

**WILLIAM DIAS BELANGERO**

**ESTUDO DA BIOCMPATIBILIDADE DO CARBONO REFORÇADO COM FIBRAS DE  
CARBONO NA MUSCULATURA DO RATO**

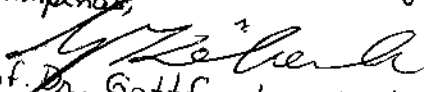
**Campinas, 1988.**

**B41e**

**10152/BC**

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelo médico William Dias Belangero.  
Campinas

WILLIAM DIAS BELANGERO

  
Prof. Dr. Gottfried Köberle  
- orientador -

ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE DO CARBONO REFORÇADO COM FIBRAS  
DE CARBONO NA MUSCULATURA DO RATO

Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obten-  
ção do Título de Doutor.

Orientador - Prof. Dr. Gottfried Köberle

Co-Orientador - Prof. Dr. Walter August Hadler

Campinas, 1988

Ao meu pai (in memoriam) e a minha mãe

À VERA, companheira de  
todos os momentos, e a  
meus filhos Paulo, Juliana  
e Alice.

Esta pesquisa foi financiada parcialmente pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos)

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. Gottfried Köberle, Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e apoio.

Ao Prof. Dr. Walter August Hadler, Titular do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia - UNICAMP, pelo incentivo e orientação imprescindíveis ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Departamento de Materiais Raros do Centro Tecnológico Aeroespacial (C.T.A.) de São José dos Campos-SP, na pessoa do Eng. Sidival Dias, pelo fornecimento dos materiais carbônicos.

A Fundação de Tecnologia Industrial - Divisão de Materiais Refratários, Lorena-SP, na pessoa do Prof. Dr. Daltro Garcia Pinatti, que gentilmente forneceu o titânio, preparou e dimensionou todos os materiais utilizados sob a forma de partículas.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, sob a coordenação do Prof. Dr. Reinaldo Wilson Vieira e especialmente a Sra. Rosana C. M. Ribeiro de Paiva, Srta. Ana Cristina de Moraes e ao Sr. Gomes Sarmiento Alvin, que com experiência e acima de tudo boa vontade, foram companheiros inestimáveis na realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Sinelli Rita Silveira, coordenadora do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia- UNICAMP, que permitiu gentilmente a utilização das instalações desta unidade.

Ao Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis, docente do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia-UNICAMP, pelo auxílio no preparo e pelas sugestões na interpretação dos cortes histológicos.

Ao Prof. Dr. Antonio Celso Arruda, Diretor da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP e em especial à Sra. Rita Helena Buzo Jacon, Técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, pela preparação e análise dos bastões.

A Sra. Sônia R. Rossini secretária do Departamento de Ortopedia e Traumatologia, responsável pela digitação e impressão deste trabalho, que além de excelente profissional foi acima de tudo uma grande amiga.

À Sra. Maria Benedita Ayres Santoro responsável pela revisão do texto.

Aos colegas docentes do Departamento de Ortopedia e Traumatologia pela cooperação e incentivo para que este trabalho fosse concluído.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua execução.

## Í N D I C E

1 - INTRODUÇÃO .....	01
2 - MATERIAL E MÉTODO.....	14
A - MATERIAL.....	15
.1 - Material testado .....	15
.2 - Materiais de referência.....	16
.3 - Acondicionamento e esterilização.....	18
.4 - Animais.....	18
B - MÉTODO .....	22
.1 - Descrição do procedimento cirúrgico.....	22
.2 - Sacrifício dos animais e preparação do material para estudo histológico.....	24
.3 - Avaliação histológica.....	26
.4 - Avaliação da superfície dos bastões de CRFC e Ti através da microscopia eletrônica de varredura..	28
3 - RESULTADOS.....	29
A - ASPECTOS GERAIS.....	30
B - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	30



C - AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES DO MÚSCULO TRÍCEPS SURAL.....	31
D - AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO MÚSCULO RETO ANTERIOR DO ABDOME.....	36
E - AVALIAÇÃO DA ESPESSURA DA CAMADA DE FIBROSE SITUADA AO REDOR DOS BASTÕES DE CRFC E Ti, COM 52 SEMANAS DE SEGUIMENTO.....	38
F - AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO GÂNGLIOS LINFÁTICOS.....	40
G - AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS BASTÕES DE CRFC E Ti ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	40
4 - DISCUSSÃO.....	70
5 - CONCLUSÕES.....	84
6 - RESUMO .....	86
7 - SUMMARY.....	89
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

INTRODUÇÃO

A história dos implantes metálicos começa em 1.565 quando PETRONIUS utiliza uma placa de ouro para obturar um defeito do palato. Dois séculos depois é citada a primeira utilização de arames metálicos, feitos de prata, como meio de síntese de fraturas (ZIEROLD, 1924). No entanto, apesar do entusiasmo dos cirurgiões da época, o emprego de sínteses metálicas era limitado devido ao alto índice de infecção e de intolerância que se desenvolviam no hospedeiro. (MEARS, 1979 c)

De acordo com ZIEROLD (1924) em 1829, Levert, pela primeira vez, avaliou em cães, a tolerância da suturas metálicas, utilizando como materiais o ouro, a prata, o chumbo e a platina, constatando que este último era o material que produzia menor irritação tissular.

A partir de 1920 o aço cromo-níquel passou a ser utilizado na produção de implantes, já que os metais nobres eram muito moles e caros e o aço vanadium não apresentava boa resistência à corrosão tissular (BARDOS, 1977). Somente após a I Guerra Mundial é que os implantes de aço com taxas mais elevadas de cromo e níquel passaram a ser utilizados, devido a sua maior resistência mecânica e maior resistência à corrosão. Estes materiais, utilizados durante este período, vieram diminuir os graves problemas da corrosão e de alterações tissulares que ocorriam com os implantes férricos oxidáveis.

Em 1926 as fábricas Krupp começaram a produzir um aço com cromo, níquel e molibdênio, que apresentava excelentes propriedades mecânicas e boa resistência à corrosão, sendo portanto superior aos materiais da época, motivo pelo qual passou a ser utilizado na produção dos implantes ortopédicos (MEARS, 1979 a).

Em 1929 surgiu através do laboratório Austenal de Nova Iorque, o Vitalium (R), uma liga de cobalto-cromo-molibdênio, com excelente resistência mecânica passando a ser utilizada também na produção de implantes ortopédicos a partir de 1936 (Mears, 1979 a)

A partir de 1946 o Colégio Americano de Cirurgiões aprovou e recomendou a utilização do aço inoxidável Tipo 316 e 317 para a produção de implantes. Este material deu origem ao aço 316L que é, sem dúvida, o mais utilizado ainda hoje, na produção dos implantes ortopédicos (POHLER & STRAUMANN, 1975; BARDOS, 1977; LANGER, 1983).

Atualmente, milhares de pessoas por ano recebem implantes dos mais variados tipos, com finalidade de fixação ou de substituição parcial ou total de estruturas do corpo humano. Em 1978 no U.S.A., por exemplo, foram implantadas 250.000 próteses totais ou parciais de quadril, 100.000 próteses de joelho, 400.000 próteses de silastic para articulações de mão e foram feitas 100.000 reconstruções de tornozelo, cotovelo e ombros que necessitaram algum tipo de implante (BURSTEIN, 1978)

As indicações para uso clínico dos implantes em Ortopedia e Traumatologia vêm crescendo, não só pelo aprimoramento das técnicas cirúrgicas e maior conhecimento da fisiologia e biomecânica osteoarticular, mas também pela melhoria da qualidade dos materiais que estão sendo utilizados para esta finalidade. No entanto, por trás deste campo de atividades, além do interesse científico no aprimoramento dos implantes, existe também o interesse econômico, estimulando o desenvolvimento de uma nova indústria denominada por SALOMON de " Human Spare Parts Business " com um faturamento mundial em 1977 estimado em U\$ 200.000.000, obtidos pela venda de próteses, e, com uma previsão de crescimento de 15% ao ano (BURSTEIN, 1978). Estas pressões econômicas se farão presentes, no sentido de estimular o uso de implantes, mas caberá ao ortopedista, a avaliação rigorosa dos riscos e benefícios que poderão advir do seu uso.

Embora seja simples verificar o desempenho do implante pelo alívio dos sintomas do paciente, a avaliação dos riscos impostos é mais difícil de ser medida. Excluindo-se as complicações por falhas técnicas ou por infecções, restam os problemas oriundos da compatibilidade do implante com o tecido hospedeiro. Atualmente, qualquer material produzido para fins de uso médico

deve ser testado inicialmente em laboratório, com a finalidade de se avaliar a sua toxicidade. O estudo da interação entre o material e o hospedeiro é denominado por alguns autores como estudo da biocompatibilidade (HOMSY, 1970; ASTH, 1973; WILLERT, 1980; ULREICH & CHVAPIL, 1981).

Etimologicamente a palavra compatível significa: " que é suscetível de se ajustar a outro ou outros; capaz de coexistir". De acordo com esta definição, em uma situação ideal de compatibilidade, deviríamos esperar que este material assumisse perfeitamente as funções a que foi destinado, não produzisse efeitos deletérios e nem sofresse alterações do meio onde estivesse colocado. No entanto, apesar de todo avanço tecnológico não se obteve ainda um material que possa ser considerado completamente compatível ou inerte para uso em Ortopedia e Traumatologia (BLACK, 1984; KLINKMANN, WOLF & SCHMITT, 1984).

Os efeitos nocivos do implante sobre o organismo dependem, principalmente, da liberação de partículas ou de produtos tóxicos provenientes da degradação eletroquímica (MEARS, 1979 b) ou mesmo da simples dissolução do material implantado (DOBSON, MATHEWS & STELLING, 1970). A liberação de partículas ocorre principalmente com os implantes metálicos, em contato com o meio interno. Este, contendo radicais ácidos, potenciais elétricos e diferentes tensões de oxigênio tecidual, causa a corrosão destes materiais (MEARS, 1979 b; BLACK, 1984;). Este fenômeno eletroquímico pode produzir nos tecidos vizinhos a chamada inflamação eletrolítica que foi descrita como um processo inflamatório estéril (LAING, 1973). O aço inoxidável libera, além de grande quantidade de ferro, íons níquel que podem ser citotóxicos e carcinogênicos (BLACK, 1984). As ligas à base de cobalto, liberam íons que também podem ter a mesma toxicidade dos íons níquel (BEARDEN & COOKE, 1980; EVANS & THOMAS, 1986). O comportamento do cromo é variável, dependendo do seu estado de oxi-redução: se trivalente, tem efeito biológico, se hexavalente, penetra facilmente na célula, podendo ser carcinogênico inclusive em baixas concentrações (BLACK, 1984). Além disto, os produtos de corrosão podem diminuir

a quimiotaxia dos leucócitos para o local do implante, podendo este fenômeno, ser responsável pela diminuição das defesas locais (BLACK, 1984).

A resposta tecidual de vários metais foi avaliada por McNAMARA & WILLIAMS (1981) na musculatura de ratos. Os autores concluíram que as respostas teciduais foram típicas para cada um dos metais e perfeitamente reprodutíveis: os discos de cobre e níquel estavam pouco aderidos à musculatura, devido à corrosão destes metais, que produziu também um infiltrado inflamatório local; o cobalto não produziu camada de fibrose ao redor do implante. Havia aglomerados de linfócitos e plasmócitos, cuja presença, sugeriu aos autores, possível papel na produção local de imunoglobulinas. Estas conclusões são importantes do ponto de vista clínico, pois COLEMAN, HERRINGTON & SCALES (1973), encontraram em nove pacientes portadores de próteses totais de quadril, fabricadas com ligas à base de cromo-cobalto, níveis séricos e urinários persistentemente altos destes íons. Por outro lado, vários autores demonstraram haver uma forte associação entre a hipersensibilidade produzida pelo cobalto e o desprendimento de partículas do implante (EVANS et alli, 1974; CRAMERS & LUCHT, 1977). Há sugestões de que em pacientes sensibilizados a determinado metal, a liberação constante de íons leva à proliferação da camada íntima dos vasos adjacentes à prótese, com obstrução destes, necrose do tecido ósseo e desprendimento da prótese ( CRAMERS & LUCHT, 1977).

FERGUSON et alli (1962) implantaram no tecido muscular de coelhos, por um período de 6 a 16 semanas, bastões de ligas metálicas à base de cromo-cobalto, aço inoxidável 316L e metais como alumínio, titânio e zircônio. Os autores observaram que tanto a corrosão dos implantes a nível do tecido muscular, como a captação dos íons metálicos pelos diferentes órgãos estavam relacionados a fatores constitucionais de cada animal. O acúmulo de íons metálicos ocorreu principalmente no baço e no pulmão, sendo seguidos pelo fígado e pelo rim. No baço, predominou cromo, cobalto, titânio, níquel, ferro, alumínio e zircônio, ao passo que

no pulmão o cobalto e o níquel foram os íons mais encontrados, o mesmo ocorrendo com o rim. A maioria destes elementos é excretada por via fecal e, em menor intensidade, pela via urinária, exceção feita ao cromo que é eliminado por via biliar (MEARS, 1979b).

O acúmulo de metais e/ou dos seus produtos de corrosão, nos tecidos vizinhos ao implante ou órgãos a distância, podem ter efeitos lesivos a médio e a longo prazo, que ainda não estão completamente definidos. Esta dúvida é compartilhada por vários autores, que demonstraram grande preocupação quanto à possibilidade de os implantes permanentes induzirem a formação de tumores (LAING, 1973; MEARS, 1979b; KAWAHARA, 1983; BLACK, 1984; KLINKMANN et alli, 1984;).

Recentemente, foram publicados três relatos que descreveram a presença de tumores ao redor de próteses totais de quadril, feitas a partir das ligas de cobalto e de aço inoxidável (BAGO et alli, 1984; PENMAN & RING, 1984; SWAAN, 1984). Apesar dos autores não relacionarem a presença dos tumores diretamente com a liberação de partículas ou com a corrosão dos implantes, esta possibilidade não pode ser completamente afastada.

Além das ligas metálicas que são, sem dúvida, os materiais mais utilizados na produção dos implantes em ortopedia, os polímeros de alta densidade, os materiais cerâmicos e o cimento acrílico são também utilizados. Tanto o polietileno como os materiais cerâmicos produzem reação inflamatória discreta quando em forma de grandes fragmentos, ao passo que na forma de partículas incitam reação inflamatória mais importante (DAVIS et alli, 1972; BURSTEIN, 1978). As próteses totais fabricadas com estes materiais liberam partículas cujo tamanho varia de 1-5  $\mu$  à 30-50  $\mu$  (WAGNER et alli, 1976; PAZZAGLIA, DELL'ORBO & WILKINSON, 1987). WILLERT & SEMLITSCH (1976), acreditam que a reação inflamatória granulomatosa produzida pela liberação destas partículas de metal, polietileno e cimento acrílico ao redor do implante seja responsável pelo desprendimento principalmente do componente femoral, argumento que também é apoiado por outros autores (WALKER & BULLOUGH, 1973; WAGNER et alli, 1976; RAE, 1979; PO-IN, 1981;

PAZZAGLIA, DELL'ORBO & WILKINSON, 1987).

MEACHIN & PEDLEY (1982) demonstraram que o cimento acrílico, quando implantado no tecido muscular do rato, na forma de partículas, induz uma reação inflamatória crônica, com predomínio de macrófagos e células gigantes, respaldando a hipótese de WILLERT & SEMLITSCH (1976), embora não tenham observado transformação carcinogênica, mesmo dois anos após a implantação.

Quando estudamos a compatibilidade de um material para uso em Ortopedia e Traumatologia, devemos levar em conta que o aparelho locomotor é, essencialmente, um sistema de alavancas, submetido a esforços mecânicos constantes, cujos pontos de aplicação de forças são muito variados. Esta lembrança, faz necessária a consideração, não só dos aspectos biológicos, propriamente ditos, mas também dos aspectos mecânicos de compatibilidade. Do ponto de vista mecânico, dois materiais terão boa compatibilidade quando a rigidez entre eles for semelhante. Esta característica do material é função primordial da sua composição e, pode ser quantificada através da determinação de seu módulo de elasticidade (VAN VLACK, 1970; CHRISTEL et alii, 1987).

As ligas metálicas e os materiais cerâmicos, apresentam altos módulos de elasticidade, que chegam a ser 10 a 40 vezes mais rígidos que o tecido ósseo (CHRISTEL et alii, 1987). A importância deste fato reside na redistribuição da carga que se faz entre o osso e o implante. Assim, quanto mais rígido for o implante, maior será a quantidade de carga absorvida por ele, fazendo com que o osso subjacente seja protegido. Esta situação favorece a remodelação óssea adaptativa, neste local, que se manifesta através da atrofia cortical e do aumento da porosidade do tecido ósseo. Isto é, não existindo uma boa compatibilidade mecânica entre o implante e o osso, este poderá sofrer alterações em sua estrutura. A utilização de materiais com módulo de elasticidade semelhantes ao do osso, produzirá uma situação inversa, com manutenção da estrutura e portanto das propriedades mecânicas, normais, deste tecido.



Com este objetivo , alguns autores vêm utilizando as ligas de titânio e os materiais isoelásticos, criados a partir da união de pelo menos dois outros, com o objetivo de solucionar estas duas problemáticas: a compatibilidade biológica e mecânica dos implantes (ANDERSSON et alli, 1978; UHTHOFF, BARDOS & LISKOVA-KIAR, 1981).

Por outro lado, no decorrer do desenvolvimento dos programas aeroespaciais e nucleares , houve necessidade de uma evolução acentuada no campo da ciência dos materiais. Desta forma, surgiram os materiais carbônicos com elevado grau de pureza , que, além de apresentarem boas propriedades mecânicas, exibiam também boa tolerância tecidual (JENKINS 1980; JENKINS, 1982).

A biocompatibilidade dos materiais carbônicos vem sendo demonstrada há muitos séculos, inclusive por sociedades primitivas que se utilizavam de lascas de bambu carbonizadas para a realização de tatuagens no corpo. Partículas de carbono coloidal também vêm sendo utilizadas há muitos anos como marcador vital (JENKINS, 1982). Por outro lado, também não existem evidências clínicas ou experimentais para imputar ao grafite puro a responsabilidade das pneumoconioses observadas em trabalhadores de minas de carvão (HANDA, 1983).

No início da década de 60, segundo BOKROS et alli (1975) GOTT, avaliando a influência das cargas elétricas na gênese da trombose sangüínea, verificou que a coagulação não ocorria na presença de cargas elétricas negativas e nem sobre superfícies pintadas com grafite coloidal, sugerindo um efeito anti-trombogênico ao carbono. Embora, mais tarde, esta última associação tenha sido afastada, o grupo de GOTT, da Universidade de WISCONSIN e o " Grupo de Carbono" da " General Atomic Company" em San Diego, deram um grande impulso aos estudos sobre biocompatibilidade deste material. Projetos foram surgindo não só com o objetivo de se avaliar a sua tolerância tecidual, mas também com o intuito de se encontrar aplicabilidade clínica para estes materiais.

No campo da medicina, os materiais carbônicos com maior perspectiva de uso são o carbono vítreo, as fibras de carbono e o carbono reforçado com fibras de carbono. Estes três materiais apresentam a mesma constituição química, ou seja, átomos de carbono formando uma estrutura cristalina, com características mecânicas diferentes, já que são obtidos a partir de substratos e de tratamentos térmicos distintos (JENKINS, 1982).

O carbono vítreo é um material obtido através de um substrato orgânico, como as resinas fenólica ou furfúrica (JENKINS & CARVALHO, 1977; JENKINS & GRIGSON, 1979; JENKINS, 1980; JENKINS, 1982). Este material não necessita normalmente de acabamento superficial para ficar polido e livre de porosidades. É bastante duro, quebradico e sujeito a trincas quando com espessura superior a 3 mm (STANITSKI & MOONEY, 1973; TARVAINEN et alli, 1985), não sendo adequado portanto para a fabricação de implantes ortopédicos (TARVAINEN et alli, 1985).

As fibras de carbono são produzidas a partir de um substrato sintético, como o nylon ou a poliacrilonitrila. Este material assim obtido, possui elevado módulo de elasticidade e principalmente grande resistência à tração axial (JENKINS, 1980; JENKINS, 1982; HASTINGS, 1983). Estas fibras podem ser adicionadas às resinas furfúrica ou fenólica e este composto submetido novamente à pirólise, produz assim um novo material, denominado carbono reforçado com fibras de carbono (CRFC). As características mecânicas deste último material, dependerão da proporção entre a resina e as fibras e da orientação das fibras no interior da resina carbônica (JENKINS, 1980; RETTIG & WEBER, 1983; BOWMAN & MANLEY, 1984; CHRISTEL et alli, 1987;) Assim, variando-se a disposição e a quantidade de fibras e de resina, é possível, teoricamente, criar-se um material com características mecânicas e com módulo de elasticidade previsíveis. As fibras de carbono podem corresponder em até 70% do peso total do composto e serem orientadas especialmente em uma, duas ou três direções, criando-se materiais adequados a suportar esforços mecânicos em flexão, tração, compressão e torção. Existem inclusive estudos para o desen-

volvimento de CRFC em quatro dimensões (CHRISTEL et alli, 1987), no entanto, a elevada tecnologia necessária para a obtenção e o alto custo inviabilizavam ainda, em nosso meio, a fabricação de CRFC com arranjos em três ou mais dimensões. Desta forma pode-se considerar o carbono reforçado com fibras de carbono como um material de grande potencialidade para a produção futura de implantes em Ortopedia. Além disto, as fibras de carbono também podem ser associadas a plásticos e outras resinas, sem serem submetidas à pirólise, formando materiais compostos, com propriedades mecânicas diferentes (SCLIPPA & PIEKARSKI, 1973; HASTINGS & THANH THUY, 1976; PILLIAR & BLACKWELL, 1976; PAL & SAHA, 1982; HUETTNER, 1983; HUETTNER & HUTTINGER, 1984; EKSTRAND, RUYTER & WELLENDORF, 1987).

Com relação ao estudo da biocompatibilidade destes materiais, podem relatar alguns trabalhos clássicos que foram responsáveis pela divulgação da idéia de que estes materiais eram completamente inertes no organismo (BENSON, 1971; BOKROS et alli, 1975). De acordo com BENSON, 1971, este mesmo autor, em 1967, através da implantação de pó de resina carbônica no tecido muscular do rato, não observou a presença de necrose muscular, inflamação ou reação carcinogênica. De acordo com este mesmo autor, o primeiro implante de fibras de carbono em humanos foi realizado em 1968, a nível do tecido celular subcutâneo e sem manifestação de reação inflamatória. STANITSKI & MOONEY (1973) avaliaram a fixação de pinos de carbono vítreo em fêmuras e úmeros de cães e após realização dos testes de arrancamento e avaliações histológicas, os autores concluíram que o material tinha produzido boa fixação óssea e discreta reação inflamatória. No entanto, coube ao grupo de Cardiff, no País de Gales, liderado por McKibbin, a responsabilidade da aprovação e divulgação dos materiais carbônicos para uso médico, tanto para substituição de ligamentos e tendões como para fabricação de materiais de síntese (TAYTON et alli, 1982). Pertencentes a este grupo, JENKINS et alli (1977), publicaram pela primeira vez os resultados da substituição do tendão de Aquiles de coelhos e ovelhas por próteses de fibras de carbono-

no, conseguindo, segundo os autores, obter a formação de um neotendão, com reação inflamatória discreta, sem a formação de granulomas do tipo corpo estranho. Estes resultados estimularam a realização de novas investigações em laboratório (FORSTER et alii, 1978; JENKINS, 1978; BEACON & AICHROTH, 1980; JENKINS & McKIBBIN, 1980; NEUGEBAUER, HEIBING & WOLTER, 1981; TAYTON, PHILLIPS & RALIS, 1982; MINNS, MUCKLE & DONKIN, 1982; VETH et alii, 1983; MICHELI, PIZZOFERRATO & LEAKE, 1984; CLAES & NEUGEBAUER, 1985; MENDES et alii, 1985; PARSONS et alii, 1985;)

também a utilização destes implantes em humanos (JENKINS & McKIBBIN, 1980; RUSHTON, DANDY & NAYLOR, 1983; HOWARD et alii, 1984; BEJUI et alii, 1984; MENDES et alii, 1985; KING & BULSTRODE, 1985; FUNK, 1987).

