

BIANCA CALLEGARI

**ANÁLISE DA INTERFACE FORMADA ENTRE O
POLI(FLUORETO DE VINILIDENO), PIEZELÉTRICO
E
NÃO PIEZELÉTRICO E O TECIDO MUSCULAR E
ÓSSEO DE RATOS**

CAMPINAS

2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C132a Callegari, Bianca
Análise da interface formada entre o poli (fluoreto de vinilideno), piezelétrico e não piezelétrico e o tecido muscular e ósseo de ratos / Bianca Callegari. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : William Dias Belangero
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Piezoeletricidade. 2. Ossos. 3. Materiais Biocompatíveis.
I. Willian Dias Belangero. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

SLP

BIANCA CALLEGARI

**ANÁLISE DA INTERFACE FORMADA ENTRE O
POLI(FLUORETO DE VINILIDENO), PIEZELÉTRICO
E
NÃO PIEZELÉTRICO E O TECIDO MUSCULAR E
ÓSSEO DE RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia, área de Pesquisa Experimental.

Orientador: Professor Doutor William Dias Belangero

CAMPINAS

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Bianca Callegari

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

William Dias Belangero

Membros:

1. Prof. Dr. William Dias Belangero (Presidente)

2. Profa. Dra. Sônia Maria Malmonge (Titular)

3 - Prof. Dr. Élcio Landim (Titular)

4 - Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada (Suplente)

5 - Prof. Dr. Alberto Cliquet Jr. (Suplente)

Curso de pós-graduação em Cirurgia, área de Pesquisa Experimental, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 14 / 05 / 2004

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. William Dias Belangero, que me orientou durante o presente trabalho e me ajudou a crescer profissionalmente;

Ao Prof Celso Xavier do Laboratório de Química, Física e Biologia da UNESP, não apenas pelos ensinamentos técnicos, mas também por sua sua afetividade e a maneira como se preocupa com o trabalho;

Ao Prof. Ms. José Carlos S. Camargo Filho, por ter sido sempre um exemplo a seguir e a principal inspiração para ter chegado onde cheguei;

À Profa. Dra. Íris Torriani e ao Técnico Carlos Leite do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da UNICAMP, aos quais dedico respeito e admiração e agradeço pelos novos conhecimentos que tive a oportunidade de experimentar;

Ao Prof João **Sinézio** C. Campos do Instituto de Engenharia Química da UNICAMP, pelo auxílio com os conceitos de física;

Ao Laboratório Nacional de Luz – Sincrotron, pela permissão de uso do microscópio eletrônico de varredura;

Ao Laboratório de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UNICAMP, pela realização das lâminas de cortes histológicos sem descalcificação.

SUMÁRIO

	<i>PÁG</i>
RESUMO	xiv
.....	
ABSTRACT	xvi
.....	
1- INTRODUÇÃO	18
.....	
2- OBJETIVOS	31
.....	
2.1- Geral.....	32
2.2- Específicos.....	32
3-MATERIAL MÉTODOS	E 33
4- RESULTADOS	43
.....	
4.1- Caracterização dos tubos.....	44
4.1.1- Análise termogravimétrica (TGA).....	44
4.1.2- Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	45
4.2- Análise macroscópica.....	46

4.3-Análise por microscopia óptica convencional.....	48
4.3.1-Tecido muscular.....	48
4.3.2-Tecido ósseo.....	53
4.4-Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	58
4.4.1-Tubos de PVDF pré implantação.....	58
4.4.2-Tubos de PVDF pós implantação no músculo	58
4.4.3-Tubos de PVDF pós implantação no OSO.....	60
4.5-Microscopia eletrônica de varredura (MEV) por feixe retroespalhado.....	62
5-	63
DISCUSSÃO	
.....	
6-	70
CONCLUSÕES	
.....	
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ampère
Å	Angstron
C	Carbono
Ca	Cálcio
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
F	Flúor
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FCT	Faculdade de Ciências e Tecnologia
HA	Cerâmica
HABT	hidroxiapatita e <i>barium titanium</i>
HE	Hematoxilina Eosinia
Hz	Hertz
IGF-I	Fator do Crescimento Insulínico do Tipo I
Kg	Quilograma
mg	miligrama
mm	milímetro
NMCE	Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
°C	Graus Celsius
P	Fósforo
PMMA	Polimetilmetacrilato
PEUAN	Polietileno de ultra alto peso molecular
PVDF	Polifluoreto de vinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
T _c	Temperatura de cristalização
T _g	Temperatura de ransição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
T _m	Temperatura de fusão

TM	Tricrômico de Masson
T _p	Temperatura máxima de cristalização
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
μ	Micra

LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Diagrama esquemático da estrutura esferulítica mostrando o crescimento radial das lamelas cristalinas e a localização dos componentes não cristalinos	26
Figura 2- Possíveis conformações estáveis para as ligações carbono-carbono e em (b) as conformações estáveis da cadeia de PVDF.....	27
Figura 3- Diagrama das interconversões entre as fases do PVDF	28
Figura 4- Cabo axial, composto de um fio central de cobre revestido pelo tubo de [P(VDF-TrFE)] piezelétrico coberto com uma camada de carbono, outra malha de cobre e revestido externamente com polyolefin.....	35
Figura 5- Exposição dos cêndilos.....	39
Figura 6- Colocação do implante no músculo.....	40
Figura 7- Fotos do preenchimento das cavidades no sacrifício (tubos piezoelétricos e não piezoelétricos).....	47

Figura 8- Cortes histológicos transversais do tecido muscular após retirada dos tubos de PVDF piezelétricos e não piezelétricos, corados com hematoxilina eosina e tricrômico de Masson, após 7 dias de seguimento 49

Figura 9-	Cortes histológicos transversais do tecido muscular após retirada dos tubos de PVDF piezelétricos e não piezelétricos, corados com hematoxilina eosina e tricrômico de Masson, após 3 semanas de seguimento.....	50
Figura 10-	Cortes histológicos transversais do tecido muscular após retirada dos tubos de PVDF piezelétricos e não piezelétricos, corados com hematoxilina eosina e tricrômico de Masson, após 6 semanas de seguimento de seguimento.....	51
Figura 11-	Cortes histológicos transversais do tecido muscular após retirada dos tubos de PVDF piezelétricos e não piezelétricos, corados com hematoxilina eosina e tricrômico de Masson, após 12 semanas de seguimento.....	52
Figura 12-	Cortes histológicos transversais do tecido ósseo após retirada dos tubos de PVDF piezelétricos e não piezelétricos, corados com hematoxilina eosina e tricrômico de Masson, após 7 dias de seguimento	54
Figura 13-	Cortes histológicos transversais do tecido ósseo após retirada dos tubos de PVDF piezelétricos e não piezelétricos, corados com hematoxilina eosina e tricrômico de Masson, após 3 semanas de seguimento.....	55
Figura 14-	Cortes histológicos transversais do tecido ósseo após retirada dos tubos de PVDF piezelétricos e não piezelétricos, corados com hematoxilina eosina e	

