INTERACÇÃO ENTRE BIOMATERIAIS E TECIDO ÓSSEO

AMÉRICO DOS SANTOS AFONSO

PORTO – 1998

Américo dos Santos Afonso

Interacção entre Biomateriais e Tecido Ósseo

PORTO – 1998

Dissertação de candidatura ao grau de doutor apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Aos meus pais
Aos meus sogros
À memória de meu tio
À minha família

À Concha e ao Zé Pedro,
a quem devo esta tese

Aos meus Mestres

Aos Docentes
da Faculdade de Medicina Dentária
da Universidade do Porto

Agradecimentos:

A concretização de um trabalho de investigação resulta sempre do esforço e do trabalho de um grupo de pessoas que directa ou indirectamente contribuem para a sua efectivação.

Mesmo correndo o risco de não citar todos aqueles que o mereceriam, constituiria uma injustiça não reconhecer a colaboração, apoio e o estímulo de um conjunto de pessoas que tornou possível a realização deste trabalho.

• *Ao Prof. Doutor José Cavalheiro, manifesto o meu reconhecimento pela orientação desta dissertação, onde, paralelamente ao apoio científico, me transmitiu o exemplo de perserverança, inconformismo, competência e sentido humanista.*

• *Ao Prof. Dr. Rogério Branco, devo a motivação para a investigação no campo dos biomateriais. Estou-lhe grato pela amizade e estima com que me tem distinguido e honrado ao longo dos anos. Os seus conselhos, orientações, sugestões e críticas serviram como incentivo para o prosseguimento da minha carreira na investigação científica.*

• *À Prof. Doutora Graça Simões de Carvalho, pelo incentivo e exemplo de grande rigor e competência na investigação científica.*

• *Ao Prof. Dr. Fernando Peres agradeço o apoio incondicional na criação de condições para a realização do trabalho na Faculdade de Medicina Dentária.*

• *Ao Professor Doutor Carlos Bernardo, pelas facilidades concedidadas na Universidade do Minho, pelo interesse com que acompanhou todo o meu trabalho, pelas críticas e sugestões oportunas, presto o meu reconhecimento.*

• *Ao colega e amigo, Dr. Mário Vasconcelos, pela colaboração inexcedível, apoio e estímulo nas inúmeras actividades que realizámos em conjunto, quero expressar a minha gratidão.*

• *À D. Ana Mota, o meu reconhecimento pela colaboração e competência na elaboração dos trabalhos histológicos.*

• *Ao Dr. José Alão Freitas, uma palavra de especial apreço pelo apoio, competência e disponibilidade na realização da cirurgia experimental.*

• *À D. Eduarda Falcão, os meus agradecimentos pela colaboração e competência na cirurgia experimental.*

• *O Dr. Ramiro Mascarenhas e a respectiva equipa da Estação Zootécnica Nacional foram inexcedíveis na competente colaboração que dispensaram durante a cirurgia experimental e na manutenção dos animais.*

• *Ao Prof. Doutor João Carlos Pinho, expresso o meu reconhecimento pelo estímulo e ajuda na revisão desta dissertação.*

• *Ao Prof. Doutor Henrique Barros, pela ajuda preciosa no tratamento estatístico dos dados.*

• *À equipa da "Medisa", quero agradecer todo o apoio, profissionalismo, sugestões e inexcedível dedicação na elaboração deste trabalho.*

• *Aos Laboratórios Bial agradeço o apoio à impressão deste trabalho.*

• *Ao Sr. Eduardo Oliveira, pela amizade e apoio na preparação da iconografia.*

• *À Gisela e ao Fred Grech, pela ajuda nas traduções.*

• *Aos alunos e funcionários da FMDUP.*

• *Aos meus colegas e amigos.*

ÍNDICE

Agradecimentos 9

Capítulo I – Contexto e Objectivos do Trabalho 15

Capítulo II – Introdução 21
1. Tecido Ósseo 21
1.1. Células do Tecido Ósseo 24
1.2. Formação do Tecido Ósseo 26
1.3. Remodelação Óssea 27
1.4. Reparação do Tecido Ósseo 28
2. Biomateriais 31
2.1. Definição 31
2.2. Classificação 32
2.2.1. Metais e Ligas metálicas 32
2.2.2. Cerâmicos 32
2.2.3. Polímeros 34
2.2.4. Compósitos 35
2.3. Comportamento Biológico 35
2.3.1. Materiais Bio-inertes 35
2.3.2. Materiais Biotolerados 36
2.3.3. Materiais Bioactivos 36
2.4. Bioactividade e Comportamento Ósseo 36
2.4.1. Bioactividade 36
2.4.2. Osseo-integração ou Osteointegração 37
2.4.3. Adesão Óssea 38
2.4.4. Osteocondução 38
2.4.5. Osteo-indução 38
2.5. Biocompatibilidade 38
2.6. Fenómenos de Superfície 39
2.7. Micromovimentos 41
3. Estudos de Biocompatibilidade 45
3.1. Estudos *in vitro* 46
3.2. Estudos *in vivo* 48

Capítulo III – Materiais e Métodos 55
1. Materiais 55
1.1. Caracterização Geral dos Materiais 55
1.1.1. Aço Inox 55
1.1.2. Titânio 57
1.1.3. Hidroxiapatite 59
1.1.4. Vidros Bioactivos 62
1.2. Caracterização dos Materiais Utilizados 66
1.2.1.Osteopatite® 66
1.2.2. Cimento de Vidro Bioactivo 66
2. Métodos 67
2.1. Caracterização dos Materiais 67
2.1.1. Composição Química 67
2.1.2. Análise Superficial 69
2.2. Preparação dos Materiais 70
2.2.1. Pinos Metálicos (Aço Inox e Titânio) 70
2.2.2. Osteopatite® 70
2.2.3. Cimento de Vidro Bioactivo 71
2.3. Experimentação Animal 71
2.3.1. Modelo Experimental 71
2.3.2. Protocolo da Cirurgia Experimental 74
2.4. Preparação Histológica 78
2.4.1. Microscopia Óptica 82
2.4.2. Microscopia de Fluorescência 83
2.4.3. Microscopia Electrónica de Varrimento 83
2.4.4. Histomorfometria 87
2.4.4.1. Análise Estatística 88

Capítulo IV – Resultados 89
1. Caracterização dos Materiais 89
1.1. Aço Inox 89
1.2. Titânio 89
1.3. Osteopatite® 92
1.4. Cimento de Vidro Bioactivo 93
2. Cirurgia Experimental 98
3. Histologia 99
3.1. Microscopia Óptica 99
3.1.1. Aço Inox 100

3.1.2. Titânio 104
3.1.3. Osteopatite® 110
3.1.4. Cimento de Vidro Bioactivo 117
3.2. Microscopia de Fluorescência 124
3.2.1. Amostras metálicas (Aço Inox e Titânio) 126
3.2.2. Osteopatite® 128
3.2.3. Cimento de Vidro Bioactivo 128
3.3. Microscopia Electrónica de Varrimento 130
3.3.1. Aço Inox 130
3.3.2. Titânio 137
3.3.3. Osteopatite® 144
3.3.4. Cimento de Vidro Bioactivo 149
3.4. Histomorfometria 158

Capítulo V – Discussão 163
1. Aço Inox 167
2. Titânio 171
3. Osteopatite® 177
4. Cimento de Vidro Bioactivo 181

Capítulo VI – Conclusões 189

Sugestões para futuras linhas de investigação 191

Resumo/Summary/Résumé 193

Bibliografia 199

I

CONTEXTO E OBJECTIVOS DO TRABALHO

A tentativa de substituir a perda de tecidos ou órgãos remonta a tempos longínquos na história humana [1].

São conhecidos relatos, através dos tempos, da procura de soluções para a perda precoce de dentes, utilizando vários tipos de materiais [2]. Todavia, só a partir da II Grande Guerra se iniciou efectivamente a investigação e o desenvolvimento de novos materiais. Este desenvolvimento foi fruto das necessidades crescentes de materiais com melhores propriedades para aplicações industriais e tecnológicas. Os avanços verificados nesta área tiveram reflexos importantes na evolução das soluções terapêuticas e de diagnóstico no campo médico.

Durante a guerra do Vietname, os médicos militares encontraram-se frequentemente perante a necessidade de reconstruções ou reparações de grandes perdas de tecido ósseo, como consequência de mutilações severas. A dificuldade de realizar autotransplantes, por falta de osso em quantidade suficiente, motivou o aparecimento de soluções alternativas, que incluíam o recurso a novos materiais biocompatíveis, tanto metálicos como cerâmicos ou poliméricos.

Em anos mais recentes, cientistas e clínicos têm vindo a envolver-se cada vez mais no desenvolvimento e investigação de materiais de alta tecnologia para aplicações biomédicas. O aumento da utilização de enxertos no tecido ósseo induziu avanços enormes no desenvolvimento de materiais alternativos. A título de exemplo, refira-se que, só nos Estados Unidos da América, são realizadas anualmente mais de 200.000 intervenções deste tipo, na especialidade de ortopedia [3].

Quando uma parte do organismo perde a sua função ou morfologia, devido a dano traumático, a processo patológico ou mesmo a envelhecimento do indivíduo, o defeito produzido pode ser tratado e/ou corrigido por duas

vias: uma é a chamada transplantação, na qual podem ser utilizados tecidos ou órgãos; a segunda é denominada implantologia, que utiliza materiais artificiais para restaurar a função e/ou a morfologia.

O desenvolvimento de novos materiais para utilização em implantologia pode ser efectuado através da criação de um novo material, pelo aperfeiçoamento e investigação de um material já existente ou pela modificação da sua composição química, das suas características físicas ou da sua estrutura.

Em medicina dentária, a perda precoce de dentes ou o aparecimento de defeitos ósseos são situações que desde sempre preocuparam os clínicos. As soluções existentes, para doentes que apresentavam perdas extensas de dentes ou que possuíam defeitos ósseos amplos, apenas permitiam recuperações estéticas e funcionais muito limitadas. Foi exactamente a procura de soluções mais satisfatórias que levou à introdução dos biomateriais na medicina dentária. Nesta área os biomateriais são utilizados na reconstrução ou preenchimento de defeitos ósseos [4-7], na prevenção da reabsorção de osso alveolar após a extracção dentária [8-10] e na substituição isolada ou múltipla de dentes [11-14].

Encontram-se actualmente disponíveis diversos materiais para utilização em medicina dentária. Os mais utilizados são o osso (autógeno, alógeno, xenógeno, descalcificado ou desmineralizado), polímeros, metais e materiais cerâmicos. As propriedades destes materiais variam significativamente, tanto nas características mecânicas como na composição química. Em princípio, é muito difícil conciliar elevada biocompatibilidade e boas características mecânicas num mesmo material.

Os enxertos de osso autógeno são utilizados na reconstrução e/ou preenchimento de defeitos ósseos [15]. Estes enxertos são o tipo de substituição óssea mais adequado porque possuem propriedades biomecânicas semelhantes às do tecido que vão substituir [7, 16-18]. O principal inconveniente é estarem sujeitos a fenómenos de reabsorção, de comportamento imprevisível. Acresce que a sua colheita implica uma intervenção cirúrgica suplementar no doente, que pode assumir riscos consideráveis em função da quantidade de tecido recolhido e do local onde a recolha se processa [7, 16, 19].

Embora seja considerado o método mais histocompatível e com maior probabilidade de sucesso no preenchimento de defeitos ósseos, as limitações na quantidade de osso que se pode obter, sem complicações para o doente, restringe a sua utilização [3, 20-22]. Apesar disto, os enxertos de osso autógeno continuam a ser o método mais usado na cirurgia ortopédica [21]. Em

implantologia oral, este tipo de material tem sido utilizado simultaneamente com a colocação de implantes metálicos, para aumentar o leito ósseo ou preencher defeitos ósseos no local de intervenção [18, 23].

Os enxertos alógenos e xenógenos, além de poderem desencadear reacções imunológicas de rejeição, apresentam problemas de revascularização e o risco potencial, não negligenciável, de transmissão de doenças infecciosas e/ou víricas [16, 23, 24]. A utilização de osso alógeno em humanos implica também a existência de bancos de osso, análises bacteriológicas/víricas específicas e técnicas de purificação e tratamento sofisticadas [25]. Existem, finalmente, limitações na obtenção de osso a partir de cadáveres, por motivos legais e religiosos, especialmente nalguns países asiáticos [20].

Os polímeros têm sido utilizados na forma de suturas reabsorvíveis e, mais recentemente, na forma de membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis, para aumento ou preenchimento de defeitos ósseos, através da técnica de regeneração guiada de tecidos [18, 26-30].

Os metais são, por vezes, a única alternativa na substituição de dentes perdidos. Possuem a vantagem de serem implantados e fixados mecanicamente ao osso. Os implantes metálicos de aço inoxidável foram utilizados nos anos cinquenta para a substituição de dentes, mas actualmente a sua utilização restringe-se à fixação provisória de fracturas ósseas.

As ligas de crómio-cobalto, por serem mais resistentes, constituíram o material de eleição dos implantes dentários até finais dos anos sessenta. No início dos anos setenta, com os trabalhos de investigação do grupo de Brånemark [31], deu-se início à utilização de implantes constituídos por titânio comercialmente puro. Os bons resultados da investigação experimental e clínica contribuíram para o aumento e generalização do uso deste material em medicina, conhecendo-se estudos de longo prazo que demonstram o seu sucesso [12, 32].

Os materiais cerâmicos, principalmente os bioactivos, por serem altamente biocompatíveis podem formar ligações firmes com o osso mas, infelizmente, possuem propriedades biomecânicas fracas. Alguns destes materiais, por possuírem uma composição química semelhante à do tecido ósseo e uma boa adesão a este, criaram grandes expectativas na utilização como substitutos dos tecidos duros [33]. Contudo, as limitações das suas propriedades mecânicas reduziram o campo da sua aplicação. A substituição de tecidos em zonas não sujeitas a cargas (defeitos ósseos) [4, 6, 7, 34] e o revestimento de implantes metálicos, no sentido de potencializar a capacidade de

adesão rápida ao tecido ósseo [11, 13-15, 33, 35-38] são as principais indicações destes materiais. São de assinalar os implantes de alumina e zircónia, utilizados em aplicações clínicas devido à sua elevada resistência biomecânica e boa biocompatibilidade [16, 39].

A utilização de biomateriais na elaboração de implantes dentários tem mais de 40 anos, envolvendo diferentes materiais e apresentando tamanhos, forma e desenhos muito distintos. Este facto proporcionou um avanço muito rápido da implantologia oral quando se compara a sua evolução com a de outras especialidades da área da medicina dentária [40]. Infelizmente, e até anos recentes, a generalização da sua utilização clínica não foi acompanhada pelos benefícios da experimentação e investigação científica no que respeita à influência das propriedades físico-químicas dos materiais [41].

Na actualidade, a intensa investigação laboratorial básica e os ensaios in vivo têm permitido um avanço significativo nos conhecimentos sobre o comportamento dos biomateriais implantados e a resposta que geram no hospedeiro. Paralelamente a este tipo de investigação fundamental, o controlo da utilização e do comportamento clínico dos implantes, segundo protocolos definidos e aceites por instituições de prestígio internacional, tem contribuído para uma melhor aquisição de conhecimentos e avanços técnico-científicos na área da implantologia [11, 12].

Os implantes dentários, fundamentalmente do tipo endósseo, continuam a ser o tipo mais utilizado em medicina dentária e com um índice de utilização clínica que aumenta todos os anos [42].

Considera-se, actualmente, que um material ideal para utilizar em implantologia oral deve possuir capacidade de adesão firme ao tecido ósseo e apresentar características mecânicas adequadas ao desempenho das funções dos tecidos ou órgãos dentários que visa substituir. Um material ideal para enxertos ósseos deverá ser substituído pelo tecido ósseo do hospedeiro, de forma contínua e gradual, necessitando para tal de ser biodegradável e osteocondutor [43].

No caso dos implantes dentários, deverão ter propriedades biomecânicas adequadas para suportar as forças mastigatórias e uma boa integração nos tecidos onde são colocados. Devem ainda suportar as forças a que são submetidos durante a sua função na cavidade oral e transmitir essas forças ao tecido ósseo envolvente de forma equilibrada, contribuindo para a sua diferenciação e aumento de resistência. No desenvolvimento de biomateriais para esta função é fundamental estudar e compreender as interacções que

ocorrem após a sua implantação no tecido ósseo. Outro aspecto essencial é a identificação dos parâmetros que directa ou indirectamente condicionam a formação da interface entre o osso e o implante.

Para muitos dos materiais utilizados em implantologia oral desconhecem-se ainda vários dos factores que permitem compreender os fenómenos interactivos que induzem nos tecidos receptores.

No caso dos materiais em fase de desenvolvimento, o estudo e a análise do seu comportamento nos tecidos vivos representa uma etapa fundamental da sua evolução. Os resultados obtidos nos ensaios são fundamentais para indicar a sua utilização clínica. Não é, por isso, estranho que os objectivos que devem guiar a investigação na área da implantologia nos anos noventa sejam [44]:

- a obtenção de um melhor conhecimento sobre os factores que controlam a integração tecidular dos biomateriais, bem como dos fenómenos e mecanismos que ocorrem a este nível;
- a avaliação dos efeitos biológicos da aplicação de forças nos biomateriais;
- a transferência das tensões transmitidas pelo implante aos tecidos envolventes através da interface.

Assim, o objectivo genérico deste trabalho é o estudo das interacções de alguns dos biomateriais mais utilizados em medicina, como o aço inox 316L, o titânio, uma hidroxiapatite modificada quimicamente e um cimento de vidro bioactivo.

O tipo de implantação de cada material foi condicionado pela forma habitual de utilização clínica: nos materiais metálicos, utilizou-se a forma de pinos cilíndricos, enquanto que na hidroxiapatite usou-se a forma de grânulos e no cimento de vidro bioactivo a forma de pasta.

Mais especificamente, pretende-se responder às seguintes questões fundamentais:

- Qual a importância da composição química dos biomateriais e das suas características superficiais na modulação da resposta do tecido ósseo?
- Qual o tipo de interface que se forma entre os diferentes materiais e o tecido ósseo?
- Quais os mecanismos e/ou fenómenos que ocorrem no desenvolvimento do processo de adesão entre os materiais e o osso?

II

INTRODUÇÃO

1. TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido especializado, característico da classe dos animais vertebrados. Do ponto de vista zoológico, o tecido ósseo tende a apresentar características específicas que advêm da sua diferenciação nos vários animais, de acordo com parâmetros que incluem o meio ambiente onde vivem e o tipo de forças a que o osso é submetido [1].

Sendo um tecido especializado no suporte de forças e tensões que lhe são transmitidas pelos músculos esqueléticos, o osso é um dos tecidos mais resistentes e duros do organismo humano. Para além das funções de suporte, protecção e locomoção, o osso também é um reservatório importante de minerais, com um papel activo na regulação do equilíbrio orgânico [45].

O osso é um tipo de tecido conjuntivo, constituído por células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e matriz extracelular, diferenciando-se dos outros tecidos conjuntivos pelo facto dessa matriz ser mineralizada. Na sua composição incluem-se 33% de matriz orgânica e 67% de compostos inorgânicos [46].

Os iões mais abundantes são o cálcio e o fósforo, que formam o constituinte mineral mais importante, a hidroxiapatite, que tem como fórmula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ [46].

Os cristais de hidroxiapatite são relativamente pequenos, podendo atingir o tamanho de 10 a 100 nm [47]. Distribuem-se ao longo das fibrilas de colagénio e são envolvidos pela substância fundamental amorfa. A sua associação com as fibras de colagénio é responsável pela dureza e resistência características do tecido ósseo [48]. Podem também ser encontrados, em menores quantidades, iões de potássio, sódio e magnésio.

A matriz orgânica extracelular do osso é formada, essencialmente, por fibras de colagénio de tipo I, em percentagens de 85 a 95% [46, 49, 50].

As fibras colagénicas do osso estão envolvidas por uma substância de suporte, o cimento. Este cimento orgânico, ao longo do qual as fibras se mineralizam, preenche os espaços entre as fibrilas dando consistência ao tecido ósseo.

Os compostos não colagenosos incluem um vasto conjunto de proteínas, entre as quais se encontram as glicoproteínas, sialoproteínas e fosfoproteínas [46]. As glicoproteínas estão implicadas na transformação do tecido osteóide em osso.

O tecido ósseo apresenta características distintas, em função do seu estado de maturação, podendo ser divido em dois tipos distintos [51]:

- O tecido ósseo primário ou imaturo encontra-se, predominantemente, no feto. Surge, também, nos ossos em crescimento ou durante o processo de reparação de fracturas e em algumas situações patológicas, no adulto, nomeadamente tumores. Este tipo de tecido apresenta, como característica específica, uma orientação pouco organizada das fibras de colagénio, segundo uma disposição plexiforme e com trajecto irregular. Possui numerosos osteócitos, de grande volume, com uma forma de distribuição inconstante na matriz, relativamente aos espaços vasculares e conjuntivos.
- O tecido ósseo secundário existe em locais onde são exercidas forças de tensão. Substitui o osso primário durante o processo de crescimento ou de regeneração óssea. É, por sua vez, dividido em dois tipos de tecido: o osso lamelar, predominante, e o osso fibroso ou fascicular.

O osso lamelar é constituído por lâminas finas, as lamelas, de tamanhos compreendidos entre os 4 e 7 μm. No interior de cada lamela, as fibras de colagénio orientam-se de forma paralela entre si, mas a sua orientação geral é diferente da das lamelas adjacentes. Este tipo de tecido é observado nos ossos longos e na cortical do osso alveolar [51].

O osso fibroso ou fascicular, não lamelar, é constituído por fibrilas de colagénio espessas, com organização paralela entre elas. É observado, geralmente, nos locais de inserção dos ligamentos, permitindo uma união forte entre o tecido ósseo e as fibras ligamentares [51].

Os ossos são classificados macroscopicamente em ossos longos e achatados. Incluem-se no grupo dos ossos longos, a tíbia, o fémur, o rádio, o cúbito e o úmero. Os ossos do crânio e o externo são exemplos de ossos achatados.

Uma característica comum a todos os tipos de osso é possuírem uma camada externa, densa, de osso compacto e uma cavidade medular central.

A cavidade medular está ocupada, nos ossos vivos, por medula óssea e tecido gordo.

Os ossos adultos, tanto os compactos como os esponjosos, possuem características histológicas semelhantes. São constituídos por camadas microscópicas de tecido, as lamelas ósseas, que no osso compacto se apresentam mais comprimidas.

Podem identificar-se três tipos diferentes de lamelas: circunferenciais, concêntricas e intersticiais [51].

- As lamelas circunferenciais envolvem a parede externa do osso adulto, formando uma camada superficial.
- As lamelas concêntricas preenchem grande parte do osso compacto formando uma unidade metabólica básica denominada de ósteon. Os ósteons são cilindros de tecido ósseo, com orientação paralela ao eixo principal do osso. No centro de cada ósteon existe o canal de Havers que está recoberto por uma camada única de osteoblastos e aloja um capilar. Os canais de Havers estão interligados através dos canais de Volkman, que também possuem capilares no seu interior. Esta rede vascular permite o aporte de fluidos orgânicos às partes mais profundas do tecido.
- As lamelas intersticiais preenchem os espaços existentes entre as lamelas concêntricas e não são mais do que fragmentos das lamelas concêntricas que adoptam uma grande diversidade de formas.

Na parede externa do osso compacto existe uma membrana de tecido conjuntivo osteogénico, denominada de periósteo. Este tecido possui uma alta percentagem de células ósseas jovens e indiferenciadas, contribuindo significativamente para o processo regenerativo do osso.

A parede interna dos ossos compacto e esponjoso está revestida por uma camada única de células ósseas, denominada de endósseo, que também contribui para o processo regenerativo e remodelativo do osso.

A caracterização experimental do osso pode ser feita através da determinação da relação entre o cálcio e o fósforo, bem como da presença dos iões sódio e magnésio, entre outros. Uma relação Ca/P de 1,38± 0,04 é característica de um osso jovem, enquanto que uma relação Ca/P de 1,25± 0,12 é característica do precursor mineral de um osso recém formado [52].

1.1. Células do Tecido Ósseo

A matriz celular do tecido ósseo é formada por três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

Osteoblastos. Têm como principal função a produção da matriz óssea, durante o desenvolvimento ou a reparação do tecido ósseo. Durante o processo de remodelação funcional da estrutura óssea, para se adaptar a forças ou tensões mecânicas, estas células desempenham um papel fundamental. São células mononucleadas que sintetizam proteínas colagénicas ou não colagénicas e são responsáveis pelo processo de mineralização do tecido osteóide [45].

Os osteoblastos dispõem-se em camadas de células cubóides, que possuem características histológicas comuns às das células secretoras de proteínas. Apresentam alguma polaridade e são basófilas. Ultra-estruturalmente contêm grandes quantidades de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi [53]. Sintetizam e secretam a matriz orgânica extracelular do osso, incluindo o colagénio de tipo I, osteocalcina, osteopontina, osteonectina, fosfatase alcalina, proteoglicanos, bem como os factores de regulação do crescimento que são armazenados dentro da matriz óssea.

Os osteoblastos inactivos apresentam características morfológicas diferentes das células em estado activo. Os núcleos são mais densos e as células apresentam uma forma mais achatada, sendo denominadas células de revestimento.

Osteócitos. São células achatadas e fusiformes que suportam o osso e estão localizadas no interior das lamelas do osso esponjoso e compacto. Estão completamente envolvidas por matriz extracelular, formando um espaço denominado de lacuna. As lacunas estão interligadas através de uma série de canais finos, os canalículos, que são ocupados por finas extensões do citoplasma dos osteócitos, permitindo o contacto entre as células adjacentes. Por vezes estes prolongamentos não estão em contacto directo e o espaço entre elas é preenchido por fluído extracelular.

Estes canalículos são extremamente importantes na manutenção da vitalidade destas células, pois é através deles que se processam as trocas metabólicas entre as células e os fluidos orgânicos. No caso dos canalículos serem obstruídos as células morrem, ficando as lacunas vazias.

A quantidade de osteócitos existente por unidade de volume ósseo está directamente dependente da rapidez do processo formativo deste tecido. Quanto maior for a rapidez de formação óssea maior será a quantidade de osteoblastos aprisionados que se transformarão, posteriormente, em osteócitos. Normalmente, o osso embrionário e o osso em fase de reparação contêm um número mais elevado de osteócitos do que o osso lamelar.

Osteoclastos. Estas células desempenham um papel fundamental no processo de remoção e reabsorção do osso que é destruído, libertando cálcio ou, em conjugação com o processo de deposição óssea, levando à remodelação deste tecido em consequência de exigências funcionais [53].

Os osteoclastos são as principais células envolvidas na reabsorção do tecido ósseo mineralizado. Diferenciam-se, em contacto com o osso, a partir de células precursoras hematopoiéticas mononucleadas, estando referenciada uma série de factores locais e sistémicos que influenciam este processo [45, 51, 53, 54].

Estas células distinguem-se das outras por apresentarem um volume aumentado e múltiplos núcleos. O número de núcleos presentes pode atingir as dezenas [51]. O citoplasma contém múltiplos vacúolos e vesículas, bem como numerosas mitocôndrias e ribossomas livres. As mitocôndrias desempenham um papel relevante na produção do citrato necessário para a reabsorção do osso, armazenando, de forma transitória, os iões de cálcio e de fósforo, e satisfazendo as necessidades metabólicas através da produção de ATP. Os componentes do retículo endoplasmático rugoso são pouco pronunciados enquanto que o complexo de Golgi é nítido e acompanha o número de núcleos presentes. A membrana celular, nas zonas de contacto com o tecido ósseo, possui interdigitações citoplasmáticas com 50 a 150 μm de comprimento, assumindo a forma de múltiplas pregas estriadas denominadas de bordo rugoso [51]. Esta zona da membrana corresponde à parte activa da célula permitindo-lhe as trocas necessárias para assegurar o processo de reabsorção. Durante este processo, a membrana tem a dupla função de excretar os componentes desmineralizantes do tecido e de absorver os produtos libertados pelo processo de reabsorção óssea. Junto da membrana citoplasmática observa-se uma zona clara que delimita a área de reabsorção. Esta zona corresponde a uma parte citoplasmática sem organelos celulares, possuindo filamentos actínicos e microtúbulos organizados.

Estas células apresentam uma grande especificidade morfológica e funcional. Além de serem multinucleadas, possuem pares de centríolos em número

idêntico ao dos núcleos. Desenvolvem um bordo recortado típico, quando em contacto com a matriz óssea mineralizada e caracterizam-se pela capacidade de acidificação do meio extracelular, com consequente dissolução dos cristais de cálcio e fósforo. Apresentam, ainda, actividade de ATPase e de fosfatase ácida resistentes ao tartarato e receptores para a calcitonina [45, 55].

A intervenção dos osteoclastos no processo de reabsorção óssea ainda não está totalmente clarificada [54]. Pensa-se que é a intervenção enzimática que induz a quebra da integridade da matriz e/ou a quelação da componente mineral [51]. Quando o osso está em fase de reabsorção, estas células localizam-se na sua superfície, levando à perda de tecido e criando depressões denominadas reentrâncias de reabsorção ou lacunas de Howships.

Para além das funções osteolíticas, os osteoclastos desempenham um papel importante no desenvolvimento e crescimento ósseo, através da libertação de factores de crescimento de tipo polipeptídico, a partir da matriz extracelular mineralizada [45].

1.2. Formação do Tecido Ósseo

O tecido ósseo forma-se e desenvolve-se de forma distinta, apresentando três formas habituais de ossificação: endocondral, intramembranosa e sutural [46].

– A ossificação endocondral segue um modelo de matriz cartilaginosa que precede a formação do tecido ósseo. Localiza-se nos extremos dos ossos longos e caracteriza-se pela condensação de células mesenquimatosas que adoptam a forma genérica do osso a que vão dar origem. As células cartilaginosas diferenciam-se a partir destas células mesenquimatosas e sofrem um processo de crescimento rápido levando à formação de uma matriz cartilaginosa que sofre um processo posterior de mineralização.

– A ossificação intramembranosa ocorre de forma directa no tecido conjuntivo. Neste tipo de formação, o osso desenvolve-se directamente dentro de uma membrana de tecido conjuntivo mole em vez de tecido cartilaginoso. Uma vez iniciado, este processo de ossificação prossegue muito rapidamente, englobando tecido conjuntivo que fica misturado com o osso imaturo neoformado e originando uma matriz óssea altamente desorganizada. Esta matriz desorganizada sofre um processo de mineralização limitado pela rapidez da sua formação, incluindo no seu interior muitos osteoblastos que, ficando envolvidos, se transformam em osteócitos. Este tecido é um osso muito rico em células osteoblásticas.

– A ossificação sutural é um tipo especial de ossificação intramembranosa na qual o osso se forma nos bordos das suturas ósseas. É característica das suturas entre os ossos do crânio e permite um crescimento gradual que vai acompanhando o aumento de volume dos órgãos que estão alojados no seu interior.

1.3. Remodelação Óssea

A remodelação óssea é um processo contínuo de eventos que permitem a substituição de osso antigo por novo tecido ósseo, assegurando, também, a substituição de osso primário ou imaturo por osso secundário [54]. Este processo depende das forças a que o osso está sujeito durante as suas funções normais. De facto, o aparecimento e a orientação das trabéculas ósseas encontram-se condicionados pela intensidade, duração e orientação das forças a que o tecido é submetido durante as suas funções de suporte [46].

A remodelação do tecido ósseo compacto adjacente a um implante resulta na formação de ósteons secundários, que são estruturas lamelares concêntricas com uma margem periférica pedunculada denominada cimento ou linha limite de reabsorção [56].

A arquitectura trabecular do tecido ósseo relaciona-se directamente com as forças que lhe são transmitidas através das inserções musculares ou, no caso da implantologia, das forças de carga que lhe são transmitidas através do implante.

Durante a remodelação óssea que ocorre após a colocação de implantes dentários metálicos, verifica-se, usualmente, um processo de reabsorção do osso adjacente da crista alveolar. Consideram-se aceitáveis valores de reabsorção que não ultrapassem 1 mm no primeiro ano e 0,1 mm nos anos subsequentes [57]. As causas possíveis desta perda de tecido no osso alveolar incluem a infecção localizada dos tecidos, peri-implantite, ou a existência de forças mecânicas anormais no implante que ou provocam uma atrofia por falta de estímulos ou promovem a sua reabsorção, devido a forças exageradas [57].

Comparativamente, a duração da fase de formação do tecido ósseo é distinta entre diferentes espécies animais. Enquanto pode demorar uma a duas semanas no Homem, no Cão dura uma semana e no Coelho alguns dias. O preenchimento de uma cavidade óssea no Coelho demora 4,5 semanas, no Cão 10 semanas e no Homem cerca de 13 semanas. A duração do ciclo de remodelação óssea aumenta na proporção directa do tamanho do animal[56].

O estabelecimento de uma relação entre a duração do ciclo de remodelação óssea nas várias espécies animais permite calcular os tempos que são necessários no Homem para obter um comportamento idêntico ao do tecido ósseo dos coelhos, após a implantação de um biomaterial semelhante.

1.4. Reparação do Tecido Ósseo

A resposta normal de cicatrização do osso é um fenómeno dinâmico no qual as células e os seus metabolitos interactuam para reparar o tecido danificado. Muitos tipos de células estão envolvidos neste processo fisiológico de reparação, incluindo os macrófagos, os leucócitos polimorfonucleares e outras células do sistema imunitário.

Sendo um tecido vivo, responde às agressões com o mesmo tipo de resposta tecidular e celular que os outros tecidos orgânicos: inflamação, cicatrização ou reacção de corpo estranho.

No caso da colocação de um implante intra-ósseo, realiza-se um conjunto de actos que provocam agressão e dano aos tecidos intervencionados. Após a inserção ou a implantação cirúrgica de um biomaterial, o tecido inicia a resposta à agressão, sendo despoletado um conjunto de fenómenos que levam à reparação dos danos e à cicatrização tecidular [58].

A resposta regenerativa orgânica, no local do trauma cirúrgico, envolve a diferenciação e regulação dos tecidos esquelético e conjuntivo, de forma semelhante ao processo que ocorre durante a reparação de uma fractura óssea. Este processo regenerativo ou reparador também apresenta muitos dos mecanismos que se observam durante o crescimento ósseo e a morfogénese [50].

A gravidade da perturbação dos mecanismos homeostáticos, a extensão das respostas patofisiológicas e a sua resolução são medidas de resposta do hospedeiro à implantação de um biomaterial [58]. Dois factores importantes que influenciam todo o processo de diferenciação tecidular óssea são a vascularização dos tecidos, que permite uma oxigenação e aporte de nutrientes ao local, e a estabilidade dos tecidos, por ausência de forças biomecânicas. Imediatamente após a intervenção cirúrgica, ocorre a primeira resposta do hospedeiro, que se manifesta pela formação de um coágulo ou trombo sanguíneo, através da activação dos sistemas extrínseco e intrínseco da coagulação. Surgem mudanças imediatas da permeabilidade e do volume dos vasos que provocam alterações no fluxo sanguíneo. O aumento deste fluxo permite o incremento rápido, no local intervencionado, de célu-

las sanguíneas, proteínas, líquidos e factores químicos, que medeiam a resposta tecidular inicial. O processo de diferenciação do tecido ósseo está altamente dependente da vascularização dos tecidos. Enquanto que os tecidos cartilaginosos e fibrocartilaginosos não necessitam de uma abundante vascularização devido às exigências metabólicas mínimas, o osso e o tecido fibroso, por outro lado, necessitam de um incremento significativo da irrigação para se diferenciarem.

Este processo continua com a presença de células específicas de defesa, que contribuem para a resposta inflamatória local. O tamanho, forma e propriedades físico-químicas do biomaterial são responsáveis pela duração do processo inflamatório [58]. Várias células com funções e tempos de actuação distintos intervêm no processo. Os neutrófilos possuem um tempo de vida curto, entre algumas horas até alguns dias, desaparecendo do exsudado plasmático mais rapidamente do que os macrófagos, que podem perdurar durante algumas semanas ou meses. Os monócitos são as células de defesa responsáveis, principalmente, pela cicatrização em situações de reacções de corpo estranho. Possuem a capacidade de se diferenciarem rapidamente em macrófagos.

Se forem mantidos os estímulos nocivos, os macrófagos podem tornar-se o tipo celular predominante no local lesionado, originando a passagem a um estado inflamatório crónico.

No caso dos implantes, estes estímulos nocivos podem ser motivados pela persistência de micromovimentos do material, por má adaptação deste ao osso, ou devido a forças de carga exageradas ou precoces [58].

O processo final de cicatrização, em resposta à implantação de um biomaterial, pode incluir dois tipos distintos de reparação tecidular. Um é a regeneração tecidular, que consiste na substituição do tecido danificado por células parenquimatosas específicas desse tecido, osteoblastos no caso do osso. O outro é a substituição do tecido original por tecido conjuntivo que irá constituir uma cápsula fibrosa, no caso do tecido ósseo, ou uma cicatriz, no caso dos tecidos moles [58].

O tipo de tecido ósseo que se forma após a colocação de um implante endósseo depende da idade, da função e de múltiplos factores sistémicos. É composto por quatro tipos diferentes de osso, caracterizados microscopicamente como osso imaturo ou embriológico, lamelar, compacto e esponjoso [56].

O osso imaturo, primário ou osteóide, é um tecido ricamente preenchido por células, que se forma rapidamente (mais de 30 a 50 μm por dia) em

resposta ao crescimento ou adaptação biomecânica. Comparativamente com o osso secundário, possui um grau de mineralização relativamente menor, uma orientação das fibras mais irregular e uma resistência mínima. Em condições normais é substituído rapidamente por tecido ósseo lamelar.

O osso lamelar é o principal tecido do esqueleto adulto. Tem uma formação relativamente lenta (0,6 μm por dia) e um mecanismo primário e secundário de mineralização. A maturação completa deste tipo de osso requer um período de tempo de pelo menos 6 a 12 meses.

O osso compacto possui estriações que são extensões das fibras de Sharpey e é semelhante ao osso lamelar na resistência biomecânica. É característico das uniões estáveis entre o tecido fibroso e o ósseo.

O osso esponjoso forma-se nas superfícies corticais durante o processo de cicatrização ou reparação, crescimento e adaptação biomecânica do osso.

É importante salientar que existe uma relação directa entre a idade do osso e a seu conteúdo mineral. Os osteoblastos depositam cerca de 65% dos componentes minerais existentes no osso lamelar vital, durante a mineralização primária. A mineralização secundária, correspondendo aos 35% remanescentes, consiste num fenómeno de crescimento dos cristais não celulares que se prolonga durante o período de alguns meses [56].

As diferenças da capacidade osteogénica do tecido ósseo, apresentadas em vários locais anatómicos, é outro aspecto importante. O calo ósseo que ocorre após fractura é predominantemente formado no periósteo e endósseo, sendo mais reduzido na cavidade medular [59].

O tipo de regeneração óssea na zona da interface formada entre um implante e o osso neoformado não é idêntico ao que ocorre durante a reparação de uma fractura óssea. Tal facto é devido a que não é possível observar a formação de uma cartilagem endocondral como precursora do crescimento do osso esponjoso no homem [60].

Os efeitos das forças de carga na cicatrização da fractura óssea têm sido objecto de vários trabalhos de investigação [61]. Os resultados obtidos apontam para a conclusão de que após um período de protecção da zona de fractura, com fixação externa e a sua estabilização, se verifica um aumento dos valores de cicatrização com a aplicação de forças cíclicas controladas. Variáveis tais como o tamanho do espaço inicial entre os bordos da fractura, a estabilidade da fixação do osso e os parâmetros que condicionam a aplicação dos movimentos (magnitude, frequência e duração da força) parecem ser determinantes neste processo [61].

No estudo do tecido ósseo regenerado após a implantação de um biomaterial, é muito importante identificar qual os tipos de células que se formam na zona da interface. A identificação das células multinucleadas associadas aos processos de reabsorsão óssea é a mais complexa [55]. É fundamental estabelecer a diferenciação entre as células osteoclásticas e as células gigantes multinucleadas, também denominadas de células de Langhans ou de células gigantes de corpo estranho [62]. Estas células têm a sua origem na fusão dos monócitos maduros ou dos macrófagos, e surgem, normalmente, em situações inflamatórias crónicas, na forma de tecido de reacção identificado como granuloma. Diferenciam-se dos osteoclastos através da análise do comportamento de marcadores citoquímicos específicos para os osteoclastos, que não são evidenciados neste tipo de células [55].

2. BIOMATERIAIS

2.1. Definição

O objectivo principal de um biomaterial é substituir órgãos ou tecidos. Para isso, antes de ser aceite como possível candidato em aplicações clínicas, é necessário proceder a uma investigação intensa e exaustiva sobre a sua biocompatibilidade e segurança biológica.

As características mais importantes para seleccionar um material para utilização médica são biocompatibilidade, ausência de efeitos nocivos ou tóxicos para o organismo e propriedades biomecânicas capazes de responderem às solicitações dinâmicas e estáticas a que estará sujeito durante a sua vida útil.

Um biomaterial foi inicialmente definido como sendo "um material não vivo, usado como dispositivo médico, projectado para interactuar com sistemas biológicos" [63]. Como esta definição apresentava alguma controvérsia, pois a sua amplitude restringia-se apenas a materiais não vivos, na segunda Conferência sobre Consenso nas Definições em Biomateriais, realizado em Chester no ano de 1991, o termo biomaterial foi redefinido como sendo: "um material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo" [64]. Pode considerar-se também, de forma geral, que um biomaterial é um material que interactua com os tecidos nos quais é implantado, mantendo a sua estrutura e propriedades, sem provocar alterações no meio fisiológico envolvente.

Os biomateriais podem ser classificados sob o ponto de vista do comportamento biológico e da sua composição química. A classificação biológica é baseada na resposta orgânica após a implantação do biomaterial, enquanto que a química depende das suas propriedades intrínsecas. O comportamento biológico é mais utilizado pelos investigadores clínicos enquanto que a classificação química é preferencialmente utilizada em estudos laboratoriais e em ciências básicas.

2.2. Classificação

2.2.1. Metais e Ligas Metálicas

Os metais são utilizados em múltiplas aplicações clínicas, em medicina dentária e noutras áreas médicas, devido às suas propriedades mecânicas e à sua suposta inerticidade.

A rigidez e potencial toxicidade, através da libertação de iões que podem provocar metaloses, reacções inflamatórias e encapsulação fibrosa, são os principais inconvenientes deste tipo de materiais [65-68].

O aço inox, o titânio, a liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti6Al4V) e as ligas de crómio-cobalto são alguns exemplos de metais ou ligas metálicas utilizadas em medicina. Os implantes metálicos de titânio comercialmente puro constituem o tipo de implante mais usado em implantologia oral e em outras aplicações médicas [69].

2.2.2. Materiais Cerâmicos

Os materiais cerâmicos, muito estáveis e não reactivos, são produzidos a temperaturas superiores a 1000 °C. Quando puros, estes materiais possuem uma estrutura cristalina geralmente robusta, porque os átomos estão num estado de máxima densidade de compactação, ao contrário dos materiais cerâmicos não cristalinos onde as distâncias inter-atómicas são grandes.

Em termos físico-químicos, pode dizer-se que os materiais cerâmicos são:

- frágeis, duros e resistentes ao desgaste;
- altamente resistentes a ataques ácidos;
- estáveis a altas temperaturas;
- isolantes térmicos e eléctricos.

Os materiais cerâmicos podem dividir-se em três grupos, em função das suas propriedades físico-químicas [70]:

- Um primeiro grupo é constituído pelos materiais cerâmicos oxidados que, quando implantados nos tecidos orgânicos, se mantêm estáveis e inertes, sendo limitada a sua utilização clínica. Os óxidos de alumina, de zircónia e de magnésio são exemplos deste grupo de materiais [16].
- Num segundo grupo encontram-se os materiais cerâmicos de tipo fosfato de cálcio, com comportamento biológico distinto. Os representantes mais importantes destes materiais são os fosfatos tricálcicos e as apatites. A utilização destes materiais na substituição de tecido ósseo é relativamente corrente devido à semelhança da sua composição com a fase mineral do tecido ósseo e por apresentarem grande biocompatibilidade [71]. Estes biomateriais têm indicação clínica no preenchimento de defeitos ósseos [4, 9, 72], mas não em situações em que sejam submetidos a forças de carga, excepto no revestimento de implantes metálicos [11, 13-15, 36, 38, 73, 74].
- No terceiro grupo podem incluir-se os vidros de sílica e os vidros cerâmicos. O primeiro e mais conhecido material, baseado no vidro de sílica contendo iões de cálcio e fósforo, foi desenvolvido por Larry Hench e col. [75, 76], nos anos setenta, na Universidade da Florida, sendo denominado de Bioglass®. Apresenta boas propriedades de adesão óssea e biocompatibilidade, embora tenha limitações de resistência mecânica. No sentido de melhorar as propriedades biomecânicas deste grupo de materiais, foram introduzidas modificações no processo de síntese dos vidros bioactivos levando ao aparecimento dos vidros cerâmicos. Os vidros bioactivos e os vidros cerâmicos têm sido utilizados no preenchimento de defeitos ósseos [6, 7, 77], na prevenção da reabsorção alveolar pós-extracção dentária [78], no revestimento de implantes metálicos, melhorando as suas propriedades mecânicas e a regeneração óssea [35, 37], na substituição de vértebras e de osso ilíaco [48, 79] e na libertação de fármacos [80]. Os mecanismos de adesão óssea dos materiais cerâmicos são diferentes conforme se consideram os cerâmicos com superfícies bioactivas e os reabsorvíveis. Enquanto que os primeiros apresentam um tipo de adesão química ao tecido ósseo através de uma camada superficial bioactiva de apatite, os segundos unem-se, preferencialmente, através de ligações mecânicas. A hidroxiapatite apresenta um tipo intermédio de união ao tecido ósseo [81].

2.2.3. Polímeros

Os polímeros são cadeias extensas de unidades monoméricas repetidas, unidas por ligações covalentes, com peso molecular elevado. A unidade monomérica é essencialmente constituída por ligações do tipo C-C, contendo por vezes átomos de C, N, O, S e Si. As propriedades físico-químicas destes materiais são marcadamente influenciadas por vários factores, dos quais se destacam: a composição química, a estrutura, a extensão da cadeia macromolecular (peso molecular) e a distribuição de tamanhos nas cadeias [20].

Os polietilenos, o polipropileno, o poliuretano, o ácido polilactídico (PLA) e o poli (metacrilato de metilo) – PMMA – são exemplos de polímeros utilizados em implantologia.

Alguns implantes poliméricos podem causar respostas patológicas através da libertação de monómeros tóxicos ou da sensibilização alérgica [82].

O poli (metacrilato de metilo), vulgarmente designado por PMMA, é muito usado como cimento ósseo para fixar as próteses ortopédicas [83-85]. O monómero necessário para a reacção de polimerização é tóxico e pode provocar hipotensão, insuficiência respiratória e/ou cardiovascular e reacções alérgicas [82, 84, 85]. Localmente, a hipertermia, a precipitação proteica e a necrose tecidular são efeitos secundários a considerar [83-85].

Os materiais poliméricos também estão sujeitos a fenómenos de biodegradação que dependem da composição química do polímero, dos monómeros residuais e dos aditivos aceleradores da polimerização, incluídos no processo de fabrico [82, 86]. São exemplos as reacções oxidativas e hidrolíticas que podem ocorrer em zonas localizadas das cadeias, dando origem à dissolução, deformação e fractura de componentes [70].

A utilização de materiais poliméricos é mais benéfica do que a dos metálicos por duas razões: em primeiro lugar, porque a diferença no módulo de elasticidade entre o implante e o osso é mais reduzida, o que diminui a tensão de contacto e a reabsorção óssea; em segundo lugar, porque, como já se referiu, muitos polímeros são susceptíveis de degradação.

Através dos processos de degradação, os implantes poliméricos podem ser gradualmente substituídos pelo tecido hospedeiro, reduzindo a necessidade de uma segunda intervenção para remover o implante. Contudo, os conhecimentos sobre as reacções adversas prováveis aos produtos de degradação são ainda restritos. As limitações destes materiais são significativas em situações de solicitações mecânicas mais intensas, devido a algumas insuficiências na sua resistência [82].

A utilização de membranas de e-PTFE (politetrafluoroetileno expandido) na regeneração óssea guiada tem tido um incremento notável em implantologia oral. Quer de forma isolada, para aumentar a quantidade de osso e para a reparação de defeitos ósseos periodontais, ou associadas a outros biomateriais [18, 26, 27, 30, 87], estas membranas têm aumentado significativamente o seu campo de aplicação em implantologia [28]. Estudos comparativos, em humanos, sobre a utilização das membranas de e-PTFE não reabsorvíveis versus membranas reabsorvíveis de PLA (ácido poliláctico) e PGA (ácido poliglicólico), demonstraram que as membranas de e-PTFE são mais eficazes na sua função de barreira, induzindo a formação de osso em maior quantidade e qualidade [29].

2.2.4. Compósitos

No sentido de aumentar as propriedades mecânicas e físico-químicas, podem combinar-se tipos diferentes de materiais, originando os denominados biomateriais compósitos. Os compósitos são sintetizados tendo como objectivo principal a criação de um biomaterial que possua propriedades que os componentes isolados não possuem individualmente, e que sejam superiores às que adviriam da simples adição das propriedades de cada um dos componentes. Estes materiais permitem prever uma nova dimensão no desenvolvimento de novos produtos para utilização biomédica.

O tecido ósseo, constituído por fibras de colagénio e minerais, é um bom exemplo de um compósito criado pela natureza, com propriedades biomecânicas excelentes.

A literatura internacional refere alguns exemplos de associações de materiais para a obtenção de biomateriais compósitos [20, 47, 88-93]. A maioria destas associações pretende colmatar as limitações apresentadas pelos componentes isolados e, de forma sinérgica, potencializar as suas propriedades individuais, melhorando as propriedades e o comportamento biológico do biomaterial compósito em aplicações clínicas.

2.3. Comportamento Biológico

2.3.1. Materiais Bio-inertes

Os materiais bio-inertes caracterizam-se por serem essencialmente inertes e não provocarem qualquer reacção de corpo estranho no organismo

onde são implantados. Os tecidos envolventes, a nível da interface, encontram-se em contacto directo com o material, com ausência de interposição de cápsula ou tecido fibroso.

O titânio é um exemplo clássico de um material inerte, embora exista alguma controvérsia sobre a sua inclusão neste grupo de materiais. O zircónia e a alumina estão também incluídos nesta classe de materiais [16, 94].

2.3.2. Materiais Biotolerados

Os materiais biotolerados são moderadamente aceites pelos tecidos envolventes. Observa-se, por vezes, a formação de uma cápsula de tecido fibroso rodeando o implante, que pode ser causada pela libertação de iões ou partículas tóxicas a partir da superfície do material. O aço inoxidável, a liga de crómio-cobalto e o PMMA podem induzir respostas deste tipo [16, 94].

2.3.3. Materiais Bioactivos

Nos materiais bioactivos observa-se a formação de uma união directa e firme entre a superfície do material e os tecidos onde este é implantado. Os materiais bioactivos utilizados na substituição de tecido ósseo possuem normalmente na sua composição química iões livres de cálcio e fósforo superficiais, que promovem uma ligação físico-química com o tecido ósseo envolvente. Os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatite e os vidros bioactivos são exemplos destes materiais [16, 94].

2.4. Bioactividade e Comportamento Ósseo

Além das classificações anteriormente referidas, encontram-se incluídas nas respostas biológicas as denominações de bioactividade, osseo-integração ou osteo-integração, adesão óssea, osteocondução e osteo-indução.

2.4.1. Bioactividade

Um material pode definir-se como bioactivo quando é "um material que é projectado para induzir ou condicionar a actividade biológica" [64]. Bioactividade é a capacidade de um biomaterial poder formar uma união com os tecidos vivos [95].

De acordo com estas definições, os materiais cerâmicos são incluídos dentro deste grupo.

2.4.2. Osseo-integração ou Osteo-integração

A definição de osseo-integração tem levantado bastante polémica [41, 69, 96]. Inicialmente, osseo-integração foi definida como sendo "o contacto directo, detectado a nível da microscopia óptica, entre o osso e o implante" [31]. Com a evolução dos recursos e meios de análise, que permitem maiores ampliações e melhor observação de detalhes, verificou-se que este conceito teria de ser revisto, pois em muitas situações não existe um verdadeiro contacto directo entre o osso e o material, mas apenas um contacto físico. No entanto, e devido à generalização do uso deste termo em implantologia clínica, é muito aceite e utilizado pela maioria dos especialistas. Clinicamente, pode traduzir-se como uma espécie de anquilose do implante ao tecido ósseo [69]. As variadas interpretações sobre o conceito de osseo-integração na literatura mundial perpetuam a controvérsia sobre o que este conceito realmente representa [42]. O uso indevido desta classificação levou a que alguns investigadores do grupo de Brånemark procurassem esclarecer as razões da má utilização deste conceito [41]. Estes autores referem que o termo osseo-integração foi rapidamente expandido e usado em situações em que é evidente a existência de uma camada de tecido fibroso entre o osso e o implante, devendo, nestes casos, ser designado por fibro-integração ou fibro-ósseo-integração.

Os motivos para esta utilização indevida de um conceito, originalmente introduzido para se distanciar e diferenciar das interfaces fibrosas, deve-se a estar ligado à ideia de sucesso, em consequência dos óptimos resultados clínicos apresentados pelo sistema Brånemark. É consequência, também, da interpretação incorrecta, por muitos autores, do conceito originalmente definido por Brånemark.

A osseo-integração é um conceito baseado numa definição histológica e apenas parcialmente clínica e radiográfica. Daí se infere que a classificação de um implante como osseo-integrado apenas pelos elementos obtidos através do exame clínico e radiográfico é incorrecta [32]. A tentativa de esclarecer este conceito e apresentar uma classificação abrangente de todas as situações de interface, formada entre os vários tipos de implantes e o tecido ósseo, tem sido fruto de alguns trabalhos de revisão [97]. Todavia, continua na actualidade, a manter-se uma acesa polémica sobre este assunto.

2.4.3. Adesão Óssea

A adesão ao tecido ósseo está restringida a um número limitado de materiais, que são denominados de bioactivos. A adesão óssea foi definida como sendo: "o estabelecimento, através de processos físico-químicos, de uma continuidade entre o implante e a matriz óssea" [64].

2.4.4. Osteocondução

A osteocondução é a propriedade que alguns materiais possuem de poder guiar a formação óssea na sua superfície, quando são implantados em tecido ósseo. Este processo ocorre pela penetração de vasos nos espaços e/ou nos poros existentes na estrutura do material, que vão induzir a deposição de osso imaturo [16]. Quase todos os materiais bioactivos, habitualmente usados, podem ser classificados como sendo materiais osteocondutores, embora existam referências recentes que apontam para a capacidade osteo-indutora de alguns deles.

2.4.5. Osteo-indução

A osteo-indução é a propriedade que alguns materiais possuem de induzir a formação de tecido ósseo quando são implantados em tecidos não ósseos. Este fenómeno consiste na conversão fenotípica de células dos tecidos moles em precursores do tecido ósseo, através de uma estimulação apropriada [16]. Tem sido referida na literatura, a possibilidade da hidroxiapatite, quando associada a células osteoblásticas, apresentar esta propriedade [17, 21].

2.5. Biocompatibilidade

O termo biocompatibilidade foi definido, no *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials* como sendo "a capacidade de um material desencadear uma resposta adequada do hospedeiro, numa aplicação específica" [63].

A biocompatibilidade de um material não inclui apenas, como classicamente é considerado, os fenómenos de interacção entre os tecidos envolventes e o implante nos quais é colocado. Engloba, também, a biofuncionalidade que os tecidos onde é implantado um material irão apresentar durante as solicitações a que são submetidos [38].

2.6. Fenómenos de Superfície

A composição química, as características físicas e a morfologia superficial desempenham um papel muito importante nas interacções entre os materiais implantológicos e os tecidos onde são implantados [31, 98-103].

A superfície do material é o local que contacta em primeiro lugar com os fluidos orgânicos e, com o decorrer do processo de cicatrização tecidular, é a área onde vão ocorrer todos os fenómenos de regeneração óssea que levam à manutenção e ao sucesso clínico do implante.

O primeiro evento que ocorre durante a interacção dos biomateriais com os tecidos onde são implantados é a adsorção, na superfície dos implantes, do sangue e das proteínas plasmáticas [104-106]. Este processo é dinâmico e sujeito a mudanças com o tempo e com a actividade das células do meio ambiente envolvente [107]. Dão-se, a seguir, uma série de interacções entre as células e a superfície dos implantes, induzindo a libertação de factores de crescimento e quimiotácticos que modulam a actividade celular nos tecidos circundantes [103].

Um factor crucial no sucesso da integração do implante nos tecidos orgânicos é o seu grau de contaminação superficial. A presença de resíduos na superfície de um implante pode alterar a sua composição química e condicionar significativamente o sucesso clínico [108].

A influência das variáveis físico-químicas na superfície do material e na consequente adsorção e deposição de proteínas específicas, é um dos factores primários mais relevantes no processo de regeneração tecidular [101].

Quando um biomaterial é implantado num organismo vivo, forma-se uma interface entre o biomaterial e o tecido ou entre o biomaterial e o sistema de fluidos orgânicos. Neste último caso, as interacções que ocorrem ao longo da interface podem ser consideradas um factor importante na determinação da biocompatibilidade do material [109].

A biocompatibilidade de um material pode ser parcialmente determinada pela sensibilidade da resposta do hospedeiro aos iões específicos desse material, pelas suas propriedades de corrosão e pela sua molhabilidade superficial [110].

A molhabilidade superficial de um implante está directamente relacionada com a energia superficial e é influenciada pelo grau de contacto com o meio fisiológico. O aumento da molhabilidade potencia as interacções entre a superfície do implante e o meio biológico envolvente.

Em amostras de titânio com vários tipos de preparação e passivação verifica-se que a tensão crítica de superfície é independente do tamanho do grão [110]. Os valores similares da tensão superficial e da tensão crítica de superfície devem-se à semelhança da camada oxidada superficial. As superfícies de titânio não polidas apresentam uma tensão superficial significativamente mais baixa do que as superfícies polidas [110]. Sabe-se que a molhabilidade das superfícies dos implantes de titânio é condicionada pela composição da camada oxidada, pelo grau de contaminação e pela morfologia superficial [100].

Foi já estudada a influência da adsorção de proteínas na molhabilidade de vários materiais utilizados em medicina dentária [111]. Através da medição dos ângulos de contacto, concluiu-se que a maioria dos metais estudados têm ângulos de contacto bastante baixos e não são influenciados significativamente pela adsorção e desorpção da albumina [111].

A morfologia superficial, a molhabilidade e a tensão superficial influenciam o crescimento celular mas não desempenham papel significativo na forma e orientação das células nas superfícies com microtextura [106, 112]. Outros estudos referem que a composição superficial de um biomaterial afecta o metabolismo e a expressão fenotípica dos osteoblastos e dos condrócitos [113].

A rugosidade superficial tem um efeito muito marcante nas células e muitos dos aspectos da actividade celular são afectados por esta característica superficial, incluindo a proliferação celular, a sua diferenciação e a síntese da matriz orgânica [103, 114, 115]. A resposta celular a um determinado tipo de superfície é também influenciada pelo estado de maturação celular. Células com diferentes graus de maturação apresentam comportamentos diversos após serem colocadas em contacto com superfícies idênticas [113].

Os resultados de estudos *in vivo* sobre o efeito das características superficiais na resposta do tecido ósseo diferem entre os vários autores. Enquanto que para uns as características superficiais não provocam diferenças significativas [69], outros consideram que a ultra-estrutura da interface entre um implante e o tecido ósseo pode ser condicionada ou modificada pela alteração das características e propriedades superficiais do material [98, 102, 116-118].

Entre as metodologias de análise recomendadas para o estudo das características superficiais incluem-se a microscopia electrónica de varrimento, a análise por dispersão de energia de raios X, a determinação do ângulo de contacto e uma variedade de técnicas espectroscópicas [119, 120].

2.7. Micromovimentos

Estudos experimentais e revisões recentes têm apresentado provas convincentes de que as forças mecânicas desempenham, directa ou indirectamente, um importante papel na diferenciação e desenvolvimento do tecido mesinquematoso [57, 61, 121, 122].

Num estudo de revisão, Goodman e Aspenberg [61] analisaram a literatura referente ao efeito das forças mecânicas na regeneração óssea, enfatizando duas áreas da investigação ortopédica: a cicatrização das fracturas ósseas e o crescimento ósseo na presença de próteses com revestimento poroso. Estes autores concluíram que é possível modular o ambiente mecânico com a aplicação de forças exógenas bem definidas, de maneira a promover uma resposta mais favorável do tecido ósseo. No entanto, deve ter-se em atenção que, durante a fase inicial de reparação óssea, um dos factores que condicionam o sucesso de um implante é a necessidade da ausência total de micromovimentos na interface entre o osso e o implante [121].

O aparecimento de micromovimentos pós-operatórios no implante, induzidos por uma adaptação imperfeita entre o material e o tecido ósseo, interfere com os mecanismos de regeneração óssea, levando à formação de tecido fibroso e encapsulação fibrosa, em alternativa à deposição/formação de tecido ósseo [22, 36, 94, 121, 123]. A formação de uma camada ou cápsula de tecido fibroso contribui para a instabilidade do implante e para o aparecimento de micromovimentos excessivos [86].

Estes mecanismos de diferenciação em tecido fibroso são condicionados pela manutenção de um estímulo nocivo, os micromovimentos, que induz uma resposta inflamatória crónica [58]. Estabelecendo-se este ciclo vicioso, o resultado final pode ser a perda do implante devido à destruição da união física entre o material e o tecido ósseo. A persistência de micromovimentos pode interferir directamente com o tecido fibroso da interface, através da estimulação das células inflamatórias, levando à formação de uma bolsa. Neste caso, as células inflamatórias activadas produzem substâncias tais como interleucina-1 (IL-1), prostaglandina E2 (PGE2) e metaloproteinases, incluindo colagenase, que podem levar à reabsorção óssea e causar dor e desconforto para o doente [86]. Uma das explicações possíveis para a interferência das forças provocadas pelos micromovimentos na diferenciação tecidular prende-se com o facto das células sujeitas a tensões sofrerem distorções morfológicas, podendo levar a alterações na expressão genética e na actividade de biossíntese necessária para a formação e diferenciação dos tecidos [94].

A pressão hidrostática pode influenciar a diferenciação celular, tanto por efeito directo na célula como pela inibição do fluxo sanguíneo dos capilares que irrigam os tecidos, diminuindo a sua oxigenação e alterando o metabolismo normal, impedindo o processo fisiológico de reparação/remodelação tecidular.

