

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

ARIADNE CRISTIANE CABRAL DA CRUZ

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE
BIOCOMPATIBILIDADE DE BIOVIDROS – ESTUDO LABORATORIAL E
HISTOMORFOMÉTRICO EM RATOS**

PONTA GROSSA
2004

ARIADNE CRISTIANE CABRAL DA CRUZ

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE
BIOCOMPATIBILIDADE DE BIOVIDROS – ESTUDO LABORATORIAL E
HISTOMORFOMÉTRICO EM RATOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: **Prof. Dr. Fábio André dos Santos**

**PONTA GROSSA
2004**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UEPG

Cruz, Ariadne Cristiane Cabral da
C957 Caracterização físico-química e avaliação de biocompatibilidade
de biovidros - estudo laboratorial e histomorfométrico em ratos./
Ariadne Cristiane Cabral da Cruz. Ponta Grossa, 2004.
123f. il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

Orientador : Prof. Dr. Fábio André dos Santos.

1- Materiais biocompatíveis - biovidros. 2- Microscopia
eletrônica - varreduras. 3- Vidro. 4- Substitutos ósseos. I. T.

CDD : 574.192

ARIADNE CRISTIANE CABRAL DA CRUZ

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE
BIOCOMPATIBILIDADE DE BIOVIDROS – ESTUDO LABORATORIAL E
HISTOMORFOMÉTRICO EM RATOS

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 17 de junho de 2004.



Prof. Dr. Fábio André dos Santos - Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli
Universidade Estadual Paulista

DEDICATÓRIA

Aos meus maravilhosos pais, **Alceu e Mariliza**, que desde minha graduação vem fazendo possível a realização de sonhos. O sacrifício de vocês em prol dos filhos será eternamente guardado em nossas lembranças com muito carinho e gratidão. Agradeço dia após dia ter nascido em seus lares.

Ao **Neto**, meu grande companheiro, por ter me ajudado, nas mais diversas formas, a materializar o sonho do mestrado.

À **Nessa**, minha irmã predileta, por se fazer sempre tão perto, mesmo a muitos quilômetros de distância.

Ao **Thiago**, meu eterno irmãozinho.

Obrigada por compreenderem a ausência, a distância e minha dedicação a este delicioso sonho. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

DEUS, obrigada pela oportunidade desta existência e tudo o que a acompanha.

Ao **Prof. Dr. Fábio André dos Santos**, meu orientador, por estender seu amplo conhecimento as pessoas que o cercam. Por me ensinar o valor das perguntas e da dedicação aos trabalhos de pesquisa. Pelo auxílio e informações fornecidas durante a execução deste trabalho. Pelo exemplo de dedicação à pesquisa e docência. Por seu senso crítico. A sua colaboração reside em cada página deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Laerte Luiz Bremm** e **Prof. Dr. Márcio Grama Hoepfner** por terem sido meus primeiros orientadores e terem me feito tomar gosto pela Odontologia. Obrigada por terem me incentivado e acreditado em mim.

Ao **Prof. Dr. José Caetano Zurita da Silva** pela colaboração e fundamental apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

À **Prof^a. Mt. Josélia Borba Daher** pelas importantes informações e conhecimentos transmitidos sobre os ratos, amigos de tempos longos.

Ao **Prof. Dr. Newton Capella** pelo imprescindível apoio que tornou possível a conclusão deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Tramonti** pela orientação e acolhida no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

À **Dra. Daniela Serafin Couto Vieira** por ter cedido seu precioso tempo à realização das fotos das lâminas histológicas.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Gomes**, pelos esforços para a elaboração e manutenção de um curso de Mestrado com qualidade. Pela exemplar dedicação à Universidade Estadual de Ponta Grossa. Pelo incentivo aos mestrandos. Somos gratos!

Ao **Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti** por suas importantes idéias.

Ao **Prof. Nino** e sua **equipe** pela confecção das lâminas histológicas.

À colega e hoje amiga, **Leyla Antoinette Delgado Cotrina**. Seu apoio, incentivo e amizade com certeza fizeram esta jornada mais interessante, animada e menos árdua.

Ao **Neto**, meu companheiro, pelo seu carinho e amor.

À **Nessa**, minha querida irmã pelo apoio incondicional durante todo o mestrado.

Aos colegas de Mestrado **Adriana Büher Samra, Adriana de Oliveira Silva, Alfredo Adimari Jr., Ana Cláudia Rodrigues Chibinski, Andrea Maria de Sousa, Carlos Antônio Pelissari, Douglas Roderjan, Edison do Rócio Meister, Flávia Tanaka, João Paulo Filgueiras Ribeiro, Leyla Antoinette Delgado Cotrina, Milko Javier Villaroel Córtes, Protásio Vargas Neto** por dividirmos as mesmas angústias e expectativas. Sinto saudades dos ótimos momentos que passamos juntos.

Às queridas e atenciosas funcionárias do Biotério da UEPG, **Bete e Mari**, pela amizade, apoio e proficiência no exercício de suas funções.

À **Morgana Maria das Graças** por sua atenção, carinho e auxílio.

À **Mari** pelos primeiros ensinamentos de processamento histológico, confecção de lâminas e técnicas de coloração.

À **Maria Luzia Fernandes Bertholino** pelas correções da tese.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – **CAPES** pela presteza e dedicação ao fomento da pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

O presente trabalho se propôs a avaliar as características físico-químicas e a biocompatibilidade do biovidro desenvolvido pelo departamento de Química da UEPG (Biovidro UEPG) e compará-lo com o PerioGlas® e Biogran®. Realizou-se a caracterização físico-química através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (tamanho e morfologia das partículas); microscopia eletrônica de varredura/ energia dispersiva de Raios X (MEV/EDX) (elementos químicos); difratometria de Raios X (DFR) (estrutura); fluorescência de Raios X FRX (elementos químicos). Para o teste de biocompatibilidade utilizou-se 100 ratos, sendo: GI- PerioGlas® - 25 animais; GII- Biogran® - 25 animais; GIII- Biovidro UEPG - 25 animais; GIV- Controle (procedimento cirúrgico sem implantação do biomaterial) - 25 animais. Avaliou-se os animais em 7, 15, 21, 45 e 60 dias. Através de histomorfometria determinou-se o tamanho da reação inflamatória, tamanho dos grânulos, presença e quantidade de células polimorfonuclear (PMN), mononuclear (MN) e fibroblasto (F). Os resultados mostraram que as partículas dos três materiais apresentaram-se não uniformes e com rugosidade superficial. Os grânulos de PerioGlas® apresentaram-se com tamanho médio de $222,00 \pm 40,64 \mu\text{m}$. O Biogran® com $385,09 \pm 68,51 \mu\text{m}$. E o Biovidro-UEPG com $102,86 \pm 36,22 \mu\text{m}$. Houve diferença significativa no tamanho dos grânulos ($p < 0,001$ - ANOVA). Identificou-se nas três amostras cálcio, oxigênio, sódio, fósforo e sílica, agrupados em óxido de sílica, óxido de sódio, óxido de cálcio e óxido de fósforo. Os materiais mostraram-se não cristalinos e com pontos de cristalização. Houve diferença significativa no tamanho da reação inflamatória entre os grupos, tempos e interação (grupo*tempo) ($p < 0,001$). Na contagem de MN não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,117$), havendo entre os tempos ($p < 0,001$) e interação ($p = 0,022$). Houve diferença significativa ($p < 0,001$) na contagem de PMN entre os tempos, grupos e interação. A contagem de F não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,131$) e interação ($p = 0,665$), havendo diferença entre os tempos ($p = 0,008$). Houve diferença significativa no tamanho dos grânulos entre os grupos, tempo e interação ($p < 0,001$). Concluiu-se que os três materiais apresentaram-se biocompatíveis e bioreabsorvíveis, sem indício de capacidade osteoindutora.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis/ vidro/ substitutos ósseos

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate physic-chemical characteristics and the biocompatibility of the bioglass, developed by the UEPG Chemistry Department, (UEPG Bioglass) and compare it with the PerioGlas[®] e Biogran[®]. The physic-chemical characterization was made by scanning electron microscopy (SEM) (size and morphology of particles); scanning electron microscopy/energy dispersive X Ray (MEV/EDAX) (chemical elements); X Ray diffractometry (DRX) (structure); X Ray fluorescence (FRX) (chemical elements) For the biocompatibility test was used 100 rats: GI-PerioGlas[®] - 25 animals; GII – Biogran[®] - 25 animals; GIII – Biovidro UEPG – 25 animals; GIV – Control (surgical procedure without implantation of biomaterial) – 25 animals. The animals were evaluated at 7, 15, 21, 45 and 60 days. It was used histomorphometric analysis to determine the size of inflammatory reaction, size of granules, the presence and quantity of polymorphonuclear cells (PMN), mononuclear (MN) and fibroblast (F). The results shown that the particles of the three materials were irregular with superficial roughness. The medial size of PerioGlas[®] granules was $222,00 \pm 40,64 \mu\text{m}$. The Biogran[®] granules with $385.09 \pm 68.51 \mu\text{m}$. And the UEPG Bioglass was $102.86 \pm 36.22 \mu\text{m}$. There was significant difference in the size of granules ($p < 0.001$ -ANOVA). The three samples presented calcium, oxygen, sodium, phosphorus and silica, aggregated on silica oxide, sodium oxide, calcium oxide and phosphorus oxide. The materials were no crystalline and with crystalline points in their surfaces. There was significant difference on size of inflammatory reaction between groups, times and interaction (group*time) ($p < 0.001$). There was not significant difference between on the count of MN between groups ($p = 0.117$), there was difference between times ($p < 0.001$) and interaction ($p = 0.022$). There was significant difference ($p < 0.001$) on the count of PMN between the times, groups and interaction. There was not significant difference on the count of F between the groups ($p = 0.131$) and interaction ($p = 0.665$), with significant difference between the times ($p = 0.008$). There was significant difference on granules size between the groups, time and interaction ($p < 0.001$). It was concluded that the three materials were biocompatible and bioreabsorbable, without sign of osteoinducture capacity.

Key-words: Biocompatible materials / glass / bone substitutes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1	Os 100 animais da pesquisa foram divididos em 4 grupos, com 25 animais em cada. Os grupos foram divididos em cinco subgrupos de tempo, como 5 animais em cada.....	62
Esquema 2	Cada animal recebeu o tratamento nos dois lados do dorso, resultando em duas amostras por animal. Assim, cada grupo apresentou cinco animais por tempo operatório, resultando em 10 amostras por tempo operatório em cada grupo.....	63
Figura 1.1	Incisão de aproximadamente 15mm realizada com tesoura de ponta romba.....	64
Figura 1.2	Implantação do biomaterial no tecido subcutâneo do rato.....	64
Figura 1.3	Dorso do animal, após o tratamento, suturado com fio mononylon agulhado Shalon®.....	64
Figura 1.4	Remoção da peça contendo o material implantado.....	64
Figura 2.1	Lâmina corada com HE, aumento de 100x. Medição do tamanho da reação inflamatória.....	65
Figura 2.2	Lâmina corada com HE, aumento de 400x. Contagem de PMN, MN e F.....	65
Figura 2.3	Lâmina corada com HE, aumento de 100x. Medição do tamanho do grânulo dos biovidros, após implantação nos animais.....	65
Figura 2.4	Microscopia eletrônica de varredura, aumento de 100x. Medição do tamanho do grânulo dos biovidros previamente à implantação...	65
Figura 3.1	Micrografia eletrônica de varredura do PerioGlas®. Aumento de 100x.....	84
Figura 3.2	Micrografia eletrônica de varredura do PerioGlas®. Aumento de 5000x.....	84
Figura 3.3	Micrografia eletrônica de varredura do Biogran®. Aumento de 100x.....	84
Figura 3.4	Micrografia eletrônica de varredura do Biogran®. Aumento de 5000x.....	84
Figura 3.5	Micrografia eletrônica de varredura do Biovidro-UEPG. Aumento	

de 100x.....	84
Figura 3.6 Micrografia eletrônica de varredura do Biovidro-UEPG. Aumento de 5000x.....	84
Figura 4.1 . PerioGlas [®] , indicando presença de sódio, cálcio, sílica e fósforo..	85
Figura 4.2 MEV/EDX. Biogran [®] , indicando presença de sódio, cálcio, sílica e fósforo.....	85
Figura 4.3 MEV/EDX. Biovidro-UEPG, indicando presença de sódio, cálcio, sílica e fósforo.....	85
Figura 4.4 Elementos químicos e percentagens encontradas nos biomateriais, segundo MEV/EDX.....	85
Figura 5.1 Biogran [®] . Aumento de 100x. Grânulo sem fissura aos sete dias....	86
Figura 5.2 Biogran [®] . Aumento de 400x. Presença de PMN aos sete dias (seta).....	86
Figura 5.3 PerioGlas [®] . Aumento de 100x. Início de formação de fissuras aos quinze dias.....	86
Figura 5.4 PerioGlas [®] . Aumento de 400x. Presença de PMN aos quinze dias (seta).....	86
Figura 5.5 Biovidro-UEPG. Aumento de 100x. Grânulo com fissuras aos vinte e um dias.....	86
Figura 5.6 PerioGlas [®] . Aumento de 400x. Predominância de célula MN aos vinte e um dias (setas).....	86
Figura 6.1 Biovidro-UEPG. Aumento de 400x. Presença de fibrócitos aos 45 dias (setas).....	87
Figura 6.2 Biogran [®] . Aumento de 100x. Fissuras e degradação do grânulo aos 45 dias (setas).....	87
Figura 6.3 Biovidro-UEPG. Aumento de 400x. Vasos sangüíneos e capilares aos 60 dias (setas).....	87
Figura 6.4 PerioGlas [®] . Aumento de 100x. Presença de fissuras aos 60 dias (setas).....	87
Figura 6.5 Biovidro-UEPG. Aumento de 400x. Presença de fibroblastos aos 60 dias (setas).....	87

Figura 6.6 Biogran[®]. Aumento de 40x. Aspecto geral das partículas aos 60 dias (setas).....

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 7.1	Tamanho dos grânulos previamente à implantação	88
Gráfico 7.2	Tamanho da reação inflamatória.....	88
Gráfico 7.3	Contagem de PMN nos quatro grupos e cinco tempos de análise...	88
Gráfico 7.4	Contagem de MN nos quatro grupos e cinco tempos de análise.....	88
Gráfico 7.5	Contagem de F nos quatro grupos e cinco tempos de análise.....	88
Gráfico 8.1	Determinação do tamanho dos grânulos dos biovidros após implantação nos animais nos cinco tempos de análise.....	89
Gráfico 8.2	Difratograma da amostra de PerioGlas [®] , indicando fase cristalina..	89
Gráfico 8.3	Difratograma da amostra de Biogran [®] , indicando fase cristalina.....	89
Gráfico 8.4	Difratograma da amostra de Biovidro-UEPG, indicando fase cristalina.....	89
Gráfico 9.1	Reprodutibilidade dos dados de tamanho dos grânulos (μm), obtidos em duas análises feitas em dois momentos distintos (48h) - Coeficiente de correlação intraclasse.....	122
Gráfico 9.2	Reprodutibilidade dos dados de tamanho da reação inflamatória (μm), obtidos em duas análises feitas em dois momentos distintos (48h) - Coeficiente de correlação intraclasse.....	122
Gráfico 9.3	Reprodutibilidade dos dados de contagem de células, obtidos em duas análises feitas em dois momentos distintos (48h) - Coeficiente de correlação intraclasse.....	122
Gráfico 9.4	Reprodutibilidade dos dados de determinação do tamanho dos grânulos após implantação nos animais, obtidos em duas análises feitas em dois momentos distintos (48h) - Coeficiente de correlação intraclasse.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estatística descritiva- Tamanho dos grânulos previamente à implantação.....	68
Tabela 2	Pós-teste Tukey HSD. Comparação entre os grupos - Tamanho dos grânulos previamente à implantação.....	69
Tabela 3	Estatística descritiva – Tamanho de reação inflamatória (valores transformados em log). Fator interação grupos * tempo (dias).....	73
Tabela 4	Pós-teste Games Howell. Comparação entre os grupos - Tamanho da reação inflamatória (valores transformados em log).....	74
Tabela 5	Pós-teste Games Howell. Comparação entre os tempos (dias) - Tamanho da reação inflamatória (valores transformados em log).....	74
Tabela 6	Estatística descritiva - Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).....	76
Tabela 7	Pós-teste Games Howell. Comparação entre os grupos - Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).....	77
Tabela 8	Pós-teste Games Howell. Comparação entre os tempos (dias) - Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).....	77
Tabela 9	Estatística descritiva - Contagem de MN (valores transformados em percentagens).....	78
Tabela 10	Pós-teste Games Howell. Comparação entre os tempos (dias) - Contagem de MN (valores transformados em percentagem).....	79
Tabela 11	Estatística descritiva - Contagem de F (valores transformados em percentagens).....	80
Tabela 12	Pós-teste Games Howell. Comparação entre os tempos - Contagem de F (valores transformados em percentagem).....	81
Tabela 13	Estatística descritiva - Tamanho dos grânulos. Fator interação grupos * tempo (dias).....	82

Tabela 14	Pós-teste de Tukey HSD. Fator Grupos - Tamanho dos grânulos.....	82
Tabela 15	Pós-teste de Tukey HSD. Fator Tempo - Tamanho dos grânulos.....	83
Tabela 16	Tamanho dos grânulos (μm) previamente à implantação.....	107
Tabela 17	Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em sete dias de pós-operatório.....	108
Tabela 18	Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em quinze dias de pós-operatório.....	108
Tabela 19	Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em vinte e um dias de pós-operatório.....	108
Tabela 20	Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em quarenta e cinco dias de pós-operatório.....	109
Tabela 21	Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em sessenta dias de pós-operatório.....	109
Tabela 22	Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em sete dias de pós-operatório.....	109
Tabela 23	Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em quinze dias de pós-operatório.....	110
Tabela 24	Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em vinte e um dias de pós-operatório.....	110
Tabela 25	Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em quarenta e cinco dias de pós-operatório.....	110
Tabela 26	Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em sessenta dias de pós-operatório.....	111
Tabela 27	Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em sete dias de pós-operatório.....	112
Tabela 28	Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em quinze dias de pós-operatório.....	113
Tabela 29	Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em vinte e um dias de pós-operatório.....	114
Tabela 30	Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em quarenta e cinco dias de pós-operatório.....	115

Tabela 31	Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em sessenta dias de pós-operatório.....	116
Tabela 32	Teste de normalidade - Tamanho dos grânulos previamente à implantação.....	117
Tabela 33	Teste de normalidade - Tamanho da reação inflamatória (valores transformados em log).....	117
Tabela 34	Teste de normalidade - Contagem de PMN (valores transformados em percentagem)	117
Tabela 35	Teste de normalidade - Contagem de MN (valores transformados em percentagem).....	117
Tabela 36	Teste de normalidade - Contagem de F (valores transformados em percentagem).....	118
Tabela 37	Teste de normalidade - Tamanho dos grânulos.....	118
Tabela 38	Teste Levene para equivalência de variância - Tamanho dos grânulos previamente à implantação.....	118
Tabela 39	ANOVA (um critério) - Tamanho dos grânulos previamente à implantação.....	118
Tabela 40	Levene para equivalência de variância - Tamanho da reação inflamatória (valores transformados log).....	118
Tabela 41	ANOVA (dois critérios) - Tamanho de reação inflamatória (valores transformados em log).....	119
Tabela 42	ANOVA (dois critérios) – Contagem de PMN (valores transformados em percentagem).....	120
Tabela 43	Teste Levene para equivalência de variância – Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).....	120
Tabela 44	ANOVA (dois critérios) – Contagem de MN (valores transformados em percentagens).....	120
Tabela 45	Teste Levene para equivalência de variância – Contagem de MN (valores transformados em percentagens).....	120
Tabela 46	ANOVA (dois critérios) – Contagem de F (valores transformados em percentagens).....	121
Tabela 47	Teste Levene para equivalência de variância – Contagem de F (valores transformados em percentagens).....	121

Tabela 48	Estatística descritiva - Contagem de PMN. Fator interação grupos * tempo (dias).....	121
------------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

Al₂O₃	Óxido de alumina
B₄C	Carbeto de boro
BV	Biovidro
CaCO₃	Carbonato de cálcio
Ca₂F	Fluoreto de cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CaMgSi₂O₆	Diopsida
CaSiO₃	Wollastonita
CC	Carbonato de cálcio
EDX	Energia dispersante de Raios X
Fe₂O₃	Óxido férrico
F	Fibroblasto
Ga₂O₃	Óxido de gadolínio
HÁ	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e Eosina
K₂O	Óxido de potássio
La₂O₃	Óxido de Lantânio
M	Molar
MEV	Microscópico eletrônico de varredura
MgO	Óxido de magnésio
Mg(OH)₂	Hidróxido de magnésio
MI	Mililitro

MO	Microscopia óptica
Na₂O	Óxido de sódio
NS	Não significativo
µm	Micrometro
P	Nível de significância
P.M.	Pré-molar
PMN	Polimorfonuclear
P₂O₅	Óxido de fósforo
S	Significativo
SiO₂	Óxido de sílica
Si₃N₄	Nitreto de silício
Ta₂O₅	Óxido de Tântalo
WO₃	Óxido de tungstênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	PROPOSIÇÃO.....	26
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3. 1	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E TESTES IN VITRO.....	27
3. 2	TESTES IN VIVO.....	33
4	MATERIAL E MÉTODO.....	51
4.1	ANÁLISE FÍSICA.....	52
4.1.1	Microscópico eletrônico de varredura (MEV).....	52
4.2	ANÁLISE QUÍMICA.....	53
4.2.1	Fluorescência de Raios X.....	53
4.2.2.	Difratometria de Raios X.....	53
4.2.3	Microscópico eletrônico de varredura/ Energia dispersante de Raios X (MEV-EDX).....	53
4.3	ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	54
4.3.1	Estudo piloto.....	55
4.3.2	Procedimento cirúrgico.....	55
4.3.3	Cuidados pós-operatórios.....	59
4.3.4	Obtenção das peças.....	59
4.3.5	Processamento histológico.....	59
4. 3.6	Análise histológica.....	60
4.3.7	Determinação do tamanho da reação inflamatória.....	60
4.3.8	Determinação de polimorfonuclear (PMN), mononuclear (MN) e fibroblasto (F).....	61

4.3.9	Determinação do tamanho do grânulo.....	62
4.4	ANÁLISE DOS DADOS.....	62
5	RESULTADOS.....	66
5. 1	OBSERVAÇÕES CLÍNICAS.....	66
5. 2	ANÁLISE FÍSICA.....	67
5.2.1	MEV.....	67
5. 3	ANÁLISE QUÍMICA.....	69
5. 3. 1	Fluorescência de Raios X	69
5. 3. 2	Difratometria de Raios X	69
5.3. 3	MEV/EDX.....	70
5. 4	ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	73
5. 4. 1	Análise histológica – Microscópico óptico.....	73
5. 4. 2	Determinação do tamanho da reação inflamatória.....	77
5. 4. 3	Contagem de PMN, MN e F.....	79
5. 4. 4	Determinação do tamanho dos grânulos dos biovidros.....	82
6	DISCUSSÃO.....	88
7	CONCLUSÃO.....	98
	REFERÊNCIAS.....	99
	APÊNDICE – Tabelas 16 a 62/ Prancha 9.....	103

1 INTRODUÇÃO

*P*rocedimentos de enxerto ósseo são freqüentemente necessários em cirurgias bucais. O aumento e/ou manutenção do tecido ósseo pode ser necessário no tratamento de perdas ósseas em traumas, defeitos ósseos periodontais, lesões císticas, deficiências congênitas, aumento de rebordo alveolar, lesões apicais e preparação de leito para a colocação de implantes osteointegrados. (CHAN et al., 2002; GRANJEIRO et al., 1992).

A busca de um material ideal para ser utilizado como substituto ósseo vem sendo objeto de pesquisa por anos. Quanto a sua origem, estes podem ser classificados em: Autógeno - obtido do próprio indivíduo, podendo ser de sítios intrabuciais ou extrabuciais. Alógeno ou homógeno - obtido de indivíduos da mesma espécie, contudo geneticamente diferentes. Xenógeno ou heterógeno - advém de doadores de espécie diferente do receptor, como osso bovino. Aloplástico - material sintético, de natureza polimérica, metálica ou cerâmica. (CANCIAN, 1998; CHAN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 1993; SANTOS, 2000).