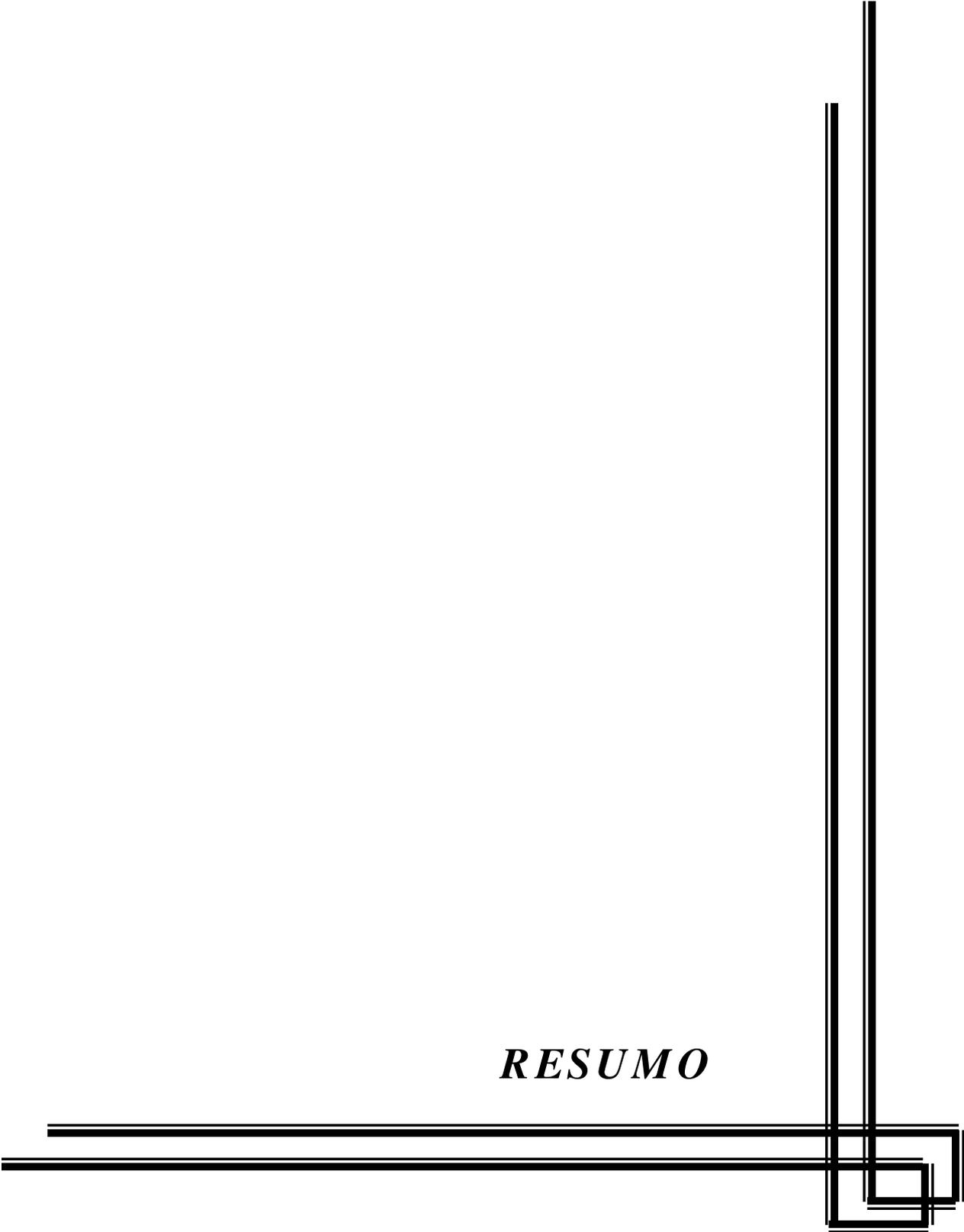
tricroômico de Masson, após 6 semanas de seguimento.....	56
---	----

Figura 15-	Cortes histológicos transversais do tecido ósseo após retirada dos tubos de PVDF piezelétricos e não piezelétricos, corados com hematoxilina eosina e tricrômico de Masson, após 12 semanas de seguimento.....	57
Figura 16-	Imagens da microscopia eletrônica de varredura da superfície dos tubos antes da implantação	58
Figura 17-	Imagens da microscopia eletrônica de varredura da superfície dos tubos de PVDF piezelétricos retirados do tecido muscular, após 6 e 12 semanas	59
Figura 18-	Imagens da microscopia eletrônica de varredura da superfície dos tubos de PVDF não piezelétricos retirados do tecido muscular, após 6 e 12 semanas de seguimento.....	59
Figura 19-	Imagens da MEV da superfície dos tubos de PVDF piezoelétricos retirados do tecido ósseo, após 6 e 12 semanas de seguimento.....	61
Figura 20-	Imagens da microscopia eletrônica de varredura da superfície dos tubos de PVDF não piezoelétricos retirados do tecido ósseo.....	61
Figura 21-	Microscopia eletrônica de varredura por feixe retro espalhado (backscattered) do cortes de tecido ósseo embutidos em resina acrílica, após 6 e 12 semanas de seguimento.....	62