Provavelmente, a inibição do crescimento ósseo deve-se à rotura mecânica do tecido ósseo. No entanto, este processo de inibição não depende exclusivamente deste factor. O impedimento da proliferação dos pré-osteoblastos e a selecção da via diferencial de proliferação da população celular pluripotencial contribuem para a formação de tecido fibroso [124]. Por outro lado, se o tecido da interface é fibroso e existem micromovimentos, então poderá existir um aumento da concentração de iões libertados pelo implante, devido à combinação dos efeitos produzidos pela corrosão e por fenómenos de desgaste, se a frequência dos movimentos for elevada. Se as forças de carga na interface forem pequenas, o meio local e a espessura do tecido depositado na interface podem manter-se estáveis durante longos períodos de tempo. Os processos de desgaste podem ocorrer, também, entre duas superfícies em contacto na presença de micromovimentos, ou como resultado de abrasão de triplo corpo, onde as partículas libertadas a partir do material funcionam como terceiro elemento, associadas à superfície dos implantes e do tecido ósseo [86].

Uma boa estabilidade do implante, que minimize as tensões distorcionais no tecido de reparação, facilita a osteogénese e o crescimento ósseo. Se a estabilização do material for fraca pode assistir-se ao aparecimento de tensões axiais intermitentes e micromovimentos na interface, que produzem a distorção das células do tecido em fase de regeneração, provocando uma estimulação da sua diferenciação em tecido fibroso.

Durante o crescimento/deposição óssea existe uma destruição da matriz inicialmente formada à volta da superfície do implante, que é induzida pelos micromovimentos que eventualmente surjam em fases precoces da formação óssea, provocando uma resposta reparadora de tecido fibroso mais rápida do que a deposição de tecido ósseo. Este fenómeno deve-se ao facto do processo de diferenciação celular e do crescimento tecidular conjuntivo ser mais rápido do que o do tecido ósseo. Os efeitos nefastos destes micromovimentos serão reduzidos se a sua amplitude for inferior a 30 μm [125].

Num estudo em cães foi observado que micromovimentos de amplitude inferior a 28 μm permitem o processo de crescimento do tecido ósseo. Inversamente, micromovimentos com valores superiores a 150 μm de amplitude, na zona da interface, induzem a formação de tecido fibroso [126].

Em simulações de cargas fisiológicas, exercidas sobre próteses femorais, verificou-se que os micromovimentos com amplitude de 150 μm impediam o crescimento do tecido ósseo, enquanto que com micromovimentos até 40 μm se observavam sinais identificativos de crescimento ósseo [127].

O revestimento com hidroxiapatite de implantes de titânio colocados nos côndilos femorais de cães adultos aumenta o crescimento ósseo de 8% para 47%, quatro semanas após a implantação [128].

Quando os implantes são sujeitos a micromovimentos, através de forças dinâmicas que produzem uma translação axial de 500 μm em cada ciclo, os implantes revestidos com hidroxiapatite aumentam a resistência aos testes de tracção, mas sem aumento significativo do crescimento ósseo. Se o grau de micromovimentos for reduzido para 150 μm, aumenta a força de tracção dos implantes revestidos [128]. Além disso, nos implantes sem revestimento é observada a existência de uma membrana fibrosa, enquanto que os implantes com revestimento são envolvidos por uma fina membrana de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso com colagénio de padrão irradiante [121]. Com micromovimentos descontínuos, as membranas fibrosa e fibrocartilaginosa que rodeiam ambos os tipos de implantes são substituídas, entre as 4 e as 16 semanas, por tecido ósseo, indiciando a sua capacidade de diferenciação tecidular quando em presença de estímulos adequados [128].

O preenchimento do espaço de adaptação entre o implante e o tecido ósseo pela hidroxiapatite revela-se uma vantagem potencial para a obtenção de uma fixação mais rápida ao osso do implante que é submetido a forças de carga [74, 122, 129, 130].

Os implantes revestidos com uma camada porosa de hidroxiapatite atingem o valor máximo de adesão ao tecido ósseo cerca de duas vezes mais rapidamente do que os implantes porosos não revestidos [11].

O desenvolvimento de uma câmara de micromovimentos em titânio comercialmente puro e a sua implantação na tíbia de coelhos permitiu calcular os efeitos dos movimentos, impostos manualmente, no crescimento ósseo dentro de um poro isolado de 1 mm [124, 131]. Constatou-se que movimentos diários curtos (20 ciclos/dia) com a amplitude de 0,5 mm e duração aproximada de 30 segundos, durante um período de 3 semanas, inibiam o crescimento do osso para o interior dos poros. Porém, quando os micromovimentos aumentaram de amplitude e de duração, verifica-se um incremento significativo no crescimento do tecido fibroso em vez de osso [124].

Micromovimentos com uma frequência de 40 ciclos/dia, com a amplitude de 0,5 mm, contribuem, directa ou indirectamente, para a estimulação e

a formação de um tecido conjuntivo denso em vez de tecido ósseo. A hipótese de explicação para este fenómeno radica, provavelmente, em factores químicos, libertação de mediadores solúveis, ou através de alterações eléctricas, induzidas pelo estímulo mecânico, que modulam e condicionam a diferenciação tecidular dentro do implante [131].

O aumento da amplitude dos micromovimentos na interface entre o implante e o tecido ósseo resulta numa diminuição da quantidade de osso formado [132].

A presença de uma camada de tecido fibroso interposta na interface dos implantes, que impede a remodelação óssea e o seu crescimento em direcção da superfície do implante, não pode ser apenas associada com os micromovimentos existentes na interface. Também é atribuída às propriedades intrínsecas de cicatrização, devido ao sangue que se deposita nos espaços formados na zona da interface, durante o processo de implantação. Existe uma ausência de crescimento ósseo quando estão presentes espaços com dimensões superiores a 50 μm, em vários locais entre o osso e o implante preenchidos por sangue [60].

A controvérsia que existe na literatura sobre este assunto deriva da extrapolação dos resultados obtidos em modelos experimentais discutíveis, e no facto de muitos investigadores confundirem a remodelação óssea dinâmica e o crescimento ósseo com a impactação do osso nos revestimentos porosos dos implantes. É, por isso, necessária mais investigação e requer-se maior cuidado nos estudos e ensaios experimentais dos materiais bioactivos antes da sua utilização clínica rotineira [60].

Para prevenir os efeitos adversos dos micromovimentos, recomenda-se a colocação dos implantes de forma a obter uma excelente estabilidade inicial e uma elevada proximidade entre a superfície do material e o osso adjacente [61, 133]. A morfologia, o desenho do implante e a técnica cirúrgica são variáveis cruciais para a obtenção de condições ideais de estabilidade na fase de colocação do material, que é fundamental na sua posterior integração no tecido ósseo. Micromovimentos com 25-50 μm podem inibir o crescimento do tecido ósseo. Todavia, a aplicação de forças controladas, exógenas e específicas, podem estimular o crescimento e a remodelação do osso que envolve o implante [61].

Na implantologia oral utiliza-se a técnica de dois tempos para manter o implante isento de forças de carga que possam provocar micromovimentos durante a fase inicial de cicatrização óssea. Num primeiro tempo, o implante mantêm-se imóvel e estável durante um período de tempo variável entre os

4 a 6 meses, permitindo uma regeneração óssea adequada. No segundo tempo, procede-se à sujeição do implante às forças de tensão inerentes à sua função.

Se os movimentos e cargas funcionais podem interferir com a regeneração óssea envolvente do implante, existem outros factores biomecânicos que nem sempre são tidos em consideração e que contribuem para a manutenção da estabilidade do local operado. Entre esses factores salientam-se a retenção mecânica do implante dentro do osso, a aproximação da superfície do implante à margem perióssea cortical e a flexão funcional do osso implantar [56].

Uma outra evolução nos implantes dentários, no sentido de promover a sua estabilização primária, foi a adopção da forma de parafuso que, sendo roscado no osso sob pressão, evita a sua mobilidade e pode transmitir alguma da tensão ao tecido envolvente.

3. ESTUDOS DE BIOCOMPATIBILIDADE

Para além das propriedades físico-químicas intrínsecas do material, o sucesso de um implante está geralmente dependente dos fenómenos que ocorrem na zona da interface formada entre o tecido ósseo e o material implantado.

O conceito de biocompatibilidade baseia-se nas interacções entre o material e o meio biológico envolvente [134]. Um dos aspectos mais importantes da biocompatibilidade, no que respeita às qualidades do material, é a resposta tecidular local, que normalmente permite obter uma indicação clínica sobre o sucesso do implante [135].

A análise da resposta tecidular local à implantação de um biomaterial é, desde há muito tempo, reconhecida como desempenhando um papel importantíssimo nos testes de biocompatibilidade. O estudo das interacções entre o meio biológico e os biomateriais implantados, a nível da interface entre as células e a superfície dos materiais, é essencial para avaliar e quantificar a sua biocompatibilidade [99, 106].

Os avanços mais significativos na área dos biomateriais dependem de uma cuidadosa e minuciosa determinação do comportamento *in vivo*, em condições de utilização funcional, dos diferentes tipos de materiais existentes [136]. O controlo da biocompatibilidade é assim, sem dúvida, o factor mais importante no sucesso, a longo prazo, dos implantes [137].

Antes de ser utilizado no corpo humano, um biomaterial deve ser estudado de forma a ser avaliada a sua biocompatibilidade a vários níveis:

a) *in vitro*, em meio simulador do ambiente fisiológico, e com culturas de células semelhantes às dos tecidos onde o material vai ser implantado [99];
b) *in vivo*, no animal, em condições próximas da utilização final do biomaterial;
c) *in vivo*, no ser humano, em condições experimentais bem controladas.

Embora até há cerca de 20 anos a utilização dos biomateriais não fosse previamente submetida a estes ensaios, sendo seleccionados em função dos conhecimentos gerais sobre as suas propriedades físico-químicas e do seu comportamento em experimentação animal limitada, na actualidade estão estabelecidas normas de avaliação e selecção dos materiais e dispositivos médicos para utilização humana [138, 139].

Antes da aplicação de um biomaterial em situações clínicas é exigida uma bateria de testes que permita aquilatar da sua segurança biológica, toxicidade, carcinogenicidade e biocompatibilidade. Este conjunto de testes inclui ensaios *in vitro* e *in vivo* específicos. Finalmente, são efectuados ensaios controlados em seres humanos onde é avaliado o seu comportamento local e efeitos sistémicos. Só após a obtenção de resultados válidos na multiplicidade de testes realizados o biomaterial pode ser utilizado clinicamente.

3.1. Estudos in vitro

A variedade de processos e mecanismos que ocorrem na interface do biomaterial, quando implantado *in vivo*, aumenta a dificuldade do conhecimento das reacções que ocorrem a este nível.

Os ensaios com a utilização de culturas celulares permitem a obtenção de dados sobre a resposta tecidular à presença de biomateriais [99, 106, 114, 140-142]. Esta metodologia experimental é válida no estudo das várias etapas da resposta biológica e das interacções entre os biomateriais e as células num ambiente específico e bem controlado [82, 99, 106, 114, 141, 143, 144].

Os estudos *in vitro* recomendados para a avaliação da biocompatibilidade dos materiais apresentam as seguintes vantagens principais:

a) são relativamente rápidos, sensíveis, reprodutíveis e mais baratos do que os testes *in vivo* [99, 145];
b) permitem um isolamento e separação dos factores que condicionam o processo a estudar [106, 115, 146];

c) permitem eliminar, numa fase inicial do processo de desenvolvimento, os materiais que não apresentem biocompatibilidade, poupando tempo e investimento [140];

d) contribuem para a redução da experimentação animal [99, 146].

As limitações principais deste tipo de ensaios resultam, essencialmente, da dificuldade de reproduzir, *in vitro*, o ambiente fisiológico dos tecidos orgânicos e englobar todas as interacções que existem entre todos os factores incluídos nos mecanismos de defesa e de reparação do organismo, após a implantação de um biomaterial [82]. Alguns autores referem expressamente que os resultados obtidos em culturas tecidulares podem não reflectir a situação que ocorre *in vivo*, durante a diferenciação osteoblástica no processo formativo do tecido ósseo [144].

Embora constituam uma metodologia válida para efectuar uma pré-selecção fácil de muitos materiais desenvolvidos para utilização médica, os resultados obtidos nunca poderão ser extrapolados directamente para as situações clínicas, sem ter em consideração as limitações e as condicionantes destes ensaios. É preciso salientar que toda a experimentação *in vitro*, tanto genérica como específica, não pode substituir os testes subsequentes *in vivo* [145, 146].

Muitos dos estudos *in vitro* apresentados na literatura referem resultados obtidos com linhas celulares modificadas [100, 140]. Este aspecto levanta a questão da sua validade, pois as células modificadas nunca estão envolvidas nas interacções que ocorrem *in vivo* entre os tecidos e os implantes [99, 142]. Além disso, as células modificadas de tipo osteoblástico têm sido um dos modelos favoritos nos estudos da interacção entre os implantes e as células "ósseas". Todavia, as primeiras interacções ocorrem com as células mesenquimatosas indiferenciadas ou com os condrócitos, durante as fases mais precoces da formação óssea endocondral [113].

A utilização de células humanas diferenciadas obtidas a partir do tecido onde, futuramente, se vão implantar os biomateriais, revela-se um factor muito importante, porque é mais representativa da reacção tecidular que ocorre *in vivo* [114].

Os resultados obtidos com os ensaios de biomateriais em culturas celulares têm que ser analisados cuidadosamente. A nossa experiência com culturas de osteoblastos onde foram colocados discos de Osteopatite® demonstrou que os resultados obtidos *in vitro* são antagónicos do comportamento deste material *in vivo*. O facto de ser um material com grandes potencialidades de trocas iónicas com o meio biológico onde é inserido levam a que o meio

de cultura atinja um pH que interfere significativamente com o crescimento celular.

Verifica-se assim que materiais que induzem grandes trocas iónicas com o meio biológico podem alterar as condições do meio de cultura e provocar respostas inadequadas nas células em crescimento. Neste tipo de situações apenas se pode testar o efeito dos produtos de degradação dos materiais em culturas celulares.

A pressão da sociedade e de entidades oficiais para a redução de ensaios experimentais com recurso a modelos animais contribuiu fortemente para a aceitação e implementação deste tipo de ensaios [146]. Todavia, nenhum modelo *in vitro* pode simular, concretamente, o meio fisiológico real em que se processam as interacções entre os tecidos e os biomateriais. Este tipo de testes poderá, fundamentalmente, contribuir para a compreensão de fenómenos isolados entre as células e os biomateriais e constituir um complemento precoce dos testes de biocompatibilidade [107, 115, 140, 141, 146, 147].

A determinação da toxicidade dos materiais, ou seja, os efeitos negativos ou deletérios nas funções celulares normais provocados por um material, pode ser realizada em ensaios *in vitro* específicos [98, 105, 113, 134, 141, 144].

A avaliação real da biocompatibilidade de um material deve ser feita *in vivo* em condições que simulem as situações a que o material vai ser sujeito durante a sua utilização clínica, da forma mais realística possível.

3.2. Estudos in vivo

A utilização de modelos animais para o estudo da regeneração do tecido ósseo, *in vivo*, após a implantação de biomateriais é uma das etapas fundamentais para a determinação do comportamento do tecido ósseo em presença desse agente estranho.

Os estudos histológicos das amostras obtidas em ensaios experimentais, realizados em condições biológicas próximas das que os biomateriais vão encontrar durante a sua utilização clínica, permitem analisar quantitativa e qualitativamente o tipo de interface entre o biomaterial e o tecido ósseo [82].

Na análise histológica das amostras contendo os materiais implantados nos tecidos podem encontrar-se quatro tipos de situações diferentes [75]:

a) se o material é tóxico, os tecidos envolventes sofrem um processo de necrose;
b) se o material não é tóxico e é biodegradável, pode ser substituído pelos tecidos que o rodeiam ou por uma cápsula fibrosa;

c) se o material não é tóxico e é biologicamente inactivo, forma-se uma cápsula fibrosa que o envolve;
d) se o material não é tóxico e é biologicamente activo, pode formar uma união na interface com o tecido onde foi implantado.

Nos estudos experimentais que usam modelos animais, a regeneração óssea difere significativamente entre os diferentes animais e pode apresentar grandes diferenças no mesmo animal, em função do seu estado físico [148].

Podem usar-se vários parâmetros para quantificar e qualificar o comportamento de biomateriais que são colocados em organismos vivos. Entre eles, contam-se a quantificação da percentagem de osso que contacta directamente a superfície dos implantes [25, 38, 149-151], a determinação do tipo e quantidade de células imunológicas que se concentram nos tecidos envolventes do biomaterial [134, 152-155] e a compreensão dos fenómenos e mecanismos que decorrem da implantação dos biomateriais [57, 156].

A investigação da biocompatibilidade dos vários materiais com potencial de aplicação biomédica pode ser realizada nos tecidos moles [138, 154, 155, 157-159] ou no tecido ósseo [138, 158, 159], recorrendo à utilização de modelos animais ou, numa fase final dos ensaios, em humanos [82].

Alguns autores, adoptando as normas ISO, preconizam a utilização de testes de implantação dos materiais no tecido muscular animal, visto que os tecidos moles são mais sensíveis às diferenças apresentadas pelos diversos biomateriais do que o tecido ósseo e, além disso, os implantes utilizados em ortopedia ou medicina dentária raramente se encontram apenas em contacto com o tecido ósseo [154, 160].

Nos implantes dentários, o contacto é predominantemente feito com o tecido ósseo. Todavia, é fundamental a existência de um selamento perfeito do colo do implante com o tecido conjuntivo gengival que impeça a deposição e migração de agentes patogénicos. A inexistência desta união hermética pode contribuir para o aparecimento de uma situação patológica peri-implantar que, prolongando-se ao longo da interface, pode destruir a ligação entre o osso e o implante, comprometendo o seu sucesso clínico.

O critério de selecção do tipo de animal a utilizar nos ensaios com os biomateriais depende de vários factores. Contudo, encontra-se condicionado por aspectos legais que são cada vez mais restritivos, dificultando imenso a experimentação animal [161]. O número mínimo de animais recomendado para permitir a obtenção de resultados válidos é de dois por tempo de implantação [82]. A maioria dos investigadores utiliza pelo menos cinco ani-

mais para cada tempo de implantação, por forma a permitir o tratamento estatístico dos resultados obtidos [162].

Uma revisão da literatura permitiu coligir os resultados apresentados na tabela 2.1, que resume alguns exemplos dos vários animais utilizados em trabalhos de investigação sobre biomateriais.

Os estudos histológicos baseados em microscopia óptica [25, 38, 39, 59, 62, 150, 151, 156, 175, 180], de fluorescência [39, 43, 59, 60], electrónica de varrimento [39, 62, 156, 167, 181] e de transmissão [44, 62, 92, 156, 175], são frequentemente utilizados como métodos qualitativos no estudo do comportamento da regeneração óssea e da interface entre o implante e o tecido ósseo. Recentemente, surgiram alguns trabalhos onde foi utilizada uma tecnologia microscópica mais evoluída, como é o caso da microscopia de varrimento por laser, que permite definir melhor a estrutura da interface devido à superior resolução espacial da amostra num plano simples através do feixe laser confocal [182, 183].

A análise histológica por microscopia óptica permite evidenciar o tipo de adesão do implante aos tecidos envolventes porque a sua capacidade de resolução é suficiente para caracterizar a interface e a intervenção das células dos tecidos moles [41].

A afirmação de que as análises ultra-estruturais não são necessárias para revelar a resposta do osso à implantação de um biomaterial porque o nível óptimo de investigação é o micrómetro e não o ângstrom [41] é contestada por outros autores [167], que manifestam opinião contrária. Estes autores referem que, apesar da microscopia óptica ser uma técnica rápida e adequada para o estudo da resposta biológica à implantação de um biomaterial, não permite, todavia, distinguir o contacto físico da adesão química nas diferentes fases do processo de integração.

Por outro lado, a microscopia óptica apenas permite uma visão geral dos tecidos que se formam à volta dos implantes devendo a caracterização e a descrição da natureza da resposta do tecido ósseo à colocação dos implantes ser estudada em alta resolução. O problema é que os estudos ultra-estruturais da interface entre o osso e os implantes são pouco frequentes, porque a preparação das amostras para este tipo de análise é complexa e bastante difícil [44].

A micro-radiografia possibilita o estudo do tecido ósseo neoformado na zona envolvente da superfície de um implante, permitindo efectuar a distinção entre o tecido ósseo mineralizado e o não mineralizado que existe na interface. Esta metodologia de estudo foi utilizada em vários trabalhos experimentais [59, 165, 175, 177, 178, 184, 185].

A microscopia de fluorescência pode utilizar múltiplos marcadores e permite obter informação muito importante sobre o comportamento fisiológico do tecido ósseo, podendo marcar temporalmente a regeneração deste tecido e localizar os locais de maior actividade metabólica do seu processo remodelativo [43, 59, 60, 186].

Desde que a metodologia de preparação para análise ultra-estrutural respeite a integridade das amostras, o que nem sempre é exequível, a possibilidade de estudar em grandes ampliações a estrutura dos tecidos da interface tem-se revelado de grande utilidade na compreensão dos fenómenos, mecanismos e interacções que ocorrem a este nível, contribuindo para o avanço da investigação sobre o comportamento biológico dos tecidos após a implantação dos biomateriais. A utilização da microscopia electrónica de varrimento torna possível estabelecer a distinção entre o contacto físico e a adesão química entre um biomaterial e o osso [167], tornando-se um método auxiliar valioso no estudo das estruturas da interface.

A histomorfometria, sendo um método de análise quantitativa da percentagem de contacto entre o osso formado e a superfície do material implantado, fornece elementos válidos na caracterização e quantificação da regeneração óssea, após a implantação de um biomaterial [56].

As técnicas mais utilizadas recorrem a imagens obtidas através de microradiografias [39, 177] e/ou cortes histológicos [25, 38, 59, 118, 149-151, 180, 187]. Os valores obtidos a partir da percentagem de contacto ósseo directo com a superfície do material, determinados por este método, também são denominados como índice de afinidade [188] ou índice de deposição óssea [189].

Outro método histomorfométrico consiste na quantificação e identificação dos diferentes tipos de células que se formam na zona da interface, formada entre os implantes e o tecido ósseo, e na espessura da membrana formada nessa zona [62, 153, 154, 160].

No sentido de melhorar e validar os resultados obtidos, foi proposto um outro método histomorfométrico quantitativo, associado a um método semiquantitativo, que consiste na avaliação da reacção do tecido ósseo e das características da interface que circunda os implantes, recorrendo a uma escala histológica graduada [151]. Esta escala consiste na classificação numérica da morfologia tecidular (inflamação, tecido fibroso, lacunas de remodelação, contacto directo entre o osso e o implante e a presença de osso imaturo ou cortical).

A comparação da espessura da membrana fibrosa existente na interface, parece ser um teste insuficientemente sensível para ser utilizado em estudos

Tabela 2.1 - **Principais animais utilizados em ensaios sobre comportamento dos biomateriais**

Animal	Local	Biomateriais	Autores	Ref
Rato	Tíbia	Cimento de vidro bioactivo	Taguchi e col.	163
	Fémur	Implantes metálicos	Pazzaglia e col.	164
	Subcutâneo	Hidroxiapatite e vidros bioactivos	Fujita e col.	79
	Periodonto	Hidroxiapatite	Kawaguchi e col.	55
	Fémur	Hidroxiapatite	Bruijn e col.	156
Cobaia	Palato	Hidroxiapatite e fosfatos de cálcio	Bou-Abboud e col.	157
Coelho	Tíbia	Implantes de titânio	Kalebo e col.	148
	Tíbia	Vidros bioactivos	Ohura e col.	165
	Tíbia	Implantes revestidos com hidroxiapatite	Jansen e col.	166
	Tíbia	Vidros bioactivos	Andersson e col.	167
	Fémur	Implantes revestidos com materiais bioactivos	Gottlander e col.	168
	Fémur	Implantes revestidos com materiais bioactivos	Maxian e col.	130
	Tíbia	Ti6A14V e hidroxiapatite	Maruyama	129
	Músculo	Hidroxiapatite e células ósseas	Kurashina e col.	21
	Tíbia	Implantes de titânio	Bianco e col.	169
	Tíbia	Cerâmicos	Chang e col.	59
	Tíbia	Implantes de titânio revestido	Kitsugi e col.	170
Cabra	Fémur	Implantes revestidos com materiais bioactivos	Klein e col.	171
	Fémur	Vidros bioactivos	Kangasniemi e col	172
	Fémur	Implantes revestidos com materiais bioactivos	Caulier e col.	173
Porco	Fémur	Polímero e aço inox	Elst e col.	174
Ovelha	Mandíbula	Vidros bioactivos e cerâmicos de vidro	Gatti e col.	158
Cão	Mandíbula	Implantes de hidroxiapatite	DeLange	175
	Fémur	Implantes revestidos com materiais bioactivos	Hayashi e col.	176
	Fémur	Implantes revestidos com hidroxiapatite	Cook e col.	177
	Fémur	Implantes revestidos com hidroxiapatite	Moroni e col.	178
	Fémur	Implantes revestidos com materiais bioactivos	Hayashi e col.	73
	Mandíbula	Implantes de alumina e zircónia	Tavares	39
	Maxilares	Implantes de titânio, enxerto ósseo e membranas	Becker e col.	18
Macaco	Periodonto	Hidroxiapatite	Ettel e col.	179
	Maxilares	Membranas, hidroxiapatite, implantes de titânio	Gotfredsen e col.	30
	Crânio	Hidroxiapatite	Ripamonti	22

comparativos sobre a avaliação da reacção dos tecidos envolventes à implantação de biomateriais bem tolerados [160]. Este facto deve-se a não existir uma correlação entre a espessura da membrana e os parâmetros de distribuição celular. Além disso, foi observado que a espessura praticamente não tem relação com o tipo celular, a não ser com os fibroblastos [153].

É importante sublinhar que a estrutura da interface e a determinação histomorfométrica podem, no caso dos cortes histológicos, estar condicionados pela espessura e polimento dos cortes, assim como pelas propriedades de coloração da resina de inclusão [96].

Existem outros métodos de estudo que incluem técnicas histoquímicas específicas para a identificação de algumas das células presentes na zona da interface [62, 135]. Estas metodologias permitem identificar melhor o tipo de resposta celular local e a influência das várias células na regeneração tecidular à volta dos implantes.

Variados factores desempenham um papel relevante no estudo da regeneração óssea e no tipo de interface formada entre os biomateriais e o tecido ósseo. Entre eles podem-se incluir:

- raça, sexo, idade e estado geral de saúde do animal;
- técnica cirúrgica adoptada;
- condições de adaptação do material às paredes ósseas;
- forças a que são submetidos.

III

MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1. Caracterização geral dos materiais

1.1.1. Aço Inox

O aço inox foi utilizado durante várias décadas na confecção de implantes dentários e como material de osteossíntese, em aplicações ortopédicas de tratamentos de fracturas ósseas [86].

A sua estrutura e propriedades dependem, fundamentalmente, de possuir o elemento carbono no seu conteúdo, que em teores elevados reduz a resistência à corrosão. O conteúdo de crómio e níquel também condiciona a sua resistência à corrosão. A presença de aditivos e os tratamentos térmicos ou físico-químicos a que seja submetido também interferem com a estrutura e as propriedades deste material [82, 174].

O aço inox, principalmente do tipo 316L AISI, que é produzido em vácuo, é muito usado na fixação temporária de fracturas ósseas [82, 174]. Este aço é uma liga metálica de base férrica, que se caracteriza por possuir um conteúdo baixo de carbono. A sua composição química percentual é apresentada na tabela 3.1 e as suas características mecânicas na tabela 3.2.

O aço 316L é um tipo de material metálico não adequado para implantes permanentes devido à sua fraca capacidade de ligação ao tecido ósseo, para além de poder apresentar problemas de corrosão [174].

Tabela 3.1 – **Composição química do aço inox 316L** (ASTM, ISO) [1]

Fe	Cr	Ni	Mn	Si	C	P	S	Mo	N
60-68%	16-18%	10-14%	2,0%	1,0%	0,03%	0,045%	0,03%	2-3%	-

Tabela 3.2 – **Propriedades físicas e mecânicas do aço inox 316L**

	Aço Inox 316L
Módulo de elasticidade (GPa)	200
Carga de Rotura (MPa)	965
Elongação (%)	20
Densidade (g/cm^3)	7,9
Ponto de fusão aproximado (°C)	não determinado

(Adaptado de J.C. Wataha) [42]

A camada oxidada superficial do metal não é estável e pode levar à libertação de iões ou partículas tóxicas por fenómenos de corrosão. Esta libertação de iões, especialmente de crómio e, em menor quantidade, de níquel e ferro, pode induzir uma resposta inflamatória crónica com reacção de corpo estranho. Esta reacção caracteriza-se pela formação de uma cápsula fibrosa, que vai envolver o material e isolá-lo dos tecidos circundantes. A lâmina fibrosa formada, de pequena espessura, contem uma acumulação de iões tóxicos que reduzem dramaticamente a biocompatibilidade do implante e provocam desconforto doloroso nos portadores deste tipo de implantes.

Um dos aspectos mais negativos destes materiais é a libertação dos produtos de corrosão e a sua toxicidade [190], embora Takamura e col. [191] afirmem que o grupo de aços 316L não é carcinogénico e, na forma de implantes, não evidencia sinais significativos de corrosão superficial.

Alguns dos produtos de corrosão do aço inox acumulam-se no baço, provocando alterações histológicas e causando alterações na população celular, em particular, pelo esgotamento dos linfócitos. Entre esses produtos contam-se o ferro, o níquel e o crómio [190].

O ferro interfere selectivamente com a expressão do CD2, sendo um regulador importante do sistema imunológico [192] e, ao inibir a proliferação dos linfócitos T, pode provocar uma depressão do sistema imunológico [193].

Para o níquel, há resultados que comprovam a sua potencial toxicidade e efeito carcinogénico [191].

O crómio pode existir na forma tri ou hexavalente. A forma hexavalente (Cr^{6+}) é a biologicamente mais activa, penetrando nas membranas celulares e induzindo alterações carcinogénicas ou dermatite de contacto. A actividade biológica da forma hexavalente advém da penetração deste ião no cito-

plasma da célula, tornando-se trivalente e provocando alterações nas estruturas internas das células [66].

1.1.2. Titânio

O titânio, na sua forma comercialmente pura, tornou-se o material implantológico mais utilizado em cirurgia oral e crânio-facial [69]. Em implantologia oral, a utilização deste material processa-se, essencialmente, na forma de implantes endósseos [97].

Quer na forma de titânio puro quer em liga, a sua ampla utilização na área médica deve-se à boa biocompatibilidade, às propriedades mecânicas e à resistência à corrosão [155, 181]. É uma alternativa válida aos materiais metálicos, anteriormente utilizados, aço inox e ligas de crómio-cobalto [160].

Sendo um material utilizado em implantologia oral há mais de duas décadas, continuam a existir muito boas razões para o considerar como o material ideal para o fabrico de implantes dentários endósseos [194].

O titânio puro encontra-se normalmente revestido por uma camada de óxidos (TiO_2) com uma espessura de 5 nm, que se forma espontaneamente quando o material está exposto às condições atmosféricas. Esta camada passivada apresenta uma alta resistência à polarização, porque é isolante e limita a corrosão superficial do material [82, 160]. É composta por vários tipos de óxidos – TiO, TiO_2, Ti_2O_3, Ti_3O_4 –, reforçando-se com o tempo de exposição ao ar e ainda mais em contacto com o tecido ósseo [82]. Em solução aquosa, assim como em condições fisiológicas, a camada oxidada do titânio transforma-se em $Ti(OH)_4$ que é estável nos tecidos normais [160].

O comportamento electroquímico do titânio pode explicar a excelente tolerância deste material, quando utilizado em condições biológicas.

São reconhecidos quatro tipos diferentes de titânio comercialmente puro utilizado na fabricação de implantes endósseos: tipos I, II, III e IV. Nos anos mais recentes foram introduzidos no mercado implantes que já utilizam na sua composição outros componentes além do titânio, ou seja, ligas de titânio.

A liga de titânio mais divulgada comercialmente é denominada Ti6Al4V, contendo 90% de titânio, 6% de alumínio e 4% de vanádio [82]. Comparativamente com o titânio puro, esta liga apresenta propriedades mais favoráveis, nomeadamente menor condutividade térmica e uma resistência à fadiga superior em cerca de 50%. Como principal desvantagem é apontado o facto de possuir alumínio e vanádio, que apresentam efeitos adversos no organismo humano [82].

Tabela 3.3 - **Composições químicas do titânio e da liga de titânio** (% ponderal)[42]

	N	*C*	*H*	*Fe*	*O*	*Al*	*V*	*Ti*
Ti c.p., Grau 1	0,03	0,10	0,015	0,02	0,18	-	-	Balanço
Ti c.p., Grau 2	0,03	0,10	0,015	0,03	0,25	-	-	Balanço
Ti c.p., Grau 3	0.05	0,10	0,015	0,03	0,35	-	-	Balanço
Ti c.p., Grau 4	0,05	0,10	0,015	0,05	0,40	-	-	Balanço
Ti6Al4V	0,05	0,08	0,012	0,25	0,13	5,6-6,5	3,5-4,5	Balanço

Tabela 3.4 – **Propriedades físicas e mecânicas do titânio c.p. e da liga de titânio**

	Ti 1	*Ti 2*	*Ti 3*	*Ti 4*	*Ti6Al4V*
Módulo de elasticidade (GPa)	100	100	100	100	110
Carga de Rotura (MPa)	240	345	450	550	900
Elongação (%)	24	20	18	15	12
Densidade (g/cm^3)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Ponto de fusão aproximado (°C)	1660	1660	1660	1660	1670

(Adaptado de J.C. Wataha) [42]

A composição química dos diferentes tipos de titânio comercialmente puro e de uma liga é referida na tabela 3.3 e as propriedades mecânicas na tabela 3.4.

As propriedades mecânicas do titânio puro na forma de implantes de tipo cilíndrico com 3 mm de diâmetro, quando o implante está colocado no tecido ósseo, permitem obter uma resistência às forças axiais superior a 400 kg e, no caso das forças terem incidência lateral, superior a 20 kg [194]. Possuindo um módulo de elasticidade inferior ao do aço inox, está mais próximo dos valores apresentados pelo osso vivo, embora sejam ainda valores muito superiores aos apresentados por este tecido.

Apesar do sucesso obtido pelos implantes de titânio em utilização clínica, têm sido desenvolvidas várias técnicas para aumentar a sua fixação ao osso. Alguns dos processos utilizados passam pela alteração da sua estrutura superficial ou pela utilização de revestimentos com materiais bioactivos [14, 38, 102, 170].

O objectivo principal destas técnicas é a obtenção de um contacto direc-

to entre o osso e a superfície do implante, com ausência de interposição de qualquer camada de tecido fibroso na interface, e um aumento na rapidez e quantidade de regeneração óssea [149, 168]. Permite-se, assim, que os implantes sejam colocados mais rapidamente em carga, reduzindo os tempos de espera, de 4 a 6 meses, normalmente recomendados para os implantes de titânio [170].

1.1.3. Hidroxiapatite

A hidroxiapatite é um biomaterial do grupo dos cerâmicos bioactivos, cuja fórmula química é $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Este material faz parte de uma classe mais alargada de materiais identificados como apatites, que se caracterizam pela fórmula $M_{10}(XO_4)_6Z_2$.

As apatites formam um leque alargado de biomateriais sólidos, que podem apresentar variações consideráveis na sua composição química através da substituição iónica de todos ou alguns elementos nos pontos M, (XO_4) e Z [136].

Relativamente à composição química, a hidroxiapatite apresenta, normalmente, uma relação Ca/P de 1,67, que é idêntica à do tecido ósseo mineralizado.

Esta classe de materiais tem sido utilizada na substituição de tecidos duros devido à sua fase mineral ser semelhante à dos depósitos minerais do osso e dos dentes, ser biocompatível, não tóxica e aderir bem ao tecido ósseo [33].

A maioria das denominadas hidroxiapatites usadas como biomateriais apresentam variações, tanto na substituição iónica dos grupos fosfato e/ou hidroxílico, como nas características estequiométricas da hidroxiapatite padrão.

As diferenças na estrutura, composição e características físicas das hidroxiapatites sintéticas derivam do processo de síntese e de sinterização, que pode ser alterado em função das propriedades que se pretendem obter para o material. A temperatura, o tempo, o meio atmosférico e os aditivos usados na sinterização são alguns dos parâmetros que condicionam as características finais do material [195, 196] e o seu comportamento in vitro [197] e *in vivo* [198, 199].

As propriedades físicas mais importantes deste tipo de biomaterial são a superfície específica, o tamanho e a forma das partículas, a estrutura e o tamanho dos cristais, a porosidade residual após sinterização, e o tamanho, a forma e a distribuição dos poros [136].

Tabela 3.5 – **Propriedades físicas e mecânicas da hidroxiapatite e do osso cortical**

	Hidroxiapatite	*Osso cortical*
Módulo de elasticidade (GPa)	10	18
Carga de Rotura (MPa)	40	140
Elongação (%)	não determinada	1
Densidade (g/cm^3)	3,1	0,7 (seco)

(Adaptado de J.C. Wataha) [42]

As propriedades físicas e mecânicas da hidroxiapatite são apresentadas na tabela 3.5, comparativamente com as do osso cortical [42].

Têm sido descritas metodologias de adição de partículas de alguns materiais que, em conjunto com os tempos e as temperaturas de sinterização utilizadas, permitem obter hidroxiapatites com determinadas estruturas porosas que simulam o osso vivo [195]. Estas metodologias permitem controlar as características, o tamanho, a forma e a distribuição dos poros.

A hidroxiapatite apresenta uma boa biocompatibilidade quando implantada em tecidos duros [4] ou em tecidos moles [43], e forma uma união firme e íntima com o tecido ósseo. Não apresenta reacções imunológicas adversas ou toxicidade, quando implantado no organismo [200].

A utilização clínica da hidroxiapatite está generalizada a vários campos da medicina. É utilizada em reconstruções do ouvido médio [201-204], reconstrução ou aumento crânio-facial [71], prevenção da reabsorção alveolar após extracção dentária [8, 9], aumento do rebordo alveolar [91], revestimento de implantes dentários [13-15, 168] e de próteses ortopédicas [60, 189], reconstrução de paredes da órbita, preenchimento de defeitos ósseos [4, 72] e como veículo para a libertação de drogas [205-207].

A forma física de aplicação depende do tipo de indicação clínica e pode variar entre as formas de grânulos, pasta, bloco e camada de revestimento de implantes metálicos [16].

Relativamente ao comportamento clínico da hidroxiapatite, têm sido realizados estudos no sentido de confirmar a biocompatibilidade em situações clínicas e comprovar os resultados dos trabalhos experimentais.

Embora a hidroxiapatite isolada não possua propriedades osteo-indutoras [157], a impregnação de blocos porosos deste material com células cultivadas a partir da medula óssea, na presença de dexametasona, permitiu observar a indução da formação e do crescimento de tecido ósseo, uma semana após implantação no tecido conjuntivo subcutâneo de Rato [17]. Tem sido

referida na literatura a propriedade osteo-indutora da hidroxiapatite, quando associada a células osteoblásticas [21] ou à proteína morfogénica do osso (BMP) [208].

Sendo utilizada como revestimento de implantes dentários em titânio há mais de uma década, continua a existir alguma controvérsia sobre as vantagens da utilização da hidroxiapatite a curto e longo prazos [13]. Nos ensaios experimentais, o revestimento de implantes metálicos com uma camada de hidroxiapatite tem revelado elevadas potencialidades destes implantes, quando comparados com implantes metálicos sem revestimento. São exemplos a rapidez da regeneração óssea, a quantidade de tecido ósseo que contacta directamente com a superfície dos implantes, e a indução de crescimento ósseo, quando existe uma má adaptação do implante às suas paredes [11, 33, 130, 168, 176, 209]. Um outro aspecto relevante para este tipo de implantes dentários é a capacidade da hidroxiapatite estabelecer uma união com as células do ligamento periodontal. Esta ligação é feita através de fibras colagénicas que se unem a uma substância depositada na superfície da hidroxiapatite, semelhante ao cimento, que recobre as raízes dentárias [209].

Uma revisão da literatura sobre os implantes dentários endósseos revestidos com hidroxiapatite permite sugerir, face aos resultados clínicos obtidos, que os implantes revestidos com hidroxiapatite possuem valores de sucesso no médio prazo (6 meses a 6 anos) comparáveis aos resultados obtidos com implantes de titânio [13]. Estudos clínicos recentes confirmam os bons resultados a curto/médio prazo deste tipo de implantes [211]. As suas principais indicações são em ossos de tipo IV, implantes colocados imediatamente após a extracção dentária, enxertos nos maxilares e/ou nos seios nasais e quando existem limitações da espessura do osso disponível para a colocação dos implantes (implantes com tamanhos inferiores a 10 mm) [13].

Este tipo de implantes demonstrou possuir uma boa adesão a enxertos de osso vascularizado, mantendo a camada de revestimento sem qualquer evidência de degradação ao fim de 32 semanas [15]. Contudo, os resultados e as conclusões obtidas em estudos clínicos de curto e médio prazo necessitam de uma avaliação continuada e do estudo de vários parâmetros em ensaios com maior duração.

Um parâmetro fundamental no estudo do comportamento clínico destes implantes, negligenciado por alguns investigadores, é a necessidade de confirmar que quer a composição química quer a estrutura do revestimento não apresentam diferenças significativas relativamente ao material inicial [212].

Sabendo-se que a temperatura de decomposição da hidroxiapatite é de cerca de 1250 °C, as temperaturas mais elevadas atingidas durante o processo de deposição da camada de revestimento podem induzir a transição de uma fase cristalina para uma fase amorfa [16]. Trata-se, essencialmente, do resultado da elevada velocidade de arrefecimento dos revestimentos obtidos a partir do material fundido por projecção de plasma.

Quando a hidroxiapatite é submetida a temperaturas superiores a 1300 °C ocorre uma reacção química ($Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6 \rightarrow 2Ca_3(PO_4)_2 + Ca_4P_2O_9 + H_2O$), em que se forma α-TCP (tri-fosfato de cálcio) [196, 213].

Alguns autores referem que a deposição de uma camada de hidroxiapatite pela técnica de projecção de plasma altera fortemente a estrutura cristalográfica do material, diminuindo em 30% o grau de cristalinidade quando se compara com o material de origem [166]. Este processo de deposição da camada de revestimento pode afectar significativamente as propriedades físico-químicas do material [33, 171, 212-215].

As transformações de fase no material depositado através deste método dependem das características das partículas utilizadas [171, 214]. No caso específico da hidroxiapatite, este material sofre um processo de desidroxilação, sendo transformado em oxihidroxiapatite e parcialmente decomposto em α-TCP e tetrafosfato de cálcio [171, 214].

A modificação da composição química da hidroxiapatite, pela adição de vários iões e pela alteração da sua porosidade, tem contribuido para o desenvolvimento de novos tipos de materiais com bom comportamento em estudos experimentais.

1.1.4. Vidros Bioactivos

Os vidros bioactivos são materiais que apresentam boa biocompatibilidade e capacidade de adesão ao tecido ósseo [158]. Os vidros mais simples são os do sistema binário $CaO\text{-}SiO_2$ [216] que, além de apresentarem bioactividade, possuem também a capacidade de adesão ao tecido ósseo [165, 184].

Este tipo de material foi inicialmente desenvolvido em 1971, por Hench e col. [75]. Possui a composição química apresentada na tabela 3.6 e foi designado comercialmente por Bioglass®, sendo dos primeiros materiais sintetizados pelo Homem com capacidade de estabelecer uma ligação química com tecido ósseo.

Os vidros bioactivos podem apresentar propriedades diferentes em função de alterações na concentração dos seus componentes ou pela adição de

Tabela 3.6 – **Composição do vidro bioactivo Bioglass® [217]**

Na_2O	CaO	SiO_2	P_2O_5
24,5%	24,5%	45,0%	6,0%

outros iões. As diferentes composições químicas e as formas distintas de degradação cinética, influenciam a interface com os tecidos biológicos [158].

A adição dos iões Na_2O e P_2O_5 aos vidros do tipo $CaO\text{-}SiO_2$ aumenta a sua capacidade reactiva. Inversamente, a introdução de Al_2O_3 e de Fe_2O_3 na composição química destes materiais reduz esta capacidade [184].

A determinação teórica das propriedades destes materiais pode ser realizada por computador através de modelos matemáticos que indicam a fórmula do vidro bioactivo seleccionado, considerando as propriedades que se desejam obter [218]. No entanto, tem sido proposto e utilizado um modelo mais simples de representação ternária, em diagrama de fase, que permite descrever o efeito simultâneo dos três componentes principais, SiO_2, CaO e Na_2O/P_2O_5, mantendo-se os restantes compostos em proporção fixa.

Estes tipos de materiais, extremamente bioactivos, apresentam sérias limitações no que respeita à resistência mecânica, nomeadamente no que se refere aos parâmetros de fadiga e fractura. Esta limitação condiciona a sua utilização clínica em situações de solicitações mecânicas, levando a que vários investigadores procurassem desenvolver materiais mais resistentes através da precipitação de fases cristalinas em matrizes vítreas, reforçando o material sobre o ponto de vista mecânico. Desde então, várias formulações têm sido propostas no campo dos vidros cristalizados [16]. A ideia básica é cristalizar duas ou três fases do vidro que possuem propriedades diferentes. A fase cristalina aumenta a resistência e as outras duas fases actuam ambas como cimento ou como agente bioactivo.

Este grupo de materiais pode ser dividido em dois tipos distintos, em função das diferenças estruturais e da composição: os vidros bioactivos e os vidros cerâmicos.

Os vidros bioactivos são vidros com superfícies activas que formam camadas de protecção superficial ricas em sílica ou fosfatos de cálcio. Os vidros cerâmicos são vidros com precipitação de fases cristalinas após tratamento térmico, que apresentam actividade superficial semelhante à dos vidros bioactivos [218]. A tabela 3.7 apresenta a composição química de alguns vidros cerâmicos mais conhecidos comercialmente. A tabela 3.8 mostra algumas das suas propriedades.

Tabela 3.7 – **Composição química de alguns vidros cerâmicos bioactivos, em comercialização (% ponderal)**

	SiO_2	P_2O_5	CaO	CaF_2	MgO	Na_2O	K_2O	Al_2O_3	*Fases*
CERAVITAL	40-50	10-50	30-35	–	2,5-5	5-10	0,5-3	–	Vidro, apatite
CERABONE	34	16,2	44,7	0,5	4,6	–	–	–	Vidro, apatite, wolastonite
BIOVERITE	19-52	4-24	9-30	F0,7-7	5-15	3-5	3-5	12-33	Vidro, apatite/ flogopite

(Adaptado de M. H. Fernandes) [219]

Tabela 3.8 – **Propriedades de alguns vidros cerâmicos em comercialização** [219, 220].

	CERAVITAL	*CERABONE*	*BIOVERIT*	*OSSO*
Módulo de ruptura (MPa)	100-150	215	100-160	60-170
Módulo de Young (GPa)	–	118	77-88	1-19
Resistência à compressão (MPa)	500	1080	500	2-170
Densidade (g/cm^3)	–	3,07	2,8	0,16-2,25
Tenacidade à fractura (K_{Ic} -$MPa.m^{1/2}$)	–	2	0,5-1	2-12

A formação, por tratamento térmico, de cristais de apatite e wolastonite numa matriz de vidro constituída por MgO-CaO-SiO_2 aumenta as propriedades mecânicas deste material [48], mantendo a propriedade de adesão ao tecido ósseo através da formação de uma camada de apatite na sua superfície, quando em contacto com os fluidos orgânicos [221]. Os iões de fósforo necessários para a formação da camada de apatite, na superfície dos cerâmicos de vidro, são fornecidos apenas pelos fluidos envolventes [79].

A dissolução dos iões de cálcio e de sílica, das fases vítreas e da wolastonite é suprimida pela presença de Al_2O_3, concentrado na fase vítrea, devido à formação de compostos insolúveis que, obviamente, aumentam a estabilidade química. Desta forma, é aceite que a presença de Al_2O_3 aumenta a durabilidade química dos vidros [221]. A inclusão de Al_2O_3 na composição dos vidros bioactivos e a sua consequente estabilização reduz a adesão ao tecido ósseo, mesmo quando se forma na superfície do material uma camada rica em cálcio e fosfatos [216]. Os vidros que possuem menos de 1,5 mol/% de

Al_2O_3 formam uma camada superficial de apatite semelhante à dos materiais que não possuem Al_2O_3. Os vidros com Al_2O_3 em concentrações superiores a 1,7 mol/% não geram esta camada superficial, à semelhança do que ocorre nos vidros sem SiO_2. A adição de pequenas quantidades de Al_2O_3 suprime a bioactividade dos vidros e cerâmicos de vidro, através da inibição da formação de apatite nas suas superfícies quando implantados no organismo [184, 216].

A adição de Fe_2O_3 aos vidros do tipo $CaO\text{-}SiO_2$ suprime mais eficazmente a formação de uma camada rica em fósforo, cálcio e sílica, do que a adição de Al_2O_3. A adição de valores superiores a 3% de Fe_2O_3 é suficiente para evitar completamente a formação dessa camada [184]. A dissolução dos iões de cálcio e sílica contidos nos vidros bioactivos e nos materiais cerâmicos de vidro desempenha um papel relevante na formação da camada superficial de apatite [48, 221]. Os iões de sílica dissolvidos contribuem, de forma significativa, para a formação dos núcleos de apatite nas superfícies dos vidros bioactivos e nos cerâmicos de vidro, pois desempenham uma função essencial durante a fase inicial deste processo. O incremento do conteúdo de sílica diminui a cinética da reacção dos vidros bioactivos, sabendo-se que vidros com mais de 60% de sílica não são bioactivos, devido à formação de uma rede fechada de sílica [159]. A composição e as características estruturais desta camada de apatite superficial são semelhantes às da apatite do osso [48].

A condição essencial para que os vidros bioactivos e os cerâmicos de vidro se unam ao tecido ósseo é a formação dessa camada de apatite, na sua superfície, quando implantados no organismo [76, 159, 165, 184, 220, 222]. Esta camada superficial pode ser reproduzida numa solução acelular que simule o fluido orgânico, com uma composição e concentração iónica iguais à do plasma sanguíneo humano [216, 221-223]. A sua formação deve-se a uma reacção química dos vidros bioactivos e dos materiais cerâmicos de vidro com os fluidos orgânicos que envolvem os materiais, após a sua colocação no organismo [222].

A formação da camada de apatite hidroxicarbonatada policristalina, nos vidros bioactivos, está dependente da composição do material em SiO_2 [223]. Um vidro de rede menos estável com menor concentração de SiO_2 forma esta camada mais rapidamente do que um vidro com 55% de SiO_2 na sua composição. Aumentando a concentração deste elemento até 60%, é eliminada a possibilidade de formação desta camada biologicamente fundamental para a união química ao osso [159, 223].

1.2. Caracterização dos materiais utilizados

1.2.1. Osteopatite®

A Osteopatite® é uma hidroxiapatite que, possuindo uma composição química diferente da hidroxiapatite padrão, tem estrutura igual à da hidroxiapatite quimicamente pura. Encontram-se descritas na literatura a composição química e algumas propriedades deste material [9, 224-226].

A composição química da Osteopatite®, apresentada na tabela 3.9, mostra que contêm uma quantidade de catiões para além do cálcio, como, por exemplo, o sódio, que induz algumas modificações do meio envolvente, no que respeita a alterações da sua composição química e alterações do pH, sem haver uma perda significativa do peso do material [225].

Os grânulos de Osteopatite® possuem uma superfície específica de 0,9 m^2/g e uma densidade de 1,80 g/cm^3 [9].

1.2.2. Cimento de Vidro Bioactivo

A composição química e algumas das propriedades físico-químicas, além do comportamento biológico deste material já foram descritas na literatura [187, 227-229].

A composição química do vidro bioactivo é apresentada na tabela 3.10.

Resumidamente, podemos referir que o processamento deste cimento consiste na redução do vidro a pó, sendo misturado com uma solução tamponada, com pH de 7,4, de $(NH_4)_2HPO_4$ e $NH_4H_2PO_4$. Após este processo, obtem-se uma pasta que ganha presa ao fim de 5 a 8 minutos. O tempo de presa pode ser determinado através da utilização do teste de agulhas de Gilmore que utiliza dois penetradores cilíndricos com a possibilidade de apli-

Tabela 3.9 – **Composição química da Osteopatite®**

P_2O_5	43,1%
K_2O	1,0%
Al_2O_3	0,21%
CaO	Restante
MgO	0,7%
Na_2O	3,1%
Fe_2O_3	0,34%

Tabela 3.10 – **Composição química do vidro bioactivo que constitui o cimento de vidro bioactivo (% ponderal)**

SiO_2	CaO	P_2O_5	Na_2O
35,6	42,4	17,0	5,0

cação de tensões diferentes sobre o cimento. Pode modificar-se o tempo de presa alterando o tratamento térmico do pó de vidro, no tamanho das partículas, e nas proporções da mistura entre o pó e a solução [187].

Num cimento deste tipo pode definir-se o tempo de presa inicial como correspondendo ao início da formação dos cristais resultantes da reacção entre o silicato e a solução de fosfatos. Nesta fase, o material deixa de ser moldável não permitindo a incisão da primeira agulha. Após o início da formação dos cristais, a deformação do material é acompanhada pelo aparecimento de fissuras, tornando-se a pasta friável. Num segundo tempo, tempo de presa final, o cimento torna-se rígido devido ao estabelecimento de ligações entre os cristais primários. A formação do cimento deve-se à precipitação dum composto de fosfato de amónia e cálcio hidratado [229], com a fórmula de $CaNH_4PO_4.H_2O$ [48].

Uma propriedade favorável de um biomaterial utilizado como cimento ósseo ou para o preenchimento de defeitos ósseos é estar disponível na forma de pasta, que endurece ao fim de poucos minutos, devido à sua manipulação e colocação fácil no local operatório [163].

2. MÉTODOS

2.1. Caracterização dos materiais

2.1.1. Composição química

A determinação da composição química dos materiais foi realizada através da microanálise por raios X, com a utilização de uma sonda detectora da dispersão de energias (EDS), acoplada a um microscópio electrónico de varrimento.

Neste caso, a determinação do espectro de energia dos fotões é realizada através da medida directa da energia absorvida por um sistema detector

que aproveita as propriedades ionizantes da radiação, estando o sistema integrado num microscópio electrónico de varrimento, JEOL JSM 6301F (Jeol, Ltd, Japão). Esta particularidade permite aliar a realização da microanálise por raios X com a observação em alta resolução das amostras.

O espectrómetro de dispersão de energias, utilizado para a microanálise por raios X, possui como detector um cristal semicondutor de silício, preenchido parcialmente com lítio. Este espectrómetro analisa, simultaneamente, todo o espectro de raios X emitido pelas amostras, determinando continuamente a energia de cada fotão detectado [230] (Fig. 1).

A realização da microanálise por raios X requer a excitação da superfície da amostra por um feixe de electrões e a análise dos raios X por uma microssonda, que não é mais do que um espectrómetro de raios X (EDS - *Energy Dispersive System*). Este sistema é controlado por um computador, permitindo visualizar, em tempo real, o espectro global registado e o seu processamento imediato. O computador permite a realização de um exame detalhado de todo o espectro obtido, o seu processamento e registo, para análise qualitativa e quantitativa [230].

Nas imagens obtidas encontram-se referidos os seguintes itens, que importa legendar, para uma perfeita compreensão do gráfico:

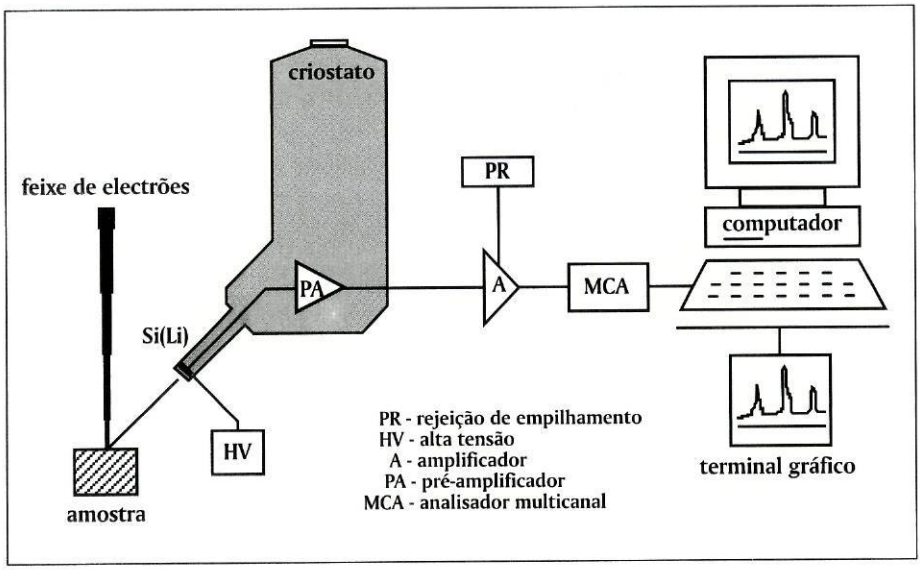


Fig. 1 – **Espectrómetro de raios X de dispersão de energias (EDS), com detector de Si(Li).**

VFS – escala de fotões libertados (valor máximo).

Livetime – tempo efectivo necessário para obter o espectro.

keV – tensão de aceleração dos electrões.

Label – legenda introduzida pelo operador e a potência a que é observado (por exemplo 15 keV).

Uma das maiores limitações deste equipamento é a dificuldade de detectar elementos presentes em baixas concentrações e a possibilidade de sobreposição dos picos de alguns compostos químicos, por exemplo o manganês com o crómio e com o ferro. A necessidade de tornar as amostras condutoras, revestindo-as com uma película de ouro ou carbono, para observação concomitante, leva ao aparecimento dos picos correspondentes a estes iões no espectro recolhido, sendo um factor de perturbação nos traçados obtidos.

Os espectros obtidos permitem apenas uma análise qualitativa e semi-quantitativa dos compostos químicos presentes nas amostras estudadas.

A resolução espacial, em profundidade e lateralidade, é um factor essencial na avaliação da informação obtida nos espectros de análise pontual das amostras, principalmente na zona da interface. Conforme se pode observar na fig. 2, o efeito da energia do feixe de electrões atinge uma zona, em profundidade e largura, que pode levar ao aparecimento de interferências produzidas pela composição do material. Este efeito é fundamental, principalmente quando o ponto em análise se encontra na zona da interface, onde existe o risco da distância da superfície do biomaterial ser inferior a 1 μm.

2.1.2. Análise Superficial

A análise da morfologia superficial e da micro-estrutura das amostras foi realizada com recurso à utilização de microscópios electrónicos de varrimento, JEOL JSM 35C e JSM 6301F (Jeol, Ltd, Japão).

Para a melhor observação dos pormenores topográficos utilizou-se a função de electrões secundários, que permite uma melhor visualização do estado e das características superficiais.

Os materiais metálicos, pinos, foram observados directamente no microscópio sem preparação prévia por serem materiais metálicos condutores eléctricos. As amostras cerâmicas foram recobertas com uma camada fina de ouro, através de um processo de deposição catódica em equipamento específico para esse fim, JEOL FINE COAT, ION SPUTTER JFC 1100 (Jeol, Ltd, Japão), de forma a torná-las condutoras de electrões.

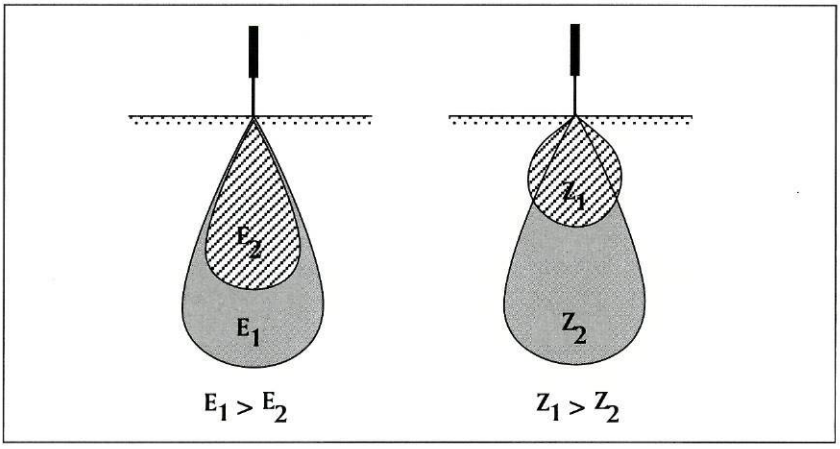


Fig. 2 – **Efeito da energia do feixe de electrões (E) e do número atómico da amostra (Z) no volume de interacção.**

2.2. Preparação dos Materiais

2.2.1. Pinos Metálicos (Aço Inox e Titânio)

Maquinaram-se pinos com um diâmetro de 2± 0,2 mm e comprimento de 6 mm a partir de um varão de aço inox 316L e outro de titânio (pureza química >99,5%) adquiridos comercialmente (Thyssen Inds., Alemanha). A superfície dos pinos apresentou algumas estrias de maquinagem, resultantes do tipo de preparação das amostras.

Os pinos foram colocados num aparelho de ultrassons JULABO USRI (Julabo Labortechnick, Alemanha), contendo água destilada desionizada, durante 15 minutos, para remover possíveis resíduos depositados na sua superfície, durante a preparação. Não foi realizado qualquer tratamento superficial.

Seguidamente foram colocados em mangas de esterilização, fechadas hermeticamente e colocadas em autoclave a 135 °C, durante cerca de 30 minutos e a uma pressão de 2 atmosferas, para se proceder à esterilização dos materiais.

2.2.2. Osteopatite®

A partir de um material de síntese orgânica, o produto foi moído, durante 4 horas, num moinho de bolas com 50% de água destilada, para a obten-

ção de partículas de pequenas dimensões. O pó foi seguidamente compactado numa prensa com a aplicação de uma pressão uniaxial de 150 MPa e sujeito a um processo de sinterização (1100 °C, durante 4 horas). O material obtido foi fragmentado em grânulos de diversos tamanhos, sendo feita a sua classificação por crivagem [224].

Os grânulos com as dimensões de 0,5 a 0,85 mm (-20/+100 mesh ASTM) foram seleccionados após a sua passagem por crivos calibrados. O tamanho mínimo dos grânulos é importante para prevenir eventuais fenómenos de fagocitose pelas células de defesa [4, 6, 7, 34, 231].

Os grânulos foram colocados em mangas hermeticamente fechadas para serem esterilizados em autoclave, durante cerca de 30 minutos, a temperatura de 135 °C e pressão de 2 atmosferas.

2.2.3. Cimento de Vidro Bioactivo

O pó de vidro foi misturado com uma solução de fosfato de amónia, ajustada a pH de 7,4. Esta solução foi preparada pela dissolução de $(NH_4)_2HPO_4$ e $NH_4H_2PO_4$ em água destilada. A pasta obtida foi manipulada manualmente, apresentando um tempo médio de presa de cerca de 5 minutos. Este tempo permitiu a colocação e adaptação fácil do cimento no defeito ósseo antes da solidificação da pasta.