Estes resultados inicialmente animadores, passaram a ser encarados com maior reserva depois das publicações de RUSHTON, DANDY & NAYLOR (1983). Estes autores reconstruíram o ligamento cruzado anterior com fibras de carbono em 39 pacientes. Em 10 pacientes com um período médio de seguimento de 16,9 meses houve necessidade de exame artroscópico, pois eles estavam com os joelhos inchados e dolorosos. O exame mostrou que os ligamentos de carbono não haviam induzido a formação de neoligamentos, exceção feita a 2 pacientes que apresentavam alguma resposta fibroblástica às fibras de carbono. O inchaço articular era devido a uma irritação sinovial produzida por fragmentos de fibras de carbono que estavam espalhados no interior da articulação. AMIS et alii (1984), MENDES et alii (1985a) e MENDES et alii (1985b), também observaram reação inflamatória granulomatosa persistente, ao redor das fibras de carbono, em situações clínicas semelhantes, sugerindo que as indicações deste tratamento, fossem feitas somente em casos selecionados.

Com relação ao CRFC, as suas características mecânicas tornam-no adequado à produção de implantes sólidos, que podem ser submetidos à carga (JENKINS & CARVALHO, 1977; JENKINS, 1980; JENKINS, 1982;). Este material foi inicialmente utilizado para produção de anéis, usados na montagem de gaiolas de válvulas cardíacas.

cas com bons resultados (JENKINS & GRIGSON, 1979). Posteriormente passou a ser utilizado na fabricação de placas, pinos e próteses para uso experimental e clínico (HASTINGS, 1983; STUART, 1986; CHRISTEL et alli, 1987;). Estudos sobre a sua biocompatibilidade no tecido ósseo foram realizados por NEUGEBAUER et alli (1981) e por ADAMS & WILLIAMS (1984) implantando-o na forma de partículas e de bastões respectivamente. O primeiro estudo mostrou a presença de discreta reação inflamatória, sem reação do tipo corpo estranho. O segundo, embora com seguimento de apenas 8 semanas, também apresentou bons resultados, avaliados através de microscopia eletrônica de varredura. De acordo com os autores houve crescimento ósseo ao redor dos bastões com discreta camada de tecido fibroso.

LANGER (1983), publicou uma revisão extensa sobre materiais disponíveis para a produção de implantes ortopédicos e afirmou que os materiais carbônicos, além de caros, produziam reação inflamatória intensa quando em forma de partículas, chegando a considerá-los inadequados para este fim.

Podemos considerar que o comportamento do carbono reforçado com fibras de carbono merece maior investigação, e os bons resultados obtidos por alguns autores podem estar relacionados ao fato de que os testes de compatibilidade foram realizados com pequeno tempo de seguimento, e, no tecido ósseo, que exterioriza a reação inflamatória de forma lenta (NEUGEBAUER et alli, 1981; ADAMS & WILLIAMS, 1984;).

No Brasil, a aplicação de materiais carbônicos nas áreas biomédicas iniciou-se em 1975 com o projeto "Desenvolvimento de Válvulas Cardíacas em Carbono" na Divisão de Materiais do IPI/CTA, em conjunto com o Centro Experimental de Pesquisa em Bi engenharia (CEPEB), Instituto do Coração e Faculdade de Medicina da USP. A partir de 1977 iniciou-se o projeto "Fibra de Carbono", o qual continuou em andamento em 1983 com o projeto "Uso de Carbono em Ortopedia", tendo como objetivo a avaliação de aplicabilidade deste material neste área.

Assim, foi iniciado no C.T.A., a produção do carbono reforçado com fibras de carbono, utilizando-se para tal, fibras de carbono, com alto módulo de elasticidade obtidas a partir da poliacrilonitrila impregnadas com resina furfurílica.

Apesar da resina furfurílica não ser utilizada normalmente na produção do carbono reforçado com fibras de carbono, na Europa e na América do Norte, este material foi utilizado no projeto " Carbono em Ortopedia. Isto foi devido à experiência adquirida no projeto anterior (Desenvolvimento de Válvulas Cardíacas em Carbono), às facilidades de aquisição, inclusive no mercado nacional, e ao seu alto teor de carbono residual, em torno de 50%.

As fibras de carbono impregnadas com a resina furfurílica eram compactadas através de um processo de prensagem manual e o corpo de prova, assim obtido, era submetido à pirólise controlada, à temperatura de  $1000^{\circ}\text{C}$  em atmosfera inerte, ou seja, sem a presença de oxigênio.

Após a padronização do processo de fabricação, era necessário que o material fosse submetido a avaliações das suas qualidades mecânicas (realizadas no C.T.A.) e da sua tolerabilidade pelos tecidos vivos, principalmente com a finalidade de se avaliar a aplicabilidade de um material que estava sendo produzido no Brasil, com tecnologia desenvolvida e adaptada às nossas condições.

Desta forma, tomamos como objetivo deste trabalho o estudo da biocompatibilidade do carbono reforçado com fibras de carbono " in vivo", através da análise da reação inflamatória produzida por este material na forma de partículas e bastões, no tecido muscular do rato, de forma comparativa com as reações produzidas pelo titânio e pela resina carbônica

**MATERIAL E MÉTODO**

## A - MATERIAL

### A.1 - MATERIAL TESTADO

O material testado foi o Carbono Reforçado com Fibras de Carbono na forma de partícula e de bastão. Este material foi produzido e cedido pelo Departamento de Materiais Raros do Centro Tecnológico Aeroespacial (CTA) de São José dos Campos. A transformação do material em partículas foi realizada de duas formas: A primeira foi realizada no C.T.A., com pilão e pistilo de ágata. O pó obtido era passado em peneira granulométrica de 200 malhas/cm<sup>2</sup> obtendo-se partículas irregulares de até 30 u m de diâmetro e pequenos fragmentos de fibra de carbono com 100 u m de comprimento denominado de C.R.F.C.-A. A segunda foi realizada na Fundação de Tecnologia Industrial - Divisão de Materiais Refratários (Lorena - SP.), através de um moinho de ágata preparado para esta finalidade. As partículas obtidas foram dimensionadas por passagens sucessivas em peneiras granulométricas de 400 malhas/cm<sup>2</sup> obtendo-se assim partículas e pequenas fibras com tamanho máximo de 11 u m de diâmetro denominadas de CRFC-B. Foram produzidos pelo C.T.A. 28 bastões de CRFC com 2mm de diâmetro e 20 mm de comprimento.



## A-2 MATERIAIS DE REFERÊNCIA

Os materiais utilizados como referência foram o Titânio (Ti) e a Resina Carbônica (R.C.). O Ti com elevado grau de pureza foi cedido pela Fundação de Tecnologia Industrial - Divisão de Materiais Refratários, (Lorena-SP), na forma de pó e bastões. O pó foi dimensionado com a mesma metodologia utilizada para os materiais carbônicos obtendo-se duas frações, uma com 30  $\mu$ m e outra com 11  $\mu$ m, denominadas de Ti-A e Ti-B respectivamente. Os 28 bastões de Ti foram também fabricados com as mesmas dimensões dos bastões de CRFC. A R.C. foi transformada em pó com a mesma metodologia utilizada para obtenção do CRFC-B, obtendo-se então partículas de 11  $\mu$ m de diâmetro. Amostras do CRFC e da R.C. foram enviadas à Divisão de Materiais Raros do CTA, bem como amostra do Ti à Fundação de Tecnologia Industrial, para análise química, com a finalidade de se confirmar o grau de pureza dos materiais. Estes valores estão presentes na Tabela I.

**TABELA I**  
**ANÁLISE QUÍMICA DAS PARTICULAS DE Ti, CRFC, R.C. e FIBRAS DE**  
**CARBONO**

Impurezas ppm-peso	Ti	C.R.F.C.	R.C.	Fibra de Carbono
V	0,0	8,0	8	8,0
Ti	- - -	17,0	352,0	8,0
Ni	0,0	3,5	11,5	2,8
Zn	0,0	4,2	5,5	172,5
Mn	18,0	4,9	3,1	1,0
Mg	452,0	5,7	5,9	102,0
K	0,0	17,0	13,0	29,5
Fe	413,0	83,0	129,0	19,5
Cu	16,0	7,6	10,4	9,0
Ca	12,0	13,0	10,0	252,5
Co	0,0	1,0	1,3	0,7
Cr	19,0	0,0	0,0	0,0
Na	7,0	0,0	0,0	0,0
Al	14,0	0,0	0,0	0,0
Si	143,0	0,0	0,0	0,0
Sn	708,0	0,0	0,0	0,0
Pb	43,0	0,0	0,0	0,0
Mo	0,0	0,0	0,0	0,0

### A.3 - ACONDICIONAMENTO E ESTERILIZAÇÃO

Os materiais, na forma de partículas, foram recebidos em uma única remessa, em vidros separados e devidamente identificados. Em seguida, foram repartidos em vários vidros previamente lavados com água destilada e identificados através de siglas específicas. Os vidros eram fechados com papel celofane duplo e enviados para esterilização com óxido de etileno.

Os bastões de CRFC e Ti eram lavados em água destilada e separados em lotes de cinco unidades, para serem esterilizados com óxido de etileno.

### A.4 - ANIMAIS

Foram operadas 120 ratas brancas (Rattus norvegicus) variedade Wistar, com peso entre 180 e 200 g, não isogênicas, oriundas do Biotério Central da UNICAMP entre 13/06/85 e 13/07/87. Estes animais foram distribuídos da seguinte forma:

- 50 animais para o estudo da reação inflamatória aguda produzida pelos cinco materiais na forma de partículas (CRFC-A, CRFC-B, tI-A, Ti-B e R.C.) e bastões (CRFC e Ti) com período de observação de 1 e 2 semanas. Em 10 animais acompanhados por 1 semana foram colocados 10 bastões de CRFC e 10 de Ti.

- 60 animais para o estudo da reação inflamatória crônica comparativa entre os cinco materiais (CRFC-A, CRFC-B, Ti-A, Ti-B e R.C.) na forma de partículas, nos seguintes períodos de observação: 4 semanas e 8 semanas com variação de  $\pm 15$  dias, 16 semanas com variação de  $\pm 15$  dias e 52 semanas com variação de  $\pm 30$  dias. Em 10 animais do grupo de 4 semanas e em 8 animais do grupo de 52 semanas foram colocados 10 e 8 bastões de CRFC e Ti respectivamente.

- 10 animais para o estudo comparativo da reação inflamatória produzida pelo CRFC-A e Ti-A após 78 semanas com variação de  $\pm 45$  dias de observação.

Estes dados estão apresentados nas Tabelas II e III

TABELA II  
DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM O TEMPO DE SEGUIMENTO E  
COM O MATERIAL IMPLANTADO NA FORMA DE PARTÍCULAS

Tempo de Seguimento	Animais Operados	Animais Observados	Material implantado	
			Lado D	Lado E
1 SEMANA	5	5	CRFC-A	-
	5	5	CRFC-B	-
	5	5	-	Ti-A
	5	5	-	Ti-B
	5	5	-	R.C.
	5	5	-	-
2 SEMANAS	5	5	CRFC-A	-
	5	5	CRFC-B	-
	5	5	-	Ti-A
	5	5	-	Ti-B
	5	5	-	R.C.
	5	5	-	-
4 SEMANAS	5	5	CRFC-A	Ti-A
	5	5	CRFC-B	Ti-B
	5	5	CRFC-B	R.C.
	5	5	-	-
8 SEMANAS (±15 DIAS)	5	5	CRFC-A	Ti-A
	5	4	CRFC-B	Ti-B
	5	5	CRFC-B	R.C.
	5	4	-	-
16 SEMANAS (±15 DIAS)	5	4	CRFC-A	Ti-A
	5	4	CRFC-B	Ti-B
	5	4	CRFC-B	R.C.
	5	4	-	-
52 SEMANAS (±30 DIAS)	5	4	CRFC-A	Ti-A
	5	5	CRFC-B	Ti-B
	5	4	CRFC-B	R.C.
	5	4	-	-
78 SEMANAS (±45 DIAS)	10	6	CRFC-A	Ti-A

TABELA III

DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM O TEMPO DE SEGUIMENTO E  
COM O MATERIAL IMPLANTADO NA FORMA DE BASTÃO.

Tempo de Seguimento	Animais Operados	Animais Observados	Material Implantado Bastões	
			Lado D	Lado E
1 SEMANA	5	5	CRFC	-
	5	5	-	Ti
4 SEMANAS	10	10	CRFC	Ti
52 SEMANAS (±30 DIAS)	8	5	CRFC	Ti

## B - MÉTODO

### B.1 - DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais eram colocados em campânula com éter etílico para indução da anestesia, a qual era mantida através da aspiração de éter etílico que embebia um chumaco de algodão. Em seguida, os animais eram submetidos a tricotomia dos membros inferiores e da região abdominal. Era feita uma incisão longitudinal sobre a coxa direita, de aproximadamente 3 cm de comprimento, expondo-se a musculatura adutora que tinha suas fibras separadas por dissecação roma, no sentido crânio-caudal, para se visualizar o músculo tríceps sural que era isolado com auxílio de uma alavanca de dentista. Sua fascia era seccionada longitudinalmente e as fibras musculares divulsionadas, criando-se uma cavidade que era preenchida à direita com pó de CRFC-A ou B e à esquerda com Ti-A ou B ou R.C. em quantidade correspondente ao volume contido em uma cureta Q-0, 294-01 número 000 da marca Quinelato. A fascia e as fibras musculares eram então aproximadas, a alavanca era retirada e a pele fechada com mononylon 5-0 com pontos contínuos.

Após a colocação das partículas fazia-se, no abdome, uma incisão longitudinal, mediana de 3 cm de comprimento para exposição do músculo reto anterior do abdome. Os bastões de CRFC e Ti eram introduzidos dentro de uma cavidade produzida entre suas fibras, à direita para o CRFC e à esquerda para o Ti através de uma perfuração prévia da fascia e do tecido muscular com agulha

de calibre 40 x 12. A pele era suturada da mesma forma já descrita anteriormente.

Para que não ocorresse contaminação de um material com outro na forma de partículas, durante a implantação, trabalhava-se com dois instrumentais cirúrgicos ou faziam-se os procedimentos em dias diferentes. O CRFC ou Ti, implantados no mesmo animal, tinham o mesmo tamanho de partículas.

Para se avaliar a reação inflamatória produzida pelo trauma-cirúrgico, nos grupos sacrificados com uma e duas semanas, fazia-se a implantação das partículas à direita ou à esquerda e, no lado oposto, o procedimento era realizado sem a introdução do material.



## B.2 - SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA ESTUDO HISTOLÓGICO

No dia previsto para o sacrifício, os animais eram anestesiados e, através do mesmo acesso cirúrgico na coxa, eram retirados os músculos tríceps sural direito e esquerdo após secção da sua origem e inserção.

O músculo reto anterior do abdome era exposto e dele se retiravam dois fragmentos retangulares que continham os bastões implantados.

A cavidade abdominal era aberta completamente e as vísceras ocas eram desviadas para o lado esquerdo e para fora da cavidade. A aorta era identificada e cranialmente à ramificação das ilíacas eram localizados e retirados os gânglios linfáticos lombares direito e esquerdo. A cavidade abdominal era observada cuidadosamente na busca de lesões infecciosas e tumorais. O tórax era também aberto com a mesma finalidade. Além do material já relacionado, era coletado sistematicamente o baço, o rim esquerdo, o lobo médio do fígado e o lobo médio do pulmão direito.

Os materiais eram lavados em solução salina e fixados em formol a 10% e/ou Bouin, em frascos diferenciados: um, para o lado direito, outro, para o lado esquerdo e o último, para as vísceras.

A preparação dos materiais para o exame histológico era feita da seguinte forma:

a) para o músculo tríceps sural - retirava-se do seu terço médio um fragmento cilíndrico de 2 mm de espessura.

b) para o músculo reto anterior do abdome - sobre a saliência produzida pelo bastão, fazia-se uma incisão longitudinal; o bastão era retirado, e o terço médio do fragmento muscular era separado para o exame histológico.

Estes fragmentos musculares e os gânglios linfáticos lombares eram preparados para inclusão em parafina. Os fragmentos musculares eram incluídos de forma que, ao serem cortados, sempre o fossem transversalmente às suas fibras. Quanto aos gânglios linfáticos, os cortes foram feitos no plano sagital. Obtinham-se desta forma, vários cortes de cada bloco de parafina, com espessura mínima de 7  $\mu$  m, que eram corados com hemalume-eosina (H.E.) e tricrômico de Masson ou tricômico de Gomori.

### B.3 - AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

#### B.3.a - Avaliação histológica da reação produzida pelas partículas

A avaliação histológica, a nível do tecido muscular, foi feita levando-se em consideração a presença e a intensidade dos seguintes parâmetros:

- 1) necrose muscular
- 2) inflamação (grau de congestão, hemorragia, edema e tipo de infiltrado)
- 3) componentes do infiltrado celular: polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e células gigantes.

Estes parâmetros foram utilizados para uma avaliação comparativa entre as reações inflamatórias produzidas pelas partículas em um mesmo animal e entre animais de grupos de observações diferentes.

Levando-se em conta estes parâmetros, procurou-se em cada grupo definir o tipo da reação e a sua intensidade. Isto foi realizado da seguinte forma: o observador analisava todas as lâminas do material carbônico de um grupo e obtinha uma estimativa da reação inflamatória produzida por este material e comparava

estes resultados com o material correspondente (Ti ou R.C.) do mesmo animal

Numa outra etapa, fazia-se esta mesma sequência, de forma longitudinal, isto é, comparava-se a reação inflamatória de um determinado material, ao longo do tempo.

Foram feitas fotos das lâminas que também auxiliaram na comparação das reações inflamatórias.

### B.3.b - Avaliação histológica da reação produzida pelos bastões

A avaliação da reação inflamatória ao redor dos bastões de CRFC e Ti implantados, foi feita levando-se em consideração os mesmos parâmetros já referidos para a avaliação das partículas. Nos bastões analisados após 12 meses de implantação, mediu-se também a espessura da camada de fibrose através de uma câmara clara. Traçou-se sobre papel sulfite, o contorno da camada de fibrose em três locais distintos. O aumento final da projeção sobre o papel foi aproximadamente de 1.000 vezes. O valor final da espessura foi considerado como a média aritmética dos valores encontrados nas três áreas desenhadas. Os valores encontrados foram comparados através da aplicação do teste t de Student para a comparação de duas médias tomadas nos mesmos elementos considerando-se  $\alpha = 0,05$

#### **B.4 - AVALIAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DOS BASTÕES DE CRFC e T1 ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELÉTRÔNICA DE VARREDURA (M.E.V)**

A M.E.V. foi realizada em microscópio eletrônico de varredura, da marca Cambridge Stereoscan, modelo S10-4. Os bastões, após serem retirados dos animais, permaneceram em formal a 10% até o dia do exame. Eram então lavados com ácido sulfúrico e água destilada em aparelho de ultra-som, para serem então fixados nos suportes, de análise.

**R E S U L T A D O S**

## A - ASPECTOS GERAIS

Das 120 ratas operadas, 10 não foram incluídas no material analisado por terem ido a óbito durante o período de seguimento ou por apresentarem sinais sugestivos de infecção no local do implante.

Em três ratas houve crescimento de massa tumoral; em locais que não haviam recebido os implantes: uma, localizada na região cervical, logo abaixo do lado esquerdo da mandíbula, outra, na parede torácica à direita e a última, na região pélvica à esquerda. Estas tumorações que surgiram após um período de pelo menos um ano de seguimento apresentaram crescimento relativamente rápido não interferindo no entanto com a época prevista para o sacrifício com 52 e 78 semanas.

## B - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A cicatrização da pele e do tecido muscular já era evidente com uma semana de observação. Neste período, a fascia do músculo tríceps sural também já estava refeita, apresentando aspecto normal, com exceção de pequenas aderências fibrinosas com o músculo adutor. A partir de um mês de observação, estas aderências desapareciam e tornava-se muito difícil a visualização do local da incisão cirúrgica. O material implantado era facilmente identificado por transparência, no interior do músculo. Frequentemente encontrava-se discreta quantidade do material implantado, aderido à face externa do músculo adutor.

O músculo reto anterior do abdome não mostrava alterações de coloração ou da textura ao redor dos implantes que pudessem sugerir necrose muscular, mesmo com uma semana de seguimento.

Dois bastões de CRFC e três de Ti, excepcionalmente, não foram encontrados no músculo reto anterior do abdome e sim, na cavidade abdominal. Os bastões de CRFC estavam sempre aderidos firmemente ao músculo, desde a primeira semana, enquanto que nos bastões de Ti esta adesividade era menor.

Os gânglios lombares foram encontrados com relativa facilidade. À direita, era comum a presença de dois gânglios enquanto que, à esquerda, havia somente um. A variação de tamanho dos gânglios relativos a cada material implantado não era evidente. Os gânglios que drenavam a linfa dos músculos com material carbônico exibiam freqüentemente cor acizentada mais intensa do que os gânglios que drenavam a linfa dos músculos nos quais foram implantadas as partículas de Ti.

## C - AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES DO MÚSCULO TRÍCEPS SURAL

### C. 1 - Grupo com uma e duas semanas de seguimento

#### C.1.A - Músculo triceps sural controle, com cirurgia fictícia efetuada sem a introdução de partículas



Na coloração pela H.E. verificavam-se no local do trauma cirúrgico alterações degenerativas discretas, caracterizadas por pequeno número de fibras musculares sem miofibrilas. O processo mais evidente era o de regeneração muscular, caracterizado por fibras pequenas, mais basófilas e mais arredondadas, com núcleos hipertrofiados centrais com tendência a se localizarem na periferia, cujo número estava aumentado, principalmente em algumas áreas, dando a impressão de hiperplasia nuclear; a cromatina era frouxa. No citoplasma destas células em regeneração, já era evidente a presença de miofibrilas desde a primeira semana. No endomísio havia infiltrado inflamatório discreto, constituído por neutrófilos, linfócitos e macrófagos. (Fig.1).

Os vasos sanguíneos estavam com diâmetro aumentado e as células endoteliais engurgitadas. Da primeira para a segunda semana, a regeneração muscular era mais intensa e a reação inflamatória mais discreta.