LISTA DE GRÁFICOS

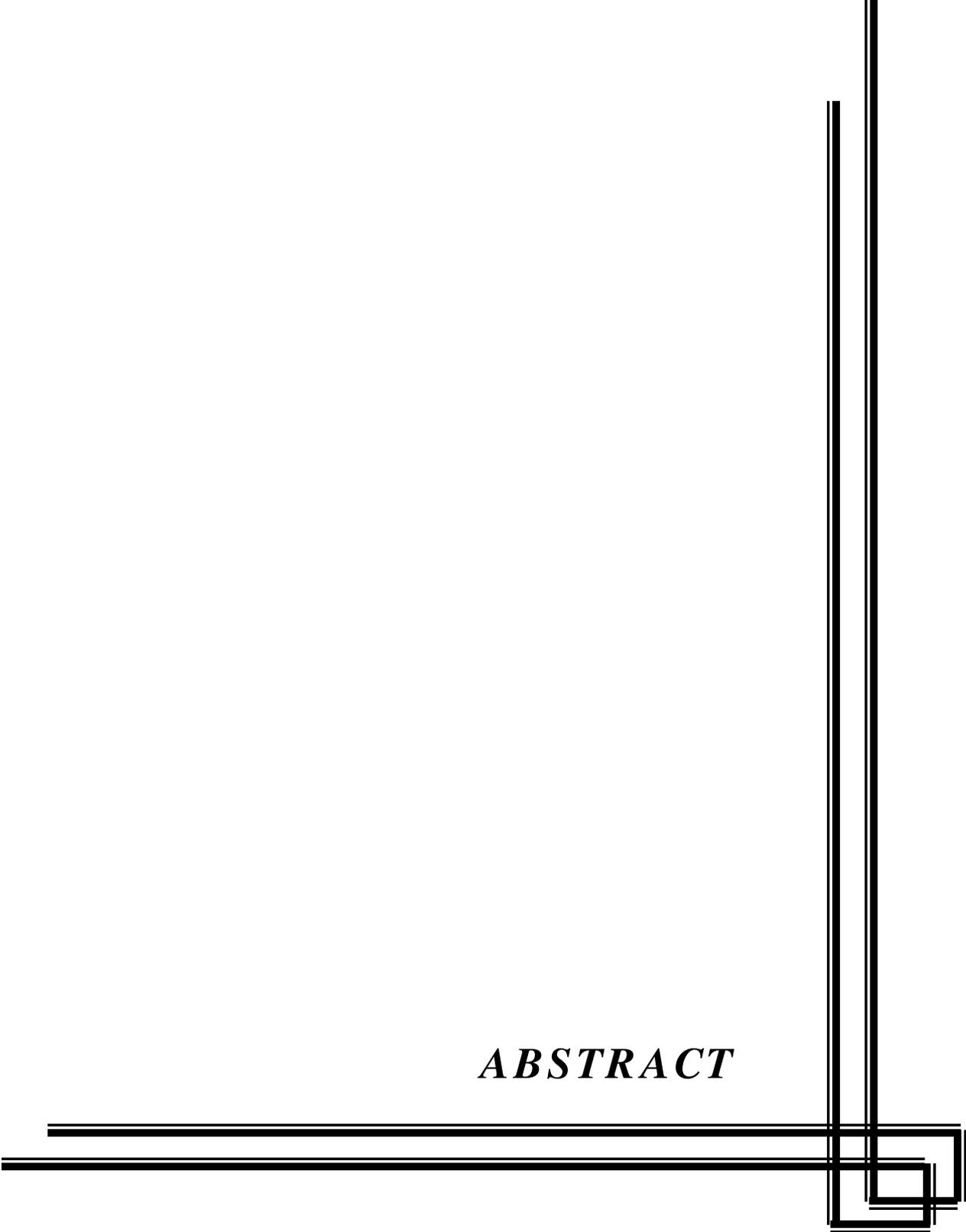
	<i>PÁG.</i>
Gráfico 1- Medida termogravimétrica realizada nos tubos de P(VDF-TrFE) piezelétricos e não piezelétricos.....	44
Gráfico 2- Medida de calorimetria diferencial de varredura realizada tubos de P(VDF-TrFE) piezelétricos e não piezelétricos.....	45

RESUMO



O objetivo deste estudo foi analisar a interface formada entre o poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF - piezelétrico e não piezelétrico) e o tecido muscular e ósseo do rato. Foram utilizados 40 tubos de PVDF [P(VDF-TrFE)] piezelétricos com coeficiente de piezeletricidade de $d_{3h} = 2,5$ pC/N e capacitância 800 pF/m e 40 tubos de PVDF não piezelétricos. Em vinte animais foram implantados 40 tubos de PVDF piezelétricos e nos outros vinte, 40 tubos de PVDF não piezelétricos, seguidos por 7 dias, 3, 6 e 12 semanas. Os tubos foram implantados na região intercondiliana do fêmur da pata posterior esquerda e no corpo do músculo tríceps sural da pata posterior direita. A interface formada pelos tubos com o tecido muscular (n=40) e ósseo (n=32) foi estudada por microscopia óptica convencional e os tubos retirados por microscopia eletrônica de varredura (n= 72). A MEV por retroespalhado foi realizada para o estudo da interface entre o tubo e o tecido ósseo não descalcificado (n = 8). Ao redor dos tubos implantados no tecido muscular houve formação de cápsula com ausência de macrófagos e células gigantes. A retirada dos tubos piezelétricos, tanto do tecido muscular quanto do tecido ósseo, foi sempre mais difícil do que a dos tubos não piezelétricos, devido à aderência dos primeiros no leito receptor. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou maior aderência e crescimento de tecido conjuntivo sobre os tubos de PVDF piezelétricos. Ao redor e no interior dos tubos de PVDF piezelétricos implantados no tecido ósseo pode se observar, após 12 semanas, crescimento evidente de tecido ósseo, principalmente no interior do tubo. A microscopia eletrônica por retroespalhamento também demonstrou a presença de tecido ósseo somente no interior dos tubos piezelétricos, após 12 semanas. Os resultados indicam que a piezeletricidade teve papel importante na neoformação, tanto do tecido ósseo quanto do tecido conjuntivo denso. Provavelmente, essa neoformação foi decorrente de microdeformações produzidas nos tubos piezelétricos, oriundas da contração do músculo tríceps sural e da pressão intraarticular gerada pelo movimento articular e pela marcha.

ABSTRACT



The objective of this study was to evaluate the interface formed between the poly(vinylidene) fluoride (PVDF – piezoelectric and non piezoelectric) and bone rats tissue. Were used 40 PVDF [P(VDF-TrFE)] piezoelectric tubes and 40 PVDF [P(VDF-TrFE)] non piezoelectric tubes. In 20 animals were implanted 40 piezoelectric PVDF tubes and in the other 20 animals, 40 non piezoelectric PVDF tubes, followed for 7 days, 3, 6, and 12 weeks. The tubes were implanted in the femoral interncondilian region in the left foot and in the triceps muscle in the right foot. The interface formed by the tubes and the muscular tissue (n=40) and bone (n=32) was achieved by conventional optic microscopy and the removed tubes by scanning electron microscopy (n= 72). The SEM backscattered was used to access the interface between the tube and the bone tissue without decalcifying (n=8). Around the muscular implanted tubes, there was a capsule formation without macrofage and giant cells. The piezoelectric tubes removal, even from the muscular or bonetissue, was always more difficult than the non piezoelectric tubes removal. It occurred because there was greater tissue adhesion. The SEM showed greater adhesion and connective tissue growth around the piezoelectric tubes. Around and inside the piezoelectric tubes in the bone tissue, after 12 weeks, we could observe evident bone growth inside the tube. The SEM backscattered showed the boné tissue presence only inside the piezoelectric tubes, after 12 weeks. The results indicate that the piezoelectric effect had an important role in the new formation, even for bone or connective tissue. Probably, this new formation was due to small deformations in the piezoelectric tubes, provided from the triceps contraction and from the articular movement during the march.

*1 -
INTRODUÇÃO*

As pesquisas na área da ortopedia e traumatologia têm como um dos focos o aprimoramento das técnicas cirúrgicas e dos implantes para se obter consolidação óssea mais eficiente e rápida, com um mínimo de complicações possíveis.

O aprimoramento dos implantes está ligado aos avanços tecnológicos e ao desenvolvimento de novos materiais. Apesar de existirem diversos materiais disponíveis para esse fim, a busca ainda se faz necessária com a finalidade de se obter materiais que incitem poucas reações inflamatórias, que suportem os esforços mecânicos sem sofrer fadiga, que possam ser esterilizados pelos meios rotineiros, que possam ser moldáveis à superfície do osso e que, se possível, estimulem a osteogênese.