2.3. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

2.3.1. Modelo Experimental

O estudo do comportamento do tecido ósseo após a implantação de biomateriais deve ser realizado, idealmente, em condições análogas ou homólogas às que se verificam quando o biomaterial é utilizado clinicamente. Contudo, em estudos experimentais de média duração, o recurso a modelos animais é a metodologia mais recomendada por se tratar de uma fase precoce da avaliação do comportamento tecidular após a introdução de um corpo estranho [139].

A decisão de seleccionar um animal para testar o comportamento de um tecido específico depende de inúmeros factores. Os critérios científicos para esta selecção dependem dos objectivos do estudo. Todavia, devem ter-se em especial atenção os aspectos anatómicos, bioquímicos, fisiológicos e patoló-

gicos que condicionam os mecanismos de resposta do animal. A fundamentação da escolha do animal deve também ter em consideração os estudos prévios realizados em condições semelhantes, que permitem estabelecer comparações entre os resultados obtidos no ensaio e os resultados publicados na literatura. O modelo experimental utilizado neste estudo é referido abundantemente na literatura mundial, em estudos in vivo sobre o comportamento biológico da maioria dos biomateriais [129, 131, 132, 148, 165-170, 182, 184, 208]. O modelo de implante transcortical é um método recomendado pela sua eficácia na realização de testes sobre a determinação da força de adesão na interface entre os biomateriais e o tecido ósseo [177, 232].

A selecção do Coelho como animal de experimentação foi realizada atendendo aos aspectos referidos. A utilização deste animal permite, de forma relativamente fácil, comprovar o comportamento dos materiais no tecido ósseo e estabelecer comparações com trabalhos publicados em revistas internacionais, onde é adoptada metodologia semelhante [151, 166, 182]. Tratando-se de um estudo onde o objectivo fundamental é a análise do comportamento de vários biomateriais, sendo dois deles inovadores, este tipo de modelo experimental é válido quando se pretendem obter resultados que permitam fornecer indicadores das potencialidades de integração rápida dos materiais ensaiados no tecido ósseo.

Estudos experimentais de longo prazo, prévios à utilização clínica dos biomateriais, implicam a selecção de um tipo de osso, com estrutura e localização idênticas às do tecido que os biomateriais pretendem substituir clinicamente. Desta forma, é possível realizar uma melhor avaliação e extrapolação dos resultados para a sua aplicação clínica. O recurso a modelos animais é recomendado sempre que a duração do período experimental não ultrapassa o médio prazo, isto é, 6 meses [138].

A transposição dos resultados obtidos no Coelho pode ser feita para o Homem quando se recorre ao mesmo tipo de osso, multiplicando-se o valor dos tempos seleccionados por três [56]. O osso regenerado à volta dos implantes de titânio aparenta semelhanças significativas no Homem, Cão e Coelho. O facto de a regeneração óssea ocorrer mais rapidamente no Coelho é um dos factores que contribuem para a selecção deste animal [148].

O custo dos animais e da sua manutenção é outro factor a ter em conta, devido às implicações que têm na viabilidade do projecto de experimentação. O Coelho pode considerar-se um animal com custos de aquisição e manutenção dentro do razoável. Sendo mais barato que os animais de maior porte, apresenta ossos com dimensões normalmente suficientes para a im-

plantação de biomateriais, o que não acontece com o Rato ou com a Cobaia [169].

A manipulação dos animais de experimentação tem que obedecer a normas específicas e legalmente estipuladas [161, 162]. O tratamento deve ser feito por pessoal especializado e em condições adequadas, pois estes animais são muito sensíveis às variações ambientais e podem morrer facilmente durante o ensaio experimental.

A legislação actualmente em vigor, em Portugal, sobre as normas técnicas de protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, obriga a vários cuidados de ordem geral e de acomodação, assim como a selecção e o número de animais, além de todas as condicionantes que devem regulamentar a experimentação animal [161]. O nosso trabalho contemplou todas as normas existentes na legislação vigente no que respeita à experimentação animal. O número de animais a utilizar no ensaio experimental foi definido em função de vários parâmetros:

- Minimização do número de animais a operar - O cumprimento das normas legais em vigor no nosso País implica a redução máxima do número de animais a utilizar nos estudos experimentais [161]. Esta norma está em conformidade com o que internacionalmente é recomendado para este tipo de investigação animal [138, 139]. Como se referiu na Introdução, no caso dos testes de toxicidade o número de animais a utilizar é de dois [162]. No estudo de biocompatibilidade, segurança biológica e eficácia os investigadores devem usar um número máximo de cinco ou seis animais [139, 162]. Contudo, com um mínimo de dois animais por cada tempo de implantação podem obter-se resultados válidos para este tipo de estudos [82].
- Limitações estatísticas – Utilização de um número mínimo de animais que permita realizar tratamento estatístico da variação da percentagem de contacto directo do tecido ósseo com os biomateriais. Com amostras superiores a cinco animais por tempo de implantação já é possível fazer a determinação estatística da variabilidade entre os diferentes materiais.
- Custos totais do projecto de investigação - O tamanho e o número dos animais, bem como a duração do ensaio, têm implicações significativas nos custos da investigação. As limitações económicas condicionam o recurso a um número elevado de animais e a ensaios experimentais de longa duração.

2.3.2. Protocolo da Cirurgia Experimental

Neste estudo experimental, foram utilizados 12 coelhos (Oryctolagus cuniculus) adultos, de raça Nova Zelândia, de ambos os sexos e com peso médio de 3,0± 0,4 kg. Os animais foram divididos em dois grupos de 6 coelhos cada. Este número de animais permite obter resultados válidos no estudo da biocompatibilidade dos materiais ensaiados [82, 162].

O protocolo experimental foi realizado em Santarém, na Estação Zootécnica Nacional, que é um centro licenciado para a experimentação animal.

A equipa cirúrgica foi constituída por um cirurgião, um cirurgião ajudante, um anestesista, um instrumentista, um médico veterinário e dois técnicos de apoio.

A técnica anestésica utilizada consistiu na perfusão intra-muscular (i.m.) de Ketamina (Ketalar®, Parke-Davies S.A., Espanha), numa dose de 100 mg/kg de peso corporal, complementada por Midazolam (Dormicum®, Roche, Suiça), na dose de 0,20 mg/kg, reforçada com a administração de anestesia local através da perfusão i.m. de 1,8 ml de Lidocaina a 2% com Epinefrina a 1:100000 (Graham Chemical Co., Jamaica) perto da zona da intervenção.

Durante o acto cirúrgico foram utilizadas todas as condições de assepsia recomendadas para este tipo de procedimentos experimentais. Todo o material utilizado num dado animal era descartável, embalado e esterilizado individualmente.

O local seleccionado para se implantarem os materiais foi a tíbia posterior, direita e esquerda, de cada coelho. Escolheu-se um acesso fácil à face anteromedial da tíbia, procurando produzir o menor traumatismo possível nos tecidos intervencionados e obter um leito ósseo excelente.

Os materiais foram colocados, bilateralmente, na seguinte ordem:

- tíbia esquerda: grânulos de Osteopatite® e pino de aço inox 316L;
- tíbia direita: cimento de vidro bioactivo e pino de titânio.

Esta ordem de distribuição dos materiais foi definida tendo em conta a possibilidade de existirem possíveis interacções entre os dois metais, se colocados no mesmo osso a distâncias próximas.

O pêlo que recobria as patas a operar foi cortado imediatamente antes da intervenção (Fig. 3) e a superfície exposta foi desinfectada com uma solução dérmica iodada, bactericida e antimicótica (Betadine®, Asta Médica, Lisboa).

A exposição da superfície óssea foi realizada através de uma incisão longitudinal com cerca de 6 cm, utilizando-se um bisturi cirúrgico com uma

lâmina nº 15. A incisão permitiu o acesso ao periósteo, que foi cuidadosamente cortado e descolado, permitindo a exposição do osso onde foi realizada a colocação dos biomateriais (Fig. 4). Foram realizadas janelas ósseas de tipo rectangular na superfície do osso exposto, com as dimensões médias de 12x3 mm, para a colocação dos materiais cerâmicos, perfurando a parede cortical até à cavidade medular (Fig. 5). Para a implantação dos pinos metálicos, usaram-se brocas cilíndricas normalizadas de tungsténio com 2 mm de diâmetro. Estas brocas permitem a obtenção de orifícios com um diâmetro aproximado de 2,0± 0,1 mm. Perfurando a cortical até à medula óssea obtêm-se um apoio firme dos pinos na parede interna da cortical oposta (Fig. 6).

O corte do osso foi realizado com brocas de tungsténio a baixa rotação, e acompanhado de irrigação abundante com uma solução de soro fisiológico (B. Braun Medical S.A., Espanha), prevenindo-se o sobreaquecimento do osso na zona operada. Teve-se o máximo cuidado para minimizar o trauma cirúrgico durante todo o processo. Para a realização deste procedimento, foi utilizado um equipamento comercial, desenvolvido e adaptado para a colocação de implantes dentários, Osada XL-150 (Osada Irrigation Dispenser, Osada Electric Co. Ltd., Japão), com rotação não superior a 1500 rpm.

Os materiais foram esterilizados em autoclave (135 °C durante cerca de 30 minutos, a uma pressão aproximada de 2 atmosferas), sendo acondicionados, previamente, em mangas de esterilização hermeticamente fechadas. Esta técnica de esterilização demonstrou, em estudos realizados por outros investigadores, não alterar as propriedades de materiais semelhantes [73, 149, 173].

Durante a colocação no osso, os pinos metálicos foram pressionados para se fixarem firmemente às paredes ósseas e evitar o aparecimento de micromovimentos nos implantes, que pudessem interferir com o processo regenerativo do tecido ósseo. Os grânulos de Osteopatite® e a pasta de cimento de vidro bioactivo foram compactados com uma espátula metálica para se adaptarem firmemente às paredes das cavidades ósseas. Os materiais foram colocados a uma distância entre os orifícios de cerca de 1,5 cm.

Concluída a implantação, removeram-se todos os resíduos, fragmentos do osso cortado e o excesso de materiais no local intervencionado, através de uma lavagem abundante com soro fisiológico.

Os tecidos foram suturados em duas camadas distintas e com dois tipos de sutura diferentes. A camada tecidular profunda foi suturada com fio de sutura reabsorvível (Dexon® II, Davis+Gleck) e a camada superficial com fio de seda 4-0 (B. Braun SSC AG, Suiça). Finalmente, o local cirúrgico foi limpo e desinfectado através de irrigação abundante com Betadine® solução dérmica.



Fig. 3 – **Patas posteriores do coelho preparadas para serem intervencionadas cirurgicamente. O pêlo foi cortado de modo a permitir uma correcta desinfecção e manipulação do local operatório.**



Fig. 4 – **Preparação de janela óssea para a colocação dos materiais cerâmicos com broca de tungsténio a baixa rotação e com irrigação abundante.**



Fig. 5 – **Janela óssea, na tíbia da pata esquerda, onde foram colocados os grânulos de Osteopatite®. O orifício onde foi colocado o pino de aço inox encontra-se recoberto pelos tecidos.**



Fig. 6 – **Janela óssea, na tíbia da pata direita, onde foi colocado o cimento de vidro bioactivo. O orifício onde vai ser colocado o pino de titânio encontra-se já preparado.**

Na fase pós-operatória, os animais foram submetidos a uma terapêutica antibiótica com 200000 IE de penicilina (Combi-Kel®, Helsinn, Portugal), numa dose de 0,12 mg/kg, por um período de uma semana e tratados segundo as condições recomendadas para animais de experimentação. Os animais foram colocados em jaulas isoladas e com total liberdade de movimentos. A alimentação, igual para todos os animais, consistiu na dieta convencional de ração e água em doses aconselhadas para coelhos.

Uma semana antes do sacrifício foi administrado, por via e.v., cloridrato de tetraciclina (Terramicina®, Pfizer, Portugal), numa dose de 30 mg/kg, para servir de marcador fluorescente. A tetraciclina possui uma grande afinidade de deposição em tecidos duros, durante o processo de formação/remodelação e é fluorescente mediante a incidência de luz ultra-violeta (UV).

Decorrido o período experimental, os animais foram sacrificados através de uma *overdose* endovenosa de anestésico (Penthotal® Sódico, Lab. Abbott Lda., Portugal), 4 e 10 semanas após a implantação dos materiais.

Após o sacrifício, foram retirados todos os segmentos do osso contendo os materiais implantados. Os tecidos moles envolventes foram cuidadosamente dissecados e removidos. As amostras, assim preparadas, foram colocadas num frasco de vidro estéril, contendo uma solução de formol a 4%, tamponada a pH 7,4.

Este procedimento foi executado à temperatura ambiente (20-25 °C) e, após serem colocadas identificações codificadas, as amostras foram transportadas em mala térmica para o laboratório a fim de serem sujeitas ao processamento histológico. Na altura da colheita dos blocos ósseos contendo os biomateriais, estes foram observados cuidadosamente na procura de sinais macroscópicos evidentes de qualquer alteração patológica, sendo fotografados e radiografados (Figs. 7 e 8).

2.4. Preparação Histológica

O protocolo da técnica de preparação histológica das amostras de tecidos duros não descalcificados, contendo implantes, foi por nós adaptado e desenvolvido no laboratório de Anatomia Dentária da FMDUP, a partir de métodos descritos na literatura [38, 91, 233-241].

O primeiro passo deste protocolo foi a fixação das amostras. Para diminuir os tempos de fixação, reduziu-se o máximo possível o tamanho da amostra. Quanto mais reduzida for a amostra, menor é o tempo que deve ficar imersa na solução fixadora.

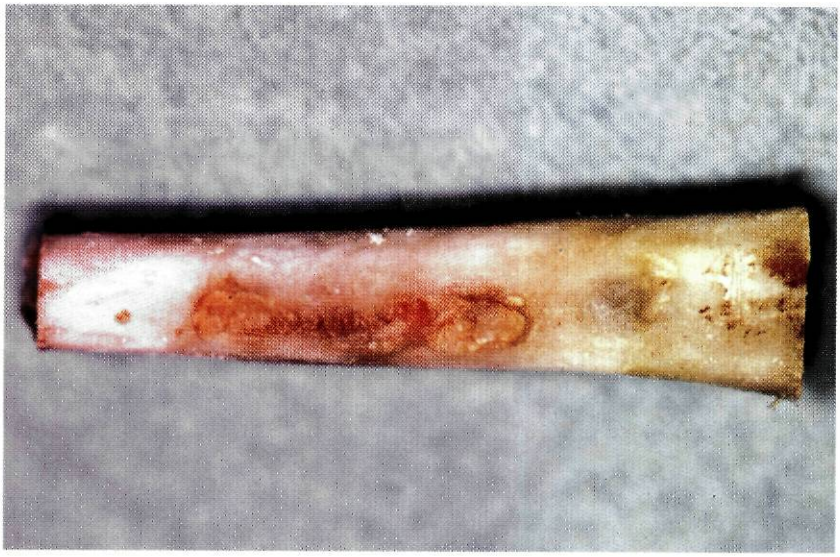


Fig. 7 – **Amostra de um bloco de osso contendo materiais implantados, após ser cortado da tíbia e serem dissecados os tecidos moles.**

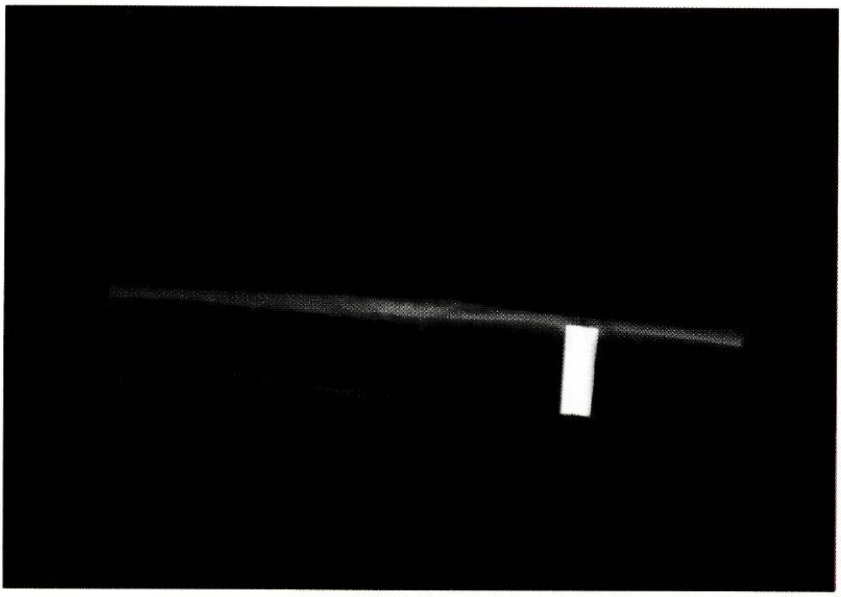


Fig. 8 – **Imagem radiográfica de um bloco de osso com grânulos de Osteopatite® e um pino de aço inox, 10 semanas após a implantação.**

O processo de fixação utilizado, consistiu na introdução dos blocos isolados num frasco de vidro esterilizado, contendo uma solução de formol a 4%, que foi fechado hermeticamente por um período de tempo nunca inferior a 24 horas. O tempo de fixação pode ser prolongado em função do tamanho da amostra.

Decorrido o tempo recomendado para uma fixação correcta, iniciou-se a fase de desidratação, numa série crescente de concentrações de álcool. Este processo desenvolveu-se colocando as amostras em frascos individuais, contendo etanol a 70% durante cerca de 48 horas, à temperatura ambiente do laboratório (20-25 °C). Seguidamente, colocaram-se as amostras durante períodos iguais de tempo, em frascos contendo álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. A solução de etanol a 100% foi substituída três vezes.

A etapa seguinte, de inclusão, consistiu na colocação das amostras em frascos de vidro esterilizados e individualizados, contendo uma solução composta por 800 ml/l de metil-metacrilato (Methyl Methacrylate BDH), 200 ml/l de Plastoid (Plastoid N, Röhm Pharma) e 1 gr/l de Perkadox (Akzo Chemicals BV, Holanda). Para remover as bolhas de ar que habitualmente se formam na solução antes da polimerização, os frascos abertos foram colocados num aparelho de vácuo durante 10 a 15 minutos. Após serem hermeticamente fechados, foram colocados num equipamento de banho-maria GFL (Gesellschaft fur Labortechnik GmbH, Alemanha) à temperatura de 37 °C, durante cerca de 48 horas, até os blocos estarem completamente polimerizados.

Quando foi confirmada a polimerização pela verificação do endurecimento da resina, os frascos foram cuidadosamente partidos, sendo retirados os blocos cilíndricos de resina que incluíam as amostras de osso (Fig. 9). A localização das posições dos implantes foi feita através da realização de radiografias das amostras em películas Kodak DF 57, utilizadas em Medicina Dentária, para evitar o corte acidental das estruturas a estudar.

Os blocos foram cortados com um disco diamantado, usando um micrótomo para tecidos duros não descalcificados (Accutom, Struers, Dinamarca), ajustado para a obtenção de fatias com a espessura de 150-200 µm. O corte foi executado a uma rotação de 2500 rpm e a baixa pressão. A eliminação do risco de alterações mecânicas e/ou térmicas durante o processo de corte foi efectuada através de abundante lubrificação e refrigeração com solução especificamente indicada para este tipo de procedimentos, fornecida pelo fabricante e diluída em água na proporção de 1:25 (Cutting Fluid, Struers, Dinamarca).



Fig. 9 – **Bloco cilíndrico de resina incluindo uma amostra de osso/biomaterial, após o processo de polimerização estar completo.**

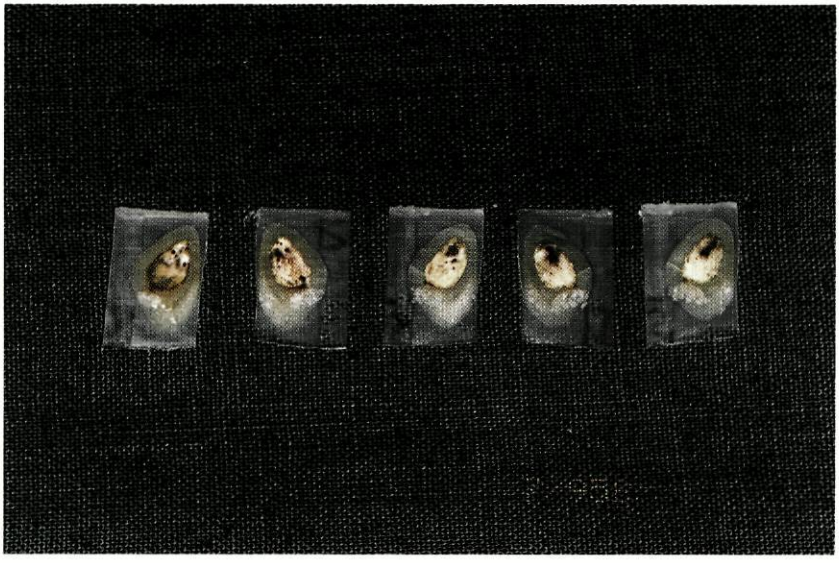


Fig. 10 – **Cortes de resina com as amostras de osso e os implantes, com 150-200 μm de espessura, após o corte por disco diamantado em micrótomo para tecidos duros não descalcificados.**

As fatias obtidas (Fig. 10) sofreram um processamento distinto, em função da sua utilização nos diferentes tipos de microscopia, que se descreverão adiante.

A preparação das amostras para a microscopia electrónica de varrimento foi realizada de forma distinta. Cortaram-se os blocos de resina contendo o osso e o material num ponto próximo da colocação do implante e desgastaram-se até a superfície do material estar exposta, através de polimento superficial. Seleccionou-se uma amostra de cada coelho, contendo os diversos biomateriais implantados, para a realização de observações histológicas e análise histomorfométrica.

2.4.1. Microscopia Óptica

A espessura dos cortes destinados ao exame por microscopia óptica foi reduzida até cerca de 40± 10 μm, por desgaste num equipamento de polimento (DAPS, Struers, Dinamarca), utilizando discos com granulometrias decrescentes de #1000 (P1000, 3M 734, UK), #1200 (P1200, 3M 314, UK) e finalizado com discos de grão super fino (SF737, 3M, UK), com prevenção do sobreaquecimento por irrigação abundante e simultânea de água. A determinação da espessura final dos cortes foi realizada através de um micrómetro digital (Digimatic Micrometer, Mytotuyo, Japão).

As amostras foram, então, colocadas num aparelho de ultrassons JULABO USRI (Julabo Labortechnick, Alemanha), durante 10 minutos, para a remoção de resíduos ou impurezas resultantes do processo de preparação.

A técnica de coloração usualmente utilizada no nosso laboratório é feita por hematoxilina (Harris Hematoxylin Acidified, Shandon Sci. Ltd., UK) e eosina (Eosin Y, Shandon Sci. Ltd., UK). Com este tipo de coloração, os núcleos assumem cor azul, os tecidos calcificados violeta acastanhada, o tecido ósseo imaturo rosa claro, a matriz cartilaginosa azul e o citoplasma, colagénio e eritrócitos vermelha.

As amostras foram montadas através da colocação de uma gota de Permacol (Ind. Permacol UV, Adhesive 327/3, Permacol Ind., Holanda) sobre o corte, cobrindo toda a superfície, que foi depois colocado sobre uma lâmina de vidro. O Permacol foi espalhado de forma uniforme sobre a lâmina com o recurso a um jacto de ar e polimerizado com luz UV.

Seguidamente, colocou-se outra gota deste produto numa lamela, tendo o máximo cuidado para evitar a formação de bolhas de ar. A lâmina preparada é polimerizada por luz UV durante alguns segundos.

Estando a polimerização completa, as lâminas foram identificadas e classificadas através da inscrição de uma nomenclatura codificada utilizada no laboratório, num dos seus extremos (Fig. 11).

As amostras foram observadas num microscópio de luz Olympus BH-2 (Olympus Optical Co. Ltd., Japão), que possui uma máquina fotográfica acoplada, permitindo a realização de fotografias para análise e estudo posterior.

2.4.2. Microscopia de Fluorescência

As amostras processadas para microscopia de fluorescência seguiram um procedimento idêntico ao utilizado para a microscopia de luz convencional, com excepção de não ser realizado qualquer tipo de coloração.

As lâminas foram observadas e fotografadas num microscópio de fluorescência Olympus BH-2 RFCA (Olympus Optical Co. Ltd., Japão), que possui um filtro emissor de luz UV. Este equipamento encontra-se ligado a um sistema fotográfico, permitindo registar e guardar as imagens observadas, para análise posterior.

2.4.3. Microscopia Electrónica de Varrimento

Os blocos destinados à observação e análise por microscopia electrónica de varrimento foram radiografados para se proceder à localização dos materiais implantados e evitar a destruição acidental de estruturas importantes. Seguidamente, foram seccionados, em cortes transversais ou longitudinais, de forma a expor a superfície do material, através de um disco diamantado incluído num micrótomo para tecidos duros.

A superfície exposta das amostras foi submetida a um processo gradual e cuidadoso de polimento, em equipamento específico para esse fim (DAPS, Struers, Dinamarca), utilizando discos de sílica com granulometrias decrescentes de #1000 (P1000, 3M 734, UK), #1200 (P1200, 3M 314, UK) e finalizando com discos de grão super fino (SF737, 3M, UK). Este procedimento foi realizado com prevenção do sobreaquecimento através de irrigação abundante e simultânea de água, por forma a não provocar alterações das amostras devido a alterações térmicas superficiais.

Após terem sido polidas adequadamente, as amostras foram colocadas e limpas num aparelho de ultrassons JULABO USRI, durante 10 minutos, para remover as impurezas e resíduos resultantes da técnica de polimento.

O resultado final de uma amostra com um pino metálico, preparada através deste processo, é apresentado na figura 12.

Todos os exemplares destinados a ser observados no microscópio electrónico de varrimento foram revestidos com uma película fina de ouro, através de deposição catódica, num equipamento Jeol Fine Coat, Ion Sputter JFC 1100 (Jeol, Ltd., Japão).

Os microscópios electrónicos de varrimento utilizados habitualmente, foram um JEOL JSM 35C e um JSM 6301F (Jeol, Ltd., Japão), com uma aceleração de voltagem de 25 kV e 15kV, respectivamente. Estes aparelhos estão conectados a uma sonda de microanálise de raios X, detectora da energia de dispersão dos electrões (EDS) (Noran Intruments, Inc., EUA), acoplada a um computador com programa de análise de espectros Voyager (Noran Intruments, Inc., EUA).

Conforme se referiu anteriormente, este espectrómetro de dispersão de energias baseia o seu funcionamento em detectores que geram um impulso de corrente no circuito exterior, por cada fotão de raios X absorvido, em resultado da carga eléctrica gerada pela ionização do meio sensor. A amplitude do impulso da corrente é proporcional à energia do fotão absorvido, apresentando uma dispersão estatística determinada pelo ruído do sistema e pelo processo físico de base [230]. O espectrómetro analisa, simultaneamente, todo o espectro de raios X emitido pela amostra, determinando continuamente a energia de cada fotão detectado.

O sistema, controlado por computador, permite a visualização e registo, em tempo real, do espectro global da análise em curso e o seu processamento imediato (Fig.1). O computador de controlo permite, ainda, o exame detalhado do espectro obtido, o seu registo e processamento para análise qualitativa e semiquantitativa [230].

A identificação das riscas características dos iões é realizada tendo como referência uma base de dados, com o apoio do sistema informático associado ao espectrómetro de raios X. Neste caso, trata-se de um programa de análise de espectros Voyager. Deste modo, é possível identificar os elementos presentes nas amostras, por análise global ou pontual, determinando os elementos que constituem cada uma das fases e avaliar a respectiva concentração relativa. Deve ter-se em atenção o ponto de análise nas amostras, principalmente na proximidade da superfície dos materiais, por poderem existir interferências dos componentes do material no espectro recolhido (Fig. 2).

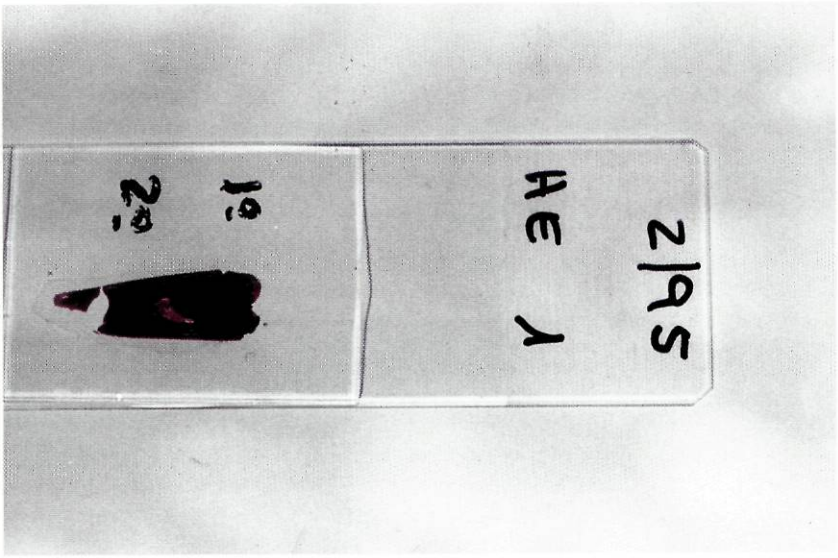


Fig. 11– **Exemplar de uma lâmina preparada para observação por microscopia óptica.**

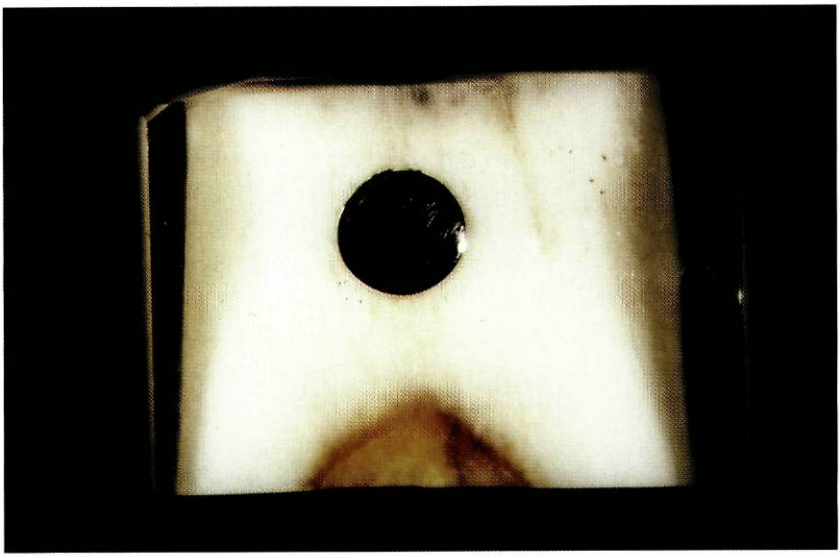


Fig. 12– **Bloco de osso com pino metálico, polido e preparado para ser observado através de microscopia electrónica de varrimento.**

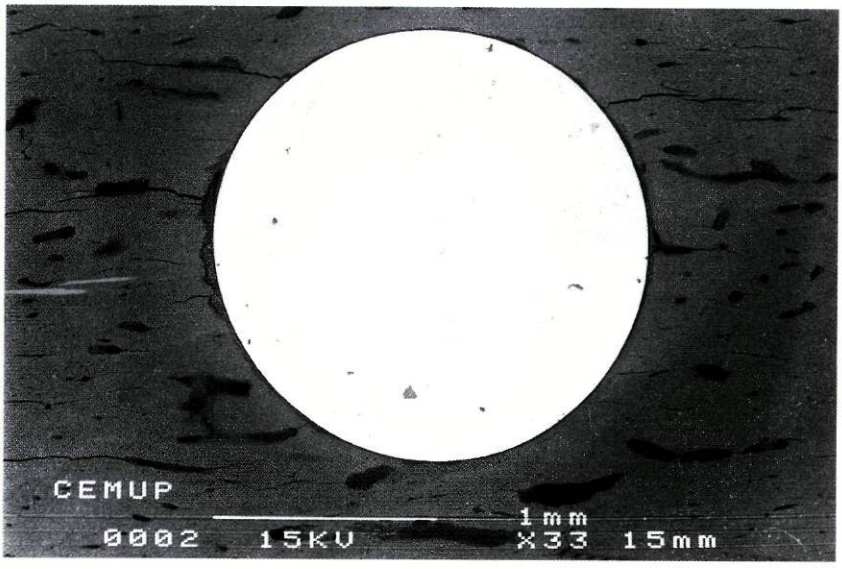


Fig. 13 – **Fotografia obtida por microscopia electrónica de varrimento, onde se visualiza todo o perímetro de um implante de aço inox. Foram utilizadas imagens deste tipo para as determinações histomorfométricas. (MEV – Electrões Retrodifundidos).**

Para a observação das estruturas das amostras, utilizaram-se imagens obtidas por electrões secundários, em pequenas e grandes ampliações (30 a 30.000 X). Quando foi necessário diferenciar os distintos tecidos depositados na interface, através da sua densidade e do seu número atómico, recorreu-se à função de electrões retrodifundidos, embora com menores ampliações (30 a 500 X).

A utilização deste tipo de imagens (electrões retrodifundidos) é bastante usual na investigação do comportamento biológico dos biomateriais, porque permite estabelecer uma relação directa entre a densidade e o conteúdo mineral dos tecidos observados [242, 243].

A distribuição das cores, de cinza até ao preto, permite estabelecer um paralelo entre as imagens obtidas por esta técnica e as imagens das microradiografias convencionais do tecido ósseo. Esta metodologia de análise é de importância primordial quando se estudam biomateriais implantados no tecido ósseo [242, 243]. A importância da correlação entre as observações histológicas e as radiografias de tecido ósseo com implantes está documentada na literatura [57].

2.4.4. Histomorfometria

A quantificação da resposta tecidular na zona da interface, isto é, a determinação da percentagem do contacto ósseo entre os materiais e o tecido ósseo, foi realizada a partir de cortes histológicos contendo os materiais implantados. Estas amostras foram observadas e fotografadas utilizando microscopia electrónica de varrimento, em baixas ampliações, para permitir visualizar adequadamente todo o perímetro do implante.

Existem alguns estudos que referem variações estatisticamente significativas entre a percentagem de contacto ósseo e a espessura das secções das amostras que são montadas nas lâminas para observação histológica [96, 244].

Foi difícil obter cortes de espessura inferior a 50 μm para as amostras que continham os pinos metálicos, o que levou à opção pela realização das determinações histomorfométricas em fotografias de microscopia electrónica de varrimento com electrões retrodifundidos, que permitiram determinar mais exactamente quais os tecidos que estão ou não mineralizados [242, 243]. Esta metodologia já foi aplicada por outros autores [178, 189].

As fotografias foram ampliadas para as dimensões de 20x15 cm para se poder estabelecer, correctamente, a distinção entre as áreas onde existe contacto directo entre o material e o tecido ósseo e as outras zonas, onde tal contacto é feito por tecido fibroso ou conjuntivo não mineralizado.

Utilizando um curvímetro, mediu-se nas fotografias, inicialmente o perímetro total do implante e, depois, o perímetro de contacto directo com o tecido ósseo. Para todos os materiais calculou-se o perímetro total do implante, o valor da superfície em contacto com o tecido ósseo e o da superfície em contacto com o tecido não mineralizado. A selecção do implante a medir foi feita tendo em consideração que é necessário que toda a superfície do material seja nítida na fotografia (Fig. 13). Por isso, entre as amostras observadas para cada coelho com os diferentes tempos de implantação, escolheu-se a imagem com melhor definição.

Todas as medições foram realizadas por forma a garantir que, em caso de dúvida, seria considerado como contacto com tecido não mineralizado todo aquele em que não houvesse a certeza absoluta de se tratar de tecido ósseo mineralizado. Determinou-se, finalmente, a percentagem de contacto ósseo, segundo a fórmula seguinte:

% de contacto ósseo = perímetro de contacto ósseo/perímetro total do implante x 100%

Calculou-se a média (***m***) e o desvio-padrão (***d.p.***) dos valores obtidos para cada conjunto de amostras, contendo o mesmo material e durante igual período de duração do ensaio.

Neste método manual podem ocorrer erros nas várias fases da execução, por exemplo, durante o desenho, a medição e a interpretação dos valores. No sentido de minimizar a ocorrência de possíveis erros, seguiu-se uma metodologia de análise de erro, recomendada por Quirynen e col. [245] e aplicada por Schepers e col. [246].

O cálculo da análise de erro incluiu os seguintes aspectos:

1. Os erros durante a fase de desenho foram calculados em seis fotografias, desenhando e medindo as linhas do perímetro da mesma amostra. Para minimizar os erros de interpretação e de medição com o curvímetro, foi escolhido um implante que apresentasse grande nitidez e contraste entre a parte em contacto com o tecido ósseo e a parte em contacto com o tecido não mineralizado.
2. Todo o procedimento foi realizado pelo mesmo operador. Para determinar a calibragem intra-examinador, foram desenhadas linhas do perímetro do implante e medidas através do curvímetro em seis duplicações de uma fotografia original, durante seis vezes, com um intervalo de uma semana entre as medições.

2.4.4.1. Análise Estatística

Antes de se proceder à análise estatística dos resultados da percentagem de contacto ósseo dos quatro materiais ensaiados, determinou-se a calibragem intra-examinador através do cálculo do coeficiente de variação (C_v), seguindo a metodologia anteriormente descrita. Este coeficiente, definido como sendo "a razão entre o desvio-padrão e a média aritmética de uma série de valores ou distribuição de frequências" [247], permite identificar a margem de erro intrínseca ao próprio examinador.

A análise estatística foi realizada através da utilização do programa informático Statgraphics, versão 5.01, utilizando o teste Wilcoxon para dados não paramétricos emparelhados. Este tipo de análise tem sido utilizado por outros investigadores no estudo comparativo da percentagem de contacto ósseo [168, 189]. Foi considerado existirem diferenças estatisticamente significativas para valores de $p<0,05$. Os dados são apresentados com a média e o desvio-padrão das determinações das medidas, para os doze coelhos, com 4 e 10 semanas de implantação.

IV

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

1.1. Aço Inox

O espectro da composição química dos pinos de aço inox, obtido por microanálise de raios X (EDS), permitiu a identificação de picos correspondentes à presença de iões de Fe, Cr, Ni, Mo e C (Fig. 14). Este espectro é característico de uma amostra de aço inox 316L (AISI).

A observação da morfologia superficial dos pinos, através de microscopia electrónica de varrimento, mostrou uma superfície relativamente lisa, apresentando algumas cavidades e riscos induzidos durante o processo de maquinagem (Fig. 15).

1.2. Titânio

A figura 16 apresenta um espectro da composição química dos pinos de titânio utilizados neste ensaio. Observou-se apenas a presença do ião de titânio. Não se identificaram vestígios de oxigénio nem de carbono, o que confirma a inexistência de contaminação superficial dos implantes por qualquer material biológico. Tendo os implantes de titânio sido expostos ao meio atmosférico, seria natural a formação de uma camada de óxidos na sua superfície. Tal facto não é passível de identificação, por limitações deste método de análise no que respeita a iões com concentrações muito baixas.

A observação das características morfológicas superficiais destes implantes, realizada por microscopia electrónica de varrimento, permitiu identificar uma superfície irregular. As irregularidades foram produzidas pelo processo de maquinagem dos implantes de titânio, na forma de pinos cilíndricos (Fig. 17).

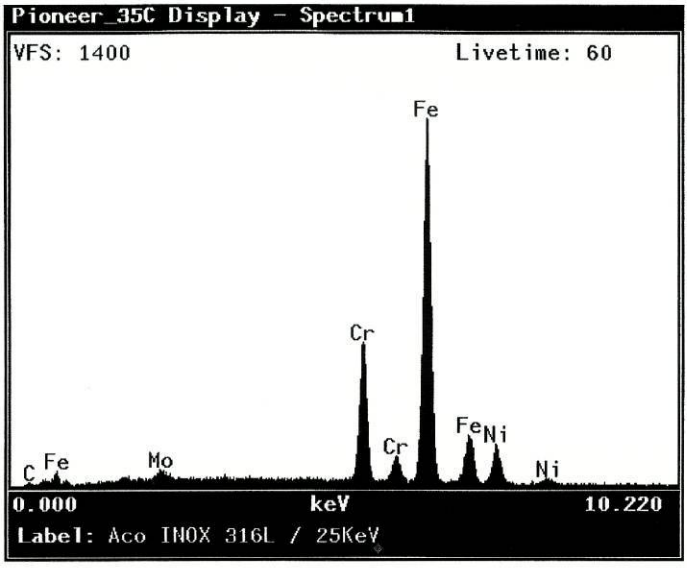


Fig. 14 – **Espectro da composição química de um pino de aço inox 316L. (Microanálise por raios X, EDS)**

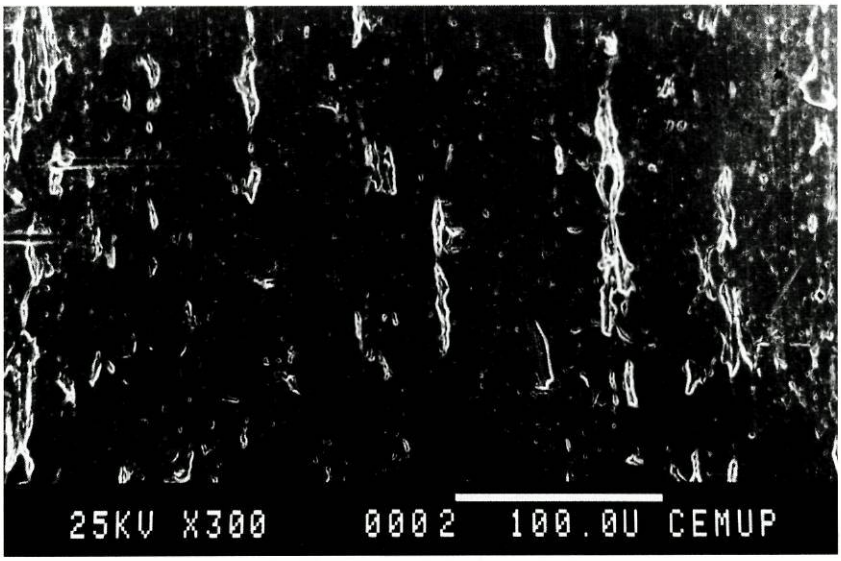


Fig. 15 – **Morfologia superficial de um pino de aço inox 316L, preparado através de um processo de maquinagem. (Microscopia Electrónica de Varrimento – MEV – Electrões Secundários)**

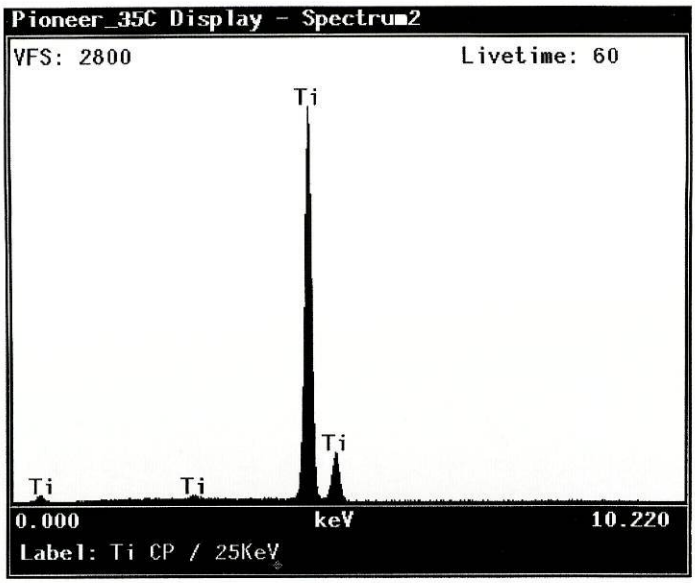


Fig. 16 – **Espectro da composição química de um pino de titânio. (Microanálise por raios X, EDS)**

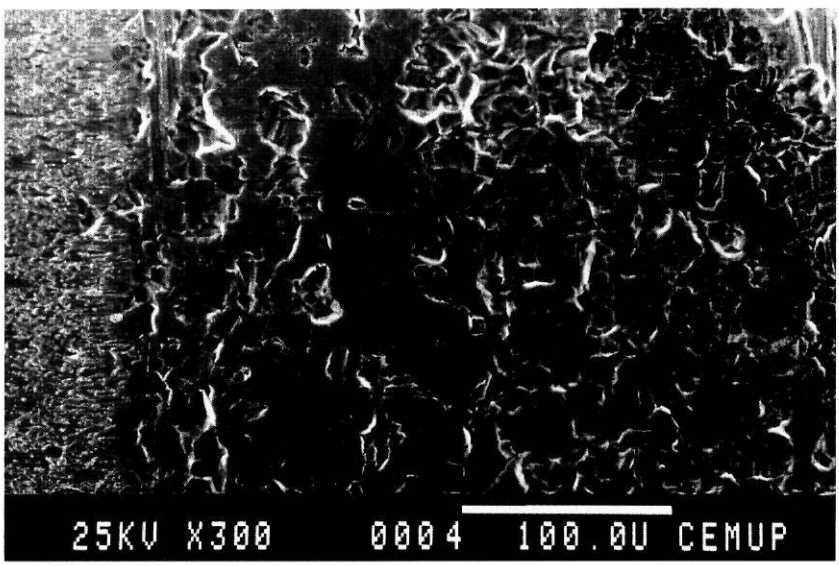


Fig. 17 – **Morfologia superficial de um pino de titânio comercialmente puro, preparado através de um processo de maquinagem. (MEV – Electrões Secundários)**

1.3. Osteopatite®

Os grânulos de Osteopatite® apresentaram uma superfície específica de 0,9 m^2/g e uma densidade de 1,80 g/cm^3. Na forma de partículas têm uma densidade aparente de 1,64 g/cm^3.

Este material, colocado em contacto com uma solução de água destilada desionizada durante a realização dos testes de degradação (0,5 g em 50 cc), provocou um aumento do pH, atingindo o valor de 9,6 após 24 horas. O valor foi obtido após imersão durante 20 minutos. A curva de pH manteve-se estável até às 24 horas.

A perda de pequenas quantidades de iões alcalinos pode beneficiar o comportamento do material após a sua implantação. O aumento da alcalinidade do meio biológico onde os grânulos são implantados pode incrementar a actividade osteoblástica. Esta actividade iónica do material promove um aumento do pH em solução aquosa, apesar da quantidade dissolvida ser muito pequena.

Os resultados da determinação da concentração iónica dos produtos de degradação, 24 horas e 6 dias após a imersão do material [9], apresentam-se na tabela 4.1.

O espectro da composição química de um grânulo de Osteopatite® é apresentado na figura 18. A partir deste espectro pode identificar-se um material rico em cálcio e fósforo, com vestígios de sódio e magnésio.

O aparecimento de iões de carbono e oxigénio deveu-se ao facto do grânulo analisado se encontrar implantado em tecido ósseo, possuindo resíduos de matéria orgânica. A presença de vestígios de cobre teve origem na interferência com o recipiente de fixação das amostras para observação em microscopia electrónica de varrimento.

Tabela 4.1 – **Concentração dos iões libertados pela Osteopatite® em solução aquosa (ppm)**

	24 horas	6 dias
Ca^{++}	13,70	22,70
Na^{+}	1,37	2,40
K^{+}	0,28	0,43

A observação da morfologia superficial dos grânulos de Osteopatite® mostrou o aspecto denso e microporoso deste material (Fig. 19).

Um corte de um grânulo permitiu observar a sua micro-estrutura (Fig. 20), onde se identificou a existência de interconexão entre os vários poros, com tamanho médio inferior a 1 μm. A porosidade aberta, obtida por gravimetria, foi de 33,75%. Esta característica de estrutura microporosa permite um contacto dos fluidos orgânicos com a parte interna dos grânulos, incrementando as trocas iónicas entre o material e o meio envolvente.

1.4. Cimento de Vidro Bioactivo

A resistência à compressão do cimento de vidro bioactivo foi de 41 MPa [187].

A dimensão média dos poros, correspondente à maior fracção volumétrica da porosidade, foi de 0,3 μm. Após a imersão em água, verificou-se que esta classe dimensional de poros deixa de ser a mais relevante, havendo um aumento significativo da fracção volumétrica, correspondente aos poros de maior dimensão.

A porosidade aberta determinada por gravimetria foi de 16%. A estrutura porosa permitiu a comunicação entre o interior do cimento e uma solução aquosa em que este se encontre imerso. Este facto foi determinante, condicionando o comportamento do material quando imerso em água ou em meio fisiológico, em virtude da porosidade aberta possibilitar uma troca iónica que envolve toda a secção do material. O cimento demonstrou sofrer modificações rápidas na composição superficial, verificando-se um aumento muito significativo da concentração de cálcio e fósforo, correspondente a fenómenos de dissolução e precipitação. Esta alteração atingiu também o interior do material [229].

A utilização de uma solução de plasma sintético em vez de água provocou a formação de precipitados de fosfato de cálcio sobre a superfície das amostras, alterando o processo de transformação do material. A rugosidade superficial desapareceu levando a que superfície ficasse isenta de relevos. Os poros de maior dimensão aumentaram consideravelmente de diâmetro. Verificou-se, assim, que as modificações da composição foram acompanhadas de alterações morfológicas muito importantes que se foram acentuando com o tempo de imersão [229].

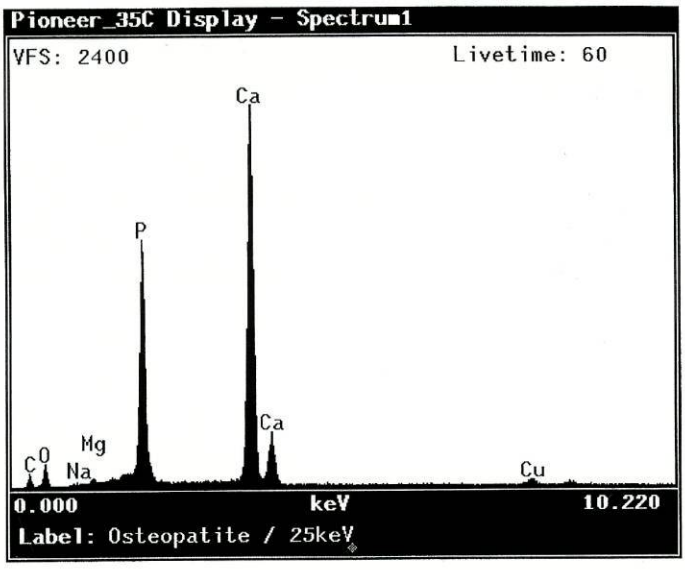


Fig. 18 – **Espectro da composição química de um grânulo de Osteopatite®. (Microanálise por raios X, EDS)**

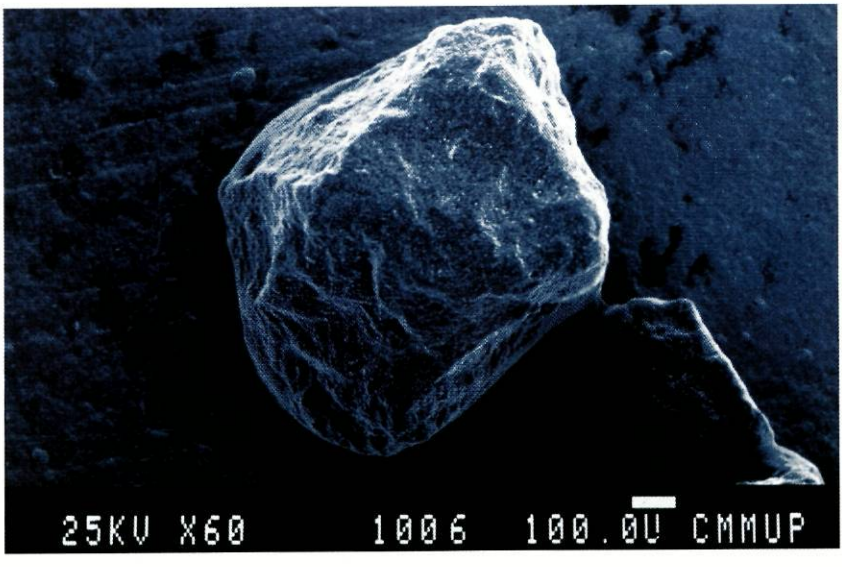


Fig. 19 – **Grânulos de Osteopatite®. Observa-se um aspecto microporoso. (MEV - Electrões Secundários)**

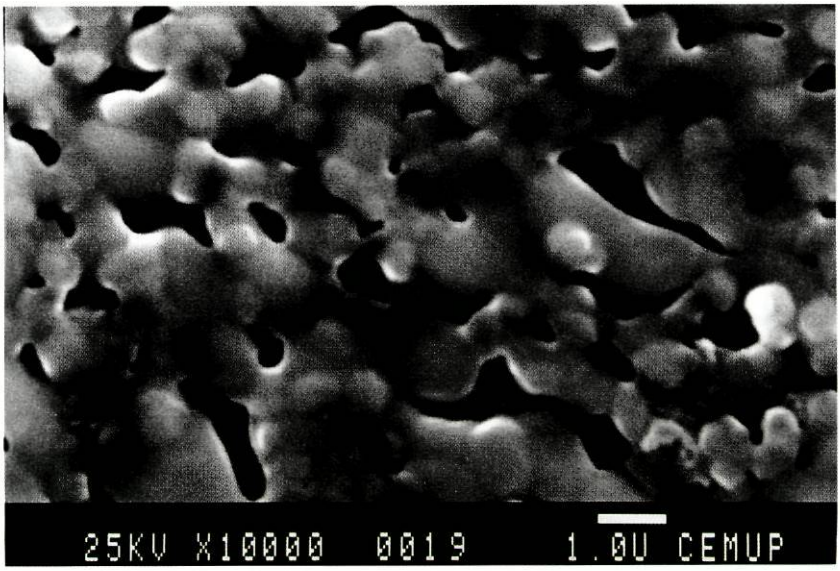


Fig. 20 – **Imagem do corte de um grânulo de Osteopatite®, podendo observar-se a micro-estrutura, a distribuição e a interconexão entre os poros. (MEV - Electrões Secundários)**

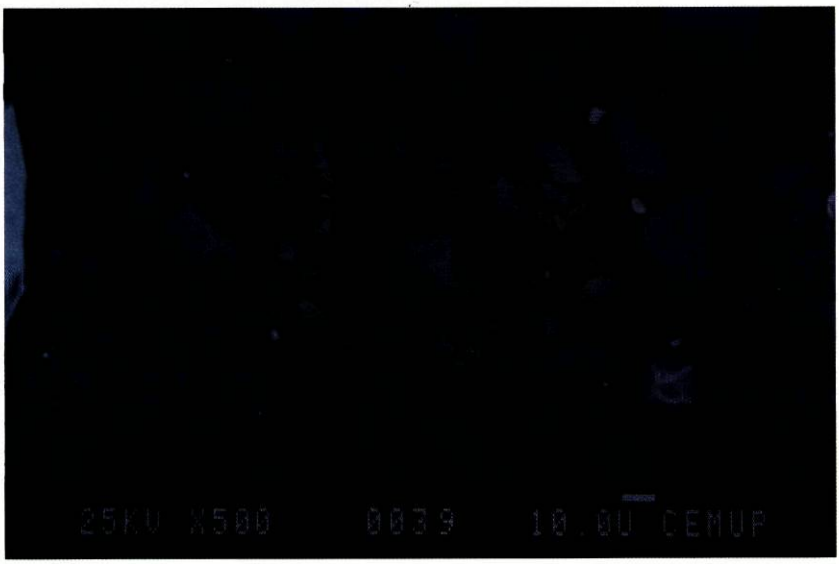


Fig. 21 – **Cimento de vidro bioactivo. Partículas originais de vidro e matriz do cimento resultante da reacção com a solução de fosfato de amónia. (MEV - Electrões Retrodifundidos)**

A determinação da composição química da água após a imersão mostrou uma reduzida solubilidade dos iões de fósforo e cálcio, com estabilização do processo de dissolução ao fim de 24 horas [227].

Em face dos resultados obtidos nos testes de degradação em água e em meio fisiológico verificou-se que, quando o cimento de vidro bioactivo é imerso em água, havia uma dissolução de zonas morfológicas preferenciais, picos, arestas e poros de maior dimensão, acompanhada de precipitação na superfície restante. Em meio fisiológico, as alterações sofridas foram bastante distintas, devido à formação rápida de precipitados de apatite sobre a superfície [227].

O cimento de vidro bioactivo observado por microscopia electrónica de varrimento, após ter sido misturado na forma de pasta, apresentou um aspecto heterogéneo, observando-se vários cristais de vidro original envolvidos por uma matriz rica em cálcio e fosfatos, com tamanhos variando entre 10 e 50 μm (Fig. 21).

A reacção entre o pó de vidro e a solução de fosfato de amónia transformou a pasta fluida num cimento sólido. O produto desta reacção foi um fosfato de cálcio amoníaco cristalino.

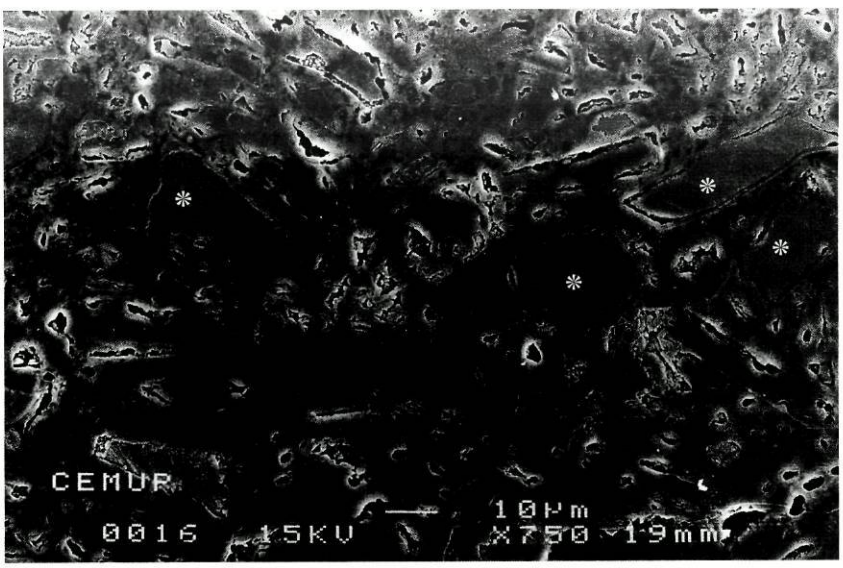


Fig. 22 – **Cimento de vidro bioactivo. Imagem da microestrutura após solidificação e corte do material. Evidenciam-se as partículas de vidro original (*), com diferentes tamanhos, rodeadas pela matriz do cimento. (MEV - Electrões Secundários)**

Nem todas as partículas do vidro reagiram com a solução, podendo detectar-se as partículas originais na matriz do cimento (Fig. 22).

O tratamento térmico do material, o uso de partículas com diferentes tamanhos e a mudança da relação entre o líquido e o sólido podem modificar o comportamento do cimento. Quando as partículas são tratadas pelo calor, a temperaturas superiores a 500 °C, durante 30 minutos, a estrutura inicial amorfa do vidro modifica-se através da precipitação de uma fase cristalina. Esta fase é mais estável do que a estrutura original arrefecida, tornando-se a reacção mais lenta [187].

O tempo necessário para transformar um líquido viscoso em pasta é denominado "tempo de plasticidade". O tempo de presa inicial é o tempo necessário para suportar a primeira agulha de Gilmore sem qualquer marca visível no cimento [163].

Na figura 23, observa-se a representação gráfica da variação do tempo de plasticidade e do tempo de presa inicial do cimento de vidro utilizado neste ensaio, em função do tamanho das partículas.

A grande variação na superfície específica das partículas pode explicar os tempos obtidos na reacção. Alterando a relação entre as quantidades de pó e de líquido usadas na preparação da pasta podem obter-se grandes diferenças no tempo de plasticidade. Usando-se partículas com tamanho médio de 2,3 μm e modificando-se a relação entre o pó e o líquido de 2 para 1, aumen-

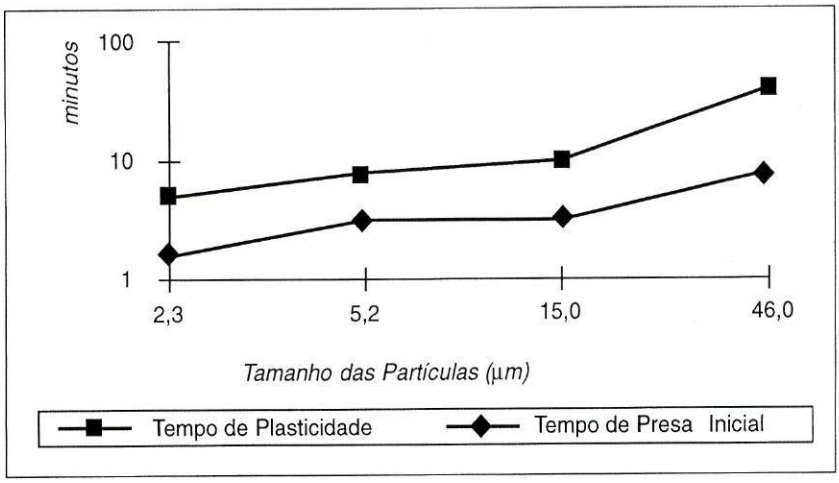


Fig. 23 – **Influência do tamanho das partículas nos tempos de plasticidade e de presa inicial do cimento de vidro bioactivo.**

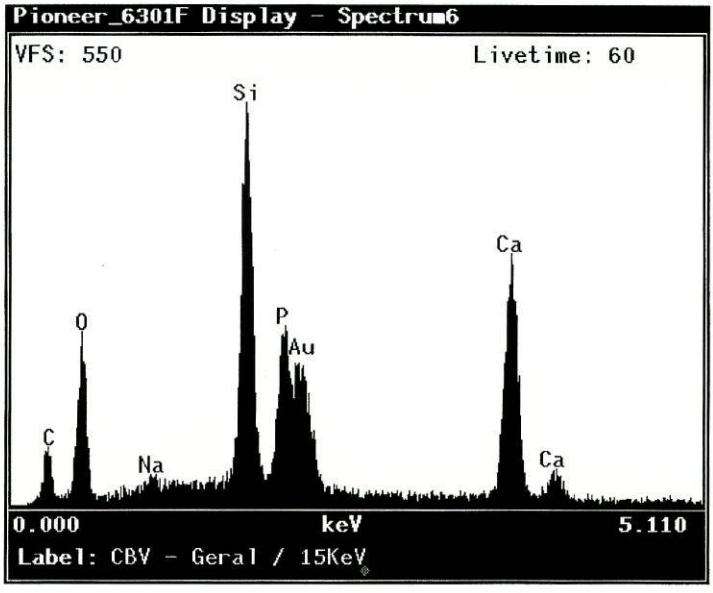


Fig. 24 – **Espectro da composição química do cimento de vidro bioactivo. (Micro-análise por raios X, EDS)**

ta-se o tempo necessário para consumir a solução de fosfato, e o tempo de plasticidade pode ser aumentado de 1,5 para 8 minutos.

