K. (1990) *Bone, volume 1: The osteoblast and osteocyte*. The Telford Press.
- HEIKKILÄ, J T; AHO, A J; KANGASNIEMI, I; YLFURPO, A. (1996) Polymethylmethacrylate composites: disturbed bone formation at the surface of bioactive glass and hydroxyapatite. *Biomaterials*, v.17, n.18, p.1755-60, Sep.
- HENCH, L L,. (1998) Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, v.81, n.7, p.1705-28.

- HENCH, L L; PASCHALL, H A; ALLEN, W C; PIOTROWSKI. (1972). *An investigation of Bonding mechanisms at the interface of a prosthetic material*, p.54-96, p.109-110, p.137-153, University of Florida.
- HENCH, L L; PASCHALL, H A; ALLEN, W C; PIOTROWSKI. (1973). *An investigation of Bonding mechanisms at the interface of a prosthetic material*, p.21-44, p.52-83, University of Florida.
- HENCH, L L; PASCHALL, H A; ALLEN, W C; PIOTROWSKI. (1974). *An investigation of Bonding mechanisms at the interface of a prosthetic material*, p.24-29, p.97-117 University of Florida.
- HENCH, L L; PASCHALL, H A; ALLEN, W C; PIOTROWSKI. (1975). *An investigation of Bonding mechanisms at the interface of a prosthetic material*, p.26-47, University of Florida.
- HENCH, L. L. (1993) Characterization of Bioceramics. In: HENCH, L. L., WILSON, J. (1993). *An introduction to biocerâmicas*, Singapore, World Scientific.
- HENCH, L L; ETHRIDGE, E C. (1982) *Biomaterials: an interfacial approach*. United States, Academic Press.
- HEYS, R J; HEYS, D R; COX, C F; AVERY, J K. (1982). Experimental observations on the biocompatibility of composite resins. In: *Biocompatibility of dental materials*. V.3, p.131-150, Florida, CRC Press, Inc.
- JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. (1990). *Histologia Básica*. 7.ed., Rio de Janeiro, Guanabara.
- KAWAI, N; NIWA, S; SATO, M; SATO, Y; SUWA,Y; ICHIARA, I. (1997) Bone formation by cells from femurs cultured among three-dimensionally arranged hydroxyapatite granules. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.37, n.1, p.1-8, Oct.
- KOBAYASHI M.; NAKAMURA T.; TAMURA J.; KIKUTANI T.; NISHIGUCH S.; MOUSA W.F.; TAKAHASHI M.; KOKUBO T. (1999) Osteoconductivity and bone-bonding strength of high- and low-viscous bioactive bone cements. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.48, n.3, p.265-76.

- KOKUBO, T. (1990). Surface chemistry of Bioactive glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.120, p.138-51.
- LIN, C-P; LIN, F-H; TSENG Y-C; KOK, S-H; LAN W-H; LIAO J-D (2000) Treatment of tooth fracture by medium energy CO₂ laser and DP-bioactive glass paste: compositional, structural, and phase changes of DP-bioglass paste after irradiation by CO₂ laser, *Biomaterials*, v.21, n.6, p.637-643, Mar.
- MALLUCHE, H. H.; FAUGERE, M. C. (1986) *Atlas of mineralized bone histology*, Cap 6-8, Germany, Karger.
- MARCOLONGO, M; DUCHEYNE, P; GARINO, J; SCHEPERS, E. (1998). Bioactive glass fiber/polymeric composites bond to bone tissue. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.39, n.1, p.161-70 Jan.
- MARCOLONGO, M; DUCHEYNE, P; LACOURSE, W C. (1997) Surface reaction layer formation in vitro on a bioactive glass fiber polymeric composite. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.37, n.3, p.440-448, Dec.
- MENDENHALL, H. V. (1995). Surgical principles of biomaterial implantation, In: *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A: Materials*, Vol. 1, (1995) WISE, D. et al, United States of America, Marcel Dekker, Inc.
- MICHALANY, J. (1980) *Técnica histológica em anatomia patológica – com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico*, São Paulo Editora Pedagógica e Universitária.
- MOREAU, C; MAZIÈRE, D. (1989) Os biomateriais. *Contacto*. Maio/junho, ano 2, n.7, p.6-12.
- NEO, M.; VOIGT, C.F.; HERBST, H.; GROSS, U.M. (1998) Osteoblast reaction at the interface between surface-active materials and bone in vivo: A study using in situ hybridization, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.39, n.1, p.1-8, Jan.
- OHGUSHI, H; DOHI, Y; YOSHIKAWA, T; TAMAI, S; TABATA, S; OKUNAGA, K; SHIBUYA, T. (1996) Osteogenic differentiation of cultured marrow

- stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.32, n.3, p.341-8, Nov.
- OLIVA, A; SALERNO, A; LOCARDI, B; RICCIO, V; DELLA RAGIONE, F; IARDINO, P; ZAPPIA, V. (1998). Behaviour of human osteoblasts cultured on bioactive glass coatings. *Biomaterials*, v.19, n. 11-12, p.1019-1025.
- OONISHI, H; KUSHITANI, S; YASUKAWA, E; IWAKI, A; HENCH, L L; WILSON, J; TSUJI, E; SUGIHARA, T.(1997) Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clinical Orthopaedics*, v.334, p.316-25, Jan.
- PADILHA, A. F.; AMBROIZIO FILHO, F. (1985) *Técnicas de análise microestrutural*. 1.ed. São Paulo, Hemus.
- PAJAMAKI, K J J; LINDHOLM, T S; ANDERSSON, O H; KARLSSON, K H; VEDEL, E; YLIURPO, A; HAPPONEN, R P. (1995) Bioactive glass and glass ceramic coated hip endoprosthesis: Experimental study in rabbit. *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, v.6, n.1, p.14-18, Jan.
- PELTIER, L F. (1961) The use of plaster of Paris to fill defects in bone. *Clinical Orthopaedics*, v.21, p.1-31.
- PIZZOFERRATO, A.; ARCIOLA, C. R.; CENNI, E.; CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; SAVARINO, L.; STEA, S. (1995). Biocompatibility of implant materials: a quantitative approach, In: *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A: Materials*, Vol. 1, WISE, D. et al, (1995), United States of America, Marcel Dekker, Inc.
- RIEGGER, C L (1993). Propriedades mecânicas do osso. In: GOULD III, J A. *Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte*. Cap. 1, p.3-47, São Paulo, ed. Manole.
- ROLLO, J. M. D. de A. (1978) Estudo sobre o revestimento cerâmico em próteses metálicas. São Carlos. 67p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos.
- ROSS, M H; REITH, E J; ROMRELL, L J. (1993) *Histologia, texto e atlas*. 2.ed., São Paulo Editorial Médica Panamericana.

- SATO, S., KOSHINO, T., SAITO, T., (1998). Osteogenic response of rabbit tibia to hydroxyapatite particle-Plaster os Paris mixture. *Biomaterials*, v.19, p.1895-1900.
- SCHEPERS, E J G; DUCHEYNE, P. (1997) Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: A 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *Journal of Oral Rehabilitation*, v.24, n.3, p.171-181, Mar.
- SHACKELFORD, J. F. (1996) *Introduction to materials science for engineers*, 4.ed., New Jersey, Prentice Hall.
- SMITH, D C. (1982) *Composition and characteristics of dental cements. Biocompatibility of dental materials*. v.2, p.143-199, Florida, CRC Press, Inc.
- SÖDERLING, E; HERBST, K; LARMAS, E; YLIURPO, A. (1996) Protein adsorption to a bioactive glass with special reference to precorrosion. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.31, n.4, p.525-31, Aug.
- SUOMINEN, E; AHO, A J; VEDEL, E; KANGASNIEMI, I; UUSIPAIIKKA, E; YLIURPO, (1996) A.Subchondral bone and cartilage repair with bioactive glasses, hydroxyapatite, and hydroxyapatite composite. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.32, n.4, p.543-51, Dec.
- TAGA, R., et al. (1997) Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de Ossebond. *Revista Brasileira de Implantodontia*, v.3, n.1, p.13-20. Jan – Fev.
- TURUNEN, T.; PELTOLA, J.; HAPPONEN, R.-P.; YLIURPO, (1995) A Effect of bioactive glass granules and polytetrafluoroethylene membrane on repair of cortical bone defect, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.6, n.11, p.639-641, Nov.
- TURUNEN, T.; PELTOLA, J.; MAKKONEN, T.; HELENIUS, H.; YLIURPO, A.; HAPPONEN, R.-P. (1998) Bioactive glass granules and polytetrafluoroethylene membrane in the repair of bone defects adjacent to titanium and bioactive glass implants, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, n.7, p.403-407, Jul.

- WEN, H. B.; MORADIAN-OLDAK, J.; FINCHAM, A. G. (1999) Modulation of apatite crystal growth on Bioglass® by recombinant amelogenin, *Biomaterials*, v.20, n.18, p.1717-1725, Set.
- WHEELER, D. L.; STOKES, K. E.; PARK, H. M.; HOLLINGER, J. O. (1997) Evaluation of particulate Bioglass® in a rabbit radius ostectomy model. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.35, p.249-254.
- WHEELER, D. L.; STOKES, K. E.; HOELLRICH, R. G.; CHAMBERLAND, D. L.; McLOUGHLIN, S. W. (1998) Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.41, p.527-533.
- YUAN, H.; KURASHINA, K.; de BRUIJN, J. D.; LI, Y., de GROOT, K.; ZHANG, X. (1999) A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, v.20, p.1799-1806.
- ZAVAGLIA, C. A. C., PURCHIO, R. A. J., BIERWAGEN, L. E., ZOLOTAR, M. S., (1996) O uso de novos materiais cerâmicos em próteses ortopédicas. In: I Seminário Regional de Biomateriais, Santa Catarina. *Anais*, p 18-31 Santa Catarina, UDESC.