Segundo BLACK (1971) não há material inerte, ou seja, todo implante colocado no organismo vivo sofre corrosão ou dissolução, interagindo de variadas formas com os tecidos ao seu redor. Por outro lado, sabe-se que todo material estranho ao organismo vivo incita reação inflamatória, cujo tipo e intensidade dependem de vários fatores, dentre eles a composição química e física do material, o seu tamanho, a sua forma e as suas características de acabamento superficial, assim como a sua função (SALTHOUSE e MATAGLA, 1983; POHLER, 1983; SMITH, 1983).

De acordo com a National Institutes Of Health Biomaterials Consensus Conference (1982) "biomaterial é qualquer substância que não droga, ou combinação de substâncias de natureza sintética ou natural que pode ser usada por qualquer período de tempo, como um todo ou parte do sistema que trata, aumenta ou substitui, qualquer tecido, órgão ou função do corpo" (MALMONGE, 1997, p. 3). Posteriormente, assumiu-se como nova definição de biomaterial "todo material não vivo, usado em um dispositivo médico (ou biomédico), objetivando a interação com o sistema biológico (WILLIAMS, 1987).

Os implantes utilizados em ortopedia e traumatologia são fabricados a partir dos seguintes materiais: metais e ligas metálicas, polímeros e seus

compósitos, materiais cerâmicos e carbônicos, e materiais biológicos. Dentre esses materiais, as ligas metálicas e os polímeros são os mais utilizados e dentre os polímeros destacam-se o polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM), o polimetilmetacrilato (PMMA) e os derivados do silicone (GALANTE et al., 1991).

A função dos implantes é substituir articulações, segmentos ósseos ou fixar fraturas, até que o processo normal de reparação óssea ocorra. O processo de reparação produz a união dos fragmentos ósseos fraturados, pela formação de um tecido com características biológicas e mecânicas semelhantes ao osso, denominado de calo ósseo (HAM, 1963).

O processo de remodelação óssea associada a implantes pode ser extremamente complexo. Variáveis relacionadas com a forma, material, método de fixação, local do osso fixado, idade do paciente, sexo, balanço hormonal e atividade física podem afetar esse processo de remodelação. Uma das áreas de pesquisa mais interessantes envolvendo o aparelho locomotor são aquelas que estudam os mecanismos que controlam a função, a organização e a composição da matriz celular e das células ósseas. A função das células ósseas é regulada tanto a nível sistêmico como a nível local. O genoma e os hormônios representam a regulação sistêmica, enquanto que os exercícios e a liberação de produtos de degradação de implantes e mediadores inflamatórios exercem efeito local (BUCKWALTER et al., 1995-b).

A capacidade do osso de se adaptar às solicitações do meio externo vem sendo estudada desde o século XVII e a partir do século XIX vários autores escreveram com detalhes a relação entre a forma e a função do osso, destacando-se entre eles o estudo de Julius Wolff, que não só realizou observações críticas da relação entre a estrutura óssea e a carga, mas também como essas alterações ocorrem no tecido ósseo vivo, seguindo leis matemáticas (WOLFF, 1986).

Paralelamente, outros estudos se dedicaram a avaliar os efeitos da corrente elétrica e do campo eletromagnético sobre o tecido ósseo (BRIGHTON et al., 1975; BRIGHTON et al., 1981; BASSET et al., 1981; BRIGHTON et al, 2001) e os

efeitos da piezeletricidade no tecido ósseo. (MARINO et al. 1971; GJELSVIK 1973-a, GJELSVIK-b; WILLIAMS & BREGER, 1975; FICAT et al. 1988; ASCHERO et al. 1999; FICAT et al., 1974)

O fenômeno da piezeletricidade foi observado pela primeira vez em 1880 pelos irmãos Pierre e Jacques Curie. Esses autores descobriram que quando um cristal de quartzo era mecanicamente deformado em compressão, seguindo a direção do seu eixo óptico, uma carga elétrica surgia entre as duas superfícies comprimidas, sendo que um lado se tornava eletricamente negativo em relação ao outro. Retirando-se a deformação a diferença de carga desaparecia e esse processo podia ser feito indefinidamente. Por outro lado, quando o cristal era submetido a uma diferença de potencial este sofria expansão e contração, em função desse gradiente (FROST, 1973).

A piezeletricidade é uma propriedade universal dos tecidos vivos e pode fazer parte de muitos fenômenos fisiológicos, como a remodelação óssea, a formação de trombos nas lesões de vasos sanguíneos, transmissão auditiva e nas respostas do tato. Por outro lado a piezeletricidade está presente em inúmeros materiais de origem biológica, como a madeira, ossos, cartilagens, tendões e até nos ácidos nucléicos (DNA, RNA). A capacidade desses materiais gerarem sinais elétricos, quando submetidos a deformação, vem sendo demonstrada por diversos autores (FUKADA e YASUDA, 1957; BASSETT e BECKER, 1962; SHAMOS e LAVINE, 1967; KÖBERLE, 1974; YASUDA, 1977; FUENTES, 1978).

FUKADA (1955) estudou o efeito piezelétrico da madeira e o atribuiu às propriedades cristalinas da celulose, que é altamente orientada na direção do eixo da fibra. A piezeletricidade é mensurada. O coeficiente piezelétrico é dado como $d_{j,i}$, onde j tem valores de 1 a 6, correspondendo aos seis tipos de deformações possíveis em um cubo e i tem valores 1, 2 ou 3, de acordo com os três planos cartesianos (XYZ) (FUKADA, 1955). Posteriormente, FUKADA e YASUDA (1957) observaram o efeito piezelétrico no osso retirado de fêmur humano e de boi (ambos desidratados). A magnitude da constante piezelétrica dependeu do ângulo em que

foi aplicada a deformação. A resposta máxima foi observada quando a deformação era aplicada a 45° do eixo de direção das fibras de colágeno.

FUKADA e YASUDA (1964) estudaram também o coeficiente piezelétrico no tendão calcâneo do cavalo e do boi, já que esses materiais são formados por grande quantidade de moléculas de colágeno, muito cristalizadas e bem orientadas. Os coeficientes encontrados foram maiores que aqueles observados no tecido ósseo, indicando que a origem do efeito piezelétrico deveria estar na porção orgânica do material, fato esse confirmado posteriormente por SHAMOS e LAVINE (1967).

Confirmando essas hipóteses, MARINO et al. (1970 e 1971) mediram o coeficiente piezelétrico do osso humano após desmineralização e após a retirada do colágeno (decolagenização). Os resultados mostraram que os maiores coeficientes piezelétricos foram obtidos quando a deformação era aplicada em um ângulo de 45° em relação à orientação das fibras. A amostra sem colágeno não apresentou coeficiente piezelétrico, ao passo que a amostra sem a porção mineral obteve coeficientes maiores do que o do osso normal. Os autores interpretaram esse achado concluindo que a retirada da porção mineral favoreceria a deformação do corpo de prova, obtendo-se, portanto, maior coeficiente piezelétrico. Além disso, concluíram também que o efeito piezelétrico é oriundo da fase orgânica e que a fase mineral sozinha não contribui para a piezeletricidade.