A utilização deste biomaterial na forma de pasta, que endurece ao fim de poucos minutos, revelou-se ideal, pela facilidade de manipulação e colocação no defeito ósseo criado.

O espectro da composição química do cimento de vidro bioactivo, após solidificação, foi obtido através de micro-análise por raios X (EDS) de uma amostra do material implantado (Fig. 24).

Os picos do espectro mostraram a existência de um alto conteúdo de silício, cálcio e fósforo, encontrando-se vestígios de sódio. A presença de oxigénio e carbono foi motivada pela existência de componentes orgânicos no material.

2. CIRURGIA EXPERIMENTAL

Todos os animais incluídos no estudo recuperaram rapidamente o seu estado normal, 2 a 3 horas após a intervenção cirúrgica, mantendo-se saudá-

veis durante todo o ensaio experimental. No período pós-operatório e na altura do sacrifício, nenhum dos animais apresentou qualquer reacção adversa, não sendo evidentes quaisquer sinais de inflamação, infecção ou qualquer outro tipo de reacção tecidular anormal que envolvesse os tecidos no local de implantação.

Na face externa do osso cortical, a generalidade dos materiais apresentou-se totalmente coberta por uma camada de tecido ósseo, sendo bastante difícil a identificação do local da intervenção 10 semanas após a implantação. Verificou-se, também, um aumento significativo de peso, cerca de 0,5 kg, desde a data da intervenção até ao sacrifício, o que evidencia as óptimas condições em que se desenrolou a evolução pós-operatória dos animais e os bons cuidados de tratamento a que foram submetidos.

3. HISTOLOGIA

3.1. Microscopia Óptica

Nas imagens obtidas através da microscopia óptica foi possível observar alguns aspectos comuns a todos os materiais e que foram consequência da intervenção cirúrgica e/ou da própria capacidade intrínseca de regeneração do tecido ósseo.

Um aspecto observado em todas as amostras foi a presença de uma linha ténue de separação entre o tecido ósseo cortical e o osso formado na interface. Esta estrutura corresponde a uma linha de tecido necrótico resultante do trauma induzido durante o corte do tecido ósseo na intervenção cirúrgica.

Esta linha apresenta uma atenuação gradual, através de um processo de remodelação óssea, levando à sua substituição por tecido ósseo normal com o decorrer do tempo, tornando-se menos nítida nas amostras com 10 semanas e estando ausente em algumas delas.

Outro aspecto a evidenciar foi o incremento da formação de tecido ósseo com o tempo. Além de existir maior quantidade de osso regenerado, as características histomorfológicas deste tecido indicam também um estado de maior maturação.

Finalmente, foi constante a presença de grande quantidade de tecido vascular no osso cortical e no osso formado junto da superfície dos materiais. Além de um aumento significativo no número de vasos, é de salientar, também, o seu maior volume. Isto corresponde a uma resposta fisiológica do

tecido ósseo como consequência das maiores necessidades metabólicas inerentes ao processo de reparação deste tecido no local da implantação. Para além destes aspectos comuns a todos os materiais, observaram-se comportamentos particulares para cada material, que iremos seguidamente referir.

3.1.1. Aço Inox

Amostras com 4 semanas após a implantação

A observação, através da microscopia óptica simples, das lâminas contendo amostras de tecido ósseo com pinos de aço inox com 4 semanas de implantação, permitiu evidenciar, na sua generalidade, a formação/remodelação de uma camada de tecido ósseo na zona de interface entre o implante e o osso cortical. Esta camada de tecido ósseo, em fase de maturação, apresentou-se separada da superfície dos pinos pela interposição de tecido fibroso e, nalguns casos, por espaços não preenchidos por qualquer tipo de estrutura orgânica evidenciada pela técnica de preparação histológica utilizada (Fig. 25).

Nas amostras obtidas a partir de um dos coelhos foi notória a existência de um grande espaço entre o material e o osso depositado, preenchido por um tecido não diferenciado. Este facto poderá dever-se a uma falta de adaptação correcta do material ao leito ósseo, podendo induzir micromovimentos no implante e impedindo a regeneração óssea normal.

Na análise histológica do perímetro total dos implantes, em baixas ampliações, verificou-se a ausência de contacto directo entre o osso formado e a superfície dos pinos, a não ser um locais pontuais (Fig. 25). A ausência de contacto directo entre os tecidos envolventes e os pinos do aço inox, com a consequente falta de ligação física entre as duas estruturas, levou à remoção espontânea de dois pinos durante a preparação histológica das amostras para microscopia óptica.

A figura 26 exemplifica uma imagem de uma amostra onde se verificou a perda do pino metálico durante o processo de preparação das amostras, na fase de desgaste das fatias para reduzir a espessura. Confirmou-se a existência de uma camada de tecido ósseo neoformado, próximo da interface com o material. Este tecido apresentou características de osso imaturo, com a matriz pouco mineralizada e dispersão desorganizada dos osteócitos. Na parte interna, mais próxima do material, identificou-se uma camada fina de tecido fibroso.

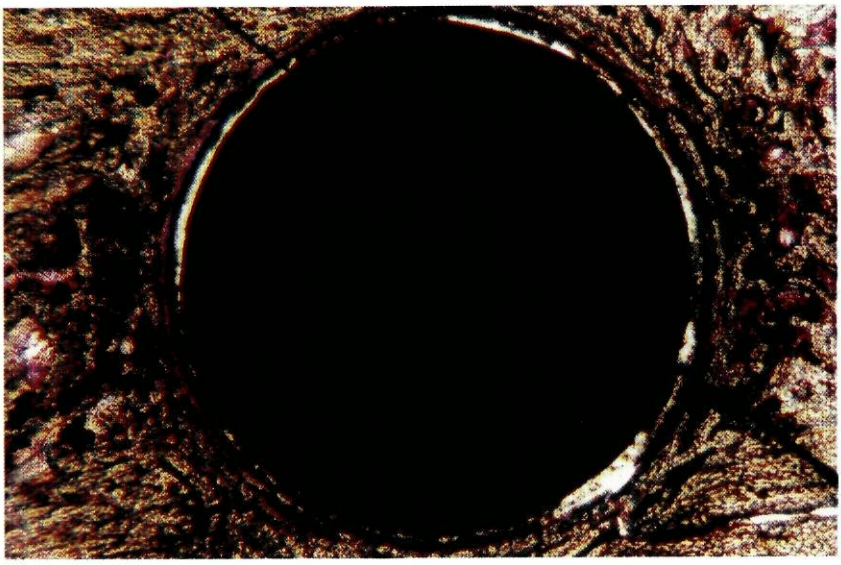


Fig. 25 – **Aço Inox – 4 semanas. Ausência de contacto entre o tecido ósseo neoformado e parte da superfície do pino, existindo uma fenda não preenchida por qualquer tecido. Nalguns pontos, verifica-se a deposição de tecido ósseo na proximidade do material. (M.O., H+E – 30 X)**

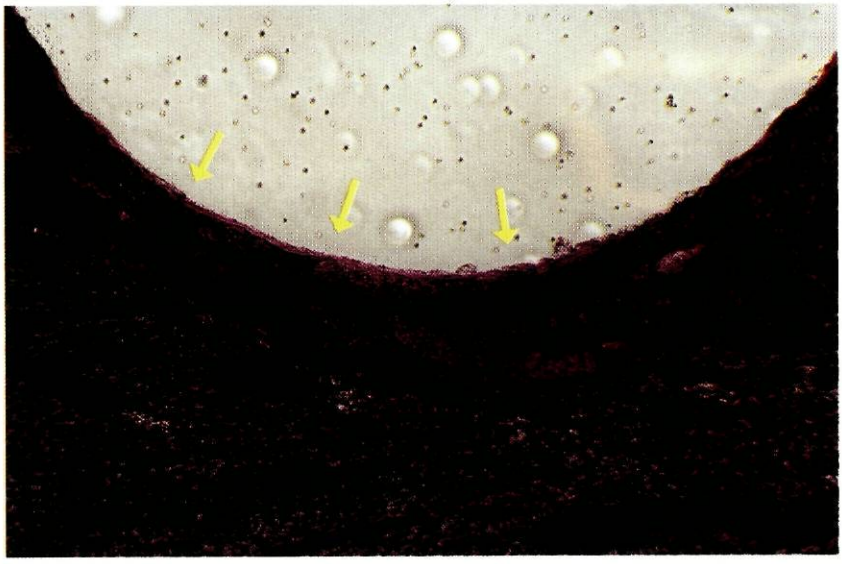


Fig. 26 – **Aço Inox – 4 semanas. Nesta amostra, o material foi removido durante a preparação histológica. Nota-se uma camada de tecido fibroso (setas) que recobre a parte interna do osso depositado junto da interface. (M.O., H+E – 100 X)**

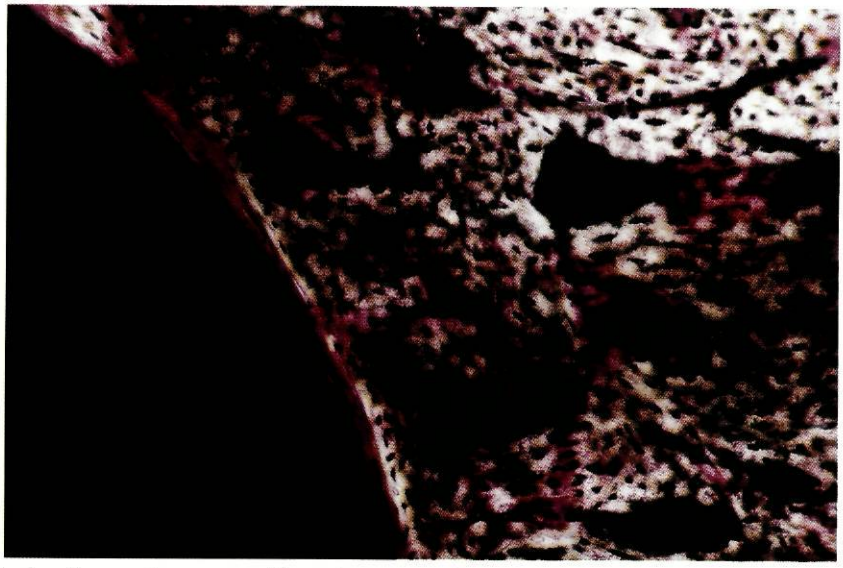


Fig. 27 – Aço Inox – 4 semanas. Nesta imagem, observa-se a presença de uma camada de tecido fibroso, interposta entre o implante e o tecido ósseo neoformado, com orientação circunferencial das fibras. Abundante presença de tecido vascular. (M.O., H+E – 200 X)

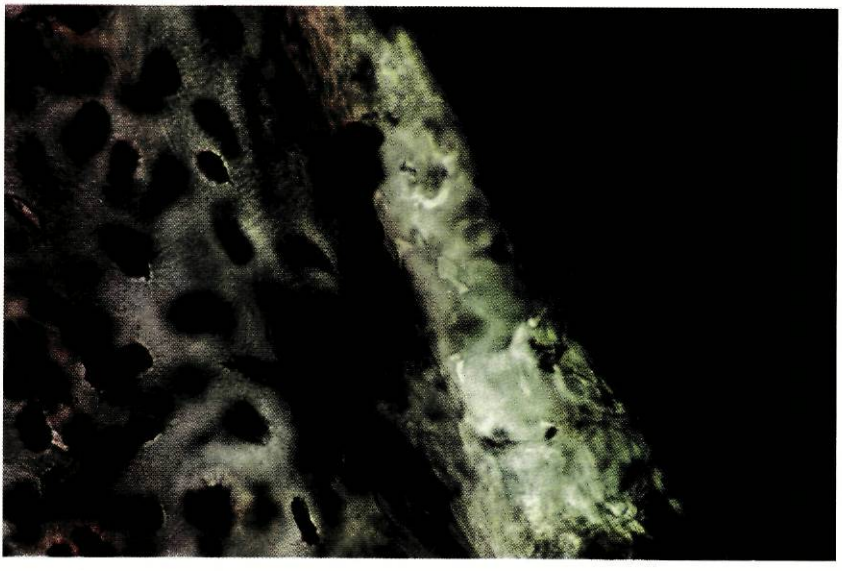


Fig. 28 – Aço Inox – 4 semanas. Pormenor da zona da interface, onde se verifica a presença de tecido fibroso interposto entre o osso e a superfície do material, evidenciando-se a existência de algumas fibras. Osteócitos com morfologia típica. (M.O., H+E – 400 X)

A camada de tecido fibroso apresentou diferenças de espessura entre amostras distintas e, na mesma amostra, em locais diferentes da interface. Esta estrutura foi observada em todas as amostras.

Aumentando a ampliação, verificámos que em algumas zonas da interface esta camada de tecido fibroso possuía um conjunto de feixes de fibras com orientação circunferencial, paralela à superfície do material (Fig. 27). Noutras zonas, esta orientação das fibras não era nítida e identificou-se um tecido conjuntivo, com matriz não mineralizada e feixes de fibras dispersas no seu interior.

A observação pormenorizada da interface confirmou a existência de uma matriz tecidular não mineralizada, contendo vários conjuntos de feixes de fibras dispersos e não organizados, interposta entre a superfície do material e o osso neoformado (Fig. 28). Este tecido ósseo, em fase de maturação, possuía um grau baixo de mineralização e osteócitos, com os prolongamentos citoplasmáticos irradiantes característicos, dispersos pela matriz sem qualquer organização aparente.

Amostras com 10 semanas após a implantação

Um dos aspectos mais significativos observados nestas amostras, foi o aumento da quantidade de tecido ósseo formado/remodelado na zona da interface com os pinos de aço inox. Na generalidade, este tecido não só aumentou de quantidade como o seu estado de maturação se tornou mais evoluído, possuindo uma maior mineralização e osteócitos dispersos pela matriz óssea.

Nalguns locais da interface notou-se uma maior proximidade do tecido ósseo neoformado com a superfície do material. Todavia, observou-se sempre a interposição de uma camada fina de tecido fibroso entre o osso e os pinos (Fig. 29). Esta camada apresentou diferenças de espessura tanto na mesma amostra como entre as várias amostras analisadas.

Em maior ampliação, foi possível caracterizar os dois tipos de estruturas tecidulares presentes na generalidade das amostras. Na maior parte da interface existia tecido fibroso (Fig. 30), embora havendo locais onde se formou tecido ósseo imaturo que apresentava contacto aparentemente directo com o material, na observação por microscopia óptica (Fig. 31). A maioria do tecido formado na zona de interface apresentou características de tecido fibroso. Nalgumas zonas, verificou-se a existência de feixes de fibras com orientação paralela à superfície do implante. Contudo, em muitos casos, este tecido apresentou uma estrutura não diferenciada e de difícil caracterização.

Na figura 30, evidencia-se a presença de um tecido não mineralizado, numa camada próxima da superfície do material, separado do tecido ósseo cortical por uma camada de tecido ósseo imaturo. Enquanto que a linha de interface entre o tecido ósseo imaturo e o tecido não mineralizado é irregular e sinuosa, a transição entre o osso cortical antigo e o osso regenerado é gradual e menos evidente. Os locais onde ocorreu a formação de osso imaturo próximo da interface (Fig. 31) mostraram diferenças significativas entre as características estruturais deste tecido e as do tecido ósseo cortical antigo. O osso neoformado apresentou menor grau de mineralização da matriz e células osteoblásticas, em maior número na proximidade do osso cortical. No osso cortical observou-se o aspecto estrutural característico de um osso haversiano.

A análise mais pormenorizada das estruturas da interface (Fig. 32) permitiu identificar a presença de tecido fibroso interposto entre o osso regenerado e a superfície do material. Nalgumas imagens, foi notória a presença de vários feixes de fibras de tecido fibroso, com orientação paralela à superfície do material. Os osteócitos do osso neoformado apresentavam características morfológicas específicas, com os prolongamentos citoplasmáticos irradiando na direcção dos osteócitos vizinhos, aprisionados na matriz óssea.

A observação das amostras de aço inox permitiu evidenciar que o tempo decorrido (4 a 10 semanas) contribuiu para formação mais extensa de tecido ósseo, aproximando-se da superfície do material. Todavia, manteve-se a presença de uma camada de tecido fibroso, rodeando e envolvendo estes implantes. O tecido ósseo formado próximo da interface apresentou um aumento do conteúdo mineral com o tempo, tornando-se difícil, em alguns casos, estabelecer uma separação nítida entre este tecido e o osso cortical antigo. Nalgumas amostras, foi possível identificar células com histomorfologia compatível com a das células do processo inflamatório.

3.1.2. Titânio

Amostras com 4 semanas após a implantação

Os exemplares histológicos contendo pinos de titânio implantados durante 4 semanas no tecido ósseo cortical da tíbia dos coelhos evidenciaram uma formação abundante de osso imaturo na zona da interface. Este tecido contactava directamente com a superfície dos implantes, rodeando-os numa extensão significativa do seu perímetro (Fig. 33).

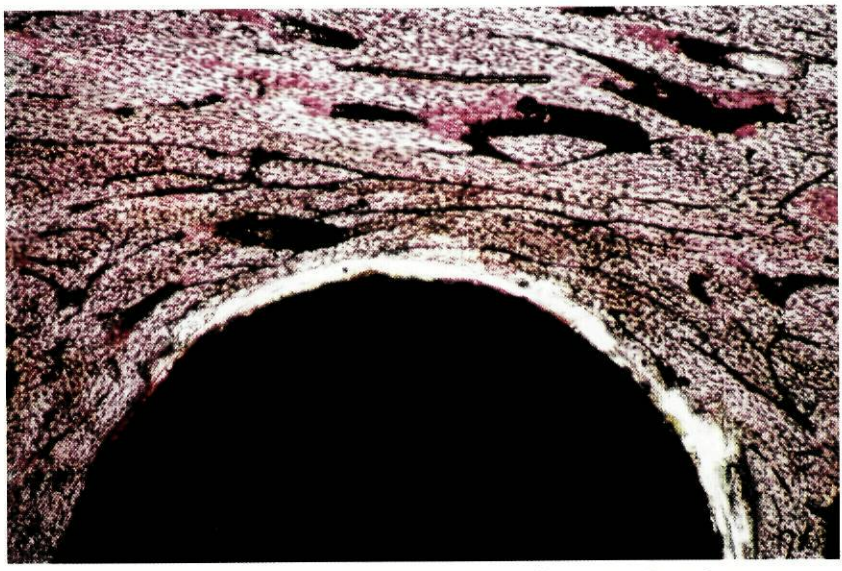


Fig. 29 – Aço Inox – 10 semanas. Camada de tecido fibroso na interface, com espessura variável. Nalguns pontos existe maior proximidade do tecido ósseo neoformado e a superfície do material. (M.O., H+E – 50 X)

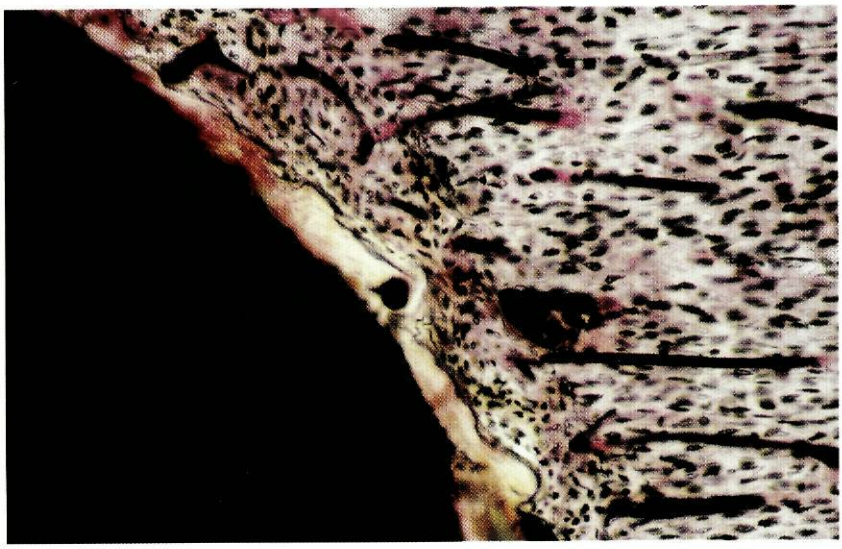


Fig. 30 – Aço Inox – 10 semanas. Repare-se na camada de tecido fibroso, interposta entre a superfície do implante e o osso neoformado. Este tecido ósseo apresenta uma estrutura menos organizada do que a do osso cortical. Note-se a interface irregular entre este tecido e o tecido fibroso. Identificam-se algumas células inflamatórias. (M.O., H+E – 100 X)

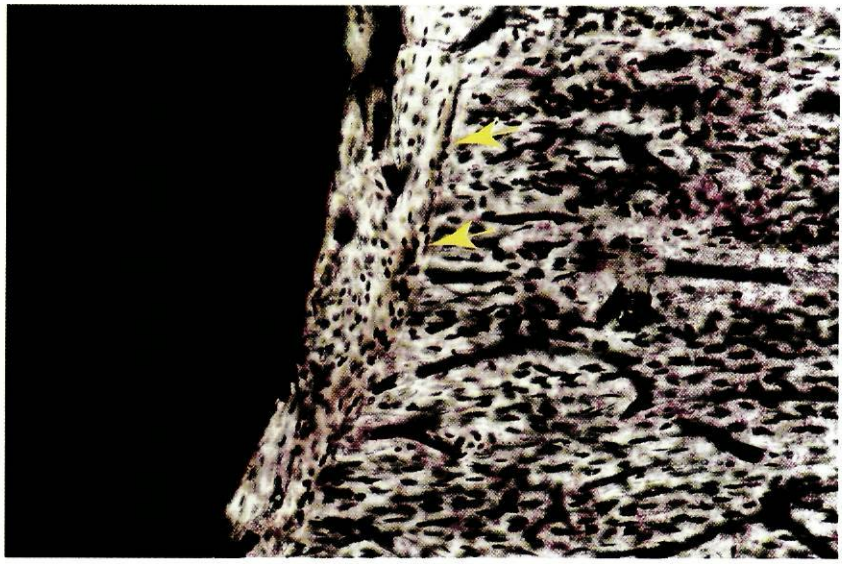


Fig. 31 – Aço Inox – 10 semanas. Nalguns pontos da interface, verifica-se a formação de tecido ósseo imaturo entre o osso cortical e a superfície do implante. É nítida a linha de separação entre este tecido e o osso cortical (setas). (M.O., H+E – 100 X)

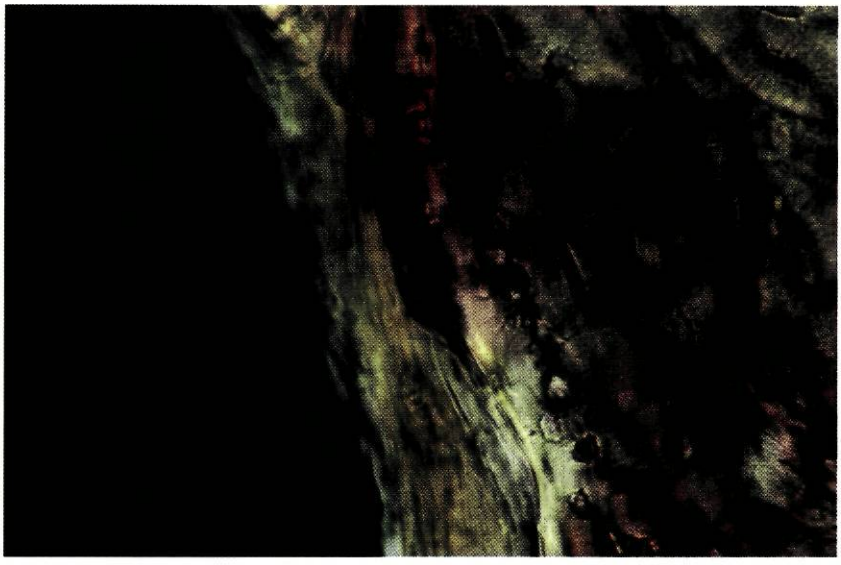


Fig. 32 – Aço Inox – 10 semanas. Maior pormenor da zona da interface, sendo perceptível a existência de uma camada de tecido fibroso, com feixes de fibras paralelas à superfície do implante. Osteócitos com histomorfologia característica. (M.O., H+E – 400 X)

Algumas amostras apresentavam uma linha nítida de separação entre o osso cortical antigo e o osso neoformado. Esta linha de diferenciação entre os dois tecidos evidencia-se por uma coloração mais intensa do osso neoformado, consequência de um menor grau de mineralização e diferenciação estrutural.

Nalgumas amostras observou-se o crescimento de tecido ósseo na cavidade medular ocupada por parte do implante. Este crescimento fez-se a partir do endósseo e revestiu a superfície dos implantes. Na figura 34 pode analisar-se uma imagem representativa das amostras onde se verificou este fenómeno. É perceptível a formação de uma ponte óssea a unir o endósseo ao osso que envolve o implante. As pontes ósseas caracterizavam-se, histomorfologicamente, por possuírem um menor grau de mineralização e diferenciação estrutural.

A análise da interface formada entre o tecido ósseo e a superfície dos pinos de titânio permitiu observar que a generalidade do perímetro dos implantes estava em contacto directo com o osso, embora fossem evidentes algumas zonas onde esse contacto não se verificava. Neste caso, era notória a interposição de tecido conjuntivo não mineralizado ou mesmo a existência de espaços aparentemente vazios. Todavia, é de salientar o facto de em nenhuma amostra se ter identificado qualquer camada de tecido fibroso interposta nesta zona.

A camada de tecido ósseo formada junto da interface com o material era constituída por um tecido imaturo, nitidamente distinto do osso cortical (Fig. 35). Possuía células osteoblásticas, distribuídas de forma desorganizada pela matriz óssea, e um menor grau de mineralização. A observação pormenorizada deste tecido com maiores ampliações evidenciou as características de tecido ósseo imaturo. Foram identificados alguns osteócitos na camada externa e um grau baixo de mineralização e de organização estrutural da matriz óssea neoformada (Fig. 36). Notou-se, ainda, uma linha de separação nítida entre o osso neoformado e o osso cortical antigo.

Amostras com 10 semanas após a implantação

Todas as amostras de titânio com 10 semanas de implantação, quando observadas por microscopia óptica evidenciaram um aumento quantitativo e qualitativo do tecido ósseo formado na interface. O osso neoformado encontrava-se em contacto directo com a superfície dos implantes, havendo uma diminuição das zonas da interface, constituídas por tecido conjuntivo não mineralizado (Fig. 37).

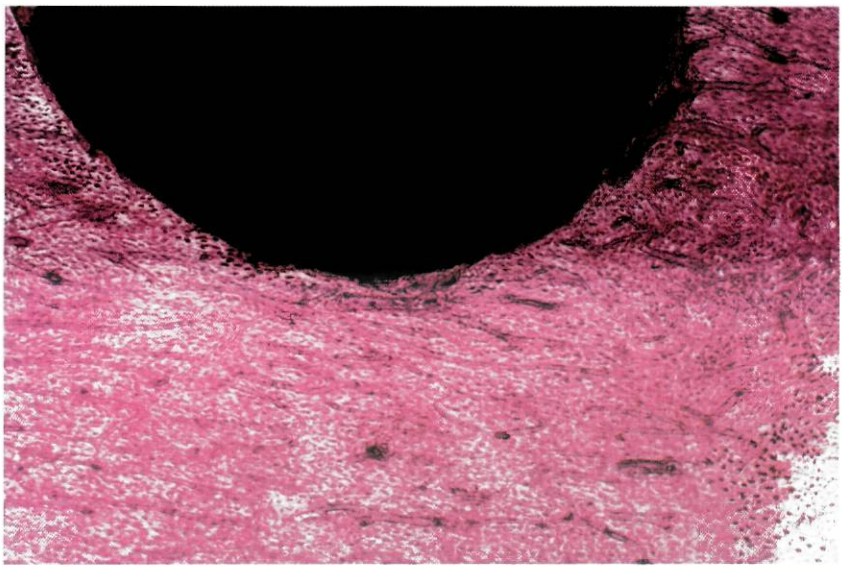


Fig. 33 – **Titânio – 4 semanas. Observa-se a formação de tecido ósseo imaturo na zona da interface. Nota-se menor grau de mineralização do tecido neoformado, comparativamente ao osso cortical. (M.O., H+E – 50 X)**

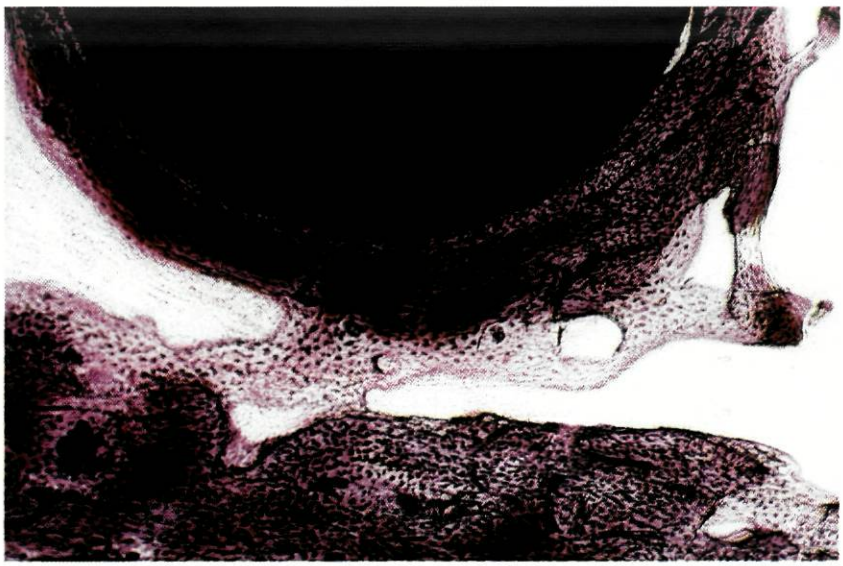


Fig. 34 – **Titânio – 4 semanas. Formação de uma ponte de osso neoformado entre o endósseo e o osso que envolve a superfície do implante colocado na cavidade medular. (M.O., H+E – 50 X)**

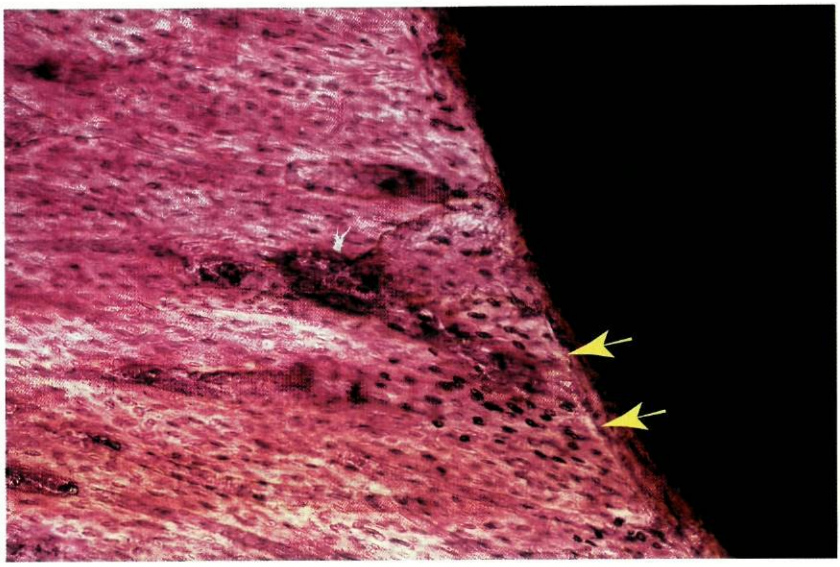


Fig. 35 – **Titânio – 4 semanas. Formação de uma camada de tecido ósseo na interface com a superfície do material. Ausência de interposição de tecido fibroso. O tecido neoformado apresenta menor grau de mineralização e está separado do osso cortical por uma linha ténue (setas). (M.O., H+E – 100 X)**

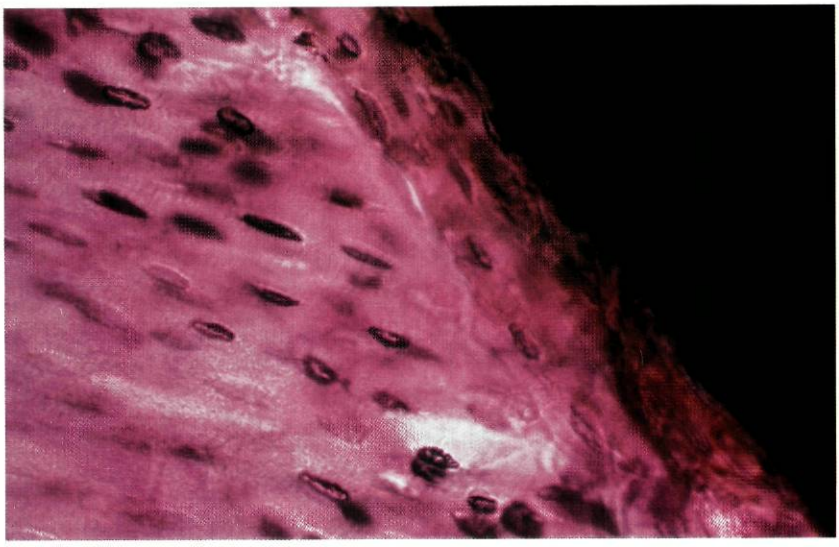


Fig. 36 – **Titânio – 4 semanas. Pormenor da zona da interface. A camada de tecido ósseo neoformado em contacto directo com o implante apresenta algumas células osteoblásticas e uma matriz pouco mineralizada. (M.O., H+E – 400 X)**

O tecido ósseo que envolvia a superfície dos implantes apresentou um estado de maturação mais evoluído. Nalgumas amostras, tornou-se difícil estabelecer a separação entre o osso neoformado e o osso cortical antigo (Fig. 38).

Em maior ampliação, foi evidente um contacto directo entre o tecido ósseo formado na interface e a superfície dos implantes (Fig. 39). O tecido ósseo neoformado caracterizou-se por possuir abundantes osteócitos que se distribuíam pela matriz óssea e que, nalgumas zonas, aparentavam uma distribuição circunferencial à volta dos capilares, característica do sistema haversiano do osso cortical. Na observação mais pormenorizada da zona de interface, em grande ampliação, confirmou-se o bom contacto do tecido com a superfície do material, com ausência de interposição de qualquer tipo de tecido fibroso (Fig. 40). Identificaram-se os osteócitos, distribuídos desorganizadamente pela matriz, estando alguns em contacto próximo com a superfície do material.

Uma das maiores limitações na análise destes exemplares deveu-se à precária definição das imagens, comprometida pela excessiva espessura dos cortes realizados durante a preparação histológica (50 a 70 μm). Este facto foi determinante no aparecimento de uma sobreposição de campos nos diferentes planos de focagem do microscópio, o que perturbou as observações. A sobreposição de células e outras estruturas orgânicas limitou seriamente a correcta caracterização destas estruturas.

3.1.3. Osteopatite®

Amostras com 4 semanas após a implantação

Os resultados histológicos obtidos a partir das amostras contendo este material permitiram constatar uma abundante e extensa regeneração de tecido ósseo, preenchendo a quase totalidade dos espaços existentes entre os grânulos. Este tecido, ainda numa fase inicial de maturação, formou-se tanto na zona cortical como na cavidade medular da tíbia (Fig. 41).

Em todas as amostras observadas, verificou-se um crescimento acentuado de osso imaturo ou primário a partir das paredes do defeito ósseo criado, invadindo e preenchendo os espaços entre os grânulos e prolongando-se para os grânulos localizados na cavidade medular.

O tecido neoformado apresentou diferenças evidentes, a nível ultraestrutural, quanto à localização dos grânulos. O osso que preencheu os espaços entre os grânulos com localização cortical apresentou um grau de

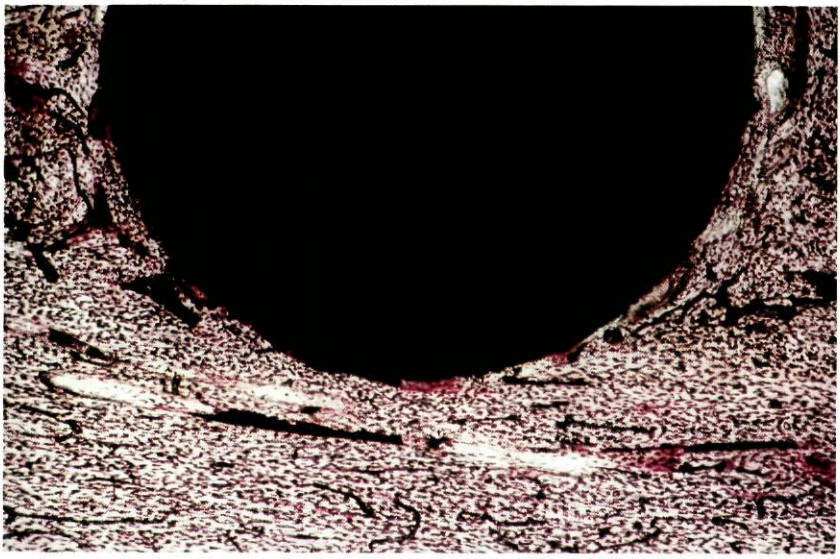


Fig. 37 – **Titânio – 10 semanas. Formação de tecido ósseo na interface com o implante. Verifica-se um contacto directo, nalguns pontos. O estado de maturação deste tecido é mais evoluído. (M.O., H+E – 50 X)**

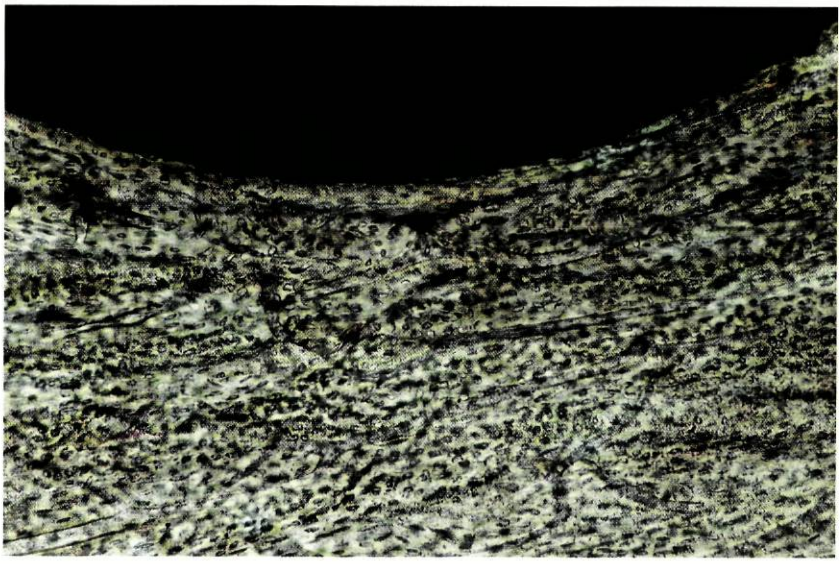


Fig. 38 – **Titânio – 10 semanas. Maior maturação do tecido ósseo formado junto da interface, apresentando um bom contacto com a superfície do material. (M.O., H+E – 100 X)**

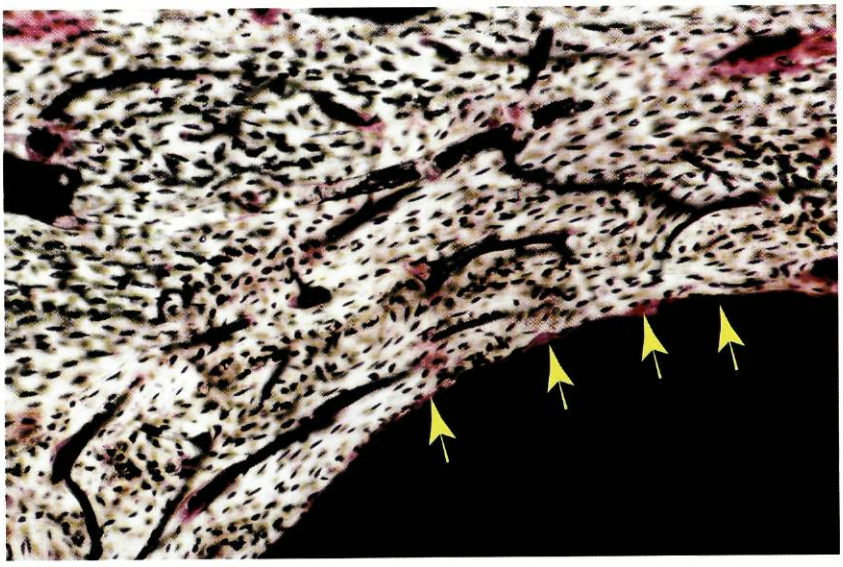


Fig. 39 – **Titânio – 10 semanas. Bom contacto entre o osso neoformado e a superfície do implante. Nalguns pontos o tecido ainda é pouco mineralizado (setas). (M.O., H+E – 200 X)**

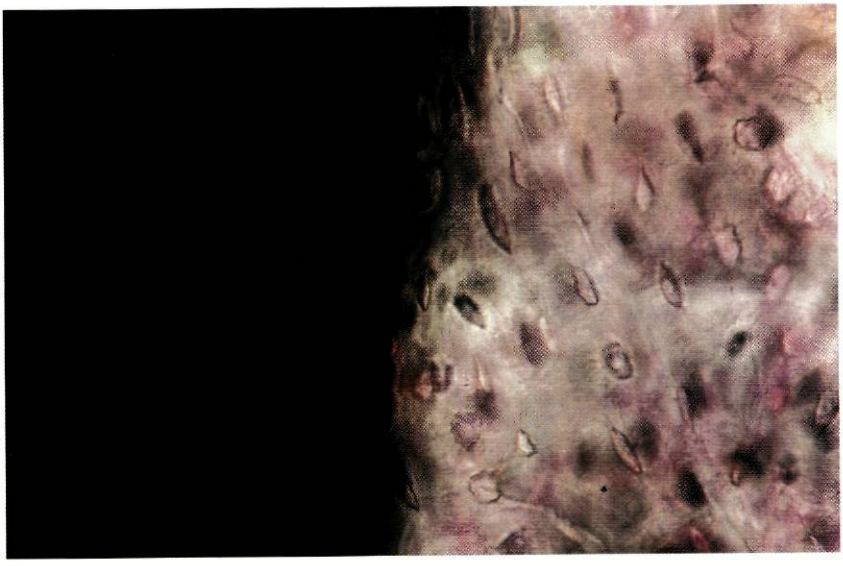


Fig. 40 – **Titânio – 10 semanas. Pormenor da zona da interface. Contacto directo entre a matriz óssea e algumas células osteoblásticas com a superfície do material. (M.O., H+E – 400 X)**

maturação superior ao osso que envolveu os grânulos com localização medular.

Na zona cortical observou-se uma maior quantidade de osso neoformado, envolvendo directamente os grânulos. Este tecido possuía uma matriz mais mineralizada e um número mais elevado de células osteoblásticas do que o osso formado na cavidade medular.

Nalgumas imagens foi nítido o contraste existente entre o osso cortical antigo e o osso neoformado entre os grânulos (Fig. 42). Além de se verificarem diferenças significativas no grau de mineralização, aparecendo o osso cortical antigo com uma coloração mais acastanhada, a organização estrutural também foi bastante distinta. Enquanto que no osso cortical se identificou um padrão típico de sistemas haversianos, com a orientação dos osteócitos em lâminas concêntricas a rodearem os capilares em ósteons bem definidos, no osso neoformado as células apresentaram uma distribuição desorganizada e sem qualquer aparência de orientação.

Um fenómeno sempre presente nestas amostras foi a abundância de vasos de tamanho e número muito superior ao observado no tecido ósseo normal. Tal facto teve origem nas necessidades metabólicas aumentadas do tecido em fase activa de formação/remodelação, consequente ao processo reparador do tecido ósseo.

É de salientar que apesar do osso neoformado apresentar características estruturais nítidas de osso imaturo, possui um grande índice de contacto directo com a superfície dos grânulos. A matriz óssea, projectando-se e crescendo a partir das paredes do defeito ósseo, foi envolvendo todos os grânulos com localização cortical e, mais tarde, os grânulos que se localizavam na cavidade medular. Este padrão de regeneração óssea não é análogo com o que ocorre durante a reparação de fracturas ósseas, em que o osso cresce, nas fases mais precoces, a partir do periósteo e do endósseo, e na zona cortical apenas numa fase mais tardia.

O osso formado entre os grânulos apresentou um baixo grau de mineralização, com matriz mais clara, e um grande número de células osteoblásticas, distribuídas de forma aparentemente desorganizada ao longo da matriz óssea (Fig. 43) . Foi difícil estabelecer uma relação directa entre os osteócitos e os capilares abundantes neste tecido. Estes vasos, além de presentes em número elevado, apresentavam dimensões superiores ao normal, permitindo um aporte rápido e abundante de nutrientes necessários ao intenso metabolismo das células envolvidas no processo reparador.

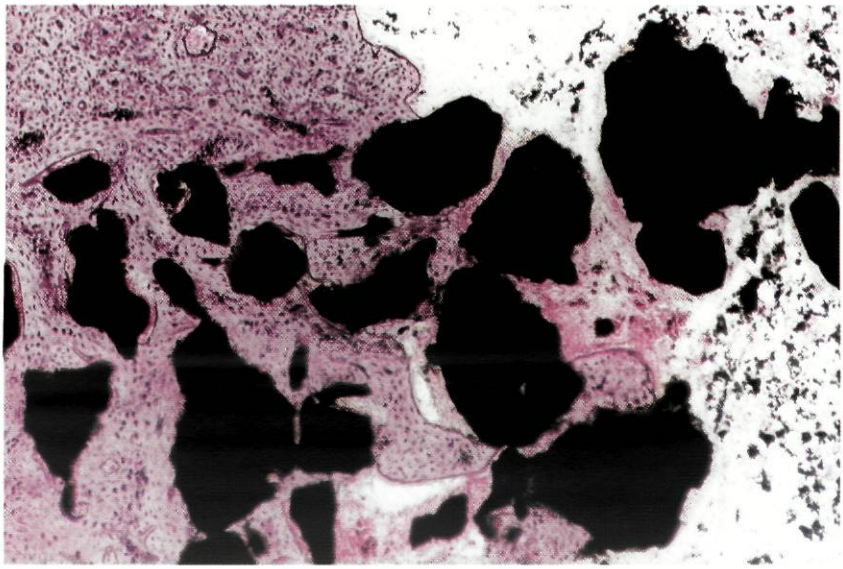


Fig. 41 – **Osteopatite® - 4 semanas. Regeneração óssea, com preenchimento dos espaços existentes entre os grânulos. O crescimento do osso faz-se também para o interior da cavidade medular, rodeando alguns dos grânulos aí localizados. (M.O., H+E – 50 X)**

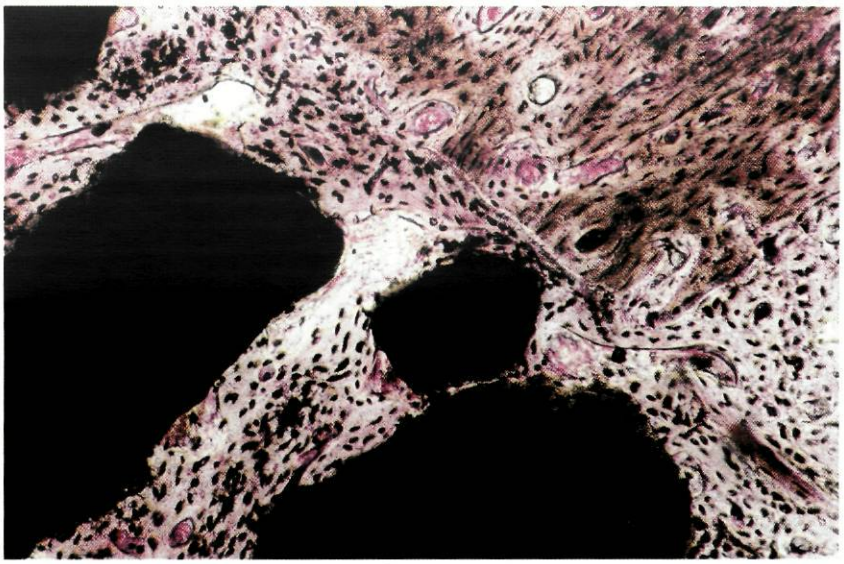


Fig. 42 – **Osteopatite® - 4 semanas. É nítida a diferença estrutural entre o osso cortical antigo e o osso formado entre os grânulos. A linha de separação entre os dois tecidos é muito evidente. A organização estrutural e o grau de mineralização são também bastante distintos. (M.O., H+E – 100 X)**

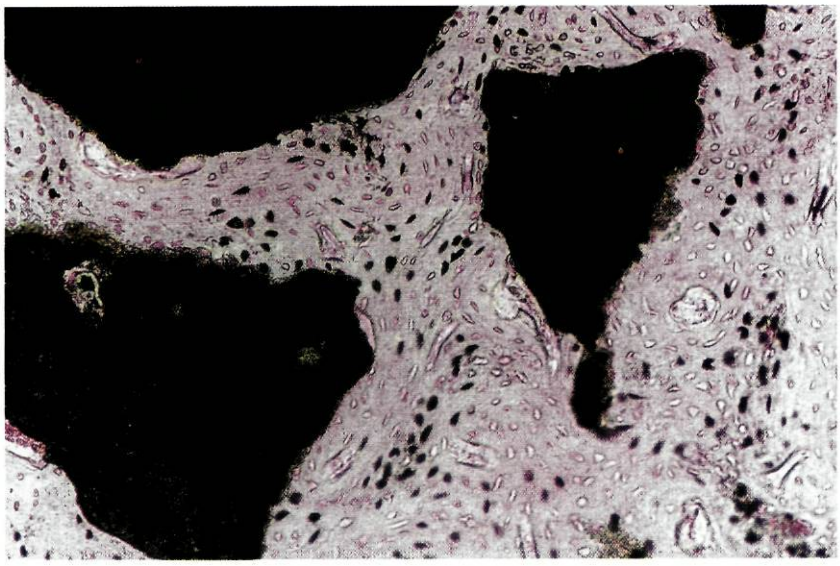


Fig. 43 – Osteopatite® - 4 semanas. Tecido ósseo imaturo depositado entre os grânulos. A matriz é pouco mineralizada, com células osteoblásticas abundantes, distribuídas de forma desorganizada. Vasos abundantes com volume aumentado. Bom contacto entre o tecido formado e os grânulos. (M.O., H+E – 200 X)

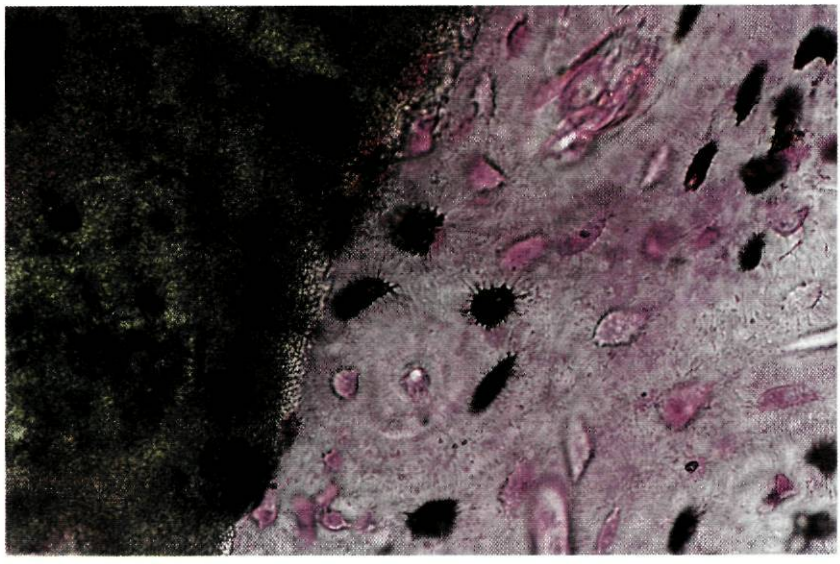


Fig. 44 – Osteopatite® - 4 semanas. Pormenor da zona de interface entre um grânulo e o osso. Bom contacto entre o material e o osso. Observa-se a presença de osteócitos com localização muito próxima do material. (M.O., H+E – 400 X)

A análise pormenorizada das zonas de interface entre o tecido ósseo neoformado e a superfície dos grânulos contribuiu para a confirmação de um contacto directo entre estas estruturas, sem interposição de tecido fibroso (Fig. 44). Todavia, observou-se, nalgumas zonas mais angulosas dos grânulos, um tecido menos mineralizado, distinto do restante tecido ósseo neoformado.

Os osteócitos presentes na matriz óssea apresentaram os prolongamentos citoplasmáticos irradiantes característicos. Algumas das células estavam muito próximas da superfície do material, aparentando um contacto directo com os grânulos.

Amostras com 10 semanas após a implantação

Com o decorrer do ensaio, aumentou a formação de tecido ósseo nos espaços entre os grânulos, envolvendo-os e revestindo-os totalmente, independentemente da sua localização (Fig. 45). Todavia, os grânulos mais distantes, localizados na cavidade medular, apresentavam menos tecido ósseo formado nos espaços entre eles.

O osso neoformado contactava e aderia directamente à superfície da maior parte dos grânulos. Este tecido evidenciou um estado de maturação mais evoluído, relativamente às amostras com 4 semanas, apresentando uma organização estrutural mais próxima da do osso cortical (Fig. 46). De referir o revestimento, por crescimento do periósteo, da superfície dos grânulos com localização mais próxima da superfície externa do osso cortical da tíbia.

O osso neoformado preencheu, na totalidade, os espaços entre os grânulos que se localizavam na parte cortical do osso, assim como na parte mais externa, próxima do periósteo. Na cavidade medular também se verificou crescimento a partir do endósseo, envolvendo os grânulos aí localizados. O tecido ósseo que englobou os grânulos apresentava uma ultraestrutura com maior grau de mineralização e uma fase de organização lamelar mais avançada, comparativamente às amostras com 4 semanas de implantação. Manteve-se grande abundância de tecido vascular, com vasos de calibre bastante aumentado.

Apesar do estado avançado de maturação do tecido ósseo neoformado, ainda foram perceptíveis algumas diferenças estruturais entre este tecido e o osso cortical antigo. Embora as diferenças na mineralização não fossem muito evidentes, no que respeita à organização estrutural existia uma distinção nítida no padrão de orientação e distribuição dos osteócitos. No osso cortical antigo observaram-se sistemas haversianos bem definidos, com a

disposição concêntrica dos osteócitos, rodeando os capilares centrais, enquanto que no osso neoformado a distribuição dos osteócitos era lamelar, sem a formação de ósteons.

Nalgumas amostras foi ainda possível observar uma linha atenuada que separou o osso neoformado do osso cortical antigo. Esta linha foi ainda mais evidenciada pelas diferenças de arranjo estrutural entre os dois tecidos.

A maior maturação do tecido ósseo neoformado foi uma constante em todas as amostras estudadas. Salienta-se, também, o facto de existir um contacto directo e firme entre a superfície dos grânulos e o osso.

A análise mais pormenorizada da zona da interface, com maiores ampliações, permitiu identificar duas estruturas distintas no processo de formação de tecido ósseo nesta zona. Nalgumas amostras (Fig. 47), observou-se uma estrutura óssea lamelar, paralela à superfície do material, bem distinta do osso cortical com os sistemas haversianos característicos. Noutras (Fig. 48), foi possível identificar uma disposição circunferencial dos osteócitos, envolvendo os capilares centrais, num esboço do sistema haversiano característico do osso cortical. Em qualquer dos casos foram abundantes os osteócitos, com características histomorfológicas típicas, distribuídos pela matriz óssea e estando alguns deles muito próximos da superfície do material. Não se observou qualquer interposição de camada tecidular conjuntiva ou fibrosa entre o tecido ósseo e o material, havendo um contacto directo entre as duas estruturas.

3.1.4. Cimento de Vidro Bioactivo

Amostras com 4 semanas após a implantação

As amostras de cimento de vidro bioactivo implantadas durante 4 semanas apresentaram a formação de tecido ósseo imaturo na zona da interface e em contacto directo com a superfície do material. Não se observaram sinais de interposição de qualquer camada de tecido fibroso nem a presença de células de reacção inflamatória. O osso depositado, que envolvia e contactava directamente a superfície do material, apresentou-se numa camada com a espessura aproximada de 250 a 300 μm. Possuía um arranjo estrutural distinto, em função da sua localização (Fig. 49). A camada formada na zona cortical apresentava diferenças em relação ao osso neoformado na superfície externa do material. O tecido ósseo que revestia a superfície externa do material, possuía um aspecto trabecular, com as lamelas ósseas rodeadas por tecido medular, projectando-se a partir dos bordos do periósteo, limítrofes do de-

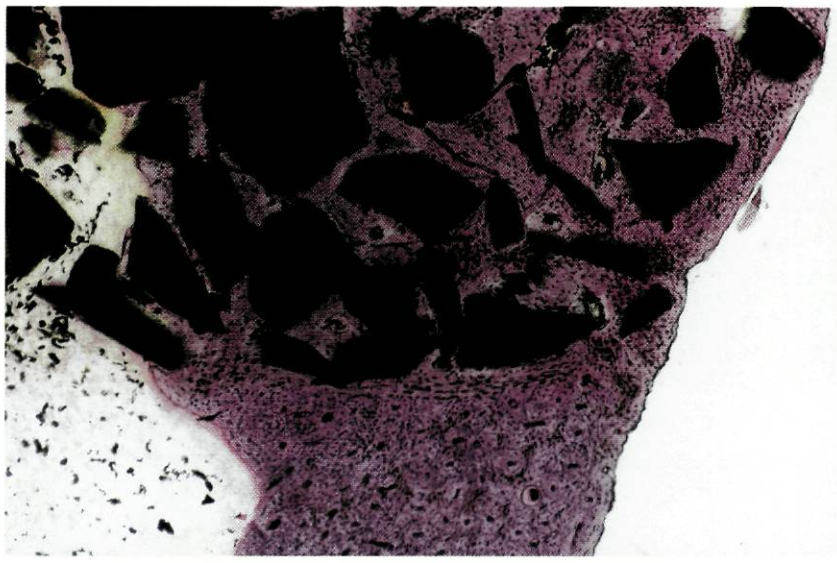


Fig. 45 –**Osteopatite® - 10 semanas. Abundante formação de tecido ósseo no espaço entre os grânulos. O estado de maturação e organização estrutural deste tecido é próximo do apresentado pelo osso cortical. (M.O., H+E – 50 X)**

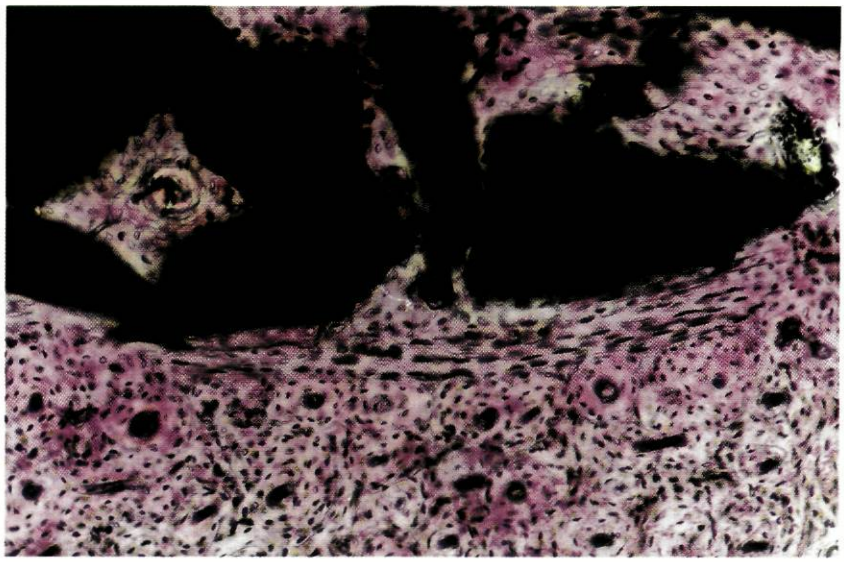


Fig. 46 – **Osteopatite® - 10 semanas. Diferença entre o osso neoformado e o osso cortical antigo. Apesar do estado avançado de organização estrutural, o tecido neoformado ainda não possui ósteons tão bem definidos como os do osso cortical. (M.O., H+E – 100 X)**

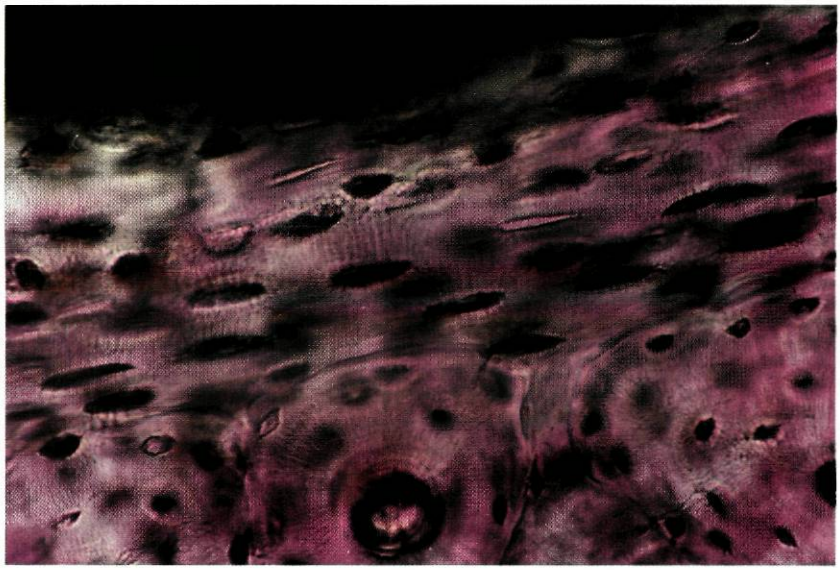


Fig. 47 – **Osteopatite® - 10 semanas. Pormenor de uma zona de interface entre o osso neoformado e o material. Observa-se contacto perfeito entre o tecido e o material. Presença de osteócitos abundantes, orientados de forma lamelar, contrariamente aos sistemas haversianos do osso cortical. (M.O., H+E – 400 X)**

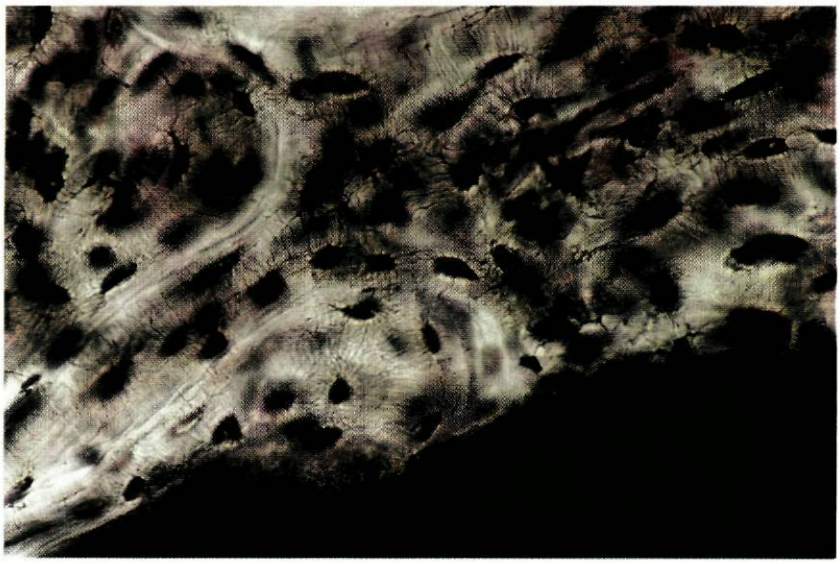


Fig. 48 – **Osteopatite® - 10 semanas. Grande ampliação de uma zona da interface. Fase de orientação concêntrica dos osteócitos em sistema haversiano. Note-se a proximidade dos osteócitos com a superfície do material. (M.O., H+E – 400 X)**

feito ósseo criado. Na zona cortical, o osso formado/remodelado possuía um menor grau de mineralização da matriz e uma distribuição celular mais desorganizada, comparativamente ao osso cortical antigo (Fig. 50). Verificou-se um bom contacto entre este tecido e a superfície do material. Foi evidente a presença de vasos com volume muito aumentado, com localização privilegiada entre o osso cortical antigo e o osso neoformado.