#### C.1.B - Músculo tríceps sural com partículas implantadas

A alteração predominante, também neste grupo, era a de regeneração muscular, que, no entanto, estava em fase mais atrasada que no lado controle. Este atraso era sugerido pela presença de maior número de fibras musculares pequenas e de mioblastos, aparentando um processo regenerativo mais intenso. (Fig.2).

A reação inflamatória era semelhante, exceto de que os macrófagos e as células gigantes eram mais numerosas e já continham partículas no seu interior. (Fig. 3).

Com relação a R.C., apesar de existir infiltrado inflamatório ao redor das partículas, este era menos intenso. No endomísio era possível, em algumas lâminas, se observar partículas do material infiltrado, fagocitado por macrófagos. (Fig.4)

O CRFC-A foi o material que produziu reação inflamatória mais intensa, seguida pelos demais materiais que se comportaram de forma semelhante entre si.

**C.2 - Grupo de animais com quatro semanas de seguimento,  
nos quais foram implantadas partículas de  
CRFC-A, Ti-A, CRFC-B, Ti-B e R.C**

Nesta fase a fibra muscular já se mostrava recuperada na maioria dos animais.

A reação inflamatória produzida pelas partículas era formada, principalmente, por macrófagos e células gigantes. Não se observavam polimorfonucleares e os linfócitos eram raros. Em todos os animais, as partículas estavam, na sua maioria, localizadas no interior de macrófagos ou envolvidas por células gigantes. A R.C. foi o material que induziu a menor reação inflamatória, levando-se em consideração a quantidade de células inflamatórias. No entanto, a quantidade de partículas por unidade de superfície era muito grande, tendendo à aglutinação. (Fig.5).

O CRFC-A apresentou a reação inflamatória mais intensa entre o três materiais. Era evidente, com este material, a presença de infiltrado inflamatório constituído por células gigantes e macrófagos no centro e células menores de núcleo alongado e basófilas, na periferia, semelhantes a um granuloma, envolvendo as fibras de carbono. (Fig.6).

Com a coloração pelo tricrômico de Gomori, notavam-se também algumas fibras de colágeno envolvendo as células mais periféricas.

Tanto o Ti-B como o CRFC-B apresentavam intensidade de reação inflamatória semelhantes entre si e menores que a descrita para os CRFC-A. Apesar do CRFC-B possuir também fibras de carbono, este material não induziu o mesmo aspecto histológico da reação provocada pelo CRFC-A.

**C .3 - Grupo de animais com oito e dezesseis semanas de seguimento nos quais foram implantadas partículas de CRFC-A, Ti-A, CRFC-B, Ti-B e R.C.**

O aspecto histológico da fibra muscular era normal em todos os animais.

A reação inflamatória parecia muito semelhante ao grupo anterior, com aumento da quantidade de fibrose. Havia fibras musculares normais no interior das reações inflamatórias produzidas pela R.C., pelo CRFC-B e pelo Ti-B. No CRFC-A, estas fibras musculares eram menos freqüentes (Fig. 7 e Fig. 8).

**C.4 - Grupo de animais com doze meses de seguimento nos quais foram implantadas partículas de CRFC-A, Ti-A, CRFC-B, Ti-B e R.C.**

Nesta fase, parecia que se acentuava a diferença entre os infiltrados inflamatórios produzidos pelo CRFC-A e os demais materiais. A população celular continuava semelhante àquela já descrita, observando-se aumento na quantidade de tecido fibroso, no interior da reação produzida pelo CRFC-A. (Fig.9).

Aquelas estruturas, semelhantes a granulomas, já descritos, eram bem evidentes, especialmente quando se efetuava a coloração pelo tricrômico de Gomori. Estas estruturas continuaram a ser mais freqüentes no CRFC-A do que nos demais materiais, especialmente em relação a R.C. (Fig. 10). Além disto, havia também formação de granulomas ao redor das partículas, caracterizada por maior número de células e menor quantidade de fibras de colágeno do que aquele formado ao redor das fibras de carbono.

**C.5 - Grupo de animais com dezoito meses de seguimento nos quais foram implantadas partículas de CRFC-A e Ti-A**

Neste grupo, foi observada somente a reação inflamatória produzida pelo CRFC-A, que continuava com predomínio de ma-

crófagos e células gigantes, fagocitando ou envolvendo as partículas. A reação parecia estar ainda em atividade já que havia nítido predomínio do componente celular sobre a fibrose. Não foram observadas alterações estruturais no tecido muscular vizinho ao implante. Todo o material continuava bem circunscrito, mas sem cápsula de fibrose ao redor. (Fig.11)

Obs: Os músculos com partículas de Ti-A, não foram considerados para análise devido à grande quantidade de artefatos observados nas lâminas.

#### D - AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO MÚSCULO RETO ANTERIOR DO ABDOME

##### D.1 - Grupo de animais com uma semana de seguimento nos quais foram implantados bastões de CRFC e Ti

Os bastões de CRFC produziram reação inflamatória maior do que os bastões de Ti. Adjacente aos bastões de CRFC encontrava-se um infiltrado celular formado principalmente por macrófagos e fibroblastos. Freqüentemente, encontravam-se, nesta área, partículas de CRFC fagocitadas pelos macrófagos. (Fig.12). Abaixo desta camada celular, havia outra mais espessa, com maior número de células, com algumas fibras de colágeno. Permeando esta camada, havia fibras musculares, poucas com alterações degenerativas e muitas em fase de regeneração, muito semelhante ao aspecto encontrado no músculo tríceps sural, na mesma época.

Os bastões de Ti, pelo contrário, produziram uma reação inflamatória muito discreta com predomínio de linfócitos e fibroblastos, entremeados por fibras de colágeno. A quantidade de macrófagos era muito menor do que a observada ao redor dos bastões de CRFC. (Fig.13).

## D.2 - Grupo de animais com quatro semanas de seguimento nos quais foram implantados bastões de CRFC e Ti

Nesta fase era nítida a presença de uma camada de fibrose envolvendo os bastões de CRFC e Ti. Na reação que envolvia o bastão de CRFC, podiam-se distinguir três camadas: uma mais interna, fina, adjacente ao bastão, constituída de células com citoplasma amplo, núcleo volumoso e cromatina frouxa interpretadas como macrófagos; (Fig.14); uma camada central, com fibrose já evidente, além de fibroblastos e fibrócitos. Na camada mais periférica encontravam-se macrófagos e células gigantes com partículas inclusas de CRFC. O tecido muscular circunjacente tinha aspecto quase normal. (Fig.15).

Ao redor dos bastões de Ti, a camada de fibrose parecia mais compacta e com maior quantidade de fibrócitos. Não se observavam macrófagos ou células gigantes nesta camada, mas sim um infiltrado linfocitário discreto; externamente observava-se uma terceira camada na qual células inflamatórias, principalmente macrófagos e fibroblastos se misturavam às fibras musculares regeneradas (Fig.16).

## D.3 - Grupo de animais com 52 semanas de observação nos quais foram implantados bastões de CRFC e Ti

Nesta época o que chamava atenção, tanto nos bastões de CRFC como nos de Ti, era a presença de uma camada de fibrose, muito bem orientada, na qual se encontravam praticamente só fibrócitos. Abaixo da camada de fibrose encontravam-se algumas células inflamatórias, principalmente macrófagos, contendo partículas fagocitadas de CRFC. O tecido muscular subjacente apresentava aspecto normal (Fig. 17).

E - AVALIAÇÃO DA ESPESSURA DA CAMADA DE FIBROSE SITUADA AO  
REDOR DOS BASTÕES DE CRFC e Ti, COM 52 SEMANAS  
DE SEGUIMENTO

Na tabela IV são apresentados os valores individuais, as médias, os desvios padrão da média e as medianas das espessuras encontradas para os bastões de CRFC e de Ti. Pode-se notar que, com exceção da medida no animal 01, em todas as outras os valores da espessura da camada de fibrose foram maiores para os bastões de CRFC. A aplicação do teste t de Student mostrou que estas diferenças não foram significativas.

TABELA IV

VALORES INDIVIDUAIS, MÉDIAS , DESVIOS PADRÃO E MÉDIANAS DA ESPES-  
SURA DA CAMADA DE FIBROSE AO REDOR DOS BASTÕES DE CRFC E Ti.

Animal	Lâmina	Espessura da camada de fibrose (um)	
		CRFC	Ti
1	205/87	37,87	
	206/87		42,75
2	207/87	44,25	
	208/87		37,43
3	209/87	63,00	
	210/87		35,06
4	214/87	43,86	
	213/87		38,06
5	216/87	81,06	
	215/87		30,93
$\bar{x}$		54,01	36,85
s		17,83	4,32
mediana		44,25	37,43



## F- AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DOS GÂNGLIOS LINFÁTICOS

Os gânglios linfáticos continham partículas nos seios subcapsulares. A quantidade de partículas encontradas no interior era variada e sem relação evidente com o tempo de seguimento, ou com o tipo de material. Os gânglios, com 12 meses e 18 meses de seguimento, não continham maior quantidade de material do que os demais. O encontro de partículas era mais evidente a partir da segunda semana de seguimento. Estas partículas eram encontradas no interior dos macrófagos que mostravam-se aumentados de volume, com citoplasma de cor alanrajada e floconoso. Este aspecto era mais evidente com as partículas de Ti-A e Ti-B Fig.18 (L.86/86-2), apesar de ser também observado com as partículas dos materiais carbônicos. Fig.18 (L.26/86-5 e L.214/87).

## G - AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS BASTÕES DE CRFC e Ti, ATRAVÉS DA MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Entre os bastões retirados dos animais com doze meses de seguimento, foram escolhidos, de forma aleatória, 4 bastões de CRFC e 4 de Ti para análise pela M.E.V. Analisamos também dois bastões de cada material, oriundos do mesmo lote, mas sem terem sido submetidos à implantação (controle).

Os aspectos das superfícies, em relação aos bastões de CRFC, eram idênticos tanto nos controles como nos bastões implantados. Observamos uma superfície irregular, devido à presença de sulcos, saliências e cavidades de vários tamanhos (Fig.19) Em algumas regiões encontrávamos uma concentração maior de fibras enquanto que em outras a resina estava mais porosa ou substituída por grafite (Fig.20). As fibras, às vezes, pareciam torcidas, interrompidas ou salientes na superfície dos bastões. (Fig. 21).

Nos bastões de Ti, o acabamento superficial era mais homogêneo (Fig. 22). Nos aumentos maiores era possível observar-se o arranjo cristalino do material (Fig.23). Nos bastões implantados foram observados manchas e cavidades que não tinham sido

encontradas nos bastões controle (Fig. 24).

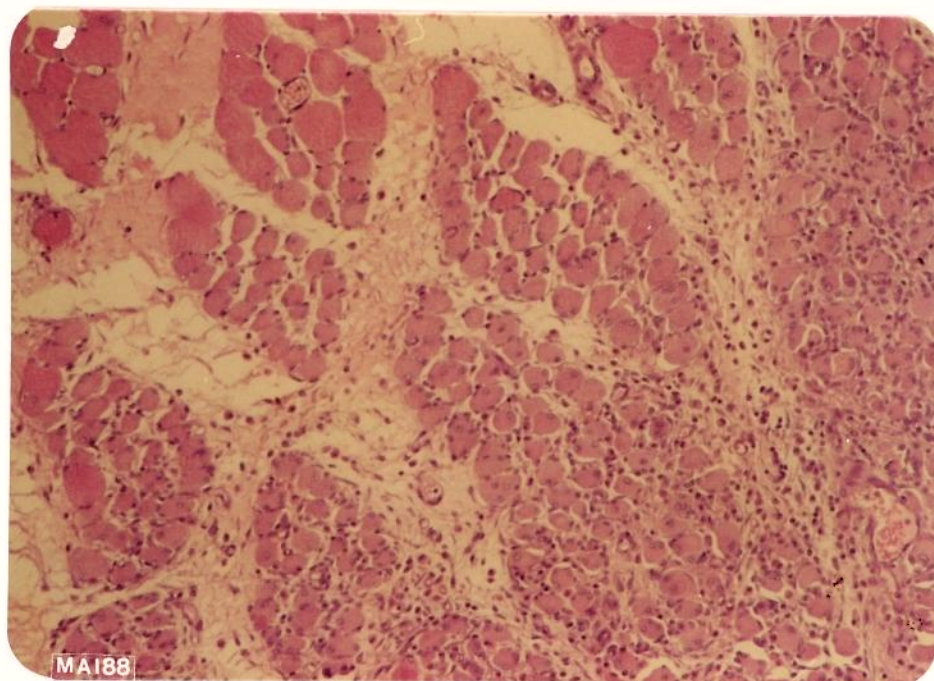


Fig. 1 - L.29/86 H.E. Grupo com uma semana de seguimento após cirurgia ficticia. 120 x  
Notar as fibras musculares com perfil de corte transversal circular em processo de regeneração.

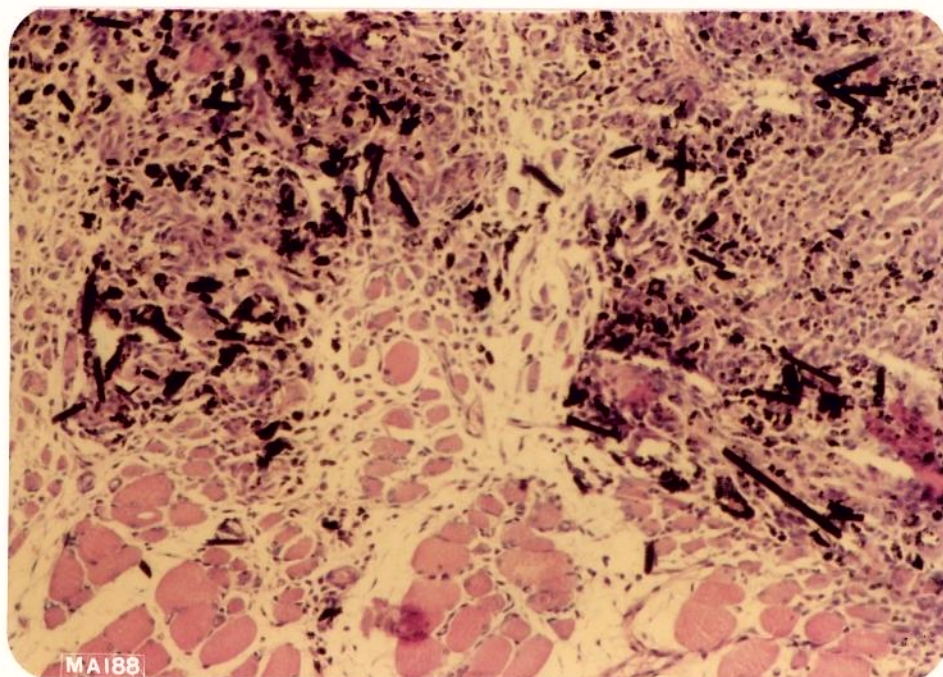


Fig.2 - L.30/86 H.E. Grupo com uma semana de seguimento CRFC-A  
120x

Notar que o processo de regeneração, embora presente  
está mais atrasado

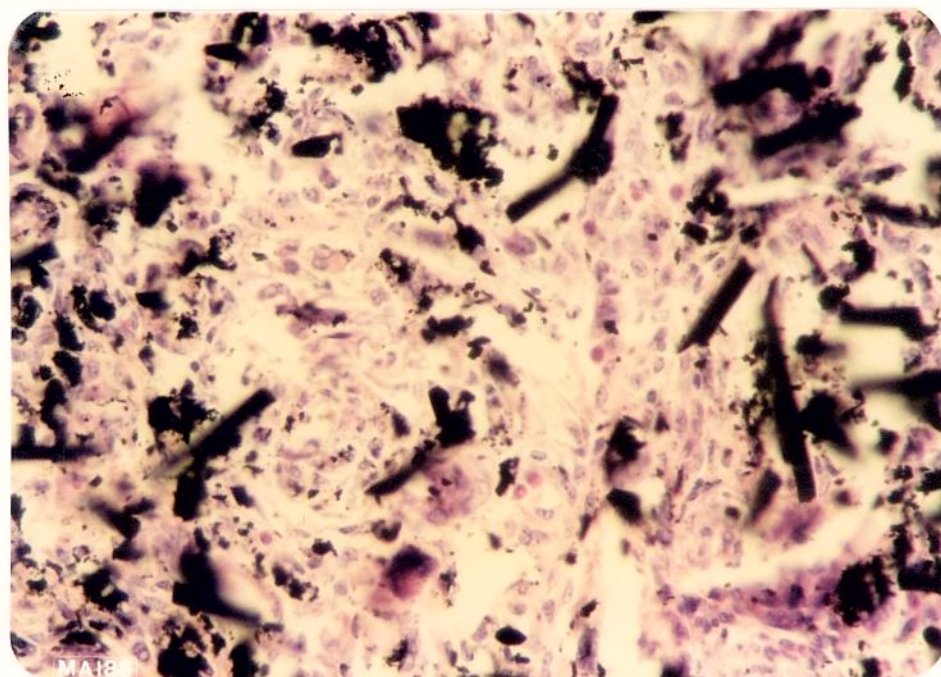


Fig. 3 - L.90/86 H.E. Grupo com duas semanas de seguimento  
CRFC-A . 480x

Notar que no infiltrado inflamatório predominam macrófa-  
gos , células linfóides e eosinófilos.

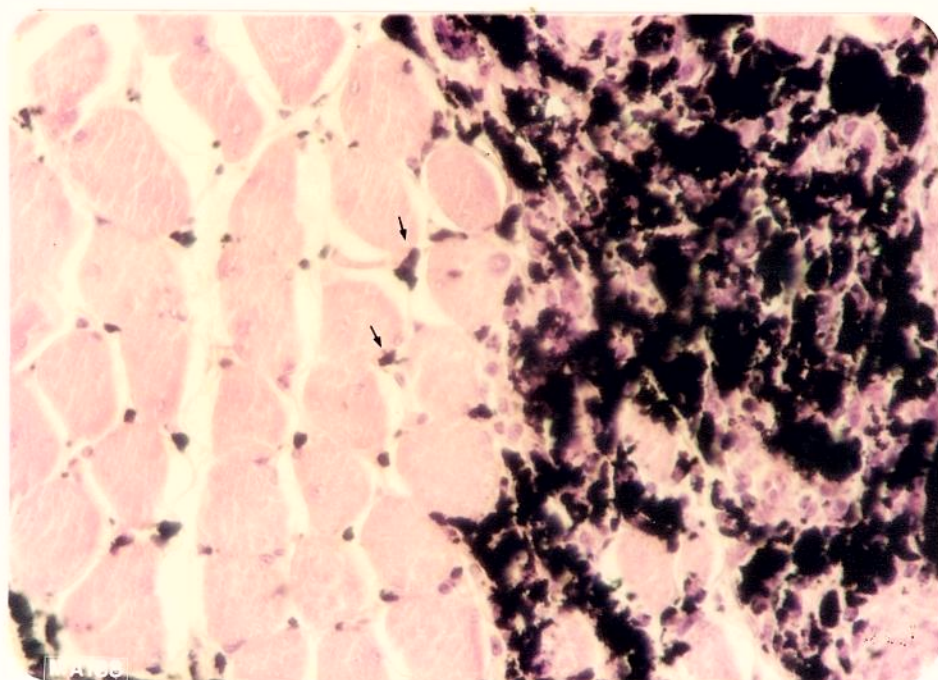


Fig. 4 - L.178/87 H.E. Grupo com duas semanas de seguimento R.C.  
480x

Notar que o material carbônico permanece agrupado e o infiltrado inflamatório é discreto. O material encontra-se fagocitado por macrófagos do endomísio. (seta)

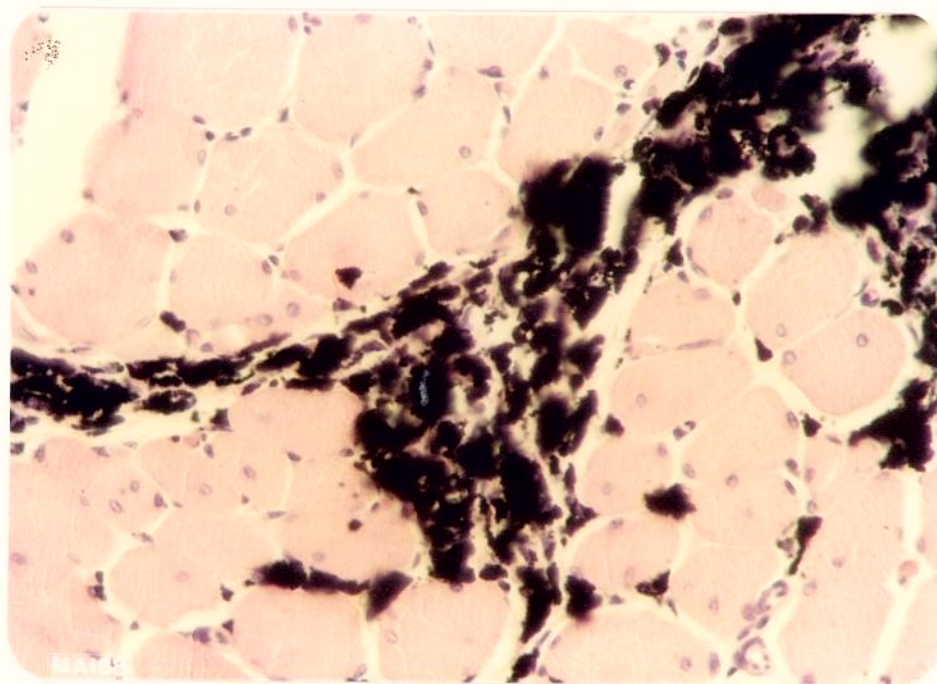


Fig. 5 - L.55/80 H.E. Grupo com quatro semanas de seguimento R.C  
480x

Notar que, nesta fase, as fibras musculares já estão com tamanho e forma praticamente normais. A R.C. induz reação inflamatória muito discreta.

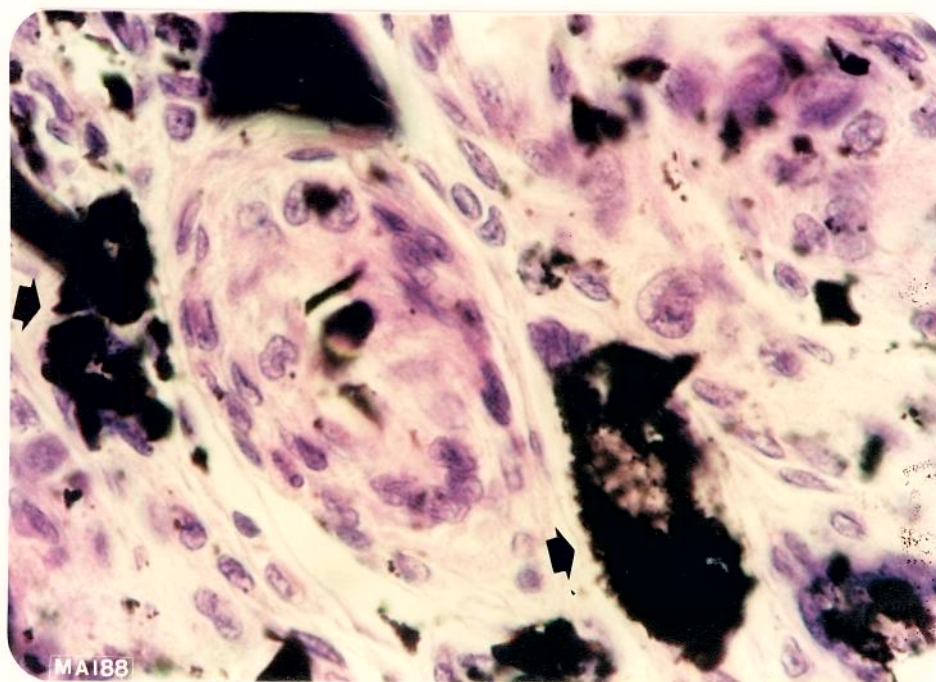


Fig. 6 - L.54/86 H.E. Grupo com quatro semanas de seguimento CRFC-A . 1000X

Notar a fibra de carbono envolvida concentricamente por macrófagos e por células semelhantes a fibroblastos. É possível evidenciarem-se alguns macrófagos com partículas (seta) e uma célula gigante cuja morfologia está mascarada pelo excesso de partículas fagocitadas.