Em nosso meio deve-se ressaltar o trabalho de KÖBERLE (1974) que, em sua tese de livre-docência, descreveu o efeito de eletreto no osso, a existência de efeito magnético no osso e finalmente a influência de correntes elétricas (4 μ A) na formação de calo em fraturas da fíbula de coelhos, colocando o cátodo no foco de fratura e o ânodo na musculatura.

YASUDA (1977) induziu a formação de calo ósseo pela passagem de corrente elétrica no osso in vivo, sem estímulo mecânico e denominou-o de calo eletrodinâmico. A quantidade de calo formada foi significativamente maior no cátodo do que no ânodo e a qualidade do mesmo mudou de acordo com o aumento

da corrente elétrica. Correntes de baixa amperagem ($1\mu\text{A}$) produziam tecido ósseo, enquanto que correntes maiores do que 10 amperes (A) produziram tecido cartilaginoso ou fibroso e correntes superiores a $1.000\mu\text{A}$ produziram necrose óssea. Paralelamente YASUDA (1977) estudou a formação de calo por eletretos e, para tanto, baseou sua pesquisa no trabalho anterior de MASCARENHAS (1975)¹ que havia conseguido demonstrar que o osso seco poderia ser transformado em um eletreto e, portanto, poderia acumular carga e ser polarizado.

YASUDA (1977) estudou, então, o efeito do Teflon, carregado e não carregado eletricamente, colocado sobre a superfície do fêmur de coelho ou enrolado ao redor do fêmur desse mesmo animal. O autor observou que sob o Teflon não polarizado não ocorreu crescimento ósseo, enquanto que ao redor do Teflon polarizado houve maior formação de calo, especialmente nos animais em que esse foi enrolado ao redor do fêmur. As observações de que tanto o tipo quanto a direção do crescimento do calo podem ser controladas pela corrente elétrica e de que um eletreto pode formar calo, sugeriam que os fenômenos de crescimento ósseo seriam dirigidos por parâmetros elétricos.

FUENTES (1978) relatou em sua tese de doutoramento resultados animadores no tratamento de pseudoartrose experimental produzida no rádio de cães adultos, utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente por KÖBERLE (1974).

MARINO e GROSS (1989) comprovaram a existência e mediram o coeficiente de piezeletricidade do cimento e da dentina, comparando com o do osso ($d_{3,1} = 0.22\text{pC/N}$). Não foi obtido coeficiente piezelétrico nas amostras sem os componentes orgânicos e ficou demonstrado que o coeficiente piezelétrico da dentina é menor do que o do osso, provavelmente por diferenças no arranjo e na microestrutura do colágeno.

¹ MASCARENHAS, S. The electrical effect in bone and biopolymer and the bound-water problem. Ann. N. Y. Acad. Sci. 238: 36, 1974. (Apud FUENTES, 1978)

Apesar do tecido ósseo ser formado principalmente por material inorgânico (cristais de hidroxiapatita), há a porção orgânica formada basicamente por moléculas de colágeno do tipo I, pela substância fundamental e por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos). A manutenção da estrutura do tecido ósseo é feita pelos elementos celulares, que são em última análise os responsáveis pelo processo de remodelação óssea, promovendo deposição e reabsorção, de acordo com as necessidades locais e de acordo com as solicitações mecânicas existentes. A sensibilização desses elementos celulares, pela carga ou pela deformação mecânica do osso, ainda é motivo de estudo e investigação. Uma das explicações envolve o efeito piezolétrico, que transformaria as solicitações mecânicas em estímulos elétricos e estes, por sua vez, seriam responsáveis pela estimulação das células (do tipo osteoblasto ou o osteoclasto).

Outra linha de investigação coloca o osteócito, célula que está envolvida pela matriz óssea, como o elemento essencial nesse processo de transdução mecânica. Entende-se por transdução mecânica a conversão de um estímulo físico (deformação) ou biofísico em uma resposta celular. Esse mecanismo é essencial em uma grande variedade de funções fisiológicas que permitem os organismos vivos a responderem à solicitações mecânicas e à gravidade. DUNKAN e TURNER (1995) acreditam que essa transdução mecânica no osso deva incluir quatro fases distintas: 1) acoplamento mecânico, 2) acoplamento bioquímico, 3) transmissão do sinal, 4) resposta da célula efetora (osteócito).

O osteócito se origina do osteoblasto e por meio de longos e delgados prolongamentos celulares que correm pelos canalículos, mantém contato com osteócitos vizinhos e com os osteoblastos na superfície das trabéculas (TURNER e FORWOOD, 1995).

É bem conhecido o fato de que a solicitação mecânica em níveis fisiológicos causa aumento da massa óssea, enquanto que a sua falta causa perda óssea. Ao nível celular tem sido demonstrado que a atividade metabólica do osteócito pode ser alterada com a deformação óssea, sugerindo que essa célula seja o efector final do estímulo mecânico, que é transformado em estímulo biológico. É

sugerido que as deformações produzidas no osso durante a atividade física criem diferentes gradientes de pressão hidrostática no interior dos canalículos que, por sua vez, promovam mudanças no fluxo de fluidos que atingem o osteócito. Esse fluxo de fluido pode deformar e estimular essa célula a produzir mediadores químicos, tais como a osteocalcina, o Fator do Crescimento Insulínico do Tipo I (IGF-I), entre outros (COWIN, 1999; SIKAVITSAS et al., 2001).

Confirmando essa hipótese, SHERRY et al (1989), realizou estudo in vivo utilizando a ulna do peru e demonstrou que logo após estímulo intermitente de 1 hertz (Hz) por seis minutos havia aumento da glicose-6-fosfato desidrogenase. Seguindo essa linha de investigação, KLEIN-NULEND et al. (1995) e AJUBI et al. (1996) demonstraram que osteócitos isolados do calvário da galinha, quando estimulados por um fluxo de fluido, aumentam a produção de prostaglandinas do tipo E2 e I2. Estas prostaglandinas são essenciais para a formação do tecido ósseo, já que estimulam as células osteoblásticas a aumentarem em número e a produzirem matriz osteóide. Além das prostaglandinas, os osteócitos podem também produzir óxido nítrico, com potente efeito vasodilatador, levando à inibição da atividade osteoclástica e à estimulação da proliferação osteoblástica.

A falta da deformação mecânica reduz o fluxo de fluido no interior dos canalículos e também o fluxo de nutrientes ao osteócito. Essa redução de fluxo diminui tanto o estímulo biológico, como a viabilidade celular, sendo responsável pela apoptose do osteócito. Há indícios de que a redução da viabilidade celular reduziria a liberação de inibidores de osteoclastos e que a apoptose estimularia a presença dessas células, causando redução da massa óssea (DUNCAN e TURNER, 1995; SIKAVITSAS et al., 2001)

Do mesmo modo, sobrecargas repetidas no osso podem causar microfraturas que quando atingem a região mineralizada, aumentam a permeabilidade dos canalículos e diminuem o fluxo de fluido dos mesmos. Essa redução é interpretada pelo osteócito como uma situação de baixa solicitação mecânica, bloqueando uma série de reações conforme já descrito anteriormente.