Em maiores ampliações (Fig. 51), é nítido o bom contacto existente entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do material, sem interposição de qualquer tecido conjuntivo fibroso ou não mineralizado. A matriz óssea do tecido neoformado possui grande número de vasos com volume razoável e de células osteoblásticas, aparentemente sem qualquer organização estrutural. A superfície mais externa do material está separada do corpo principal por uma linha mais escura e densa.

Uma ampliação superior permitiu analisar mais detalhadamente a interface entre o material e o osso neoformado (Fig. 52). Identificou-se um contacto directo entre a camada externa do material e o tecido ósseo formado na zona da interface, com delimitação, através de uma linha densa, do núcleo interno do material e a camada mais superficial, a qual possuía um arranjo estrutural diferente do resto do material, correspondendo a fenómenos de degradação superficial do cimento.

Amostras com 10 semanas após a implantação

Nestas amostras verificou-se um recobrimento total da superfície externa do material, com crescimento ósseo a partir do periósteo e formação/ /remodelação óssea na zona cortical. O tecido ósseo neoformado apresentou maior grau de maturação e diferenciação estrutural (Fig. 53). Todas as amostras apresentaram a superfície externa completamente recoberta por tecido ósseo. O osso neoformado prolongou-se a partir do periósteo dos bordos do defeito criado, recobrindo e contactando directamente a superfície externa do material, formando uma camada de tecido ósseo de reparação que recuperou a morfologia do osso tibial (Fig. 53).

O material incluído na zona cortical ficou rodeado por tecido ósseo, contactando directamente a sua superfície e estabelecendo uma boa ligação sem interposição de qualquer tipo de tecido conjuntivo. Este tecido ósseo neoformado/remodelado apresentou características histomorfológicas de maturação que tornaram difícil a sua separação do osso cortical antigo (Fig. 54). A existência de alguns vasos com calibre extremamente aumentado é a evidência de que este tecido ainda se encontra numa fase metabólica activa.

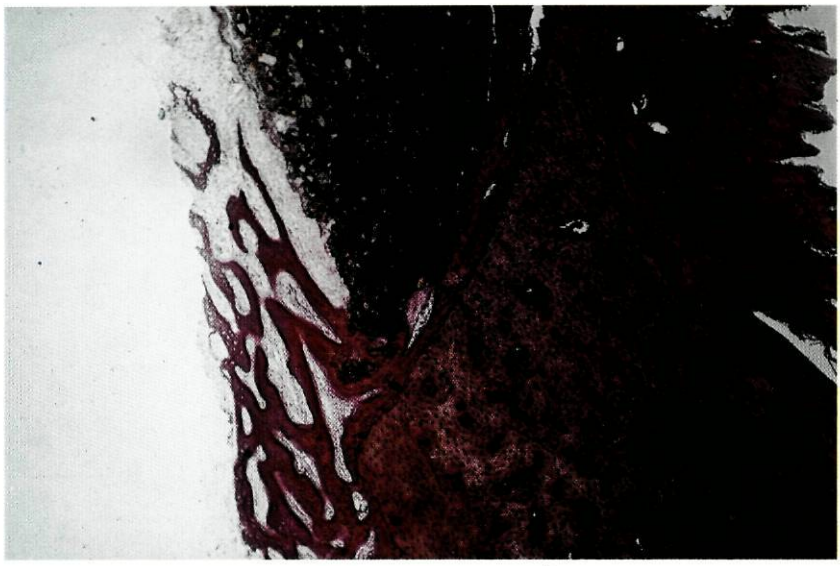


Fig. 49 – Cimento de Vidro Bioactivo – 4 semanas. É nítida a formação de tecido ósseo imaturo na zona de interface com o osso cortical e na superfície externa do cimento, pelo crescimento de trabéculas ósseas a partir do periósteo. (M.O., H+E – 50 X)

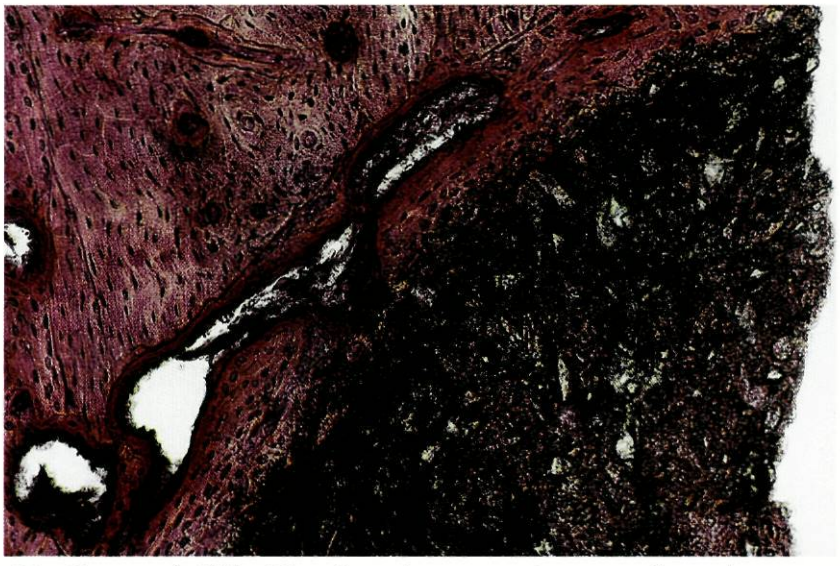


Fig. 50 – Cimento de Vidro Bioactivo – 4 semanas. O osso neoformado na zona de interface encontra-se em contacto directo com a superfície do material. Note-se a presença de grandes vasos na zona de separação entre o osso cortical e o osso neoformado. (M.O., H+E – 100 X)

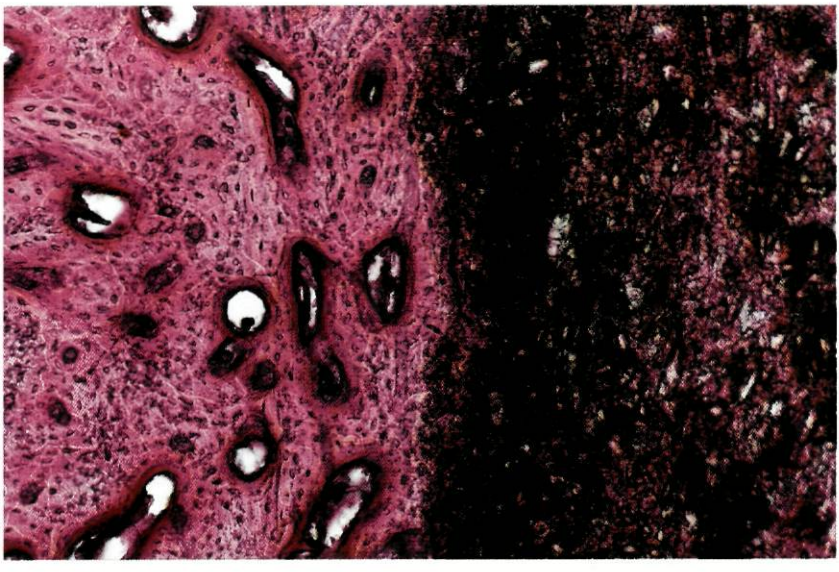


Fig. 51 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 4 semanas. Bom contacto entre o tecido ósseo regenerado junto da interface com o material. Este tecido apresenta uma grande riqueza de vasos. (M.O., H+E – 200 X)**



Fig. 52 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 4 semanas. Pormenor da zona de interface. Identificam-se as células osteoblásticas próximas da superfície do material. O cimento apresenta uma linha mais densa, que separa o corpo principal do material de uma camada externa de degradação. (M.O., H+E – 400 X)**

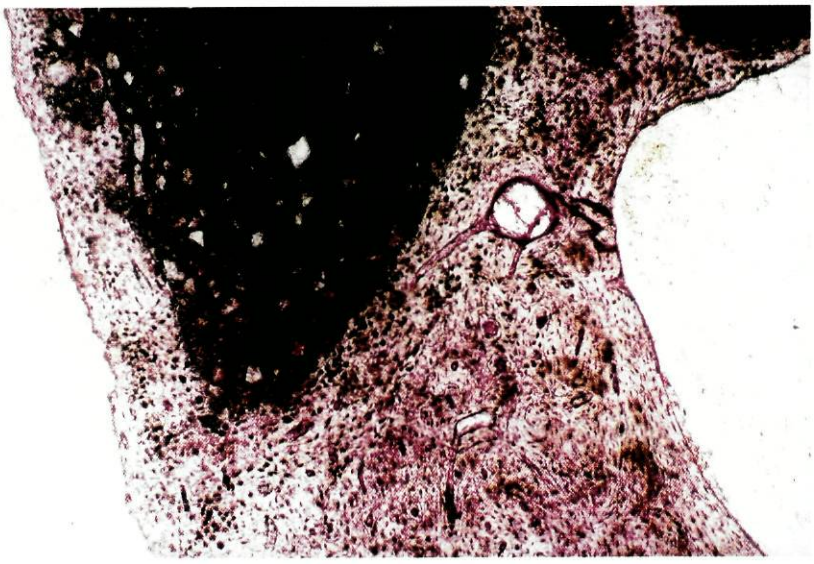


Fig. 53 – Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. Crescimento do tecido ósseo, que envolve completamente toda a superfície do material. (M.O., H+E – 50 X)

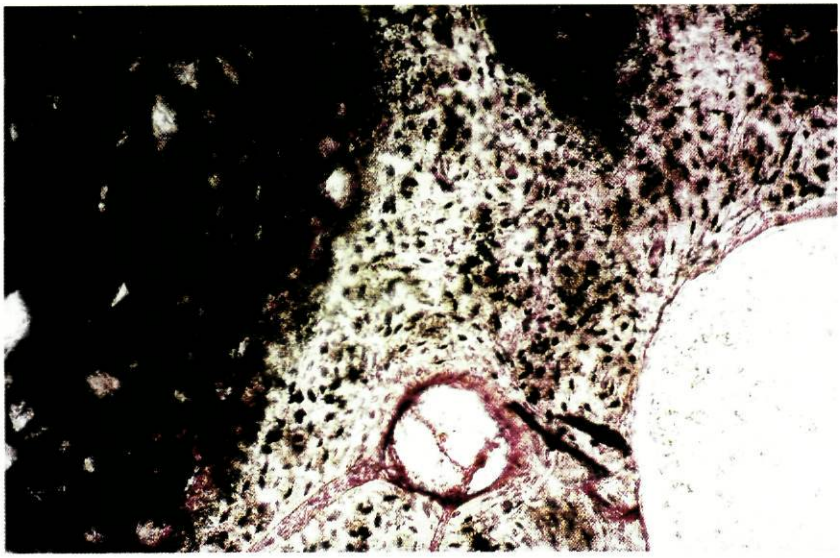


Fig. 54 – Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. O tecido ósseo neoformado, que contacta directamente a superfície do material, apresenta um grau de maturação bastante evoluído, sendo difícil a distinção com o osso cortical antigo. Presença de vasos com grandes dimensões. (M.O., H+E – 100 X)

Todavia, na observação mais pormenorizada de algumas zonas da interface, verificamos que a mineralização e o arranjo estrutural do tecido ósseo neoformado ainda apresentavam algumas diferenças (Fig. 55). A matriz era menos mineralizada, possuindo uma coloração mais clara do que a do osso cortical antigo, e a distribuição dos osteócitos era feita de forma menos organizada do que a do osso cortical. Neste último tecido evidenciou-se a existência de sistemas haversianos, com orientação concêntrica dos osteócitos que rodeiam os capilares centrais. Na zona da interface, este padrão de orientação celular não foi tão evidente, embora aparecessem esboços de formação de sistemas haversianos (Fig. 55). Nestas ampliações puderam identificar-se as partículas de vidro que não se combinaram com a solução de fosfato do cimento, com forma poliédrica, distribuídas pela matriz do cimento e, na zona da interface, interpostas entre o tecido ósseo que penetra nos espaços entre as partículas, contribuindo para um verdadeiro microcontacto físico-químico entre o osso e a camada superficial do material.

A análise mais pormenorizada da interface formada entre o osso e o material permitiu confirmar a boa união entre as duas estruturas, com ausência de interposição de qualquer tecido não mineralizado (Fig. 56). O osso depositado junto da interface apresentava uma matriz mineralizada com osteócitos e capilares abundantes. Os osteócitos possuíam a histomorfologia característica destas células osteoblásticas, com inclusão e aprisionamento na matriz óssea. Algumas das células estavam em contacto muito próximo com a superfície do material. A existência de abundantes capilares foi um indicador precioso da alta actividade metabólica dos tecidos desta zona. Relativamente ao material, identificou-se nestas ampliações uma degradação da camada mais superficial, que se encontrava separada do corpo principal do cimento através de uma linha mais densa. Com esta metodologia de análise foi impossível caracterizar estes fenómenos de degradação superficial.

O cimento de vidro bioactivo induziu a formação de uma camada de tecido ósseo, que envolveu o material, englobando-o e criando um contacto directo, com ausência de interposição de tecido conjuntivo não mineralizado. O tecido ósseo neoformado apresentou uma evolução significativa com o tempo, no que respeita ao grau de mineralização e diferenciação estrutural.

3.2. Microscopia de Fluorescência

Utilizando um marcador de emissão fluorescente, a tetraciclina, foi possível diferenciar, claramente, o osso regenerado do osso cortical antigo, as-

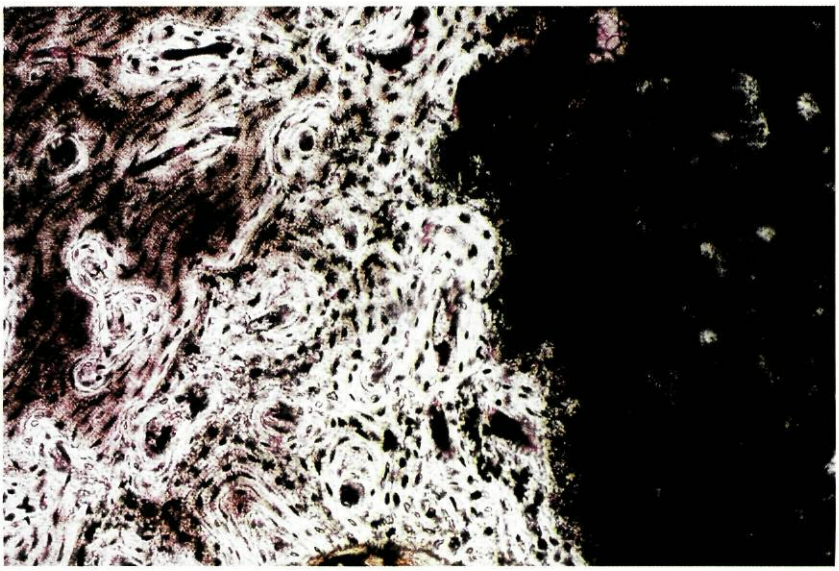


Fig. 55 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. Presença de tecido ósseo, junto da interface, em fase de maturação avançada. Apesar da menor mineralização da matriz relativamente ao osso cortical antigo, observam-se esboços da formação de sistemas haversianos. (M.O., H+E – 200 X)**

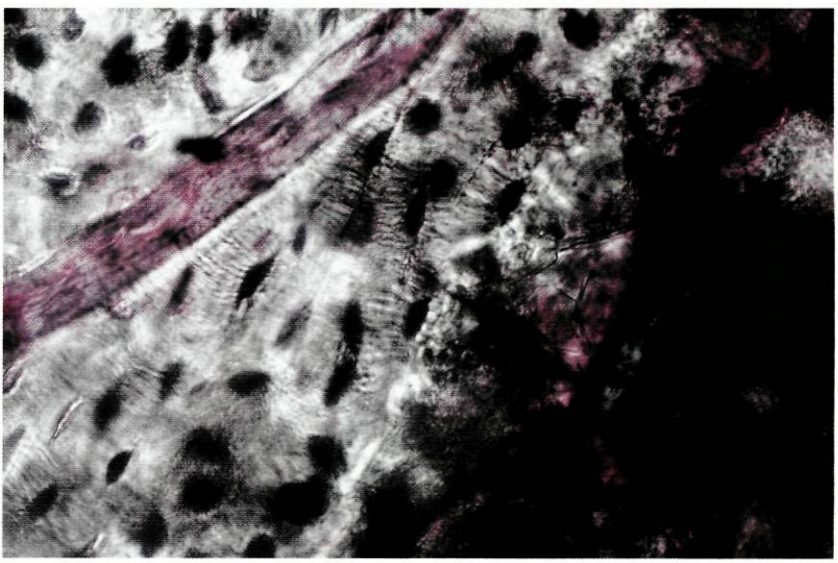


Fig. 56 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. Pormenor da zona de interface. Identifica-se a matriz óssea com osteócitos, com morfologia característica, e a degradação da camada superficial do cimento. (M.O., H+E – 400 X)**

sim como os locais que apresentavam uma maior actividade de formação/ remodelação óssea na altura da administração do marcador, uma semana antes do sacrifício dos animais.

Através da comparação das imagens observadas em microscopia de fluorescência e as imagens de cortes das mesmas amostras obtidas em microscopia óptica convencional, foi possível observar uma concordância nas estruturas identificadas como sendo osso neoformado e a existência de zonas com um processo de formação/remodelação óssea em fase de grande actividade.

Não sendo utilizado qualquer processo de coloração das amostras, a incidência da luz UV nas lâminas permitiu apreciar dois tipos de coloração do campo histológico, que vão do verde escuro ao amarelo claro. As zonas com coloração mais escura correspondem aos tecidos mais antigos enquanto que as zonas de coloração mais clara correspondem aos locais de maior deposição de marcador fluorescente e, por conseguinte, às zonas de maior actividade metabólica do processo remodelativo do tecido ósseo.

3.2.1. Amostras Metálicas (Aço Inox e Titânio)

As amostras com implantes de aço inox e titânio, observadas através da microscopia de fluorescência, não foram muito elucidativas quanto aos aspectos fundamentais da estrutura óssea que rodeava os implantes. Este facto, observado em todas as lâminas contendo amostras com pinos metálicos, deveu-se, provavelmente, à maior espessura destas amostras (>50 μm), que impossibilitou uma boa observação das estruturas por sobreposição de diferentes planos de focagem.

Apesar desta significativa limitação, verificou-se a existência de uma camada tecidular, com características de tecido fibroso, interposta entre o osso e a superfície dos implantes de aço inox (Fig. 57). Esta camada de tecido fibroso apresentou diferenças de espessura ao longo do perímetro da interface, parecendo existir, nalguns pontos, um contacto entre o osso e o material.

Nas amostras de titânio pouco mais se observou do que um contacto próximo entre o osso e a superfície dos implantes deste material. Notou-se, ainda, que a camada de tecido formado junto à superfície do material apresentava uma maior fluorescência do que o osso cortical antigo. Este fenómeno pode ser indicador de maior actividade de remodelação óssea a este nível (Fig. 58).

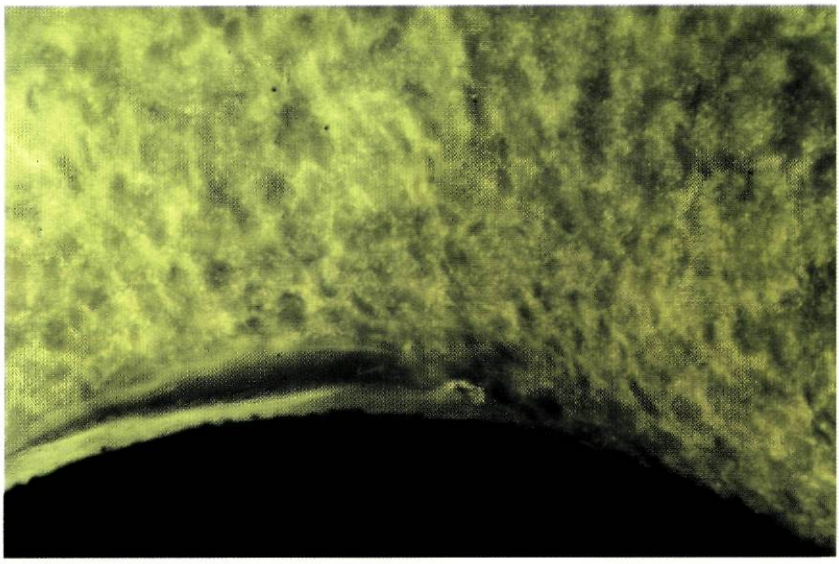


Fig. 57 – **Aço Inox – 4 semanas. Estrutura do tecido ósseo com pouca nitidez devido à espessura das amostras. Maior fluorescência junto da interface. Identifica-se tecido fibroso interposto entre o pino e o osso neoformado. (Microscopia de Fluorescência – 100 X)**

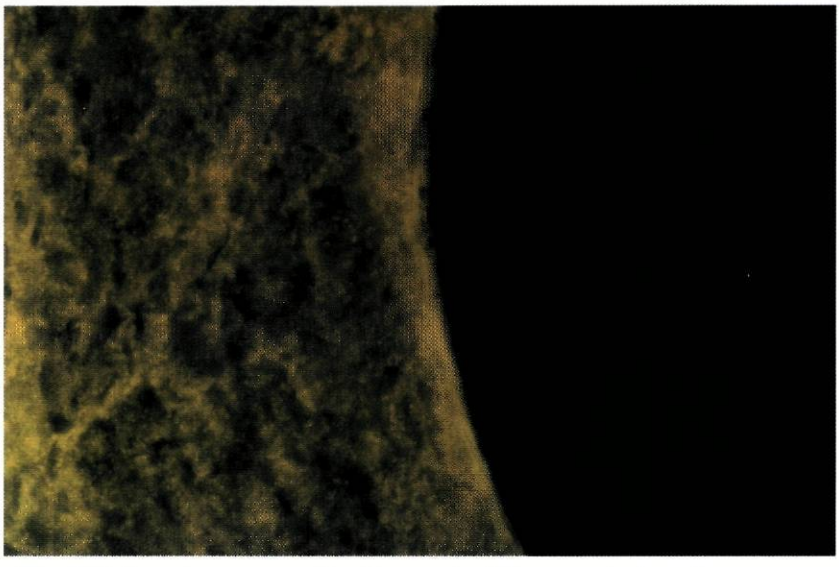


Fig. 58 – **Titânio – 4 semanas. Identicamente à figura anterior, observa-se pouca nitidez na estrutura dos tecidos ósseos e da zona da interface. Maior fluorescência da camada tecidular depositada junto da interface. (Microscopia de Fluorescência – 100 X)**

Pelas razões anteriormente apontadas, a observação das amostras contendo os pinos metálicos (duas lâminas para cada tempo seleccionado) não permitiu realizar uma boa caracterização das estruturas destas amostras.

3.2.2. Osteopatite®

As imagens das amostras contendo os grânulos de Osteopatite®, observadas através da microscopia de fluorescência, evidenciaram linhas de grande deposição do marcador utilizado. Nas zonas do tecido ósseo regenerado, em posição mais próxima da superfície dos grânulos, nos vasos e nos pontos correspondentes à localização das células osteoblásticas, identificou-se uma intensa coloração amarelo clara, correspondente às zonas de maior actividade metabólica e de deposição da tetraciclina (Fig. 59).

Em todas as amostras analisadas, observou-se a localização preferencial de zonas de maior intensidade fluorescente nos locais onde a formação/remodelação óssea foi mais intensa. Foi possível identificar, de forma clara, a orientação concêntrica das lamelas ósseas que envolviam os vasos, posicionados centralmente, com disposição e orientação característica do sistema haversiano do osso cortical. No tecido ósseo depositado nos espaços entre os grânulos foram evidentes os sinais identificativos de um estado precoce de diferenciação estrutural. Notou-se uma organização de osso lamelar que contactava directamente a superfície dos grânulos.

Um indicador do processo evolutivo da reparação óssea é o facto do tecido ósseo regenerado, a partir do periósteo e endósseo, apresentar maior fluorescência comparativamente ao tecido depositado na parte central do osso cortical. Isto permitiu considerar que o tecido formado nestes locais apresentava um estado de desenvolvimento mais tardio no processo de formação/remodelação óssea. A evolução deste processo reparador do defeito ósseo preenchido pelos grânulos não é semelhante ao que ocorre durante o processo fisiológico de reparação de fracturas ósseas, onde o crescimento mais precoce se inicia a partir do periósteo e endósseo.

3.2.3. Cimento de Vidro Bioactivo

As amostras de cimento de vidro bioactivo estudadas com esta metodologia mostraram a existência de grande actividade de formação/remodelação do tecido ósseo que envolvia o material (Fig. 60).

A camada de tecido ósseo neoformado à volta da superfície do material

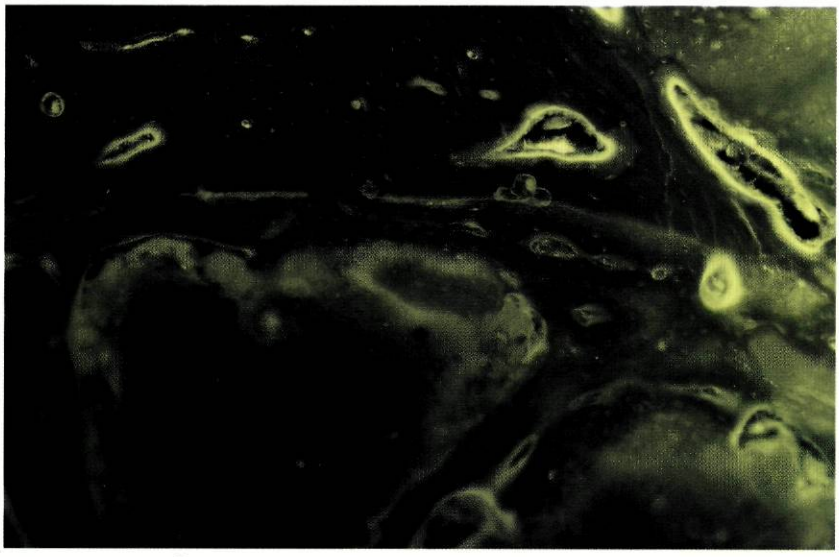


Fig. 59 – Osteopatite® – 4 semanas. Maior deposição do marcador fluorescente junto dos vasos, no tecido ósseo formado entre os grânulos e na linha de separação entre o osso cortical e o neoformado. De evidenciar as linhas lamelares de células osteoblásticas activas que constituem os sistemas haversianos do osso cortical. (M. de Fluorescência – 100X)

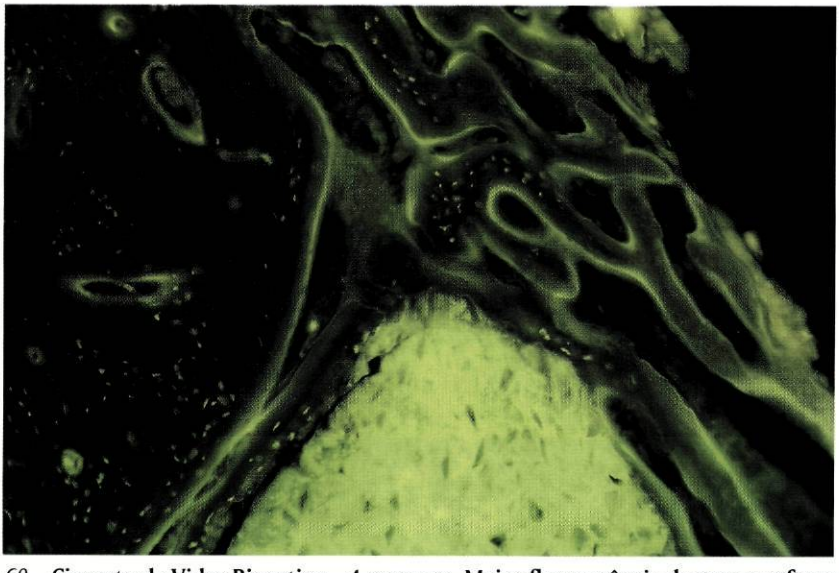


Fig. 60 – Cimento de Vidro Bioactivo – 4 semanas. Maior fluorescência do osso neoformado a partir do crescimento do periósteo que recobre a parte externa do material. O osso formado na interface é mais fluorescente do que o osso cortical antigo. Maior fluorescência do tecido vascular e de algumas células osteoblásticas. (M. de Fluorescência – 100 X)

apresentou estados distintos de diferenciação e maturação em função da sua localização. O osso que recobriu parte da superfície externa do material tinha um aspecto trabecular, com linhas limítrofes de grande fluorescência, indicativa de um fenómeno de crescimento activo dessas estruturas a partir do periósteo antigo. Estas trabéculas do osso esponjoso encontravam-se envolvidas por tecido medular.

Na zona da interface do osso cortical com a superfície do material, foi evidente a formação de uma camada fina de tecido ósseo em fase de organização lamelar, com espessura superior a 50 μm, interposta entre a superfície do material e o osso cortical. Este tecido apresentou características que o diferenciaram perfeitamente do osso cortical antigo, havendo mesmo uma linha nítida de separação entre estes dois tecidos. Nesta zona verificou-se a existência de linhas de intensa fluorescência nos tecidos vasculares e em alguns locais da matriz óssea, que correspondiam a células osteoblásticas em fase de grande actividade metabólica. A distinção entre o osso cortical antigo e o osso formado junto da interface estabeleceu-se não só pela diferença de coloração mas também devido à presença de sistemas haversianos bem definidos no osso cortical, que não se visualizaram no osso neoformado.

Em algumas amostras observou-se o aparecimento de uma linha de fractura, com localização na interface formada entre a camada superficial e o núcleo do cimento. Esta linha resultou de um artefacto induzido durante o processo de preparação histológica, possivelmente na fase de desidratação (Fig. 60), que origina fenómenos de contracção diferentes para cada material.

3.3. Microscopia Electrónica de Varrimento

3.3.1. Aço Inox

Amostras com 4 semanas após a implantação

Nestas amostras, observou-se a deposição de uma camada de tecido ósseo imaturo, que envolveu a superfície dos implantes de aço inox, embora não existisse contacto directo entre o osso e o material.

Interposta entre o osso neoformado e a superfície dos pinos, formou-se uma camada fina de tecido conjuntivo (>10 μm), que apresentou uma estrutura ligeiramente diferente do osso regenerado, mas que é de difícil diferenciação na análise por electrões secundários (Fig. 61). A espessura desta camada tecidular apresentou variações significativas na mesma amostra e nas diversas amostras observadas.

Através da observação das amostras por electrões retrodifundidos foi possível obter uma melhor caracterização dos tecidos depositados na zona da interface (Fig. 62). A possibilidade de obter imagens onde existia uma relação directa entre o conteúdo mineral dos tecidos e a sua coloração nas imagens, permitiu distinguir a camada de tecido conjuntivo não mineralizado, que apresentou uma cor preta, enquanto que os tecidos mineralizados eram cinzentos. Esta característica foi importante na diferenciação do conteúdo mineral dos tecidos. Nalgumas imagens, obtidas em electrões secundários, foi possível identificar a estrutura fibrosa da camada tecidular mais próxima da superfície dos implantes (Fig. 63). Nestas imagens evidenciaram-se os feixes de fibras que se dissociaram da matriz conjuntiva e da superfície do material, deixando a percepção da formação de um espaço de separação entre os tecidos e o material.

Na generalidade das amostras, a interface formada entre o tecido ósseo cortical antigo e a superfície dos implantes caracterizou-se pela existência de duas estruturas distintas. Na proximidade da superfície dos implantes de aço inox, formou-se uma camada fina de tecido conjuntivo não mineralizado, tecido fibroso, com uma espessura entre 10 e 30 μm. Esta camada tecidular apresentou alguns contactos pontuais com a superfície do material mas, na generalidade, existia uma fenda de separação nítida entre o tecido formado e o material. Esta separação foi mais acentuada na microscopia electrónica de varrimento, pois o vácuo a que as amostras foram submetidas, necessário para a observação correcta das amostras, induziu a criação de tensões que levaram à separação dos tecidos nas zonas mais frágeis.

A camada de tecido fibroso ficou interposta entre a superfície do implante e uma camada de tecido ósseo regenerado, imaturo, com conteúdo mineral e arranjo estrutural distinto do osso cortical antigo. As imagens obtidas através de electrões retrodifundidos permitiram estabelecer uma melhor distinção entre estas estruturas, comparativamente com a utilização dos electrões secundários.

Todavia, mesmo na função de electrões secundários, foi possível diferenciar as várias estruturas presentes na interface (Fig. 64). Observou-se também, um espaço de separação nítido entre o material e o tecido depositado neste local.

Amostras com 10 semanas após a implantação

Com o decorrer do tempo do ensaio, verificaram-se algumas diferenças nas amostras com 10 semanas de implantação. A camada de tecido fibroso

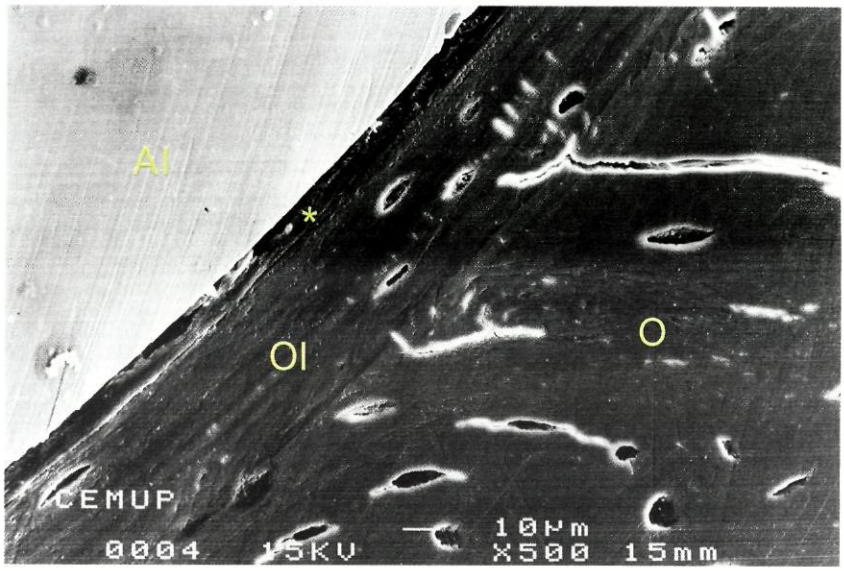


Fig. 61 – **Aço Inox – 4 semanas. Podem observar-se as estruturas da interface: osso cortical (O), osso imaturo (OI), tecido não mineralizado (*) e o implante de aço inox (AI). (MEV – Electrões Secundários)**

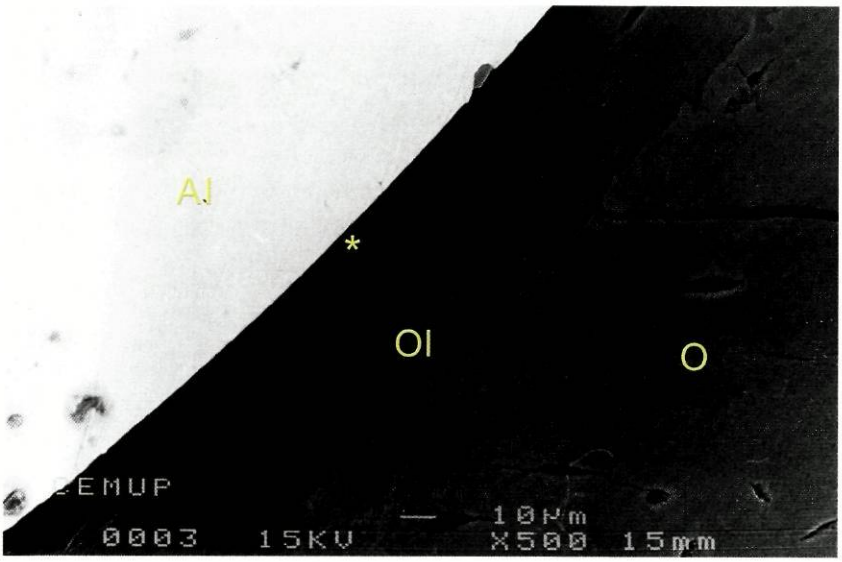


Fig. 62 – **Aço Inox – 4 semanas. Através deste método de observação, são mais nítidas as diferenças entre as estruturas da interface: osso cortical O), osso imaturo (OI), tecido não mineralizado (*) e o implante de aço inox (AI). (MEV – Electrões Retrodifundidos)**

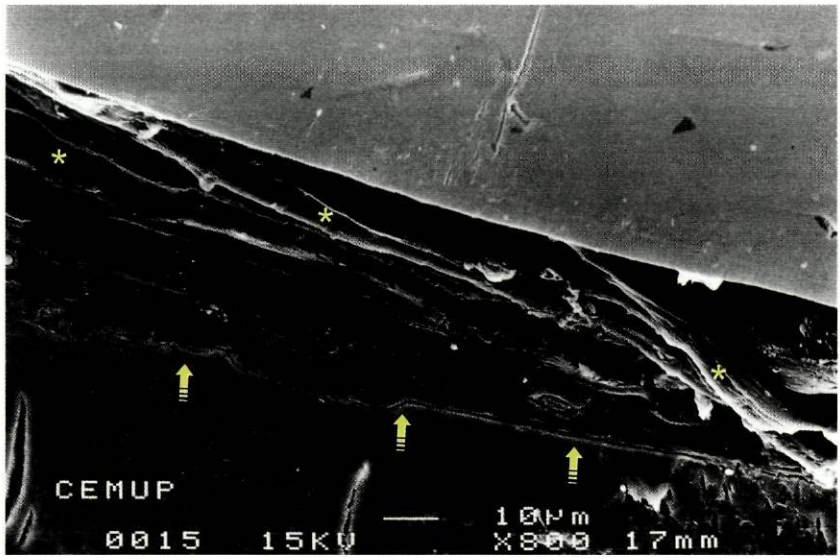


Fig. 63 – Aço Inox – 4 semanas. Imagem exemplificativa da constituição fibrosa da camada tecidular que se deposita na superfície do implante. São evidentes os feixes de fibras (*) que fazem parte deste tecido. Note-se a linha de separação entre o osso imaturo e o osso cortical antigo (setas). (MEV – Electrões Secundários)

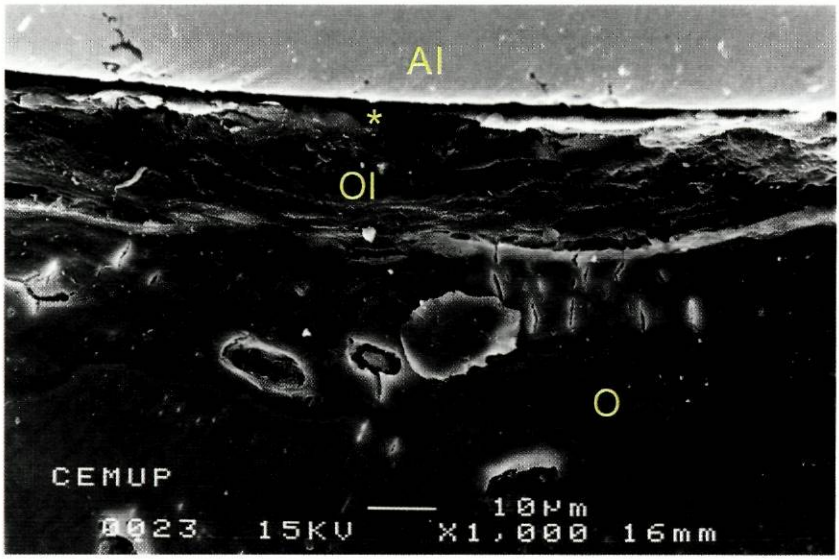


Fig. 64 – Aço Inox – 4 semanas. Maior pormenor das estruturas interfaciais. Osso cortical (O), osso imaturo (OI), tecido não mineralizado (*) e implante de aço inox (AI). Salienta-se a falta de adesão entre o tecido depositado e a superfície do material. (MEV – Electrões Secundários)

interposta entre o material e o osso regenerado, diminuiu de espessura, embora se mantivesse presente na globalidade das amostras. Esta camada separou-se facilmente da superfície do material por falta de retenção mecânica, dando lugar ao aparecimento de um espaço vazio na interface.

O osso formado/remodelado na zona da interface apresentou um estado de maturação mais evoluído, comparativamente às amostras com 4 semanas, sendo praticamente indistinguível do osso cortical antigo no que respeita ao arranjo estrutural, embora ainda persistissem algumas zonas dispersas de tecido conjuntivo não mineralizado. Notou-se, também, o número elevado de vasos dispersos pela matriz deste tecido (Fig. 65), indicativo da alta actividade metabólica existente.

A presença de alguns vasos com tamanho considerável e de uma linha ténue de separação entre o osso cortical e o osso neoformado delimitaram a camada de tecido ósseo em fase mais activa de formação/remodelação (Fig. 66).

O tecido fibroso, embora não aderindo às irregularidades superficiais dos implantes, mostrou uma adaptação perfeita à sua morfologia externa, mas sem possuir qualquer tipo de retenção ou adesão mecânica, dado formar-se uma fenda nítida entre o material e o tecido.

Esta separação acentuou-se quando a superfície do implante apresentava poucas irregularidades (Fig. 67). Nalgumas imagens, identificou-se a manutenção de uma camada de tecido fibroso envolvendo os implantes, mas o osso neoformado na interface apresentou um grau de maturação semelhante ao osso cortical antigo, sendo difícil definir os seus limites (Fig. 67).

A observação em pormenor da zona de interface, em grandes ampliações, permitiu confirmar a separação entre a superfície do material e o tecido depositado (Fig. 68). Nestas imagens, identificou-se a ausência de deposição de estruturas orgânicas na superfície irregular do implante.

A análise global das amostras contendo implantes de aço inox evidenciou a falta de adesão entre os tecidos neoformados na interface e a superfície dos implantes. Os implantes encontravam-se separados do osso cortical por uma camada de tecido fibroso e por uma outra camada de tecido ósseo imaturo. Com o decorrer do tempo de permanência dos implantes, verificou-se uma diminuição geral da espessura da camada do tecido fibroso, mantendo-se, todavia, uma separação nítida entre o implante e o tecido neoformado. Esta separação foi incrementada pelas forças de tensão induzidas pelo vácuo do microscópio, provocando o aparecimento de uma fenda de tamanho considerável em quase todo o perímetro.

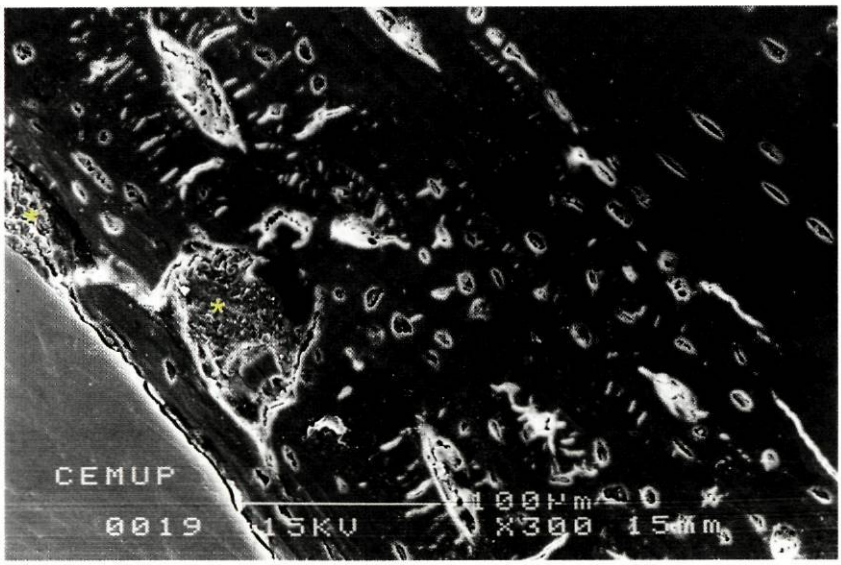


Fig. 65 – Aço Inox – 10 semanas. Verifica-se a formação de um tecido ósseo na zona da interface aparentando bastantes semelhanças estruturais com o osso cortical. Presença de algumas zonas com tecido conjuntivo não mineralizado (*), a abundante distribuição de vasos pela matriz e a existência de uma fenda na interface. (MEV – Electrões Secundários)

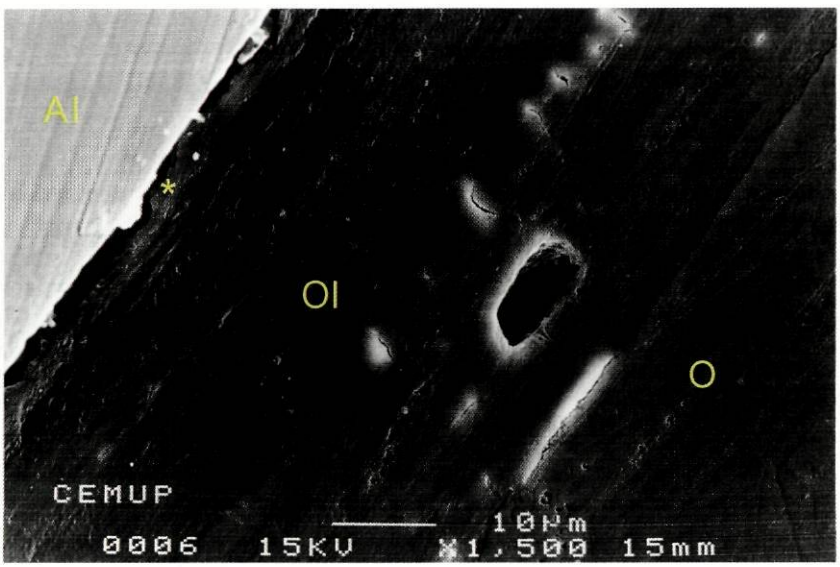


Fig. 66 – Aço Inox – 10 semanas. Formação de uma camada de tecido ósseo regenerado (OI), separado do osso cortical (O) por uma linha nítida. Presença de um vaso de grandes dimensões neste tecido. A zona da interface está preenchida por uma camada de tecido não mineralizado (*), separado do material por uma fenda. (MEV – Electrões Secundários)

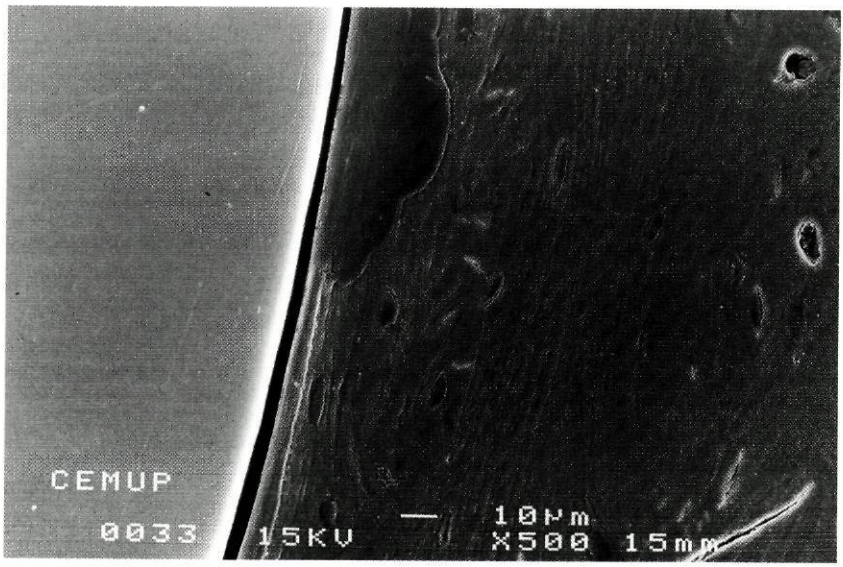


Fig. 67 – Aço Inox – 10 semanas. Imagem representativa da falta de contacto directo entre o tecido neoformado e a superfície do material. Camada de tecido não mineralizado, interposta entre o osso e o implante. A fenda observada na interface é incrementada pelo vácuo do microscópio. (MEV – Electrões Secundários)

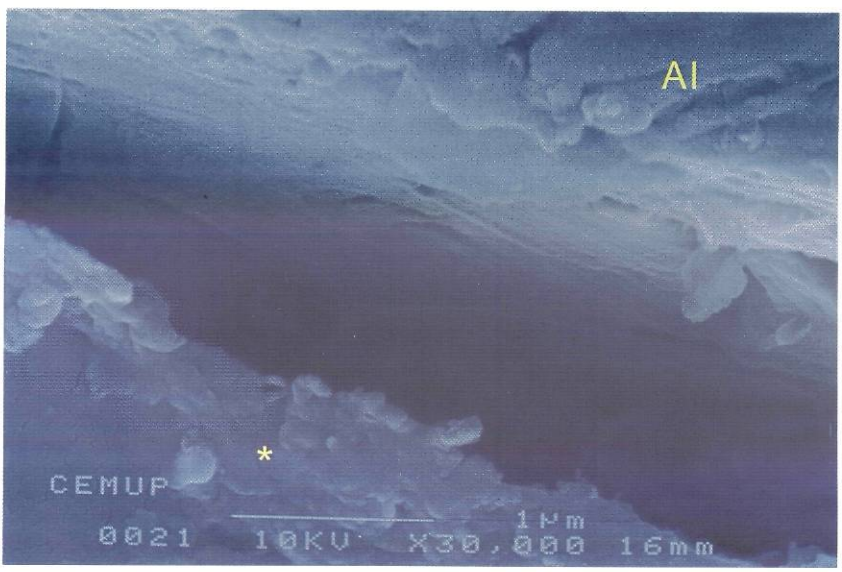


Fig. 68 – Aço Inox – 10 semanas. Pormenor da fenda de separação entre a superfície do implante (Al) e o tecido envolvente (*). De salientar a ausência de qualquer vestígio orgânico na superfície do material. (MEV – Electrões Secundários)

A camada de tecido ósseo regenerado sofreu, com o tempo, um incremento no conteúdo mineral e no estado de maturação estrutural. Nalgumas amostras com 10 semanas de implantação foi extremamente difícil estabelecer uma diferença nítida entre o osso cortical antigo e o osso regenerado.

A microanálise por raios X das estruturas da interface não revelou qualquer evidência de difusão de iões a partir dos implantes de aço inox para os tecidos envolventes. A camada tecidular, mais próxima da superfície do material, revelou características de tecido orgânico não mineralizado, com altos teores de carbono e oxigénio, mas sem vestígios de cálcio nem fósforo. Nas amostras com 4 semanas de implantação, o osso formado junto da interface possui algum cálcio e fósforo, o que é compatível com um tecido pouco mineralizado. O conteúdo destes elementos foi mais elevado nas amostras com 10 semanas, aproximando-se dos teores apresentados pelo tecido ósseo cortical antigo.

3.3.2. Titânio

Amostras com 4 semanas após a implantação

A observação por microscopia electrónica de varrimento das amostras de titânio com 4 semanas de implantação mostrou, na generalidade, a formação de tecido ósseo imaturo, que contactava directamente parte da superfície dos implantes (Fig. 69). As imagens analisadas apresentaram evidências da deposição de um tecido ósseo menos mineralizado na zona da interface, que se distinguiu perfeitamente do osso cortical, não só pela sua estrutura mas porque possuía uma grande riqueza de vasos, com calibres variando entre 2 e 10 μm.

Na função de electrões retrodifundidos (Fig. 70), a distinção entre o tecido ósseo cortical e o osso formado na interface foi mais notória. Para além das diferenças estruturais observadas em electrões secundários, verificou-se que o tecido ósseo regenerado apresentava um menor conteúdo de componentes minerais. Tal facto não impediu, contudo, a identificação de pontos de contacto directo entre o tecido ósseo neoformado e a superfície dos implantes. O contacto na interface promoveu uma retenção mecânica suficiente para resistir às forças de tensão provocadas pelo vácuo do microscópio, pois a fenda de separação apareceu localizada na camada tecidular e não entre o material e o tecido neoformado.

A penetração de parte da superfície dos implantes de titânio na cavidade medular não impediu que ocorresse o crescimento de tecido ósseo nesta

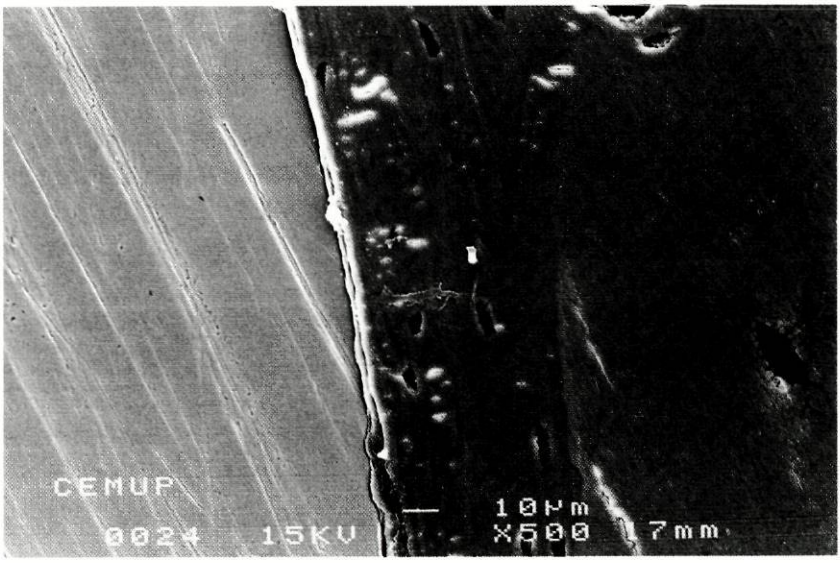


Fig. 69 – Titânio – 4 semanas. Formação de tecido ósseo imaturo na zona da interface, contactando o implante em alguns pontos. Refira-se a grande abundância de vasos neste tecido e a existência de uma camada com estrutura diferente na zona mais próxima da superfície do material. (MEV – Electrões Secundários)

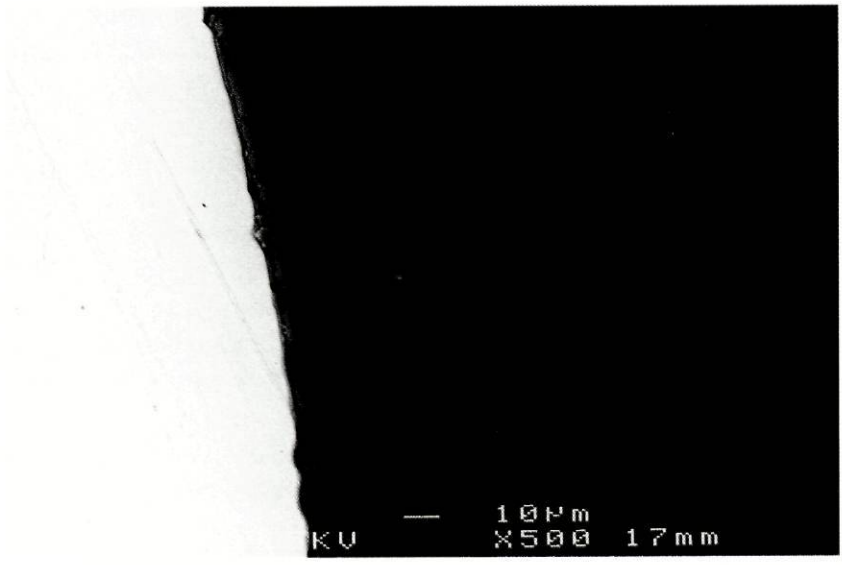


Fig. 70 – Titânio – 4 semanas. Mesmo campo da imagem anterior. Melhor identificação do grau de mineralização das estruturas da interface. Note-se a união entre o tecido mineralizado depositado e a superfície do material. (MEV – Electrões Retrodifundidos)

zona. A observação de várias amostras em que os pinos de titânio se localizavam na cavidade medular permitiu constatar o crescimento de tecido ósseo trabecular rodeando e envolvendo os pinos de titânio (Fig. 71). As trabéculas ósseas, rodeadas por tecido medular, cresceram a partir do endósseo na direcção da superfície do implante envolvida por este tecido.

Em maiores ampliações, na zona da interface, foi possível observar um contacto directo entre o tecido neoformado e a superfície dos implantes (Fig. 72). O tipo de adesão, contacto físico directo com retenção mecânica do tecido, foi suficientemente forte para manter a união na interface entre o osso e o material. Nalgumas imagens verificou-se a formação de uma fenda de separação mas, contrariamente ao que ocorreu com os pinos de aço inox, não se localizou na interface entre o material e o tecido neoformado mas sim entre a linha de separação deste tecido menos mineralizado e o osso cortical. Este facto é demonstrativo da boa integração do material nos tecidos envolventes, decorridas 4 semanas após a implantação do material no osso cortical do coelho.

Amostras com 10 semanas após a implantação

A análise das amostras de titânio com 10 semanas de implantação mostrou um aspecto global de maior contacto entre o tecido ósseo neoformado e a superfície dos implantes. O osso depositado apresentou um estado de maturação mais avançado, comparativamente com as amostras implantadas durante 4 semanas.

A observação das estruturas da interface permitiu identificar uma camada de tecido ósseo bastante mineralizado junto da superfície do material, mas que ainda se distinguiu do osso cortical antigo pela persistência de uma linha nítida de separação. O tecido ósseo depositado na superfície dos implantes preencheu as reentrâncias e irregularidades superficiais do titânio mantendo um bom contacto com o material, e suportando as tensões produzidas na amostra durante a observação neste tipo de microscópio (Fig. 73).

A resistência mecânica e a boa união do tecido ao mineral é confirmada pela manutenção da união, resistindo à retracção provocada pelo vácuo do microscópio e levando ao aparecimento de linhas de fractura na matriz tecidular (Fig. 74).

A observação mais pormenorizada da zona da interface, permitiu identificar a deposição de uma camada de tecido ósseo com cerca de 10 μm de espessura, que se encontrava em contacto directo com a superfície dos im-

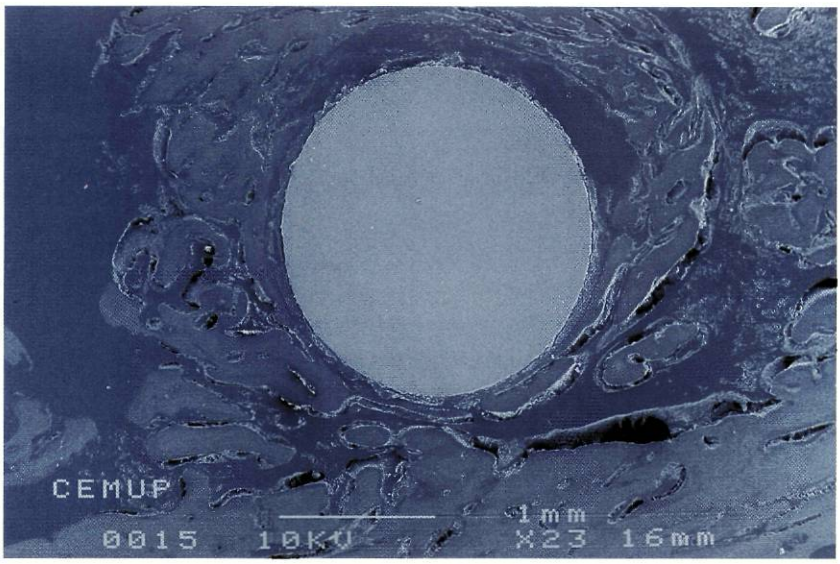


Fig. 71 – **Titânio – 4 semanas. Crescimento e formação de tecido ósseo na parte do implante que se localiza na cavidade medular. Este tecido apresenta um aspecto de osso trabecular rodeado por tecido medular. (MEV – Electrões Secundários)**

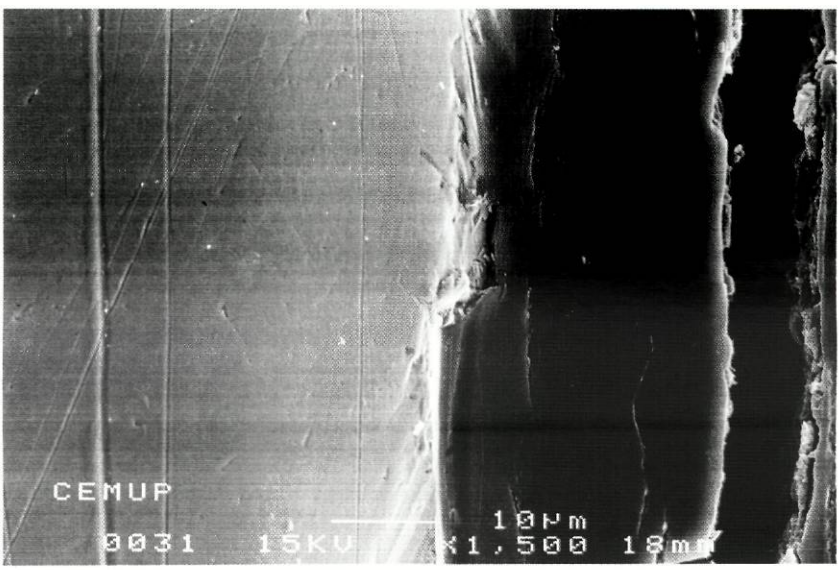


Fig. 72 – Titânio – 4 semanas. Contacto directo entre o tecido neoformado e a superfície do material. A força de adesão é suficiente para que a linha de fractura surja entre o tecido neoformado e o osso cortical, mantendo-se íntegra a união com a superfície do material. **(MEV – Electrões Secundários)**

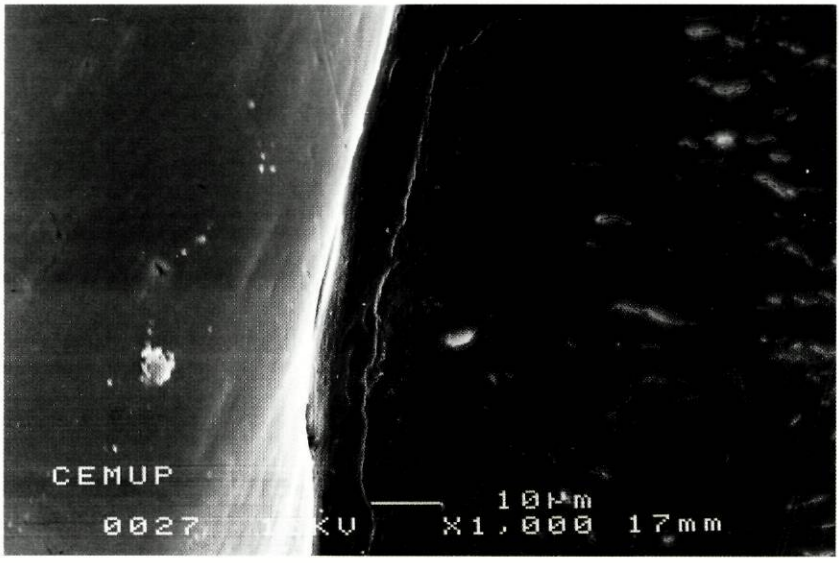


Fig. 73 – **Titânio – 10 semanas. Contacto perfeito entre o tecido ósseo neoformado na zona da interface e a superfície do material. A camada de tecido ósseo encontra-se separada do osso cortical por uma linha nítida. (MEV – Electrões Secundários)**

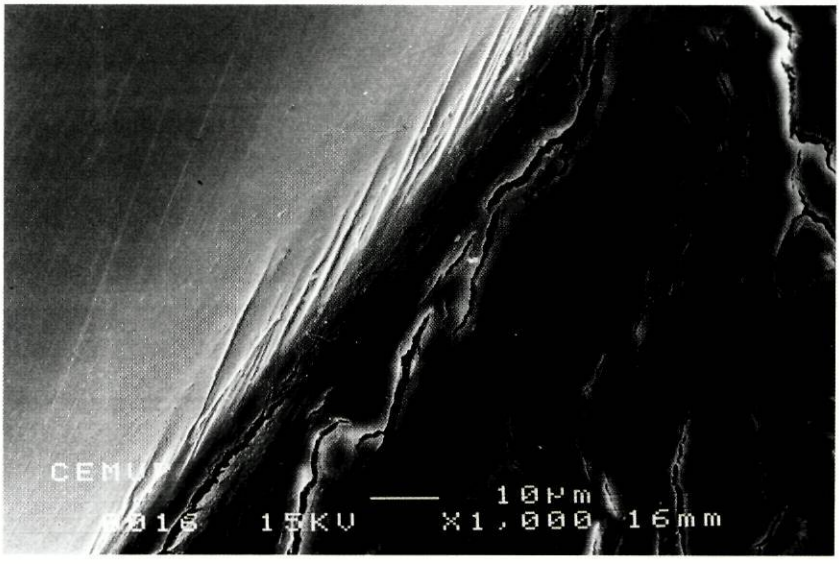


Fig. 74 – **Titânio – 10 semanas. A força de união do tecido ósseo neoformado à superfície do implante é suficientemente forte para resistir às forças criadas pelo vácuo do microscópio, levando a que as linhas de fractura surjam na matriz do tecido e não na interface. (MEV – Electrões Secundários)**

plantes (Fig. 75). O arranjo estrutural deste tecido foi semelhante ao do osso cortical, fazendo-se a distinção entre os dois tecidos através da presença de uma linha ténue de separação. Evidenciou-se a interpenetração do tecido neoformado nas irregularidades superficiais do implante, aumentando a superfície específica de adesão física entre as duas estruturas.