Os enxertos/implantes ósseos tradicionais incluem materiais autógenos e homógenos (AL RUHAIMI, 2001; SCHMIT et al., 1997). Enquanto o osso autógeno apresenta-se como uma excelente alternativa biológica pelas suas propriedades osteocondutora e osteoindutora, possui alguns fatores desfavoráveis bem significativos, como a necessidade de uma área doadora, maior período de convalescença, morbidade e susceptibilidade de infecção no sítio doador, limitada quantidade de tecido ósseo, custo elevado (especialmente de sítios extrabuciais) e um procedimento cirúrgico adicional. (AL RUHAIMI, 2001; CHAN et al., 2002;

FURUSAWA et al., 1998; GRANJEIRO et al., 1992; KAUFMANN et al., 2000; NARY FILHO; OKAMOTO, 1996; SANADA et al., 2003; SCHEPERS et al., 1991; WHEELER et al., 1997; 1998).

Por outro lado, os enxertos homogêneos e heterogêneos, apesar de terem sido há muito tempo utilizados, apresentam limitações como a necessidade de um banco de ossos, reabsorção prematura (especialmente o osso medular) alta variabilidade das propriedades de osteoindução (variam de acordo com a área obtida, tipo de tecido ósseo, idade do doador, processamento do tecido ósseo e técnica de esterilização empregada) (HALL et al., 1999; PINHEIRO, 2001) e o potencial de transmissão de doenças infectocontagiosas e priônicas. (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001; PINHEIRO, 2001; SOGAL; TOFE, 1999).

Quanto ao mecanismo de ação, os substitutos ósseos podem ser agrupados em: Osteoindutores - capazes de estimular células ectomesenquimais indiferenciadas a diferenciar-se em osteoblastos e/ou condroblastos. Osteocondutores - servem como um arcabouço para a proliferação de vasos sanguíneos, tecido perivascular e células osteoprogenitoras do leito, que trarão os componentes necessários à formação e deposição óssea. O substituto ósseo pode ficar incorporado a matriz óssea neoformada ou sofrer um processo de reabsorção e/ou dissolução. Osteogenitores - capazes de formar tecido ósseo por si mesmo (apresentam osteoblastos viáveis). (AL RUHAIMI, 2001; CHAN et al., 2002; SANTOS, 2000).

Como uma alternativa à utilização do enxerto ósseo autógeno, alógeno e heterógeno vem tentando-se empregar uma variedade significativa de materiais aloplásticos. A aplicabilidade destes materiais em organismos humanos

depende de suas propriedades, especialmente biocompatibilidade, estabilidade enzimática e hidrolítica, além de propriedades químicas, físicas e mecânicas similares ao tecido que está sendo substituído. (STRNAD, 1992).

Os materiais a base de cerâmica (naturais ou sintéticos) vem sendo largamente empregados em procedimentos de enxertos ósseos. Dentre os naturais estão as hidroxiapatitas (HA) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, obtidas a partir de estruturas de coral ou de matriz mineral de tecido ósseo bovino. De origem sintética tem-se hidroxiapatita, beta fosfato tricálcio (β -TCP) - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, fosfato de cálcio bifásico (HA+ β -TCP) e os vidros bioativos. Os biovidros representam materiais promissores (STRNAD, 1992) por apresentar elevada biocompatibilidade e possuir propriedades osteocondutivas. (AL RUHAIMI, 2001; CANCIAN, 1998; FETNER et al., 1994; FURUSAWA; MIZUNUMA, 1997; FURUSAWA et al., 1998; JOHNSON et al., 1997; KAUFMANN et al., 2000; KARATZAS et al., 1999; SILVER; DEAS; ERICINSKA, 2001; VOGEL et al., 2001; WHEELER et al., 1997; 1998).

A composição química dos biovidros usualmente inclui fósforo, cálcio, sódio, sílica e oxigênio (AMARAL et al., 2002; COSTA et al., 2003; SILVER et al., 2001; STRNAD, 1992; VOGEL et al., 2001), sendo similar à composição inorgânica do tecido ósseo, formado principalmente por cálcio e fosfato, além de hidroxilas, carbonatos, citratos, e pequena quantidade de sódio, magnésio e flúor. (GLIMCHER, 1990).

A preparação dos vidros bioativos abrange a fundição de diferentes pós de vidro e formação de produtos com cristalização controlada. De acordo com os componentes utilizados e a técnica de fabricação empregada, os biovidros podem apresentar variação nos elementos constituintes, na quantidade dos mesmos, tamanho e superfície da partícula. Estas características físico-químicas estão

intimamente relacionadas com o desempenho biológico destes materiais, como bioatividade e osteocondução. (AMARAL et al., 2002; COSTA et al., 2003; ROSENGREN et al., 2003; STRNAD, 1992).

Estudos têm comprovado que os biovidros a base de 45% de óxido de sílica (SiO_2), 24,5% de óxido de sódio (Na_2O), 24,5% de óxido de cálcio (CaO) e 6% de óxido de fósforo (P_2O_5) apresentam bioatividade in vitro em solução de fluido corporal simulado (AMARAL et al., 2002; BRANDA et al., 2002; COSTA et al., 2003; SILVER; DEAS; ERECINSKA, 2001; STRNAD, 1992) e in vivo (FURUSAWA; MIZUNUMA, 1997). Sugere-se que in vivo ocorra a formação de uma camada externa rica em hidroxiapatita, enquanto internamente há perda de sílica para o meio, o que permitiria a inserção e proliferação de osteoblastos na superfície do vidro e osteointegração. Este evento é importante para que o processo de dissolução do biovidro se estabilize, e possibilite que os processos físico-químicos ocorram e formem ligações químicas entre a superfície vítrea e o tecido recém-formado. (STRNAD, 1992). Além de determinar o grau de reabsorção ou de incorporação das partículas vítreas na matriz óssea neoformada.

Trabalhos na literatura têm destacado a importância da composição, porosidade, densidade, nível de entrelaçamento dos cristais e tamanho das partículas de biovidro como características que afetam grandemente a capacidade de dissolução destes biomateriais e sua atividade nos tecidos. (ALIZADEH; MARGHUSSIAN, 2002; AMARAL et al., 2002; BRANDA et al., 2002; COSTA et al., 2003; KAUFMANN et al., 2000; SILVER DEAS; ERECINSKA, 2001; STRNAD, 1992; VOGEL et al., 2001).

Tendo em vista a importância do desenvolvimento e aplicabilidade de novos substitutos ósseos para redução de custos, aumento da quantidade de

materiais seguros e surgimento de alternativas de tratamentos, o presente trabalho teve o propósito de analisar um biovidro desenvolvido pelo Departamento de Química - DEQUIM-CIPP da Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG e compará-lo com dois biovidros disponíveis no comércio (Biogran[®] e PerioGlas[®]).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com o intuito de abranger trabalhos pertinentes aos propósitos deste estudo, encontram-se na revisão de literatura trabalhos sobre reparo ósseo, testes de biocompatibilidade, alterações decorrentes da composição e forma de fabricação de biovidros, influência das propriedades físico-químicas de biovidros e hidroxiapatitas sobre a resposta biológica.

2. 1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E TESTES IN VITRO

Granjeiro et al. (1992) avaliaram algumas características físico-químicas das hidroxiapatitas: Biohidroxi-Inodon®, Osteosynt®, HA-40®, Osteogen® e HA-Padrão Sigma. Através da análise por microscopia óptica de campo escuro observou-se que a Biohidroxi-Inodon® apresentou contornos irregulares, pequena espessura, superfície lisa e permitiu passagem de luz. Os demais materiais analisados apresentaram-se na forma de partículas densas, superfície irregular, não permitindo passagem de luz. A análise de microscopia eletrônica de varredura determinou o tamanho médio das partículas, sendo: Biohidroxi-Inodon: 10-50µm; Osteosynt®: 400-600µm; HA-40®: 1000-2000µm e Osteogen®: 200-300µm. O perfil espectrofotométrico determinou o grau de pureza dos materiais, sendo que a HA-40® apresentou contaminantes como o titânio, estrôncio, ferro, enxofre e potássio. A Biohidroxi-Inodon® foi o único material que liberou totalmente o cálcio e fosfato no

teste de dissolução ácida. Segundo os resultados da difração de Raios X todos os materiais foram identificados como hidroxiapatita.

Strnad (1992) realizou testes in vitro e in vivo com intuito de verificar a influência do parâmetro estrutural Y no comportamento biológico de implantes aloplásticos vidros-cerâmicas. Este parâmetro pode ser definido como o número médio de pontes de oxigênio por poliedro na cadeia do vidro. Utilizou-se quatro diferentes composições de biovidro. Dois corpos de prova de cada tipo de material permaneceram dois meses imersos em solução de fluido corporal simulado (SBF- 0,2g cloreto de potássio, 8g cloreto de sódio, 0,2g cloreto de cálcio, 2g óxido de hidrogênio, 0,05g dihidrogeno fosfato de sódio, 1g bicarbonato de sódio, 0,1g cloreto de magnésio hidratado e 1g glicose para 1000ml de água). A análise in vivo ocorreu por meio da implantação dos materiais em tíbias e fêmur de cães. Sacrificou-se os animais após dois meses e analisou-se as biópsias através do microscópico eletrônico de varredura (MEV). Os resultados mostraram que uma composição apropriada da fase vítrea residual dos vidros-cerâmicas bioativos pode ser controlada com base no cálculo do parâmetro estrutural Y. Quando Y é maior que 3, os vidros perdem sua bioatividade. O valor de Y ideal é igual a 2. Conclui-se que o parâmetro estrutural de Y pode ser usado como uma ferramenta para teorizar bioatividade.

O objetivo desse trabalho de Kaufmann et al. (2000) foi determinar o efeito da porosidade e tamanho de poro de vidro bioativo (45S5) na expressão e manutenção de fenótipo osteoblásticos. Células ROS 17/2.8 foram cultivadas em substratos com diferentes tamanhos de poros e porosidades por um período de sete

e quatorze dias. Analisaram-se as características das células e matriz extracelular. Os resultados demonstraram que substrato do vidro suportou a proliferação e crescimento de células tipo osteoblastos. A morfologia da célula diferiu nos vários substratos. O formato e a extensão da membrana celular sugeriu alta atividade metabólica. Células em todos substratos expressaram altos níveis de atividade de fosfatase alcalina e produção de matriz extracelular. A porosidade de 44% do tamanho do poro não dirigiu nem modulou a expressão de fenótipos osteoblástico in vitro. Por outro lado, a porosidade afetou a função celular. A média de poro de 92µm, como a porosidade de 35 a 59%, reduziu a atividade osteoblástica. Um aumento na porosidade ocasiona um aumento na área total dos espécimes. Com aumento da porosidade e área superficial, a reação do biovidro com o meio pode apresentar longa duração e altas intensidades, afetando a composição do meio local.

Com propósito de determinar o efeito das reações que ocorrem na superfície das partículas de Bioglass® na viabilidade de bactérias supra e subgengivais Allan; Newman e Wilson (2001) analisaram as seguintes bactérias: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*. Os resultados mostraram efeito antibacteriano contra os espécimes supra e subgengivais. As medições de pH mostraram que houve aumento do mesmo em todos os meios de cultura empregados. Concluiu-se que as partículas do Bioglass® exerceram considerável efeito antibacteriano contra as bactérias bucais, incluindo as causadoras das doenças cárie e periodontal.

Utilizando modelo de cultura de osteoblasto, Silver, Deas e Erecinska (2001) avaliaram as alterações metabólicas, viabilidade celular, mudanças nas concentrações intracelulares de íons, proliferação e diferenciação celular, através do uso dos seguintes biovidros: Bioglass® 45S5 (forma fundida), 58S e 77S (ambos na forma de gel). Empregou-se como controle soda-sílica-cal e vidro de boro silicato. Tanto os materiais teste quanto controle apresentavam partículas com tamanho de 90-150µm. Os resultados mostraram que o Bioglass® 45S5 promoveu alcalinização extra e intracelular. Apresentou uma pequena membrana hiperpolarizada. E também aumentou a produção de lactato. A atividade glicolítica foi estimulada tanto através de células em contato direto com as partículas do Bioglass® 45S5 como através da comunicação pelo meio. O Bioglass® 45S5 não afetou a viabilidade, proliferação e diferenciação osteoblástica. Os biovidros 77S e 58S não alteraram os níveis de íons e a atividade metabólica. Concluiu-se que o Bioglass® 45S5 promoveu acentuada alcalinização externa e interna, a qual foi responsável pelo aumento da glicólise e produção de ATP celular. Alterações na concentração de íons hidrogênio podem contribuir para alterações na concentração de outros íons. O aumento na concentração de íons cálcio pode influenciar a atividade de enzimas intracelulares.

O objetivo deste trabalho de Alizadeh e Marghussian (2002) foi investigar as propriedades mecânicas e bioatividade de vidros contendo óxido férrico (Fe_2O_3) e óxido de tungstênio (WO_3) como agentes de nucleação. Prepararam o vidro com pós de óxido de sílica (SiO_2), carbonato de cálcio (CaCO_3), hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), Fe_2O_3 (óxido férrico) e WO_3 (óxido de tungstênio). Realizaram análise de difração de Raios X (identificação dos elementos da fase cristalina), medição da resistência à fratura e flexural (teste SENB-S), análise microestrutural

(MEV e espectroscopia infra-vermelho) e teste in vitro com SBF. A análise de Raios X demonstrou que a fase cristalina era formada basicamente por wollastonita (CaSiO_3) e diopsida ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$), e uma quantidade menor de cristobalita. A presença de fibras de diopsida e partículas de wollastonita aumentaram os valores de força e dureza dos materiais. A resistência flexural e a fratura de amostras contendo 3%, em peso, de óxido de magnésio (MgO) foi 116 MPa e 1,48MPa.m^{1/2}, respectivamente. Os resultados do teste in vitro indicaram a formação da camada superficial de hidroxiapatita. Concluiu-se que a presença do Fe_2O_3 e WO_3 como agentes de nucleação provocou a formação de diopsida e wollastonita, retardando a formação de cristobalita. As amostras com grandes quantidades de MgO (>6%) não são aceitáveis.

Amaral et al. (2002) realizaram este trabalho com intuito de descrever o processo utilizado para preparação de biovidro de alta densidade, contendo nitreto de silício (Si_3N_4). Incluindo descrição do mecanismo de densificação, caracterização mecânica e micro-estrutural. Os resultados mostraram que a densificação obtida em vinte amostras foi de 97,0±0,9%. O processo utilizado na preparação do material resultou em um produto altamente poroso. Através da análise de difratometria de Raios X verificou-se que não houve formação de fase cristalina adicional. Os resultados da caracterização mecânica foram: resistência a fratura K_{IC} = 4,4MPa; dureza Vickers H_V =10,3GPa; módulo de Young E =197GPa; resistência a torção R =383MPa. Concluiu-se que os valores obtidos representam propriedades atrativas deste novo biomaterial, com propriedades biológicas e considerável resistência mecânica.

Branda et al. (2002) com intuito de relatar o efeito da substituição do óxido de cálcio (CaO) por M_2O_3 ($M = La, Y, In, Ga, Al$) na bioatividade do vidro $2,5CaO.2SiO_2$, realizaram este trabalho. Preparou-se o biovidro através da fundição dos seguintes reagentes: $CaCO_3$, óxido de gadolínio (Ga_2O_3), óxido de alumina (Al_2O_3), In_2O_3 e SiO_2 . Avaliou-se a bioatividade através da colocação das amostras de molho em SBF. Analisou-se a capacidade de formar a camada de apatita através de MEV, equipado com sistema de energia de dispersão de Raios X (EDX) para análise de elementos, e espectroscopia de infravermelho. Verificou-se que a substituição do CaO por M_2O_3 reduziu progressivamente a capacidade de formação da camada de cálcio-fosfato na superfície exposta ao SBF. Tal fato pode ser atribuído ao efeito desta substituição nas propriedades ácidas dos grupos com sílica.

Costa et al. (2003) propuseram preparar um vidro na forma de espuma que apresentasse bioatividade e poros que permitissem osteocondução em seu interior. Preparou-se um biovidro com a seguinte composição: 12% óxido de sódio (Na_2O), 28% óxido de cálcio (CaO), 10% óxido de fósforo (P_2O_5) e 50% óxido de sílica (SiO_2), a partir de óxidos puros via fusão. Combinou-se este biovidro com o aditivo de carbeto de boro (B_4C), resultando no vidro tipo espuma. Realizou-se caracterização do novo material por fluorescência de Raios X, difratometria de Raios X, picnômetro de hélio, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de varredura. Também se fez ensaios in vitro em meio de SBF. Os resultados mostraram que a mistura de aditivos ao biovidro provocou a formação de poros de tamanhos variados e interconectados. A caracterização química por fluorescência de Raios X indicou que o material, segundo o diagrama de fases, apresentou-se na faixa de bioatividade. Os ensaios in vitro das amostras resultaram na formação de

uma película à base de fosfato de cálcio na superfície, indicando bioatividade do material.

Rosengren et al. (2003) estudaram, através de cromatografia e gel de eletroforese bidimensional, a adsorção de proteínas de plasma humano em dois vidros-cerâmicas bioativos: -AP40 (44,00% SiO₂, 32,16% CaO, 2,84% MgO, 5,00% CaF₂, 4,60% Na₂O, 0,2 K₂O, 11,20% P₂O₅) e -RKKP (43,94% SiO₂, 31,93% CaO, 2,79% MgO, 4,94% CaF₂, 4,55% Na₂O, 0,19 K₂O, 10,27% P₂O₅, 0,99% Ta₂O₅, 0,50% La₂O₃). A análise quantitativa mostrou que os dois biomateriais apresentaram boa capacidade de adsorção de proteínas, entretanto os melhores resultados foram obtidos com o AP40 (ausência de Ta₂O₅ e La₂O₃). Encontrou-se correlação entre a composição química e a quantidade de proteínas adsorvidas. Concluiu-se que a presença de Ta (Tântalo) e La (Lantânio) diminuíram a adsorção de proteínas.

2. 2 TESTES IN VIVO

Utilizando defeitos ósseos criados em rebordo de cães, Schepers et al. (1991) avaliaram o Calcite[®], Interpore 200[®] e o Biogran[®] como material de preenchimento ósseo. Em um mês as partículas de biovidro, próximas a parede do defeito, estavam incorporadas com o tecido ósseo. O centro das partículas apresentava-se com fissuras. Através da análise microquímica das partículas de Biogran[®] verificou-se a formação de uma camada externa rica em cálcio e fósforo, enquanto o centro apresentava-se rico em sílica. Observou-se, com dois meses, tecido ósseo formado nas fissuras do biovidro sem conexão com o tecido ósseo

externo. Em três meses as partículas de Calcite®, no centro do defeito, apresentavam-se encapsuladas por tecido fibroso. Todos os materiais foram melhores que o grupo controle (sem implantação de biomaterial). O Biogran® apresentou os melhores resultados.

Utilizando ratos como modelo experimental, Oliveira et al. (1993) analisaram a resposta tecidual de micropartículas de hidroxiapatitas implantadas em tecido subcutâneo. Utilizaram-se trinta animais divididos em tempos de três e vinte e quatro horas e sete, vinte e um, trinta e sessenta dias de pós-operatório. Em três e vinte e quatro horas verificou-se reação inflamatória aguda, principalmente em vinte e quatro horas. Em sete dias houve formação de granulomas do tipo corpo estranho envolvendo as partículas de material. Aos vinte e um e trinta dias a resposta inflamatória era semelhante aos sete dias, porém o granuloma apresentava-se mais duro. Após sessenta dias percebeu-se redução aparente no volume dos granulomas. A ausência de resposta inflamatória exacerbada no tecido subcutâneo de ratos reforçou a biocompatibilidade do material.

Através de defeitos periodontais criados em primatas, Fetner et al. (1994) examinaram, clínica e histologicamente, as propriedades do PerioGlas® (biovidro- BV), hidroxiapatitas (HA), fosfato tricálcio (TCP) e controle (não implantado) no processo de reparo. Empregou-se duas formulações diferentes de PerioGlas®, 45S5 e 45S5-F (alto conteúdo de flúor). Selecionaram-se materiais com duas variações de tamanho de partículas: 90-310µm (Syntograft® - TCP, PerioGlas® - BV e Periograf® - HA), e de 500-710µm (PerioGlas® - BV, Alveolograft® - HA e Augmen® - TCP). Após um mês, não houve formação de osso ou cimento em

nenhum dos defeitos. Percebeu-se pequena reabsorção radicular em todos os sítios, sendo mais significativa no grupo do PerioGlas® em ambas formulações. Os espécimes tratados com PerioGlas® apresentaram pequena migração do epitélio juncional para apical. As avaliações histométricas dos sítios com PerioGlas®, em quatro e seis meses, apresentaram 68% de nova inserção no defeito. O TCP apresentou 55%, HA 38% e controle 34%. O reparo ósseo do PerioGlas® foi de 47% da altura do defeito, TCP 31%, HA 18% e controle 21%. Em relação ao tamanho das partículas, não houve diferença no processo de reparo entre os materiais. Todos os materiais foram bem tolerados histologicamente.

Gregghi e Campos Júnior (1994) compararam a biocompatibilidade da hidroxiapatita FOB-USP com Interpore 200®, Bioapatite®, esmalte dental humano em pó e particulado, e esponja de PVC (cloridrato de polivinil), através da implantação em subcutâneo de ratos. As cerâmicas fosfato de cálcio foram analisadas após um, dois e doze meses, enquanto os outros materiais apenas em um e dois meses. Realizou-se análise histológica qualitativa (análise histopatológica) e quantitativa (volumetria de pontos). Em relação à esponja de PVC verificou-se grande quantidade de macrófagos e células gigantes multinucleadas após um e dois meses. O grau de fibrosamento variou entre discreto e moderado. Para o esmalte particulado, tanto em um e dois meses, todos os parâmetros mostraram-se discretos, exceto o fibrosamento que evoluiu de discreto/moderado para moderado/intenso. Contrariamente, o esmalte em pó apresentou grande quantidade de linfócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas. A Interpore 200® apresentou uma reação muito discreta em trinta dias, tornando-se ainda menor (dois e doze meses). Apenas o fibrosamento aumentou, passando de discreto (um e dois

meses) para intenso (doze meses). A Bioapatite® apresentou vários macrófagos e células gigantes multinucleadas, sendo que esta apresentou os piores resultados. A HA FOB-USP mostrou inicialmente escore alto para macrófagos, células gigantes e proliferação vascular. Aos sessenta dias houve redução deste quadro e aos doze meses a reação apresentou-se semelhante a Interpore 200®.

Macedo et al. (1995) realizaram a implantação da HA-40® (sintética) e hidroxiapatita obtida a partir de coral (natural) no tecido subcutâneo de ratos, com intuito de verificar a reação tecidual após sete, quatorze, vinte e um e trinta dias. O grupo HA-40® apresentou pigmentos escuros, de natureza granular, que poderiam representar contaminantes ou impurezas. Os dois materiais induziram resposta inflamatória que persistiu por todo período de avaliação, sendo menor no grupo hidroxiapatita coral. Ambos materiais não mostraram potencial osteoindutivo.

Pollick et al. (1995) compararam a degradação de implantes de cerâmica porosa, implantados em tecido mole (subcutâneo e muscular) e em tecido ósseo. Utilizaram Interpore-200® e Pro Osteon-500®. Os implantes para preenchimento ósseo apresentaram 15mm de comprimento e 8mm de diâmetro. Para tecido mole utilizaram blocos de 8mm. Criaram três defeitos ósseos em cada fêmur de dois cães, resultando em doze defeitos. Colocaram vinte e um implantes intramusculares, através da dissecação do músculo e criação de um envelope. Inseriram vinte e cinco implantes no subcutâneo do dorso dos animais. Sacrificaram os animais após quatro meses. Os resultados mostraram reabsorção dos implantes no tecido ósseo de 16,7-24,4%, no tecido muscular de 4,9-10,1% e de 5,0-9,7% no subcutâneo. Sendo estatisticamente significativa apenas no tecido ósseo. Os

autores observaram crescimento ósseo em 67% dos implantes colocados no tecido mole.