Além dos osteócitos, os osteoblastos também podem responder diretamente ao estímulo mecânico. Deformação mecânica *in vitro* pode aumentar a produção de prostaglandina, fosfatase alcalina e colágeno do tipo I, além de aumentar a proliferação do próprio osteoblasto (SIKAVTSAS et al, 2001).

Diante desses fatos e comprovações a nível experimental, é razoável pensar-se na utilização de materiais piezelétricos para a produção de implantes como um novo caminho para se estimular o processo de reparação de fraturas.

Seguindo essa linha de pensamento, JIANQING et al. (1997) compararam implantes de cerâmica (HA) e de hidroxiapatita e bário titanium (HABT) piezelétrica. Seus resultados demonstraram crescimento ósseo ao redor dos implantes HABT em uma semana, enquanto que após duas semanas não havia neoformação óssea ao redor dos implantes de HA. Os resultados sugeriram que os potenciais elétricos gerados pela deformação mecânica do implante de HABT haviam promovido osteogênese ao seu redor.

O poli(fluoreto de vinilideno), também conhecido como fluoreto de vinilideno (PVDF), é um polímero semicristalino (50% cristalino, 50% amorfo), cuja unidade básica é o $F_2C=CH_2$, que se repete e dá origem a cadeias macromoleculares com até 2.000 unidades. Por apresentar essa composição química, o PVDF pode ser considerado um material polar. Os átomos de Hidrogênio (H) são carregados positivamente, enquanto que os de flúor (F) são carregados negativamente, em relação aos átomos de carbono (C). O PVDF é considerado material piroelétrico e piezelétrico, podendo assim ser transformado em eletreto e ser polarizado. Tais características propiciaram que esse material fosse utilizado na produção de microfones, alto-falantes, transdutores ultrassônicos e transdutores eletromecânicos (FURUKAWA, 1984; LOVINGER, 1982).

A cristalização do PVDF forma estruturas esferulíticas, que são responsáveis pela disposição de lamelas que crescem radialmente a partir de um centro comum. A espessura de cada lamela é da ordem de 100 Angstrom (Å) (Figura 1) (LOVINGER, 1982).

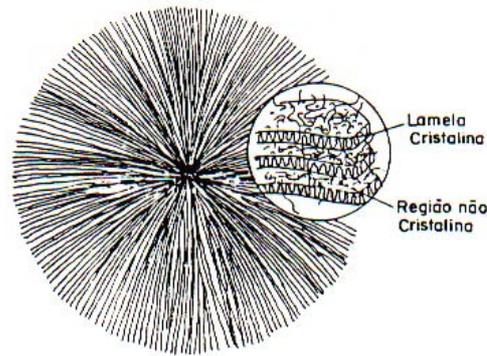


Figura 1-Diagrama esquemático da estrutura esferulítica mostrando o crescimento radial das lamelas cristalinas e a localização dos componentes não cristalinos (Modificado de RIBEIRO, 1994).

A fase amorfa é responsável pelas propriedades mecânicas desejáveis que o material possui, como a elasticidade e a flexibilidade. Conforme foi descrito acima, a cadeia molecular do PVDF pode tomar conformações distintas, dependendo do processo de preparação da amostra. A conformação local numa cadeia é definida por arranjos espaciais no posicionamento entre ligações carbono-carbono sucessivas, podendo ser de conformação planar Zig-Zag (TT), não planares TGTG' e T3GT3G' (FARIA, 1989), como na figura 2.

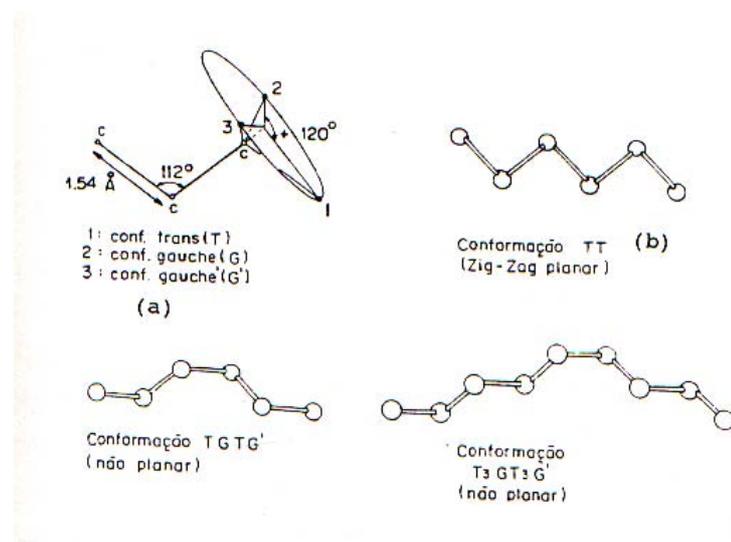


Figura 2-(a) Possíveis conformações estáveis para as ligações carbono-carbono e em (b) as conformações estáveis da cadeia de PVDF (Modificado de SILVA, 1992).

Essas diferentes conformações vão ser responsáveis pelas diferentes formas cristalinas conhecidas : α (alfa não polar), β (polar), γ (polar), e δ (alfa polar). A forma mais comum é a α , porém esta não é polar, ou seja não apresenta piezeletricidade (RIBEIRO, 1994). A fase β , que apresenta as melhores propriedades piezelétricas, é mais comumente obtida a partir da fase α , por estiramento mecânico. Porém, todas as fases podem ser convertidas umas nas outras, como mostra a figura 3.