A microanálise por raios X das várias estruturas da interface permitiu quantificar a sua composição elementar. A determinação da composição química da camada tecidular depositada na zona da interface permitiu obter o registo apresentado na figura 76. Os picos correspondentes aos vários elementos presentes nesta estrutura permitiram classificar este tecido como sendo um tecido conjuntivo mineralizado, apresentando uma relação Ca/P bastante elevada. Identificou-se, também, a presença de titânio.

O traçado obtido a partir da análise do tecido neoformado localizado próximo do osso cortical é apresentado na figura 77. Confirma-se a presença de titânio, embora de forma vestigial, no ponto que dista da superfície do implante em cerca de 180 a 200 μm. No osso cortical (fig. 78), num ponto analisado a cerca de 300 μm da superfície do implante, não foram encontrados vestígios de titânio.

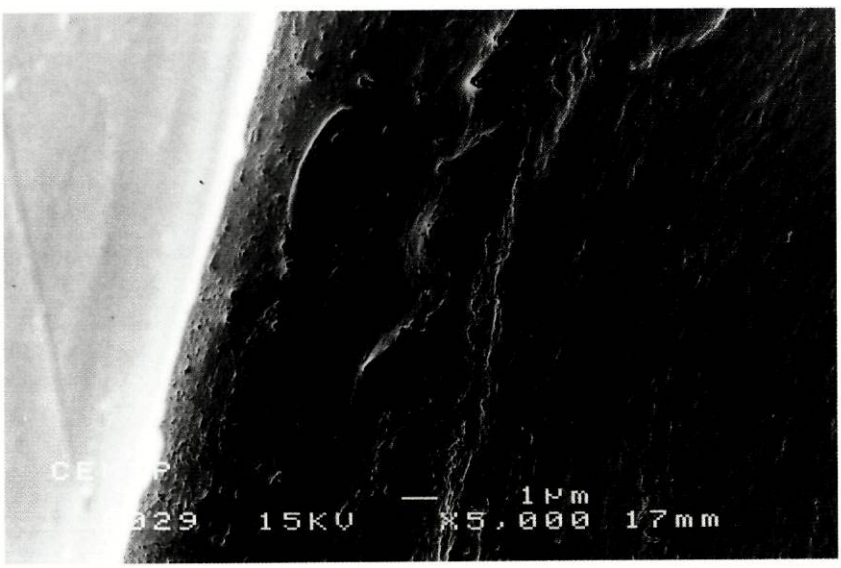


Fig. 75 – **Titânio – 10 semanas. Pormenor de uma zona de interface entre o osso neoformado e a superfície do implante. Confirma-se a existência de uma união perfeita entre o tecido e o material. É perceptível uma diferença estrutural atenuada entre o osso cortical e o osso neoformado. (MEV – Electrões Secundários)**

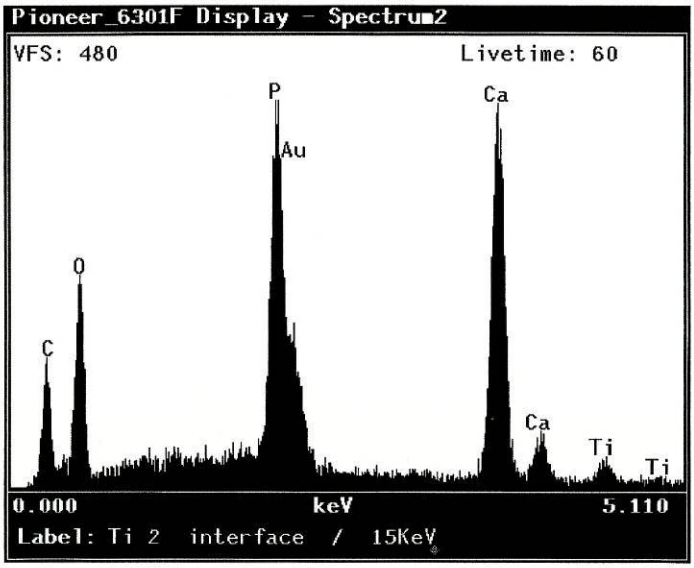


Fig. 76 – Titânio – 10 semanas. Espectro da composição química do tecido da interface. O traçado confirma tratar-se de um tecido mineralizado, rico em cálcio e fósforo. Os vestígios de titânio concentrado neste ponto, a cerca de 5 μm da superfície do material, podem ser atribuídos a uma possível interferência do implante. (Microanálise por raios X – EDS)

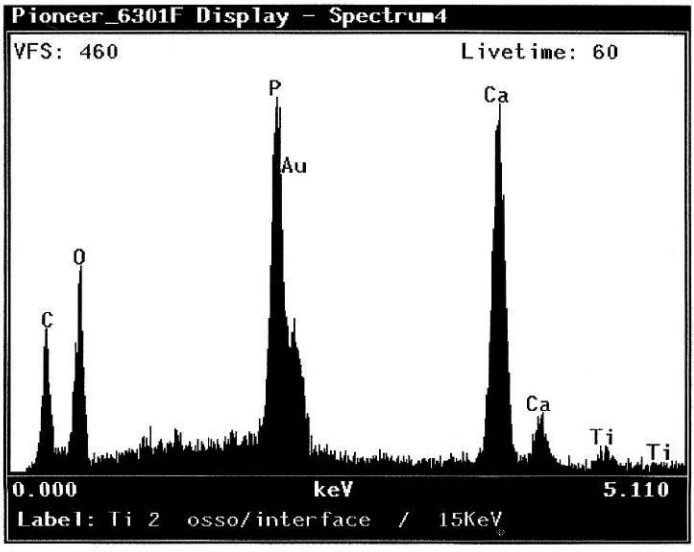


Fig. 77 – Titânio – 10 semanas. Espectro da composição química do tecido da interface, próximo do osso cortical. Trata-se de tecido mineralizado, rico em cálcio e fósforo. Os vestígios de titânio encontrados a cerca de 180-200 μm da superfície do material correspondem à dissolução de iões de Ti a partir do implante. (Microanálise por raios X – EDS)

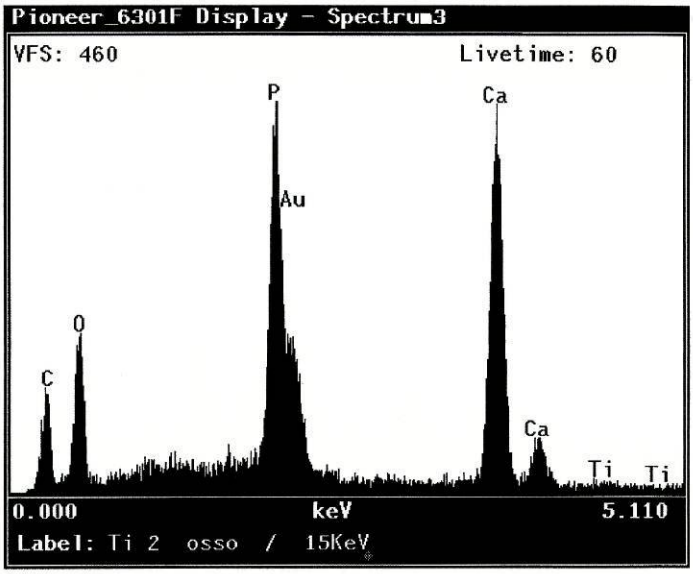


Fig. 78 – **Titânio – 10 semanas. Espectro da composição química do osso cortical. Não foram detectados vestígios de titânio neste tecido. (Microanálise por raios X – EDS)**

Estes resultados foram confirmados noutras amostras com 10 semanas de implantação na camada tecidular depositada junto da interface, com uma espessura que varia entre os 150 a 250 μm. Nas amostras com 4 semanas de implantação, utilizando esta metodologia de microanálise, não foram detectados vestígios de qualquer tipo de titânio, a não ser em pontos muito próximos da superfície dos implantes. Neste caso, a presença destes iões foi atribuída a interferências, por interacção do feixe de electrões com a superfície do material, devido à grande proximidade dos locais de determinação com a superfície dos implantes.

3.3.3. Osteopatite®

Amostras com 4 semanas após a implantação

Nas amostras de Osteopatite® observadas 4 semanas após a implantação no osso cortical da tíbia dos coelhos por microscopia electrónica de varrimento, verificou-se uma extensa regeneração de tecido ósseo imaturo que preencheu parte dos espaços existentes entre os grânulos deste material (Fig. 79).

Observou-se um maior crescimento do tecido ósseo no espaço central do defeito ósseo, localizado no osso cortical, orientando-se também para os grânulos colocados na cavidade medular. O osso neoformado era composto por lamelas que penetram nos espaços entre os grânulos, envolvendo-os e contactando directamente com a sua superfície. O espaço entre as lamelas de osso imaturo foi preenchido por tecido medular.

A observação do tecido ósseo neoformado permitiu caracterizá-lo como sendo um tecido ósseo imaturo envolvendo a totalidade da superfície da maioria dos grânulos. Verificou-se a formação de um contacto directo entre o tecido ósseo e a superfície do material, sem interposição de qualquer camada de tecido conjuntivo não mineralizado (Fig. 80). A matriz do tecido ósseo era perfurada por um número elevado de vasos, apresentando alguns deles um calibre bastante aumentado. Este facto confirma a alta actividade metabólica inerente a um tecido em fase de formação/remodelação activa que necessita de um aporte abundante de nutrientes através da corrente sanguínea. Os vasos distribuíram-se ao longo da matriz óssea formada, encontrando-se alguns deles localizados muito próximo da superfície do material (Fig. 81).

A análise pormenorizada da interface formada pelo tecido ósseo e a superfície dos grânulos conduziu a observações interessantes. Em algumas zonas da interface foi possível identificar uma fase precoce da formação da matriz óssea nas porosidades existentes entre as partículas dos grânulos (Fig. 82). Verificou-se, nestes locais, a produção de fibras de colagénio que penetravam nas porosidades superficiais, numa profundidade de cerca de 10 μm. Seguiu-se a deposição de substância fundamental amorfa, originando a matriz óssea mineralizada através da deposição de cristais de hidroxiapatite. As fibras de colagénio tipo I são o constituinte fundamental no processo de osteogénese.

A penetração do tecido ósseo nas porosidades é um indicador da alta capacidade de adesão deste tecido ao material e das suas boas propriedades biológicas que motivam a indução da formação/remodelação de tecido ósseo no interior das suas porosidades. Os feixes de fibras projectaram-se da matriz óssea em formação, penetrando nas porosidades e aderindo firmemente às partículas que revestem as suas paredes (Fig. 83). Verificou-se um contacto directo e contínuo entre a superfície do material e a matriz óssea em formação, observável em grandes ampliações. Não se observou a deposição de qualquer estrutura mais densa a nível da interface formada entre os grânulos da Osteopatite® e o tecido ósseo depositado na sua superfície.

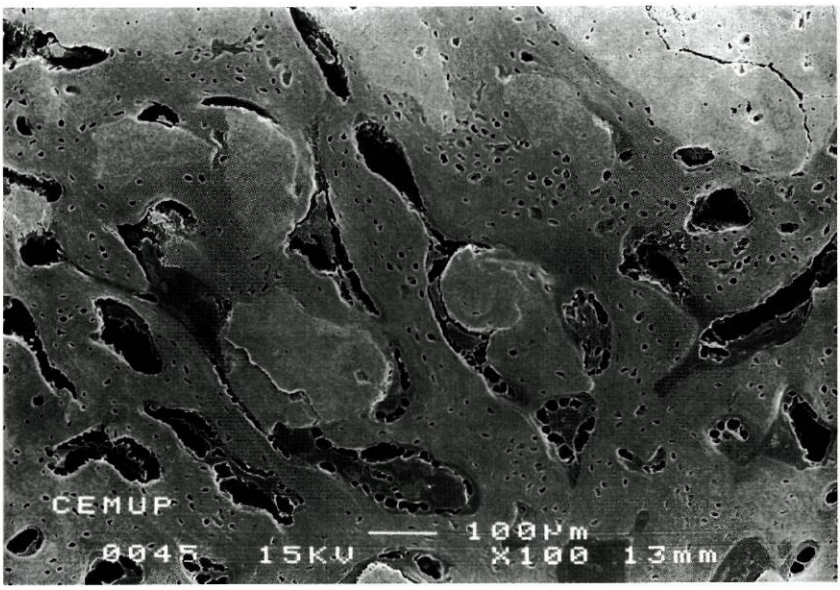


Fig. 79 – **Osteopatite® – 4 semanas. Grânulos rodeados por trabéculas ósseas que invadem os espaços inter granulares. Presença abundante de vasos e tecido medular. O crescimento ósseo processa-se na direcção dos grânulos. (MEV – Electrões Secundários)**

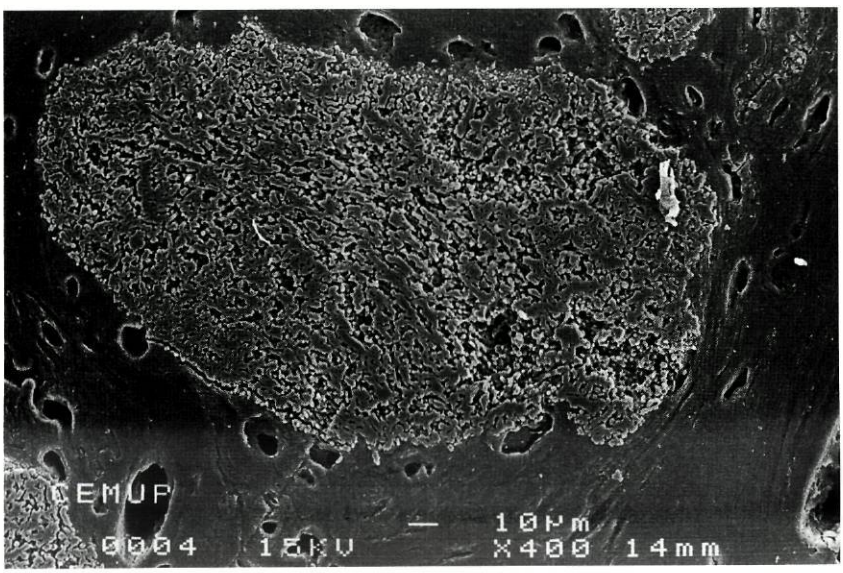


Fig. 80 – **Osteopatite® – 4 semanas. Envolvimento de um grânulo pelo tecido ósseo. Salienta-se o contacto directo entre o osso e a superfície do grânulo e a riqueza de vasos, dispersos pela matriz óssea. (MEV – Electrões Secundários)**

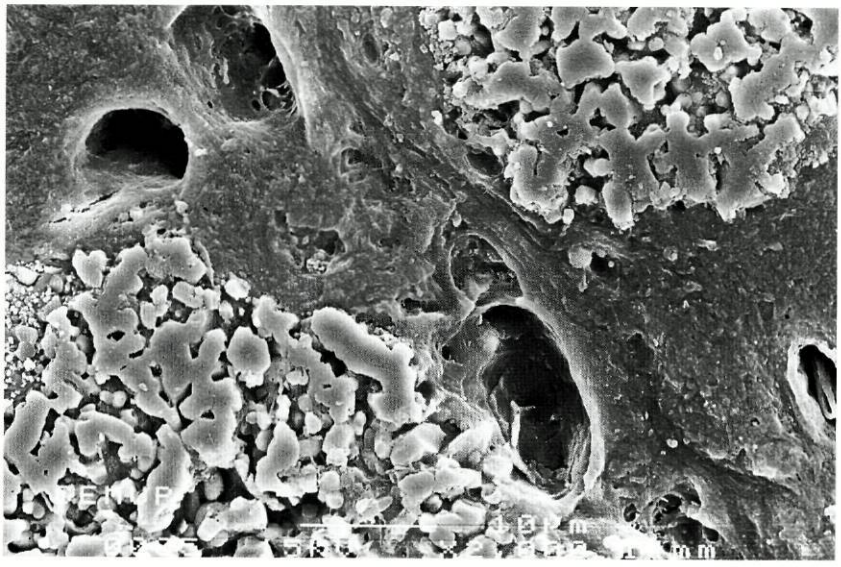


Fig. 81 – **Osteopatite® – 4 semanas. Pormenor do tecido ósseo depositado entre dois grânulos. Evidenciam-se vasos com calibre aumentado e boa adesão do tecido ósseo às superfícies dos grânulos. (MEV – Electrões Secundários)**

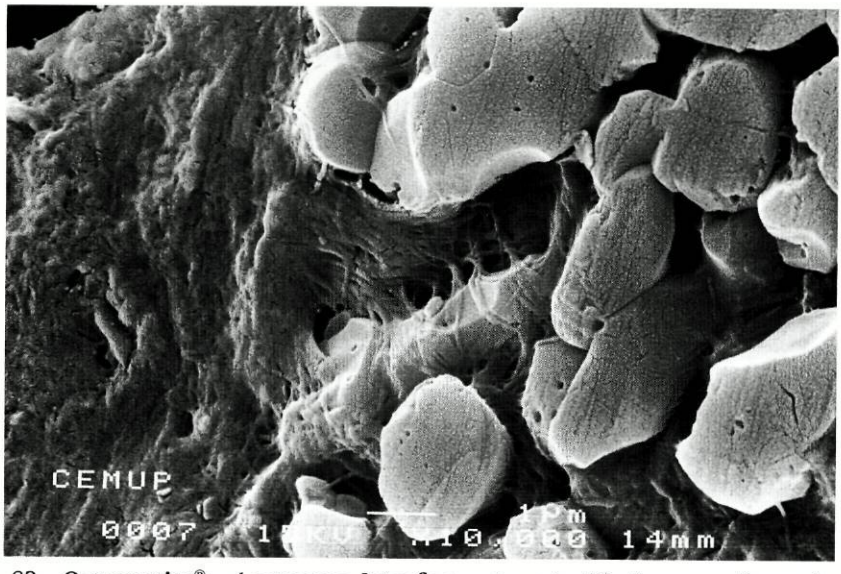


Fig. 82 – **Osteopatite® – 4 semanas. Interface entre o tecido ósseo neoformado e a superfície de um grânulo. Penetração de fibras de colagénio no interior das irregularidades do grânulo, aderindo às partículas. Estas fibras são precursoras fundamentais do processo de osteogénese. (MEV – Electrões Secundários)**

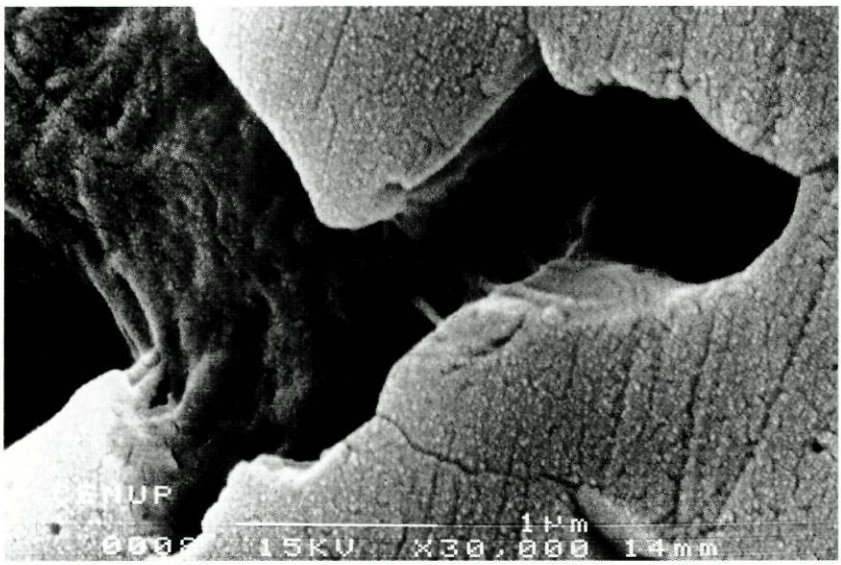


Fig. 83 – **Osteopatite® – 4 semanas. Grande ampliação da zona da interface. Visualiza-se a penetração do tecido ósseo nas irregularidades de um grânulo. São evidentes as fibras de colagénio que crescem e se projectam para o interior do grânulo, a partir da matriz óssea. (MEV – Electrões Secundários)**

Também não foi perceptível qualquer sinal de degradação superficial dos grânulos, mantendo as partículas a sua morfologia normal, mesmo as mais superficiais e portanto mais sujeitas ao efeito do meio fisiológico envolvente.

Amostras com 10 semanas após a implantação

O decurso temporal entre as 4 e as 10 semanas contribuiu para que a formação de tecido ósseo não só aumentasse de quantidade como também sofresse mudanças significativas no seu estado de maturação. As amostras observadas evidenciaram o preenchimento da totalidade do espaço existente entre os grânulos, por um tecido ósseo mais maduro e diferenciado (Fig. 84). Continuaram presentes um elevado número de vasos, de calibre aumentado, distribuindo-se por toda a matriz óssea formada, estando alguns deles localizados próximos da superfície dos grânulos.

O tecido ósseo depositado entre os grânulos contactava directamente a superfície do material, penetrando nas suas porosidades superficiais e estabelecendo uma união firme e íntima com o material (Fig. 85). Não se observou em qualquer das amostras a interposição de uma camada de tecido não

mineralizado na zona da interface. O tecido ósseo neoformado possuía uma matriz mineralizada e uma estrutura homogénea, rodeando e envolvendo a superfície do grânulo.

A análise pormenorizada da interface (Fig. 86) não evidenciou a presença de qualquer estrutura não mineralizada nesta zona. Confirmou-se o preenchimento das reentrâncias superficiais por tecido ósseo de estrutura idêntica à do osso depositado nos espaços entre os grânulos. A ausência das fibras de colagénio na matriz óssea é um indicador do estado avançado de maturação e diferenciação do tecido ósseo neoformado.

Uma observação evolutiva, em termos de incremento de ampliações, da mesma zona da interface, permitiu confirmar a boa adesão do tecido ósseo à superfície dos grânulos, com interpenetração tecidular nos espaços formados pela porosidade aberta dos grânulos (Fig. 87). A penetração do tecido ósseo, numa profundidade de cerca de 10 μm, foi um indicador da boa integração do material no tecido e do estabelecimento de uma união físico-química entre as duas estruturas. Não foram identificados sinais evidentes de degradação superficial dos grânulos de Osteopatite® durante os períodos de implantação utilizados neste ensaio.

A realização da microanálise por raios X, concomitante com a observação microscópica, foi feita em três pontos fundamentais das amostras: grânulo implantado, interface entre o material e o novo osso formado e no osso cortical. Esta análise demonstrou a existência de uma relação Ca/P com bastantes semelhanças nas três determinações (Figs. 88, 89 e 90).

Os espectros obtidos, representativos do conteúdo iónico dos três pontos seleccionados, confirmam uma relação de Ca/P semelhante. Este facto não é surpreendente se tivermos em atenção que a composição química deste material é bastante semelhante à do osso humano e que o tecido ósseo formado nas zonas envolventes dos grânulos apresentava um grau de mineralização significativo.

A Osteopatite® é um material cerâmico que induz um bom comportamento biológico do tecido ósseo onde é implantado, e forma uma ligação perfeita e directa com o tecido ósseo regenerado.

3.3.4. Cimento de Vidro Bioactivo

Amostras com 4 semanas após a implantação

As amostras do cimento de vidro bioactivo, observadas em microscopia electrónica de varrimento, revelaram uma boa integração do material no te-

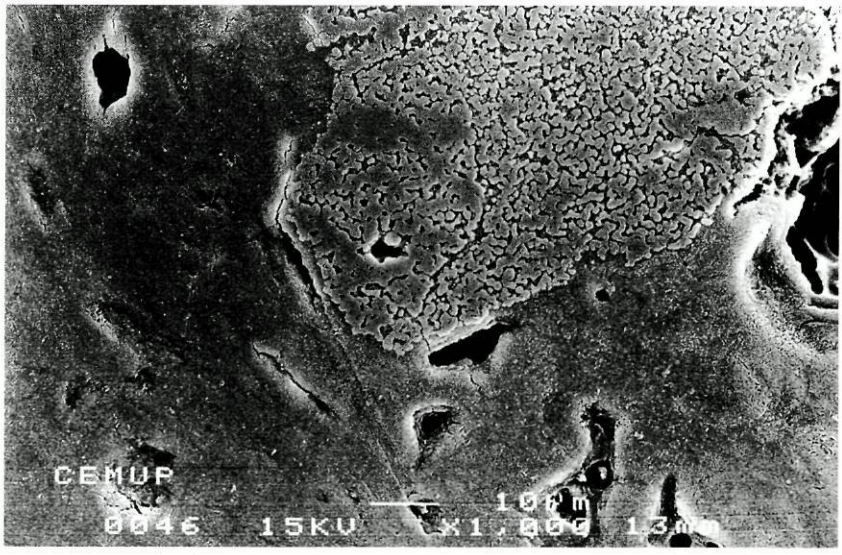


Fig. 84 – **Osteopatite® – 10 semanas. Grânulo rodeado por tecido ósseo. Este tecido apresenta um estado de maior maturação, comparativamente com as amostras de 4 semanas, e um contacto perfeito com a superfície do material. Visualizam-se alguns vasos, com calibre aumentado, dispersos pela matriz do osso formado e em proximidade da superfície dos grânulos. (MEV – Electrões Secundários)**

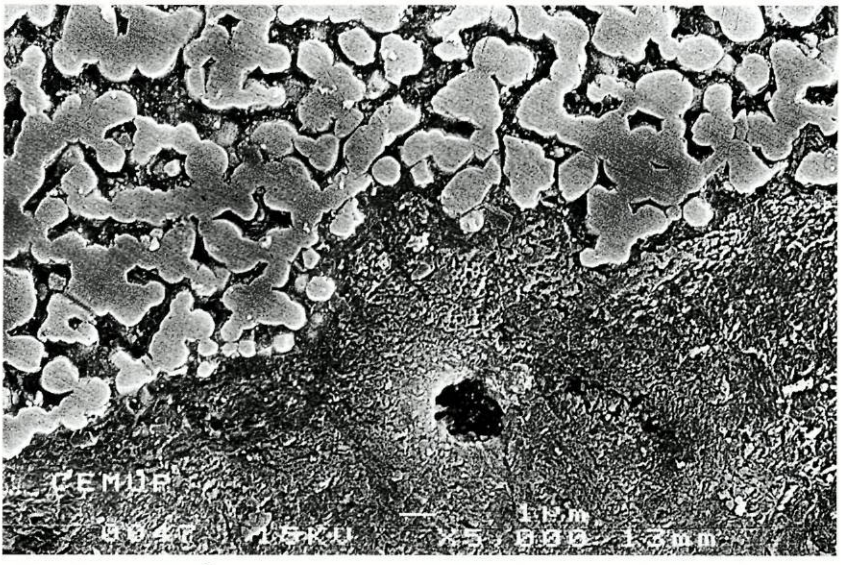


Fig. 85 – **Osteopatite® – 10 semanas. Formação de um tecido ósseo homogéneo que contacta directamente a superfície do grânulo. Este tecido penetra e preenche as porosidades existentes entre as partículas. (MEV – Electrões Secundários)**

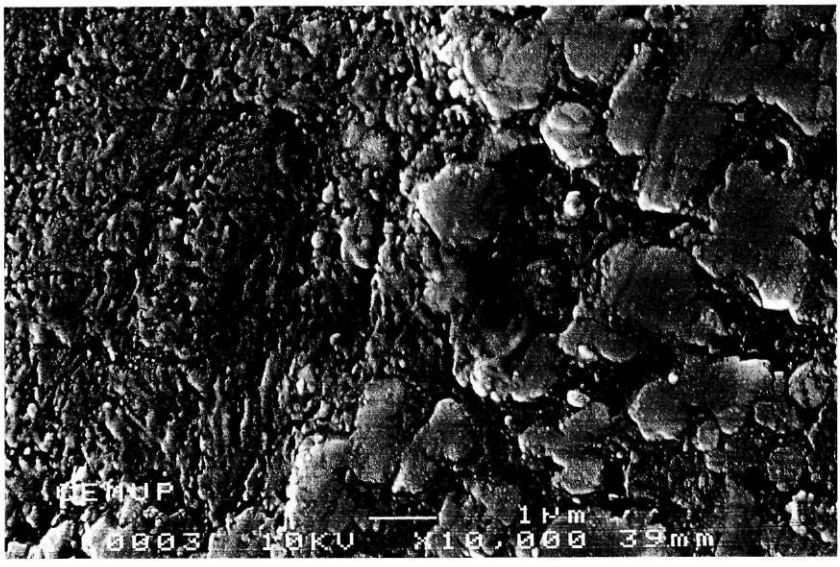


Fig. 86 – Osteopatite® – 10 semanas. Pormenor da zona da interface entre o osso neoformado e a superfície de um grânulo. Nota-se a penetração e preenchimento das irregularidades do grânulo pelo tecido ósseo neoformado. Não se observam sinais de degradação superficial do material. (MEV – Electrões Secundários)

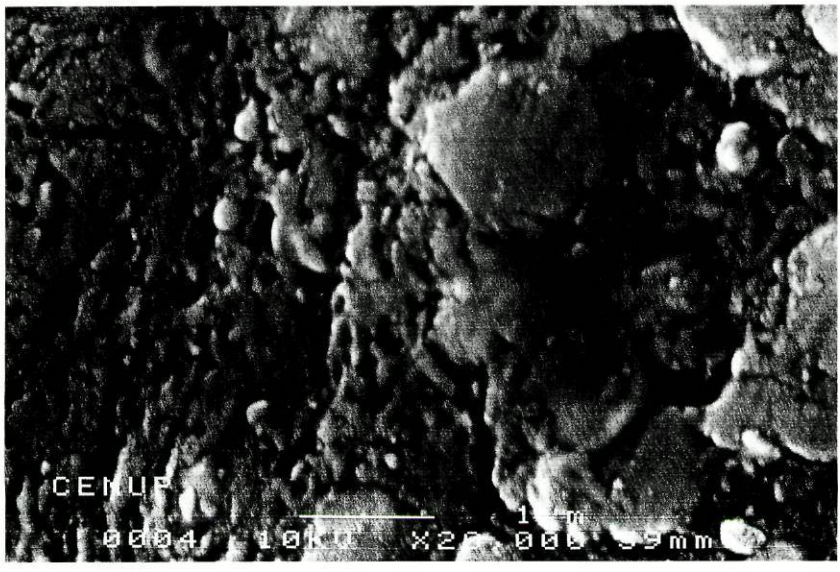


Fig. 87 – Osteopatite® – 10 semanas. Observação da interface através de maior ampliação. É evidente a união entre o tecido ósseo e a superfície do material. As partículas superficiais do material encontram-se totalmente envolvidas pelo tecido ósseo, que penetra nas porosidades. (MEV – Electrões Secundários)

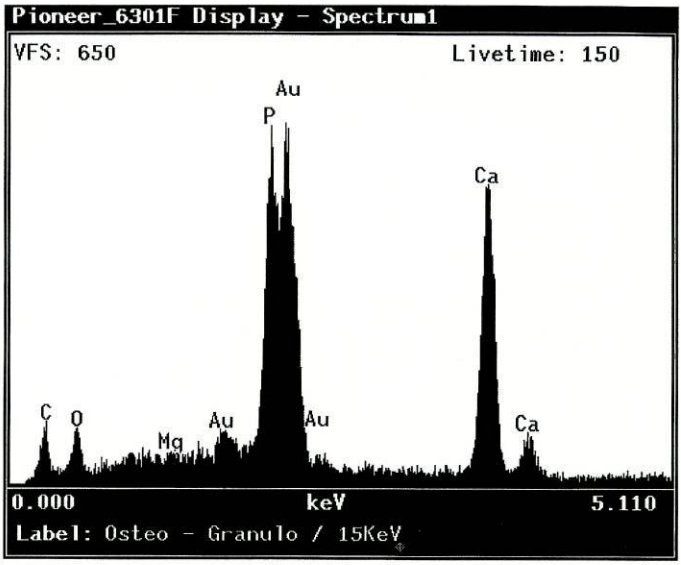


Fig. 88 – **Osteopatite® – 10 semanas. Espectro da composição química de um grânulo implantado. Não se encontram sinais da presença dos iões Na e Mg, constituintes naturais do material. (Microanálise por raios X – EDS)**

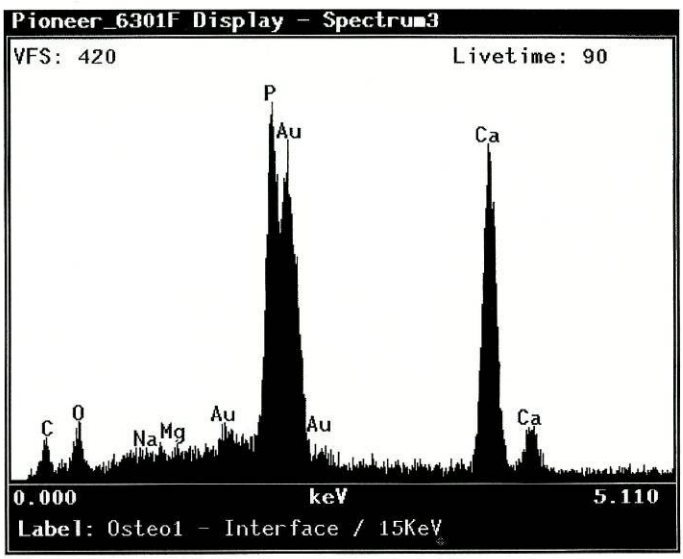


Fig. 89 – **Osteopatite® – 10 semanas. Espectro da composição química do tecido depositado na zona da interface. Este espectro é compatível com um tecido ósseo mineralizado, rico em cálcio e fósforo, apresentando vestígios de Na e Mg. (Microanálise por raios X – EDS)**

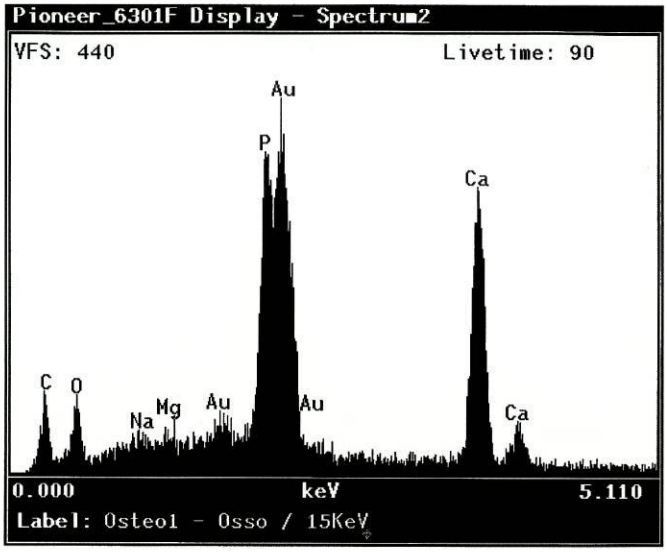


Fig. 90 – **Osteopatite® – 10 semanas. Espectro da composição química do osso próximo da zona da interface. A presença dos iões Ca, P, C e O é característica de um tecido orgânico mineralizado. Também se encontram presentes vestígios de iões de Na e Mg. (Microanálise por raios X – EDS)**

cido ósseo. Verifica-se uma deposição/remodelação de osso na zona da interface e o recobrimento da superfície externa do material, a partir do crescimento de trabéculas ósseas, que se prolongam do periósteo (Fig. 91). O osso formado na proximidade da interface, numa camada com cerca de 300 μm, apresenta características estruturais em conformidade com um estado de remodelação activa. A presença de grandes vasos e o menor grau de mineralização, comparativamente com o osso cortical antigo, são características constantes em todas as amostras observadas.

O osso neoformado adere firmemente à superfície do cimento, mantendo uma união suficiente para resistir às tensões resultantes do vácuo criado pelo microscópio. Estas forças provocam o aparecimento de uma linha de fractura que separa a camada externa do cimento do bloco principal do material (Fig. 92). A linha de fractura é um artefacto que surge durante a observação das amostras, sendo visível o seu aparecimento e crescimento ao longo do campo observado durante a análise das amostras.

O facto destas forças não serem suficientes para separar a camada externa do material do tecido ósseo é um possível indicador da união firme que se estabelece entre o material e o osso neoformado. Por outro lado, o facto

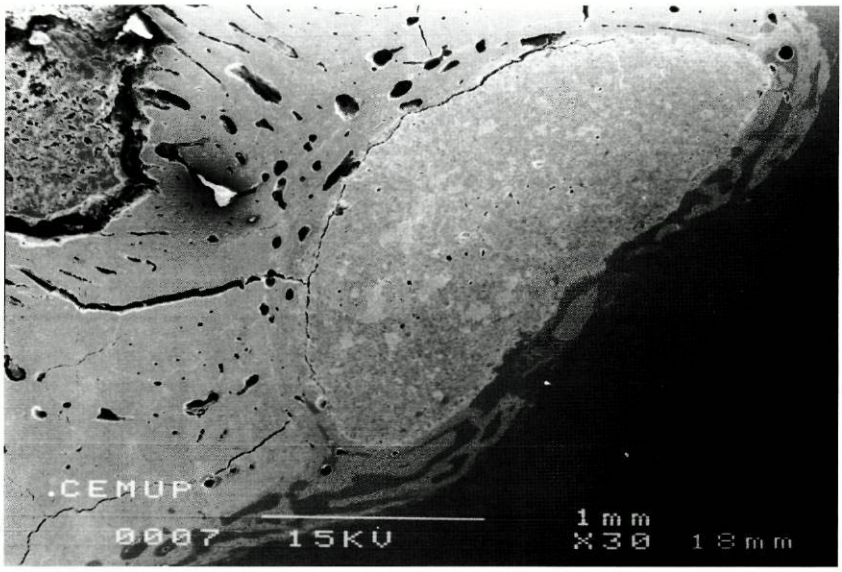


Fig. 91 – Cimento de Vidro Bioactivo – 4 semanas. Formação de tecido ósseo na zona da interface e na superfície externa do cimento. O osso cresce a partir do periósteo, recobrindo a superfície externa do material. Na interface identifica-se uma união directa entre o tecido e o material. (MEV – Electrões Secundários)

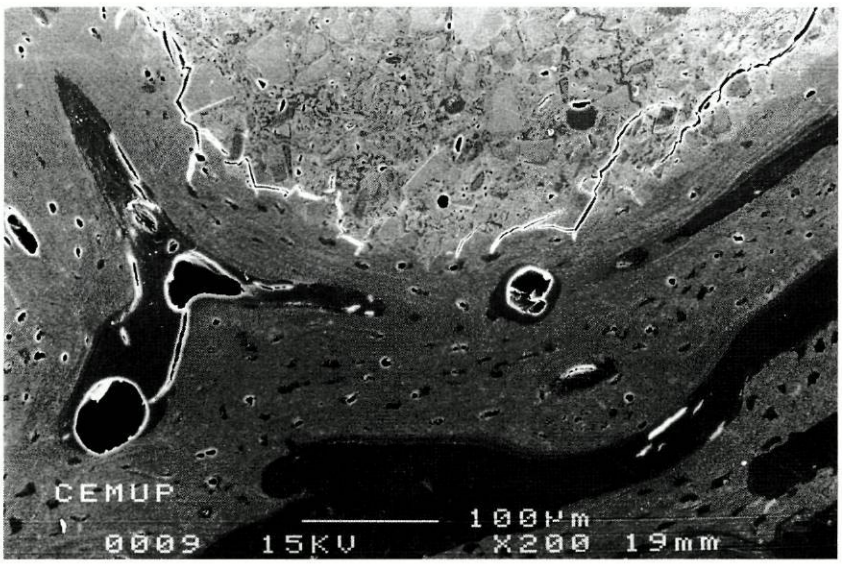


Fig. 92 – Cimento de Vidro Bioactivo – 4 semanas. O osso formado na zona da interface com o material apresenta uma grande riqueza de vasos, alguns com calibre muito aumentado. Existe uma adesão firme entre o cimento e o osso neoformado. (MEV – Electrões Secundários)

desta linha separar uma camada externa do corpo principal do cimento, fenómeno detectado nos outros tipos de análise microscópica, contribuem para a especulação da existência de características estruturais distintas desta camada externa, em consequência de possíveis fenómenos de degradação superficial do cimento. A degradação superficial dos vidros bioactivos é um fenómeno conhecido e aceite como relevante para a formação de uniões estáveis com o tecido ósseo.

Uma análise pormenorizada da zona da interface entre o cimento e o osso regenerado permitiu evidenciar a interposição do tecido ósseo entre as partículas de sílica do material, formando uma zona da adesão perfeita (Fig. 93). Nestas imagens, identificam-se alguns sinais evidentes de degradação superficial do material. A degradação da superfície do material consiste na dissolução da matriz que rodeia as partículas de sílica. Estas partículas mantêm uma morfologia poliédrica constante, indicadora de que não foram ainda sujeitas a fenómenos de degradação (Fig. 94). Os elementos observáveis nesta ampliação da interface, confirmam uma transição gradual e contínua do material para o tecido ósseo, não se observando a deposição de qualquer tecido conjuntivo. A reabsorção da matriz do cimento levou à sua substituição por tecido ósseo, formando uma ligação perfeita entre as duas estruturas.

Amostras com 10 semanas após a implantação

Com o decorrer do tempo do ensaio, observou-se um aumento da quantidade de tecido ósseo formado à volta do cimento de vidro bioactivo. Diminuíram os espaços ocupados por tecido vascular e medular, havendo um recobrimento total da superfície externa do material pelo crescimento ósseo a partir do periósteo. Simultaneamente, verificou-se uma evolução da maturação e diferenciação deste tecido na vizinhança da superfície do cimento, sendo mais difícil estabelecer uma distinção entre o tecido ósseo neoformado e o osso cortical antigo. Na zona da interface entre o material e o tecido ósseo, verifica-se uma interpenetração perfeita do osso neoformado nos espaços entre as partículas do cimento, após reabsorção parcial da matriz (Fig. 95). Este tipo de união entre as duas estruturas motiva uma transição gradual entre o cimento e o osso depositado na sua superfície.

A análise pormenorizada da interface (Fig. 96), confirma a união directa do tecido ósseo à superfície do material, através de interdigitação do osso no cimento, sendo difícil de definir os limites de separação entre as duas estruturas. O contacto perfeito entre o osso e o cimento e a transição gradu-



Fig. 93 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 4 semanas. Pormenor da interface. Verifica-se uma boa união entre o cimento e o osso. A parte externa do material apresenta alguns sinais de degradação da camada superficial. (MEV – Electrões Secundários)**

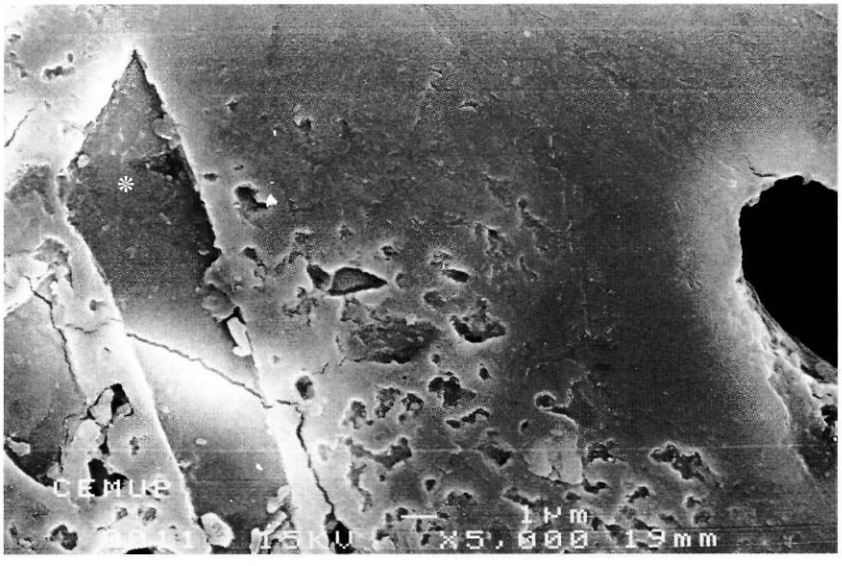


Fig. 94 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 4 semanas. Maior ampliação da zona da interface. As partículas de vidro original (*) mantêm a sua morfologia enquanto que a matriz do cimento sofreu alguma degradação superficial, permitindo a penetração do tecido ósseo nos espaços formados. (MEV – Electrões Secundários)**

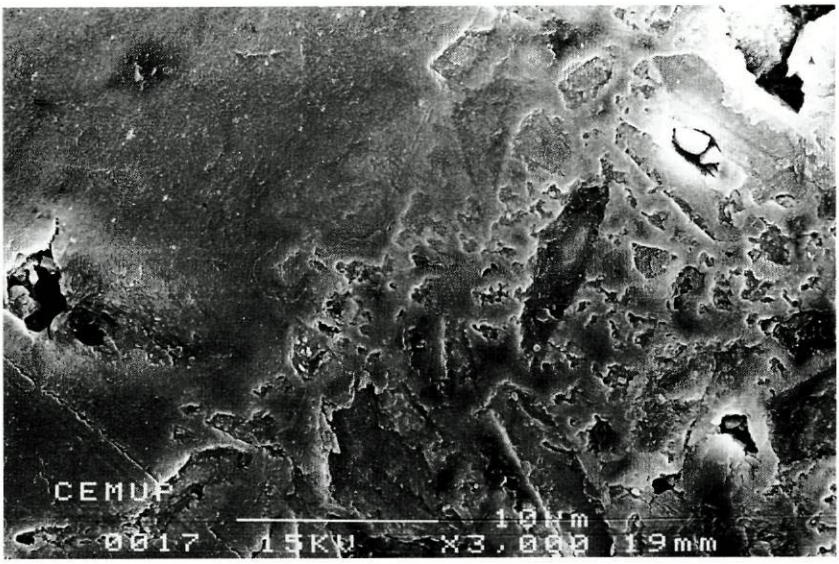


Fig. 95 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. Interface entre a superfície do cimento e o tecido ósseo. Existe uma ligação perfeita entre as duas estruturas. A camada superficial do cimento apresenta alguns sinais de degradação. (MEV – Electrões Secundários)**

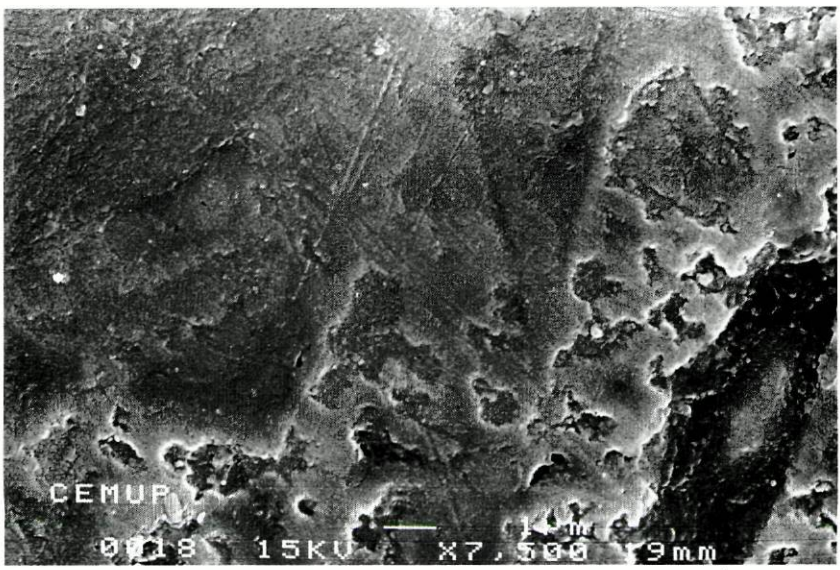


Fig. 96 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. Maior ampliação da zona da interface. Existe uma interpenetração do osso na matriz superficial do cimento, que foi parcialmente reabsorvida. Este facto torna impossível a distinção entre as duas estruturas. (MEV – Electrões Secundários)**

al do material para o tecido ósseo, são demonstrativos da grande capacidade de integração deste material (Fig. 97). Nestas imagens é possível observar uma ligeira alteração da morfologia das partículas de sílica, indicativa dos efeitos de degradação a que são submetidas.

Uma determinação da composição química em alguns pontos seleccionados das amostras, através da microanálise por raios X, revelou a composição do cimento, da zona da interface e do osso cortical. O espectro obtido de um ponto do cimento implantado (Fig. 98) apresenta a predominância do silício isolado, que não pode ser representativo da composição global do material, correspondendo antes a fenómenos localizados de degradação.

Na zona da interface, não se identificaram vestígios da presença de silício (Fig. 99). O espectro obtido é compatível com a presença de uma camada de tecido mineralizado com conteúdo mineral semelhante ao do osso cortical (Fig. 100).

3.4. Histomorfometria

O procedimento necessário para a determinação da percentagem de contacto ósseo directo com a superfície dos implantes, índice de afinidade, incluiu uma avaliação prévia da calibragem do examinador através da determinação do coeficiente de variação intra-examinador (C_V), segundo a metodologia anteriormente descrita.

As medições foram realizadas em seis diferentes fotografias da mesma imagem, obtida por microscopia electrónica de varrimento, na função de electrões retrodifundidos. A selecção da imagem teve em consideração a necessidade de apresentar uma boa definição e um campo de observação que englobasse todo o perímetro do implante em contacto com o tecido envolvente.

As determinações da percentagem de contacto ósseo directo com a superfície do material foram realizadas com intervalos de uma semana, sendo sempre executadas em condições semelhantes e pelo mesmo examinador. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 4.2.

Os valores obtidos nas medições para o cálculo da análise de erro demonstraram um coeficiente de variação intra-examinador (C_V) de 0,01%.

A determinação da percentagem de contacto directo entre a superfície dos implantes e o tecido ósseo foi realizada em imagens obtidas através da função de electrões retrodifundidos, em microscopia electrónica de varrimento, a baixas ampliações (30 X). As imagens foram ampliadas para fotografias com um tamanho padrão de 20x15 cm.

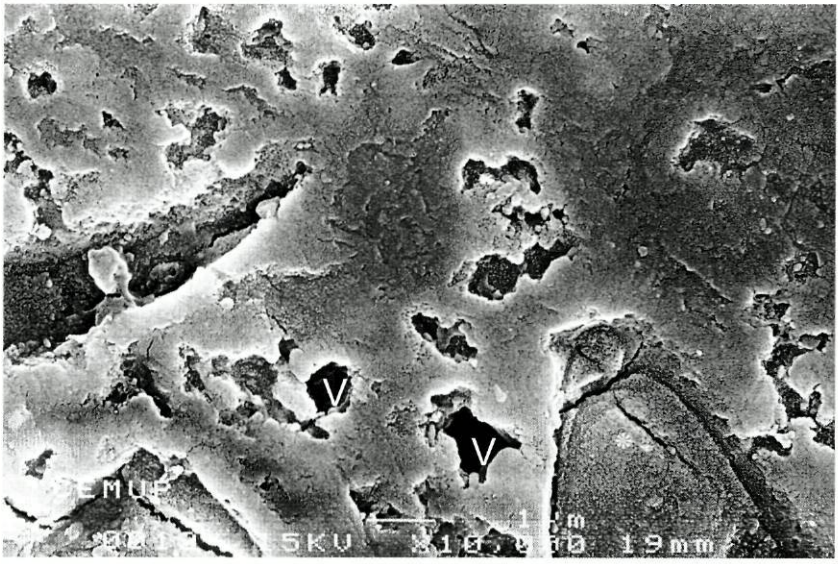


Fig. 97 – Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. Maior pormenor da zona da interface. Nota-se a perfeita integração do material no tecido ósseo. Observa-se alguns sinais de degradação superficial do material. As partículas de vidro original (*) apresentam um aspecto mais arredondado e existem alguns vasos (V) no interior da matriz do cimento. (MEV – Electrões Secundários)

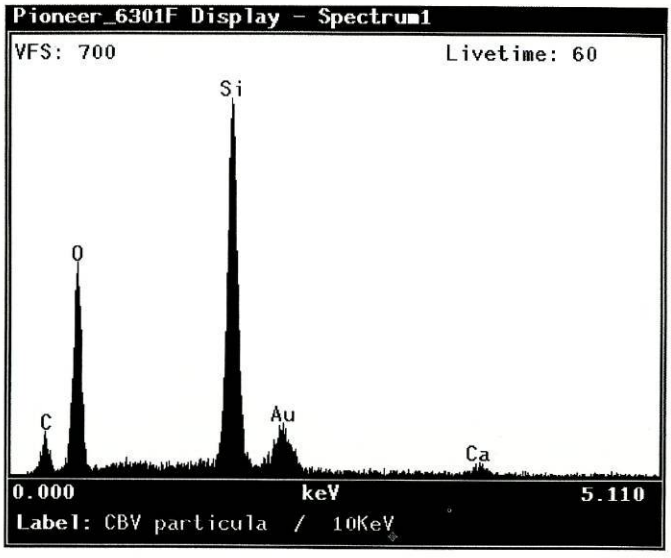


Fig. 98 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. Espectro da composição do cimento implantado num ponto muito próximo da interface. Identifica-se a presença predominante de Si, de compostos orgânicos (C e O) e vestígios de Ca. (Microanálise por raios X – EDS)**

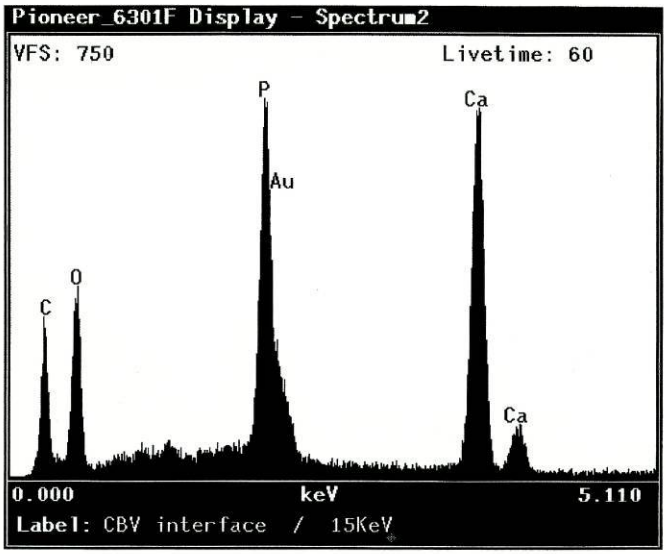


Fig. 99 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. Espectro de um ponto da interface formada entre o cimento e o tecido ósseo (10 μm), correspondente à camada de apatite precipitada. (Microanálise por raios X – EDS)**

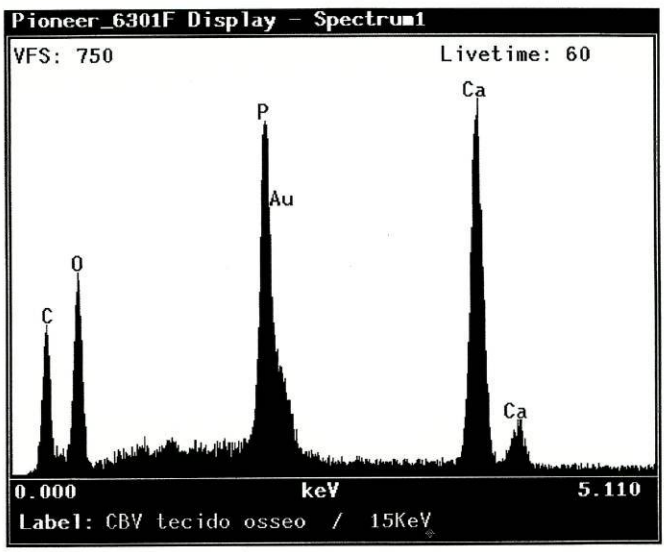


Fig. 100 – **Cimento de Vidro Bioactivo – 10 semanas. Espectro da composição química de uma camada de tecido depositado próximo da zona da interface (200 μm). (Microanálise por raios X – EDS)**

Tabela 4.2 – **Resultados dos valores determinados para a análise de erro**

Medições	*% de contacto ósseo*
1	63,6
2	64,4
3	64,6
4	63,2
5	64,1
6	62,8
Média± desvio-padrão	63,8± 0,7

Os resultados obtidos para os distintos materiais são apresentados na tabela 4.3 e na fig. 101.

Um aspecto a salientar dos resultados obtidos é o incremento que se verifica na percentagem de contacto ósseo com o decorrer do tempo de implantação, que é de 66,7% para o aço inox, 73,8% para o titânio, 27,7% para a Osteopatite® e de 27,2% para o cimento de vidro bioactivo.

Tabela 4.3 – **Resultados da determinação da percentagem do contacto ósseo dos diferentes biomateriais, obtidos através da histomorfometria**

	Aço Inox		**Titânio**		**Osteopatite®**		**Cimento de VB**	
Coelho nº	*4 sem*	*10 sem*	*4 sem*	*10 sem*	*4 sem*	*10 sem*	*4 sem*	*10 sem*
1	0%		17,8%		54,6%		85,7%	
2	2,5%		28,9%		69,7%		51,4%	
3	8,3%		12,8%		72,9%		64,3%	
4		5,8%		29,4%		64,7%		97,8%
5		2,9%		37,8%		85,1%		81,4%
6	6,0%		25,7%		81,3%		62,2%	
7		12,6%		59,0%		94,6%		98,8%
8	0%		29,5%		52,6%		87,9%	
9		0%		47,6%		92,3%		93,9%
10		7,8%		44,8%		77,8%		72,9%
11	4,6%		34,1%		61,3%		72,5%	
12		6,7%		39,8%		84,4%		94,7%
Média	3,6%	6,0%	24,8%	43,1%	65,4%	83,2%	70,7%	89,9%
d. padrão	3,4%	4,3%	8,0%	10,0%	11,2%	10,9%	14,2%	10,4%

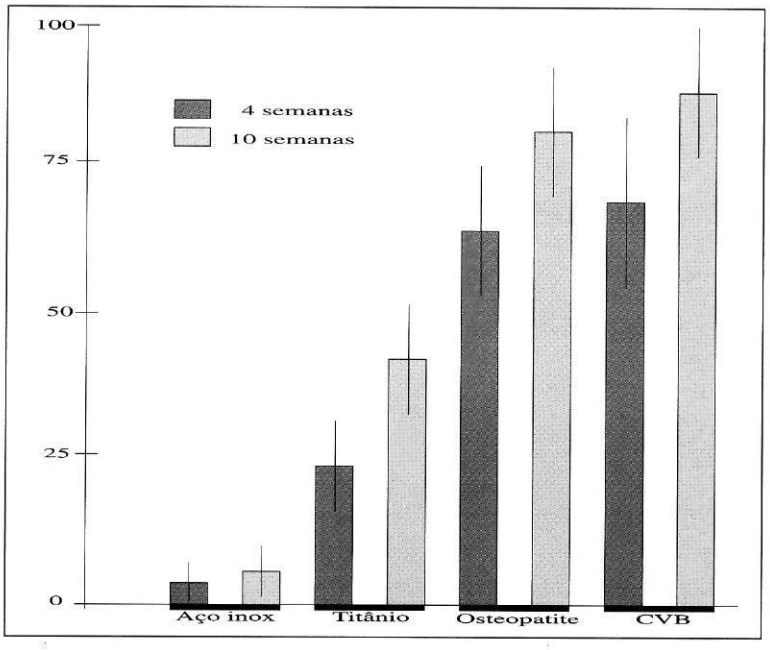


Fig. 101 – **Resultados da determinação do contacto ósseo dos diferentes biomateriais (média ± desvio-padrão). CVB - Cimento de vidro bioactivo.**

A percentagem de contacto ósseo do aço inox é significativamente inferior ($p<0,05$; teste de Wilcoxon), comparativamente com todas as outras amostras para o mesmo tempo de implantação. O titânio apresenta uma percentagem de contacto ósseo significativamente superior ao aço inox e significativamente inferior às amostras de Osteopatite® e cimento de vidro bioactivo ($p<0,05$; teste de Wilcoxon), para os mesmos tempos de implantação. A Osteopatite® e o cimento de vidro bioactivo apresentam uma percentagem de contacto ósseo significativamente superior às amostras metálicas, não existindo diferenças estatisticamente significativas entre estes dois materiais, para os mesmos tempos de implantação ($p<0,05$; teste de Wilcoxon).