Utilizando alvéolo dental de ratos, Nary Filho e Okamoto (1996) avaliaram a biocompatibilidade do Hapset® (sulfato de cálcio associado a hidroxiapatita densa). Extraíu-se o incisivo superior direito de vinte animais. Imediatamente após a extração implantou-se um tubo de polietileno, com gutapercha (controle) em uma extremidade e Hapset® na outra. Sacrificou-se os animais sete, quinze, vinte e um e trinta dias após a cirurgia. Os resultados mostraram resposta inflamatória desde os períodos iniciais, sendo maior para o grupo teste. Houve atraso na organização dos tecidos próximo ao Hapset®, com persistência do infiltrado e atraso na formação do trabeculado ósseo.

Com a proposta de avaliar a bioatividade e osteocondutividade do Biogran® em procedimentos de elevação da mucosa do seio maxilar Furusawa e Mizunuma (1997) realizaram o procedimento cirúrgico em vinte pacientes. Avaliou-se a formação óssea através de radiografias, tomografias computadorizadas, análise histológica, distribuição dos elementos, análise bioquímica e de microdureza. Os resultados foram obtidos após sete meses de cicatrização. As radiografias e tomografias mostraram que os sítios preenchidos com biomaterial apresentaram altura desejável. Segundo a análise histológica houve crescimento ósseo e os grânulos apresentaram dissolução na parte central e desenvolvimento de fissuras. Não observaram células inflamatórias. A análise de microdureza mostrou diminuição na dureza dos grânulos após o período de implantação. Os resultados sugerem que o biovidro apresenta propriedades osteocondutivas.

Johnson et al. (1997) determinaram a interface entre PerioGlas[®], implantes de titânio e tecido ósseo em coelhos. Cada animal recebeu quatro implantes de 3,3x8mm de titânio. Um foi colocado sem a criação de defeito ósseo. Os outros três receberam defeitos ósseos periféricos, adjacentes à porção coronária. Preencheu-se dois defeitos com PerioGlas[®] e um não foi preenchido (controle). Em uma semana os defeitos do grupo controle estavam preenchidos com tecido fibrovascular com mínima formação óssea. Os preenchidos com PerioGlas[®] apresentavam abundante formação de matriz osteóide ao redor do material. Com duas semanas o grupo teste demonstrou calcificação parcial, com formação de matriz osteóide através do defeito. O grupo controle apresentava mínima formação óssea, com ausência de contato com o implante. Em três semanas, os defeitos do grupo controle apresentavam poucas mudanças, enquanto os do PerioGlas[®] estavam quase completamente preenchidos com osso imaturo. Com seis semanas o grupo controle estava quase totalmente preenchido por tecido ósseo e o grupo PerioGlas[®] estava completamente preenchido com osso cortical imaturo. Na décima segunda e vigésima quarta semana, observou-se osso maduro formado preenchendo tanto os defeitos do grupo controle quanto no teste. Entretanto, o osso formado nos defeitos com biomaterial apresentavam-se mais densos e com melhor adaptação a superfície do implante. Não se observou reação de corpo estranho para o grupo tratado com PerioGlas[®].

Schmitt et al. (1997) realizaram um estudo em osso rádio de coelhos com intuito de comparar a capacidade de regeneração óssea do Bio-Oss[®] (osso poroso mineral) e PerioGlas[®] (biovidro), através de análise radiográfica e

histomorfométrica. Dividiu-se os vinte e quatro animais em tempos de cicatrização de quatro e oito semanas. Fizeram as análises radiográficas a cada duas semanas. Utilizou-se modelo de defeito de tamanho crítico, que não cicatriza espontaneamente, com 20mm. Imediatamente ao pós-operatório e duas semanas após, ambos materiais mostraram similar radiopacidade, entretanto, em quatro semanas o Bio-Oss® foi significativamente mais radiopaco, mantendo-se assim em seis e oito semanas. Com oito semanas os defeitos tratados com Bio-Oss® mostraram uma consolidação de suas características radiopacas e contorno semelhante ao pré-operatório, não ocorrendo o mesmo com o PerioGlas®. Histologicamente, os defeitos tratados com Bio-Oss® mostraram crescimento ósseo uniforme, enquanto que para o PerioGlas® o crescimento se deu das margens para o centro do defeito. Não houve evidência de reabsorção osteoclástica para nenhum material, embora as partículas de biovidro diminuíram seu tamanho de quatro para oito semanas. O PerioGlas® apresentou maior atividade fibroblástica que o Bio-Oss®. Houve significativamente mais formação óssea nos defeitos tratados com Bio-Oss® do que com PerioGlas®.

Turunen et al. (1997) utilizaram coelhos como modelo experimental para comparar biovidro (BV) com carbonato de cálcio Biocoral® (CC) como material de preenchimento ao redor de implantes de titânio e de biovidro, no interior de defeitos ósseos. Os quinze animais receberam quatro defeitos em cada tíbia totalizando cento e vinte defeitos. Avaliaram-se os tempos de três, seis e doze semanas de pós-operatório. Os resultados histológicos demonstraram discreta reação inflamatória (células mononucleares) ao redor dos grânulos de BV e CC em três semanas, para todos os grupos. A reação inflamatória não persistiu nos demais

tempos de análise. Todas as partículas de CC foram reabsorvidas após doze semanas. Não houve reabsorção das partículas de BV. Segundo a análise histomorfométrica, foi significativamente maior ($p < 0,001$) a área de tecido ósseo formada ao redor do grupo de implantes de titânio com o BV do que com o CC. Não houve diferença significativa ($p = 0,227$) nos grupos de implantes de BV. Melhores resultados foram obtidos com os implantes de BV, comparado com os de titânio, avaliando-se o contato entre o tecido ósseo formado e o implante, independente do biomaterial utilizado.

Com objetivo de determinar a capacidade do Bioglass® em promover reparação óssea em defeitos de 20mm, unilaterais, no osso radio de coelhos, Wheeler et al. (1997) utilizaram quarenta e oito animais divididos em tempos de quatro e oito semanas de cicatrização. Um grupo recebeu Bioglass® e outro não foi tratado (controle). A formação óssea foi determinada através de medidas histomorfométricas e mecânicas. Através da microscopia de fluorescência verificou-se que a quantidade de osso formado dos defeitos tratados foi significativamente maior ($p = 0,04$) em quatro semanas. Não houve diferença em oito semanas ($p = 0,23$). O Bioglass® mostrou-se mais efetivo nos períodos iniciais da cicatrização. A análise biomecânica não mostrou diferença significativa entre o grupo tratado e controle.

Utilizando doze cavidades ósseas cirurgicamente criadas em mandíbula de macacos, Cancian (1998) avaliou histologicamente a efetividade do Calcite® (Hidroxiapatita densa) e do Biogran® (Biovidro) no reparo ósseo. As cavidades foram preenchidas com Calcite®, Biogran® e deixadas sem implantação do biomaterial (controle). Os animais foram sacrificados após cento e oitenta dias.

Os resultados demonstraram que não ocorreu formação óssea no grupo controle. O Biogran[®] propiciou neoformação óssea com reparação total do defeito. A maioria das partículas foi reabsorvida e substituída por tecido ósseo. O Calcite[®] não permitiu formação óssea, e suas partículas apresentaram-se envoltas por tecido fibroso.

Através de defeitos ósseos criados na mandíbula de ratos Furusawa et al. (1998) avaliaram as propriedades de osteocondução do Biogran[®]. Criaram defeitos com 2mm de diâmetro e 1-1,5mm de profundidade em dezoito animais. Aplicaram o biovidro nos sítios e cobriram com uma membrana reabsorvível. Dividiram a amostra em seis grupos: um, dois, três, quatro, oito e dezesseis semanas de cicatrização. Os resultados da análise histológica mostraram após uma semana redução das bordas agudas, por reabsorção dos grânulos. Observou-se células osteoprogenitoras nos espaços entre os grânulos. Em duas semanas notou-se dissolução adicional das partículas e aparecimento de fissuras. Na terceira semana observaram fissuras atingindo o centro dos grânulos, preenchidas por células osteogênicas. Após quatro semanas houve reabsorção do centro do grânulo, fagocitose e formação de matriz osteóide. Com oito semanas notou-se fagocitose e invasão de célula osteogênicas nos grânulos. Em dezesseis semanas muitos grânulos apresentavam-se incorporados por tecido ósseo.

Com objetivo de determinar a eficácia do Biogran[®] no tratamento de defeitos ósseos previamente à colocação de implantes de titânio, Schepers et al. (1998) realizaram um estudo com cães. Os animais tiveram todos os pré-molares e o 1º molar extraídos de ambos os lados da mandíbula. Imediatamente após, um lado recebeu implantes de Biogran[®] e o outro serviu como controle. Após quatro meses,

colocou-se três implantes em cada lado da mandíbula. No grupo controle, o crescimento ósseo deu-se das margens do alvéolo em direção ao implante, enquanto que com Biogran[®] este crescimento ocorreu ao redor das partículas em direção ao implante. Observou-se maior crescimento ósseo para o grupo teste. Próximo à superfície do implante praticamente todos os grânulos sofreram reabsorção e aumento do diâmetro interno. Alguns grânulos foram completamente reabsorvidos. Este estudo demonstrou alta atividade de remodelação em decorrência do uso do Biogran[®].

Wheeler et al. (1998) analisaram as características biomecânicas e histológicas do PerioGlas[®] e Biogran[®] implantados em defeitos ósseos de fêmur de coelhos, verificando se o tamanho da partícula afeta o reparo. Utilizaram doze animais divididos em dois grupos com tempos de reparo de quatro e doze semanas. Removeu-se um cilindro ósseo medular do fêmur (6x1x2mm) dos espécimes. O PerioGlas[®] foi implantado no membro direito e o Biogran[®] no esquerdo. Um grupo de dez animais foi utilizado para os testes biomecânicos. Verificou-se que a porcentagem de novo osso dentro do defeito foi maior com a utilização do PerioGlas[®] em quatro e doze semanas. Não se observou diferença na deposição mineral entre os dois materiais. As partículas de Biogran[®] dentro do defeito apresentaram áreas significativamente maiores ($p < 0,05$) que as de PerioGlas[®], em ambos os tempos. Não se verificou diferença na porção de material reabsorvido nos dois grupos. Havia mais partículas de biovidro nos defeitos preenchidos com PerioGlas[®]. No grupo do Biogran[®] a média do tamanho das partículas variou de 626 μ m, 333 μ m e 299 μ m, para os tempos zero, quatro e doze semanas, respectivamente. No grupo do Perioglas[®] diminui de 416 μ m para 168 μ m (quatro

semanas) e 137 μ m (doze semanas). Histologicamente os grânulos de biovidros mostraram-se não cristalinos, alguns com fissuras, especialmente após 12 semanas. Observou-se infiltrado de células ectomesenquimais dentro destas fissuras em 4,5 % das partículas de Perioglas[®] no tempo de quatro semanas e 32,5% em doze semanas. Para o Biogran[®], observou-se 6% e 16%, respectivamente em quatro e doze semanas.

Hall et al. (1999) avaliaram a cicatrização de defeitos ósseos em cães. Os defeitos foram criados ao redor de implantes de titânio e tratados com dois biovidros de diferentes tamanhos (NRG 300-355 μ m e BRG 90-710 μ m), osso desmineralizado seco e congelado de cão (DFDBAc) e deixados vazios (controle). Extraíram-se os pré-molares e o 1º molar inferior dos animais. No terceiro mês de cicatrização os cães receberam quatro implantes. Previamente a colocação do implante, criou-se um defeito intra-ósseo (3x5x5mm). Após três meses de cicatrização e integração dos implantes as cavidades receberam os tratamentos. Sacrificou-se os cães após quatro meses. Através da histomorfometria, observou-se diferença significativa ($p=0,0379$) na média da porcentagem de osso em contato com o implante entre o grupo DFDBAc e controle. Não houve diferença significativa entre os grupos controle, BRG e NRG. Quando comparado a porcentagem de novo osso preenchendo o defeito na área implantada, DFDBAc mostrou resultados significativamente melhores ($p<0,05$) que o grupo controle. Não houve diferença significativa entre o grupo controle, BRG e NRG. A quantidade de partículas remanescentes de material no tecido mole foi estatisticamente maior ($p=0,0304$) nos sítios tratados com NRG do que com DFDBAc. Não houve diferença significativa entre BRG e DFDBAc. Conclui-se que a porcentagem de osso em contato com o

implante e a porcentagem de preenchimento ósseo no defeito ao redor do implante foram estatisticamente melhores com o uso do DFDBAc comparado com os biovidros.

Utilizando macacos como modelo experimental, Karatzas et al. (1999) determinaram histologicamente o efeito das partículas de PerioGlas® na cicatrização de defeitos periodontais. Removeu-se o osso palatino e interproximal na região dos pré-molares e dois primeiros molares superiores. Criou-se oito defeitos em cada um dos dois animais. Após oito semanas de cronicidade, preencheu-se metade dos defeitos com PerioGlas® e metade não foi preenchida com biomaterial (controle). Sacrificou-se os macacos após oito semanas. Os resultados mostraram ausência de reabsorção radicular e anquilose nos grupos teste e controle. Havia partículas remanescentes de PerioGlas® em todos os espécimes. Estas aparentavam estarem envoltas por uma camada de tecido conjuntivo, sem sinais de inflamação ou de reação de corpo estranho. A quantidade de osso e cimento formada, bem como inibição da migração apical do epitélio juncional foi estatisticamente maior no grupo do biovidro do que controle.

Oliveira et al. (1999) avaliaram microscópica e bioquimicamente a resposta celular de dois materiais obtidos a partir de osso cortical bovino, através da implantação no tecido subcutâneo de ratos. Os animais foram divididos em três grupos: GI- cápsulas de colágeno vazias; GII- cápsulas com partículas de osso cortical microgranular desproteínizado a 100°C (Gen-Ox®); GIII- cápsula com partículas de osso cortical microgranular desproteínizado a 1000°C. Os animais foram sacrificados após dez, vinte, trinta e sessenta dias. Os resultados mostraram

que a implantação do tecido ósseo mineralizado e desproteínizado induziu a formação de grânuloma com recrutamento de macrófagos e células gigantes multinucleadas, independentemente da temperatura. Os autores concluíram que estes biomateriais podem ser empregados como substitutos ósseos.

Carvalho (2000) avaliou a matriz óssea humana desmineralizada em forma de gel (Grafton DBM Gel) colocada em cavidades cirurgicamente confeccionadas em tíbias de ratos e no interior de tubos de polietileno, no tecido subcutâneo do dorso dos mesmos animais. As cavidades cirúrgicas foram cobertas com membrana de politetrafluoretileno não-expandido (Teflon-membrana Dentoflex). Os animais foram sacrificados aos sete, quinze, trinta e sessenta dias pós-operatórios. Na cavidade cirúrgica houve aceleração da formação de trabéculas ósseas e as partículas do osso implantado foram incorporadas. O material atuou como osteocondutor. Conclui-se que o material não induz à formação óssea em contato com o tecido conjuntivo e causa reação inflamatória de leve à moderada.

Santos (2000) se propôs a avaliar o comportamento biológico de quatro biomateriais, sendo duas hidroxiapatitas sintéticas (Osteogen[®] e Bioapatita[®]), uma hidroxiapatita natural (Bio-Oss[®]) e um biovidro (Biogran[®]), implantados em alvéolos de cães. Extraíam-se os primeiros e terceiros pré-molares, de ambas arcadas e ambos os lados, de dez animais. Avaliou-se a cicatrização em trinta, sessenta e duzentos dias. Os resultados histológicos mostraram que a maioria das partículas de Osteogen[®] estava em íntimo contato com tecido ósseo neoformado, porém algumas estavam envoltas por tecido conjuntivo. As partículas de Bio-Oss[®] não foram totalmente reabsorvidas e apresentaram deposição direta de tecido ósseo. Os

grânulos de Biogran[®], em alguns espécimes, estavam ausentes sugerindo reabsorção. Em outros espécimes as partículas estavam recobertas por tecido calcificado e este circundado por tecido conjuntivo. Conclui-se que a resposta histológica foi semelhante para todos os materiais. O Bio-Oss[®] apresentou maior número de partículas envolvidas por tecido ósseo, seguido pelo Osteogen[®] e Biogran[®]. Não se observou Bioapatita[®] nos alvéolos, sugerindo completa reabsorção ou expulsão. Todos os materiais retardaram o processo de reparo.

Al Ruhaimi (2001) investigou o potencial de reparo de seis materiais osteocondutivos: HTR (polimetil metacrilato /polihidróxido metil metacrilato/ hidróxido de cálcio/sulfato de bário-sintético), BOP (copolímero de metilmetacrilato-sintético), Biogran[®] (biovidro-sintético), Laddec[®] (hidroxiapatita-natural), Dembone[®] (hidroxiapatita-humana) e Osteograft[®] (hidroxiapatita-sintética), em defeitos ósseos criados em tibia de coelhos de 8mm de diâmetro. Utilizou-se vinte e oito coelhos, sendo quatro do grupo controle e vinte e quatro do grupo tratado. Os vinte e quatro animais foram divididos em seis grupos. O período de reparo foi de oito semanas. Metade do número de defeitos destinou-se a análise histológica com microscopia óptica através de coloração de Hematoxilina e Eosina e metade por meio de microscopia eletrônica de varredura. Verificou-se que o Laddec[®] possuiu o melhor potencial para osteocondução, seguido do Biogran[®] e do Osteograft[®]. Os piores reparos ósseos foram demonstrados pelo HTR e BOP, sendo que o Dembone[®] não apresentou atividade de reparo ósseo.

Schliephake e Kage (2001) avaliaram o uso de implantes reabsorvíveis para reparo de defeitos ósseos no osso parietal de ratos. Utilizaram-se

oitenta animais divididos em quatro grupos, sendo três tratados e um controle (não implantados com biomaterial). Utilizou-se implante de cerâmica porosa (α -tricálcio fosfato), cerâmica porosa com superfície tratada com vidro-cerâmica, e um implante de compósito sólido com superfície tratada com vidro cerâmico e ácido polilático, de 8mm de diâmetro por 2mm de espessura. Avaliou-se os tempos de seis, treze, vinte e seis e cinquenta e duas semanas. O grupo controle mostrou regeneração incompleta, com formação de osso de 1,66mm em média após cinquenta e duas semanas. O grupo de α -tricálcio fosfato mostrou que o osso formado durante os estágios iniciais sofreu reabsorção posterior. O reparo ósseo após cinquenta e duas semanas foi de 1,83mm. O implante de vidro-cerâmica exibiu extensiva formação óssea, quase preenchendo o defeito criado, com 3,9mm de crescimento ósseo em média. A degradação da cerâmica foi quase total, com poucas partículas circundadas por tecido mole. O implante de compósito mostrou um crescimento na média de 0,63mm. A degradação do polímero não foi completa em cinquenta e duas semanas.

Vogel et al. (2001) investigaram partículas de Bioglass® de três diferentes composições - 45S5, 52S, 55S - para avaliar o efeito da variação de solubilidade na reparação óssea em defeitos criados em coelhos. De acordo com o fabricante, os tamanhos de partícula variam de 90-710 μ m. A medição de cento e sessenta e duas partículas de material mostrou a média de 507 $\pm$ 180 μ m. Uma cavidade de 4mm de diâmetro com 8mm de profundidade foi criada anteriormente na epífise distal do fêmur. Dos doze sítios criados, preencheu-se onze com 100mg de material e um serviu como controle (não preenchido com biomaterial). Sacrificaram os animais depois de sete, vinte e oito e oitenta e quatro

dias. Dos sítios tratados, analisou-se seis com microscópio óptico, três com hibridização in situ, um com microscopia eletrônica e um permaneceu congelado em nitrogênio líquido. Verificou-se que todos os materiais foram reabsorvidos e mostraram incorporação com o tecido ósseo. Regeneração óssea ocorreu da periferia para o centro do defeito. O material 45S5 mostrou os melhores resultados de incorporação com o tecido ósseo e de reabsorção.

Zendron (2001) investigou a formação óssea vertical em torno de implantes osteointegrados, em cães. Através de acesso cirúrgico expôs-se e aplainou-se a base da mandíbula. Inseriu-se parcialmente quatro implantes, permitindo que a rosca de três implantes ficassem posicionadas acima da cortical óssea. Parafusou-se dispositivos de exclusão tecidual à cortical óssea, cobrindo a porção exposta dos implantes. Os dispositivos haviam sido previamente preenchidos com os seguintes materiais: Osso autógeno; Controle (não preenchido com biomaterial); Biogran[®] (biovidro) e Bio-Oss[®] (osso bovino inorgânico). Sacrificou-se os animais após três meses de acompanhamento. Os resultados mostraram que a formação óssea vertical foi significativamente maior no grupo de osso autógeno. O resultado obtido com o emprego do Biogran[®] foi similar ao Bio-Oss[®] e controle.

Utilizando modelos de reparação óssea em defeitos criados em coelhos, Chan et al. (2002) avaliaram o efeito da adição de dextrano (polissacarídeo formado por resíduos de glicose) ao Bioglass[®] 45S5 no comportamento biológico deste material. O dextrano foi adicionado ao material para melhorar as propriedades de manipulação, aumentando a consistência. Foram preparados defeitos de 7-8 mm na porção lateral do côndilo do fêmur e preenchidos com os materiais, sendo

divididos em grupos: GI - osso autógeno (obtido durante a confecção do defeito), GII - Bioglass® 45S5, GIII - Bioglass® 45S5 associado com dextrano, GIV - Bioglass® 45S5 em associação com osso autógeno, GV - Bioglass® 45S5 em conjunto com osso autógeno e dextrano. Utilizaram-se oito animais em cada tempo e os dois fêmures de cada espécime, totalizando dezesseis sítios por período, sendo três sítios para cada material e um reserva. Os períodos de reparo foram de dois dias, uma, duas, três, seis e doze semanas. Os resultados não mostraram evidência de toxicidade do material contendo dextrano. Todos os defeitos, independente do material, mostraram total preenchimento ósseo após seis semanas. Concluiu-se que a adição de dextrano de médio peso molecular não alterou o comportamento biológico do Bioglass®.

Por meio de defeitos criados em tíbia de ratos Holzhausen et al. (2002) compararam a eficácia de duas hidroxiapatitas para regeneração óssea, nos tempos de sete, quinze, trinta, sessenta e cento e vinte dias. Sessenta animais receberam defeitos em ambas as tíbias, perfazendo cento e vinte defeitos que receberam os seguintes tratamentos: GI- cavidade óssea sem implante de material (controle); GII- cavidade óssea preenchida com Osteogen® (controle positivo); GIII- cavidade preenchida com hidroxiapatita experimental (HAF). A utilização de ambas hidroxiapatitas provocou uma regeneração mais lenta do defeito ósseo em relação ao grupo controle. A hidroxiapatita Osteogen® apresentou maior eficácia em relação a HAF, no que se refere à capacidade de reparar os defeitos ósseos.

Sanada et al. (2003) realizaram avaliações histológicas, radiográficas e de imunoglobulinas (IgG e IgM) após implantação de enxerto de osso esponjoso

bovino desmineralizado em blocos (Gen-Ox®) no músculo abdutor da coxa de ratos. O material foi cortado em cilindros de 5mmx12mm. Realizou-se as análises aos três, sete, quatorze, vinte e um e vinte e oito dias de pós-operatório. Os resultados histológicos mostraram em três e sete dias reação inflamatória aguda com predominância de neutrófilos. No décimo quarto dia observou-se reabsorção das partículas de biomaterial, aumento de macrófagos, células gigantes multinucleadas e de fibrosamento. Aos vinte e um dias observou-se intensa e extensa angiogênese e reabsorção do material. Em vinte e oito dias não houve variação dos tipos e quantidades celulares. As análises radiográficas e histológicas não detectaram osteogênese no tecido muscular. As concentrações de IgG e IgM foram similares entre os períodos experimentais. Concluiu-se que o material é biocompatível, bioabsorvível sem capacidade osteoindutora.