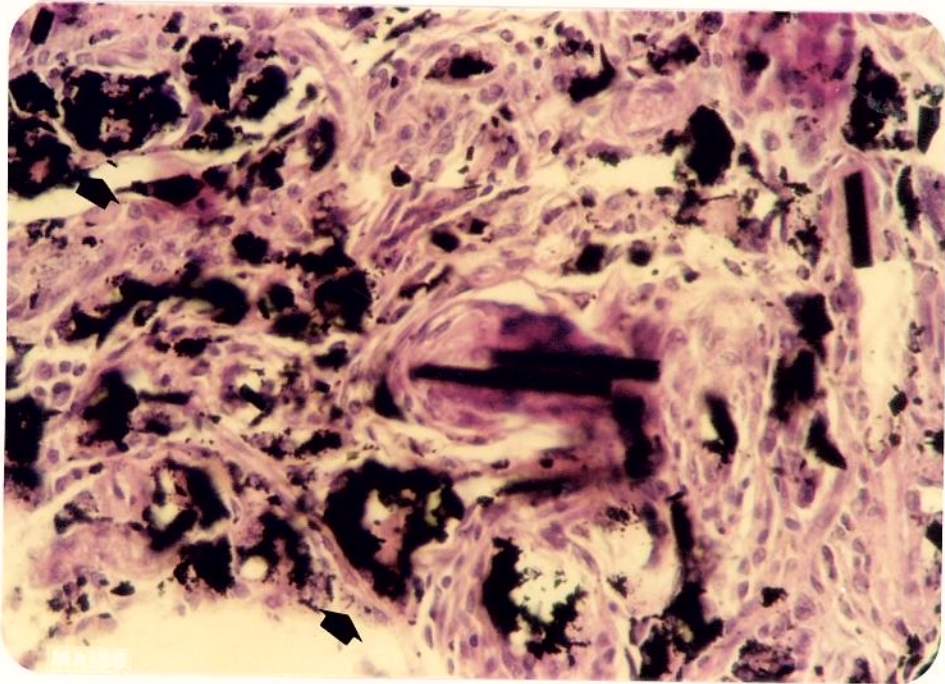
Fig. 7 - L.22/86-1 H.E. Grupo com oito semanas de seguimento  
CRFC-A 480x

L.188/87-1 Grupo com oito semanas de seguimento.R.C.  
300x. Tricrômico de Gomori.

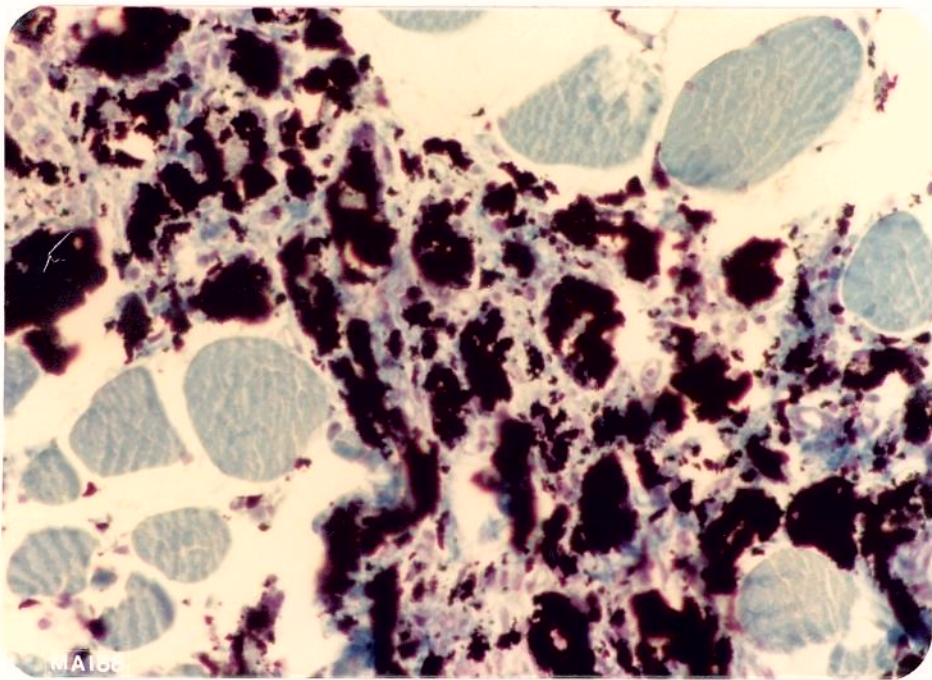
L.127/86-1 H.E. Grupo com oito semanas de seguimento  
CRFC-B . 480X

L.128/86 H.E. Grupo com oito semanas de seguimento Ti-B  
480x

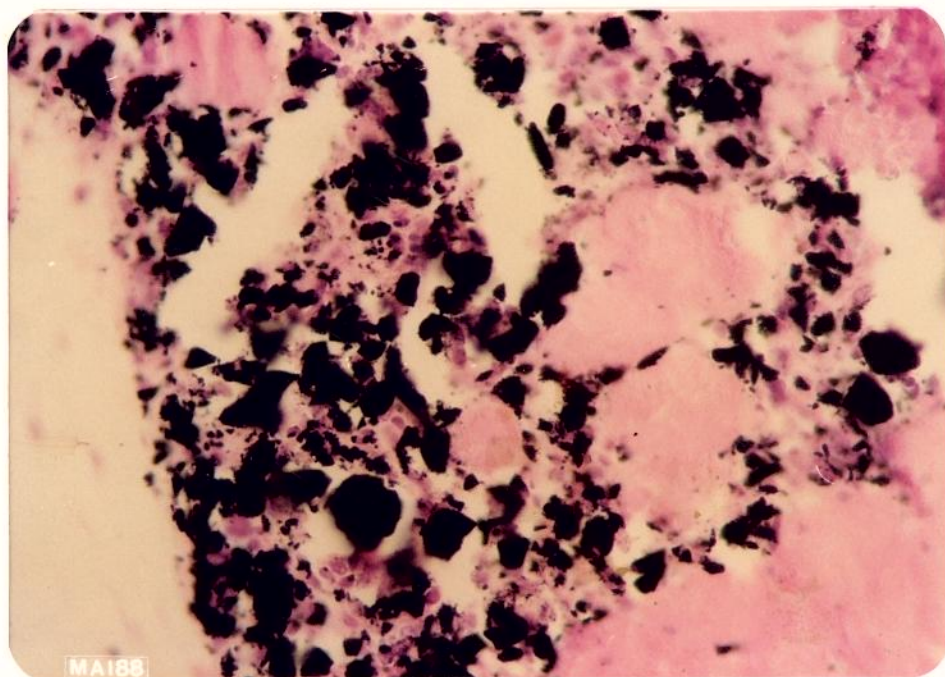
Notar que a reação inflamatória produzida pelo CRFC-A é mais intensa, com número maior de macrófagos e células gigantes (seta). Tanto na R.C. como no CRFC-B encontram-se fibras musculares normais no interior da reação inflamatória.



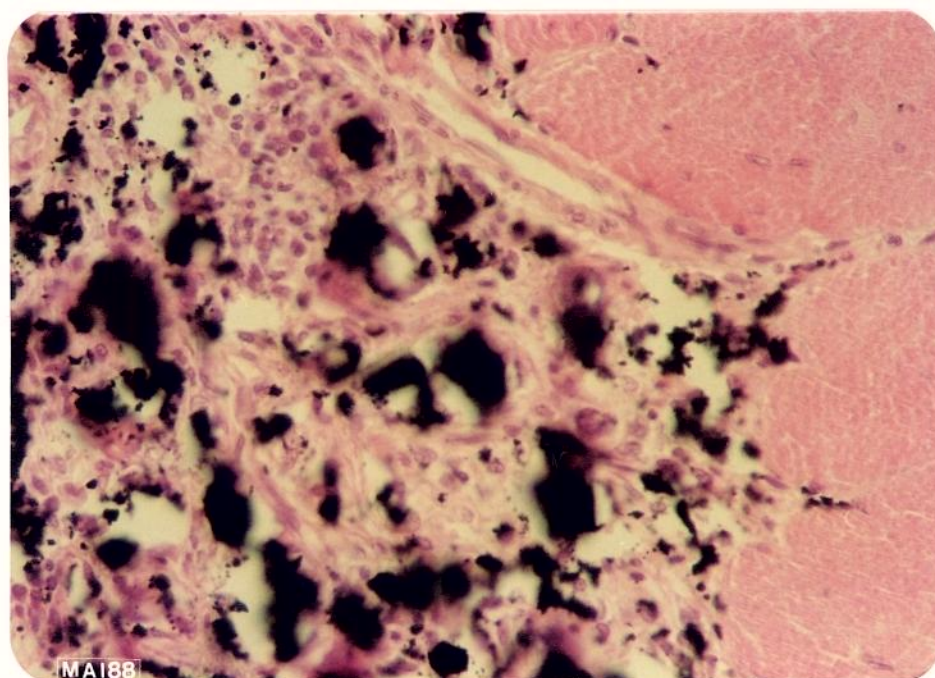
L. 22/86-1



L. 188/87-1



L. 127/86-1



L. 128/86-2

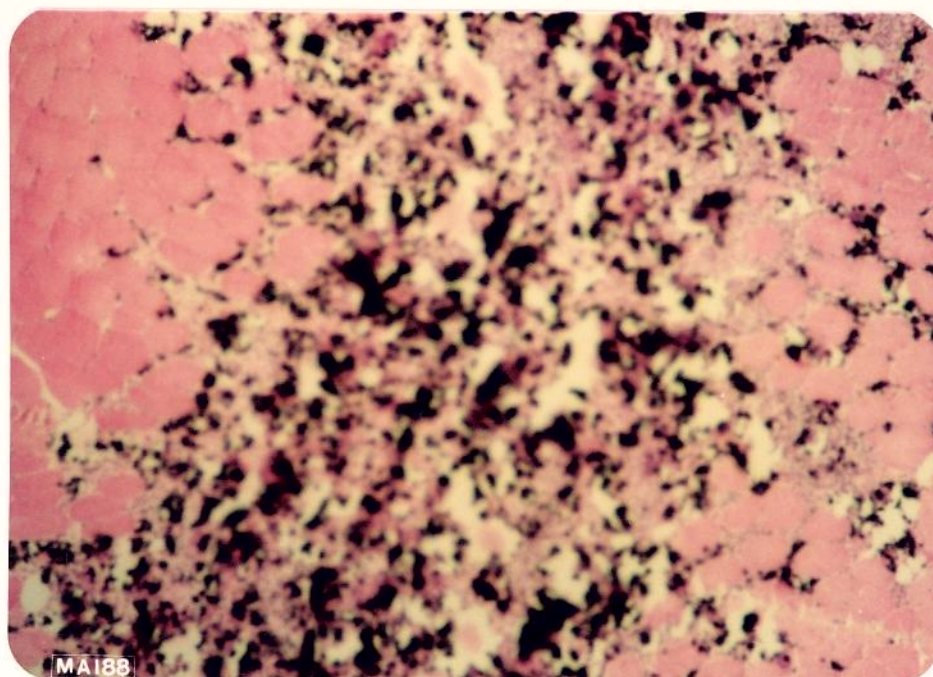


Fig .8 - L.130/86 H.E. Grupo com oito semanas de seguimento Ti-B  
120x

Encontra-se o material implantado ao redor das fibras musculares e no interior dos macrófagos. A reação inflamatória é discreta e semelhante quando em maior aumento com a reação produzida pelo CRFC-B.

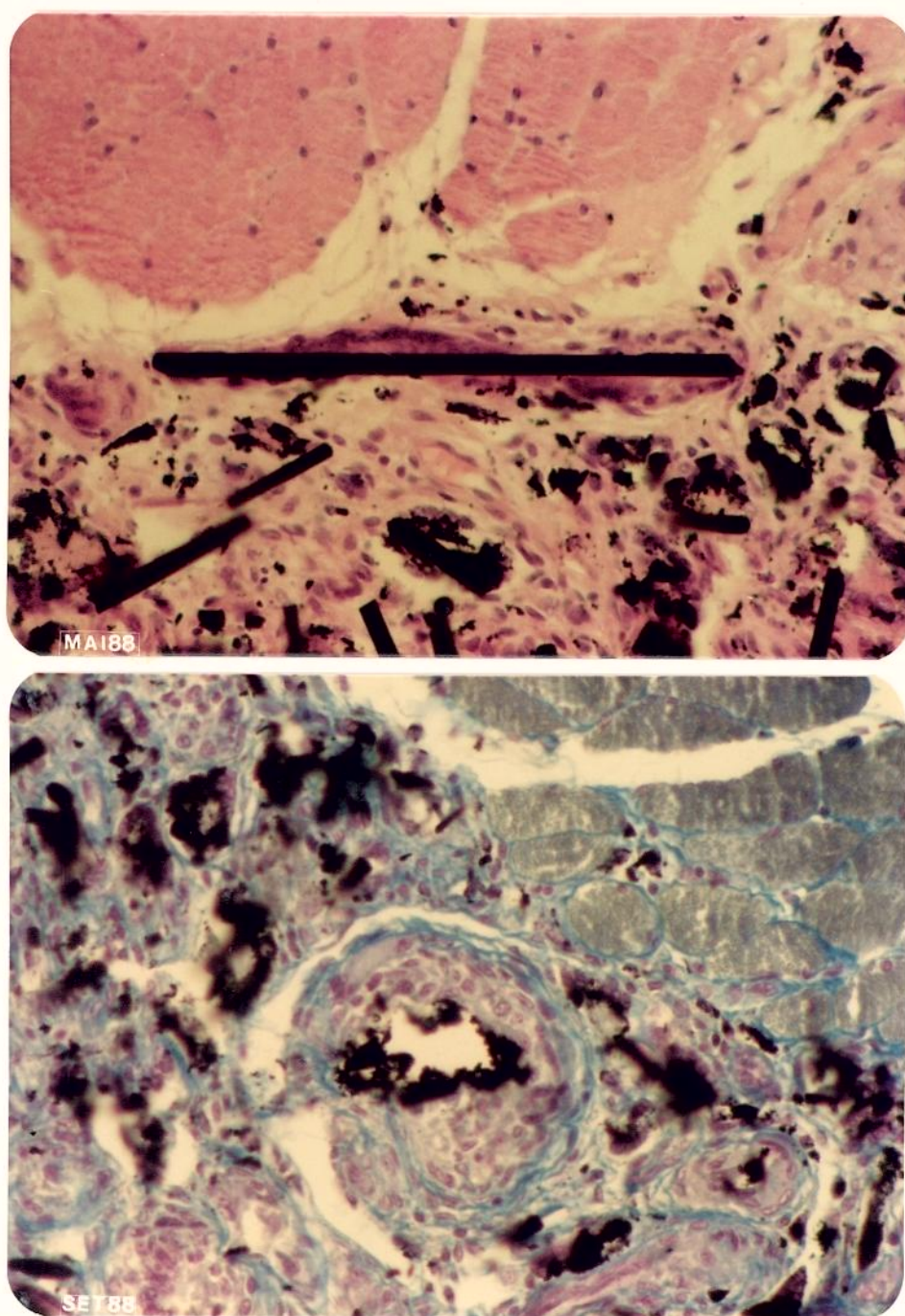


Fig. 9 - L.24/86-2 H.E. Grupo com 52 semanas de seguimento CRFC-A  
300x

L.24/86-2 Grupo com 52 semanas de seguimento CRFC-A.300x  
Tricrômico de Gomori.

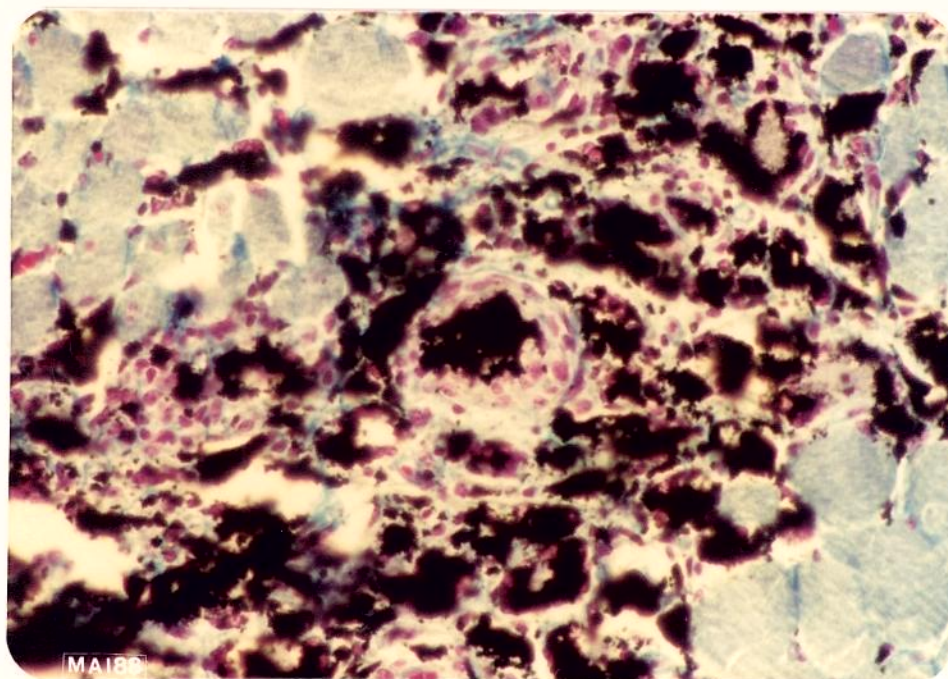
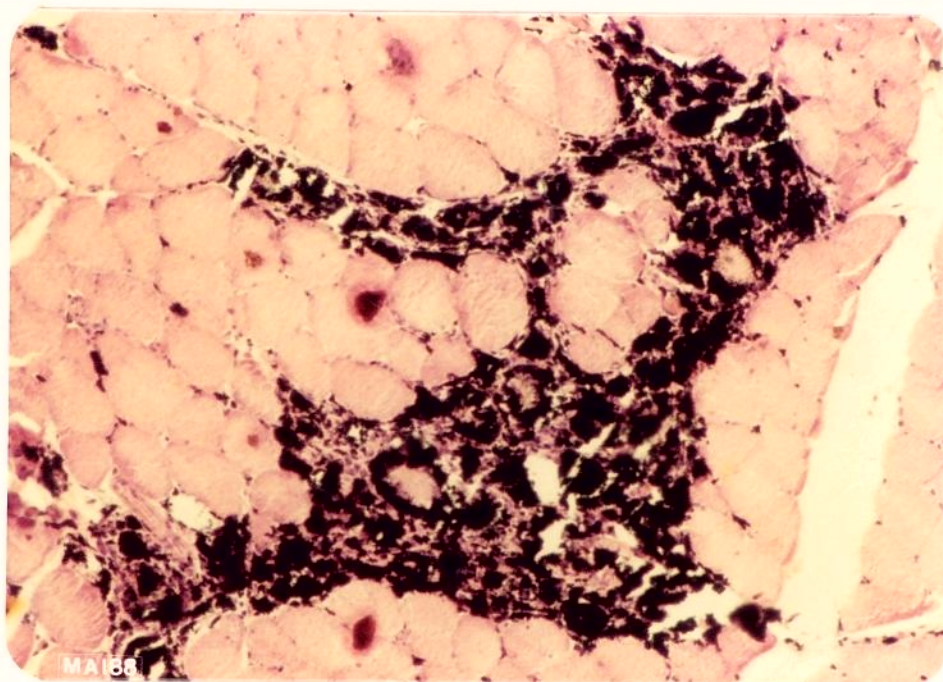


Fig.10 - L.216/87-1 H.E. Grupo com 52 semanas de seguimento R.C. 120x  
L.213/87-1 Grupo com 52 semanas de seguimento R.C. 300x  
Tricrômico de Gomori  
Notar que o aglomerado de partículas de R.C. continua compacto, e que o infiltrado inflamatório continua sendo discreto.

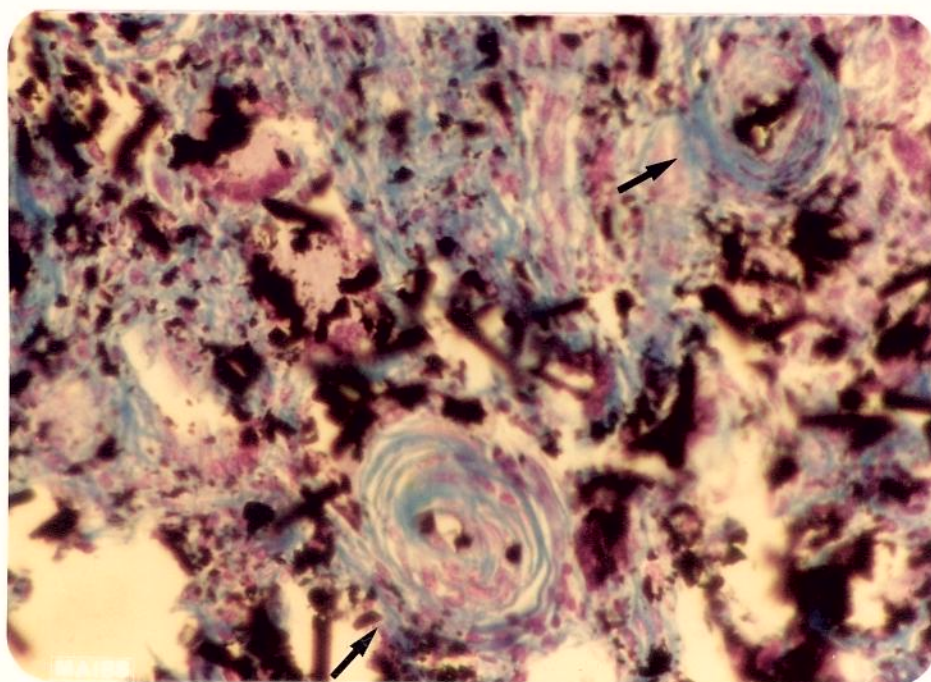
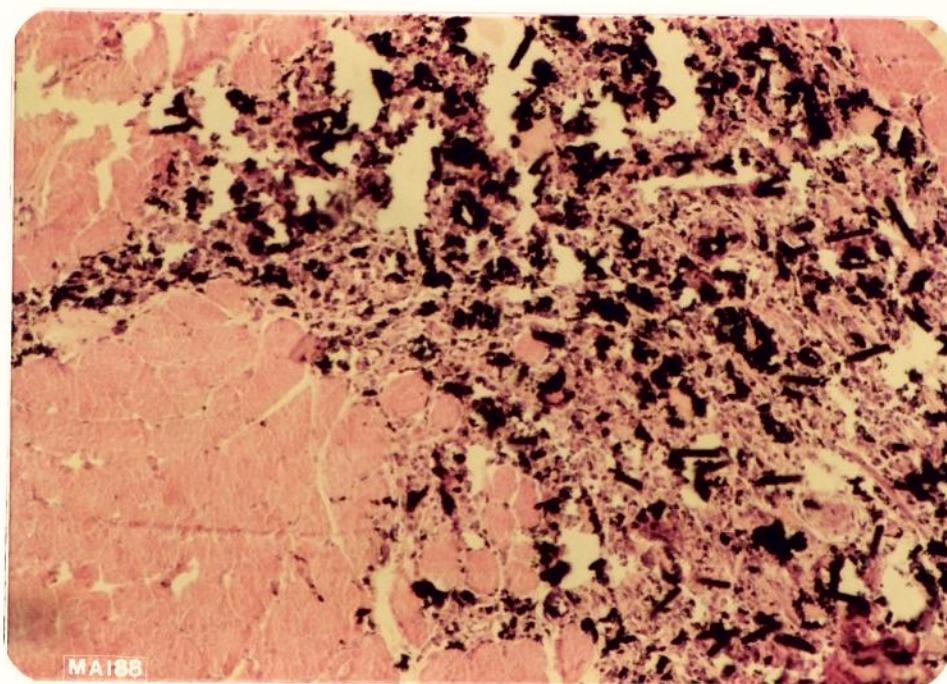


Fig.11 - L.150/87 H. E. Grupo com dezoito meses de seguimento CRFC-A . 120x  
 L.150/87 Grupo com dezoito meses de seguimento CRFC-A. 300x. Tricrômico de Gomori.  
 O infiltrado inflamatório está invadindo e afastando as partículas de CRFC-A. As fibras de colágeno se dispõem, principalmente ao redor das fibras de carbono (setas).