V

DISCUSSÃO

O conjunto de resultados apresentados no capítulo anterior demonstra que, para além dos factores comuns, inerentes ao modelo animal e à técnica cirúrgica, existem interacções distintas entre os quatro biomateriais e o tecido ósseo cortical do Coelho.

Consideramos, também, que as reacções na interface entre os biomateriais e o tecido ósseo correspondem a fenómenos importantes na determinação da sua biocompatibilidade. Este facto é aceite pela generalidade dos investigadores, salientando-se a importância deste tipo de estudos na avaliação do comportamento dos tecidos vivos, após a implantação de biomateriais [53].

O sucesso clínico da utilização dos biomateriais, em implantologia oral, pressupõe uma perfeita integração dos implantes nos tecidos envolventes, recuperando e substituindo as características morfofuncionais dos tecidos ou órgãos que visam substituir. No estudo das interacções entre biomateriais e tecido ósseo é necessário salientar que existe um conjunto multifactorial de parâmetros que interferem e condicionam o processo de integração e, consequentemente, a união entre os materiais e os tecidos onde são implantados.

A resposta do tecido hospedeiro à colocação de um biomaterial é avaliada através da observação morfológica e histológica dos tecidos que envolvem o implante e, em função do comportamento desses tecidos, define-se o tipo de biocompatibilidade do material [53].

Neste trabalho foi realizada esta avaliação através da utilização das microscopias óptica, de fluorescência e electrónica de varrimento. Complementámos, por histomorfometria, os dados histológicos recolhidos com a determinação do índice de afinidade, percentagem de contacto directo entre os materiais e o osso neoformado. Finalmente, efectuamos a caracterização química elementar de diversas estruturas, através da microanálise por raios X (EDS).

Os resultados obtidos permitiram-nos verificar a existência de respostas específicas do osso cortical para cada um dos materiais utilizados, embora tenham sido também observados comportamentos gerais, comuns a todos. Estas respostas inespecíficas não dependem essencialmente das características dos biomateriais utilizados, mas sim da capacidade reparadora intrínseca do tecido ósseo, em resposta ao trauma que lhe é induzido pela intervenção cirúrgica.

Um aspecto a realçar, que foi observado em algumas das amostras estudadas, é a existência de vários artefactos que condicionam significativamente o valor dos resultados obtidos. Um exemplo foi a identificação da sobreposição de distintos campos de focagem, nos cortes com espessura superior a 50 μm, observados em microscopia óptica e de fluorescência. Na análise dos resultados histológicos, é fundamental ter em consideração o método seleccionado de preparação histológica. Sendo uma metodologia complexa, torna-se essencial a identificação e eliminação dos artefactos que facilmente podem ser criados durante as várias fases de preparação das amostras.

Uma das maiores dificuldades nas técnicas de preparação histológica, de tecidos duros não desmineralizados, reside na obtenção de cortes muito finos das amostras [241].

Durante a observação de alguns exemplares, em microscopia electrónica de varrimento, foram observadas linhas de fractura ou fendas, provocadas pelas tensões geradas pelo vácuo do equipamento. Quando submetidos a vácuo elevado, devido às diferenças estruturais, os tecidos orgânicos e os biomateriais apresentam graus de contracção distintos que podem provocar estas linhas de fractura. Este tipo de artefactos também é referenciado por outros autores, que utilizaram técnicas semelhantes de preparação das amostras para microscopia electrónica de varrimento [7, 96, 159, 167, 183, 244].

Os cortes histológicos, obtidos através da técnica de corte e desgaste descrita no capítulo III, apresentaram uma variação média de espessura entre os 30 e 60 μm. Estas diferenças de espessura foram significativas no caso das amostras a seccionar incluírem implantes metálicos. Foi extremamente difícil conseguir obter cortes com espessura inferior a 50 μm, sem remover os pinos metálicos (Fig. 26). Em consequência da espessura elevada tivemos dificuldades na interpretação de algumas lâminas, principalmente em microscopia de fluorescência (Figs. 57 e 58). No caso dos materiais cerâmicos foi mais fácil a diminuição da espessura das amostras sem danificação das zonas mais importantes para o estudo.

A avaliação da interface dos biomateriais com o tecido ósseo, e da sua ultraestrutura, teve em consideração a influência dos artefactos produzidos pela técnica histológica.

A produção de falsas imagens aparentando contacto directo do osso com o material é um aspecto reconhecido por vários autores [96, 182].

A resolução histológica da zona da interface depende do ângulo e da espessura da secção da amostra. Sendo bastante difícil controlar o ângulo de corte, a única forma de diminuir a probabilidade de falsas imagens é reduzir a espessura das secções, para evitar a sobreposição dos diferentes planos de focagem do microscópio.

Com a utilização da microscopia electrónica de varrimento pretendeu-se não só confirmar o contacto físico directo entre os biomateriais e o tecido ósseo, que pode ser obtido através da microscopia óptica [41], mas também observar a sua adesão física e química [167].

Com o decorrer do ensaio, observou-se um incremento na quantidade e qualidade de tecido ósseo neoformado à volta de todos os biomateriais bem como um aumento quantitativo e qualitativo do tipo de osso neoformado na zona da interface, com maior grau de maturação e mineralização. Estes resultados vêm de encontro aos apresentados por diversos investigadores, em ensaios que seguiram metodologia semelhante [22, 25, 73, 101, 151, 177].

A informação mais relevante sobre as interacções dos biomateriais com os tecidos orgânicos foi obtida através da análise ultraestrutural da interface. Sendo um local altamente dinâmico, desempenha um papel essencial e crítico na determinação da integração dos biomateriais nos tecidos envolventes e, consequentemente, no sucesso a longo prazo dos implantes.

O estudo da interface é habitualmente realizado através do recurso a várias técnicas histológicas específicas e observações em diferentes tipos de microscopia. Se é possível fazer uma caracterização estrutural pormenorizada desta zona, ainda continuam a existir algumas limitações na compreensão de vários dos fenómenos celulares e moleculares que aqui ocorrem. Este facto resulta das grandes limitações inerentes à metodologia de preparação de secções muito finas (< 10 µm) das amostras de tecidos duros, sem se proceder à descalcificação dos tecidos e/ou dos biomateriais [241].

A utilização de culturas celulares permite compreender alguns dos fenómenos isolados que ocorrem a nível ultraestrutural, mas a extrapolação dos resultados para os ensaios in vivo ainda levanta muitas reservas. No caso concreto de um dos biomateriais utilizados neste trabalho, a Osteopatite®, ocorreram dificuldades na realização de ensaios com culturas de osteoblastos

do osso alveolar humano, devido às alterações do meio de cultura, induzidas pela troca iónica do material com esse meio. Como se observou neste trabalho, estas alterações, que se revelam benéficas no comportamento in vivo deste material, interferem significativamente com a viabilidade das células em cultura, quando se utilizam discos com 5 mm de diâmetro e 1 mm de altura, em placas normalizadas para culturas celulares de 96 poços. Tal facto é motivado pela quantidade limitada do meio de cultura (100 µl) que é colocado em cada poço, e pela troca iónica deste material com o meio envolvente, que produz uma elevação do pH pouco compatível com o desenvolvimento normal das células em cultura.

A caracterização dos tipos de adesão, que se podem formar entre os tecidos e a superfície de vários biomateriais, tem sido apresentada através da descrição de várias microestruturas na zona da interface. É referida a presença de uma camada electrodensa na interface do tecido ósseo e a superfície de vários materiais, entre os quais se contam o aço inox 316L [248], o titânio [249, 250], a hidroxiapatite [141, 183, 251] e os vidros bioactivos [252]. Esta camada, composta por mucopolissacarídeos, glicosaminoglicanos e proteínas [248, 249, 253], podendo funcionar como uma camada adesiva do tecido ósseo à superfície dos materiais, foi sempre observada em amostras descalcificadas ou em culturas celulares. Pelo facto de não ser normalmente identificada em amostras não descalcificadas, como no caso deste estudo, somos levados a considerar que, eventualmente, esta estrutura possa resultar de um artefacto produzido pelo processo de descalcificação. Contudo, alguns investigadores referem que a inobservância desta estrutura em amostras não descalcificadas assenta no facto dos depósitos de tecido ósseo, na zona da interface, impedirem a sua observação [248].

A determinação quantitativa da percentagem de tecido ósseo, que contacta directamente a superfície do material, é um elemento fundamental na caracterização do comportamento biológico dos biomateriais. Existem várias técnicas que permitem quantificar a percentagem do contacto directo com o tecido ósseo, recorrendo a imagens obtidas em microscopia óptica, electrónica de varrimento e microrradiografia [25, 38, 39, 59, 118, 149-151, 177, 180, 187].

Neste trabalho, utilizámos imagens obtidas por microscópia electrónica de varrimento, na função de electrões retrodifundidos, por serem consideradas mais elucidativas na distinção perfeita entre o tecido ósseo mineralizado e os tecidos não mineralizados, presentes na zona da interface [178, 189, 242, 243]. Este tipo de metodologia permite fazer uma distinção nítida entre

as estruturas que apresentam graus de mineralização diferentes, dependentes do número atómico médio das estruturas analisadas.

Segundo Bloebaum e col. [189], os estudos onde são apresentados resultados de recobrimento completo dos implantes sem utilização de imagens obtidas através desta técnica devem ser analisados com cepticismo, porque os únicos métodos de observação onde se obtêm uma caracterização tecidular, em função do seu conteúdo mineral, são a microrradiografia e os electrões retrodifundidos.

De forma a melhor caracterizar, sobre o ponto de vista da composição química, as várias estruturas observadas no espaço circundante dos implantes, realizamos, na zona da interface, microanálise por raios X (EDS) em pontos seleccionados. Os traçados obtidos permitiram verificar a existência de elementos importantes na identificação mais exacta dos graus de mineralização tecidular, a observação de fenómenos de degradação superficial dos materiais e a presença de vestígios de alguns elementos dos implantes (Figs. 76, 77, 78, 88, 89, 90, 98, 99 e 100).

Através da análise das imagens foi possível avaliar algumas das composições químicas destas estruturas, identificando-se vários fenómenos que ocorreram durante o processo de integração dos biomateriais no tecido ósseo, quer a nível de modificações superficiais dos diferentes biomateriais quer durante a evolução das camadas tecidulares formadas próximo da superfície dos implantes.

Para além destes aspectos gerais, foram observados comportamentos específicos de cada biomaterial, que serão discutidos seguidamente.

1. Aço Inox 316L

Os resultados obtidos neste trabalho justificam uma limitação da utilização clínica do aço inox como material implantar permanente, o que está em concordância com a generalidade dos autores [82].

A comprovação da ausência de contacto directo com o tecido ósseo e o conhecimento sobre a libertação de iões potencialmente tóxicos condicionam a utilização clínica destes materiais, de acordo com os padrões de biocompatibilidade actualmente exigidos [42, 66, 191].

Apesar destes efeitos indesejáveis, este material continua a ser utilizado ainda em algumas aplicações ortopédicas, principalmente na fixação e imobilização temporária de fracturas ósseas [174].

Conforme observámos através dos diversos tipos de microscopia utilizados, este material é biotolerado pelos tecidos orgânicos, induzindo a formação de uma camada de tecido fibroso na zona da interface, que impede qualquer tipo de ligação física aos tecidos envolventes (Figs. 22, 27, 29, 54, 60, 64, 65), facto que é frequentemente referido na literatura e aceite pela generalidade dos investigadores [82]. Contrariamente, em ensaios in vitro, parece existir um contacto dos osteoblastos em cultura com os discos de aço inox, em cuja superfície, passivada durante 30 minutos em ácido nítrico a 30%, se verificou também a deposição de uma matriz extracelular [248]. Estes resultados devem ser analisados à luz das limitações destes ensaios, referenciadas no capítulo II.

A implantação de pinos de aço inox 316L no osso cortical dos coelhos, permitiu observar a deposição de uma camada de tecido fibroso, interposta entre a superfície dos implantes e o osso neoformado (Figs. 29 e 60). Os vários tipos de análise histológica confirmaram sempre a presença desta camada de tecido fibroso, verificando-se, nalgumas imagens, a orientação paralela dos feixes de fibras, incluídos na matriz do tecido conjuntivo, relativamente à superfície dos implantes (Fig. 60). Esta camada tecidular diminuiu de espessura com o tempo de ensaio, tendo-se verificado uma redução da espessura da camada fibrosa nas amostras com 10 semanas, comparativamente às de 4 semanas de implantação.

Face a estes dados podemos afirmar que o tempo de implantação é um parâmetro que condiciona significativamente a maturação e a diferenciação dos tecidos neoformados na interface dos implantes de aço inox com o osso, facto que é corroborado por outros investigadores [164, 174].

Comparativamente com o titânio comercialmente puro, o aço inox 316L caracteriza-se por, numa fase inicial, induzir uma resposta fibrocítica mais baixa, mas, com o decorrer do tempo, esta resposta celular não sofre qualquer redução, contrariamente ao que se verifica nos implantes de titânio [160].

A análise do comportamento do tecido ósseo, após a implantação dos pinos de aço inox 316L, leva-nos a especular que o crescimento e a neoformação de tecido ósseo verificados na proximidade da superfície dos pinos se deveu, predominantemente, aos mecanismos intrínsecos da reparação óssea em resposta ao trauma mecânico sofrido durante o processo de colocação dos implantes. É importante salientar que a zona de remodelação do tecido ósseo, junto da interface, depende muito da adaptação do implante às paredes do defeito ósseo. Neste trabalho, houve a preocupação de realizar orifícios no tecido ósseo com dimensões uniformizadas em todo o

perímetro, por forma a permitir contacto perfeito entre as paredes do defeito ósseo e toda a extensão da superfície dos implantes.

Esta metodologia foi resultante das conclusões obtidas em estudos experimentais por nós realizados anteriormente, em que a falta de uniformização dos orifícios provocou má adaptação dos implantes, motivando o aparecimento de grande quantidade de tecido fibroso e espaços aparentemente vazios, que provavelmente promoveram o aparecimento de fenómenos de micromovimentos nos implantes, condicionando significativamente o tipo de neoformação do tecido ósseo, conforme descrito no capítulo II.

Refira-se, no entanto, que apenas temos a certeza de uma adaptação perfeita entre os pinos e as paredes ósseas se os implantes tiverem forma de rosca, e forem colocados sobre pressão, pelo que nunca pode ser totalmente excluída a possibilidade da existência de zonas pontuais de mau contacto da superfície dos pinos com as paredes ósseas dos orifícios, usando a metodologia preconizada neste trabalho.

O valor médio da percentagem de contacto directo entre estes implantes e o tecido ósseo foi baixo, respectivamente de 3,6± 3,4% para as amostras com 4 semanas e de 6,0± 4,3% para as amostras com 10 semanas após a implantação (tabela 4.3).

O facto de termos mesmo assim considerado algumas zonas como possuindo contacto directo com o osso, deve-se seguramente a uma limitação na distinção entre contacto e não contacto ósseo, motivada pelas baixas ampliações com que foi determinado este parâmetro. A figura 13 é exemplificativa das dificuldades inerentes a este procedimento e da possibilidade significativa de medir falsos contactos.

Esta hipótese é avançada em consequência de alguns factos verificados durante as nossas observações. Em primeiro lugar, a análise pormenorizada da zona da interface mostrou nunca existir um verdadeiro contacto entre o osso e o material. Nas poucas situações em que se verificou proximidade entre o tecido ósseo e a superfície do material, concluiu-se que correspondia, fundamentalmente, a um fenómeno de adaptação do tecido às irregularidades do material e não a uma verdadeira união física. Em segundo lugar, e no seguimento desta falta de adesão do material ao osso, alguns pinos foram facilmente removidos durante o processo de preparação histológica. Este fenómeno é suficientemente comprovativo da falta de retenção mecânica do material no tecido ósseo neoformado.

A observação das amostras de aço inox em microscopia electrónica de varrimento, implicou a necessidade de serem submetidas ao vácuo elevado

deste equipamento, verificando-se a formação de uma fenda de separação entre os pinos e os tecidos neoformados na interface. Este fenómeno poderá ser atribuído ao diferente grau de contracção apresentado pelos pinos metálicos e pelas estruturas orgânicas. Tendo sido observado apenas com este material, pode ser indicativo de que não existem forças de adesão suficientemente fortes para manterem a ligação entre a superfície destes implantes e os tecidos.

Algumas amostras preparadas para observação em microscopia óptica e de fluorescência também mostraram a formação de um espaço, aparentemente não preenchido por qualquer tecido, na zona da interface. A criação deste artefacto poderá ser motivada por um mecanismo diferente do observado para a microscopia electrónica de varrimento, sendo, provavelmente provocado pela retracção dos tecidos durante a fase de desidratação [167]. Como o processo de desidratação é idêntico para todas as amostras, poder-se-á pensar que o mesmo fenómeno ocorreu durante a preparação dos exemplares para observação em microscopia electrónica de varrimento. No entanto, e contrariando este pressuposto, identificámos a formação e o aumento das fendas, que interpretámos como sendo indicadores dos efeitos das tensões criadas nestas amostras pelo vácuo do equipamento.

Neste estudo não foram controlados alguns parâmetros que condicionam o comportamento do tecido ósseo após a colocação de implantes, tais como a caracterização da superfície dos implantes e a sua fixação firme ao tecido ósseo.

A superfície dos implantes não sofreu qualquer tipo de tratamento específico e as irregularidades apresentadas pelos pinos foram, fundamentalmente, uma consequência da metodologia de fabrico dos pinos metálicos, através de um processo de maquinagem normal.

No que respeita à fixação dos pinos de aço inox, estes foram colocados sob pressão e bem adaptados aos orifícios ósseos. Além disso, e apesar dos animais serem colocados em liberdade absoluta, o local de colocação dos biomateriais estava protegido de forças de carga directa ou possíveis movimentos dos implantes. Todavia, e devido ao facto dos pinos não serem roscados, não pode ser totalmente excluída a hipótese de, pontualmente, existir uma má adaptação do material ao osso e aparecerem fenómenos de micromovimentos limitados, podendo condicionar a formação e a diferenciação tecidular na zona da interface [122].

De qualquer forma, os resultados obtidos com o aço inox 316L onde se verificou a existência generalizada de uma camada de tecido fibroso inter-

posta entre o tecido ósseo neoformado e a superfície dos implantes, não podem ser atribuídos a uma técnica experimental incorrecta, mas sim às propriedades intrínsecas do material que o identificam como biotolerado enquanto que o titânio, submetido à mesma metodologia experimental apresentou um comportamento significativamente diferente.

2. Titânio

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam que o titânio comercialmente puro é um material que, por apresentar boas propriedades mecânicas e ter capacidade de osseointegração, pode ser amplamente utilizado como material implantológico. A formação de um contacto directo com o tecido ósseo é um facto confirmado por vários trabalhos experimentais [150, 166], que têm validado o conceito de osseointegração, introduzido por Brånemark há quase trinta anos [31, 41].

Existe alguma controvérsia quanto ao tempo necessário para a obtenção da integração dos implantes de titânio no osso cortical dos coelhos. Os nossos resultados indicam que este fenómeno ocorrerá entre as 4 e as 10 semanas, após a implantação dos pinos de titânio e são confirmados por outros trabalhos onde é indicada a sexta semana como sendo o período onde se verifica o processo de osseointegração [148, 167], embora Jansen e col. [166] refiram ter observado este fenómeno duas semanas após a colocação de implantes de titânio na tíbia do Coelho.

Verificamos também que as reacções na interface do osso com os implantes de titânio não são condicionadas apenas pelas propriedades intrínsecas do material, mas também por factores que incluem a técnica cirúrgica e as tensões a que o implante é submetido imediatamente após a sua colocação.

Não foi dada muita relevância neste trabalho à influência do tipo de superfície dos implantes, devido ao processo de maquinagem dos pinos de titânio ter sido idêntico ao adoptado para os de aço inox. Por esta razão as irregularidades superficiais dos dois materiais não poderão ser justificativas dos distintos comportamentos biológicos verificados.

De forma geral, os pinos de titânio mostraram boa biocompatibilidade, estabelecendo uma percentagem significativa de contacto directo com o tecido ósseo, sem interposição de qualquer camada de tecido fibroso. Observou-se a deposição de tecido ósseo imaturo, numa camada próxima da zona da interface, contactando directamente com grande parte da superfície dos

implantes. Esta camada de formação/remodelação óssea diminuiu de espessura com o decorrer do ensaio, aumentando, simultaneamente, o seu grau de mineralização e de diferenciação estrutural.

As amostras com 10 semanas, analisadas por microanálise de raios X (EDS), permitiram obter um valor de cerca de 1,89 para a relação Ca/P, existente em alguns pontos do tecido ósseo neoformado, correspondendo à deposição de um conteúdo mineral superior ao do tecido ósseo que é de 1,67. Este valor elevado tem que ser avaliado, tendo em conta a metodologia utilizada [230]. No entanto, a obtenção destes valores confirma, pelo menos, o facto de se tratar de um tecido ósseo mineralizado, depositado na zona envolvente dos implantes de titânio.

O conjunto das observações histológicas realizadas, confirma o conceito de osseointegração do titânio comercialmente puro [12, 31, 32, 41, 42]. O contacto directo da superfície dos implantes com o tecido ósseo neoformado foi observado por microscopia óptica e confirmado, em maiores ampliações, em microscopia electrónica de varrimento. As observações numa resolução superior (Fig.75), através da microscopia electrónica de varrimento, permitiram confirmar claramente a adesão do tecido ósseo à superfície destes implantes para além de um simples contacto físico [167].

Contrariamente ao que se verificou nas amostras de aço inox (Fig. 67 e 68), a força de adesão entre as estruturas da interface é suficientemente forte para resistir às tensões provocadas pelo vácuo do microscópio electrónico de varrimento. Este facto permitiu concluir que a união entre os implantes e os tecidos envolventes é mais forte do que a ligação entre as estruturas da matriz do tecido neoformado, demonstrando boa integração do material no tecido ósseo.

O mesmo tipo de comportamento não é referenciado para a liga de titânio Ti6Al4V. Nesta liga foi observada a deposição, em muitas zonas da interface, de uma membrana fina de tecido fibroso, existindo poucos locais onde houve deposição óssea directamente na superfície dos implantes, 4 semanas após a sua colocação no fémur de Cão [73].

A caracterização ultraestrutural da interface dos implantes de titânio com o tecido ósseo, apresentou algumas limitações neste trabalho, pelo que não foram identificadas as estruturas referenciadas em outros estudos, realizados *in vitro* [254] e *in vivo* [116]. De facto, não foi possível confirmar a existência de qualquer camada ultraestrutural, entre a superfície do titânio e os tecidos envolventes, com as metodologias de análise utilizadas.

Alguns estudos referem a presença de uma zona amorfa, electrodensa, com alguns nanómetros de espessura, depositada directamente na superfície do material pela matriz extracelular das células osteoblásticas [116, 254]. Esta camada é constituída por aglomerados de fosfatos de cálcio e substâncias proteicas que funcionam como uma substância cimentante que promove a união tecidular à superfície do material. A formação deste tipo de interface *in vitro*, segue um processo semelhante à produção, pelos osteoblastos, da linha cimentante, na periferia dos sistemas haversianos [254]. Esta estrutura interpõe-se entre a superfície do titânio e a zona fibrilar, precursora da matriz óssea que possui um alto conteúdo de fibras de colagénio tipo I.

A técnica de preparação das amostras não descalcificadas e a resolução dos equipamentos microscópicos utilizados não nos permitiram atingir estes níveis de análise. Todavia, confirmámos a adesão directa e firme entre o tecido ósseo e a superfície dos implantes em ampliações significativas. Mesmo quando os tecidos foram sujeitos a tensões que provocaram o aparecimento de linhas de fractura na matriz neoformada não se perdeu a aderência à superfície dos implantes.

Um fenómeno observado nalgumas amostras foi a neoformação de osso, a partir do endósseo, para a cavidade medular e que envolveu parte significativa da superfície dos pinos de titânio colocados neste espaço anatómico (Figs. 34 e 71). Foram perfeitamente identificadas as pontes ósseas que uniram o endósseo ao osso neoformado que rodeava a parte dos implantes localizada na cavidade medular. Esta capacidade osteocondutora dos implantes de titânio, colocados na tíbia de coelhos, também é apontada em trabalhos de outros autores [151, 166]. Porém, e contrariamente ao que é afirmado nesses trabalhos, consideramos que a pretensa capacidade osteocondutora do titânio não é determinante para o crescimento ósseo na cavidade medular. Deve ter-se em consideração que durante o processo de trepanação do osso cortical até à cavidade medular, para a realização dos orifícios onde são colocados os implantes, se libertam pequenos fragmentos de osso que se depositam na cavidade medular, podendo, potencialmente, funcionar como núcleos indutores do crescimento ósseo.

Esta hipótese fundamenta-se, também, nos resultados de vários estudos que referem a necessidade dos implantes de titânio se encontrarem bem adaptados às paredes ósseas para haver neoformação óssea em contacto directo com o material [56, 61, 209].

A detecção de vestígios de titânio nos tecidos neoformados na camada circundante dos implantes foi uma observação que levantou algumas ques-

tões, por não existir inicialmente uma explicação plausível para este facto. A consulta de alguns trabalhos publicados foi fundamental para esclarecer os mecanismos possivelmente implicados neste processo de deposição do titânio nos tecidos envolventes dos implantes [65, 82, 169, 209, 255-257].

Embora não tenham sido determinados os valores absolutos da quantidade de titânio presente nos tecidos, identificámos vestígios da sua presença através da microanálise por raios X (EDS). A presença de vestígios de titânio distribuiu-se por uma camada com cerca de 200 a 250 μm de espessura, correspondente ao tecido ósseo neoformado, entre o osso cortical antigo e a superfície dos pinos.

Inicialmente, foi atribuída a origem deste elemento a uma possível contaminação, por dispersão de fragmentos do material para os tecidos envolventes, durante o processo de preparação das amostras. A confirmação da presença localizada do titânio, em várias amostras, na camada tecidular neoformada e não no tecido ósseo cortical antigo, aliada ao facto de alguns pontos de determinação estarem próximos do tecido ósseo cortical, permitiu avançar com a hipótese de que existiu uma deposição preferencial no tecido ósseo neoformado. Este fenómeno poderá ser originado por um processo de difusão a partir dos implantes de titânio [65, 82, 169, 209, 257].

A presença de vestígios de titânio na camada de tecido neoformado foi identificada próximo da interface, em pontos distando entre 10 e 200 μm da superfície dos implantes. A interpretação destes resultados não pode excluir a importância da localização dos pontos analisados. No caso do ponto analisado se localizar muito próximo da superfície do implante, a menos de 1 μm, poderá levar a que ocorram fenómenos de interferência no espectro recolhido, por fenómenos de vizinhança do material [230], conforme se pode inferir através da interpretação da figura 2.

A resolução em profundidade e lateralidade é um factor essencial na avaliação da informação obtida por medidas pontuais, através das sondas de EDS. A resolução lateral é determinada pela extensão do volume de interacção do feixe de electrões com as amostras, estando condicionada pela energia do feixe de electrões, pelo número atómico da amostra e pela excitação e emissão das radiações úteis [230]. Desta forma, deve ter-se particular atenção aos pontos de medição, pois se se encontrarem próximos das superfícies dos materiais (cerca de 1 μm) podem induzir interferências significativas no espectro recolhido.

O traçado obtido num ponto próximo da zona de separação entre o osso cortical e o osso neoformado, que dista cerca de 180 a 200 μm da superfície

do implante (Fig. 77), confirma a presença de vestígios de titânio. A hipótese de se tratar de uma interferência a partir do material está afastada, atendendo à distância a que o ponto analisado se encontra da superfície do implante, que é superior à distância máxima que a resolução lateral do feixe de electrões pode atingir [230].

Não se confirmando a presença do titânio no osso cortical (Fig. 78), num ponto analisado a cerca de 300 μm da superfície do implante, será de concluir que a presença destes vestígios de titânio, no osso neoformado na zona da interface, se deve a um fenómeno de difusão para os tecidos envolventes, por dissolução a partir dos implantes de titânio, tal como é referido por outros autores [65, 82, 169, 209, 257]. Estas observações também foram confirmadas noutras amostras com 10 semanas de implantação, na mesma camada tecidular, com uma espessura variando entre os 150 a 250 μm.

Nas amostras com 4 semanas de implantação, utilizando a mesma metodologia de microanálise, não foram detectados vestígios de titânio, a não ser em pontos muito próximos da superfície dos implantes. Neste caso, a presença destes vestígios foi atribuída a interferências do material, devido à grande proximidade dos locais de determinação e a superfície dos implantes (< 1 μm).

Uma interpretação semelhante para este fenómeno de deposição de titânio na camada de tecidos neoformados é avançada por alguns investigadores que verificaram ser limitado este fenómeno às amostras que continham implantes de titânio sem revestimento. Nos implantes de titânio revestidos com uma camada de hidroxiapatite não se detectou a presença de titânio. Por isso, concluíram que sendo o núcleo de ambos os implantes constituído por titânio, era pouco provável que a dispersão dos fragmentos se devesse ao processo de preparação das amostras, funcionando antes a camada de hidroxiapatite como uma barreira inibidora da libertação dos iões metálicos [209].

Também está confirmado que o tecido ósseo pode servir como um local privilegiado de deposição e armazenamento dos iões de titânio [257]. O conteúdo normal deste elemento nos tecidos orgânicos é de 50 ppm, sendo frequente a detecção de valores de 100 a 300 ppm nos tecidos moles que envolvem os implantes, produzindo uma ligeira alteração da coloração destes tecidos [82].

Segundo Bianco e col. [169], a presença de iões de titânio foi detectada a uma distância de 100 μm da interface na matriz do tecido ósseo em quantidades superiores a 100 ppm, e de 300 a 600 ppm nos osteócitos. Os canais de Havers, localizados a 85 μm da superfície do implante, continham mais de 1600 ppm destes iões.

De realçar que este trabalho além de relatar a deposição de titânio nos tecidos envolventes do local de implantação, quantificou e correlacionou os valores obtidos com o tempo de implantação, utilizando um modelo experimental semelhante ao do nosso ensaio. Assim poderemos estabelecer possíveis correlações com os resultados apresentados no nosso trabalho, embora se saliente o facto de não ter sido possível quantificar os valores de titânio, devido a limitações da metodologia de análise.

Em face do conjunto de elementos apresentados, podemos concluir que existe uma deposição de iões de titânio nos tecidos envolventes do local de implantação, através de um processo de dissolução passiva do titânio. Os valores desta deposição são incrementados com a existência de tensões, micromovimentos e irregularidades na superfície dos implantes [169].

A percentagem de contacto directo entre o osso e a superfície dos implantes de titânio – índice de afinidade – foi respectivamente, de 24,79± 8,01% para as amostras com 4 semanas e de 43,01± 10,04% para as amostras com 10 semanas (tabela 4.3). Estes resultados incluem-se dentro da faixa de valores apresentados noutros estudos [102, 150, 168]. Refira-se que são significativamente superiores aos obtidos para as amostras de aço inox ($p<0,05$; teste de Wilcoxon), mas significativamente inferiores aos valores obtidos para os materiais cerâmicos, Osteopatite® e Cimento de Vidro Bioactivo ($p<0,05$; teste de Wilcoxon) (Fig. 101).

O aumento de 73,8% na percentagem de contacto directo com o tecido ósseo, entre as 4 e as 10 semanas, pode ser explicado pelo facto do processo de osseointegração dos implantes de titânio implantados no osso de coelhos apenas poder ser considerado completo a partir da sexta semana [148, 167].

Os bons resultados obtidos neste trabalho, no que respeita ao comportamento do tecido ósseo após a implantação dos pinos de titânio, com a ocorrência da integração óssea deste biomaterial ao fim de algumas semanas, confirmam o sucesso em estudos clínicos de médio e longo prazo [12, 13, 32].

Apesar da libertação de iões para os tecidos envolventes, da necessidade de adaptação perfeita e firme ao leito ósseo e das limitações destes implantes no osso de tipo IV, justifica-se a utilização clínica, em várias especialidades médicas, de implantes de titânio comercialmente puro.

Comparativamente com os pinos de aço inox, verificámos a inexistência de uma camada de tecido fibroso interposta na zona da interface com o titânio; antes pelo contrário, verificou-se uma significativa integração destes implantes no tecido ósseo. As forças de adesão dos tecidos neoformados à superfície dos implantes foram suficientemente fortes para resistir às ten-

sões induzidas por algumas formas de observação microscópica, inversamente ao que ocorreu com as amostras de aço inox, onde a formação de uma fenda nítida foi constantemente observada.

A hidroxiapatite é um biomaterial com reconhecidas propriedades de adesão ao tecido ósseo, estando indicada no recobrimento dos implantes metálicos, provocando uma melhoria significativa na quantidade e rapidez da regeneração óssea [168] além de prevenir a libertação dos iões de titânio para os tecidos envolventes [209]. Como seguidamente discutiremos, a Osteopatite® reúne as condições necessárias para poder ser utilizada com este objectivo.

3. Osteopatite®

A Osteopatite® é uma hidroxiapatite modificada que apresenta uma composição química semelhante à do tecido ósseo (Fig. 18). A modificação química, com a introdução de iões comuns ao tecido ósseo vivo, permite que este material se comporte de forma semelhante aos enxertos do tecido ósseo sem componente orgânica [9]. Todavia, os grânulos possuem uma estrutura microporosa (Figs. 20 e 21) e um grau de degradação insignificante, comparativamente com outras hidroxiapatites que simulam não só a composição química como a estrutura porosa do tecido ósseo [19].

As trocas iónicas entre os grânulos de Osteopatite® e os fluidos orgânicos têm um papel importante na fase inicial, imediata, após a implantação, conforme se pode concluir a partir da tabela 4.1. Contudo, a Osteopatite® não sofre fenómenos de degradação significativos nem é reabsorvida [258], porque a velocidade de dissolução começa a baixar rapidamente após ser colocada em contacto com os fluidos orgânicos [225]. No entanto, as mudanças do meio fisiológico envolvente, induzidas pelas trocas iónicas que este material produz quer pelo fornecimento de iões necessários ao processo de osteogénese quer pela alcalinização do pH, funcionam como um catalizador do crescimento e maturação do tecido ósseo neoformado [225].

Outro aspecto de grande relevância, quando se utiliza hidroxiapatite na forma de grânulos para o preenchimento de defeitos ósseos, é o das dimensões médias dos grânulos. Para a selecção do tamanho médio dos grânulos de Osteopatite®, entre -20 e +100 mesh (ASTM), foram tidos em consideração os resultados obtidos em estudos anteriores, onde é demonstrado que a dimensão dos grânulos condiciona o comportamento celular [34, 231]. No

caso das dimensões serem muito baixas, inferiores a 100 mesh (ASTM), as partículas são largamente fagocitadas pelos macrófagos da cavidade peritoneal do murganho [231].

Clinicamente, na biopsia de um tecido onde foram colocadas partículas de pequenas dimensões de hidroxiapatite, foi observada a presença de tecido fibroso envolvendo as partículas que não foram destruídas por processos de fagocitose, três anos após a sua colocação para preenchimento de um defeito ósseo [34].

Os resultados obtidos neste estudo permitiram caracterizar dinamicamente a formação de uma adesão mecânica e química entre o tecido ósseo e a superfície dos grânulos da Osteopatite®. Comprovou-se, assim, o bom comportamento do tecido ósseo após a implantação de grânulos deste material, quando são respeitadas as dimensões recomendadas (-20/+100 mesh), o que confirma os bons resultados de outros trabalhos experimentais [8, 226, 258, 259].

Nas amostras com 4 semanas, identificámos uma fase osteogénica precoce, junto da interface. O osso cresceu entre os espaços existentes entre os grânulos, contactando e envolvendo as suas superfícies. A matriz óssea imatura e pouco mineralizada contactou a superfície do material, prolongando-se para o interior das porosidades externas, através de fibras de colagénio precursoras da osteogénese (Figs. 82 e 83). Esta camada menos mineralizada, localizada na interface, é referida por outros autores [3, 183].

A ancoragem das fibras de colagénio à superfície da hidroxiapatite, através de forças de adesão elevadas, foi observada em alguns estudos e é demonstrativa do seu alto grau de biocompatibilidade com as fibras colagénicas [209]. Este fenómeno de adesão firme das fibras do colagénio foi observado nas amostras com 4 semanas, após a implantação de grânulos de Osteopatite®, verificando-se a penetração das fibras de colagénio nas porosidades e a sua adesão às partículas dos grânulos, numa fase inicial da neoformação óssea.

Nas amostras com 10 semanas de implantação, o tecido ósseo neoformado na interface apresentou um grau de maturação mais evoluído, contactando directamente a superfície dos grânulos. Verificámos, também, a penetração nas porosidades superficiais, preenchendo totalmente os espaços entre as partículas, numa profundidade de alguns micra, sendo a penetração de tecido ósseo nas porosidades da hidroxiapatite também apontada por outros autores [22] e confirmada no nosso trabalho, tendo os espaços entre os grânulos sido totalmente preenchidos por tecido ósseo neoformado, nas amostras com este tempo de implantação.

Nas nossas observações, com os meios de estudo utilizados, não foi possível identificar qualquer tipo de lâmina electrodensa interposta entre o material e o tecido ósseo, que é referida por alguns autores [156]. Possivelmente, tal facto deve-se à sobreposição da camada de tecido ósseo neoformado, que esconde totalmente esta estrutura [182].

A hipótese da hidroxiapatite, em contacto com os fluidos biológicos, sofrer uma solubilização parcial, dando origem a uma camada superficial orgânica [183], não foi claramente confirmada no presente trabalho, embora a obtenção de valores da relação Ca/P superiores na zona da interface, comparativamente com o valor da hidroxiapatite-padrão e do osso (1,67), possa ser um indicador de uma camada rica em apatite (Fig. 89). Estes resultados também têm sido referidos por outros autores [92, 209].

Confirmou-se, assim, a deposição, por precipitação, de cristais de fosfato de cálcio no tecido ósseo neoformado junto da superfície deste material. Alguns autores sugerem que o osso depositado na zona da interface com a hidroxiapatite se enriquece com iões carbonatados, produzindo cristais de hidroxiapatite rica em carbonato. Esta variação do conteúdo de CO_3 atinge valores da relação Ca/P superiores aos da hidroxiapatite pura [92].

Outro facto comprovativo da grande capacidade de indução da formação de uma camada superficial de apatite, rica em cálcio e fosfatos, foram os resultados obtidos num estudo *in vitro* [260], onde amostras deste material foram imersas numa solução acelular com uma composição iónica semelhante à dos fluidos plasmáticos. A Osteopatite® apresentou valores de bioactividade mais elevados, quando comparada com uma hidroxiapatite-padrão, quer na espessura da camada de apatite depositada quer na rapidez com que essa camada se formou [260].

Um aspecto também observado nas amostras com grânulos de Osteopatite® foi a identificação de osteócitos na proximidade da zona da interface, demonstrando a proximidade destas células com a superfície do material, isto é, a sua integração perfeita no tecido ósseo, fenómeno este que também é referido por outros autores [156, 183], destacando-se as imagens de microscopia electrónica de transmissão de Bruijn e col. [156], que mostram a orientação dos prolongamentos citoplasmáticos dos osteócitos em direcção à superfície da hidroxiapatite. Ainda que utilizando meios de observação mais limitados – microscopia óptica – foi possível confirmar este fenómeno de proximidade dos osteócitos e dos seus prolongamentos citoplasmáticos em direcção à superfície dos grânulos de Osteopatite®, em grandes ampliações (400X), de várias amostras (Figs. 44, 47 e 48).

A partir da análise das imagens obtidas por microscopia de fluorescência pode especular-se que a mineralização do osso depositado entre os grânulos sofre duas frentes de mineralização; uma próximo da superfície do osso cortical antigo e outra na proximidade da superfície do material. O facto das zonas de maior actividade metabólica se localizarem nos espaços intermédios e próximo das zonas vascularizadas, com coloração mais intensa, comparativamente com o tecido ósseo cortical e com o osso neoformado na proximidade dos grânulos, pode ser indicativo deste fenómeno, que tem sido referido na literatura [183, 189]. O crescimento de tecido ósseo, na forma trabecular, a partir das margens do defeito ósseo, em direcção aos grânulos, é outro factor indicador da capacidade osteocondutora deste material.

Estes estudos reforçam os resultados obtidos através da microanálise por raios X do osso neoformado, na zona da interface, comparativamente com os valores calculados para a Osteopatite® e para o osso cortical, respectivamente de 1,82± 0,8 e 1,70± 0,5 (Fig. 90). Contudo, é preciso sublinhar, mais uma vez, que a variação e os desvios inerentes a este tipo de quantificação apresentam valores significativos, o que representa uma limitação séria à validade destes resultados que, não obstante, confirmam as indicações deste material quer na prevenção da reabsorção do osso alveolar após a extracção dentária [8, 9, 226] quer no preenchimento de defeitos ósseos [225].

Alguns estudos experimentais onde foram utilizados grânulos de Osteopatite® no preenchimento de defeitos ósseos criados no osso tibial de Coelho, na forma isolada [258] ou com veículos de estabilização [9, 87, 226, 259], confirmam os bons resultados obtidos neste ensaio experimental. Comparativamente com a hidroxiapatite-padrão, adquirida comercialmente, a Osteopatite® demonstrou sempre um melhor comportamento [258].

Nalguns trabalhos foi utilizado um veículo de fixação dos grânulos, para obstar à sua desintegração e perda, a partir do defeito ósseo. A utilização de gesso de Paris, como matriz aglutinadora dos grânulos, contribuiu para uma melhor adaptação à cavidade óssea. O gesso é rapidamente reabsorvido e substituído por tecido ósseo neoformado, que rodeia e envolve os grânulos, preenchendo os espaços entre eles e, consequentemente, dificultando a sua libertação a partir defeito ósseo, mesmo quando sujeitos a ligeiras forças mastigatórias [9, 226, 259].

A utilização de membranas de PTFE, como forma de retenção dos grânulos no defeito ósseo, demonstrou grandes potencialidades e bons resultados, que poderão ser extrapolados para situações clínicas onde exista a necessidade de preenchimento de defeitos ósseos, com localização susceptível

de existirem perdas dos grânulos por exposição directa ao meio oral, ou por se encontrarem expostos às forças mastigatórias [87].

Os bons resultados clínicos obtidos com a utilização de vários tipos de hidroxiapatites, indicam este tipo de material para aplicações clínicas diversificadas. O preenchimento de defeitos ósseos [22, 72], a prevenção da reabsorção alveolar após extracção dentária [8, 9], o aumento do rebordo ósseo e o revestimento de implantes metálicos [60, 189], têm sido alguns dos campos onde o grupo das hidroxiapatites é preferencialmente usado.

Os valores da percentagem de contacto directo da Osteopatite® com o tecido ósseo (tabela 4.3) foram bastante semelhantes aos apresentados pelo cimento de vidro bioactivo, não existindo diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$; teste de Wilcoxon). De facto, o comportamento do tecido ósseo após a implantação destes dois biomateriais cerâmicos foi bastante similar no que respeita aos valores do índice de afinidade e podem estabelecer-se mesmo algumas semelhanças no tipo de adesão do tecido ósseo aos dois materiais, com a formação de uma camada de apatite na zona da interface.

No entanto, conforme se irá discutir seguidamente, os dois materiais são bastante distintos, bem como as suas indicações clínicas.

4. Cimento de Vidro Bioactivo

A observação das amostras de cimento de vidro bioactivo mostrou que este material induz uma boa resposta do tecido ósseo, promovendo a deposição e crescimento deste tecido na sua superfície e formando uma união firme na interface. Esta adesão resulta da reabsorção parcial da matriz superficial do cimento sendo substituída por tecido ósseo neoformado. Entre as 4 e as 10 semanas, verificou-se um maior crescimento do tecido ósseo e uma evolução do grau de maturação e diferenciação deste tecido.

A formação e crescimento do tecido ósseo foi maior na zona da interface, a nível da parte central do osso cortical. Observou-se, também, o desenvolvimento de uma camada superficial, de osso mais trabecular, a partir do periósteo, recobrindo a face externa do material, nas amostras com 4 semanas de implantação (Figs. 49, 50, 60 e 91).

Nas amostras com 10 semanas, verificámos um aumento significativo do crescimento de tecido ósseo, que contactava directamente toda a superfície do material, envolvendo a totalidade do seu perímetro (Fig. 53). O tecido neoformado apresentou um grau de diferenciação e maturação mais desen-

volvido, tornando extremamente difícil a sua distinção do osso cortical antigo (Figs. 54 e 55).

Dos resultados obtidos neste estudo confirma-se que os mecanismos de adesão ao tecido ósseo dos vidros bioactivos e dos vidros cerâmicos são diferentes. Tal como este cimento, os vidros bioactivos formam na sua superfície uma camada rica em sílica que tem a capacidade de induzir a precipitação do fosfato de cálcio, formando-se a apatite por nucleação [172]. Inversamente, alguns vidros cerâmicos não formam esta camada rica em sílica, mas apresentam a capacidade de produzir a camada de apatite necessária para a sua ligação ao tecido ósseo. A formação desta camada rica em sílica está dependente da composição química dos materiais, além de que a rapidez da sua formação depende da estabilidade da rede dos vidros bioactivos que está condicionada pelo conteúdo de SiO_2. Sabe-se que se este óxido estiver presente numa percentagem superior a 60%, não se forma esta camada de apatite [158, 221], fundamental para a ligação do material ao tecido ósseo [75, 164, 183, 218, 220].

De facto, a possibilidade destes materiais formarem uma união forte com o tecido ósseo está dependente da formação desta camada de apatite, como consequência da interacção entre a superfície do material e os fluidos orgânicos.

A capacidade de induzir a formação de uma camada rica em apatite foi demonstrada neste estudo, através da microanálise por raios X (EDS) da camada superficial do cimento (Fig. 99). Este fenómeno e os mecanismos que intervêm neste processo podem ser compreendidos pelo estudo do comportamento do cimento, após imersão em diferentes soluções [227, 229].

A actividade química deste cimento pode ser avaliada pelos produtos de reacção com a solução de fosfatos de amónia. As mudanças estruturais da superfície do material e o aumento do pH dos fluidos envolventes podem ser explicadas pela libertação gradual de amónia e pela precipitação de cálcio. O tipo e a cinética destas reacções dependem da composição da solução onde o material é colocado. Verificou-se um comportamento distinto quando o material foi colocado em água desionizada, soro fisiológico e em plasma sintético [227, 229].

Quando o cálcio está presente na solução em que o material é imerso, como no caso dos fluidos orgânicos ou no plasma sintético, observa-se um aumento muito significativo da rapidez de deposição da camada de apatite. Comparativamente com a imersão em água e soro fisiológico, quando o material é imerso em plasma sintético o aumento da deposição do cálcio na

superfície do cimento é 40% mais rápida. Este fenómeno é devido ao facto de que, quando colocado em água e em soro fisiológico, o cálcio provém do próprio material, o que reduz em cerca de metade a sua velocidade de deposição [227].

A deposição de fósforo está dependente da presença de cálcio na solução. Neste caso parece ser libertado numa fase inicial e, então, reprecipitado. As mudanças na concentração de Ca e P diminuem a concentração superficial de Si.

A imersão do cimento de vidro bioactivo em água, soro fisiológico e plasma sintético, produz alterações superficiais diferentes conforme o meio. Na água e no soro fisiológico, a superfície do material torna-se mais lisa pelo desaparecimento das partículas superficiais e podem observar-se alguns orifícios 12 horas após a imersão. A imersão em plasma sintético produziu dois efeitos: um similar ao observado em água e soro fisiológico, com erosão da superfície, e outro, que se tornou evidente após as 12 horas de imersão, com aumento da topografia superficial resultante da precipitação de "cogumelos" de apatite.

A microanálise de cortes transversais do cimento demonstraram que a composição do cimento sofreu alterações progressivas desde a superfície até ao núcleo do material. Após 24 horas de imersão em soro fisiológico e plasma sintético, a composição química num ponto a 50 μm da superfície diferia da composição de pontos localizados mais profundamente, a 450 μm da superfície [227]. As alterações da composição química do cimento dependem do tempo de imersão e do tipo de solução [227, 229].

Estes mecanismos de degradação superficial do cimento foram comprovados nas observações histológicas, tendo-se verificado, na generalidade das amostras, logo a partir dos primeiros tempos do ensaio, uma degradação superficial do cimento de vidro bioactivo (Figs. 51 e 52). Este fenómeno é evidenciado pelas características diferentes da camada externa do cimento, sendo notória uma linha de separação entre estas duas estruturas do material, observada em microscopia óptica. Confirmando as alterações estruturais verificadas a este nível, identificou-se o aparecimento de linhas de fractura entre a camada superficial e a parte interna do cimento, nas amostras observadas em microscopia de fluorescência e electrónica de varrimento (Figs. 60 e 92).

Nas observações histológicas também é referenciada a manutenção da estrutura das partículas do vidro original durante o ensaio (Figs. 52, 56 e 94). Apenas nalgumas imagens de maiores ampliações da camada superficial do

cimento parece existir uma atenuação da morfologia superficial de algumas das partículas (Fig. 97). A manutenção da estrutura e da composição destas partículas foi também confirmada nos ensaios de degradação [227].

A composição química dos vidros bioactivos e a formação de uma camada superficial rica em cálcio e fósforo, está directamente relacionada com a capacidade de adesão óssea destes materiais [48, 172, 222]. Os factores que contribuem para o aumento da espessura desta camada parecem aumentar os valores de adesão óssea [136]. Sendo a composição e a estrutura desta camada semelhante à da apatite do osso [144], pode esperar-se que os osteoblastos possuam as condições preferenciais, na superfície da camada de apatite, para se desenvolverem. Consequentemente, o tecido ósseo envolvente entra em contacto directo com os cerâmicos de vidro sem a intervenção de tecido fibroso. Quando esta situação ocorre, forma-se uma união química forte entre a apatite superficial e a apatite óssea [48].

A interface formada *in vitro* entre um vidro bioactivo e o colagénio existente na matriz extracelular, produzida por osteoblastos em cultura, é um componente crítico do mecanismo de adesão óssea associado à implantação de materiais bioactivos [252]. De facto, a primeira fase da osteogénese na zona da interface pressupõe a síntese de colagénio tipo I na matriz óssea orgânica que vai sofrer os posteriores fenómenos de mineralização e maturação. A adesão inicial entre estas fibras e a camada de apatite superficial dos cimentos de vidros bioactivos é um fenómeno crucial no desenvolvimento de uma adesão adequada entre estes materiais e o tecido ósseo neoformado.

Relativamente a algumas partículas de vidros bioactivos é referido um processo de degradação preferencial no centro das partículas, quando estas possuem um tamanho intermédio entre as 300 e 400 μm, que explica um tipo de particular de neoformação óssea [261]. Nas porosidades assim criadas, evidenciou-se a existência de osteoblastos dispostos em camadas, por cima do tecido ósseo neoformado. Com o decorrer do tempo, as reacções dos grânulos de vidro na zona de interface resultaram em reentrâncias superficiais, que se expandem, tornando-se bolsas de protecção. As células osteoprogenitoras aderem a estas bolsas e, posteriormente, diferenciam-se em osteoblastos. No exterior das partículas não existe regulação das células indiferenciadas em células com fenótipo osteoblástico. Estes eventos correspondem à formação inicial de tecido ósseo.

O fenómeno anteriormente descrito não se verificou, no nosso estudo, nas partículas de vidro residuais distribuídas na matriz do cimento. Provavel-

mente, este facto deve-se, por um lado, à dimensão destas partículas que não ultrapassam os 50 μm (Figs. 21 e 22); por outro lado, a composição do vidro usado para preparar o cimento contém poucos elementos solúveis, o que origina a estabilidade das partículas residuais, contrariamente ao fenómeno de degradação sofrida pela matriz, conforme já referido.

A interface formada nos vidros bioactivos pode ainda ser classificada como interface de tipo I (adesão não colagénica) ou de tipo II (observação de interdigitação directa do colagénio com a superfície rica em cálcio e fósforo) [252].

No que respeita aos cimento de vidro é referido que a possibilidade destes materiais formarem uma união forte com o tecido ósseo está dependente da formação de uma camada de apatite na superfície do material, como consequência da interacção entre este e os fluidos orgânicos. Os osteoblastos podem rapidamente multiplicar-se e crescer na superfície desta camada de apatite, que possui características químicas e cristalográficas muito similares às da apatite que constitui o componente inorgânico dos tecidos duros [144]. As fibras de colagénio – componentes orgânicos – são incorporadas na camada de apatite formada, estabelecendo pontos de conexão directos entre o osso e o material. Uma outra função importante desta camada consiste na prevenção de posterior dissolução da superfície, assegurando a estabilidade do implante [6].

Contrariamente ao que se observou nas amostras de Osteopatite® com 4 semanas, não foi possível identificar qualquer componente colagenoso na zona da interface entre o cimento de vidro bioactivo e o osso formado. Verificámos, antes, a existência de uma interdigitação da matriz óssea nos espaços entre as partículas superficiais do vidro original, possivelmente devido à degradação da matriz superficial do cimento e à sua substituição pelo tecido ósseo. Tal facto é interpretado à luz do avançado estado de maturação tecidular. A observação da deposição de fibras de colagénio na interface é um fenómeno inicial do processo da osteogénese. Se a osteogénese se encontrar num estado mais avançado não é possível diferenciar as fibras de colagénio da matriz óssea através dos meios de observação utilizados neste trabalho. A necessidade de realizar estudos com tempos curtos de implantação é referida por alguns autores [81]. Logo após a implantação dos cerâmicos de vidro é que seria eventualmente possível observar a deposição de uma camada rica em apatite.

Esta camada de apatite forma-se na presença de um fluido biológico acelular com concentração iónica igual à do plasma sanguíneo [220-222, 262].

A sua composição inclui cristais pequenos e hidroxiapatite carbonatada com estrutura amorfa. Esta teoria formula a hipótese de que a formação desta camada deve-se a fenómenos dependentes do biomaterial [222].

Os resultados obtidos a partir de culturas celulares e de estudos *in vivo*[81] permitem especular que os osteoblastos sintetizam uma matriz extracelular na superfície dos cerâmicos de vidro, que engloba uma camada sem colagénio e sofre um processo rápido de mineralização.

Os mecanismos de adesão ao tecido ósseo dos vidros bioactivos e dos vidros cerâmicos são diferentes. Enquanto os vidros bioactivos formam uma camada rica em sílica na superfície, que tem a capacidade de atrair os iões de cálcio e fósforo e induzir a formação de apatite por nucleação [172], alguns dos vidros cerâmicos não formam esta camada rica em sílica, embora apresentem a capacidade de produzir uma camada de apatite. Os resultados deste trabalho confirmam estes mecanismos de adesão ao tecido ósseo com a presença de uma camada de rica em apatite, de que o traçado apresentado na figura 99, obtido através de microanálise por EDS da zona da interface, é um exemplo.

Durante a observação histológica através dos vários tipos de microscopia, foi detectada a formação de linhas de factura ou fissuras na camada superficial do cimento. Este fenómeno é referido por alguns autores [7, 159], justificando o seu aparecimento como resultado da contracção exercida pela formação da camada superficial rica em cálcio e fósforo. O facto desta camada superficial se manter firmemente unida ao tecido ósseo neoformado permite pensar que a força de ligação entre este tecido e a referida camada é superior à força de coesão entre a camada de degradação superficial e o núcleo interno do material.

A microanálise por raios X, realizada na zona da interface do cimento de vidro bioactivo com o tecido ósseo, não evidenciou a presença de silício. Contudo, verificámos a presença de uma camada rica em cálcio e fósforo, o que confirma as observações feitas por outros autores sobre a formação de uma camada superficial de apatite [7, 159, 172, 262].

A sílica presente nos cerâmicos de vidro bioactivos é gradualmente reabsorvida, após se transformar num gel de sílica, por um processo de dissolução [262].

Também é referido um fenómeno semelhante de reabsorção do sódio presente em alguns destes materiais [7]. Nas nossas amostras, este mecanismo justifica a ausência de detecção destes iões na zona da interface do cimento com o tecido ósseo neoformado, embora continue presente nas par-

tes não degradadas do cimento. Este fenómeno também foi observado nos ensaios de degradação do material [227].

Os resultados obtidos no nosso estudo não permitem estabelecer comparações sobre a velocidade de adesão ao tecido ósseo entre o cimento de vidro bioactivo e os vidros bioactivos mais conhecidos. Todavia, é possível afirmar que não se verificou um desempenho inferior ao apresentado pela Osteopatite®. A percentagem de contacto directo deste material com o tecido ósseo apresenta valores significativos ao fim das 4 semanas de ensaio e um incremento de 27,2% nos valores obtidos entre as 4 e as 10 semanas.

Relativamente à sequência da deposição do tecido ósseo na superfície do material, os resultados obtidos nas observações realizadas por microscopia de fluorescência permitem avançar com a hipótese de que o tecido ósseo se deposita mais precocemente na zona da interface cortical, relativamente ao osso formado a partir do periósteo. Esta conclusão é retirada do facto de o tecido que cresce a partir do periósteo apresentar um menor grau de maturação, na fase inicial, e possuir uma fluorescência mais intensa, quando comparado com o osso cortical antigo e o osso depositado na zona da interface (fig. 60).

A percentagem de contacto directo do cimento de vidro bioactivo com o tecido ósseo é bastante elevada, respectivamente de 70,7± 14,2% para as 4 semanas e 89,9± 10,4% para as 10 semanas após implantação. O tratamento estatístico revelou existirem diferenças estatisticamente significativas com os materiais metálicos ($p<0,005$; teste de Wilcoxon), e não significativas com a Osteopatite® para ambos os tempos de implantação.

Finalmente, um dos aspectos que também gostaríamos de referir é o a facilidade de manipulação do material e sua colocação nos defeitos ósseos. Possuindo uma boa plasticidade e um tempo de presa que pode ser modificado em função da alteração da relação entre a quantidade de pó e da solução líquida, usadas na preparação da pasta, bem como a facilidade de uma adaptação perfeita à cavidade óssea, devido à sua forma de pasta, o cimento torna-se um material de fácil aplicação clínica.

Este aspecto conjuntamente com o excelente comportamento biológico indicam a sua utilização num número considerável de situações clínicas.

Para melhor se compreenderem as diferenças de comportamento evidenciadas pelos quatro materiais utilizados neste estudo experimental é apresentada uma síntese na tabela 5.1, onde são apresentadas as diferenças e semelhanças entre eles bem como os mecanismos de adesão ao tecido ósseo.

Tabela 5.1. Quadro comparativo do comportamento dos diferentes materiais.

	Aço Inox		Titânio		Osteopatite®		Cimento de VB	
Semanas	*4*	*10*	*4*	*10*	*4*	*10*	*4*	*10*
Formação inicial de tecido fibroso	+++++	++++	-	-	-	-	-	-
Formação Inicial de t. não mineralizado	++	+	+	-	-	-	-	-
Formação inicial de tecido ósseo	-	-	++	+++	+++	+++++	++++	+++++
Mecanismo	Contacto físico	Contacto físico	Contacto físico	Adesão física	Adesão (t. iónica)	Adesão	Adesão (t. iónica)	Adesão
Índice de afinidade	3,6± 3,4%	6,0± 4,3%	24,8± 8,0%	43,1± 10,0%	65,4± 11,2%	83,2± 10,9%	70,7± 14,2%	89,9± 10,4%
Comportamento global	Razoável	Razoável	Razoável	Bom	Muito Bom	Muito Bom	Muito Bom	Muito Bom

VI

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram obter as seguintes conclusões:

1. O modelo animal utilizado permite distinguir os diversos biomateriais do ponto de vista da sua ligação ao tecido ósseo. Os resultados obtidos com este modelo experimental são concordantes com o comportamento clínico de três dos biomateriais utilizados, aço inox, titânio e Osteopatite®.

2. No caso dos implantes metálicos, a formação/remodelação do tecido ósseo parece ser favorecida por uma técnica cirúrgica minuciosa e cuidadosa.

3. A preparação histológica realizada permitiu obter amostras que podem ser estudadas com vários tipos de microscopia.

4. A microscopia óptica permitiu não só estudar qualitativamente, o crescimento e maturação do tecido ósseo que envolve os biomateriais, como também identificar o contacto físico entre o tecido ósseo regenerado e a superfície dos biomateriais.

5. A microscopia de fluorescência contribuiu para a identificação dos locais de maior actividade de formação/remodelação óssea.

6. A microscopia electrónica de varrimento revelou-se um método útil para o estudo qualitativo da resposta do tecido ósseo, permitindo obter indicações sobre o tipo de contacto estabelecido entre os tecidos e a superfície dos biomateriais. A identificação da composição química elementar, de pontos seleccionados nas amostras, através da microanálise por raios X (EDS), simultaneamente com a sua observação por MEV, é um auxiliar precioso na caracterização das várias estruturas.

7. Através da histomorfometria, foi possível calcular o índice de afinidade entre o osso e os biomateriais, que mostrou ser um elemento quantitati-

vo muito importante para a determinação da sua integração no tecido ósseo. A utilização de imagens obtidas por electrões retrodifundidos (microscopia electrónica de varrimento) garantiu uma maior precisão na identificação do tecido ósseo mineralizado em contacto com a superfície dos biomateriais.

8. O aço inox é um material com indicação clínica muito limitada, face à sua fraca biocompatibilidade e ao comportamento do tecido ósseo após a sua implantação. A ausência de contacto directo com o tecido ósseo, é um dos factores que condiciona a sua utilização clínica.

9. O titânio é um material com boas propriedades mecânicas e com bom comportamento biológico, o que o torna um material de indicação obrigatória em várias situações clínicas, de que os implantes dentários são um exemplo. Realçamos o facto de termos identificado vestígios comprovativos de fenómenos de difusão e acumulação de iões deste material nos tecidos envolventes ao local de implantação.

10. A Osteopatite® é um material cerâmico bioactivo que promove o crescimento do tecido ósseo, aderindo firmemente a este tecido. É um material com grande potencial de utilização clínica no preenchimento de defeitos do tecido ósseo e na prevenção da reabsorção do osso alveolar. Face aos resultados obtidos, pode colocar-se a hipótese de que implantes metálicos revestidos com Ostepatite® possam constituir uma solução alternativa para casos em que o tecido ósseo seja de fraca qualidade ou em que a adaptação à parede óssea não seja a ideal.

11. O cimento de vidro bioactivo demonstrou um bom comportamento biológico. Possui uma manipulação fácil e propriedades físico-químicas que o indicam no preenchimento de defeitos do tecido ósseo de diversas etiologias.

12. Face ao comportamento demonstrado pelos biomateriais cerâmicos no ensaio realizado, podemos considerá-los com alto potencial de utilização clínica.