O objetivo deste trabalho de Stvrtecky et al. (2003) foi avaliar histologicamente a resposta de alvéolo humano ao uso de partículas de Biogran®, previamente a colocação de implante metálico e a performance clínica e radiográfica após a colocação do mesmo. Após a extração de dente e colocação do Biogran® aguardou-se seis meses de cicatrização. O exame radiográfico deste período mostrou que o sítio estava quase completamente preenchido por tecido ósseo. Realizou-se a biópsia e colocação do implante. Após nove meses expôs-se o *abutment* e confeccionou-se a coroa provisória. A análise histológica demonstrou tecido ósseo maduro e partículas do biovidro em íntimo contato com o tecido ósseo e outras rodeadas por tecido fibroso, sem sinais de resposta inflamatória.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho se propôs a avaliar características físico-químicas e a biocompatibilidade de um biovidro desenvolvido pelo Departamento de Química – DEQUIM - CIPP da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG e compará-lo com dois biovidros disponíveis no comércio (PerioGlas[®] e Biogran[®]), através da implantação no tecido subcutâneo de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pela Pró-reitoria de pesquisa - PROPESP da Universidade Estadual de Ponta Grossa (01205/2003).

A pesquisa se dividiu em análise das características físico-químicas e avaliação da biocompatibilidade dos biovidros, através da implantação dos materiais no tecido subcutâneo de ratos.

Utilizaram-se três biovidros, sendo dois disponíveis no comércio e outro desenvolvido pelo Departamento de Química – DEQUIM - CIPP da Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG:

- PerioGlas® (*US Biomaterials Corporation*, Alachua - Flórida, lote 3156T2) adquirido junto a revendedora no Brasil- Promodent.
- Biogran® (*Orthovita Palm Beach Gardens* - Flórida, lote 1203598) adquirido junto à revendedora no Brasil - *Implant innovations*.
- Biovidro - UEPG preparado através da mistura de pó de vidro (45% SiO₂, 24,5% CaO, 24,5% Na₂O e 6% P₂O₅, por peso) e fundição em recipiente de platina a 1350°C. As partículas foram limpas com ultra-som e esterilizadas em autoclave (Cristófoli®, Brasil) a 130°C por 2 horas. Não se realizou nenhum tratamento na superfície das partículas.

Os materiais foram pesados em câmara de fluxo laminar com balança analítica e acondicionados em frascos plásticos codificados por cor sem o conhecimento prévio do operador. O desenvolvimento de toda a pesquisa

(caracterização físico-química e análise de biocompatibilidade) caracterizou um estudo cego (operador não tinha conhecimento do material a ser analisado).

4.1 ANÁLISE FÍSICA

4.1.1 Microscópico eletrônico de varredura (MEV)

Determinou-se o tamanho das partículas e sua morfologia original (previamente à implantação nos animais) através do MEV JEOL JSM T330 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Utilizou-se uma pequena quantidade de material, suficiente apenas para cobrir o porta-amostra do microscópio. Fixou-se a amostra com uma fita adesiva específica para esta análise. As amostras foram recobertas com ouro puro até a deposição de uma camada de 20-25nm de espessura. Realizaram-se micrografias com aumento de 100 vezes para determinação do tamanho e morfologia das partículas e 5000 vezes para análise da superfície das partículas.

As imagens foram digitalizadas com uma câmara digital. O tamanho do grânulo foi determinado através do software de análise de imagens Mocha[®] versão 1.2 (*Jandel Corporation*, USA), medindo-se os pontos mais eqüidistantes da partícula. Mediu-se todos os grânulos presentes na micrografia eletrônica de varredura. Prancha 2 - figura 1.4.

4.2 ANÁLISE QUÍMICA

4.2.1 Fluorescência de Raios X (FRX)

Utilizando o aparelho de fluorescência de Raios X EDX-700 (Shimadzu, Kyoto, Japão) identificou-se os elementos químicos presentes. Empregou-se uma pequena quantidade de material, suficiente apenas para cobrir o porta-amostra.

4.2.2 Difractometria de Raios X (DRX)

Através do aparelho de difratometria de Raios X XRD-6000 (Shimadzu-XRD-6000, Kyoto, Japão) determinou-se a estrutura das amostras, verificando se eram ou não cristalinas. Empregou-se uma pequena quantidade de material, suficiente apenas para cobrir o porta-amostra.

4.2.3 Microscópio eletrônico de varredura/ Energia dispersiva de Raios X (MEV-EDX)

Utilizando o MEV-EDX JEOL SEM 8400 (Shimadzu, Kyoto, Japão) determinou-se à composição química dos materiais. Utilizou-se uma pequena quantidade de material, suficiente apenas para cobrir o porta-amostra do

microscópio. Fixou-se a amostra com uma fita adesiva específica para esta análise. O tempo de aquisição dos dados foi de 300 segundos, utilizando 20Kv.

4.3 ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE

Para a realização deste estudo utilizou-se 100 ratos (*Norvergicus albinus wistar*), machos e fêmeas (COSTA, 2001), com idade variando de 2-3 meses e peso de 200-300 gramas. Os animais procederam do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde os mesmos mantinham-se em condições de saúde satisfatória, recebendo alimentação adequada (Nuvilab®, Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo - Brasil), sendo que dez dias durante o mês esta alimentação recebeu vermífugo (Nuvilab SBZ®, Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo - Brasil) e água “ad libitum”.

Dividiu-se os animais em quatro grupos:

- GI - PerioGlas® - vinte e cinco animais
- GII - Biogran® - vinte e cinco animais
- GIII - Biovidro UEPG - vinte e cinco animais
- GIV - Grupo controle (procedimento cirúrgico sem implantação do biomaterial) - vinte e cinco animais

Subdividiu-se esses quatro grupos em cinco tempos para análise do material implantado, sendo sete, quinze, vinte e um, quarenta e cinco e sessenta dias. Esquema 1 e 2.

4.3.1 Estudo piloto

Previamente a execução da parte experimental realizou-se um estudo piloto para determinação da dose anestésica ideal para os animais, treinamento dos procedimentos cirúrgicos e determinação do protocolo cirúrgico a ser empregado.

4.3.2 Procedimento cirúrgico

Inicialmente pesou-se e identificaram-se os ratos. Os animais foram anestesiados com 10mg/ml de Rompun® (cloridrato de 2-(2,6 xilidino)-5, 6-dihidro-4H 1, 3- tiazina a 2% - Bayer do Brasil) em água destilada associado a 30mg/ml de Vetanarcol® (cloridrato de 2-(0-clorofenil)-2(metilamino) ciclohexanona – König do Brasil) em água destilada, via intraperitonal, aplicando 0,2ml da solução final por 100 gramas de peso do animal.

Realizou-se a tricotomia da região dorsal (COSTA, 2001; OLIVEIRA et al., 1999) e anti-sepsia com álcool iodado (95% de álcool a 70% em 5% de iodo). Fez-se a incisão e divulsão através de uma tesoura de ponta romba (COSTA, 2001) Metzenbaum-14 Duflex® (SS White, Brasil). A incisão ocorreu na linha sagital mediana no terço médio do dorso (GREGHI; CAMPOS JÚNIOR, 1994; PESCHINI, 1995), com cerca de 15mm. Prancha 1 - figura 1.1. A divulsão ocorreu tanto do lado direito como do esquerdo com aproximadamente 18mm de extensão com 15mm de largura. Se durante o procedimento de divulsão ocorresse sangramento o animal seria descartado da pesquisa.

Cada animal recebeu somente um material, sendo implantados 30mg (OLIVEIRA et al., 1993) de cada lado, por meio de uma cureta Duflex® nº 85 (SS White, Brasil). Prancha 1 - figura 1.2. Para melhorar as propriedades de manipulação dos biovidros e facilitar a implantação no tecido subcutâneo, acrescentou-se uma gota de solução salina 0,9%. A sutura foi realizada com pontos isolados utilizando-se fio agulhado mononylon 5-0 Shalon® e porta-agulha Duflex® (SS White, Brasil). Prancha 1 - figura 1.3.

4.3.3 Cuidados pós-operatórios

No pós-operatório os grupos de animais permaneceram em suas respectivas caixas, mantendo-os desta forma separados de acordo com o tempo de pós-operatório. Os animais receberam alimentação convencional e água “ad libitum”. Não foi dado nenhum medicamento aos animais, tendo em vista que no trabalho piloto não se observou sinais clínicos de infecção ou inflamação.

4.3.4 Obtenção das peças

A biópsia ocorreu depois de transcorrido o tempo determinado para cada subgrupo. Anestesiou-se novamente os animais. Feita a anti-sepsia, conforme já descrito, procedeu-se à biópsia da região implantada. Prancha 1 - figura 1.4. Posteriormente, sacrificou-se o animal por meio de deslocamento cervical.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único operador treinado.

4.3.5 Processamento histológico

Obteve-se duas amostras em cada animal (uma do lado direito e outra do esquerdo). Fez-se duas lâminas para cada amostra, sendo uma corada com Hematoxilina e Eosina (HE) e outra com Tricrômico de Masson. Cada lâmina apresentou três cortes. Fixou-se as peças com solução de Alfac (álcool 80% - 85ml, formol - 10ml, ácido acético - 5ml) por 12 horas. Lavou-se em água corrente. Manteve-se as biópsias acondicionadas em álcool 70% até o momento da desmineralização. Em seguida desmineralizou-se com solução de Morse (ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20%, em partes iguais) por 14 dias, em média. As peças foram desidratadas em solução de álcool etílico 70% por 12h, álcool 90% durante 1h e álcool absoluto por 20h. Incluiu-se as peças em parafina e cortou-se em micrótomo manual. Os cortes foram realizados transversalmente à região implantada, com 5µm de espessura, e semi-seriados com espaçamento de 150µm. Esticou-se os cortes em banho-maria a 45°C e colocou-se em lâminas de vidro.

4.3.6 Análise histológica

Através de microscópio óptico analisou-se as lâminas confeccionadas, avaliando-se os grânulos dos materiais, tecido conjuntivo, tipos celulares e resposta inflamatória adjacente aos grânulos.

4.3.7 Determinação do tamanho da reação inflamatória

Realizou-se uma análise prévia das lâminas histológicas, selecionando-se as uniformemente isotrópicas (apresentam as mesmas características em todas as direções). As lâminas isotrópicas foram aleatoriamente selecionadas e empregadas para determinação do tamanho da reação inflamatória, tamanho do grânulo e determinação das células.

Para determinação do tamanho da reação inflamatória analisaram-se quatro lâminas coradas por HE e quatro coradas com Tricrômico de Masson, para cada tempo e cada grupo experimental, através de microscopia óptica (MO) com aumento final de 100x. Obtiveram-se cinco medidas de cinco diferentes áreas, de cada uma das lâminas histológicas analisadas.

A medição da reação inflamatória ocorreu com auxílio de uma lâmina objeto apresentando uma régua ocular previamente calibrada com coeficiente micrométrico, conforme método preconizado por Mandarin-de-Lacerda (2003) para medidas lineares. Para esta análise, utilizou-se como parâmetro posicionar a régua ocular sobre a primeira camada de células em contato com o biovidro introduzido no subcutâneo e medir o tamanho do tecido conjuntivo, com a reação inflamatória, até a primeira camada de células musculares estriadas presentes na derme do animal. Prancha 2 - figura 2.1. No grupo controle mediu-se a reação inflamatória presente entre os tecidos musculares.

4.3.8 Determinação de polimorfonuclear (PMN), mononuclear (MN) e fibroblasto (F)

Para esta análise utilizaram-se cinco lâminas coradas por HE, para cada grupo experimental e cada tempo pós-operatório. Realizou-se a contagem destas células em cinco diferentes áreas de cada lâmina histológica, através de microscopia óptica com aumento final de 400x.

Para quantificar o número das respectivas células presentes em torno do material implantado no tecido subcutâneo dos ratos, criou-se um sistema teste linear com dez pontos de referência. O sistema baseou-se em uma lâmina objeto apresentando uma régua ocular previamente calibrada. A régua era posicionada paralelamente e perpendicularmente as partículas, delimitando uma área com tamanho conhecido. Contou-se o número de células mononuclear (MN), polimorfonuclear (PMN) e fibroblasto (F), presentes no tecido conjuntivo no interior da área delimitada. As células que tocavam na régua eram excluídas da contagem. Prancha 2 - figura 2.2.

4.3.9 Determinação do tamanho do grânulo

Para mensuração do tamanho dos grânulos, utilizaram-se as mesmas lâminas selecionadas para a determinação das células. Mediram-se cinco grânulos aleatórios de cada lâmina histológica, através de microscopia óptica com aumento final de 100x.

Realizou-se a medição do tamanho das partículas dos biovidros com auxílio de uma lâmina objeto apresentando uma régua ocular previamente calibrada

com coeficiente micrométrico. A régua era colocada sobre a partícula e efetuava-se a medida. Prancha 2- figura 2.3.

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

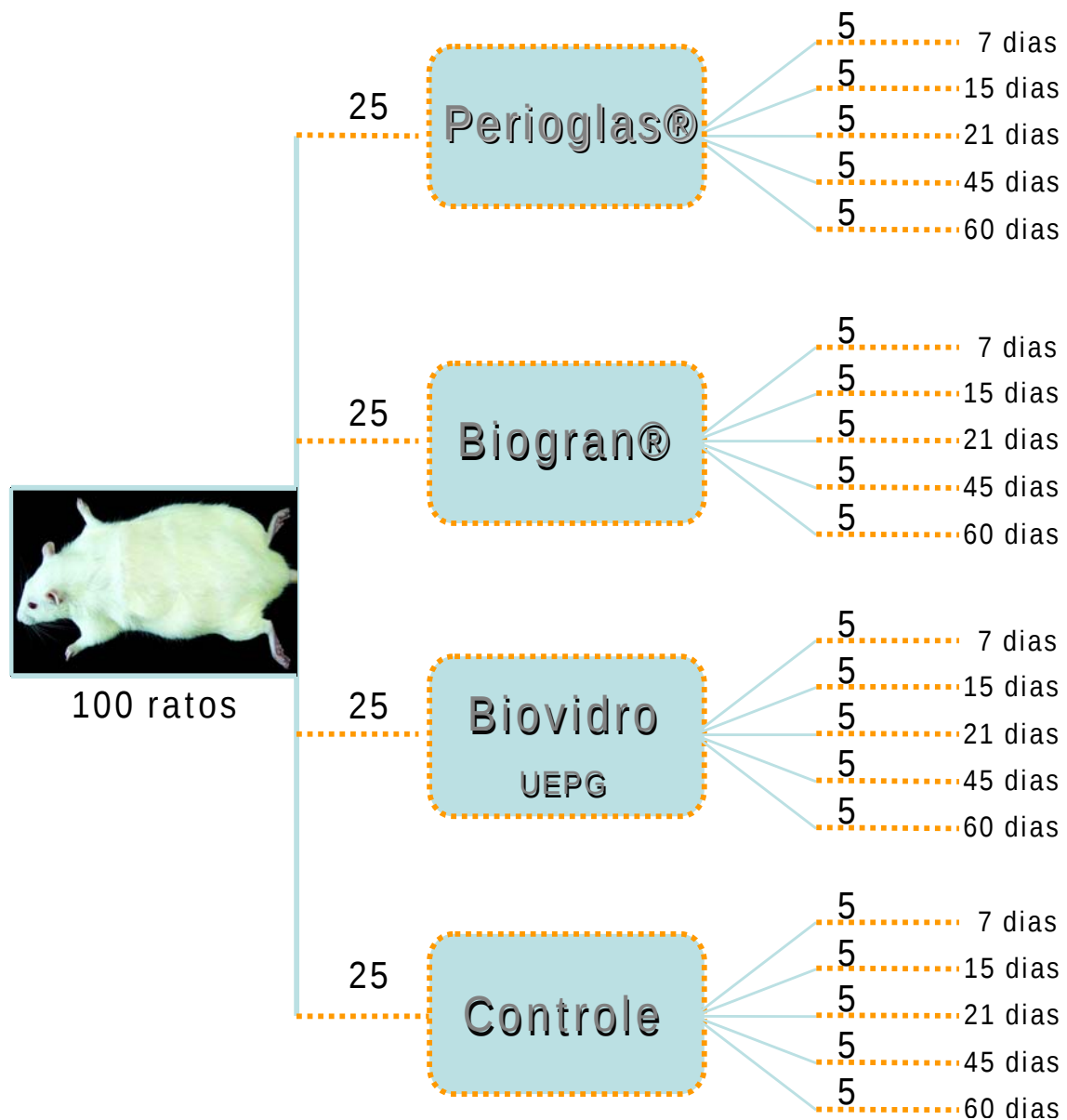
A análise de reprodutibilidade dos dados obtidos com as variáveis: tamanho dos grânulos, previamente à implantação (MEV), tamanho da reação inflamatória (MO), tamanho dos grânulos nos vários tempos pós-operatórios (MO) e contagem das células PMN, MN e F (MO), foi realizada em dois momentos distintos, em ordem aleatória, pelo examinador. Os dados foram analisados obtendo-se as diferenças entre as medidas em dois momentos, testando-se a reprodutibilidade através do coeficiente de correlação intraclass.

As comparações dos resultados para as variáveis dependentes: tamanho dos grânulos previamente à implantação, reação inflamatória, contagem das células e tamanho dos grânulos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA com um e dois critérios). Foram considerados fatores fixos (variáveis independentes) o tempo e material, sendo analisados os resultados individuais, bem como as interações entre os fatores.

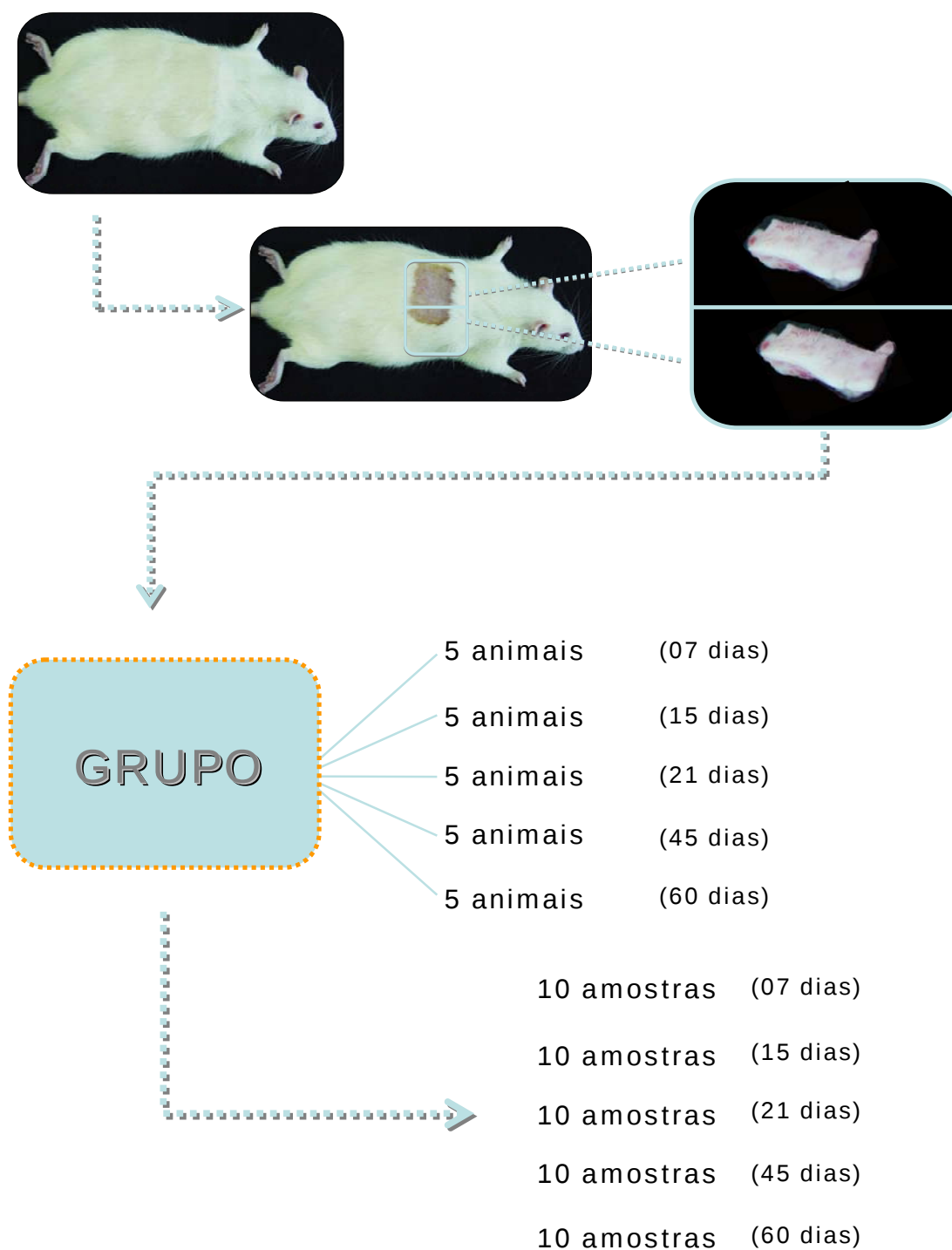
Realizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentavam distribuição normal. Verificou-se se os dados apresentavam equivalência de variância através do teste de Levene.

O nível de significância adotado foi de 0,05, desta forma se $p > 0,05$ a hipótese nula (H_0), na qual não haveria diferença significativa entre os grupos seria aceita. Caso $p \leq 0,05$, H_0 não seria aceita, indicando diferenças significativas entre os

grupos. Diante desta condição a comparação entre os valores médios das variáveis foi realizada através do teste de Tukey HSD, com o objetivo de determinar entre quais grupos havia as diferenças significativas. Aos dados que não apresentaram equivalência entre as variâncias foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Games-Howell. Os dados de contagem de PMN, MN e F foram transformados em percentagem. Os dados de tamanho da reação inflamatória foram transformados através de logaritmo na base natural. Todos os cálculos foram realizados através do software estatístico SPSS® (*Statistical Package for the Social Science*), versão 11.5.1 for Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois).



Esquema 1- Os 100 animais da pesquisa foram divididos em 4 grupos, com 25 animais em cada. Os grupos foram divididos em cinco subgrupos de tempo, como 5 animais em cada.



Esquema 2- Cada animal recebeu o tratamento nos dois lados do dorso, resultando em duas amostras por animal. Assim, cada grupo apresentou cinco animais por tempo operatório, resultando em 10 amostras por tempo operatório em cada grupo.

PRANCHA 1- Procedimentos cirúrgicos.

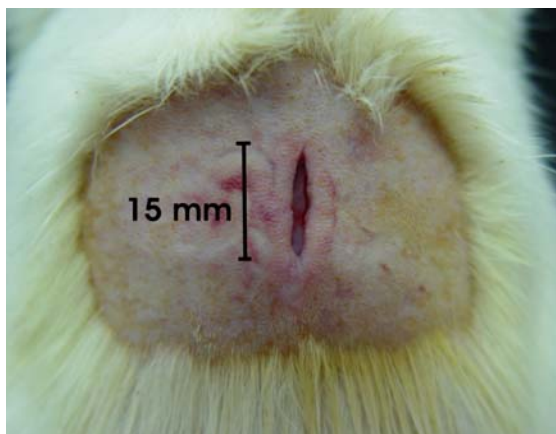


Figura 1.1



Figura 1.2



Figura 1.3



Figura 1.4

Figura 1.1- Incisão de aproximadamente 15mm realizada com tesoura de ponta romba.

Figura 1.2- Implantação do biomaterial no tecido subcutâneo do rato.

Figura 1.3- Dorso do animal, após o tratamento, suturado com fio mononylon agulhado Shalon®.

Figura 1.4- Remoção da peça contendo o material implantado.