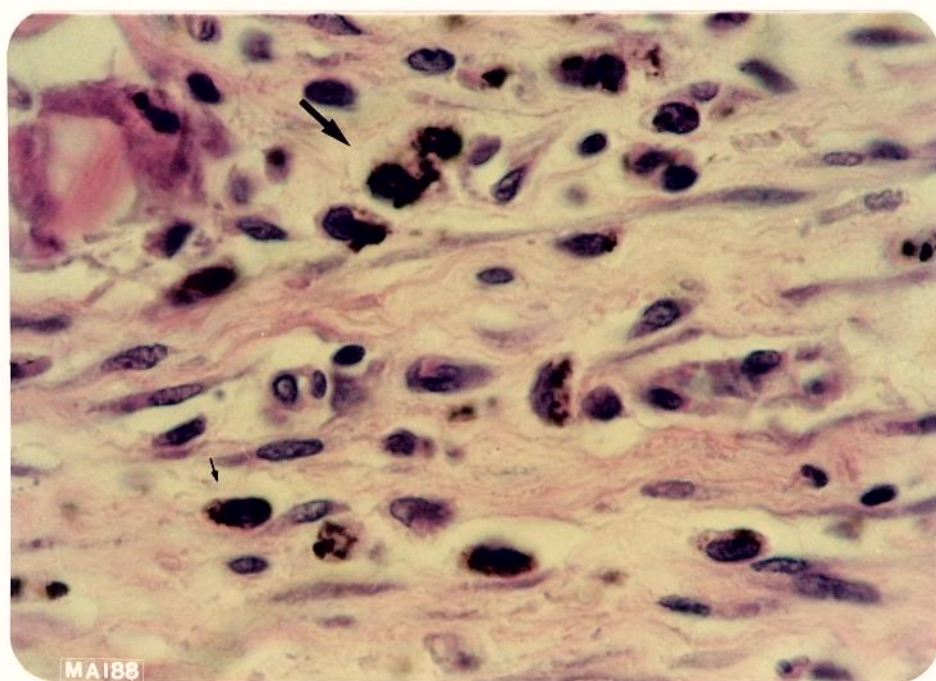


Fig.12 - L.44/86-2 H.E. Bastão de CRFC com uma semana de seguimento. 1000x

Notar a presença de macrófagos carregados de partículas de CRFC. (setas)



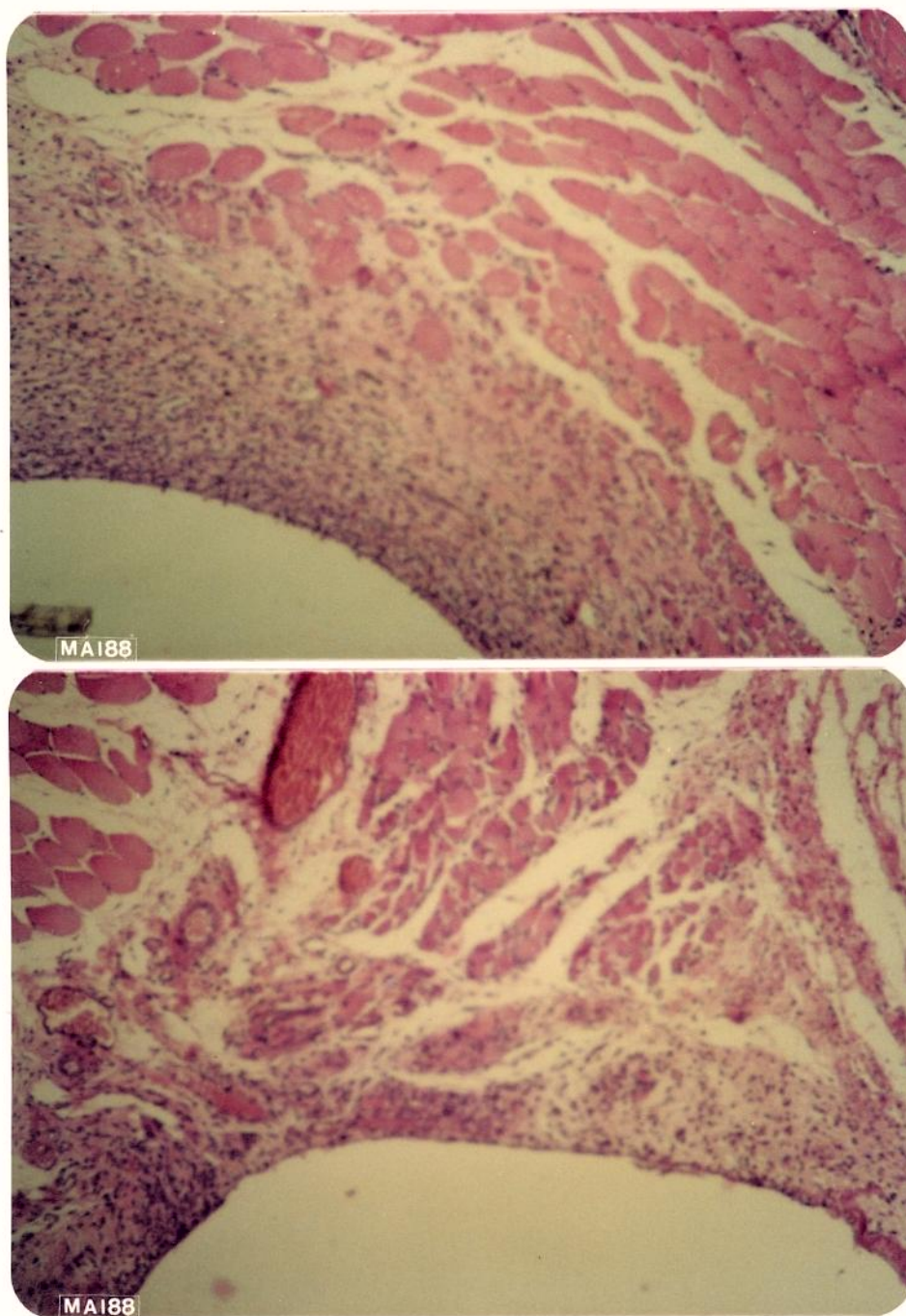


Fig.13 - L.44/86-2 H.E. Bastão de CRFC com uma semana de seguimento. 120x  
L.45/86-2 H.E. Bastão de Ti com uma semana de seguimento. 120x  
Notar a evidente diferença entre as camadas de fibrose em evolução.

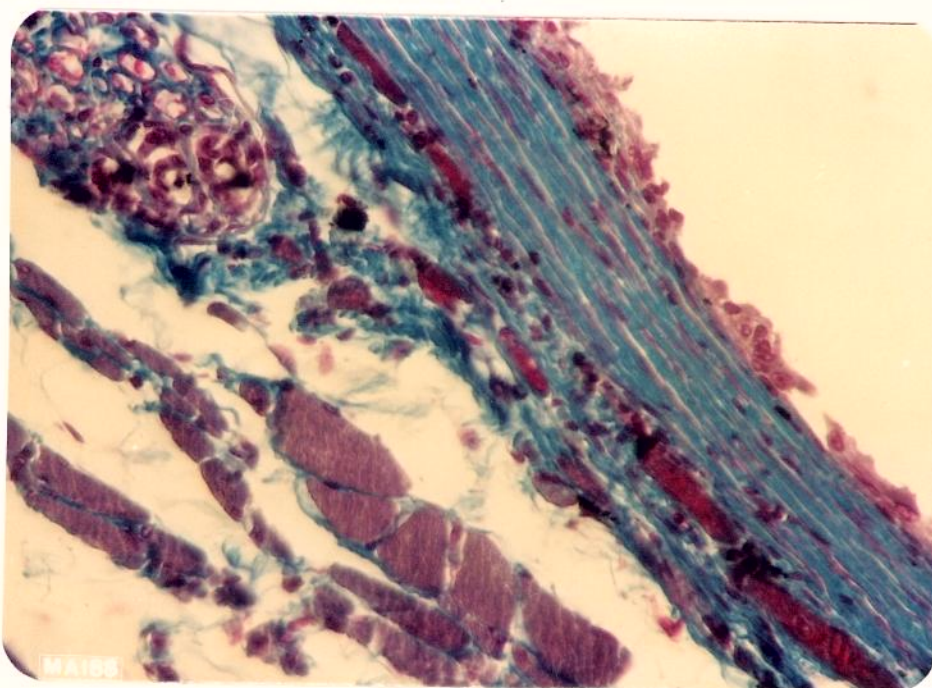
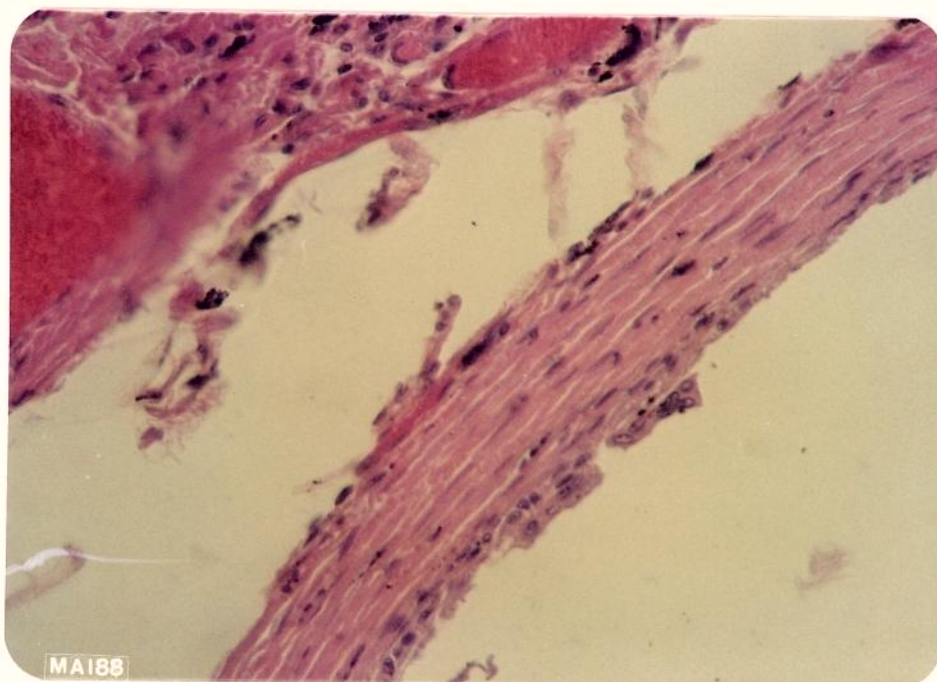


Fig.14 - L.54/87-3 H.E. Bastão de CRFC com quatro semanas de seguimento. 480x  
L.54/87-3 Bastão de CRFC com quatro semanas de seguimento. 480x . Tricrômico de Gomori.  
Notar as partículas de CRFC no interior da camada de fibrose.

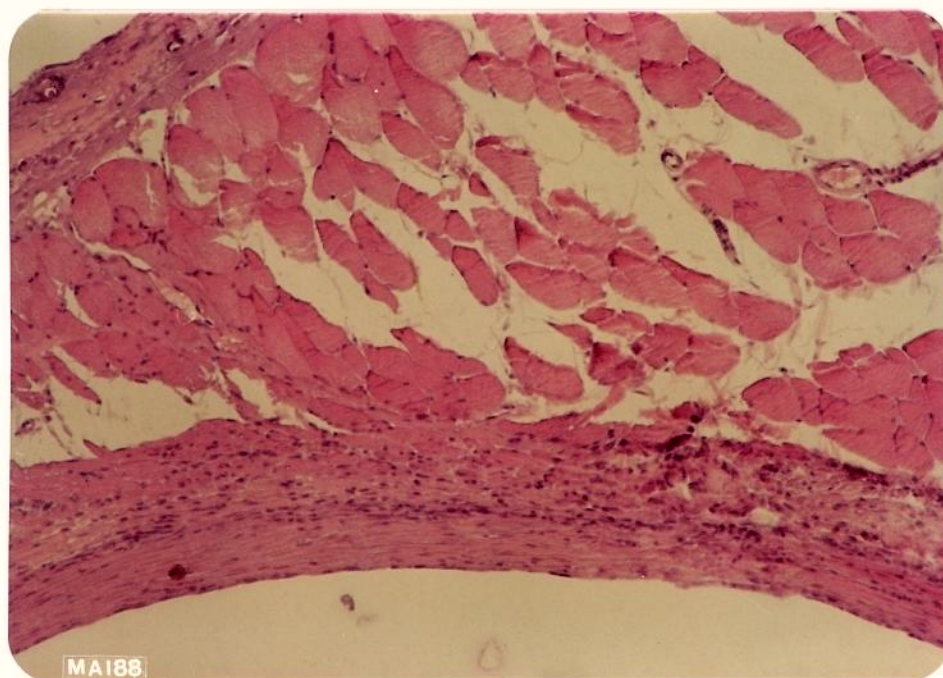
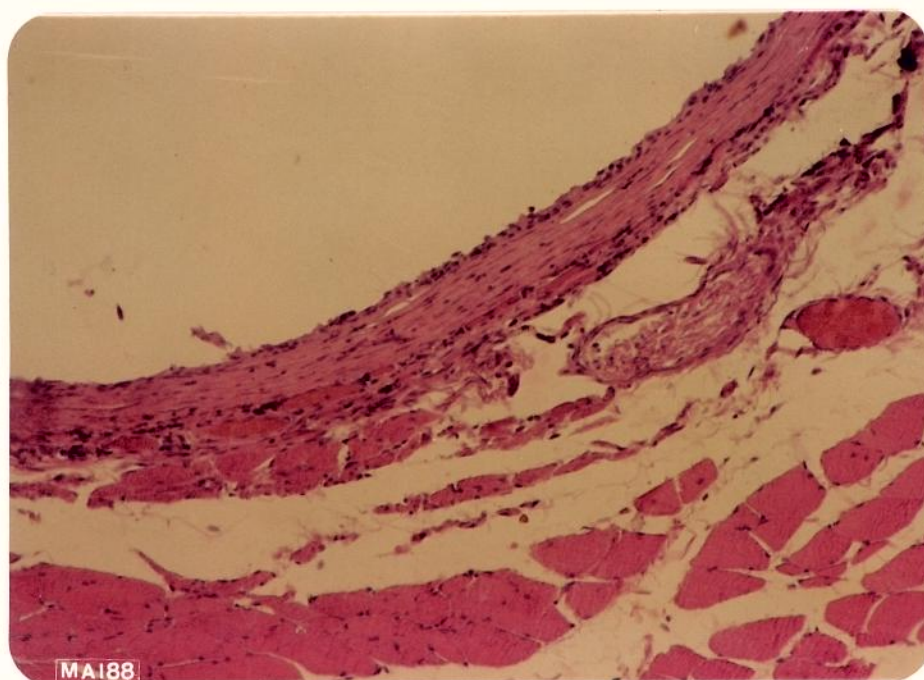


Fig.15- L.54/86-2 H.E. Bastão de CRFC com quatro semanas de seguimento. 120x  
L.57/86-5 H.E. Bastão de T1 com quatro semanas de seguimento. 120x  
Notar que o tecido muscular subjacente tem aspecto praticamente normal.

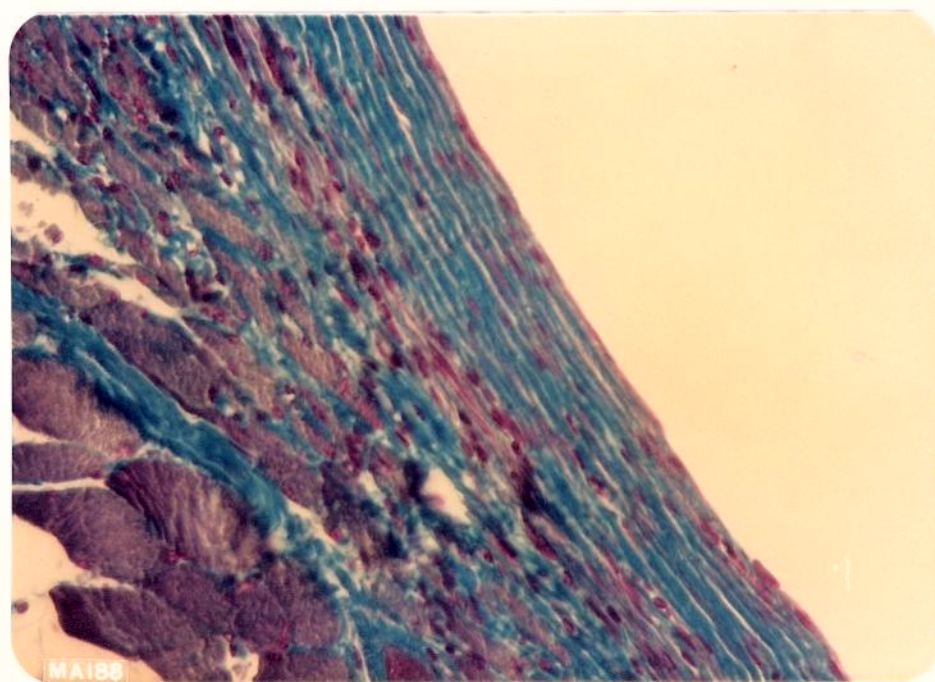
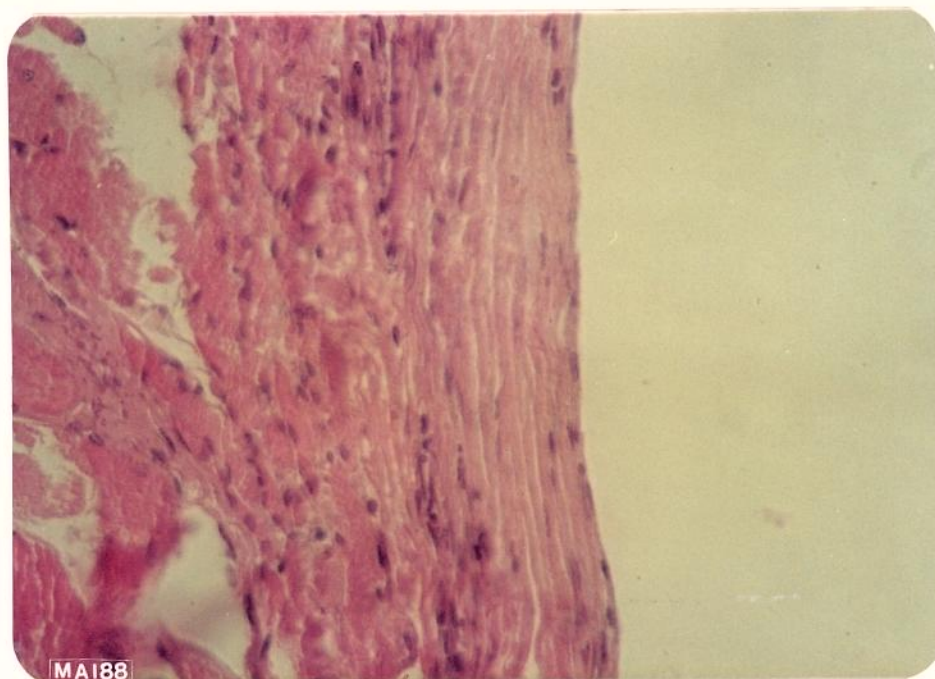


Fig. 16- L.57/87 - H.E. Bastão de Ti com quatro semanas de seguimento. 480x

L.57/87 - Bastão de Ti com quatro semanas de seguimento. 480x. Tricrômico de Gomori.

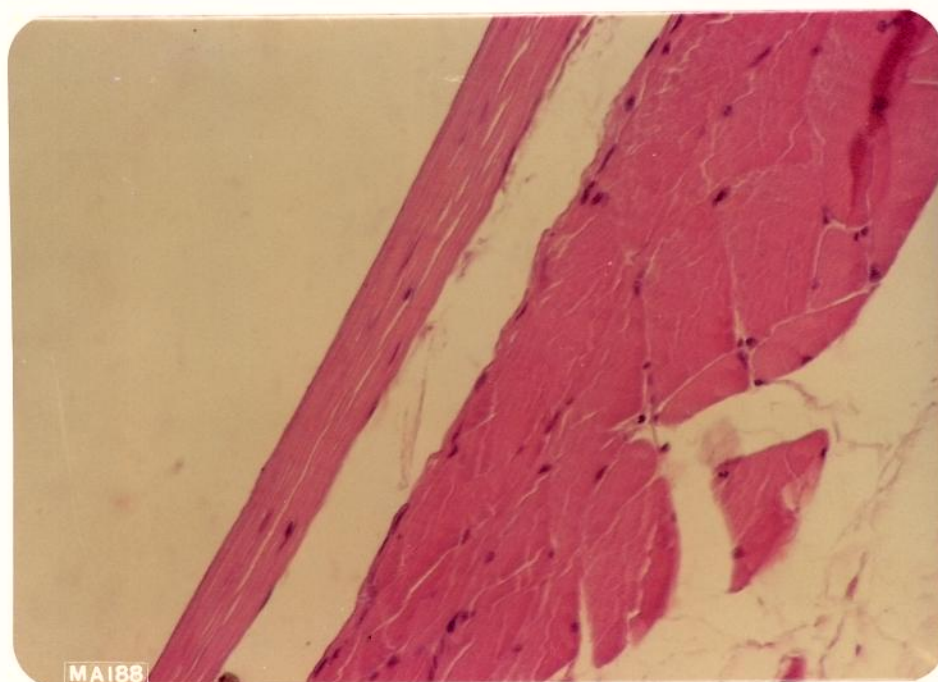
Notar que a camada de fibrose é mais compacta e que o infiltrado inflamatório subjacente é mais discreto do que aquele do CRFC.