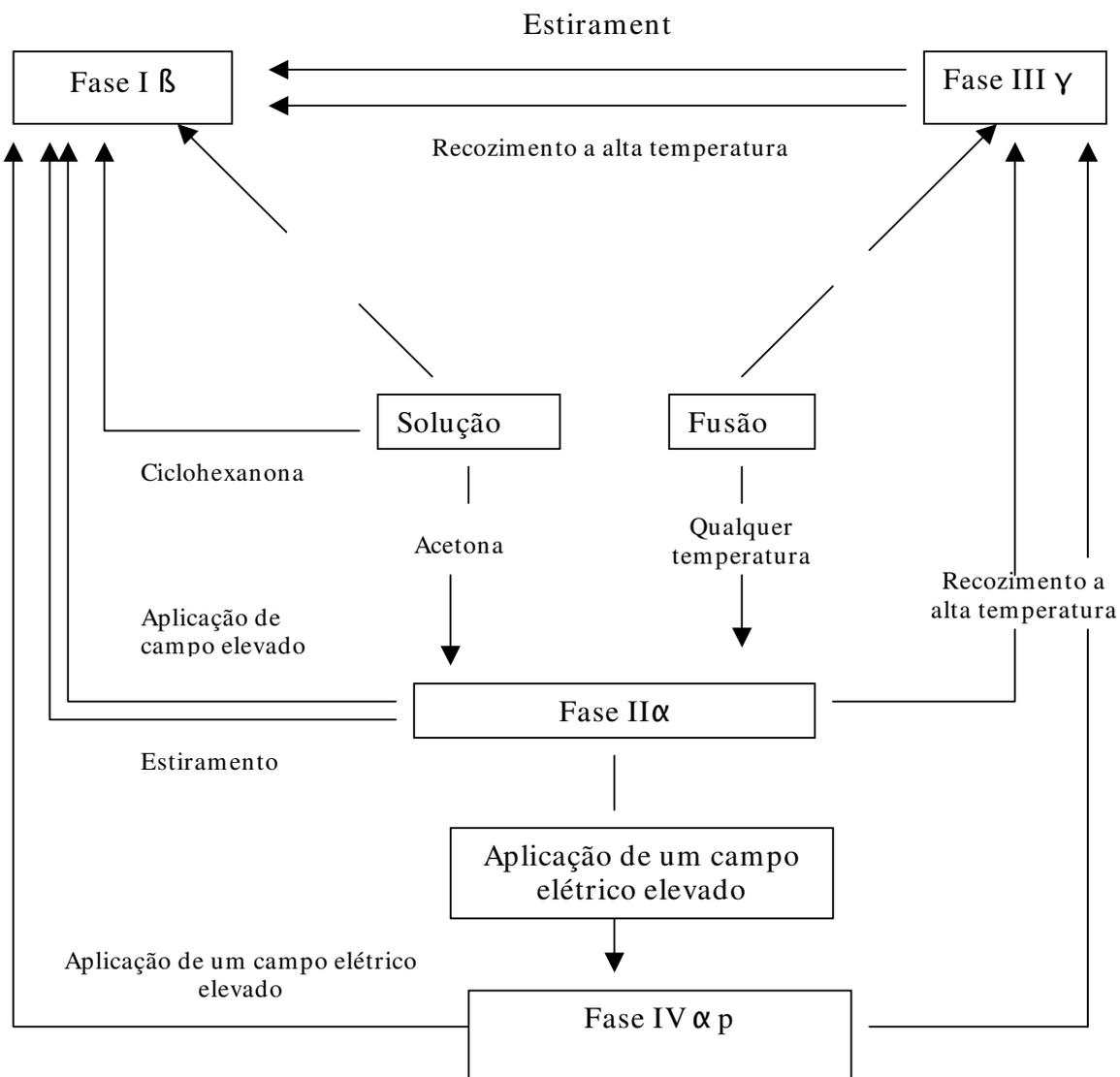


Figura 3-Diagrama das interconversões entre as fases do PVDF (Modificado de RIBEIRO, 1994).

Para tornar o PVDF piezelétrico, deve-se primeiramente transformar a fase α em β através do estiramento a uma certa temperatura (SILVA, 1992). Na fase β os dipolos estão dispostos aleatoriamente e para que sejam orientados deve-

se aplicar um campo elétrico. A piezeletricidade do PVDF está relacionada à intensidade do campo elétrico aplicado, tempo de aplicação, temperatura e conteúdo das diferentes fases na amostra (LOVINGER, 1982).

O PVDF na fase β é reconhecidamente um material ferroelétrico. Materiais ferroelétricos são definidos como aqueles que possuem polarização elétrica espontânea a qual pode ser reorientada pela aplicação de campo elétrico. Após esta orientação ele passa a apresentar propriedades piezelétricas (ALVES, 1992).

O PVDF é um polímero que foi inicialmente utilizado como material de sutura na cirurgias vasculares, com vantagens sobre o polipropileno, demonstradas em estudos experimentais. Mesmo após 9 anos de implantação, o PVDF preserva a sua estabilidade mecânica com 92,5% da sua resistência original (LAROCHE et al., 1995-a; MAROIS et al., 1998). Em contraste, as suturas de polipropileno perdem 46% da sua estabilidade por sofrerem oxidação.

LAROCHE et al. (1995-a; 1995-b) referiram-se ao PVDF como uma alternativa muito atrativa ao polipropileno justificando a sua utilização em suturas vasculares, em função de suas propriedades físico-químicas e da boa biocompatibilidade. Além disso salientaram a enorme extensibilidade do PVDF e a resistência ao deslizamento quando submetido a tensão, sendo menos susceptível a rupturas iatrogênicas.

Os resultados da utilização do PVDF na forma de malha implantados na cavidade abdominal do rato mostraram que a reação inflamatória e o crescimento de tecido fibroso foram menores que aqueles observados ao redor das malhas de polipropileno. Além desses aspectos, pôde-se observar também que ao redor das malhas de PVDF o número de macrófagos atingiu um pico em torno de 45 dias após a implantação, evoluindo com redução suave e gradativa até o 90º dia. Essa reação inflamatória moderada teve predomínio de células gigantes do tipo corpo estranho, que representam o processo de maturação do granuloma, indicando um curso crônico da inflamação (KLINGE et al., 2002).

Apesar de já ter sido demonstrado que o PVDF é um material biocompatível e que pode ser produzido na forma piezelétrica, existem poucos estudos que exploram essas características na produção de implantes para cirurgias de reconstrução do aparelho locomotor. Em nosso meio, PASCHOAL (2003) demonstrou que membranas de PVDF polarizadas, quando implantadas entre a cortical lateral do fêmur de coelho e uma placa metálica, estimularam o crescimento ósseo.

Em função dessas considerações teóricas e dos achados de PASCHOAL (2003) é pertinente a elaboração de um estudo que tenha como objetivo demonstrar se o PVDF piezelétrico pode estimular o crescimento celular e o processo de reparação óssea ao seu redor.

2 - OBJETIVOS

2.1-GERAL

Analisar a interface formada entre o poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), piezelétrico e não piezelétrico, e o tecido muscular e ósseo de ratos.

2.2-ESPECÍFICOS

Analisar a qualidade e intensidade da reação inflamatória induzida pelo implante; o tipo de encapsulamento que será imposto ao implante; a quantidade de tecido aderida ao redor dos tubos de PVDF (piezelétrico e não piezelétrico) implantados no músculo triceps sural do rato;

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-MATERIAL

3.1.1-Animal de Experimentação

Foram utilizados 40 *Rattus norvegicus* da variedade *Wistar*, machos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Durante todo tempo de estudo os animais ficaram mantidos no Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP, em gaiolas coletivas, sob condições de temperatura ambiente média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e foram alimentados com ração padrão para cunicultura da marca Guabi, e água de torneira fornecidas *ad libitum*¹.

3.2-TUBOS DE PVDF

Foram utilizados 40 tubos de PVDF [P(VDF-TrFE)] piezelétricos e 40 tubos do mesmo material, não piezelétricos(Figura 4), cedidos pelo Departamento de física, Química e Biologia da Faculdade de Ciência e Tecnologia (FCT) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Amostras com 3 cm de comprimento, diâmetro externo de 1,9 mm e diâmetro interno de 0,8mm foram obtidos de um cabo coaxial e enviados pela empresa produtora[®]. A partir dessas amostras foram obtidos tubos com 5 mm de comprimento, que foram lavados em solução de acetona e em água destilada para serem esterilizados.