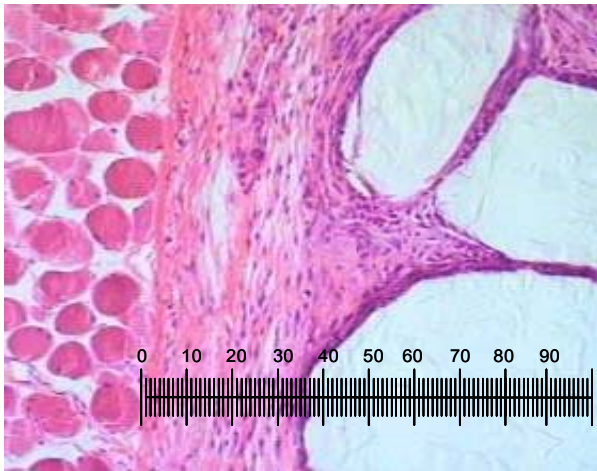
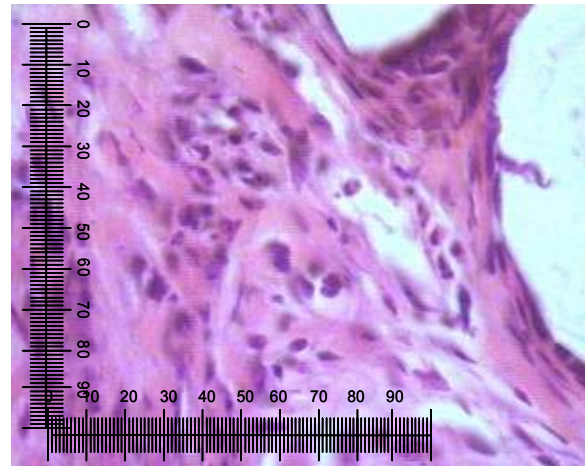
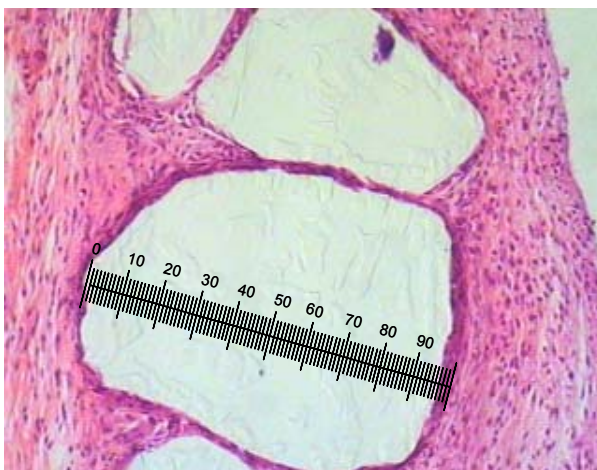
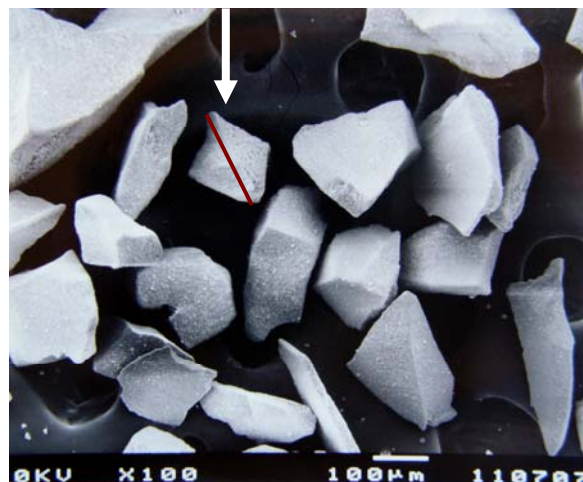
PRANCHA 2- Microscopias ópticas e eletrônicas empregadas na metodologia.**Figura 2.1****Figura 2.2****Figura 2.3****Figura 2.4**

Figura 2.1- Lâmina corada com HE, aumento de 100x. Medição do tamanho da reação inflamatória.

Figura 2.2- Lâmina corada com HE, aumento de 400x. Contagem de PMN, MN e F.

Figura 2.3- Lâmina corada com HE, aumento de 100x. Medição do tamanho dos grânulos dos biovidros, após implantação nos animais.

Figura 2.4- Microscopia eletrônica de varredura, aumento de 100x. Medição do tamanho dos grânulos dos biovidros previamente à implantação (seta).

5 RESULTADOS

O teste de biocompatibilidade é considerado um pré-requisito para materiais que estão em processo de desenvolvimento, como neste caso o Biovidro-UEPG. O Perioglass® e o Biogran®, produtos comercialmente disponíveis, de eficácia clínica e histológica cientificamente comprovada foram utilizados como controles positivos.

Apresentaremos os resultados divididos em observações clínicas, análise físico-química e análise de biocompatibilidade.

5. 1 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

Nenhum animal da pesquisa apresentou problemas de saúde durante os procedimentos cirúrgicos, bem como no tempo de pós-operatório. Da mesma forma, durante a divulsão, não ocorreu sangramento e/ou perfuração do peritônio. Deste modo, nenhum rato foi descartado durante a pesquisa.

Todos os materiais testados apresentaram boas características de manipulação.

5. 2 ANÁLISE FÍSICA

5.2.1 MEV

Por meio do microscópico eletrônico de varredura determinou-se o tamanho e morfologia das partículas dos biovidros previamente à implantação nos animais. O coeficiente de correlação intraclasse para a determinação do tamanho das partículas através do MEV foi $\alpha=0,99$, mostrando adequada reprodutibilidade por parte do pesquisador. Prancha 9 - gráfico 9.1 (ANEXO). Os resultados apresentam-se divididos de acordo com os materiais.

- **PerioGlas®**

O PerioGlas® apresentou-se como blocos grandes, não uniformes com bordas pontiagudas e arredondadas. O tamanho médio das partículas foi de $222,00\pm40,64\mu\text{m}$. Prancha 3 - figura 3.1. Tabela 16 (ANEXO). As faces apresentaram rugosidade superficial.

A microscopia eletrônica de varredura com aumento de 5000x confirmou a rugosidade superficial, através da presença de pequenas partículas ($0,5\text{-}1\mu\text{m}$) com faces planas na superfície dos grânulos. Prancha 3 - figura 3.2.

▪ Biogran®

Conforme se observa na prancha 3 - figura 3.3, o Biogran® exibiu partículas na forma de blocos irregulares, pontiagudos e arredondados com tamanho médio de $385,09 \pm 68,51 \mu\text{m}$. Tabela 16 (ANEXO). A superfície das partículas apresentou-se rugosa. Em aumento de 5000x comprovou-se a rugosidade superficial através de dendritos com tamanho de $1,5\text{-}2 \mu\text{m}$. Prancha 3 - figura 3.4.

▪ Biovidro – UEPG

As partículas do biovidro-UEPG apresentaram-se não uniformes com bordas pontiagudas, arredondadas e superfície rugosa. O tamanho médio dos grânulos foi de $102,86 \pm 36,22 \mu\text{m}$. Prancha 3 - figura 3.5. Tabela 16 (ANEXO). Através do aumento de 5000x comprovou-se a rugosidade superficial. Prancha 3 - figura 3.6.

De acordo com o teste estatístico ANOVA um critério, houve diferença significativa no tamanho dos grânulos ($p < 0,001$). Tabela 1 e 2. Prancha 7 - gráfico 7.1. Tabela 37, 38 e 39 (ANEXO).

Os três materiais apresentaram estrutura não cristalina com pontos de cristalização.

Tabela 1- Estatística descritiva - Tamanho dos grânulos previamente à implantação.

Grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão
PerioGlas®	20	221,996	40,644	9,08845
Biovidro UEPG	30	102,868	36,224	6,61361
Biogran®	10	385,086	68,506	21,66362
Total	60	189,613	112,029	14,46299

$p < 0,001$ fator tempo, grupo e interação (tempo*grupo)

Tabela 2- Pós-teste Tukey HSD. Comparação entre os grupos - Tamanho dos grânulos previamente à implantação.

Grupos	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de p
PerioGlas® X Biovidro UEPG	119,128	12,777	< 0,001*
PerioGlas® X Biogran®	-163,090	17,143	< 0,001*
Biovidro UEPG X Biogran®	-282,218	16,162	< 0,001*

* Diferenças significativas

5. 3 ANÁLISE QUÍMICA

5. 3. 1 Fluorescência de Raios X (FRX)

Utilizando FRX identificou-se na amostra dos três biovidros cálcio, oxigênio, sódio, fósforo e sílica. Os resultados demonstraram que os elementos químicos presentes estão na forma de: óxido de sílica (SiO_2), óxido de sódio (Na_2O), óxido de cálcio (CaO) e óxido de fósforo (P_2O_5).

5. 3. 2 Difratometria de Raios X (DRX)

Os resultados da DRX comprovaram que as três amostras são materiais não cristalinos. Prancha 8 - gráficos 8.1, 8.2, 8.3 e 8.4.

5.3. 3 MEV/EDX

Os resultados do MEV/EDX indicaram a presença de sílica, cálcio, fósforo e sódio nas três amostras. Nenhum dos materiais apresentou impurezas, sendo visualizados somente os elementos participantes segundo informações dos fabricantes. Prancha 4 - figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4.

5. 4 ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE

5. 4. 1 Análise histológica – Microscópico óptico

▪ SETE DIAS

Em sete dias os grânulos de todos os biomateriais apresentaram-se sem fissuras. Observaram-se células polimorfonucleares e mononucleares ao redor das partículas. O tecido conjuntivo apresentava fibroblastos e alguns fibrócitos. Notou-se vasos sanguíneos e capilares na área analisada. O tecido do grupo controle estava semelhante ao dos grupos teste. Prancha 5 - figura 5.1 e 5.2.

▪ QUINZE DIAS

O tecido conjuntivo apresentava-se semelhante para os quatro grupos experimentais, com a presença de fibroblastos e alguns fibrócitos. Notou-se

vasos sanguíneos e capilares na área analisada. Observou-se alguns polimorfonucleares e mononucleares em maior quantidade. Encontrou-se células gigantes multinucleadas, entretanto em pouca quantidade. Houve início a formação de fissuras nos grânulos. Prancha 5 - figura 5.3 e 5.4.

▪ VINTE E UM DIAS

Os grânulos apresentaram quantidade significativa de fissuras. Observou-se tecido conjuntivo no interior destas. Notou-se células polimorfonucleares e mononucleares ao redor das partículas. O tecido conjuntivo apresentava fibroblastos e poucos fibrócitos. Havia vasos sanguíneos e capilares na área analisada. Os resultados do grupo controle foram semelhantes. Prancha 5 - figura 5.5 e 5.6.

▪ QUARENTA E CINCO DIAS

Em quarenta e cinco dias observou-se células polimorfonucleares, mononucleares, fibroblastos, fibrócitos, vasos sanguíneos e capilares nos quatro grupos analisados. Os grânulos apresentaram muitas fissuras, preenchidas por tecido conjuntivo. Houve grande variação no tamanho das partículas dos biovidros. Prancha 6 - figura 6.1 e 6.2.

▪ SESSENTA DIAS

Em sessenta dias, os grânulos apresentaram grandes fissuras. A maioria dos grânulos estava dividida em várias partes em decorrência das fissuras, que estavam preenchidas por tecido conjuntivo. Observou-se, nos grupos teste e controle, células polimorfonucleares e mononucleares em menor quantidade. O tecido conjuntivo apresentava fibroblastos e fibrócitos. Prancha 6 - figura 6.3, 6.4, 6.5 e 6.6.

5. 4. 2 Determinação do tamanho da reação inflamatória

O coeficiente de correlação intraclassa para a determinação do tamanho da reação inflamatória foi $\alpha=1$, mostrando boa consistência na obtenção dos dados pelo pesquisador. Prancha 9 - gráfico 9.2 (ANEXO). Os resultados do tamanho da reação inflamatória dos quatro grupos experimentais nos cinco tempos de análise estão agrupados na prancha 7 - gráfico 7.2.

Segundo o teste estatístico ANOVA dois critérios houve diferença significativa ($p<0,001$) no tamanho da reação inflamatória entre os grupos, tempos e interação (grupo e tempo). Tabela 3, 4 e 5. Tabela 17, 18, 19, 20, 21, 33, 40 e 41 (ANEXO).

Tabela 3- Estatística descritiva - Tamanho de reação inflamatória (valores transformados log). Fator interação grupos * tempo (dias).

Grupos	Tempo (dias)	Média	Desvio Padrão	N
PerioGlas®	7 dias	4,5163	0,46363	8
	15 dias	3,0918	0,35441	8
	21 dias	3,9116	0,89386	8
	45 dias	4,9401	0,50781	8
	60 dias	4,2990	0,23054	8
	Total	4,1518	0,81354	40
Biovidro-UEPG	7 dias	4,7973	0,48035	8
	15 dias	5,2588	0,42523	8
	21 dias	5,0867	0,31617	8
	45 dias	5,1643	0,88060	8
	60 dias	4,5542	0,48694	8
	Total	4,9723	0,58547	40
Controle	7 dias	4,6052	0,00000	8
	15 dias	4,5185	0,24506	8
	21 dias	4,4319	0,32086	8
	45 dias	4,6052	0,00000	8
	60 dias	3,9987	0,24506	8
	Total	4,4319	0,30397	40
Biogran®	7 dias	4,6523	0,34006	8
	15 dias	4,3207	0,37270	8
	21 dias	4,4955	0,54595	8
	45 dias	4,7927	0,53037	8
	60 dias	4,7997	0,29700	8
	Total	4,6122	0,44716	40
Total	7 dias	4,6428	0,37072	32
	15 dias	4,2974	0,86050	32
	21 dias	4,4814	0,68743	32
	45 dias	4,8756	0,58317	32
	60 dias	4,4129	0,43636	32
	Total	4,5420	0,63820	160

p<0,001 fator tempo, grupo e interação (tempo*grupo)

Tabela 4- Pós-teste Games Howell. Comparação entre os grupos - Tamanho da reação inflamatória (valores transformados log).

Grupos	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de p
PerioGlas® X Biovidro UEPG	-0,820	0,158	< 0,001*
PerioGlas® X Controle	-0,280	0,137	0,187
PerioGlas® X Biogran®	-0,460	0,146	0,014*
Biovidro UEPG X Controle	-0,540	0,104	< 0,001*
Biovidro UEPG X Biogran®	-0,360	0,116	0,015*
Controle X Biogran®	-0,180	0,85	0,161

* Diferenças significativas

Tabela 5- Pós-teste Games Howell. Comparação entre os tempos (dias) - Tamanho da reação inflamatória (valores transformados log).

Tempo	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor p
7 dias X 15 dias	0,345	0,165	0,246
7 dias X 21 dias	0,161	0,138	0,769
7 dias X 45 dias	-0,232	0,122	0,327
7 dias X 60 dias	0,229	0,101	0,169
15 dias X 21 dias	-0,184	0,194	0,878
15 dias X 45 dias	-0,578	0,183	0,022*
15 dias X 60 dias	-0,115	0,170	0,960
21 dias X 45 dias	-0,394	0,159	0,110
21 dias X 60 dias	0,068	0,143	0,989
45 dias X 60 dias	0,462	0,128	0,006*

* Diferenças significativas

5. 4. 3 Contagem de PMN, MN e F

O coeficiente de correlação intraclasse para contagem das células selecionadas foi $\alpha=0,99$, mostrando boa reprodutibilidade dos dados obtidos pelo pesquisador. Prancha 9 - gráfico 9.3 (ANEXO).

Os valores das contagens de polimorfonucleares, mononucleares e fibroblastos presentes na reação tecidual dos cinco tempos de avaliação estão apresentados em percentuais na prancha 7 - gráficos 7.3, 7.4 e 7.5.

- **Polimorfonuclear (PMN)**

Segunda a análise estatística através do teste de ANOVA dois critérios houve diferença significativa ($p<0,001$) no percentual de células polimorfonucleares nos fatores grupo, tempo e interação (tempo e grupo). Porém, não houve diferença significativa entre os grupos de biovidro, havendo apenas entre esses e o grupo controle. Tabela 22, 23, 24, 25, 26, 34, 42, e 43 (ANEXO).

Tabela 6- Estatística descritiva - Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).

Grupos	Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	N
PerioGlas®	7 dias	4,532	2,543	5
	15 dias	6,410	7,400	5
	21 dias	20,246	13,177	5
	45 dias	19,378	9,767	5
	60 dias	8,538	2,416	5
	Total	11,820	10,105	25
Biovidro UEPG	7 dias	8,324	1,555	5
	15 dias	4,642	3,535	5
	21 dias	19,212	6,658	5
	45 dias	23,304	4,523	5
	60 dias	16,560	3,384	5
	Total	14,408	8,064	25
Controle	7 dias	0,000	0,000	5
	15 dias	2,968	4,068	5
	21 dias	4,444	7,244	5
	45 dias	0,000	0,000	5
	60 dias	2,858	6,390	5
	Total	2,054	4,644	25
Biogran®	7 dias	5,214	1,748	5
	15 dias	11,870	4,840	5
	21 dias	21,558	4,818	5
	45 dias	13,498	7,630	5
	60 dias	8,550	3,383	5
	Total	12,138	7,172	25
Total	7 dias	4,517	3,438	20
	15 dias	6,472	5,861	20
	21 dias	16,365	10,602	20
	45 dias	14,045	10,894	20
	60 dias	9,126	6,301	20
	Total	10,105	9,0032	100

p<0,001 fator tempo, grupo e interação (tempo*grupo)

Tabela 7- Pós-teste Games Howell. Comparação entre os grupos - Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).

Grupos	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor p
PerioGlas® X Biovidro UEPG	-2,587	2,5857	0,75
PerioGlas® X Controle	9,766	2,2243	0,001*
PerioGlas® X Biogran®	-0,317	2,4784	0,999
Biovidro UEPG X Controle	12,354	1,8612	<0,001*
Biovidro UEPG X Biogran®	2,270	2,1585	0,720
Controle X Biogran®	-10,084	1,7090	<0,001*

* Diferenças significativas

Tabela 8- Pós-teste Games Howell. Comparação entre os tempos (dias) - Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).

Tempo	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor p
7 dias X 15 dias	-1,955	1,519	0,701
7 dias X 21 dias	-11,847	2,492	0,001*
7 dias X 45 dias	-9,527	2,554	0,009*
7 dias X 60 dias	-4,609	1,605	0,054
15 dias X 21 dias	-9,892	2,709	0,008*
15 dias X 45 dias	-7,572	2,766	0,072
15 dias X 60 dias	-2,654	1,924	0,644
21 dias X 45 dias	2,320	3,399	0,959
21 dias X 60 dias	7,238	2,757	0,090
45 dias X 60 dias	2,814	2,814	0,421

* Diferenças significativas

▪ Mononuclear (MN)

De acordo com o teste estatístico ANOVA dois critérios não houve diferença significativa na contagem de células mononucleares nos fatores grupo (0,117). Houve diferença significativa na interação ($p=0,022$) e tempo ($p<0,001$). Tabela 22, 23, 24, 25, 26, 35, 44 e 45 (ANEXO).

Tabela 9- Estatística descritiva - Contagem de MN (valores transformados em percentagens).

Grupos	Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	N
PerioGlas®	7 dias	38,910	15,481	5
	15 dias	46,656	6,583	5
	21 dias	16,650	6,533	5
	45 dias	18,778	2,896	5
	60 dias	25,048	11,684	5
	Total	29,208	14,852	25
Biovidro UEPG	7 dias	44,712	6,786	5
	15 dias	38,838	15,926	5
	21 dias	32,940	15,325	5
	45 dias	13,960	6,861	5
	60 dias	4,670	2,055	5
	Total	27,024	18,408	25
Controle	7 dias	34,320	8,832	5
	15 dias	23,486	6,436	5
	21 dias	14,446	13,475	5
	45 dias	18,254	25,961	5
	60 dias	16,858	20,513	5
	Total	21,4728	16,874	25
Biogran®	7 dias	46,8580	6,245	5
	15 dias	27,1720	8,417	5
	21 dias	21,0920	3,178	5
	45 dias	21,6980	8,676	5
	60 dias	23,4500	16,021	5
	Total	28,0540	13,11802	25
Total	7 dias	41,200	10,502	20
	15 dias	34,038	13,260	20
	21 dias	21,282	12,349	20
	45 dias	18,172	13,321	20
	60 dias	17,506	15,491	20
	Total	26,439	15,977	100

p=0,117 grupo
p<0,001 tempo
p=0,022 interação

Tabela 10- Pós-teste Games Howell. Comparação entre os tempos (dias) - Contagem de MN (valores transformados em percentagens).

Tempo	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor p
7 dias X 15 dias	7,162	3,782	0,339
7 dias X 21 dias	19,918	3,624	<0,001*
7 dias X 45 dias	23,028	3,793	<0,001*
7 dias X 60 dias	23,694	4,185	<0,001*
15 dias X 21 dias	12,756	4,051	0,025*
15 dias X 45 dias	15,865	4,202	0,005*
15 dias X 60 dias	16,531	4,559	0,007*
21 dias X 45 dias	3,109	4,061	0,939
21 dias X 60 dias	3,775	4,430	0,912
45 dias X 60 dias	4,568	4,568	1,000

* Diferenças significativas

▪ Fibroblastos (F)

Em relação à contagem de fibroblastos, através do teste ANOVA dois critérios não houve diferença significativa nos fatores grupo ($p=0,131$) e interação ($p=0,665$). Houve diferença significativa no fator tempo ($p=0,008$). Tabela 22, 23, 24, 25, 26, 36, 46 e 47 (ANEXO).

Tabela 11- Estatística descritiva - Contagem de F (valores transformados em percentagens).

Grupos	Tempo (dias)	Média	Erro padrão	N
PerioGlas®	7 dias	56,552	16,552	5
	15 dias	46,932	4,795	5
	21 dias	63,106	13,555	5
	45 dias	58,178	13,564	5
	60 dias	66,414	13,390	5
	Total	58,236	13,666	25
Biovidro UEPG	7 dias	45,964	7,408	5
	15 dias	56,520	16,875	5
	21 dias	47,846	18,570	5
	45 dias	62,736	8,691	5
	60 dias	78,770	4,520	5
	Total	58,567	16,480	25
Controle	7 dias	64,722	10,564	5
	15 dias	73,546	6,704	5
	21 dias	61,110	34,507	5
	45 dias	61,746	41,968	5
	60 dias	80,284	21,054	5
	Total	68,281	21,495	25
Biogran®	7 dias	47,926	6,828	5
	15 dias	60,916	12,532	5
	21 dias	57,350	4,335	5
	45 dias	64,804	13,125	5
	60 dias	68,000	16,141	5
	Total	59,799	12,685	25
Total	7 dias	54,041	12,539	20
	15 dias	59,478	14,271	20
	21 dias	57,353	20,054	20
	45 dias	61,866	21,627	20
	60 dias	73,367	15,257	20
	Total	61,221	18,023	100

p=0,131 grupo
p=0,008 tempo
p=0,665 interação

Tabela 12- Pós-teste Games Howell. Comparação entre os tempos - Contagem de F (valores transformados em percentagens).

Tempo	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de p
7 dias X 15 dias	-5,437	4,248	0,705
7 dias X 21 dias	-3,312	5,288	0,970
7 dias X 45 dias	-7,825	5,590	0,632
7 dias X 60 dias	-19,326	4,416	0,001*
15 dias X 21 dias	2,125	5,503	0,995
15 dias X 45 dias	-2,387	5,794	0,994
15 dias X 60 dias	-13,888	4,671	0,039*
21 dias X 45 dias	-4,513	6,595	0,959
21 dias X 60 dias	-16,014	5,634	0,054
45 dias X 60 dias	-11,501	5,918	0,315

* Diferenças significativas

5. 4. 4 Determinação do tamanho dos grânulos dos biovidros

O coeficiente de correlação intraclasse para determinação do tamanho dos grânulos de biovidros após implantação nos animais foi $\alpha=1$. Prancha 9 - gráfico 9.4. Segundo o teste estatístico ANOVA dois critérios houve diferença significativa ($p<0,001$) nos fatores grupo, tempo e interação (grupo e tempo). Prancha 8 - gráfico 8.1. Tabela 27, 28, 29, 30, 31, 32, 37 e 48 (ANEXO).

Tabela 13- Estatística descritiva - Tamanho dos grânulos. Fator interação grupos * tempo (dias).

Grupos	Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	N
PerioGlas®	7 dias	299,600	54,22914	5
	15 dias	299,600	63,34667	5
	21 dias	269,200	39,30903	5
	45 dias	376,400	23,19483	5
	60 dias	240,800	48,05414	5
	Total	270,2400	50,96182	25
Biovidro UEPG	7 dias	145,600	42,27056	5
	15 dias	217,000	43,93177	5
	21 dias	207,600	49,30314	5
	45 dias	165,600	35,33836	5
	60 dias	150,000	24,97999	5
	Total	177,1600	47,42861	25
Biogran®	7 dias	418,800	22,20811	5
	15 dias	394,000	66,79820	5
	21 dias	369,200	48,42727	5
	45 dias	286,400	57,98965	5
	60 dias	272,800	60,14316	5
	Total	348,2400	76,98987	25
Total		288,0000	122,03278	15
		303,5333	92,60428	15
		282,0000	80,97619	15
		231,3333	64,32803	15
		221,2000	69,06643	15
		265,2133	91,92966	75

p<0,001 fator tempo, grupo e interação

Tabela 14- Pós-teste de Tukey HSD. Fator Grupos - Tamanho dos grânulos.