Fig.17 - L.215/87-3 H.E. Bastão de Ti com 52semanas de seguimen-  
to. 300x

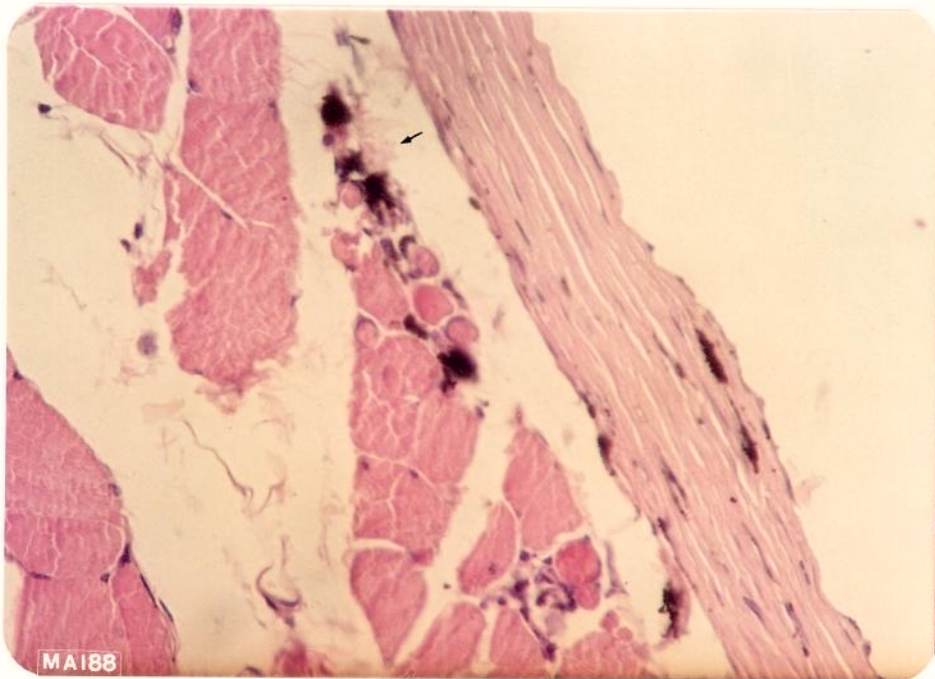
L.205/87-2 H.E. Bastão de CRFC com 52 semanas de segui-  
mento. 480x

L.205/87-2 Bastão de CRFC com 52 semanas de seguimento.  
480x. Tricrômico de Gomori.

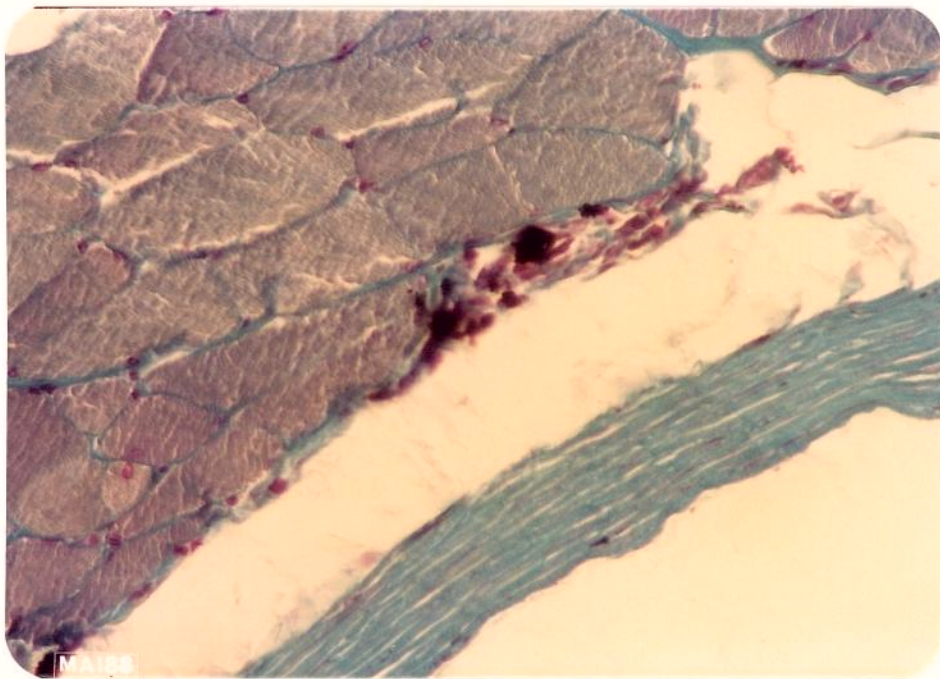
Notar que a reação inflamatória, ao redor das partículas  
de CRFC, é bastante discreta (seta).



L.215/87-3



L. 205/87-2

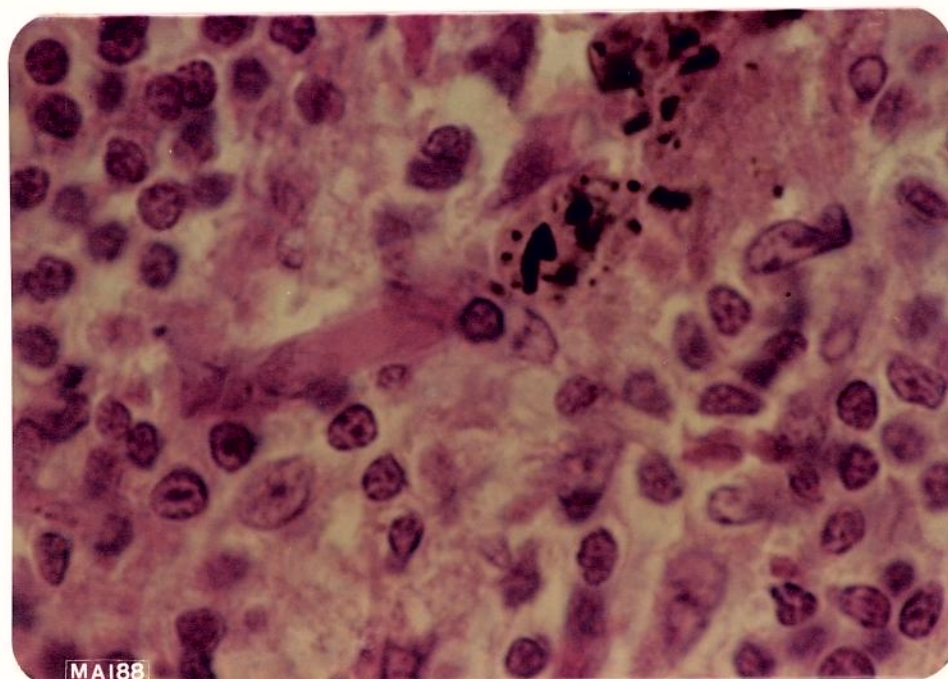


L. 205/87-2

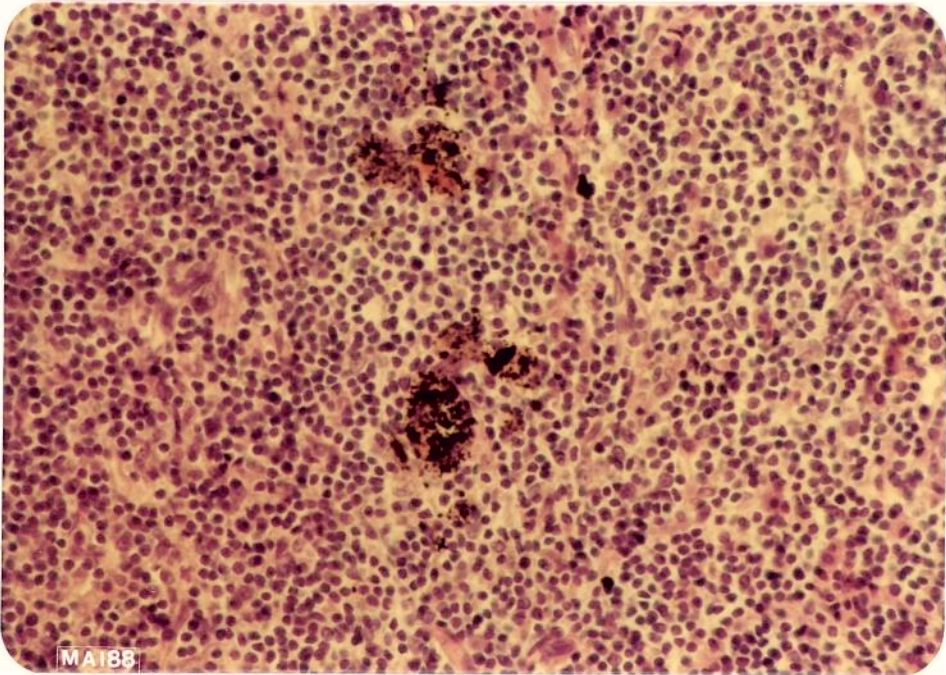
Fig.18 - L.26/86-5 H.E. Gânglio linfático lombar com partículas de CRFC no interior de macrófagos, após 52 semanas de seguimento. 1000x

L.214/87 H.E. Gânglio linfático lombar com partículas de R.C., após 52 semanas de seguimento. 300x

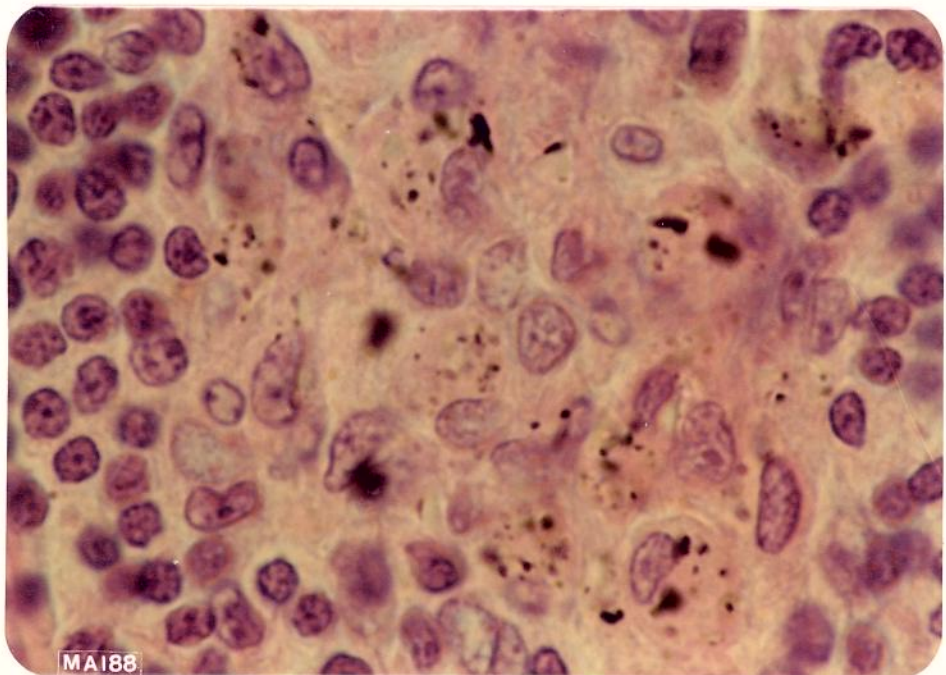
L.86/86-2 H.E. Gânglio linfático lombar com partículas de Ti-A no interior de macrófagos, após dezoito meses de seguimento. 1000x



L.26/86-5



L. 214/87



L. 86/86-2





Fig.19 - Bastão de CRFC não implantado (controle). Observar as irregularidades da superfície (sulcos, saliências e cavidades). Foto à direita com 200x de aumento. Foto à esquerda com 500x de aumento.

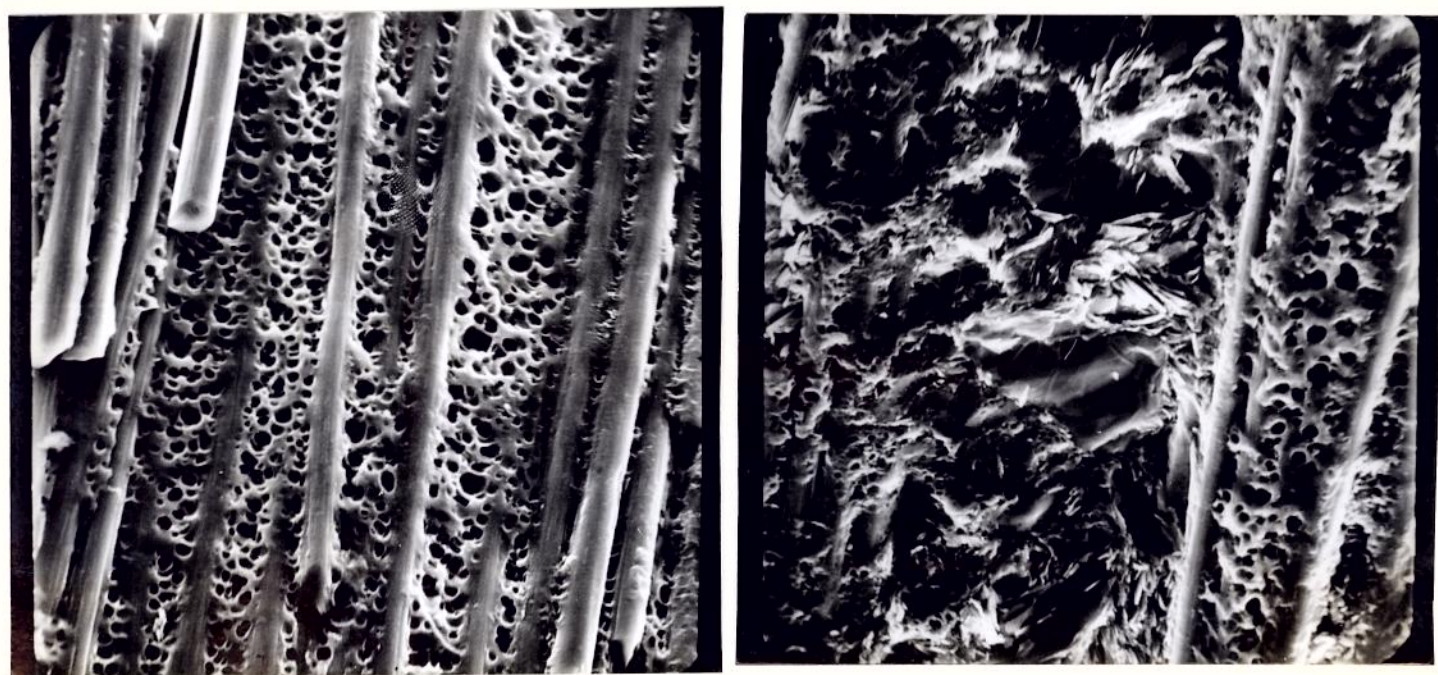


Fig.20 - Bastões de CRFC implantados. Observar a porosidade da resina carbônica e, na foto da direita, a sua substituição por grafite. Ambas com 1.000x de aumento.

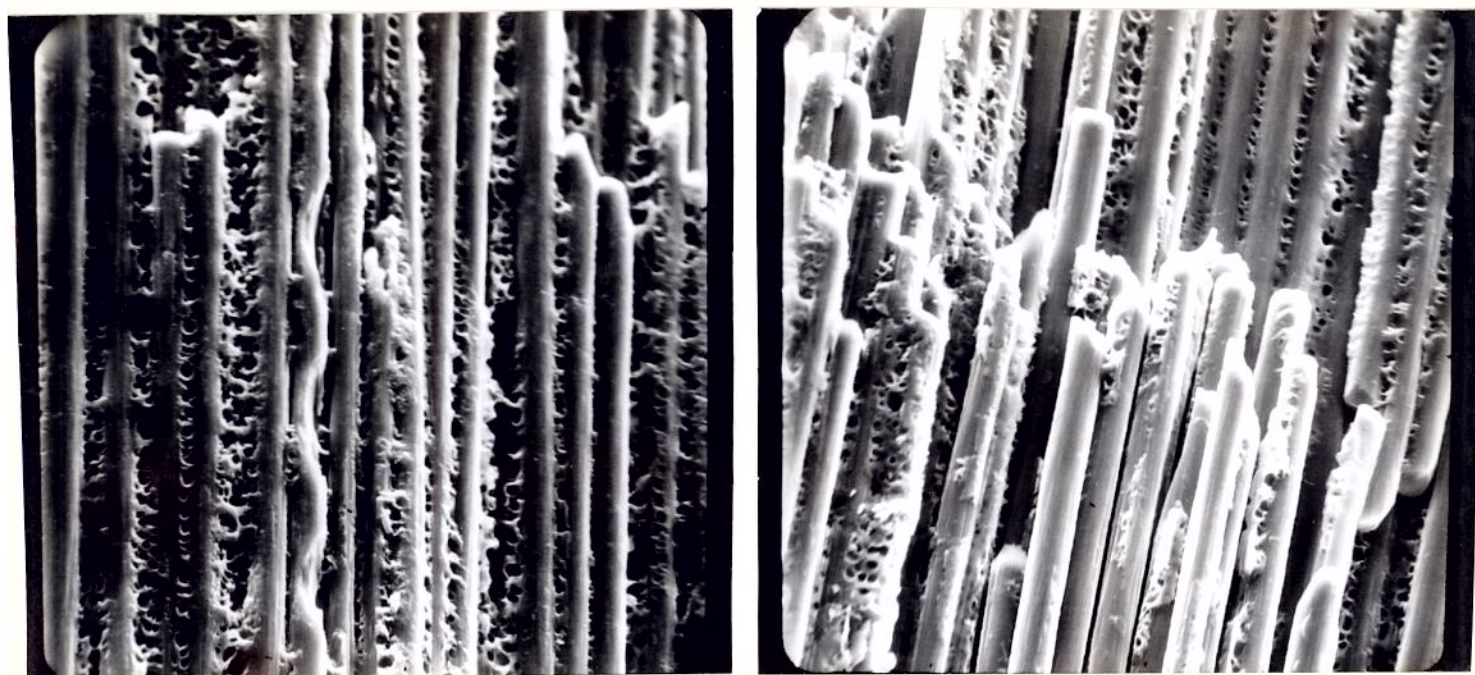


Fig.21 - Bastões de CRFC implantados. Observar as fibras de Carbono torcidas e interrompidas. Notar que as pontas das fibras da foto da direita estão muito brancas. Isto é devido à presença de restos de material orgânico, sem dúvida, da camada de fibrose. Ambas com 950x de aumento



Fig.22 - Bastão de Ti controle. Aspecto da sua superfície. Aumento de 50x.



Fig.23 - Bastão de Ti controle. Arranjo cristalino do metal . Aumento de 450x.



Fig.24 - Bastão de Ti implantado. Notar as manchas e as cavidades na superfície do bastão produzidas pela corrosão do meio interno. Aumento de 4.500x.

**D I S C U S S Ã O**

## A. Sobre a metodologia empregada

A avaliação do grau de toxicidade de um material, para ser utilizado na produção de implantes, apresenta ainda alguns pontos controversos relacionados à metodologia e à análise dos resultados (CLARK & HENCH, 1976; MEARS, 1979a; BLACK, 1984). Em relação à metodologia a ser utilizada, não existe consenso sobre o melhor tipo de avaliação, se "in vivo" ou "in vitro" (AUTIAN, 1972; LAING, FERGUSON & HODGE, 1973; ASTM, 1973; WILLERT, 1980; BLACK, 1984; KLINKMANN, WOLF & SCHMITT, 1984; KOTOURA et alii, 1985). As avaliações "in vitro" foram introduzidas pelos autores japoneses e ganharam adeptos por serem consideradas mais sensíveis e por terem seus resultados quantificados com maior facilidade (AUTIAN, 1972); (MEARS, 1979a; KAWAHARA, 1983; KOTOURA et alii, 1985; PIZZOFERRATO et alii, 1985). No entanto, esta metodologia não invalida, e não substitui as avaliações "in vivo", principalmente se o objetivo é o de se obterem resultados a longo prazo (ASTM, 1973; TURNER, LAWRENCE & AUTIAN, 1973; WILLERT, 1980;). Outro argumento favorável e importante à utilização de animais de laboratório para se testar materiais é o de que neste meio, o implante fica submetido a todas as variações de ordem metabólica, imunológica e, inclusive, ao chamado "efeito tampão" do animal que PIZZOFERRATO et alii (1985) consideram muito importante. Nas avaliações "in vitro", o material testado e os produtos de degradação, oriundos da interação deste com o meio de cultura de células, acabam se acumulando, aumentando a toxicidade local, que, se por um lado pode sensibilizar o teste, pode também fornecer resultados falsos positivos (ULREICH & CHVAPIL, 1981; PIZZOFERRATO et alii, 1985; EVANS & THOMAS, 1986;). Em nossa situação, optamos pela avaliação "in vivo" principalmente porque a maioria dos estudos publicados na literatura e consultados tinham sido feitos desta forma (BEDER & EADE, 1955; LAING et alii, 1967; BOKROS et alii, 1975; JENKINS et alii, 1977; RAE 1979; McNAMARA & WILLIAMS, 1981; NEUGEBAUER et alii, 1981; MINNS, et alii, 1982; MICHIELI, et alii, 1984; ADAMS & WILLIAMS, 1984; HARMS, MITTELMEIER



& MAUSLE, 1984,) além do que nós estávamos também interessados no tipo da reação inflamatória produzida pelo material a longo prazo.

Embora variável na literatura, os animais mais utilizados para os estudos "in vivo" são o coelho (LAING et alii, 1967; KAMINSKI et alii, 1968; TURNER et alii, 1973; NEUGEBAUER et alii, 1981; MINNS et alii, 1982; TARVAINEN et alii, 1985,) e o rato (SALTHOUSE & WILLIGAN, 1972; MATLAGA, YASENCHAK & SALTHOUSE, 1976; McNAMARA & WILLIAMS, 1981; TAYTON et alii, 1982; DAMS & WILLIAMS, 1984, ). O coelho é, preferencialmente, indicado para estudos de curto prazo (AUTIAN, 1972), por ser um animal que apresenta maiores dificuldades na sua manutenção por tempo prolongado e também, por apresentar maior taxa de complicações intra e pós-operatórias (AUTIAN, 1972). Por outro lado, o rato é um animal utilizado rotineiramente para fins experimentais, apresentando uma imensa retaguarda bibliográfica sobre aspectos da anatomia, fisiologia, imunologia e patologia que facilitam sua abordagem e manuseio. Além disto, este animal já foi utilizado no estudo sobre a biocompatibilidade dos materiais carbônicos (TAYTON et alii, 1982; ADAMS & WILLIAMS, 1984; HOWARD & TAYTON & GIBBS, 1985,).

Assim, definidos o tipo de avaliação e o animal de experimentação, restava ainda a escolha da forma do implante e o leito receptor.