13. Para se poder confirmar o excelente comportamento destes biomateriais, serão necessários estudos de longo prazo em animais, e ensaios controlados em humanos.

Sugestões para futuras linhas de investigação:

O estudo dos biomateriais é um campo de compromissos, já que basta alterar uma das suas propriedades para ocorrerem muitas alterações no seu comportamento.

O âmbito de uma tese de doutoramento não se esgota na obtenção de resultados, sua discussão e conclusões finais. A experiência e conhecimentos acumulados durante o estudo e a realização dos ensaios, bem como os aspectos que gostaríamos de esclarecer com mais profundidade, permite projectar e definir linhas de investigações futuras.

A caracterização das superfícies dos biomateriais e a sua influência na energia livre superficial e na adsorção proteica é uma área de grande interesse na investigação básica do comportamento biológico dos biomateriais e dos factores que o condicionam.

A utilização de culturas celulares, tendo sido uma área onde realizamos alguns ensaios que não foram incluídos nesta tese, representa um método acessível e válido no estudo da biocompatibilidade e na compreensão dos fenómenos que ocorrem entre as células/tecidos e os biomateriais. Permite, ainda, estudar as microestruturas formadas na interface, entre a superfície dos biomateriais e a matriz extracelular, produzida pelas células osteoblásticas, e o estudo de factores isolados na formação dessa interface.

Relativamente aos estudos histológicos, tendo implementado no nosso laboratório uma técnica de preparação de tecidos duros não descalcificados, gostaríamos de melhorar as técnicas de coloração, com a utilização de técnicas histoquímicas de identificação/quantificação de células e tecidos na zona da interface.

No que respeita à microscopia de fluorescência, quando utilizados diversos marcadores, é uma metodologia muito útil no estudo e quantificação da remodelação óssea à volta dos implantes.

A microscopia electrónica de varrimento permite a obtenção de imagens fundamentais para a interpretação do contacto físico e da adesão química do osso ao implante.

A exploração de técnicas de preparação diferentes das utilizadas neste trabalho, a criofractura e o desenvolvimento de métodos específicos de desidratação para tecidos vivos, serão muito importantes para o avanço dos conhecimentos sobre os mecanismos de interacção dos biomateriais com os tecidos envolventes.

Para o estudo ultraestrutural das células e tecidos, o recurso à microscopia electrónica de transmissão é um método valioso. O investimento no desenvolvimento de técnicas de preparação e análise para este tipo de microscopia é, portanto, um caminho fundamental a seguir para a compreensão dos fenómenos e mecanismos ultraestruturais que ocorrem na interface entre os implantes e os tecidos envolventes.

O ensaio em condições próximas da utilização final dos biomateriais em seres humanos, estando condicionado por aspectos éticos e legais difíceis de ultrapassar, quando os meios são limitados, representa, no entanto, o culminar do desenvolvimento e do estudo do comportamento biológico de um biomaterial que um clínico gostaria de realizar.

A aplicação dos biomateriais associados a células ósseas desenvolvidas em cultura e/ou a de factores de crescimento ósseo, parecem ser uma via altamente interessante na investigação e desenvolvimento de materiais e técnicas de substituição ou de reparação de tecidos. Poderá, desta forma, aumentar a rapidez da regeneração óssea e potencializar as propriedades de osteocondução e osteoindução de alguns biomateriais.

Por último, gostaríamos de confirmar a deposição de iões de titânio nos tecidos envolventes dos implantes dentários e determinar a sua quantidade, em diferentes períodos de tempo após a colocação dos implantes.

Resumo

O estudo do comportamento dos biomateriais, utilizando modelos animais, é uma das etapas fundamentais do seu desenvolvimento e investigação. A compreensão dos fenómenos e mecanismos que ocorrem após a colocação de um biomaterial num tecido vivo permite aperfeiçoar e melhorar as qualidades e propriedades dos materiais com aplicação biomédica.

O objectivo deste trabalho foi estudar as interacções entre quatro biomateriais, representativos do conjunto dos materiais mais utilizados em implantologia oral, e o tecido ósseo cortical.

O modelo experimental utilizado foi o osso tibial das duas patas posteriores de 12 coelhos, onde foram implantados aço inox 316L, titânio, Osteopatite® e um cimento de vidro bioactivo, por um período de 4 e 10 semanas.

O protocolo experimental obedeceu a todas as normas legais vigentes e foram adoptados todos os procedimentos recomendados para este tipo de intervenções. A cirurgia experimental decorreu num centro experimental específico, com uma equipa cirúrgica multidisciplinar e em condições de boa assepsia. Os animais foram sacrificados através de *overdose* anestésica, decorridos os tempos de ensaio estipulados.

Após serem recolhidos, os blocos de tecido ósseo contendo os distintos biomateriais foram processados segundo protocolo histológico para tecidos duros não descalcificados. As amostras obtidas foram estudadas em microscopia óptica, de fluorescência e electrónica de varrimento. Foi, ainda, determinada a percentagem de tecido ósseo neoformado que contactava directamente com a superfície dos implantes, através de técnica histomorfométrica, e realizado o estudo estatístico dos valores obtidos.

Os resultados observados em microscopia óptica permitiram identificar a presença de uma camada de tecido fibroso, interposta na interface entre o osso neoformado e a superfície dos pinos de aço inox 316L.

Nas amostras de titânio observou-se deposição de osso na zona da interface que contactava directamente a superfície dos implantes, numa percentagem significativa do seu perímetro. O contacto entre o tecido ósseo neoformado e a superfície dos implantes de titânio sofreu um incremento com o decorrer do ensaio. Identificou-se, também, uma maior maturação do tecido ósseo depositado na interface.

As amostras de Osteopatite® demonstraram uma grande capacidade osteocondutora, apresentando-se os grânulos deste material totalmente envolvidos por osso neoformado e em contacto íntimo na interface. A percentagem de osso neoformado aumentou com o tempo do ensaio.

O cimento de vidro bioactivo evidenciou um bom comportamento no tecido onde foi implantado, apresentando uma regeneração óssea extensa e em contacto directo com a sua superfície. A quantidade de osso neoformado aumentou com o tempo do ensaio. Observou-se uma ligeira degradação superficial do material, apresentando-se a camada mais externa com características distintas do núcleo do cimento.

A percentagem de contacto directo com o tecido ósseo obtido com os distintos biomateriais foi de 3,6± 3,4% para o aço inox, de 24,8± 8,0% para o titânio, de 65,4± 11,2% para a Osteopatite® e de 70,7± 14,2% para o cimento de vidro bioactivo, nas amostras com 4 semanas de implantação. Nas amostras com 10 semanas de implantação foi de 6,0± 4,3% para o aço inox, de 43,1± 10,0% para o titânio, de 83,2± 10,9% para a Osteopatite® e de 89,9± 10,4% para o cimento de vidro bioactivo.

No que respeita à percentagem de contacto ósseo, o aço inox e o titânio apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos restantes biomateriais, nos dois tempos de implantação ($p<0,05$; teste de Wilcoxon).

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

a) o aço inox não apresenta um bom comportamento quando implantado no tecido ósseo cortical, não sendo indicado em implantes permanentes;
b) o titânio apresenta uma boa integração no tecido ósseo, sendo um material com recomendação indicada em implantes permanentes;
c) os materiais cerâmicos possuem boas propriedades osteocondutoras e capacidade de adesão com o tecido ósseo, sendo indicados na substituição do osso e no preenchimento de defeitos ósseos.

Summary

The study of the behaviour of biomaterials using animal models, is one of the fundamental steps of their development and research. The understanding of the phenomena and mechanisms which occur after implanting a biomaterial on living tissue, allows for the perfection and improvement of the qualities and properties of biomaterials with biomedical application.

The aim of this work was to study the interaction between four biomaterials, representing materials mostly used in oral implantology, and cortical bone tissue.

The experimental model used were the posterior tibiae of 12 rabbits, where stainless steel 316L, titanium, and Osteopatite® and a glass bioactive cement, were implanted during 4 and 10 weeks.

The experimental protocol accomplished with all legal requirements, and all procedures were carried out according to current guidelines applicable to this type of study. The experimental surgery took place in a specific experimental centre with a multidisciplinary group and in good asepsis conditions.

Animals were sacrificed with an anaesthesia overdose during the prescribed trial time.

After being gathered, the biomaterial bone tissue blocks were processed according to a histological protocol for hard tissues without decalcification. The samples were studied by light, fluorescence, and scanning electron microscopy.

The percentage of new bone which contacted directly with the surface of the implants was still determined by a histomorphometric method, and the statistical analysis was performed.

The light microscopy observation permitted the identification of the presence of a fibrous tissue layer between the new bone and the stainless steel (316L) pins.

The titanium samples permitted the observation of bone deposition in the interface area which had contacted directly with the implant surface in a significant percentage of the perimeter. The contact between the new bone tissue and the titanium implant surface was increased with the trial time. A major maturation of the bone tissue deposited on the interface was also identified.

The Osteopatite® samples presented a significant osteoconductive capacity. The granules of this material were totally surrounded by new bone tissue, showing an intimate contact on the interface. The percentage of new bone was increased with the trial time.

The bioactive glass cement showed evidence of good bone tissue behaviour, presenting a vast bone regeneration in direct contact with its surface. The quantity of new bone increased with the trial time. A slight surface degradation of the material was observed and an superficial layer with different characteristics from the bulk of the cement was present.

The percentage of the biomaterial surface in direct contact with bone tissue was 3.6± 3.4% for stainless steel, 24.8± 8.0% for titanium, 65.4± 11.2% for Osteopatite®, and 70.7± 14.2% for the bioactive glass cement, in the samples with four weeks after implantation.

In the samples with 10 weeks of implantation time, the percentage of direct contact was 6.0± 4.3% for stainless steel, 43.1± 10.0% for titanium, 83.2± 10.9% for Osteopatite®, and 89.9± 10.4% for bioactive glass cement.

By the statistical analysis of the data, the stainless steel results were shown to be inferior to those of the other biomaterials, in both implantation periods ($p<0.05$; Wilcoxon test). The titanium was also significantly inferior in comparison with the ceramic biomaterials ($p<0.05$; Wilcoxon test). The ceramic materials presented no statistical differences between each other.

The results obtained in this work allowed for the following conclusions:

a) Stainless steel does not show an acceptable performance when implanted in cortical bone tissue. Because of this, the stainless steel implant is not indicated for permanent implants;

b) Titanium presents a good integration in bone tissue, being recommended in permanent implants;

c) Ceramic materials have good osteoconductive properties and capacity to adhere to the bone tissue. Their principal application field is for bone replacement and the filling of bone defects.

Résumé

L'étude du comportement biologique des biomatériaux, utilisant des modèles animaux, est une des étapes fondamentales à son dévéloppement et investigation. La compréhension des phénomènes et mécanismes qui surviennent après la colocation d'un biomatériel sur un tissu vif, permettent de perfectionner et améliorer les qualités et les propriétés des biomatériaux qui ont application biomédicale.

L'objectif de ce travail a été d'étudier les interactions entre quatre biomatériaux, représentatifs de l'ensemble des matériaux les plus utilisés en implantologie orale, et le tissu osseux cortical.

Le modèle expérimental utilisé ont été les tibias postérieurs de 12 lapins, où ont été implantés l'acier inox 316L, le titanium, l'Osteopatite® et un ciment de verre bioactif, pendant 4 et 10 semaines.

Le protocole expérimental a obéi à tous les normes légales en viguer et ont été adoptés tous les procédés récommandés pour ce type d'interventions. La chirurgie expérimentale a pris cours dans un centre expérimental spécifique pour ce genre d'interventions, avec une équipe chirurgique multidisciplinaire et en bonnes condicions d'asepsie.

Les animaux ont été sacrifiés par overdose anesthésique, écoulés les temps d'essai stipulés.

Aprés avoir été récueillis, les blocs de tissu osseux contenant les distincts biomatériaux ont été processés selon le protocole histologique pour tissus durs non décalcifiés. Les échantillons obtenus ont été étudiés en microscopie optique, à fluorescence et électronique de vallaiage.

A aussi été déterminé le pourcentage de tissu osseoux neo-formé qui contactait directement avec la surface des implants, à travers la technique histomorphométrique, et réalisée l'étude statistique des valeurs obtenues.

Les résultats observés en microscopie optique ont permis d'identifier la présence d'une couche de tissu fibreux, interposée sur l'interface entre l'os neo-formé et la surface des tiges d'acier inox 316L.

Les échantillons de titanium ont permis d'observer la déposition d'os sur la zone de l'interface, qui contactait directement la surface des implants sur un pourcentage significatif de son périmètre. Le contact entre le tissu osseux neo-formé et la surface des implants de titanium a souffert un incrément au

long de l'éssai. Une plus grande maturation du tissu osseux déposé sur la surface a aussi été identifié.

Les échantillons d'Osteopatite® ont présenté une grande capacité osteoconductrice, étant les grains de ce matériel totalement enveloppés par l'os neo-formé qui présentait un contact intime sur l'interface. Le pourcentaje d'os formé a augmenté avec le temps de l'éssai.

Le ciment de verre bioactif a presenté un bon comportement du tissu sur lequel il a été implanté, présentant une régéneration osseuse étendue en contact direct avec sa surface. La quantité d'os a augmenté avec le temps de l'essai. Une degradation superficielle légère du materiel a été observée et la couche plus externe présentait des charactéristiques distinctes du noyau du ciment.

Le pourcentage de la surface des biomatériaux en contact direct avec le tissu osseux a été de 3,6± 3,4% pour l'acier inox, de 24,8± 8,0% pour le titanium, de 65,4± 11,2% pour l'Osteopatite® et de 70,7± 14,2% pour le ciment de verre bioactif, pour les échantillons avec 4 semaines d'implantation. Pour les échantillons avec 10 semaines d'implantation , il a été de 6,0± 4,3% pour l'acier inox, de 43,1± 10,0% pour le titanium, de 83,2± 10,9% pour l'Osteopatite® et de 89,9± 10,4% pour le ciment de verre bioactif.

Le traitement des donnés a permis d'obtenir des différences statistiquement significatives, inférieures pour l'acier inox comparativement à tous les autres biomatériaux, pour les 2 temps d'implantation ($p<0,05$; test de Wilcoxon). Le titanium a aussi présenté des differences statistiquement significatives, inferieures comparativement aux biomatériaux céramiques ($p<0,05$; test de Wilcoxon). Les matériaux céramiques n'ont pas présenté de différences statistiquement significatives.

Les resultats obtenus sur ce travail ont permis de conclure que:

a) l'acier inox ne présente pas un bon comportement quand implanté sur le tissu osseux cortical, n'étant pas, ainsi, indiqué pour implants permanents;
b) le titanium présente une bonne intégration sur le tissu osseux, étant un matériel recommandé pour implants permanents;
c) les matériaux céramiques possédent de bonnes proprietés osteo-conductrices et la capacité d'adhésion au tissu osseux, ayant comme indication principale, le remplacement de l'os et le remplissage de défauts osseux.

Bibliografia

1. Ravaglioli A, Krajewski A: Bioceramics: materials, properties and applications. London: Chapman & Hall, 1992.
2. Tavares AV: História da Implantologia. *Stoma* 1993; 26: 17-31.
3. John KRS, Zardiackas LD, Black RJ, Amstrong R: Response of canine bone to a synthetic bone graft material. *Clin. Mater.* 1993; 12: 49-55.
4. Kenney EB, Lekovic V, Carranza FA, Dimitrijeric B, Han T, Takei H: A comparative clinical study of solid and granular porous hydroxylapatite implants in human periodontal osseous defects. *J. Biomed. Mat. Res.* 1988; 22: 1233-1243.
5. Gatti AM, Zaffe D: Short-term behaviour of two similar active glasses used as granules in the repair of bone defects. *Biomaterials* 1991; 12: 497-504.
6. Pavek V, Novak Z, Strnad Z, Kudrnova D, Navratilova B: Clinical application of bioactive glass-ceramic BAS-O for filling cyst cavities in stomatology. *Biomaterials* 1994; 15: 353-358.
7. Furusawa T, Mizunuma K: Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. *Implant Dent.* 1997; 6: 93-101.
8. Cavalheiro J, Branco R, Vasconcelos M, Oliveira A, Afonso A, Sousa H: Prevenção da reabsorção do osso alveolar com utilização de grânulos de hidroxiapatite. *Stoma* 1991; 18: 7-15.
9. Cavalheiro J, Branco R, Vasconcelos M: Modified hydroxyapatite granules and plaster as binder: In vitro and clinical tests. In: Bonfield W, Hastings GW, Tanner KE, eds. Bioceramics, vol 4. London: Butterworth-Heinemann, 1991; 205-211.
10. Vasconcelos M, Afonso A, Branco R, Cavalheiro J: Diferentes mecanismos de reconstrução do tecido ósseo utilizando grânulos de hidroxiapatite. *Rev. Port. de Est. e Cir. Maxilofac.* 1993; 34: 254-255.
11. Kent JN, Finger IM, Larsen H: Biointegrated hydroxylapatite-coated dental implants: 5-year clinical observations. *J. Amer. Dent. Assoc.* 1990; 121: 138-144.
12. Albrektsson T, Eriksson AR, Friberg B, et al.: Histologic investigations on 33 retrieved Nobelpharma implants. *Clin. Mater.* 1993; 12: 1-9.
13. Biesbrock AR, Edgerton M: Evaluation of the clinical predictability of hydroxyapatite-coated endosseous dental implants: A review of the literature. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1995; 10: 712-720.
14. Garcia R, Doremus RH: Electron microscopy of the bone-hydroxylapatite interface from a human dental implant. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1992; 3: 154-156.
15. Dattilo DJ, Misch CM, Arena S: Interface analysis of hydroxyapatite-coated implants in a humam vascularized iliac bone graft. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1995; 10: 405-409.
16. Muster D: Biomateriaux et biomateriels en chirurgie osseuse et dentaire (2ª partie). Encyclopedie Medico-Chirurgicale - Stomatologie, vol 22-014-F-15. Paris: Editions Techniques, 1993; 2-26.
17. Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S: Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 32: 481-492.

18. Becker W, Schenk R, Higuchi K, Lekholm U, Becker BE: Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: A study in dogs. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1995; 10: 143-154.
19. Klinge B, Alderius P, Isaksson S, Jonsson J: Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J. Oral Maxillof. Surg.* 1992; 50: 241-249.
20. Higashi S, Yamamuro T, Nakamura T, Ikada Y, Hyon S-H, Jamshidi K: Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers. *Biomaterials* 1986; 7: 183-187.
21. Kurashina K, Kurita H, Takeuchi H, Hirano M, Klein CPAT, Groot K: Osteogenesis in muscle with composite graft of hydroxyapatite and autogenous calvarial periosteum: A preliminary report. *Biomaterials* 1995; 16: 119-123.
22. Ripamonti U: Calvarial reconstruction in baboons with porous hydroxyapatite. *J. Craniofac. Surg.* 1992; 3: 149-159.
23. Tolman DE: Reconstructive procedures with endosseous implants in grafted bone: A review of the literature. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1995; 10: 275-294.
24. Damien CJ, Parsons JR: Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *J. Appl. Biomater.* 1991; 2: 187-208.
25. Chappard D, Grizon F, Brechet I, Basle MF, Rebel A: Evolution of the bone-titanium interface on implants coated/noncoated with xenogeneic bone particles: Quantitative microscopic analysis. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 32: 175-180.
26. Wachtel HC, Langford A, Bernimoulin J-P, Reichart P: Guided bone regeneration next to osseointegrated implants in humans. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1991; 6: 127-135.
27. Warrer K, Gotfredsen K, Hjorting-Hansen E, Karring T: Guided tissue regeneration ensures osseointegration of dental implants placed into extraction sockets. An experimental study in monkeys. *Clin. Oral Impl. Res.* 1991; 2: 166-171.
28. Dahlin C, Lekholm U, Becker W, et al.: Treatment of fenestration and dehiscence bone defects around oral implants using the guided tissue regeneration technique: A prospective multicenter study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1995; 10: 312-318.
29. Simion M, Scarano A, Gionso L, Piatelli A: Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: A comparative histologic study in humans. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1996; 11: 735-742.
30. Gotfredsen K, Warrer K, Hjorting-Hansen E, Karring T: Effect of membranes and porous hydroxyapatite on healing in bone defects around titanium dental implants. An experimental study in monkeys. *Clin. Oral Impl. Res.* 1991; 2: 172-178.
31. Albrektsson T, Branemark P-I, Hansson H-A, Lindstrom J: Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop. Scand.* 1981; 52: 155-170.
32. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR: The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1986; 1: 11-25.
33. Gross KA, Berndt CC, Goldschlag DD, Iacono VJ: In vitro changes of hydroxyapatite coatings. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1997; 12: 589-597.
34. Peres F, Branco R, Afonso A, Vasconcelos M, Cavalheiro J: Influência da dimensão das partículas na reconstrução do tecido ósseo: Avaliação por biopsia. *Rev. Port. de Est. e Cir. Maxilofac.* 1993; 34: 254.

35. Ogino M, Fujino M: Dental root implant coated with bioactive glass. In: Kawahara H, ed. Progress in Biomedical Engineering - Oral Implantology and Biomaterials, vol 7. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989; 139-144.
36. Donath K: A comparison of tissue-implant interface of osseous integrated titanium and hydroxylapatite coated titanium dental implants. In: Kawahara H, ed. Progress in Biomedical Engineering - Oral Implantology and Biomaterials, vol 7. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989; 193-196.
37. Fujino M, Ogino M: Clinical application of dental root implant using bioactive glass. In: Kawahara H, ed. Progress in Biomedical Engineering - Oral Implantology and Biomaterials, vol 7. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989; 145-149.
38. Hong L, Klein CPAT, Groot K: Histological observations of coated and prestressed dental implants under flexible or rigid loading conditions. *Biomaterials* 1994; 15: 390-395.
39. Tavares AV: Implantes de alumina e zircónia. Estudo experimental comparativo. [Tese de Doutoramento]. Faculdade de Medicina. Universidade de Lisboa 1994.
40. Linkow LI: Implant Dentistry - yesterday, today and tomorrow. Proceedings of the 15th Annual International Symposium of the American Academy of Implant Prosthodontics, Atlanta 1996.
41. Albrektsson T, Jacobsson M: Bone-metal interface in osseointegration. *J. Prosthet. Dent.* 1987; 57: 597-607.
42. Wataha JC: Materials for endosseous dental implants. *J. Oral Rehabil.* 1996; 23: 79-90.
43. Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, et al.: Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 885-895.
44. Steflik DE, Sisk AL, Parr GR, et al.: Transmission electron and high-voltage electron microscopy of osteocyte cellular processes extending to the dental implant surface. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 1095-1107.
45. Rodan GA: Introduction to bone biology. Bone 1992; 13: S3-S6.
46. Ten Cate AR: Hueso. In: Ten Cate AR, ed. Histologia Oral. Desarrollo, estrutura y funcion, 2ª ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 1986; 146-170.
47. Verheyen CCPM, Klein CPAT, Blieck-Hogervorst JMA, Wolke JGC, Blitterswijn CA, Groot K: Evaluation of hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: Physico-chemical properties. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1993; 4: 58-65.
48. Kokubo T: Bioactive glasses ceramics: Properties and applications. *Biomaterials* 1991; 12: 155-163.
49. Meghji S: Bone remodelling. *Br. Dent. J.* 1992; 172: 235-242.
50. Junqueira LC, Carneiro J: Tecido Ósseo. Histologia Básica, 5ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982; 145-168.
51. Klapisz-Wolikow M: Os alveolaire. Aspects anatomiques et morphologiques. In: Goldberg M, ed. Manuel d'Histologie et de Biologie Buccale. Paris: Masson, 1989; 109-135.
52. Driessens FCM, Ramselaar MMA, Schaeken HG, Stols ALH, Mullem PJ, Wijn JR: Chemical reactions of calcium phosphate implants after implantation in vivo. *J. Mater. Sci.: Mat. Med.* 1992; 3: 413-417.
53. Ziats NP, Miller KM, Anderson JM: In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials* 1988; 9: 5-13.
54. Väänänen HK: Mechanism of bone turnover. *Ann. Med.* 1993; 25: 353-359.
55. Kawaguchi H, Ogawa T, Shirakawa M, Okamoto H, Akisaka T: Ultrastructural and ultracytochemical characteristics of multinucleated cells after hydroxyapatite implantation into rat periodontal tissue. *J. Periodont. Res.* 1992; 27: 48-54.

56. Roberts WE: Bone tissue interface. *J. Dent. Educ.* 1988; 52: 804-809.
57. Pilliar RM, Deporter DA, Watson PA, Valiquette N: Dental implant design. Effect on bone remodeling. *J. Biomed. Mat. Res.* 1991; 25: 467-483.
58. Anderson JM: Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. *Cardiovasc. Pathol.* 1993; 2: 33S-41S.
59. Chang Y-S, Oka M, Nakamura T, Gu H-O: Bone remodeling around implanted ceramics. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 30: 117-124.
60. Bloebaum RD, Bachus KN, Momberger NG, Hofmann AA: Mineral apposition rates of human cancellous bone at the interface of porous coated implants. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 537-544.
61. Goodman S, Aspenberg P: Effects of mechanical stimulation on the differentiation of hard tissues. *Biomaterials* 1993; 14: 563-569.
62. Basle MF, Chappard D, Grizon F, et al.: Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif. Tissue Int.* 1993; 53: 348-356.
63. Williams DF: Consensus and definitions in biomaterials. In: Putter C, DeLange GL, Groot K, et al., eds. Advances in Biomaterials - Implant Materials in Biofunction, vol 8. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988; 11-16.
64. Williams DF, Black J, Doherty PJ: Second consensus conference on definitions in biomaterials. In: Doherty PJ, Williams RL, Williams DF, et al., eds. Advances in Biomaterials: Biomaterial-Tissue Interfaces, vol 10. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992; 525-533.
65. Merritt K, Margevicius RW, Brown SA: Storage and elimination of titanium, aluminum, and vanadium salts, in vivo. *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 1503-1515.
66. Merritt K, Brown SA: Release of hexavalent chromium from corrosion of stainless steel and cobalt-chromium alloys. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 627-633.
67. Bessho K, Fujimura K, Iizuka T: Experimental long-term study of titanium ions eluted from pure titanium miniplates. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 901-904.
68. Basle MF, Bertrand G, Guyetant S, Chappard D, Lesourd M: Migration of metal and polyethylene particles from articular prostheses may generate lymphadenopathy with histiocytosis. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 30: 157-164.
69. Hure G, Donath K, Lesourd M, Chappard D, Basle M-F: Does titanium surface treatment influence the bone-implant interface? SEM and histomorphometry in a 6-month sheep study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1996; 11: 506-511.
70. Radder AM: Bone-bonding copolymers for hard tissue replacement. [PhD Thesis]. Universiteit te Leiden; 1994.
71. Ono I, Gunji H, Kaneko F, Numazawa S, Kodama N, Yoza S: Treatment of extensive cranial bone defects using computer-designed hydroxyapatite ceramics and periosteal flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 1993; 92: 819-830.
72. Inoue O, Ibaraki K, Shimabukuro H, Shingaki Y: Packing with high-porosity hydroxyapatite cubes alone for the treatment of simple bone cyst. *Clin. Orthop.* 1993; 293: 287-292.
73. Hayashi K, Inadome T, Mashima T, Sugioka Y: Comparison of bone-implant interface shear strength of solid hydroxyapatite and hydroxyapatite-coated titanium implants. *J. Biomed. Mat. Res.* 1993; 27: 557-563.
74. Söballe K, Hansen ES, Brocksted-Rasmussen H, et al.: Gap healing enhanced by hydroxyapatite coating in dogs. *Clin. Orthop.* 1991; 272: 300-307.
75. Hench LL, Wilson J: Surface-active biomaterials. *Science* 1984; 226: 630-636.
76. Hench LL, Wilson J: Bioactive materials. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 1986; 55: 65-75.

77. Low SB, King CJ, Krieger J: An evaluation of bioactive ceramic in the treatment of periodontal osseous defects. *Int. J. Periodont. Res. Dent.* 1997; 17: 359-367.
78. Wilson J, Clark AE, Hall M, Hench LL: Tissue response to Bioglass endosseous ridge maintenance implants. *J. Oral Implantol.* 1993; 19: 295-302.
79. Fujita Y, Yamamuro T, Nakamura T, et al.: Mechanism strength of bonding between two bioactive ceramics in vivo. *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 131-1324.
80. Otsuka M, Matsuda Y, Kokubo T, Yoshihara S, Nakamura T, Yamamuro T: Drug release from a novel self-setting bioactive glass bone cement containing cephalexin and its physicochemical properties. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 33-38.
81. Neo M, Nakamura T, Yamamuro T, Ohtsuki C, Kokubo T: Transmission electron microscopic study of apatite formation on bioactive ceramics in vivo. In: Ducheyne P, Kokubo T, Blitterswijk CA, eds. Bone-Bonding Biomaterials. Leiderdorp: Reed Healthcare Communications, 1992; 111-120.
82. Muster D: Biomateriaux et biomateriels en chirurgie osseuse et dentaire (1ª partie). Encyclopedie Medico-Chirurgicale - Stomatologie, vol 22-014-F-10. Paris: Editions Techniques, 1993; 2-26.
83. Yang J-M, You J-W, Chen H-L, Shih C-H: Calorimetric characterization of the formation of acrylic type bone cements. *J. Biomed. Mat. Res. (Appl. Biomat.)* 1996; 33: 83-88.
84. Driessens FC, Planell JA, Gil FJ: Calcium phosphate bone cements. In: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, et al., eds. Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, vol 4. New York: Marcel Dekker, 1995; 855-877.
85. Planell JA, Vila MM, Gil FJ, Driessens FCM: Acrylic bone cements. In: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, et al., eds. Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, vol 4. New York: Marcel Dekker, 1995; 879-921.
86. Galante JO, Lemons J, Spector M, Wilson PD, Wright TM: The biologic effects of implant materials. *J. Orthop. Res.* 1991; 9: 760-775.
87. Vasconcelos M, Afonso A, Branco R, Cavalheiro J: Guided bone regeneration using Osteopatite granules and PTFE membranes. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1997; 8: 815-818.
88. Cranin AN, Dibling J, Simons A, Ritter T: A polymeric bone replacement material in human oral and maxillofacial surgery. In: Kawahara H, ed. Progress in Biomedical Engineering - Oral Implantology and Biomaterials, vol 7. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989; 1-5.
89. Santos JD, Vasconcelos M, Reis RL, Afonso A, Monteiro FJ, Hastings GW: Glass reinforced hydroxyapatite composites: Physical properties and preliminary histological studies in rabbits. In: Andersson OH, Yli-Urpo A, eds. Bioceramics, vol 7. Turku: Butterworth-Heinemann, 1994; 243-248.
90. Santos JD, Knowles JC, Reis RL, Monteiro FJ, Hastings GW: Microstructural characterization of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials* 1994; 15: 5-10.
91. Mehlisch DR, Leider AS, Roberts WE: Histologic evaluation of the bone/graft interface after mandibular augmentation with hydroxylapatite/purified fibrillar collagen composite implants. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1990; 70: 685-692.
92. Luklinska ZB, Bonfield W: Ultrastructure of bone-composite interface by high resolution transmission electron microscopy. In: Ducheyne P, Kokubo T, Blitterswijk CA, eds. Bone-Bonding Biomaterials. Leiderdorp: Reed Healthcare Communications, 1992; 73-77.
93. Verheyen CCPM, Wijn JR, Blitterswijk CA, Groot K, Rozing PM: Hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: An animal study on push-out strengths and interface histology. *J. Biomed. Mat. Res.* 1993; 27: 433-444.

94. Heimke G: Biomechanical aspects of joint and tooth replacements. In: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, et al., eds. Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, vol 3. New York: Marcel Dekker, 1995; 43-68.
95. Hench LL: Bioactive glasses and glass-ceramics: A perspective. In: Yamamuro T, Wilson J, Hench LL, eds. CRC Handbook of Bioactive Ceramics, vol 1, 1990; 7-23.
96. Pazzaglia UE, Bernini F, Zatti G, Nucci AD: Histology of the metal-bone interface. Interpretation of plastic embedded slides. *Biomaterials* 1994; 15: 273-277.
97. Meffert RM, Langer B, Fritz ME: Dental implants: A review. *J. Periodontol.* 1992; 63: 859-870.
98. Blitterswijk CAV, Bakker D, Hesseling SC, Koerten HK: Reactions of cells at implant surfaces. *Biomaterials* 1991; 12: 187-193.
99. Harmand MF: Human cell culture and characterization of cell/biomaterial interface. *Clin. Mater.* 1992; 11: 145-150.
100. Ong JL, Carnes DL, Cardenas HL, Cavin R: Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dent.* 1997; 6: 19-24.
101. Hazan R, Brener R, Oron U: Bone growth to metal implants is regulated by their surface chemical properties. *Biomaterials* 1993; 14: 570-574.
102. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H: Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mat. Res.* 1991; 25: 889-902.
103. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, et al.: Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 389-401.
104. Veerman ECI, Suppers RJF, Klein CPAT, Groot K, Amerongen AVN: Immunochemical identification of the protein layers adsorbed onto hydroxyapatite after in vivo and in vitro incubation with serum and plasma. In: Putter C, DeLange GL, Groot K, et al., eds. Advances in Biomaterials - Implant Materials in Biofunction, vol 8. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988; 331-335.
105. Smith DC: Dental implants: Materials and design considerations. *Int. J. Prosthodont.* 1993; 6: 106-117.
106. Malik MA, Puleo DA, Bizios R, Doremus RH: Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro: Morphology during the first 2h of attachment. *Biomaterials* 1992; 13: 123-128.
107. Lowenberg BF, Pilliar RM, Aubin JE, Sodek J, Melcher AH: Cell attachment of human gingival fibroblasts in vitro to porous-surfaced titanium alloy discs coated with collagen and platelet-derived growth factor. *Biomaterials* 1988; 9: 302-309.
108. Edwards BN, Gold BR: Analysis of surface cleanliness of three commercial dental implants. *Biomaterials* 1992; 13: 775-780.
109. Williams DF: A model for biocompatibility and its evaluation. *J. Biomed. Eng.* 1989; 11: 185.
110. Kilpadi DV, Lemons JE: Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 1419-1425.
111. Williams DF, Williams RL: Surface energy considerations in the adsorption of proteins to metals. In: Putter C, DeLange GL, Groot K, et al., eds. Advances in Biomaterials - Implant Materials in Biofunction, vol 8. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988; 275-278.
112. Braber ET, Ruijter JE, Smits HTJ, Ginsel LA, Recum AF, Jansen JA: Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 511-518.

113. Scwartz Z, Martin JY, Dean DD, Simpson J, Cochran DL, Boyan BD: Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 30: 145-155.
114. Naji A, Harmand M-F: Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts. *J. Biomed. Mat. Res.* 1990; 24: 861-871.
115. Groessner-Schreiber B, Tuan RS: Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. *J. Cell Science* 1992; 101: 209-217.
116. Chehroudi B, Gould TRL, Brunette DM: A light and electron microscopic study of the effects of surface topography on the behavior of cells attached to titanium-coated percutaneous implants. *J. Biomed. Mat. Res.* 1991; 25: 387-405.
117. Thomas KA, Kays JF, Cook SD, Jarcho M: The effect of surface macrotexture and hydroxylapatite coating on the mechanical strengths and histologic profiles of titanium implant materials. *J. Biomed. Mat. Res.* 1987; 21: 1395-1414.
118. Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E: Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 1567-1575.
119. Doundoulakis JH: Surface analysis of titanium after sterilization: Role of implant-tissue interface and bioadhesion. *J. Prosth. Dent.* 1987; 58: 471-478.
120. Smith DC, Pilliar RM, McIntire NS: Surface characteristics of dental implant materials. In: Kawahara H, ed. Progress in Biomedical Engineering - Oral Implantology and Biomaterials, vol 7. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989; 185-192.
121. Söballe K, Hansen ES, Brocksted-Rasmussen H, Jorgensen PH, Bunger C: Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions. *J. Orthop. Res.* 1992; 10: 285-299.
122. Söballe K, Hansen ES, Brocksted-Rasmussen H, Bunger C: Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants. *J. Bone Joint Surg. (Br.)* 1993; 75-B: 270-278.
123. Cook SD, Thomas KA, Haddad RJ: Histologic analysis of retrivied human porous-coated total joint components. *Clin. Orthop.* 1991; 234: 90-101.
124. Aspenberg P, Goodman S, Toksvig-Larsen S, Ryd L, Albrektsson T: Intermittent micromotion inhibits bone ingrowth. Titanium implants in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* 1992; 63: 141-145.
125. Pilliar RM: Quantitative evaluation of the effect of micromovement at a porous coated implant-boen interface. In: Davies JE, ed. The Bone-Biomaterials Interface. Toronto: Univ. of Toronto Press, 1991; 380-387.
126. Pilliar RM, Lee JM, Maniatopoulos C: Observation on the effect of movement on bone ingrowth into porous surfaced implants. *Clin. Orthop.* 1986; 208: 108-113.
127. Engh CA, Connor DO, Jasty M, McGovern TF, Bobyn JD, Harris WH: Quantification of implant micromotion, strain shielding, and bone resorption with porous-coated anatomic medullary locking femoral prostheses. *Clin. Orthop.* 1992; 285: 13-29.
128. Söballe K: Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation. *Acta Orthop. Scand.* 1993; 64: 1-58.
129. Maruyama M: Hydroxyapatite-clay bone fixation for loaded implants. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 683-686.
130. Maxian SH, Zawadsky JP, Dunn MG: Effect of Ca/P coating resorption and surgical fit on the bone/implant interface. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 1311-1319.

131. Goodman S, Aspenberg P, Song Y, Regula D, Doshi A, Lidgren L: Effects of intermittent micromotion versus polymer particles on tissue ingrowth: Experiment using a micromotion chamber implanted in rabbits. *J. Appl. Biomater.* 1994; 5: 117-123.
132. Goodman S, Aspenberg P: Effect of amplitude of micromotion on bone ingrowth into titanium chambers implanted in the rabbit tibia. *Biomaterials* 1992; 13: 944-948.
133. Albrektsson T, Albrektsson B: Osseointegration of bone implants. A review of an alternative mode of fixation. *Acta Ortoph. Scand.* 1987; 58: 567-577.
134. Vince DG, Hunt JA, Williams DF: Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials. *Biomaterials* 1991; 12: 731-736.
135. Williams DF: Objectivity in the evaluation of biological safety of medical devices and biomaterials. Medical Device Technology 1991: 44-48.
136. Ducheyne P: Bioceramics: Material characteristics versus in vivo behavior. *J. Biomed. Mat. Res.* 1987; 21: 219-236.
137. Williams DF: Biocompatibility: performance in surgical reconstruction of man. Interdisciplinary Science Reviews 1990; 15: 20-33.
138. ISO/TR-9966: Implants chirurgicaux - Biocompatibilite - Selection des methodes d'essai biologiques pour materiaux et dispostifs. Geneve: Organization Internationale de Normalisation, 1989.
139. Annual Book of ASTM standards - Medical Devices and Services, Vol. 13.01. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1991.
140. Itakura Y, Tajima T, Ohoke S, Matsuzawa J, Sudo H, Yamamoto S: Osteocompatibility of platinium-plated titanium assessed in vitro. *Biomaterials* 1989; 10: 489-493.
141. Sautier J-M, Nefussi J-R, Forest N: Ultrastructural study of bone formation on synthetic hydroxyapatite in osteoblast cultures. *Cells and Materials* 1991; 1: 209-217.
142. Berstein A, Bernauer I, Marx R, Geurtsen W: Human cell culture studies with dental metallic materials. *Biomaterials* 1992; 13: 98-100.
143. Davies JE: The use of cell and tissue culture to investigate bone cell reactions to bioactive materials. In: Yamamuro T, Hench LL, Wilson J, eds. CRC Handbook of Bioactive Ceramics, vol 1. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990; 1-65.
144. Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T, et al.: Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 32: 341-348.
145. Kirkpatrick CJ, Mittermayer C: Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1990; 1: 9-13.
146. Cheung HS, Haak MH: Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: An in vitro model for biocompatibility study. *Biomaterials* 1989; 10: 63-67.
147. Brook IM, Craig GT, Lamb DJ: In vitro interaction between primary bone organ cultures, glass-ionomer cements and hydroxyapatite/tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1991; 12: 179-186.
148. Kalebo P, Jacobsson M: Recurrent bone regeneration in titanium implants. Experimental model for determining the healing capacity of bone using quantitative microradiography. *Biomaterials* 1988; 9: 295-301.
149. Dhert WJA, Klein CPAT, Jansen JA, et al.: A histological and histomorphometrical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. *J. Biomed. Mat. Res.* 1993; 27: 127-138.
150. Johansson CB, Lausmaa J, Rostlund T, Thomsen P: Commercially pure titanium and Ti6Al4V implants with and without nitrogen-ion implantation: Surface characterization and quantitative studies in rabbit cortical bone. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1993; 4: 132-141.

151. Jansen JA, Waerden JPCM, Wolke JGC: Histological and histomorphometrical evaluation of the bone reaction to three different titanium alloy and hydroxyapatite coated implants. *J. Appl. Biomater.* 1993; 4: 213-219.
152. Hunt JA, Vince DG, Williams DF: Image analysis in the evaluation of biomaterials. *J. Biomed. Eng.* 1993; 15: 39-45.
153. Christel P, Meunier A, Therin M: A method of analysis of cellular distribution in the membrane encapsulating surgically implanted biomaterials. *J. Appl. Biomater.* 1990; 1: 205-214.
154. Therin M, Christel P, Meunier A: Analysis of the general features of the soft tissue response to some metals and ceramics using quantitative histomorphometry. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 1267-1276.
155. Johansson CB, Albrektsson T, Ericson LE, Thomsen P: A quantitative comparison of the cell response to commercially pure titanium and Ti-6Al-4V implants in the abdominal wall of rats. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1992; 3: 126-136.
156. Bruijn JD, Blitterswijk CA, Davies JE: Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 89-99.
157. Bou-Abboud NN, Patat J-L, Guillemin G, Issahakian S, Forest N, Ouhayoun J.-P: Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the palatal connective tissue of miniature pigs using undecalcified sections. *Biomaterials* 1994; 15: 201-207.
158. Gatti AM, Valdre G, Tombesi A: Importance of microanalysis in understanding mechanism of transformation in active glassy biomaterials. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 31: 475-480.
159. Gatti AM, Valdre G, Andersson OH: Analysis of the in vivo reactions of a bioactive glass in soft and hard tissue. *Biomaterials* 1994; 15: 208-212.
160. Therin M, Meunier A, Christel P: A histomorphometric comparison of the muscular tissue reaction to stainless steel, pure titanium and titanium alloy implant materials. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1991; 2: 1-8.
161. Ministério da Agricultura, Educação, Saúde e do Comércio e Turismo: Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro. Diário da República - I Serie-B, Nº 245 1992 23-10-1992; 4930-4942.
162. Mendenhall HV: Surgical principles of biomaterials implantation. In: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, et al., eds. Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, vol 1. New York: Marcel Dekker, 1995; 3-25.
163. Taguchi Y, Yamamuro T, Nakamura T, et al.: A bioactive glass powder-ammonium hydrogen phosphate composite for repairing bone defects. *J. Appl. Biomater.* 1990; 1: 217-223.
164. Pazzaglia UE, Zatti G, Cherubino P, Frick W, Koch R: Bone reaction to the implant of intramedullary pins of three different metals in rat femur. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1991; 2: 77-81.
165. Ohura K, Nakamura T, Yamamuro T, et al.: Bone-bonding ability of P_2O_5-free CaO-SiO_2 glasses. *J. Biomed. Mat. Res.* 1991; 25: 357-365.
166. Jansen JA, Waerden JPCM, Wolke JGC, Groot K: Histologic evaluation of the osseous adaptation to titanium and hydroxyapatite-coated titanium implants. *J. Biomed. Mat. Res.* 1991; 25: 973-989.
167. Andersson OH, Liu G, Kangasniemi K, Juhanoja J: Evaluation of the acceptance of glass in bone. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1992; 3: 145-150.
168. Gottlander M, Albrektsson T, Carlsson LV: A histomorphometric study of unthreaded hydroxyapatite-coated and titanium-coated implants in rabbit bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1992; 7: 485-490.

169. Bianco PD, Ducheyne P, Cuckler JM: Local accumulation of titanium released from a titanium implant in the absence of wear. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 31: 227-234.
170. Kitsugi T, Nakamura T, Oka M, et al.: Bone bonding behavior of titanium and its alloys when coated with titanium oxide (TiO_2) and titanium silicate (Ti_5Si_3). *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 32: 149-156.
171. Klein CAPT, Wolke JGC, Blieck-Hogervorst JMA, Groot K: Calcium phosphate plasma-sprayed coatings and their stability: An in vivo study. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 909-917.
172. Kangasniemi IMO, Vahatalo K, Happonen R-P, Yli-Urpo A, Groot K: In vivo reactions of Ca, P particle containing surface reactive glasses. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 993-1002.
173. Caulier H, Waerden JPCM, Paquay YCGJ, et al.: Effect of calcium phosphate (Ca-P) coatings on trabecular bone response: A histological study. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 1061-1069.
174. Elst M, Dijkema ARA, Klein CPAT, Patka P, Haarman MJTM: Tissue reaction on PLLA versus stainless steel interlocking nails for fracture fixation: An animal study. *Biomaterials* 1995; 16: 103-106.
175. DeLange GL, Putter C, Wijs FLJA: Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite-bone interface. *J. Biomed. Mat. Res.* 1990; 24: 829-845.
176. Hayashi K, Uenoyama K, Matsuguchi N, Sugioka Y: Quantitative analysis of in vivo tissue responses to titanium-oxide- and hydroxyapatite-coated titanium alloy. *J. Biomed. Mat. Res.* 1991; 25: 515-523.
177. Cook SD, Thomas KA, Dalton JE, Volkman TK, Whitecloud TS, Kay JF: Hydroxylapatite coating of porous implants improves bone ingrowth and interface attachment strength. *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 989-1001.
178. Moroni A, Caja V, Egger E, Trinchese L, Chao EY: Hydroxyapatite-coated versus uncoated porous titanium samples implanted in the canine femoral cancellous bone. In: Ducheyne P, Kokubo T, Blitterswijk CA, eds. Bone-Bonding Biomaterials. Leiderdorp: Reed Healthcare Communications, 1992; 95-100.
179. Ettel RG, Shaffer EM, Holpuch RG, Brandt CL: Porous hydroxyapatite grafts in chronic subcrestal periodontal defects in rhesus monkeys: A histological investigation. *J. Periodontol.* 1989; 60: 342-351.
180. Morberg P, Albrektsson T: A histomorphometric and removal torque analysis of c.p. titanium implants inserted in reamed bone beds with and without acrylic cement. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1992; 3: 170-174.
181. Takatsuka K, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T: Bone-bonding behavior of titanium alloy evaluated mechanically with detaching failure load. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 157-163.
182. Piattelli A, Piattelli M, Romasco N, Trisi P: Histochemical and laser scanning microscopy characterization of the hydroxyapatite-bone interface: An experimental study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1994; 9: 163-168.
183. Piattelli A, Trisi P: A light and laser scanning microscopy atudy of bone/hydroxyapatite-coated titanium implants interface: Histochemical evidence of unmineralized material in humans. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 529-536.
184. Ohura K, Nakamura T, Yamamuro T, et al.: Bioactivity of $CaO\text{-}SiO_2$ glasses added with various ions. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1992; 3: 95-100.
185. Bloebaum RD, Rubman MH, Hofmann AA: Bone ingrowth into porous-coated tibial components implanted with autograft bone chips. Analysis of ten consecutively retrieved implants. *J. Arthroplasty* 1992; 7: 483-493.

186. Barbier L: Adaptive bone remodelling around oral implants under load-bearing conditions in the mandible of the dog. [PhD Thesis]. Katholieke Universiteit te Leuven; 1995.
187. Afonso A, Vasconcelos M, Branco R, Cavalheiro J: Biological behaviour of a bioactive bone cement implanted in rabbit tibiae. In: Sedel L, Rey C, eds. Bioceramics, vol 10. Paris: Elsevier Science, 1997; 489-492.
188. Tamura J, Kawanabe K, Kobayashi M, et al.: Mechanical and biological properties of two types of bioactive bone cements containing MgO-CaO-SiO_2-CaF_2 glass and glass-ceramic powder. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 30: 85-94.
189. Bloebaum R, Bachus KN, Rubman MH, Dorrq LD: Postmortem comparative analysis of titanium and hydroxyapatite porous-coated femoral implants retrieved from the same patient. *J. Arthroplasty* 1993; 8: 203-211.
190. Tracana RB, Pereira ML, Abreu AM, Sousa JP, Carvalho GS: Stainless steel corrosion products cause alterations on mouse spleen cellular populations. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1995; 6: 56-61.
191. Takamura K, Hayashi K, Ishinishi N, Yamada T, Sugioka Y: Evaluation of carcinogenicity and chronic toxicity associated with orthopedic implants in mice. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 583-589.
192. Carvalho GS, Sousa M: Iron exerts a specific inhibitory effect on CD2 expression of human PBL. *Immunol. Letters* 1988; 19: 163-168.
193. Carvalho GS, Bravo I: In vitro immuno-cytotoxicity of iron evaluated by DNA synthesis of human T lymphocytes stimulated via CD2 and CD3. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1993; 4: 366-371.
194. Steinemann S: The properties of titanium. In: Schröeder A, Sutter F, Krekeler G, eds. Oral Implantology. New York: Thieme Medical Publishers, 1991; 37-58.
195. Liu D-M: Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1997; 8: 227-232.
196. Zhou J, Zhang X, Chen J, Zeng S, Groot K: High temperature characteristics of synthetic hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1993; 4: 83-85.
197. Bruijn JD, Flach JS, Groot K, Blitterswijk CA, Davies JE: Analysis of the bone interface with various types of hydroxyapatite in vitro. [PhD Thesis]. University of Leiden, 1993.
198. Daculsi G, LeGeros JP: Three-dimensional defects in hydroxyapatite of biological interest. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 31: 495-501.
199. Teranobu O, Naito I, Takahashi N, et al.: The influence of sintering condition and surface shape of hydroxyapatite ceramics for the osteoconductivity. In: Kawahara H, ed. Progress in Biomedical Engineering - Oral Implantology and Biomaterials, vol 7. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989; 233-238.
200. Donath K, Rohrer MD, Beck-Mannagetta J: A histologic evaluation of a mandibular cross section one year after augmentation with hydroxyapatite particles. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1987; 63: 651-655.
201. Blitterswijk CA, Grote JJ, Kuypers W: Hydroxyapatite in the infected middle ear. Proceedings of the First International Symposium "Biomaterials in Otology", Leiden, The Netherlands, 1983.
202. Lutgert HW, Blitterswijk CA, Grote JJ: Reconstruction of the external ear canal and middle ear with hydroxyapatite implants. In: Putter C, DeLange GL, Groot K, et al., eds. Advances in Biomaterials - Implant Materials in Biofunction, vol 8. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988; 93-97.

203. Blitterswijk CA, Grote JJ, Lutgert HW, Koerten HK: Biological performance of hydroxyapatite as otologic biomaterial: An evaluation of clinically applied hydroxyapatite. In: Putter C, DeLange GL, Groot K, et al., eds. Advances in Biomaterials - Implant Materials in Biofunction, vol 8. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988; 221-225.
204. Portmann M: Les biomatériaux en otologie. *Rev. de Laryngologie* 1991; 112: 301-303.
205. Yamamura K, Iwata H, Yotsuyanagi T: Synthesis of antibiotic-loaded hydroxyapatite beads and in vitro drug release testing. *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 1053-1064.
206. Downes S, Clifford CJ, Scotchford C, Klein CPAT: Comparison of the release of growth hormone from hydroxyapatite, heat-treated hydroxyapatite, and fluoroapatite coatings on titanium. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 1053-1060.
207. Hamanishi C, Kitamoto K, Tanaka S, Otsuka M, Doi Y, Kitahashi T: A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of Vancomycin. *J. Biomed. Mat. Res. (Appl. Biomat.)* 1996; 33: 139-143.
208. Ragni P, Lindholm TS: Interaction of allogeneic demineralized bone matrix and porous hydroxyapatite bioceramics in lumbar interbody fusion in rabbits. *Clin. Orthop.* 1991; 272: 292-299.
209. Söballe K, Brockstedt-Rasmussen H, Hansen ES, Bunger C: Hydroxyapatite coating modifies implant membrane formation. Controlled micromotion studied in dogs. *Acta Orthop. Scand.* 1992; 63: 128-140.
210. Takata T, Katauchi K, Akagawa Y, Nikai H: New periodontal ligament formation on a synthetic hydroxyapatite surface. *Clin. Oral Impl. Res.* 1993; 4: 130-136.
211. Hahn J, Vassos DM: Long-term efficacy of hydroxyapatite-coated cylindrical implants. *Implant Dent.* 1997; 6: 111-115.
212. Wang BC, Chang E, Lee TM, Yang CY: Changes in phases and crystallinity of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings under heat treatment: A quantitative study. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 1483-1492.
213. Locardi B, Pazzaglia UE, Gabbi C, Profilo B: Thermal behaviour of hydroxyapatite intended for medical applications. *Biomaterials* 1993; 14: 437-441.
214. Radin SR, Ducheyne P: Plasma spraying induced changes of calcium phosphate ceramic characteristics and the effect on in vitro stability. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1992; 3: 33-42.
215. Paschalis EP, Zhao Q, Tucker BE, et al.: Degradation potential of plasma-sprayed hydroxyapatite-coated titanium implants. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 1499-1505.
216. Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T: Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system $CaO\text{-}SiO_2\text{-}Al_2O_3$: Its in vitro evaluation. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1992; 3: 119-125.
217. Hench LL, Wilson J: Bioceramics. *MRS Bulletin* 1991: 62-74.
218. Kangasniemi IMO: Development of Ca,P-ceramic containing bioactive glass composites. [PhD Thesis]. University of Leiden; 1993.
219. Fernandes MHFV: Vidros cerâmicos como biomateriais: Processamento e testes pré-clínicos. Proceedings of "Bone Cell Cultures for Biomedical Applications", Porto, 1995.
220. Kokubo T: Bioactivity of glasses and glass ceramics. In: Ducheyne P, Kokubo T, Blitterswijk CAV, eds. Bone-Bonding Biomaterials. Leiderdorp: Reed Healthcare Communications, 1992; 31-46.
221. Kokubo T, Kushitani H, Ohtsuki C, Sakka S, Yamamuro T: Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramic with simulated body fluid. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1992; 3: 79-83.
222. Kokubo T, Kushitani H, Ohtsuki C, Sakka S, Yamamuro T: Effects of ions dissolved from bioactive glass-ceramic on surface apatite formation. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1993; 4: 1-4.

223. Rehman I, Hench LL, Bonfield W, Smith R: Analysis of surface layers on bioactive glasses. *Biomaterials* 1994; 15: 865-870.
224. Cavalheiro J: Hidroxiapatite modificada: um sucedâneo do tecido ósseo. *Quintessência* 1990; 1: 69-75.
225. Cavalheiro J, Branco R, Peres F, Vasconcelos M: Incremento de biorreactividade da hidroxiapatite pela modificação da sua composição química. *Stoma* 1992; 22: 41-47.
226. Cavalheiro J, Vasconcelos M, Afonso A, Branco R: Influência da composição química e da estrutura dos grânulos de hidroxiapatite na regeneração do tecido ósseo. *Rev. Port. Implantologia* 1994; 1: 35-38.
227. Carvalho B, Cavalheiro J: Study of the degradation mechanism of bioactive cement for implant fixation. Proceedings of the International Conference on Medical Physics & Biomedical Engineering, Nicosia, 1994.
228. Vasconcelos M, Afonso A, Branco R, Planell J, Driessens F, Cavalheiro J: Histological evaluation of two bioactive ceramics. Proceedings of the Fifth World Biomaterials Congress, Toronto, 1996.
229. Cavalheiro J, Vasconcelos M, Afonso A, Branco R: Alterações morfológicas por imersão em água e comportamento biológico de um cimento bioactivo. Proceedings of 4º Congresso Português de Engenharia Biomédica, BIOENG'96, Aveiro, 1996.
230. Sá CM: Caracterização morfológica, microestrutural e microanalítica de materiais por microscopia electrónica de varrimento e microanálise por raios X. Centro de Materiais da Universidade do Porto, 1994.
231. Carvalho GS, Pereira ML, Peres F, Vasconcelos M, Branco R, Cavalheiro J: Reacções in vitro e in vivo a diferentes dimensões de grânulos de hidroxiapatite modificada. *Rev. Port. de Est. e Cir. Maxilofac.* 1992; 32: 213-219.
232. Dalton JE, Cook SD: Influence of implant location on the mechanical characteristics using the transcortical model. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 133-136.
233. Boyde A, Wood C: Preparation of animal tissues for surface-scanning electron microscopy. *J. Microscopy* 1969; 90: 221-249.
234. Donath K, Breuner CA: A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. The Saege-Schliff technique. *J. Oral Pathol.* 1982; 11: 318-325.
235. Lubbe HBM, Klein CPAT, Groot K: A simple method for preparing thin (10μm) histological sections of undecalcified plastic embedded bone with implants. *Stain Technol.* 1988; 63: 171-176.
236. Buijs R, Dogterom AA: An improved method for embedding hard tissue in polymethyl methacrylate. *Stain Technol.* 1983; 58: 135-141.
237. Murice-Lambert E, Banford AB, Folger RL: Histological preparation of implanted biomaterials for light microscopic evaluation of the implant-tissue interaction. *Stain Technol.* 1983; 58: 19-24.
238. Gotfredsen K, Budtz-Jorgensen E, Jensen LN: A method for preparing and staining histological sections containing titanium implants for light microscopy. *Stain Technol.* 1983; 58: 121-127.
239. Villanueva AR, Kujawa M, Mathews CHE, Parfitt AM: Identification of the mineralization front: Comparison of a modified toluidine blue stain with tetracycline fluorescence. *Metab. Bone Dis. & Rel. Res.* 1983; 5: 41-45.
240. Rohrer MD, Shubert CC: The cutting-grinding technique for histologic preparation of undecalcified bone and bone-anchored implants: Improvements in instrumentation and procedures. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1992; 74: 73-78.

241. Fricain JC, Rouais F, Dupuy B: A two-step embedding process for better preservation of soft tissue surrounding coral implants. *J. Biomed. Mat. Res. (Appl. Biomat.)* 1996; 33: 23-27.
242. Skedros JG, Bloebaum RD, Bachus KN, Boyce TM: The meaning of graylevels in backscattered electron images of bone. *J. Biomed. Mat. Res.* 1993; 27: 47-56.
243. Skedros JG, Bloebaum RD, Bachus KN, Boyce TM, Constantz B: Influence of mineral content and composition on graylevels in backscattered electron images of bone. *J. Biomed. Mat. Res.* 1993; 27: 57-64.
244. Johansson CB, Moberg P: Importance of ground section thickness for reliable histomorphometrical results. *Biomaterials* 1995; 16: 91-95.
245. Quirynen M, Steenberghe D, Vuylsteke M: The possibility of measuring plaque growth in vivo within 24 hours. *J. Periodont. Res.* 1985; 20: 321-328.
246. Schepers E, DeClercq M, Ducheyne P: Histological and histomorphometrical analysis of bioactive glass and fibre reinforced bioactive glass dental root implants. *J. Oral Rehabil.* 1988; 15: 473-487.
247. Last JM: Um Dicionário de Epidemiologia, 2ª ed. Lisboa: Oxford University Press, 1995.
248. Garvey BT, Bizios R: A transmission electron microscopy examination of the interface between osteoblasts and metal biomaterials. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 987-992.
249. Albrektsson T, Hansson HA: An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. *Biomaterials* 1986; 7: 201-205.
250. Steflik DE, Sisk AL, Parr GR, et al.: High-voltage electron microscopy and conventional transmission electron microscopy of the interface zone between bone and endosteal dental implants. *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 529-545.
251. Sautier JM, Nefussi JR, Forest N: Surface-reactive biomaterials in osteoblast cultures: An ultrastructural study. *Biomaterials* 1991; 13: 400-402.
252. Matsuda T, Davies JE: The in vitro response of osteoblasts to bioactive glass. *Biomaterials* 1987; 8: 275-284.
253. Davies JE, Lowenberg B, Shiga A: The bone-titanium interface in vitro. *J. Biomed. Mat. Res.* 1990; 24: 1289-1306.
254. Lowenberg B, Chernecky R, Shiga A, Davies JE: Mineralized matrix production by osteoblasts on solid titanium in vitro. *Cells and Materials* 1991; 1: 177-187.
255. Ducheyne P, Willems G, Martens M, Helsen J: In vivo metal-ion release from porous titanium fiber material. *J. Biomed. Mat. Res.* 1984; 18: 293-308.
256. Osborn JF, Willich P, Meenen N: The release of titanium into human bone from a titanium implant coated with plasma-sprayed titanium. *Adv. Biomater.* 1990; 9: 75-80.
257. Merritt K, Brown SA: Distribution of titanium and vanadium following repeated injection of high-dose salts. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 1175-1178.
258. Afonso A, Santos JD, Vasconcelos M, Branco R, Cavalheiro J: Granules of osteopatite and glass-reinforced hydroxyapatite implanted in rabbit tibiae. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1996; 7: 507-510.
259. Cavalheiro J, Afonso A, Vasconcelos M, Branco R, Peres F: Estudos in vivo da regeneração do tecido ósseo com Osteopatite e gesso de Paris. *Stoma* 1994; 30: 15-17.
260. Cavalheiro J, Reis RL, Santos JD, Branco R, Carvalho B: In vitro apatite layer formation on hydroxyapatite, synthetic sintered bone, HA/Bioglass composites and HA-plasma sprayed coatings. Proceedings of the 4th International Conference Biointeractions'93 - Molecular aspects of biomaterials, Noordwijkerhout, The Netherlands, 1993.

261. Ducheyne P, Bianco P, Radin S, Schepers E: Bioactive materials: Mechanisms and bioengineering considerations. In: Ducheyne P, Kokubo T, Blitterswijk CA, eds. Bone-Bonding Biomaterials. Leiderdorp, The Netherlands: Reed Healthcare Communications, 1992; 1-12.

262. Andersson ÖH, Karlsson KH: Silica gel thickness and calcium phosphate formation at the surface of bioactive glass. In: Ducheyne P, Kokubo T, Blitterswijk CA, eds. Bone-Bonding Biomaterials. Leiderdorp: Reed Healthcare Communications, 1992;79-84

Maquetização, composição, impressão e acabamento:
MEDISA - Edições e Divulgações Científicas, Lda
Piso 01 - Faculdade de Medicina do Porto /Hospital de S. João • 4200 Porto
Telefone 02-592164 • Fax 02-592177 • e-mail: medisa@mail.cesae.pt
Rua Gonçalo Cristóvão, 347 - Centro Empresarial Mapfre, s/ 217 • 4000 Porto
Telefone 02-2001479 • Fax 02-2001490 • e-mail: medisa@mail.telepac.pt
http://www.medisa.pt

ISBN: 972-8105-11-8
Depósito-legal: 121899/98