Grupos	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor de p
PerioGlas® X Biovidro UEPG	119,960	13,672	<0,001*
PerioGlas® X Biogran®	-51,120	13,672	0,001*
Biovidro UEPG X Biogran®	-171,080	13,672	<0,001*

* Diferenças significativas

Tabela 15- Pós-teste de Tukey HSD. Fator Tempo - Tamanho do grânulo.

Tempo	Diferença entre as médias	Erro padrão	Valor p
7 dias X 15 dias	-15,533	17,651	0,903
7 dias X 21 dias	6,000	17,651	0,997
7 dias X 45 dias	11,866	17,651	0,962
7 dias X 60 dias	66,800	17,651	0,003*
15 dias X 21 dias	21,533	17,651	0,740
15 dias X 45 dias	27,400	17,651	0,533
15 dias X 60 dias	82,333	17,651	<0,001*
21 dias X 45 dias	5,866	17,651	0,997
21 dias X 60 dias	60,800	17,651	0,009*
45 dias X 60 dias	54,933	17,651	0,023

* Diferenças significativas

PRANCHA 3- Microscopias eletrônicas de varredura.

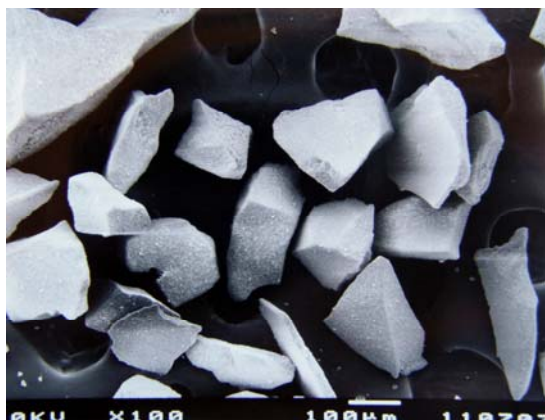


Figura 3.1

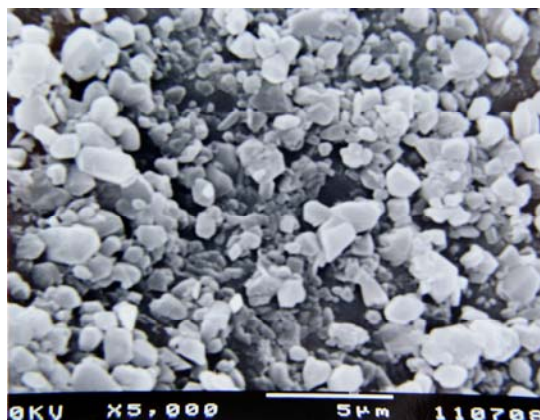


Figura 3.2



Figura 3.3

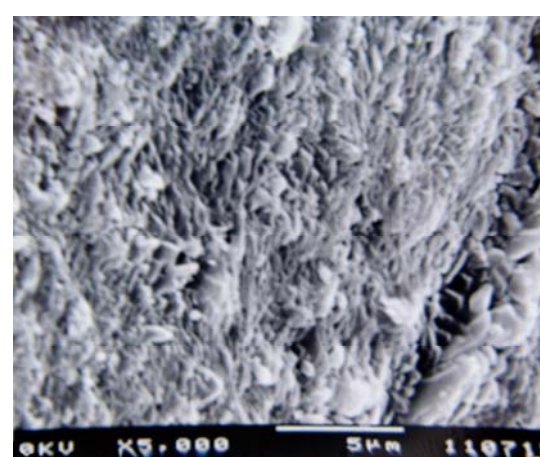


Figura 3.4



Figura 3.5

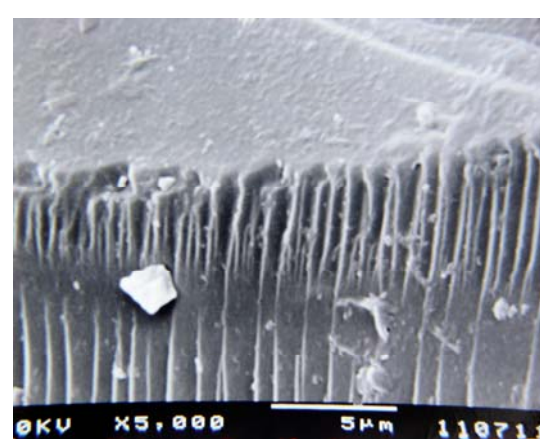


Figura 3.6

Figura 3.1- Micrografia eletrônica de varredura do PerioGlas®. Aumento de 100x.

Figura 3.2- Micrografia eletrônica de varredura do PerioGlas®. Aumento de 5000x.

Figura 3.3- Micrografia eletrônica de varredura do Biogran®. Aumento de 100x.

Figura 3.4- Micrografia eletrônica de varredura do Biogran®. Aumento de 5000x.

Figura 3.5- Micrografia eletrônica de varredura do Biovidro-UEPG. Aumento de 100x.

Figura 3.6- Micrografia eletrônica de varredura do Biovidro-UEPG. Aumento de 5000x.

PRANCHA 4- Resultados do MEV/EDX.

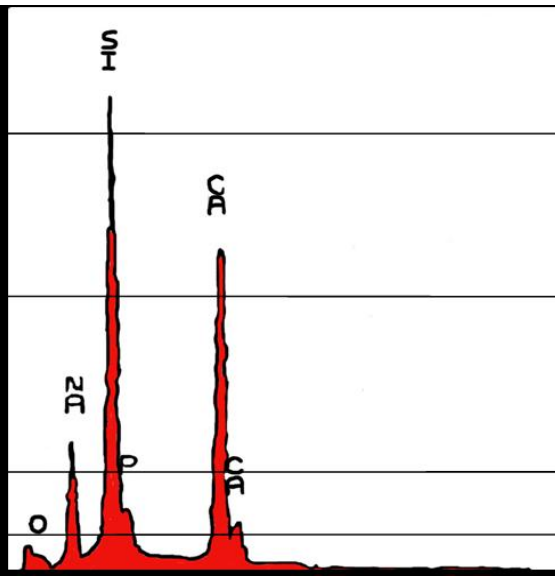


Figura 4.1

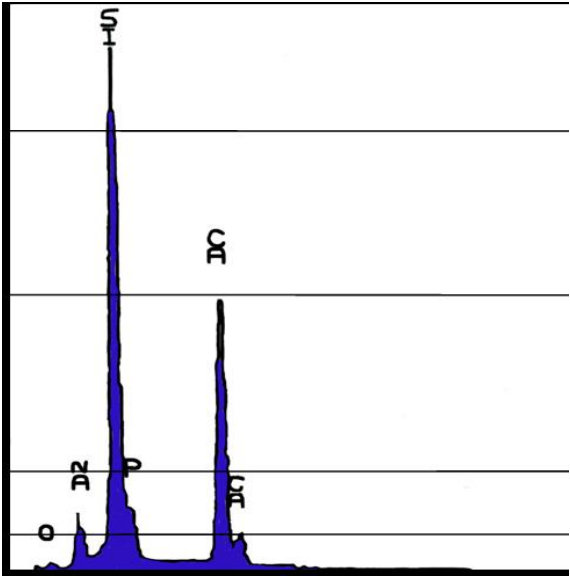


Figura 4.2

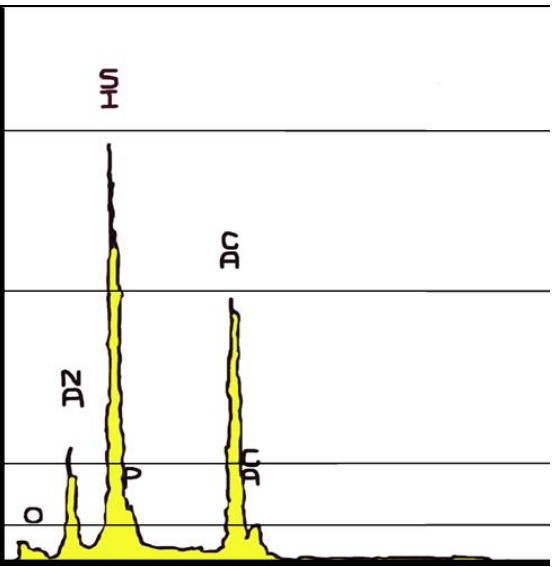


Figura 4.3

	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]
Si	X	X	X
Na	X	X	X
Ca	X	X	X
O	X	X	X
P	X	X	X

Figura 4.4

- Figura 4.1-** MEV/EDX. PerioGlas[®], indicando presença de sódio, cálcio, sílica e fósforo.
- Figura 4.2-** MEV/EDX. Biogran[®], indicando presença de sódio, cálcio, sílica e fósforo.
- Figura 4.3-** MEV/EDX. Biovidro – UEPG, indicando presença de sódio, cálcio, sílica e fósforo.
- Figura 4.4-** Elementos químicos encontrados nos biomateriais, segundo MEV/EDX e fluorescência de Raios X.

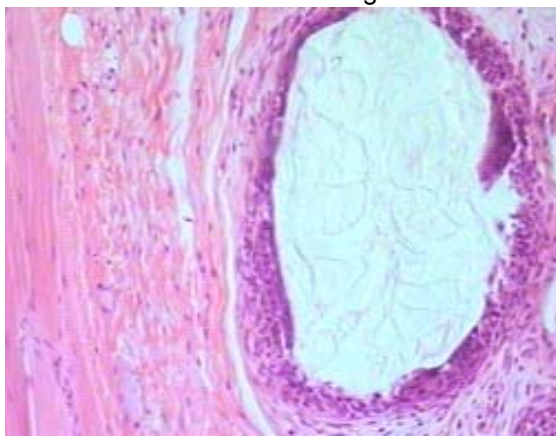
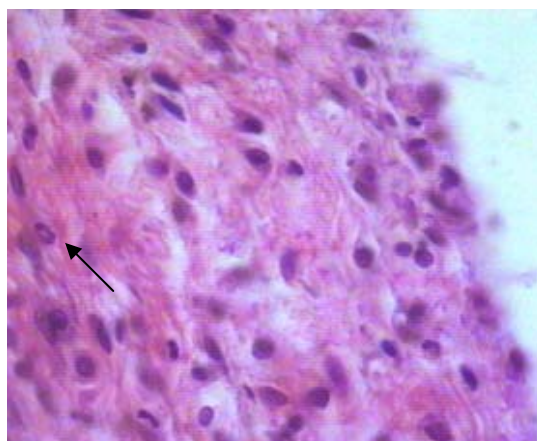
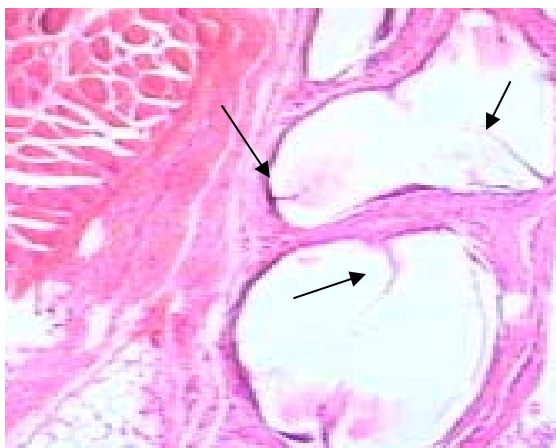
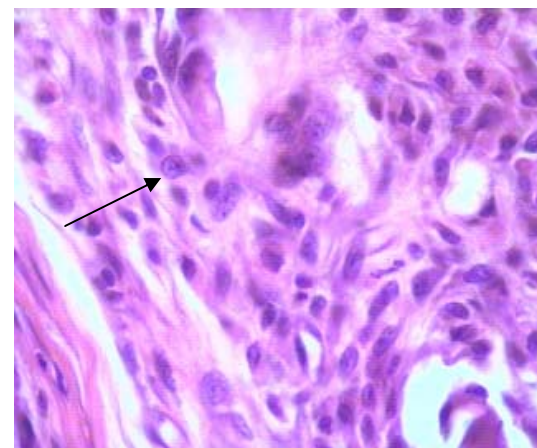
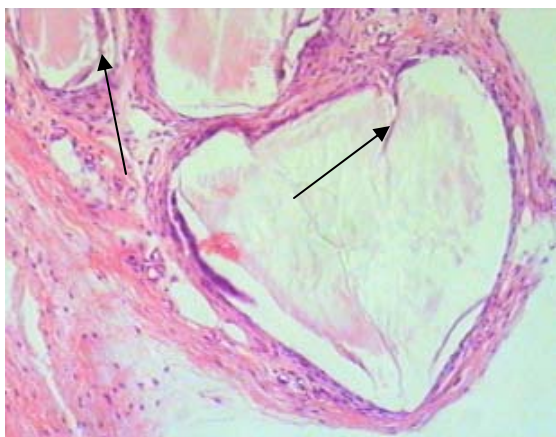
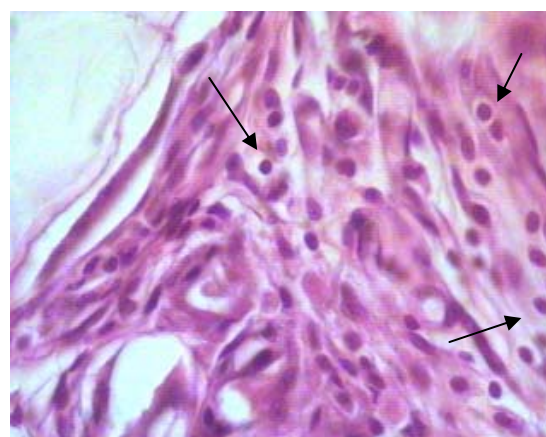
PRANCHA 5- Lâminas histológicas.**Figura 5.1****Figura 5.2****Figura 5.3****Figura 5.4****Figura 5.5****Figura 5.6**

Figura 5.1- Biogran®. Aumento de 100x. Grânulo sem fissura aos sete dias.

Figura 5.2- Biogran®. Aumento de 400x. Presença de PMN aos sete dias (seta).

Figura 5.3- PerioGlas®. Aumento de 100x. Início de formação de fissuras aos quinze dias.

Figura 5.4- PerioGlas®. Aumento de 400x. Presença de PMN aos quinze dias (seta).

Figura 5.5- Biovidro-UEPG. Aumento de 100x. Grânulo com fissuras aos vinte e um dias.

Figura 5.6 PerioGlas®. Aumento de 400x. Predominância de célula MN aos vinte e um dias (setas).

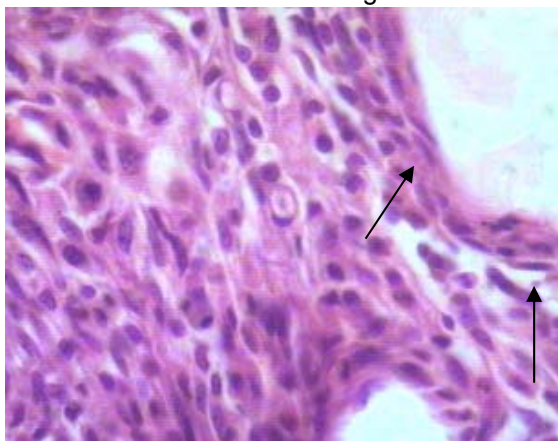
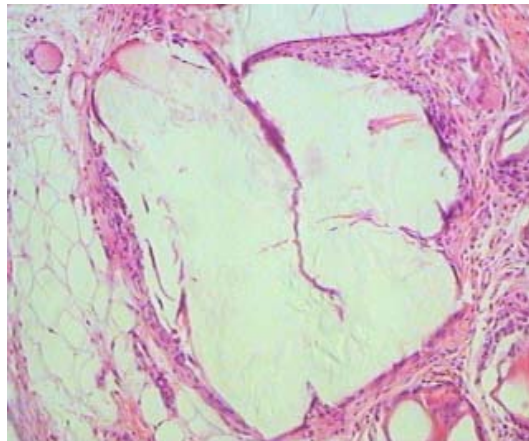
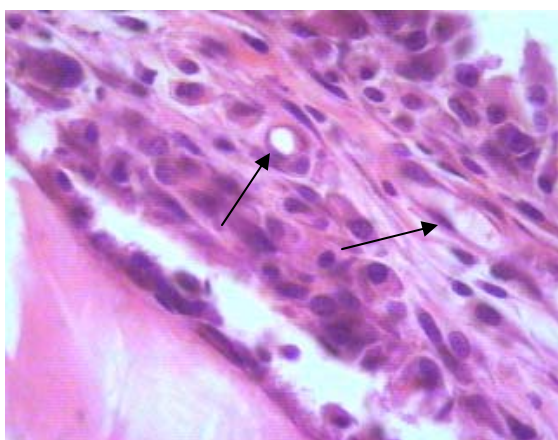
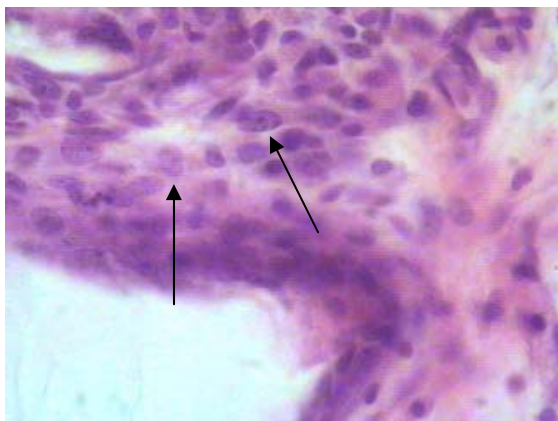
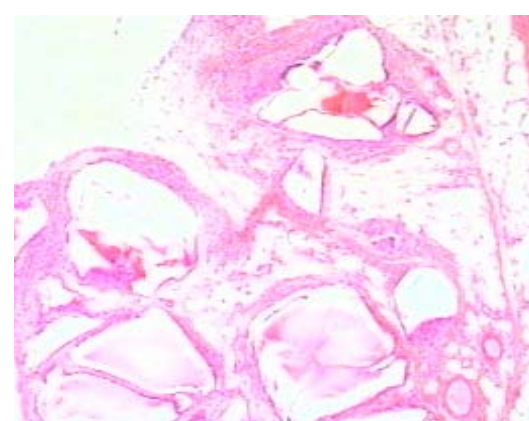
PRANCHA 6- Lâminas histológicas.**Figura 6.1****Figura 6.2****Figura 6.3****Figura 6.4****Figura 6.5****Figura 6.6**

Figura 6.1- Biovidro-UEPG. Aumento de 400x. Presença de fibrócitos aos 45 dias (setas).

Figura 6.2- Biogran®. Aumento de 100x. Fissuras e degradação do grânulo aos 45 dias (setas).

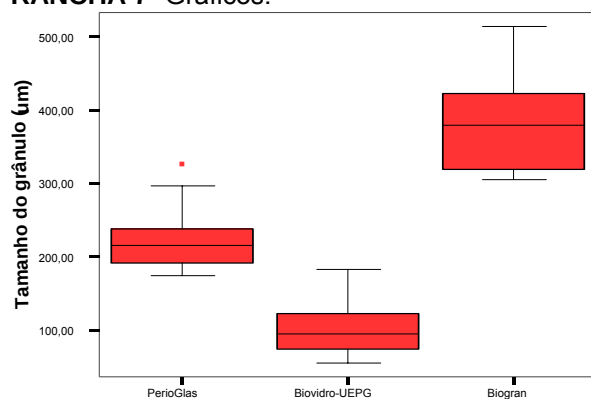
Figura 6.3- Biovidro-UEPG. Aumento de 400x. Vasos sanguíneos e capilares aos 60 dias (setas).

Figura 6.4- PerioGlas®. Aumento de 100x. Presença de fissuras aos 60 dias (setas).

Figura 6.5- Biovidro-UEPG. Aumento de 400x. Presença de fibroblastos aos 60 dias (setas).

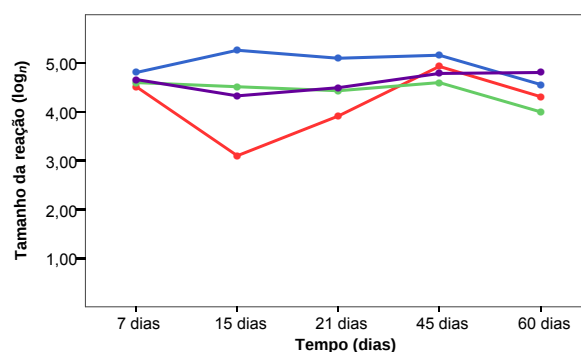
Figura 6.6- Biogran®. Aumento de 40x. Aspecto geral das partículas aos 60 dias (setas).

PRANCHA 7- Gráficos.



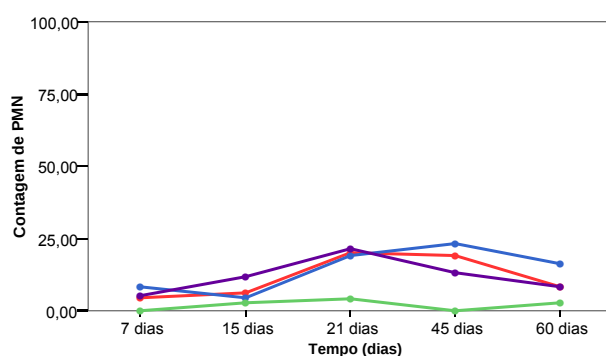
$p < 0,001$ – S – ANOVA 1 critério

Gráfico 7.1



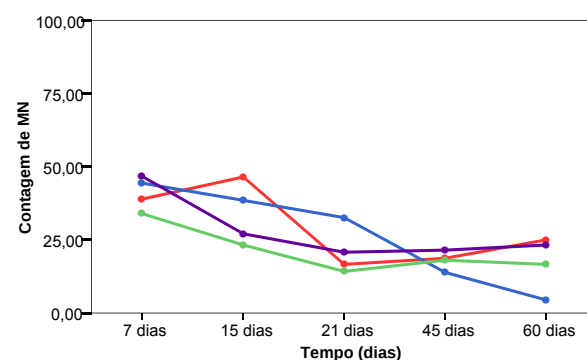
$p < 0,001$ – S – ANOVA 2 critérios

Gráfico 7.2



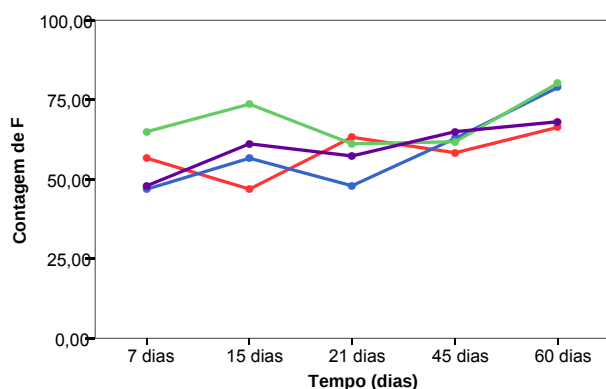
$p < 0,001$ – S – ANOVA 2 critérios

Gráfico 7.3



$p = 0,117$ (grupo) – NS – ANOVA 2 critérios
 $p = 0,022$ (interação) – S – ANOVA 2 critérios
 $p < 0,001$ (tempo) – S – ANOVA 2 critérios

Gráfico 7.4



$p = 0,131$ (grupo) – NS – ANOVA 2 critérios
 $p = 0,665$ (interação) – NS – ANOVA 2 critérios
 $p = 0,008$ (tempo) – S – ANOVA 2 critérios

Gráfico 7.5

Gráfico 7.1- Tamanho dos grânulos previamente à implantação.

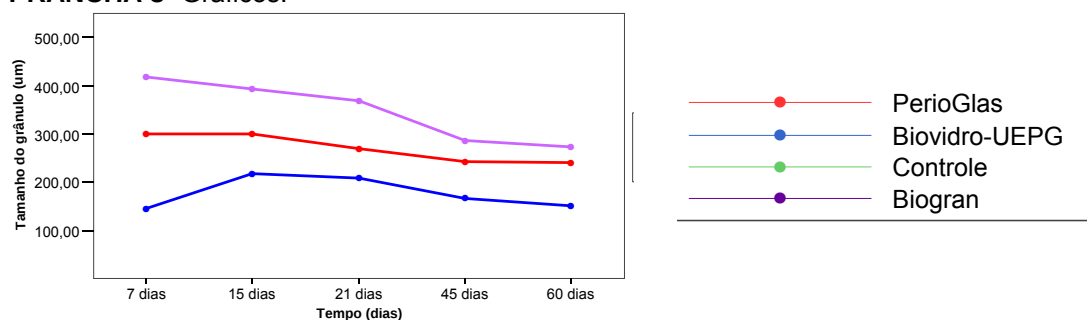
Gráfico 7.2- Tamanho da reação inflamatória.