A maioria dos autores consultados utiliza implantes na forma de bastões (LAING et alii, 1967; TURNER et alii, 1973; MATLAGA et alii, 1976; FO-IN, 1981,); discos (KAMINSKI et alii, 1968; McNAMARA & WILLIAMS, 1981) e raramente na forma de partículas (MEACHIM & PEDLEY, 1982; RAE, 1986). No entanto, COHEN (1959) em seu estudo da década de 60, chamava a atenção para o fato de que a forma do material que mais incita reação é a forma de pó ou partículas. Segundo este autor, mesmo materiais aparentemente inertes, quando estudados na forma de pó causam reação inflamatória apreciável. Esta idéia também foi compartilhada por RAE (1986) em seu estudo sobre a resposta biológica às partículas de Ti. Outro dado que reforça a importância da forma do material so-

bre a resposta inflamatória foi apresentado por MATLAGA et alli (1976) que testaram seis diferentes polímeros na forma de bastões, com secção transversa variável, ou seja, circular, triangular e pentagonal. Após permanência de 14 dias na musculatura glútea do rato, a resposta tecidual, medida quantitativamente, através do nível da fosfatase ácida no lisossomos, mostrou que a maior atividade enzimática ocorria ao redor dos bastões de secção triangular, enquanto que a mais discreta era produzida ao redor dos bastões de secção circular. Além da forma, o tamanho das partículas parece ser também fator decisivo na qualidade e intensidade da resposta inflamatória que se desenvolve no leito receptor WAGNER et alli, 1976). Este aspecto assume grande significado, levando-se em consideração a bem conhecida liberação de partículas de metal, polietileno ou mesmo de cimento acrílico que ocorrem pelo atrito dos componentes das endopróteses (WALKER & BULLOUGH, 1973; RAE, 1979).

WILLERT & SEMLITSCH (1976) avaliaram histologicamente, fragmentos de tecidos obtidos de 123 casos de endopróteses alimentadas, metal-metal e metal-plástico. O material enviado para análise consistia de fragmentos da neo-cápsula e de tecido fibroso formado entre o implante e o tecido ósseo. As observações histológicas demonstraram nitidamente a formação de uma reação inflamatória crônica, granulomatosa, estimulada e mantida pela liberação constante de partículas oriundas do atrito dos componentes das próteses. A população celular era formada principalmente por macrófagos, algumas células gigantes e, às vezes, por infiltrado linfo-plasmocitário. Os autores concluíram que estas partículas liberadas, excedendo a capacidade de fagocitose e eliminação local, estimulavam as células do tecido conjuntivo e do sistema retículo-endotelial existente entre a junção cimento-osso. Essa proliferação celular excessiva, sem adequada hiperplasia vascular, levava à formação de áreas de necrose e à reabsorção do tecido ósseo, com conseqüente soltura do implante.

Recentemente, PAZZAGLIA et alli (1987) estudaram fragmentos de tecido obtido, a partir de 12 próteses totais do qua-

dril, cimentadas. Os autores concluíram que as partículas de metais estimulavam o sistema lisossômico dos macrófagos e das células gigantes, enquanto que este efeito não tinha sido notado com as partículas de polietileno ou de cimento acrílico. Estes comportamentos diferentes foram relacionados às reações dos tamanhos das partículas, significativamente menores nos metais. Estas conclusões estão de acordo com outros autores que estudaram o efeito dos metais "in vitro" (EVANS & THOMAS, 1974; RAE, 1979; BEARDEN & COCKE, 1980; ULREICH & CHVAPIL, 1981). Portanto, consideramos que seria essencial à avaliação do nosso material, não só sob a forma de bastão para efeito de comparação com os dados da literatura, mas também sob a forma de partículas.

Em relação ao local receptor do implante, a musculatura paravertebral tem sido utilizada com maior frequência (LAING et alii 1967; LAING, 1970; McNAMARA & WILLIAMS, 1981), embora outros músculos, como os da coxa (KAMINSKI et alii, 1968) e os da região glútea (MATLAGA et alii, 1976), também sejam citados. Outros locais do corpo, como a cavidade articular (RAE, 1986), o tecido ósseo (MINNS et alii, 1982), o peritônio (BENSON, 1971), a região subperiosteal da mandíbula (KAMINSKI et alii, 1968), e o tecido celular subcutâneo (DOBSON et alii, 1970) também são utilizados.

Para os nossos objetivos, achamos que o tecido muscular seria o mais adequado. Como pretendíamos implantar dois materiais diferentes num mesmo animal, escolhemos um músculo que fosse duplo, com corpo bem definido, de fácil acesso e que tivesse drenagem linfática específica. A partir de estudos, utilizando injeções de tinta da China nos diversos grupos musculares do membro posterior do rato, e, inclusive, na região plantar da pata, concluímos que o músculo mais adequado era o tríceps sural. A drenagem linfática deste músculo, à direita e à esquerda, mostrou ser específica para os gânglios lombares à direita e à esquerda respectivamente. Além disto, KAMINSKI et alii (1968) haviam demonstrado que discos de aço inoxidável, quando implantados na musculatura para-vertebral e nas musculatura da coxa do coelho,

induziam a formação de uma reação inflamatória semelhante, apesar destes músculos terem atividade funcional diferente. Baseados nestes estudos, utilizamos não só o músculo tríceps sural como receptor, mas também o músculo reto anterior do abdome, para implantar de forma pareada os bastões de CRFC e Ti, já que o animal se encontrava anestesiado em decúbito dorsal, facilitando sobremaneira a abordagem cirúrgica.

Com relação aos resultados obtidos, o músculo tríceps sural mostrou-se perfeitamente adequado como leito receptor, no entanto, três bastões de Ti e dois de CRFC não foram encontrados no local da implantação, na época do sacrifício, provavelmente porque a espessura do músculo reto anterior do abdome é pequena, facilitando assim sua perfuração pelos bastões. Deste modo, achamos que este músculo não apresenta vantagens em relação à musculatura para-vertebral, que é normalmente utilizada para esta finalidade.

Com relação à avaliação do gânglios linfáticos, ficou evidente que os materiais implantados no músculo tríceps sural eram captados pelo sistema linfático e filtrados a nível do seio subcapsular. Não pudemos estabelecer relação direta entre o tamanho dos gânglios, a quantidade de partículas fagocitadas com o tipo de material implantado e com o tempo de seguimento. Não se evidenciou também a formação de centros claros e nem a ativação dos macrófagos do seio medular, demonstrando que o material implantado não tinha efeito antigênico, funcionando apenas como corpo estranho.

## B - Sobre as reações inflamatórias produzidas

Os critérios de avaliação da intensidade das reações inflamatórias são diferentes, de acordo com a forma do material implantado. A resposta tecidual às partículas tem critérios de avaliação pouco definidos conforme salientado por AUTIAN (1972). Vários autores já procuraram estabelecer critérios quantitativos, avaliando em cruces (HOMSY, 1970, TURNER et alli, 1973, HASTINGS,

1983 ) ou por pesos (AUTIAN 1972) a presença de alterações histológicas como necrose tecidual, infiltrado inflamatório, fibrose, área envolvida. ESCALAS, GALANTE & ROSTOKER (1976) salientam a falta de sensibilidade destas avaliações e a impossibilidade de se aplicar uma análise estatística adequada nos dados coletados.

Os estudos publicados sobre a compatibilidade de materiais, nem sempre apresentam descrição minuciosa da metodologia empregada na avaliação histológica; os tempos de permanência do implante são variados e nem sempre o material é testado em relação a um controle. Esta falta de padronização dificulta a comparação dos resultados entre os diferentes trabalhos.

Normas a nível internacional têm sido definidas com o objetivo de minimizar estes problemas (ASTM, 1973; WILLERT, 1980). Segundo ASTM (1973) um material pode ser considerado bem tolerado, quando apresenta reação inflamatória menor ou igual a um material controle, sabidamente inerte. WILLERT (1980) sugere que a avaliação pode ser qualitativa e, se possível, quantitativa. Quando o material for implantado sob a forma de partículas, recomenda o uso de ilustrações como auxílio, para uma avaliação mais sensível. Podemos considerar que estas normas reforçam as análises baseadas em descrição sistemática e comparativa das alterações histológicas, produzidas pelo material testado e pelo material controle, no hospedeiro, conforme foi empregada por nós neste estudo.

Quando o implante tem a forma de bastão é aceito pela maioria dos autores, que a presença de necrose e a presença e o tamanho da camada de fibrose ao redor do implante são características histológicas importantes (LAING et alii, 1967; AUTIAN, 1972; McNAMARA & WILLIAMS, 1981).

Apesar de TURNER et alii (1973) não terem encontrado correlação entre toxicidade e camada de fibrose ao redor dos bastões, argumento defendido por LAING et alii (1967), AUTIAN (1972) interpretou esta discrepância como consequência das diferenças entre os materiais testados e os períodos de observação analisados. McNAMARA & WILLIAMS (1981) avaliaram a medida da espessura

da camada de fibrose em diversos metais e conseguiram estabelecer um padrão de reação para cada metal. Desta forma, eles confirmaram a fidelidade e a reprodutividade do método.

Quando implantamos no tecido muscular um material na forma de partículas é esperado que, além das lesões traumáticas produzidas pelo ato cirúrgico, ocorra uma reação inflamatória aguda (HASTINGS & THANH THUY, 1976). Esta lesão traumática permanece evidente até o 30 dia de pós-operatório, sendo bastante discreta ou inexistente após uma semana de evolução (TURNER et alii, 1973). No entanto, se o material implantado for tóxico, esta alteração excede este período e, segundo MEACHIM & PEDLEY (1982), sua extensão será diretamente proporcional à toxicidade do material. Desta forma, a presença e intensidade da necrose correspondem, segundo estes autores, aos dados mais importantes de se determinar nas avaliações agudas.

Apesar de termos implantado uma quantidade relativamente grande de material, a necrose muscular observada após um semana de seguimento foi muito discreta e até inexistente em alguns animais. Além disto, não houve diferenças nas intensidades da regeneração muscular entre os diversos materiais implantados. Este fato nos permite concluir que o CRFC se comportou exatamente como os nossos materiais de referência. A ausência de um infiltrado inflamatório mais exsudativo, rico em neutrófilos, nesta fase aguda, demonstra também a ausência de toxicidade dos materiais implantados.

Quando o organismo não consegue remover o agente agressor através da reação inflamatória aguda, esta pode persistir e tornar-se crônica. A reação inflamatória crônica é lenta, inespecífica, com poucas alterações hemodinâmicas e caracterizada por um infiltrado celular formado por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e fibroblastos. Sob certas condições, esta reação inflamatória pode se acompanhar da formação de granulomas. Isto ocorre quando o agente agressor não é eliminado ou quando ele induz a fenômenos de hipersensibilidade (HEYMER, 1985).

Em relação aos implantes permanentes, a liberação crônica de produtos tóxicos, que se originam pela dissolução, degradação ou oxidação destes, devido à agressão do meio interno, pode ser responsável pela manutenção de um infiltrado inflamatório crônico (LAING, 1973; MEARS, 1979b).

Em nosso estudo, as reações passaram a ser consideradas como crônicas a partir da quarta semana de observação, notando-se, daí para frente, poucas alterações significativas. Em todos os músculos que receberam implantes na forma de partículas, foi observado o desenvolvimento de reação inflamatória granulomatosa, do tipo corpo estranho, com predomínio de macrófagos.

O Ti, nosso material de referência, é considerado, na literatura, como um material bastante inerte (BEDER & EADE, 1955; FERGUSON et alii, 1962; LAING, 1973; ANSTUTZ, 1973). Vários estudos já foram realizados com este material na forma de bastão, mas estudos sobre as reações inflamatórias produzidas por partículas são poucos (RAE, 1986).

RAE (1986) avaliou a reação inflamatória produzida pelo Ti e pelo titânio-alumínio-vanádio na forma de partículas injetadas na articulação do joelho de camundongos. A reação inflamatória foi discreta, somente com algumas células semelhantes a macrófagos, carregadas de partículas, mas sem necrose tecidual. Apesar de não termos encontrado, na literatura, estudos sobre o tipo de reação produzida pelas partículas de Ti, no tecido muscular, podemos dizer que os nossos resultados são compatíveis com o estudo descrito anteriormente, já que a reação observada por nós, foi também predominantemente histiocitária, com infiltrado discreto e algumas células gigantes.

O mesmo tipo de reação foi observado em relação às partículas da R.C. Ficamos com a impressão de que, mesmo nos animais com maior tempo de seguimento, a quantidade de macrófagos e células gigantes era menor do que aquela exibida inclusive pelo Ti. Notamos também que as partículas deste material tinham tendência maior a se agruparem e, esta maior compactação, poderia ser um fator a mais na explicação do aspecto mais benigno da

reação inflamatória, isto é, menor quantidade de infiltrado celular em relação à quantidade de partículas.

A reação inflamatória, ao redor dos materiais na forma de partículas, pode ser comparada a uma reação granulomatosa crônica, do tipo corpo estranho, semelhante àquelas onde o agente agressor permanece presente no foco da reação (ADAMS, 1976; MEYMER, 1985).

Quando o material é tóxico ou irritante, estimula reação inflamatória crônica com formação de granulomas denominados de proliferativos ou de hipersensibilidade. Nesta situação o agente agressor permanece parcialmente no interior da células mononucleadas e é possível demonstrar-se uma elevada taxa de renovação nos macrófagos (RYAN & SPECTOR, 1969). Isto ocorre porque a substância tóxica produz destruição e estimula através da liberação de mediadores químicos pelas células lesadas, a proliferação celular e a penetração dos monócitos no foco da reação (MEYMER, 1985).

Inversamente, quando o material não é tóxico, forma-se o granuloma inerte caracterizado pela presença do agente agressor no interior dos macrófagos e baixa taxa de renovação celular. A ausência de toxicidade do material e a falta de estímulos químicos provenientes da morte celular permitem que a população histiocitária permaneça estável. Pela natural longevidade desta célula o aspecto histológico deste tipo de reação inflamatória acaba sendo predominantemente histiocitário com tendência a aumentar esta população com o tempo. (RYAN & SPECTOR, 1969, ADAMS, 1976).

Em relação aos materiais carbônicos e ao Ti sob a forma de partículas, os achados histológicos mostraram que a quantidade de macrófagos e de células gigantes ia se tornando cada vez maior à medida que aumentava o tempo de observação. O quadro histológico final apresentou quase todo o material implantado, contido no interior de macrófagos, ou envolvido por células gigantes. Mesmo considerando-se a maior intensidade do infiltrado inflamatório ao redor do CRFC-A quando comparado com o CRFC-B,



Ti-B e R.C., a interpretação do tipo da reação nos leva a concluir que o material carbônico testado se comporta como um material pouco irritante.

Quando um material é implantado na forma de partículas é aceito que quanto menor for o tamanho destas maior será a intensidade da reação inflamatória produzida (COHEN, 1959). Neste estudo os resultados obtidos foram inversos, visto que o CRFC-A com partículas maiores produziu a reação inflamatória mais intensa. Como o CRFC-A e o CRFC-B foram provenientes de um mesmo material, excluimos como causa a sua composição química, para explicar estas diferenças, como é sugerido por alguns autores (AMIS et alli, 1984; FORSTER et alli, 1984). Passamos então a considerar os aspectos físicos pertinentes, já que no CRFC-B o tamanho das partículas e dos fragmentos de fibra eram menores e na R.C., apesar de ter partículas semelhantes em tamanho ao CRFC-B não continha fragmentos de fibra. O CRFC-A era formado de partículas irregulares de resina carbônica de até 30  $\mu$  m de diâmetro e por fibras que chegavam a medir até 100  $\mu$  m de comprimento. Conforme já foi relatado, estas fibras se mostravam sempre envolvidas por células e por colágeno, formando como que um invólucro às fibras de carbono. Este tipo de estrutura, apesar de não ter sido descrita nos trabalhos de vários autores (JENKINS et alli, 1977; JENKINS, 1978; JENKINS & McKIBBIN, 1980; NEUGEBAUER et alli, 1981; JENKINS, 1982) foi mencionada por MENDES et alli (1985 b) e MENDES et alli (1985 a), a partir de biópsias de neoplasmas induzidos por fibras de carbono. Estes autores discordam dos encontros de JENKINS et alli (1977) que dão pouca importância à reação inflamatória produzida por estas fibras, evidenciando apenas a sua capacidade indutora de colágeno. Os achados de MENDES et alli (1985b), que acompanharam por doze meses e dezoito meses dois pacientes, nos quais haviam implantado fibra de carbono, estão de acordo como o presente estudo, pois estes autores observaram a presença de reação inflamatória predominantemente histiocitária significativa e persistente ao redor destas fibras.

A fragmentação da fibra de carbono tem sido considerada por um lado como vantajosa, estimulando a produção e deposição do colágeno (FORSTER et alli, 1980; JENKINS & McKIBBIN, 1980), ao passo que AMIS et alli, 1984, consideram que esta fragmentação é responsável pela manutenção dos infiltrado histiocitário que poderia inibir mais do que estimular a atividade fibroblástica e conseqüentemente a formação do colágeno. Segundo estes autores, a incompatibilidade mecânica gerada pelo elevado módulo de elasticidade da fibra em relação ao tecido receptor poderia também ser responsável, pela estimulação e manutenção desta reação inflamatória.

Assim sendo, fragmentos maiores da fibra de carbono, como aqueles presentes no CRFC-A, seriam mais facilmente detectados pelo organismo provocando reação inflamatória aparentemente paradoxal. Esta discussão tem importância clínica pois estes materiais carbônicos, apesar de estarem sendo utilizado na produção de implantes (SCLIPPA & PIEKARSKI, 1973, PILLIAR & BLACKWELL, 1976; STUART, 1986) foram rejeitados por LANGER (1983). Este autor chamou atenção sobre as intensas reações teciduais que eles poderiam induzir quando na forma de partículas. O desprendimento de pequenas fibras ou partículas pelo atrito ou pelas deformações cíclicas impostas pelo uso, realmente podem produzir reações inflamatórias cuja intensidade dependerá da quantidade e do tamanho dos fragmentos liberados, podendo prejudicar o desempenho do implante se elas se comportarem de maneira semelhante àquelas observadas ao redor do polietileno, dos metais ou do cimento acrílico ( WALKER & BULLOUCH, 1973; WILLERT & SEMLISTSCH, 1976; BURSTEIN, 1978 ).

Ultimamente, tem sido utilizado o polietileno de alto peso molecular reforçado com fibra de carbono na fabricação de endopróteses (SCLIPPA & PIEKARSKI, 1973). No entanto, são escassos ainda os relatos sobre as reações teciduais produzidas por estes materiais quando utilizados em conjunto. GROTH & SHILLING (1983) avaliaram a resposta inflamatória sinovial a estes materiais em onze substituições totais de tornozelo. Os autores

fizeram referência ao desenvolvimento de reação inflamatória produzida pelas partículas do polietileno, que estavam sendo fagocitadas e envolvidas por histiócitos e células gigantes. Com relação aos fragmentos de fibras de carbono, ficou evidente que a reação inflamatória era menos intensa que a produzida pelas partículas de polietileno, e consistia basicamente na deposição de tecido fibroso.

Com relação aos bastões foi observado o desenvolvimento de reação inflamatória bem mais discreta que aquela encontrada ao redor das partículas. Segundo LAING, FERGUSON & HODGE (1967) a espessura da camada de fibrose ao redor de implantes metálicos sólidos está diretamente relacionada com o grau de toxicidade deste material. Em seus estudos realizados na musculatura paravertebral do coelho, o Ti foi o material que produziu a menor camada de fibrose. Embora a aplicação do teste t de Student não tenha demonstrado diferença significativa entre as espessuras da camada de fibrose, a comparação dos valores dos desvios padrões sugerem um comportamento bem mais uniforme dos bastões de Ti em relação aos de CRFC. Considerando-se que a composição química, as dimensões e a forma dos bastões eram semelhantes, resta para explicar esta diferença de comportamento as características superficiais dos bastões.

Através da microscopia eletrônica de varredura pudemos observar nitidamente que os bastões de Ti controle apresentavam um acabamento superficial mais uniforme. No entanto, nos bastões de CRFC foram observadas irregularidades superficiais produzidas por fibras de carbono ora interrompidas, ora salientes e por impregnação irregular da resina carbônica. Estas irregularidades podem também ser consideradas como as responsáveis pela retenção dos fragmentos de fibra e resina carbônica encontrados adjacentes à camada de fibrose e no interior de macrófagos nos grupos avaliados com 1 e 4 semanas de seguimento. Portanto, o acabamento superficial dos bastões de CRFC pode justificar perfeitamente a tendência à maior espessura da camada de fibrose, os encontros histológicos observados com 1 e 4 semanas de seguimento, e a

maior fixação destes ao músculo reto anterior do abdome.

Ficou evidente também pela microscopia eletrônica de varredura que os bastões de Ti implantados sofreram corrosão, o que não ocorreu com os bastões de CRFC, já que as irregularidades superficiais observadas eram idênticas tanto nos bastões implantados como nos bastões controle.

Por estas considerações e, de acordo com os resultados deste estudo, não é possível afirmar-se que os materiais carbônicos sejam totalmente inertes, como é colocado em geral na literatura (BENSON, 1971; BOKROS et alii, 1975; JENKINS & CARVALHO, 1977; JENKINS, 1980; JENKINS, 1982). No entanto, podemos concluir que os materiais carbônicos e, em especial o CRFC testado sob a forma de partículas e bastão é muito bem tolerado no tecido muscular do rato. A presença e as dimensões dos fragmentos de fibra de carbono, foram responsáveis pela reação inflamatória mais intensa e pela maior quantidade de tecido fibroso formado.

Aceitando a semelhança de comportamento entre ratos e seres humanos, os resultados deste estudo permitem do ponto de vista biológico afirmar que este material possa ser indicado na produção de implantes ortopédicos. No entanto, a utilização do CRFC deve ser aceita com reserva em situações nas quais os componentes dos implantes se articulem. O atrito destes, poderá resultar na produção e liberação de partículas ao seu redor que poderão provocar reação inflamatória crônica de patogenicidade não conhecida.

**C O N C L U S Õ E S**

- 1 - Todos os materiais implantados, sob a forma de partículas, produziram uma reação granulomatosa crônica do tipo corpo estranho.
  
- 2 - O tamanho das fibras de carbono presentes nas partículas de CRFC-A foram responsáveis pela reação inflamatória mais intensa observada ao redor deste material.
  
- 3 - As reações inflamatórias observadas ao redor dos bastões de Ti e CRFC foram muito discretas. A espessura da camada de fibrose tendeu a ser maior ao redor dos bastões de CRFC.
  
- 4 - Não foram observadas alterações carcinogênicas nos músculos que receberam os implantes de CRFC-A e Ti seguidos por 78 semanas.
  
- 5 - O CRFC sob a forma de partícula e bastão foi muito bem tolerado pelo tecido muscular do rato.

**R E S U M O**

Durante o período de 06.85 à 07.87 foi realizado o estudo da reação inflamatória produzida pelo Carbono Reforçado com Fibras de Carbono (C.R.F.C.) na forma de partículas e bastões em 120 ratas (Rattus norvegicus) variedade Wistar.