Gráfico 7.3- Contagem de PMN nos quatro grupos e cinco tempos de análise.

Gráfico 7.4- Contagem de MN nos quatro grupos e cinco tempos de análise.

Gráfico 7.5- Contagem de F nos quatro grupos e cinco tempos de análise.

PRANCHA 8- Gráficos.



$p < 0,001$ – S – ANOVA 2 critérios

Gráfico 8.1

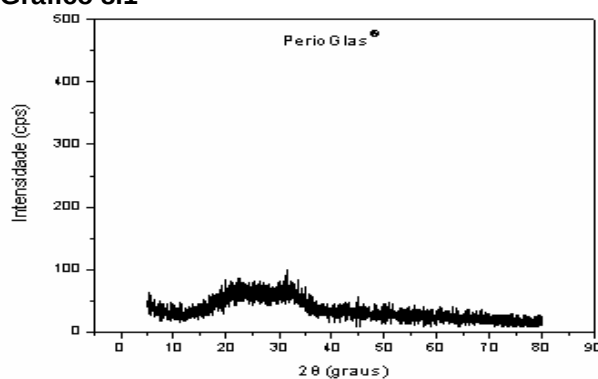


Gráfico 8.2

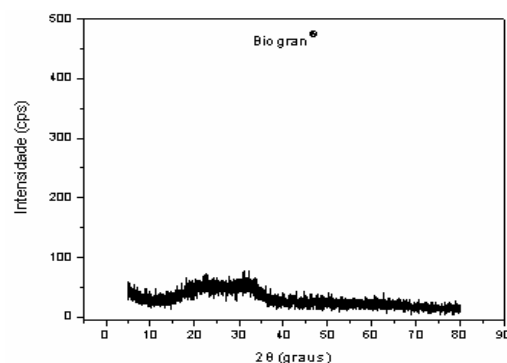


Gráfico 8.3

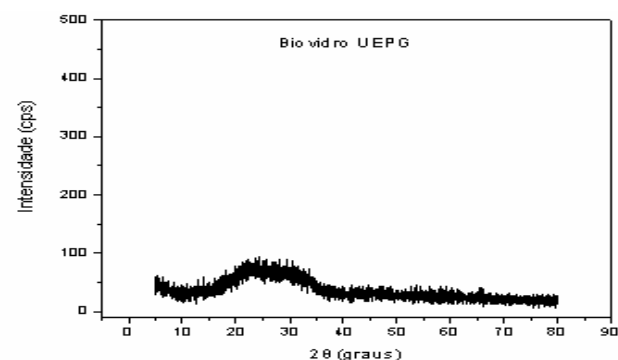


Gráfico 8.4

Gráfico 8.1- Determinação do tamanho dos grânulos dos biovidros após implantação nos animais nos cinco tempos de análise.

Gráfico 8.2- Difratoograma da amostra de PerioGlas®, indicando fase cristalina.

Gráfico 8.3- Difratoograma da amostra de Biogran®, indicando fase cristalina.

Gráfico 8.4- Difratoograma da amostra de Biovidro-UEPG, indicando fase cristalina.

6 DISCUSSÃO

*P*rocedimentos de enxerto ósseo são realizados com frequência em cirurgias bucais e maxilofaciais. Em decorrência deste fato, a busca de um material ideal como substituto ósseo vem sendo objeto de pesquisa por anos. O substituto ósseo ideal deveria apresentar composição química e física similar ao tecido ósseo que está sendo implantado, ser fonte de cálcio e fosfato, apresentar porosidades, ser de fácil manipulação, ser degradado, biocompatível e não apresentar potencial de transmissão de doenças priônicas e infecto-contagiosas. (COSTA et al., 2003; HALL, 1999; PINHEIRO, 2001; SANTOS, 2000; STRNAD, 1992).

Com intuito de suprir as limitações de técnica e tentar alcançar a excelência biológica do osso autógeno, vem tentando-se empregar uma quantidade significativa de materiais aloplásticos. (AL RUHAIMI, 2001). A aplicabilidade desses materiais em organismos humanos depende de suas propriedades biológicas, químicas, físicas e mecânicas. (ALIZADEH; MARGUSSIAN, 2002; BRANDA et al., 2002; COSTA et al., 2003; STRNAD, 1992).

Tendo em vista a importância do desenvolvimento e emprego de materiais novos e ao mesmo tempo seguros e eficazes, para tratamento de perdas ósseas, juntamente com a relevância de se avaliar as características físico-químicas e a biocompatibilidade dos substitutos ósseos aloplásticos, no presente estudo avaliou-se as características físico-químicas do PerioGlas[®], Biogran[®] e Biovidro-UEPG, com intuito de determinar o tamanho das partículas previamente à

implantação em tecidos vivos, concentração e estrutura dos elementos presentes, morfologia das partículas e características superficiais dos grânulos. Através da implantação dos materiais no tecido subcutâneo de ratos, avaliou-se também o tamanho da reação inflamatória gerada, presença e número de células polimorfonucleares, mononucleares, fibroblastos e degradação dos grânulos.

Em relação às características físicas, os resultados desta pesquisa mostraram, através de MEV, que as partículas de Biogran[®] apresentaram-se com tamanho de $385,09 \pm 68,51 \mu\text{m}$, enquanto o PerioGlas[®] com $222,00 \pm 40,64 \mu\text{m}$ e o Biovidro-UEPG com $102,86 \pm 36,22 \mu\text{m}$ (diferença significativa $p < 0,001$). A microscopia eletrônica de varredura mostrou ainda que as partículas dos três materiais apresentaram-se irregulares e com rugosidade superficial, especialmente o PerioGlas[®]. Esta rugosidade superficial sugere que algum tratamento de superfície foi realizado, podendo ser condicionamento ácido da superfície das partículas ou cristalização superficial da massa vítrea. Trabalhos como os de Rosengren et al. (2003), Kaufmann et al. (2000) e Silver, Deas; Erecinska (2001) tem mostrado que a superfície dos biovidros influencia a resposta biológica. Costa et al. (2003) afirmam ainda que a natureza da superfície dos grânulos influencia as propriedades osteocondutoras. Cho et al. (1997) e Salinas et al. (2001) comprovaram que o condicionamento da superfície de biovidros, com ácido clorídrico, melhora a bioatividade desses materiais. Deste modo, a realização de tratamentos superficiais nas partículas de biovidros visam melhorar as propriedades desses quando implantados em tecidos vivos.

A uniformidade das partículas que compõe o material também se faz importante, uma vez que alguns materiais podem apresentar grande variação no tamanho de partícula, enquanto outros se apresentam uniformes. Quando o material

apresenta partículas uniformes e pequenas, os espaços entre os grânulos não são preenchidos. Entretanto, se há partículas grandes e pequenas no mesmo material, as menores ocupam os espaços entre as grandes, culminando com uma infiltração celular e regeneração tecidual mais lenta. (SCHEPERS et al., 1998). Segundo a microscopia eletrônica de varredura utilizada nesta pesquisa, o PerioGlas® e o Biogran® apresentaram partículas mais uniformes, comparados com o Biovidro-UEPG.

O tamanho e morfologia das partículas de materiais aloplásticos estão ainda diretamente relacionados à degradação sofrida por estas quando implantadas em tecidos vivos. Em algumas intervenções a degradação do material é desejável, como em procedimentos ortopédicos que suportam carga. Em outras indesejáveis, como os *onlays* de osso craniofacial. (AL RUHAIMI, 2001). Trabalhos como os de Al Ruhaimi (2001), Fetner et al. (1994), Hall et al. (1999), Johnson et al. (1999), Wheeler et al. (1997) e Wheeler et al. (1998) têm destacado a importância de que, em procedimentos de implantes ósseos, o processo de degradação das partículas ocorra concomitantemente à formação óssea, uma vez que estes materiais devem atuar como um arcabouço, permitindo a formação óssea. Os vidros bioativos podem ser degradados completamente ou parcialmente. Segundo Fetner et al. (1994), Hall et al. (1999) e Schepers et al. (1998) o ideal é que as partículas degradadas sejam substituídas por tecido ósseo e as partículas remanescentes estejam em íntimo contato com o tecido ósseo neoformado. Al Ruhaimi (2001) concorda com esses autores e acrescenta que a degradação sofrida pelos substitutos ósseos pode ocorrer por dois processos: - hidrólise enzimática, mediado por solução e – fagocitose, mediado por células. Segundo Schepers et al. (1991) a

de troca iônica, entre as partículas de biovidros e o meio, pode levar a uma dissolução parcial da partícula resultando em partículas menores.

Pesquisas como as de Al Ruhaimi (2001), Holzhausen et al. (2002) e Pollick et al. (1995) tem mostrado que além do tamanho e morfologia, a composição e concentração dos elementos químicos presentes nos materiais sintéticos também são muito relevantes na degradação das partículas. Os resultados da fluorescência de Raios X e do MEV/EDX indicam que as três amostras apresentaram a mesma composição: cálcio, sódio, oxigênio, sílica e fósforo, na forma de óxido de sílica (SiO_2), óxido de sódio (Na_2O), óxido de cálcio (CaO) e óxido de fósforo (P_2O_5). Biovidros com formulações semelhantes a essas vem mostrando resultados satisfatórios quando implantados em tecido ósseo de acordo com observações de Al Ruhaimi, (2001), Cancian (1998) Chan et al. (2002), Furusawa; Mizunuma, (1997), Furusawa et al. 1(998), Johnson et al. (1997), karatzas et al. (1999), Santos (2000), Schepers et al. (1991), Wheeler et al. (1997) e (1998). Através da composição química dos materiais consegue-se também teorizar, por meio do diagrama de fases, se os mesmos são biocompatíveis e bioativos. Comparando-se as concentrações dos elementos químicos nas amostras empregadas neste trabalho com os dados de Strnad (1992) pode-se teorizar que as três amostras são bioativas e biocompatíveis.

Ainda em relação à degradação dos biomateriais, Holzhausen et al. (2002) afirmam que a fase cristalina também é uma característica química que pode influenciá-la. Sendo que materiais não cristalinos apresentam degradação mais rápida. Partindo-se do fato dos três materiais estudados nesta pesquisa serem não cristalinos e apresentar basicamente a mesma composição química, o Biovidro-UEPG seria mais rapidamente degradado, por apresentar as partículas menores.

Rosengren et al. (2003) afirmam que a composição química, processo de dissolução, grau de cristalização, hidrofobicidade, característica e reatividade de superfície dos biovidros são fatores que podem influenciar na adsorção de proteínas nestes materiais e conseqüentemente influenciar no comportamento biológicos dos mesmos.

Partindo do fato de que segundo os testes físico-químicos os materiais apresentaram potencial de serem bioativos e biocompatíveis realizou-se o teste de biocompatibilidade em ratos. Esses testes têm por objetivo a avaliação de materiais experimentais, permitindo assim sua segurança de aplicação clínica em seres humanos. (COSTA, 2001).

O protocolo para testes de biocompatibilidade recomenda que esse seja executado no tecido subcutâneo de ratos através da implantação do material em tubos de polietileno. (COSTA, 2001). O propósito da utilização destes tubos é determinar a localização do material a ser analisado. Tal fato é relevante quando se avaliam materiais pastosos ou géis, que poderiam ser espalhados no tecido do animal, não sendo possível precisar se o local avaliado é realmente o que recebeu o tratamento. Todavia, a localização de materiais granulares parcialmente degradáveis é facilmente determinada, como se observou no estudo piloto e na execução desta pesquisa. Além deste fato, a introdução dos materiais em tubos de polietileno permitiria a avaliação da resposta tecidual frente à implantação dos materiais, mas não o comportamento das partículas frente ao tecido que foi implantado, como degradação e formação de fissuras. Portanto, neste trabalho preferiu-se implantar os materiais diretamente no tecido subcutâneo, sem auxílio dos tubos. Trabalhos como os de Greggi e Campos Júnior (1994), Macedo et al. (1995) e Pollick et al. (1995) também não utilizaram o tubo de polietileno ao avaliarem biocompatibilidade de

biomateriais em tecido subcutâneo. Da mesma forma que Sanada et al. (2003) ao avaliar biocompatibilidade, em tecido muscular. Contrariamente, Pescinini (1995) e Carvalho (2000) empregaram o tubo de polietileno em sua metodologia. Convém salientar que ambos trabalhos avaliaram materiais pastosos que poderiam se espalhar pelos tecidos.

Como já salientado, através da implantação do material no tecido subcutâneo dos ratos avaliou-se o tamanho da reação inflamatória, o tamanho dos grânulos e a contagem de PMN, MN e F. Em relação ao tamanho da reação inflamatória observou-se uma diminuição nos grupos do Biogran® e Perioglas® até os quinze dias e um aumento posterior, que pode ser explicada pelo provável tratamento superficial ocorrido nestas partículas (observado no MEV com aumento de 5000x). Assim, esse tratamento superficial poderia ter influenciado a resposta inflamatória. Possivelmente, a partir de quinze dias o organismo dos animais modificou e/ou eliminou as alterações causadas por este tratamento e a reação inflamatória aumentou.

Partindo-se do fato de que as três amostras apresentaram em sua composição os mesmos elementos químicos e basicamente as mesmas concentrações, poderíamos sugerir que a resposta inflamatória esta na dependência de outros fatores como tamanho dos grânulos, morfologia, características superficiais e uniformidade das partículas. Concordando com Alizadeh e Marghussian (2002), Al Ruhaimi (2001), Amaral et al. (2002), Costa et al. (2003), Granjeiro et al. (1992), Greggi e Campos Júnior (1994), Holzhausen et al. (2002), Kaufmann et al. (2000), Macedo et al. (1995), Oliveira et al. (1993), Silver; Deas; Erecinska (2001), Strnad (1992), Wheeler et al. (1997) e (1998). Novamente é válido salientar que o Biovidro-UEPG apresentou-se como partículas menores e não

uniformes, enquanto o PerioGlas® e Biogran® apresentaram-se com provável tratamento de superfície. Schepers et al. (1998) afirmaram que a resposta inflamatória causada pela degradação de partículas de biovidro menores impede a estimulação de células osteoprogenitoras em contato com as partículas maiores. Acrescenta-se o trabalho de Rosengren et al. (2003) que afirmam que os biovidros têm potencial de sofrerem adsorção por diferentes glicoproteínas e proteoglicanas e em variadas composições, as quais poderiam interferir na resposta inflamatória.

Os resultados da contagem de PMN mostraram não haver diferença significativa entre os biovidros, havendo apenas diferença significativa ($p < 0,001$) entre os materiais e o grupo controle. A contagem de F não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,131$) e interação (0,665), havendo apenas entre os tempos ($p = 0,008$). Por sua vez, a contagem de MN não apresentou diferença significativa ($p = 0,117$) entre os grupos, incluindo controle, havendo diferença apenas entre os tempos ($p < 0,001$) e interação ($p = 0,022$). Partindo-se do fato de que o PerioGlas® e o Biogran® vem sendo utilizados com êxito como substitutos ósseos em procedimentos clínicos (FROUM et al., 1998; LOVELACE et al., 1998; SCHEPERS et al., 1993; STVRTECKY et al., 2003; ZAMET et al., 1997), não haver diferença significativa na contagem de células inflamatórias e fibroblastos entre estes dois materiais disponíveis comercialmente e o Biovidro-UEPG é um fator bem favorável para este biomaterial em fase experimental.

Costa (2001) afirma que a interpretação dos resultados de biocompatibilidade deve ser feita de acordo com a evolução do quadro reacional, podendo ser considerada aceitável ou não aceitável. Sendo não aceitável quando a reação aos 60 dias apresenta-se moderada ou intensa, mesmo estando discreta ou insignificante aos sete dias. Por sua vez, a reação é aceitável quando se encontra

insignificante ou discreta aos sessenta dias, seja insignificante/discreta desde os períodos iniciais, ou estando moderada/intensa e reduzindo posteriormente. A interpretação dos resultados histomorfométricos de tamanho da reação inflamatória deste trabalho mostram que apesar de ter havido diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$), os três biomateriais apresentaram resposta inflamatória aceitável, mostrando serem biocompatíveis.

Os resultados observados nos estudos revisados neste trabalho mostraram que as partículas de biovidro são bem toleradas pelos tecidos, induzindo reação inflamatória transitória. (AL RUHAIMI, 2001; CANCIAN, 1998; FETNER et al., 1994; FURUSAWA; MIZUNUMA, 1997; FURUSAWA et al., 1998; HALL, 1999; JOHNSON, 1997; KARATZAS et al., 1999; SANTOS, 2000; SCHEPERS, 1991; SCHEPERS et al., 1998; TURUNEN et al., 1997; VOGEL et al., 2001; WHEELER et al., 1997; 1998). Concordando com os achados do presente estudo.

Em relação ao tamanho dos grânulos houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre todos os grupos. Sendo que em todos os tempos o tamanho médio das partículas foi maior no grupo do Biogran[®], seguido pelo PerioGlas[®] e Biovidro-UEPG. O tamanho médio das partículas de Biogran[®] e PerioGlas[®] diminuíram desde sete até sessenta dias. Houve um aumento do tamanho médio dos grânulos de Biovidro-UEPG de sete até quinze dias e posteriormente uma redução dos mesmos, provavelmente pelo fato das partículas menores serem degradadas mais rapidamente que as maiores, concordando com Holzhausen et al. (2002). Assim, provavelmente ocorreu degradação completa das partículas menores entre sete e quinze dias, fazendo com que em quinze dias o tamanho médio dos grânulos fosse maior do que em sete. Após quinze dias as partículas menores já haviam sido completamente degradadas. Então a degradação dos grânulos remanescentes

culminou com diminuição do tamanho médio das partículas. Trabalhos como os Cancian (1998), Fetner et al. (1994), Furusawa e Mizunuma (1997), Furusawa et al. (1998), Hall et al. (1999), Johnson et al. (1997), Schepers et al. (1991), Schmitt et al. (1997), Turunen et al. (1997), Vogel et al. (2001), Wheeler et al. (1997) e (1998) mostraram que as partículas de biovidros tendem a ser parcialmente degradadas. Resultados similares aos encontrados em nossa pesquisa. Gregghi e Campos Júnior (1994) afirmam que o tamanho das partículas de biomaterial pode influenciar a biocompatibilidade dos mesmos.

Quando os vidros bioativos são colocados no interior de tecidos vivos ocorre o aparecimento de fissuras nos grânulos atingindo o centro dos cristais, como observado por Cancian (1998), Furusawa; Mizunuma (1997), Furusawa et al. (1998) e Santos (2000). Essa dissolução das partículas forma um arcabouço de cálcio fosfato, liberando um gel rico em sílica, que Furusawa; Mizunuma (1997) e Furusawa et al. (1998) sugerem ter propriedades de atrair células osteogênicas. Utilizando defeitos ósseos criados em rebordo de cães como modelo experimental Schepers et al. (1991) verificaram que muitas partículas de Biogran[®] apresentaram-se com erosão internamente através de pequenas crateras. Nestas crateras centrais foi detectado tecido ósseo neoformado com ausência de comunicação com o tecido ósseo externo. Concordando com a literatura citada, em nossa pesquisa verificou-se a presença de fissuras nas partículas a partir de quinze dias, para os três biovidros. Em estágios tardios houve aumento do número e do tamanho destas fissuras e as mesmas estavam preenchidas por tecido conjuntivo, similar ao que envolvia os grânulos.

Outra importante propriedade dos biovidros, com composição similar aos testados neste trabalho, é que quando expostos a soluções fisiológicas, ou

fluidos corporais eles perdem íons sódio para o meio e formam uma camada superficial rica em óxido de sílica, o que provoca a formação de uma camada de fosfato de cálcio, inicialmente amorfo e gradualmente evolui para uma camada policristalina de hidroxiapatita, comprovado por Costa et al. (2003), Furusawa; Mizunuma (1997), Johnson et al. (1999), Kaufmann et al. (2000), Schepers et al. (1991) e Strnad (1992). Rosengren et al. (2003) afirmam que esta camada é importante para a adsorção de glicoproteínas na superfície dos biovidros, mas ainda não se sabe exatamente como influencia o reparo ósseo. Além da formação de hidroxiapatita externa, outro fenômeno observado nos biovidros quando imersos em fluidos teciduais é a transformação de sílica solúvel em sílica ácida e conseqüente alcalinização externa; que segundo Silver; Deas; Erecinska (2001) pode influenciar o metabolismo celular, a atividade de enzimas intracelulares, promover síntese de colágeno, formação de hidroxiapatita e influenciar a atividade de enzimas intracelulares. Essas mudanças no pH destes materiais podem trazer conseqüências, até mesmo, nos potenciais benéficos do uso dos biovidros. (SILVER; DEAS; ERECINSKA 2001). Allan et al. (2001) comprovaram esta alcalinização ao avaliarem o efeito antibacteriano de partículas de Bioglass® em bactérias supra e subgengival. Os autores observaram efeito antibacteriano das partículas. Contudo, não é possível concluir que esta atividade bacteriana dependa exclusivamente do aumento do pH.

Considerando-se as características físico-químicas e a biocompatibilidade dos biovidros, com mesma formulação analisada neste trabalho, pode-se afirmar que estes materiais têm futuro promissor como substitutos ósseos na área médico-odontológica. Havendo ainda a vantagem de ser prontamente disponível, apresentar composição química compatível com o tecido ósseo, ser de

fácil manipulação, parcialmente degradado, não apresentar potencial de transmissão de doenças infecto-contagiosas e priônicas, dispensar um procedimento cirúrgico adicional e todos os inconvenientes que o acompanham.

7 CONCLUSÃO

- Os três materiais testados apresentaram características físico-químicas compatíveis com biocompatibilidade e bioatividade;
- Através da análise da implantação dos materiais no tecido subcutâneo de ratos os três materiais mostraram-se biocompatíveis e bioabsorvíveis, sem indicio de capacidade osteoindutora;
- Apesar de haver diferença estatisticamente significativa no tamanho dos grânulos dos três materiais, sendo o Biovidro-UEPG menor, seguido do PerioGlas® e Biogran®, todos se mostraram biocompatíveis.

REFERÊNCIAS

ALIZADEH, P.; MARGHUSSIAN, V. K., 2002. Mechanical properties and bioactive characteristics of glass-ceramics. **American Ceramic Society Bulletin**, v. 81, n. 3, p. 21-26, mar. 2002.

ALLAN, I; NEWMAN, H.; WILSON, M. Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra- and subgingival bacteria. **Biomaterials**, v. 22, n. 12, p.1683-1687, 2001.

AL RUHAIMI, K. A. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**. v. 16, n. 1, p. 105-114, Jan./April. 2001.

AMARAL, M. et al. Densification route and mechanical properties of Si₃N₄-bioglass biocomposites. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p.857-862, 2002.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration. **J. Periodontol.**, v. 72. N. 6, p. 834-838, June 2001.

BRANDA, F. et al. Effect of the substitution of M₂O₃ (M = La, Y, In, Ga, Al) for CaO on the bioactivity of 2,5CaO.2SiO₂. **Biomaterials**, v. 23, p.711-716, 2002.

CANCIAN, D. C. J. **Utilização de Biogran® e Calcite® em defectos ósseos. Estudo histológico em macacos *Cebus apella*.** Araraquara, 1998, 93f Tese (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

CARVALHO, D. R. **Implante de matriz óssea humana desmineralizada em forma de gel (Grafton DMB gel) em cavidades ósseas e tecido conjuntivo subcutâneo. Estudo histológico em ratos.** Araçatuba, 2000, 155f. Tese (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo facial) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

CHAN, C. et al. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 31,n. 1, p. 73-77, Feb. 2002.

CHO, S. B. et al. Introduction of bioactivity of non-bioactive glass ceramic by a chemical treatment. **Biomaterials**. V. 18, p. 1479-1485, 1997.

COSTA, C. A. S. Testes de biocompatibilidade. In: ESTRELA, C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia**. São Paulo: Artes médicas, 2001. Cap. 10, p. 161-194.