O C.R.F.C. foi implantado no músculo tríceps sural direito com partículas medindo  $30\mu\text{m}$  e  $11\mu\text{m}$  de diâmetro, denominado de CRFC-A e CRFC-B respectivamente. Foram utilizados como materiais-controle o Titânio (Ti) na forma de partículas com 30  $\mu\text{m}$  e 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro, denominados de Ti-A e Ti-B respectivamente, e a Resina Carbônica (R.C.) com partículas de  $11\mu\text{m}$ , os quais foram implantados no músculo tríceps sural esquerdo de forma pareada com o CRFC-A e B. As reações inflamatória produzidas foram analisadas histologicamente após 1, 2, 4, 8, 16, 52 e 78 semanas (18 meses). O material testado sob a forma de partículas, na fase aguda, não apresentou toxicidade, que pudesse ser sugerida pela presença de necrose ou infiltrado inflamatório do tipo exsudativo, comportando-se exatamente igual aos materiais controle. Na fase crônica, todos os materiais apresentavam reação granulomatosa do tipo corpo estranho, que pelas características histológicas sugeriam uma reação de baixa renovação celular, como ocorre quando o material é pouco irritante. O CRFC-A na fase crônica apresentou no entanto uma reação inflamatória mais intensa, que foi sugerida pela quantidade maior de infiltrado inflamatório em relação à quantidade de partículas. Paradoxalmente o CRFC-A foi mais reativo que o CRFC-B cujas partículas eram menores. Explicamos tal achado pela presença de fragmentos maiores de fibras de Carbono no CRFC-A que por incompatibilidade mecânica produziram maior irritação tissular.

Foram implantados no músculo reto anterior do abdome de 28 animais, 28 bastões de Ti e CRFC de forma pareada. Após 1, 4 e 52 semanas de seguimento estes músculos foram estudados histologicamente e foi medida a camada de fibrose formada ao redor dos bastões no grupo de animais com 52 semanas de seguimento. A reação inflamatória ao redor dos bastões foi evidentemente menor do que aquela observada ao redor das partículas, em todos os grupos



avaliados. No entanto, provavelmente pela diferença de acabamento superficial, os bastões de CRFC tenderam a apresentar uma camada de fibrose que mesmo no grupo de 52 semanas foi mais espessa do que a do Ti.

Alterações carcinogênicas não foram observadas no local em que foram implantados os materiais mesmo após 18 meses de seguimento.

**S U M M A R Y**

Between March/85 and July/87 the inflammatory reaction produced by carbon fibre reinforced carbon (CRFC) was studied as particles and rods in 120 rats (Ratus norvegicus), variety Wistar.

The CRFC was implanted into the right triceps surae as particles measuring  $30\mu\text{m}$  and  $1\mu\text{m}$ , labeled as CRFC-A and CRFC-B respectively. As controls titanium (Ti) of the same particle size was used and labeled as Ti-A and Ti-B and a carbon resin (C.R.) with a particle size of  $1\mu\text{m}$ , which were implanted into the left triceps surae at pairs to CRFC-A and B. The inflammatory reaction produced was analysed histologically as 1, 2, 4, 8, 16, 52 and 78 weeks. No toxic reaction was seen in the acute phase after implantation of the material as particles. In the chronic phase all materials evoked a granulomatous foreign body reaction, whose histological characteristics suggested a low cellular turnover, as it is typical of little irritative material. However the CRFC-A was more reactive than CRFC-B, Ti-B and R.C with smaller particles. This could be explained by the presence of larger carbon fibre fragments in the CRFC-A which mechanically produced more tissue reaction.

It was implanted 20 rods in pairs of Ti and CRFC in the abdominal muscle with a follow-up of 1, 4 and 52 weeks. The inflammatory response around the rods was lesser, than around the particles of all groups. However the rods of CRFC showed a thicker layer of fibrous tissue than those of Ti, even after 52 weeks, probably due to a different surface finishing.

No carcinogenetic alteration even after 78 weeks were seen at the implant site.

R E F E R Ê N C I A S

B I B L I O G R Á F I C A S

- ADAMS, D. & WILLIAMS, D. F. - The response of bone to carbon-carbon composites. Biomaterials , 5:59-64, 1984.
- ADAMS, D.O.- The granulomatous inflammatory response. Am. J. Pathol. , 84 (1): 164-191, 1976.
- AMIS, A.A.; CAMPBELL, J.R.; KEMPSON, S.A. & MILLER, J. H. - Comparison of the structure of neotendons induced by implantation of carbon or polyester fibres. J. Bone Jt. Surg. , 66-B (1): 131-139, 1984.
- AMSTUTZ, H.C. - Biomaterials for artificial joints , Orthop. Clin. North Am. , 4 (2): 235-273, 1973.
- ANDERSSON, G.B.J.; GAECHTER, A.; GALANTE, J.D. & ROSTOKER, W. - Segmental replacement of long bones in baboons using a fiber titanium implant. J. Bone Jt. Surg. 60-A: 31-40, 1978.
- ASTM - Standart. experimental testing for biological compatibility of metals for surgical implants. Annual Book of ASTM Standards. 367-369, 1973.
- AUTIAN, J. - The new field of plastics toxicology - Methods and results. Critical Rev. Toxicol. , 2: 1-40, 1972.
- BAGO, J.; AGUIRRE, M; NARDI, J. & TALLIADA, N. - Malignant fibron histiocytoma of bone at the site of a total hip arthroplasty . J. Bone Jt. Surg. 66-B: 38-40, 1984.
- BARROS, D.I. - Stainless steels in medical devices. In: Handbook of Stainless Steels. New York, McGraw-Hill, 1977 cap. 42.

- BEACON, J. F. & AICHROTH, P.M. - A method of reconstruction of the goat knee joint using fibre. J. Bone Jt. Surg. 62-B (4): 534-535, 1980.
- BEARDEN, L.J. & COOKE, F. W. - Growth inhibition of cultured fibroblasts by cobalt and nickel. J. Biomed Mater. Res. , 14: 289-309, 1980.
- BEDER, Ø.E. & EADE , G.- An investigation of tissue tolerance to titanium metal implants in dogs. Surgery, 39 (3): 470-473, 1955.
- BEJUI, J.; PEROT, F.; PERAULT , F.; VIGNON, E.; BEJUI-THIVOLET, F. & HARTMANN, D. - Etud expérimentale des fibres de carbone intra-articulaires dans le genou du chien avec et sans conservation du ligament croisé antérieur. REV. Chir. Orthop. , 70 suppl II: 27-29, 1984.
- BENSON, J.- Elemental carbon as a biomaterial. J. Biomed. Mat. Res. Symposium. 2 (Part 1): 41-47, 1971
- BLACK, J. - Systemic Effects of biomaterials. Biomaterials, 5: 11-18, 1984.
- BOKROS, J.C.; AKINS, R.J.; SHIM, H.S.; HAUBOLD, A.D. & GARWAL, N.K. - Carbon in prosthetic devices. ACS Symposium Series, 21: 237-253, 1975.
- ROWMAN, A.J. & MANLEY, T.R. -The elimination of breakages in upper dentures by reinforcement with carbon fibre. Br. Den. J. , 156: 87-89, 1984.
- BURSTEIN, A .H . - Mechanical failure of total joint replacement In: Proceeding of Workshop, San Diego, 1978.

- CLAES, L. & NEUGEBAUER, R. - "In vivo" and "in vitro" investigation of the long-term behavior and fatigue strength of carbon fiber ligament replacement. Clin Orthop. 196: 99-111, 1985.
- CRISTEL, P. ; MEUNIER, A. ; LECIERCO, S.; BOUQUET, Ph. & BUTTAZZONI, B. - Development of a carbon-carbon hip prosthesis J. Biomed. Mater. Res., 21 (A2): 191-210, 1987.
- CLARK, A. E. & HENCH, L.L. - The influence of surface chemistry on implant interface histology: A theoretical basis of implant materials selection. J. Biomed. Mater. Res., 10: 161-174, 1976.
- COHEN, J. - Assay of foreign - body reaction. J. Bone Jt Surg., 41-A: 152-166, 1959.
- COLEMAN, R. F.; HERRINGTON, J. & SCALES, J.T. - Concentration of wear products in hair, blood and urine after total hip replacement. Brit. Med. J., 1: 527-529, 1973.
- CRAMERS, M. & LUCHT, L. - Metal sensitivity in patients treated for tibial fractures with plates of stainless steel, Acta Orthop. Scand., 48: 245-249, 1977.
- DAVIS, S.D., GIBBONS, D.F.; MARTIN, R.L.; LEVITT, S.R.; SMITH, J. & HARRINGTON, V.R. - Biocompatibility of ceramic implants in soft tissue. J. Biomed. Mater. Res. 6: 425-449, 1972.
- DOBSON, J.L.; MATHEWS, P.S. & STELLING, F.H. - Implant acceptance in the musculo-skeletal system. Clin. Orthop 22: 233-238, 1970.

- EKSTRAND, K.; RUYTER, I.E. & WELLENDORF, H. - Carbon graphite fiber reinforced poly (methyl-methacrylate): Properties under dry and wet conditions. J. Biomet. Mater. Res. 21 (9): 1065-1080, 1987.
- ESCALAS, F.; GALANTE, J. & ROSTOKER, W. - Biocompatibility of materials for total joint replacement. J. Biomed. Mater. Res., 10: 175-195, 1976.
- EVANS, E.J. & THOMAS, I.T. - The in vitro toxicity of cobalt-chrome-molybdenum alloy and its constituent metals. Biomaterials, 7: 25-29, 1986.
- EVANS, E.M., WALES, S.; FREEMAN, M.A.R.; MILLER, A.J. & VERNON-ROBERTS, B. - Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement. J. Bone Jt Surg., 56-B: 626-642, 1974.
- FERGUSON, A.B., Jr.; AKAHOSHI, Y.; LAING, P.G. & HODGE, E.S. - Trace metal ion concentration in the liver, kidney, spleen, and lung of normal rabbits. J. Bone Jt Surg., 44-A: 317-322, 1962.
- FORSTER, I.W.; RALIS, Z.A.; MCKIBBIN, B. & JENKINS, D.H.R. - Biological reaction to carbon fiber implants: The formation and structure of a carbon-induced "Neotendon" Clin. Orthop., 131: 299-307, 1978.
- FUNK, F.J., Jr. - Synthetic ligaments. Current Status. Clin. Orthop., 219: 107-111, 1987.
- GROTH, H. & SHILLING, J.M. - Tissue response to carbon-reinforced polyethylene. J. Orthop. Res., 1: 129-135, 1983.



- HANDA, R. - Grafite pneumoconiosis. A review of etiologic and epidemiologic aspects. Scand. J. Work Environ Health., 9: 303-314, 1983.
  
- HARMS, J. ; MITTELMEIER, H. & MAUSLE, E. - Results of animal studies on the use of carbon fiber-reinforced plastic prostheses In: The Cementless Fixation of Hip Endoprotheses. Germany, Springer-Verlag, 1984.pp. 249-251
  
- HASTINGS, G. W. - Biomedical applications of carbon fibres In: International Conference on Applications of carbon Fibres. Brasil, 1983. p. 1-16.
  
- HASTINGS, G.W. & THANH THUY, N.G.- Biomechanically compatible materials: carbon fibre reinforced plastics. In: Biocompatibility of Implant Materials. London. Sector Publishing Limited, 1976. p. 128-133.
  
- HEYMER, B. - Causative agents, mediators and histomorphology of inflammation. Path. Res. Pract., 180, 143-150, 1985.
  
- HOMSY, C.A. - Bio-Compatibility in selection of materials for implantation. J. Biomed. Mater. Res., 4: 341-356, 1970.
  
- HOWARD, C.B.; BELL, W.; MACKIE, I. & JENKINS, D.H.R. - Late repair of the calcaneal tendon with carbon fibre, J. Bone Jt. Surg. 66-B (2): 206-208, 1984.
  
- HOWARD, C.B.; TAYTON, K.J.J. & GIBBS, A. - The response of human tissue to carbon reinforced epoxy resin. J. Bone Jt. Surg., 67B (4): 656-658, 1985.

- HUETTNER, W. - Carbonfibre - reinforced polysulphone. In: 16th Biennial Conf. on Carbon, San Diego: 482-483, July 18-22, 1983.
- HUETTNER, W. & HUTTINGER, K.J. - The use of carbon as an implant material In: The Cementless Fixation of Hip Endoprostheses. Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 81-94.
- JENKINS, D.H.R. - The repair of cruciate ligaments with flexible carbon fibre. A longer term study of the induction of new ligaments and of the fate of the implanted carbon. J. Bone Jt. Surg., 60-B: 520-522, 1978.
- JENKINS, D.H.R.; FORSTER, I.W.; McKIBBIN, B.; RALIS, Z.A. - Induction of tendon and ligaments formation by carbon implants. J. Bone Jt. Surg., 59-B: 53-57, 1977.
- JENKINS, D.H.R. & McKIBBIN, B. - The role of flexible carbon-fibre implants as tendon and ligament substitutes in clinical practice. A preliminary report. J. Bone Jt. Surg., 62-B: 497-499, 1980.
- JENKINS, G.M. - Biomedical applications of carbons and graphites. Review article. Clin. Phys. Physiol. Meas., 1(3): 171-194, 1980.
- JENKINS, G.M. - Carbon and the body. Spectrum, 177: 11-15, 1982.
- JENKINS, G.M. & CARVALHO, F.X. - Biomedical applications of carbon fibre reinforced carbon in implanted prostheses. Carbon, 15: 33-37, 1977.

- JENKINS, G.M. & GRIGSON, C.J. - The fabrication of artifacts out of glassy carbon and carbon fibre reinforced carbon for biomedical applications. J. Biomed Mater Res., 13: 371-394, 1979.
- KAMINSKI, E.J.; OGLESBY, R.J.; WOOD, N.K. & SANDRIK, J. - The behavior of biological materials at different sites of implantation. J. Biomed Mater Res., 2: 81-88, 1968.
- KAWAHARA, H. - Cellular responses to implant materials: biological, physical and chemical factors. Int Dent, 33: 350-375, 1983.
- KING, J.B., BULSTRODE, C. - Polylactate - coated carbon fiber in extra-articular reconstruction of the unstable knee. Clin Orthop., 196: 139-142, 1985.
- KLINKMANN, H; WOLF, H. & SCHMITT, E. - Definiton of biocompatibility. Contr Nephrol. 37: 70-77, 1984.
- KOTORA, Y.; YAMAMURO, T.; SHIKATA, J.; KAKUTANI, Y.; KITSUGI, T. & TANAKA, H. A method for toxicological evaluation of biomaterial based on colony formation of V79 cells. Arch Orthop trauma surg. 104: 15-19, 1985.
- LAING, P.G. - Compatibility of biomaterials. Orthop Clin. North Am., 1 (2): 249-273, 1973.
- LAING, P.G.; FERGUSON, A.B.; Jr. & HODGE, E.S. Tissue reaction in rabbit muscle exposed to metallic implants. J. Biomed Mater Res., 1: 135-149, 1967.
- LANGER, G.- Materials for bone and joint replacement Transplantation und künstliche Organe. 16: 203-212, 1983.

- McNAMARA , A . & WILLIAMS , D.F. - The response to the intramuscular implantation of pure metals. Biomaterials, 2: 33-40, 1981.
- MATLAGA, B.F.; YASENCHAK, L.P. & SALTHOUSE, T.N. - Tissue Response to Implanted Polymers: the significance of sample shape. J.Biomed Mater Res, 10: 391-397, 1976.
- MEACHIM, G. & PEDLEY, R.B. - The tissue response to acrylic particles implanted in animal muscle. Biomaterials, 3: 213-219, 1982.
- MEARS, C. D -The biological response to implanted materials. In: Materials and Orthopaedic Surgery. Baltimore, The Williams & Wilkins Company. 1979. pp. 196-257.
- MEARS, C.D. - The dissolution of implantable materials. In: Materials and Orthopaedic Surgery. Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1979. pp. 107-135.
- MEARS, C.D. - Introduction. In: Materials and Orthopaedic Surgery. Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1979. pp.1-28
- MENDES, D.G.; IUSIM, M. ; ANGEL, D. ; ROTEM, A; ROFFMAN, M.; GRISHKAN, A. & MORDOHOHOVICH, D. - Histologic Pattern of biomechanic properties of the carbon fiber-augmented ligament tendon: A laboratory and clinical study. Clin. Orthop. 196: 51-60, 1985.
- MENDES, D.G.; ANGEL, D.; GRISHKAN, A. & BOSS, J. - Histological response to carbon fibre. J Bone Jt Surg, 67-B: 645-649, 1985.

- MICHELI, S.; PIZZOFERRATO, A. & LEAKE, D. - Histologic evaluation of carbon-coated superiosteal dental implants in dogs. Oral Surg. 57 (1): 2-6, 1984 .
- MINNS, R.J.; MUCKLE, D.S. & DONKIN, E.J. - The repair of osteochondral defects in osteoarthritic rabbit kness by the use of carbon fibre. Biomaterials., 3: 81-86, 1982.
- NEUGEBAUER, R. ; HEIBING, G. & WOLTER, D. - The body reation to carbon fibre particles implanted into the medullary space of rabbits. Biomaterials, 2: 182-184, 1981.
- PAL, S. & SAHA, S. - Stress relaxation and creep behaviour of normal and carbon fibre reinforced acrylic bone cement. Biomaterials, 3: 93-96, 1982.
- PARSONS, J.R.; BHAYANI, S.; ALEXANDER, H. & WEISS, A.B. - Carbon fiber debris within the synovial joint. A time-dependent mechanical and histologic stydy. Clin Orthop. 196: 69-76, 1985.
- PAZZAGLIA, U.E.; DELL'ORBO, C. & WILKINSON, M.J. - The foreign body reaction in total hip arthro-plasties. Arch. Orthop. Traum Surg., 106: 209-219, 1987.
- PENMAN, H.G. & RING, B.A. - Osteossarcoma in association with total hip replacement. J Bone Jt Surg., 66-B: 632-634, 1984.
- PILLIAR, D.M. & BLACKWELL, R. - Carbon fiber-reinforced bone cement in orthopedic surgery. J Biomed Mater Res., 10: 893-906, 1976.

- PIZZOFERRATO, A. ; VESPUCCI, A.; C.CIAPETTI, G.; & STEA, S. - Biocompatibility testing of prosthetic implant materials by cell cultures. Biomaterials, 6: 346-351, 1985.
- POHLER, O. & STRAUMANN, F. - Características de los implantes de acero inoxidable A0. Waldenburg, Asociación Suiza para el Estudio de Osteosíntesis, 1975.
- PO-IN, C. - Polymer implant materials with improved X-ray opacity and biocompatibility. Biomaterials, 2: 151-155, 1981.
- RAE, T. - The biological response to titanium and titanium-aluminium-vanadium alloy particles. Biomaterials, 7: 37-40, 1986.
- RAE, T. - Comparative Laboratory Studies on the production of soluble and particulate metal by total joint Prostheses. Arch Orthop. Traumat. Surg., 95: 71-79, 1979.
- RETTIG, H. & WEBBER, U. - Experimental and clinical experience with carbon hip endoprostheses. In: The Cementless Fixation on Hip Endoprostheses, Berlin-Hidelberg, Springer-Verlag, 1984 pp. 247-248.
- RUSHTON, N.; DANDY, D.J. & NAYLOR, C.P.E. - The clinical arthroscopic, and histological findings after replacement of the anterior cruciate ligament with carbon fiber. J Bone Joint Surg, 65-B: 308-309, 1983.
- RYAN, G.B. & SPECTOR, W.G. - Natural selection of long lived macrophages in experimental granulomata. J Pathol 99: 139-151, 1969.

- SALTHOUSE, T.N. & WILLIGAN, D.A. - An enzyme histochemical approach to the evaluation of polymers for tissue compatibility. J. Biomed Mater. Res., 6: 105-113, 1972.
- SCLIPPA, E. & PIEKARSKI, K. - Carbon fiber reinforced polyethylene for possible orthopedic uses. J. Biomed Mater. Res., 7: 59-70, 1973.
- STANITSKI, C.L. & MOONEY, V. - Osseous attachment to vitreous carbons. J. Biomed Mater. Res. SYMPOSIUM, 4: 97-108, 1973.
- STUART, D. District focus: changing fashions in the management of fractures. East African Medical Journal, 63 (11): 762-767, 1986.
- SWAAN, H. - Malignant soft tissue tumor at the site of a total hip replacement. J. Bone Jt. Surg., 66-B: 629-631, 1984.
- TARVAINEN, T.; FATIALA, H.; TUNTURI, T.; PAROMEN, I.; LAUSLAHTI, K. & ROKKANEN, P. - Bone growth into glassy carbon implants A rabbit experiment. Acta Orthop Scand., 56: 63-66, 1985.
- TAYTON, K.; JOHNSON-NURSE, C.; McKIBBIN, B.; BRADLEY, J. & HASTINGS, G. - The use of semi-rigid carbon-fibre-reinforced plastic plates for fixation of human fractures. Results of preliminary trials. J. Bone Jt. Surg., 64-B (1): 105-111, 1982.
- TAYTON, K.; PHILLIPS, G.; & RÁLIS, Z. - Long-term effects of carbon fibre on soft tissues. J. Bone Jt. Surg., 64-B

(1): 112-114, 1982.

- TURNER, J.E.; LAWRENCE, W.H.; & AUTIAN, J. - Subacute toxicity testing of biomaterials using histopathologic evaluation of rabbit muscle tissue. J. Biomed. Mater. Res., 7: 39-58, 1973.
- UHTHOFF, H.K.; BARDOS, D.I. & LISKOVA-KIAR, M. -The advantages of titanium alloy over stainless steel plates for the internal fixation of fractures. J. Bone Jt. Surg., 63-B: 427-434, 1981.
- ULREICH, J.B. & CHVAPIL, M. - A quantitative microassay for "in-vitro" toxicity testing of biomaterials. J. Biomed. Mater. Res., 15: 913-922, 1981.
- VAN VLACK, L.H. - Características exigidas nos materiais usados em engenharia. In: Princípios de Ciência dos Materiais, 6a.Ed., São Paulo, Edgard Blücher, 1970 pp. 1-17
- VETH, R.P.H.; DEN HEETEN, G.J.; JANSEN, H.W.B. & NIELSEN, H.K. An experimental study of reconstructive procedures in lesions of the meniscus. Use of. synovial flaps and carbon fiber implants for artificially made lesions in the meniscus of the rabbits. Clin. Orthop., 181: 250-254, 1983.
- WAGNER, C.N.J.; SHABAIK, A.N. ; SCHURMAN, D.J. & AMSTUTZ, H.C. Preparation and characterization of wear debris of orthopedic materials for biocompatibility studies. J. Biomed. Mater. Res., 10: 653-670, 1976.
- WALKER, P.S. & BULLOUGH, P.G. - The effects of friction and wear in artificial joints. Orthop. Clin. North Am., 4( 2):



275-293, 1973.

- WILLERT, H.G. - Chairman of "Proposed guideline for the biological testing of orthopaedic Implant Materials and implants". Biomaterials , 1: 179-182, 1980.
- WILLERT, H.G. & SEMLITSCH, M. - Reactions of the articular capsule to artificial joint prostheses . In: Biocompatibility of implant materials. London Sector Publishing Limited, 1976. p. 40-48.
- ZIEROLD, A.A. - Reaction of bone to various metals. Arch Surg 9: 365-412, 1924.