COSTA, E. et al. Sinterização de biovidros na forma de partículas e do tipo espuma. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 51-54, Jan./Jun., 2003.

FETNER, A. E. et al. Periodontal repair using PerioGlas® in nonhuman primates: clinical and histologic observations. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 15, n. 7, p. 934-938, 1994.

FROUM, S. J. et al. Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. **J. Periodontol.** v. 69, p. 698-709, 1998.

FURUSAWA, T.; MIZUNUMA, K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone grafting material. **Implant. Dent.**, v. 6, n. 2, p. 93-101, 1997.

FURUSAWA, T. et al. Investigation of early bone formation using resorbable bioactive glass in the rat mandible. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v. 13, n. 5, p. 672-676, 1998.

GRANJEIRO, J. M. et al. Hidroxiapatita para uso clínico - Caracterização físico-química. **RGO**, v. 40, n. 2, p. 130-134, mar/abr. 1992.

GLIMCHER, M. J. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. In: AVIOLI, L. V. **Metabolic bone disease and clinical related disorders**. 1990, p. 42-68.

GREGHI, S. L. A.; CAMPOS JÚNIOR, A. Estudo comparativo da biocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. **Rev. Fac. Odont.** Bauru, v. 2, n. 4, p. 73-81, Out./Dez. 1994.

HALL, E. E. et al., Comparison of bioactive glass to desmineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. **J. Periodontol.** v. 70, n. 5, p. 526-535, May 1999.

HOLZHAUSEN, M. et al. Avaliação de uma nova hidroxiapatita no tratamento de defeitos ósseos: observações histológicas em tíbias de ratos. **Revista de Pós-graduação**, v. 9, n. 1, p. 37-42, jan./mar. 2002.

JOHNSON, M. W. et al. Regeneration of peri - implant infrabony defects using PerioGlas: a pilot study in rabbits. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 12, n. 6, p. 835-839, Nov./Dez. 1997.

KARATZAS, S. et al. Histologic observations of periodontal wound healing after treatment with PerioGlas® in nonhuman primates. **Int. J. Periodontics. Restorative Dent.**, v. 19, n. 5, p. 489-499, Oct 1999.

KAUFMANN, E. A. B. et al. Effect of varying physical properties of porous, surface modified bioactive glass 45S5 on osteoblast proliferation and maturation. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 52, n. 4, p. 784-796, 2000.

LOVELACE, T. B. et al. Clinical Evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal osseous defects in human. **J. Periodontol.** v. 69, p. 1027-1035, 1998.

MANDARIM-DE-LACERDA, Carlos A. **Stereological tools in biomedical research. An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 75, n. 4, p.469-486, Dec. 2003.

MACEDO, N. L. et al. Estudo da reação tecidual ao implante subcutâneo de dois tipos de partículas de hidroxiapatita em ratos. **R. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 19-28, 1995.

NARY FILHO, H.; OKAMOTO, T. Avaliação da biocompatibilidade de implantes de Hapset® (hidroxiapatita associada ao sulfato de cálcio) em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. **R. Fac. Odontol. Bauru**, v. 4, n. 1/2, p. 55-64, jan./jun. 1996.

OLIVEIRA, D. T. et al. Hidroxiapatita microgranular: comportamento biológico em tecido subcutâneo de ratos. **R. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 197-202, 1993.

OLIVEIRA, R. C. et al. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. **R. Fac. Odontol. Bauru**, v. 7, n. 3/4, p. 85-93, Jul./Dez. 1999.

PESCININI, L. M. **Reação do tecido conjuntivo subcutâneo e do tecido ósseo da tíbia a hidroxiapatita, pasta de Walkhoff e associação hidroxiapatita/pasta de Walkhoff. Estudo histológico em ratos.** Araraquara, 1995, 86f Tese (Mestrado em Odontologia) Faculdade de Odontologia, Universidade Paulista.

PINHEIRO, C. Processamento de enxertos ósseos alógenos em bancos de ósseos e sua utilização na regeneração periodontal. **J. Periodontol.**, v. 72, p. 834-838, 2001.

POLLICK, S. et al. Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 53, p.915-922, Aug. 1995.

ROSENGREN, A. et al. Protein adsorption onto two bioactive glass-ceramics. **Biomaterials.**, v. 24, n. 1, p. 147-155, Jan. 2003.

SALINAS, A. J. et al. In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 - \text{CaO} \cdot \text{SiO}_2 - \text{CaO} \cdot \text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2$ system. **Biomaterials.** v. 21, p. 251-257, 2001.

SANADA, J. T. et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação do enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em blocos em músculo de ratos. **J. Appl. Oral Scie.**, v. 11, n. 3, p.209-215, 2003.

SANTOS, F. A. **Implantes de biomateriais em alvéolos dentais. Análise histológica em cães.** Araraquara, 2000, 149f Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

SCHEPERS, E. M. et al. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. **J. Oral Reahabil.**, v. 18, n. 5, p. 439-453, Sept. 1991.

SCHEPERS, E. et al. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. **Implant Dentistry.**, v. 2, n. 3, p. 151-156, 1993.

SCHEPERS, E. et al. Implant placement enhanced by bioactive glass particles of narrow size range. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v. 13, n. 5, p. 655-665, Sept./Oct. 1998.

SCHLIEPHAKE, H.; KAGE, I. Enhancement of bone regeneration using resorbable ceramics and a polymer-ceramic composite material. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 56, n. 1, p. 128-136, Apr. 2001.

SCHMITT, J. M. et al. Comparison of Porous Bone Mineral and Biologically Active Glass in Critical-Sized Defects. **J. Periodontol.**, v. 68, n. 11, p. 1043-53, Nov. 1997.

SILVER, I. A.; DEAS, J.; ERECINSKA, M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. **Biomaterials**, v. 22, n. 2, p.175-185, Jan. 2001.

SOGAL, A.; TOFE, A. J. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. **J. Periodontol.**, v. 70, n. 9, p.1053-1063, Sept. 1999.

STRNAD, Z. Role of glass phase in bioactive glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 13, n. 5, p. 317-321, 1992.

STVRTECKY, R. et al. A histologic study of bone response to bioactive glass particle used before implant placement: A clinical report. **J. Prosthet. Dent.**, v. 90, n. 5, p. 424-428, Nov. 2003.

TURUNEN, T. et al., Bioactive glass and calcium carbonate granules as filler material around titanium and bioactive glass implants in the medullar space of the rabbit tibia. **Clin. Oral. Impl. Res.**, v. 8, n. 2, p. 96-102, Apr. 1997.

VOGEL, M. et al. In vivo comparison of bioactive glass particle in rabbits. **Biomaterials**, v. 22, n. 4, p. 357-362, Feb. 2001.

WHEELER, D. L. et al. Evaluation of particulate Bioglass® in a rabbit radius ostectomy model. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 35, n. 2, p. 249-54, May 1997.

WHEELER, D. L. et al. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 41, n. 4, p. 527-33, Sept. 1998.

ZAMET, J. S. et al. Particulate Bioglass® as a grafting material in treatment of periodontal intrabony defects. **J. Clin. Periodontol.** v. 24, p. 410-418, 1997.

ZENDRON, M. V. **Estudo da formação óssea vertical em torno de implantes osteointegrados, obtida por um dispositivo de exclusão tecidual e modificada pelo emprego isolado de osso autógeno, osso bovino inorgânico e vidro bioativo. Análise morfométrica em cães.** Bauru, 2001, 127f. Tese - (Doutorado em Odontologia) Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

Tabela 16- Tamanho dos grânulos (μm) previamente à implantação.

PerioGlas®	Biovidro UEPG	Biogran®
173,10	53,72	305,09
175,20	126,37	317,87
181,10	141,43	349,81
181,10	164,32	395,96
189,70	174,35	423,26
193,26	177,61	514,69
197,24	181,63	317,87
205,08	100,54	372,89
205,08	110,73	468,97
212,41	111,25	384,45
217,24	116,99	
223,64	119,74	
229,30	121,44	
231,63	125,46	
233,24	61,45	
242,55	66,36	
245,12	67,12	
277,98	68,00	
295,90	92,67	
325,87	92,87	
	95,45	
	97,15	
	65,49	
	72,36	
	73,21	
	75,36	
	77,10	
	82,14	
	82,26	
	91,47	

Tabela 17- Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em sete dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]	Controle (não preenchido)
1	200	94	110	100
2	110	100	80	100
3	90	50	80	100
4	104	130	90	100
5	46	104	184	100
6	54	226	116	100
7	80	182	70	100
8	120	178	154	100

Tabela 18- Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em quinze dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]	Controle (não preenchido)
1	38	320	98	100
2	30	300	70	100
3	18	180	100	100
4	24	170	44	50
5	14	210	98	50
6	26	80	106	100
7	14	210	78	100
8	22	180	42	100

Tabela 19- Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em vinte e um dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]	Controle (não preenchido)
1	100	222	110	100
2	154	230	108	100
3	10	180	40	100
4	40	100	35	100
5	38	110	124	100
6	44	140	120	50
7	30	108	120	100
8	126	160	140	50

Tabela 20- Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em quarenta e cinco dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]	Controle (não preenchido)
1	290	140	54	100
2	190	154	80	100
3	210	164	134	100
4	190	132	96	100
5	84	80	170	100
6	94	80	100	100
7	70	184	154	100
8	120	158	308	100

Tabela 21- Média do tamanho da reação inflamatória (μm) em sessenta dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]	Controle (não preenchido)
1	46	48	214	50
2	74	144	128	50
3	100	68	88	100
4	86	134	84	50
5	66	134	120	50
6	70	48	140	50
7	84	144	104	50
8	76	100	134	50

Tabela 22- Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em sete dias de pós-operatório.

PerioGlas [®]			Biovidro UEPG			Biogran [®]			Controle		
PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F
1	25	64	3	21	18	3	18	20	0	13	15
2	17	43	4	23	24	2	16	22	0	12	18
4	45	22	4	16	23	2	17	11	0	9	20
3	12	23	3	17	24	1	14	14	0	6	14
2	18	21	6	30	21	2	25	28	0	7	22

Tabela 23- Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em quinze dias de pós-operatório.

PerioGlas®			Biovidro UEPG			Biogran®			Controle		
PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F
0	16	14	3	13	42	1	4	14	0	2	7
3	21	17	4	23	14	4	10	13	1	2	10
6	12	14	0	29	26	3	7	11	1	4	9
1	11	14	2	14	45	3	5	10	0	5	11
1	23	23	2	16	22	2	4	18	0	2	8

Tabela 24- Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em vinte e um dias de pós-operatório.

PerioGlas®			Biovidro UEPG			Biogran®			Controle		
PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F
4	5	11	5	5	15	5	6	13	0	0	0
3	3	12	5	14	5	10	10	25	1	0	5
3	4	12	4	6	7	5	6	20	0	4	10
2	3	25	6	7	12	7	8	21	0	3	11
8	2	9	2	6	18	7	4	13	1	4	8

Tabela 25- Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em quarenta e cinco dias de pós-operatório.

PerioGlas®			Biovidro UEPG			Biogran®			Controle		
PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F
6	3	11	6	2	13	2	5	12	0	0	0
3	6	18	6	3	28	2	5	8	0	5	4
5	5	15	5	2	13	1	2	15	0	5	9
2	5	18	5	4	13	6	5	12	0	0	3
5	3	10	6	6	13	3	4	18	0	0	7

Tabela 26- Média da contagem de PMN, MN e F presentes na região de intervenção em sessenta dias de pós-operatório.

PerioGlas®			Biovidro UEPG			Biogran®			Controle		
PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F	PMN	MN	F
3	10	12	5	2	20	1	7	8	0	1	1
2	6	17	5	1	37	1	4	20	1	1	5
3	4	26	6	2	28	2	6	8	0	0	4
1	4	7	7	1	26	2	2	16	0	1	4
1	3	15	6	2	31	1	1	8	0	0	4

Tabela 27- Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em sete dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]
1	360	130	430
	280	120	400
	250	70	300
	130	200	620
	210	200	400
média	246	144	430
2	400	120	280
	340	90	360
	620	210	450
	340	130	430
	240	70	400
média	388	124	384
3	400	150	450
	300	200	350
	210	180	460
	280	180	520
	170	60	280
média	272	154	412
4	300	70	330
	470	130	420
	220	150	640
	280	100	290
	150	30	450
média	284	96	426
5	400	200	420
	300	200	380
	280	300	390
	200	220	600
	360	130	420
média	308	210	442

Tabela 28- Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em quinze dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]
1	450	170	420
	550	200	370
	350	350	420
	150	230	550
	200	180	350
média	340	223	422
2	560	180	350
	430	300	220
	170	80	350
	400	170	320
	100	320	200
média	332	210	288
3	200	200	420
	400	190	450
	50	300	430
	200	270	400
	450	310	300
média	260	254	400
4	380	160	550
	410	240	320
	410	130	400
	530	110	330
	60	90	750
média	358	146	470
5	310	250	420
	120	370	470
	180	170	230
	130	290	330
	300	180	500
média	208	252	390

Tabela 29- Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em vinte e um dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]
1	380	250	460
	420	310	320
	300	330	440
	200	210	440
	200	330	200
média	300	286	372
2	320	300	530
	430	100	230
	500	120	420
	200	80	470
	140	200	400
média	318	160	410
3	350	230	310
	100	150	230
	320	180	230
	140	220	360
	320	250	300
média	246	206	286
4	280	270	380
	240	100	550
	260	200	530
	220	180	280
	300	110	210
média	260	172	390
5	250	160	490
	280	100	400
	210	230	350
	120	330	250
	250	250	450
média	222	214	388

Tabela 30- Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em quarenta e cinco dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas [®]	Biovidro UEPG	Biogran [®]
1	300	230	450
	220	270	210
	320	230	470
	130	130	160
	150	250	160
média	220	222	260
2	170	110	430
	180	120	430
	250	180	150
	230	120	370
	400	100	450
média	246	126	366
3	200	110	500
	170	180	350
	300	100	400
	180	250	160
	300	130	210
média	230	154	324
4	450	270	150
	320	110	320
	280	100	250
	200	180	300
	150	120	80
média	280	156	220
5	450	100	420
	130	130	350
	90	270	180
	250	230	100
	250	120	260
média	234	170	262

Tabela 31- Mensuração do tamanho (μm) dos grânulos em sessenta dias de pós-operatório.

Lâmina	PerioGlas®	Biovidro UEPG	Biogran®
1	300	150	330
	320	120	280
	200	250	400
	210	110	350
	290	150	120
média	264	156	296
2	160	190	160
	320	200	240
	170	80	130
	160	230	300
	320	180	250
média	226	176	216
3	210	160	450
	180	170	150
	200	50	230
	300	60	190
	60	160	250
média	190	120	254
4	530	50	230
	430	70	250
	370	150	480
	120	120	470
	110	250	400
média	312	128	366
5	150	70	100
	100	160	340
	70	190	310
	560	200	110
	180	230	300
média	212	170	232

Tabela 32- Teste de normalidade - Tamanho dos grânulos previamente à implantação.

Grupos	Kolmogorov-Smirnov		
	Estatística	Graus de liberdade	Valor p
PerioGlas®	0,141	20	0,200
Biovidro UEPG	0,129	30	0,200
Biogran®	0,137	10	0,200

Tabela 33- Teste de normalidade - Tamanho da reação inflamatória (valores transformados log).

Grupos	Kolmogorov-Smirnov		
	Estatística	Graus de liberdade	Valor p
PerioGlas®	0,122	40	0,134
Biovidro UEPG	0,138	40	0,053
Controle	0,466	40	<0,001
Biogran®	0,109	40	0,200

Tabela 34- Teste de normalidade - Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).

Grupos	Kolmogorov-Smirnov		
	Estatística	Graus de liberdade	Valor p
PerioGlas®	0,207	25	0,007
Biovidro UEPG	0,125	25	0,200
Controle	0,471	25	<0,001
Biogran®	0,113	25	0,200

Tabela 35- Teste de normalidade - Contagem de MN (valores transformados em percentagens).

Grupos	Kolmogorov-Smirnov		
	Estatística	Graus de liberdade	Valor p
PerioGlas®	0,139	25	0,200
Biovidro UEPG	0,142	25	0,200
Controle	0,178	25	0,039
Biogran®	0,152	25	0,141

Tabela 36- Teste de normalidade - Contagem de F (valores transformados em percentagens).

Grupos	Kolmogorov-Smirnov		
	Estatística	Graus de liberdade	Valor p
PerioGlas®	0,091	25	0,200
Biovidro UEPG	0,120	25	0,200
Controle	0,198	25	0,013
Biogran®	0,231	25	0,001

Tabela 37- Teste de normalidade - Tamanho dos grânulos.

Tempo (dias)	Kolmogorov-Smirnov		
	Estatística	Graus de liberdade	Valor p
7	0,184	15	0,182
15	0,148	15	0,200
21	0,133	15	0,200
45	0,163	15	0,200
60 dias	0,105	15	0,200

Tabela 38- Teste Levene para equivalência de variância - Tamanho dos grânulos previamente à implantação.

F	Graus de liberdade 1	Graus de liberdade 2	Valor p
3,110	2	57	0,052

Tabela 39- Anova (um critério) - Tamanho dos grânulos previamente à implantação.

Causas de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Valor de p
Tratamentos	628811,0	2	314405,481	160,469	< 0,001*
Resíduos	111679,8	57	1959,294		
Total	740490,7	59			

* Diferenças significativas

Tabela 40- Teste Levene para equivalência de variância - Tamanho da reação inflamatória (valores transformados log).

F	Graus de liberdade 1	Graus de liberdade 2	Valor p
2,956	19	140	<0,001

Tabela 41- Anova (dois critérios) - Tamanho da reação inflamatória (valores transformados em log).

Causas de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Valor de p
Grupos	14,178	3	4,726	22,943	< 0,001*
Tempos	6,450	4	1,613	7,828	< 0,001*
Grupos x Tempo	15,293	12	1,274	6,187	< 0,001*
Tratamentos	35,921 ^a	19	1,891	9,178	< 0,001*
Resíduo	28,839	140	0,206		
Total	64,760	159			

* Diferenças significativas

Tabela 42- ANOVA (dois critérios) - Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).

Causas de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Valor de p
Grupos	2260,373	3	753,458	22,952	< 0,001*
Tempos	2001,677	4	500,419	15,244	< 0,001*
Grupos x Tempo	1136,416	12	94,701	2,885	< 0,001*
Tratamentos	5398,466	19	284,130	8,655	< 0,001*
Resíduo	2626,231	80	32,828		
Total	8024,696	99			

* Diferenças significativas

Tabela 43- Teste Levene para equivalência de variância - Contagem de PMN (valores transformados em percentagens).

F	Graus de liberdade 1	Graus de liberdade 2	Valor p
2,309	19	80	0,005

Tabela 44- ANOVA (dois critérios) - Contagem de MN (valores transformados em percentagens).

Causas de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Valor de p
Grupos	882,135	3	294,045	2,025	0,117
Tempos	9007,318	4	2251,830	15,507	< 0,001*
Grupos x Tempo	3766,524	12	313,877	2,161	0,022*
Tratamentos	13,655,977	19	718,736	4,949	< 0,001*
Resíduo	11617,308	80	145,216		
Total	25273,285	99			

* Diferenças significativas

Tabela 45- Teste Levene para equivalência de variância - Contagem de MN (valores transformados em percentagens).

F	Graus de liberdade 1	Graus de liberdade 2	Valor p
4,318	19	80	<0,001

Tabela 46- ANOVA (dois critérios) - Contagem de F (valores transformados em percentagens).

Causas de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Valor de p
Grupos	1695,602	3	565,201	1,935	0,131
Tempos	4349,829	4	1087,457	3,723	0,008*
Grupos x Tempo	2748,299	12	229,025	0,784	0,665
Tratamentos	374802,309	1	374802,309	1283,264	< 0,001*
Resíduo	23365,559	80	292,069		
Total					

* Diferenças significativas

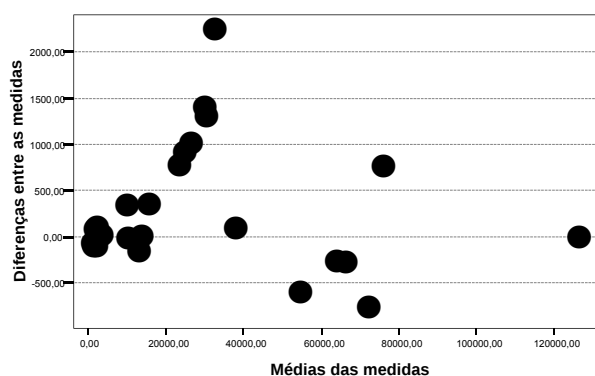
Tabela 47- Teste Levene para equivalência de variância - Contagem de F (valores transformados em percentagens).

F	Graus de liberdade 1	Graus de liberdade 2	Valor p
2,979	19	80	<0,001

Tabela 48- Teste Levene para equivalência de variância - Tamanho dos grânulos.

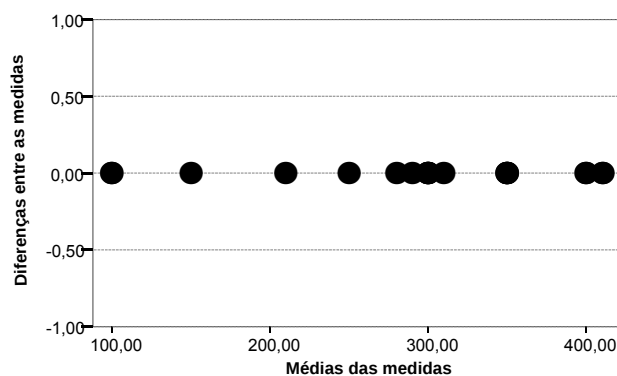
F	Graus de liberdade 1	Graus de liberdade 2	Valor p
0,883	14	60	0,581

Prancha 9: Gráficos de coeficiente de correlação intra-classe.



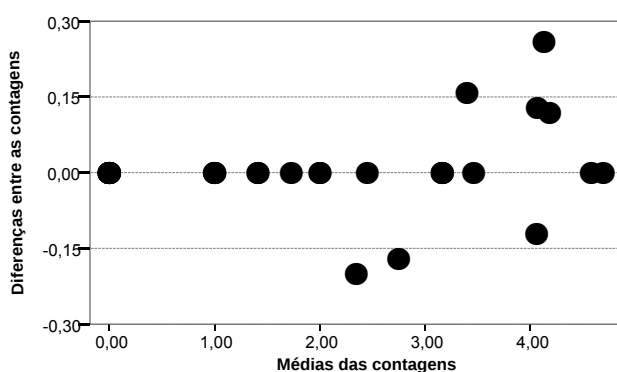
$\alpha = 0,99$

Gráfico 9.1



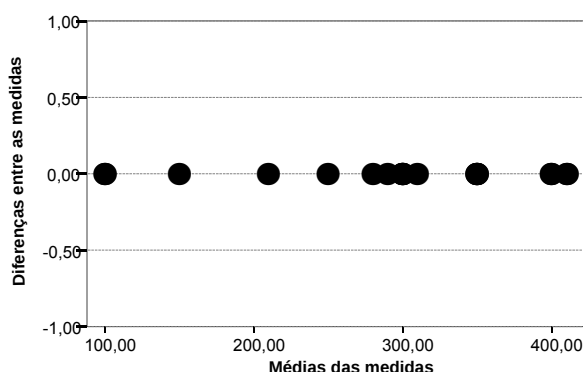
$\alpha = 1$

Gráfico 9.2



$\alpha = 0,99$

Gráfico 9.3



$\alpha = 1$

Gráfico 9.4

Gráfico 9.1- Reprodutibilidade dos dados de tamanho dos grânulos (μm), obtidos em duas análises feitas em dois momentos distintos (48h) - Coeficiente de correlação intraclass.

Gráfico 9.2- Reprodutibilidade dos dados de tamanho da reação inflamatória (μm), obtidos em duas análises feitas em dois momentos distintos (48h) - Coeficiente de correlação intraclass.

Gráfico 9.3- Reprodutibilidade dos dados de contagem de células, obtidos em duas análises feitas em dois momentos distintos (48h) - Coeficiente de correlação intraclass.

Gráfico 9.4- Reprodutibilidade dos dados de tamanho dos grânulos (μm) após implantação nos animais, obtidos em duas análises feitas em dois momentos distintos (48h) - Coeficiente de correlação intraclass.