¹ Todos os procedimentos foram avaliados e autorizados pelo comitê de ética em experimentação animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob no. 442-3.

[®]Ormal Electronics Limited Unit 2 Hillside Farm, Rhyls Lane, Lockeridge, nr Marlborough Wiltshire, SN8 4ED, UK. Tel: +44 (0)1672 861718 Fax: +44 (0)1672 861716 sales@ormal.co.uk
www.ormal.co.uk

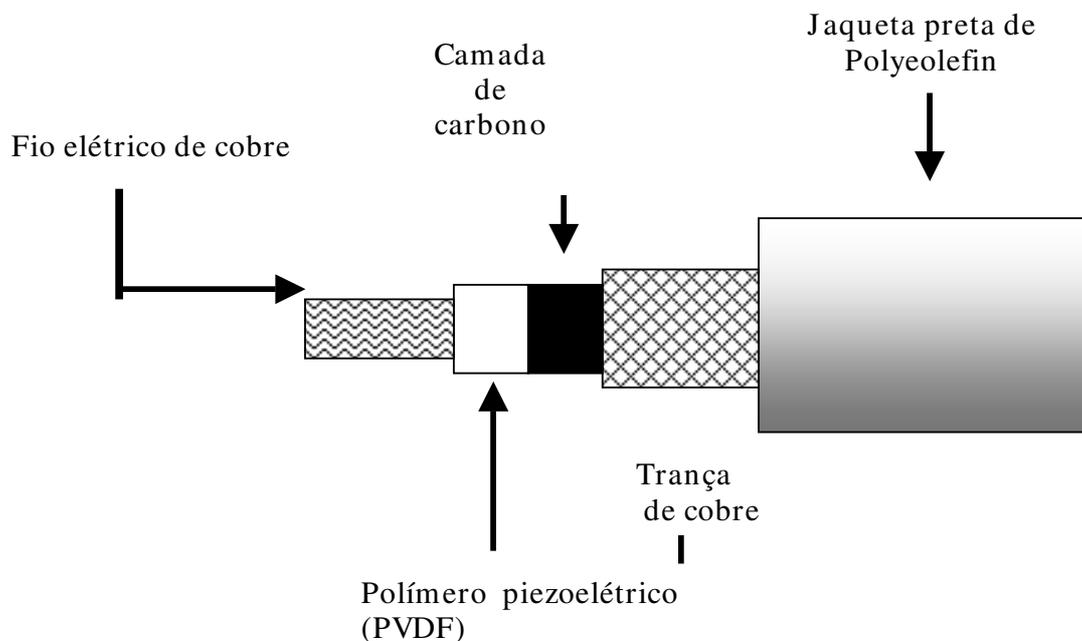


Figura 4-Cabo axial, composto de um fio central de cobre revestido pelo tubo de [P(VDF-TrFE)] piezoelétrico coberto com uma camada de carbono, outra malha de cobre e revestido externamente com polyeolefin

3.2.1-Tubos de PVDF [P(VDF-TrFE)] piezoelétricos

Amostras com 3 cm de comprimento, diâmetro externo de 1,9mm e diâmetro interno de 0,8mm foram obtidos de um cabo coaxial e enviados pela empresa produtora. A partir dessas amostras foram obtidos tubos com coeficiente de piezeletricidade de $d_{3h} = 2,5 \text{ pC/N}$ e capacitância 800 pF/m, com 5 mm de comprimento que foram lavados em solução de acetona e em água destilada para serem esterilizados.

3.2.2-Tubos de PVDF [P(VDF-TrFE)] não piezelétricos

Os tubos piezelétricos recebidos da empresa produtora foram fundidos à temperatura de 150°C e colocados em porta amostras de latão para formação de tubos com 2,0 mm de diâmetro externo e 0,8 mm de diâmetro interno.

3.2.3-Characterização dos tubos de PVDF piezelétricos e não piezelétricos

Todos os implantes foram submetidos a esterilização por óxido de etileno. A caracterização dos tubos piezelétricos e não piezelétricos foi feita pela análise termogravimétrica (TGA) e por Calorimetria diferencial de varredura (DSC), utilizando-se 5 tubos de cada um dos materiais, escolhidos aleatoriamente, antes de serem implantados.

3.2.3.1-Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) é definida como um processo contínuo que envolve a medida da variação de massa de uma amostra, em função da temperatura. O principal uso do TGA nos polímeros envolve o estudo da estabilidade e decomposição térmica dos mesmos. Outras aplicações incluem a determinação da estabilidade térmica e composição de compostos intermediários que possam formar o polímero, composição de resíduos, se presentes, extensão da cura em polímeros de condensação, composição e alguma informação sobre a distribuição das seqüências de monômeros nos copolímeros entre outras aplicações.

A análise termogravimétrica é realizada em equipamento modelo TG 209, Marca Netzsch. A amostra é colocada em um cadinho de alumina. Em seguida

é aquecida a uma taxa de 10° C/minuto, da temperatura ambiente até 1000° C. Na termogravimetria, o parâmetro medido é a massa, isto é, detecta-se utilizando-se uma termo-balança, o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função de uma variação de temperatura. O transdutor ou sensor utilizado na análise termogravimétrica é uma balança registradora.

3.2.3.2-Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura é uma técnica utilizada na caracterização das alterações dos cristais contidos no material, em função da temperatura. As transições de fases são acompanhadas por alterações de entalpia do composto, já que alterações na estrutura do material necessariamente liberam ou absorvem energia, com a quebra e formação de novas ligações, ou simplesmente com rearranjos na estrutura cristalina. No estudo de polímeros semicristalinos o uso da técnica de DSC nos fornece a temperatura de transição vítrea (T_g), a temperatura de cristalização (T_c), onde os primeiros cristais são formados, a temperatura máxima de cristalização (T_p) e finalmente a temperatura de fusão (T_m). Entre as temperaturas T_c e T_p podem ocorrer várias transições de fases cristalinas.

A análise é realizada no equipamento DSC 204 – Netzsch. A amostra é colocada em um recipiente de alumínio, levada ao DSC e aquecida de -100° C à 500° C, com taxa de 10° C/ minuto.

3.2.4-Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos:

- Grupo 1-Vinte animais submetidos à implantação de tubos piezelétrico.
- Grupo 2-Vinte animais submetidos à implantação de tubos não piezelétrico.

Quadro 1-Distribuição dos animais, segundo a quantidade e o local de tubos implantados e o tempo de seguimento

No. de animais Local de implante		Quantidade de tubos implantados		Tempo de seguimento
		P	ÑP	
10	Osso	5	5	7 dias
	Músculo	5	5	
10	Osso	5	5	3 semanas
	Músculo	5	5	
10	Osso	5	5	6 semanas
	Músculo	5	5	
10	Osso	5	5	12 semanas
	Músculo	5	5	
0		0	0	

P = piezelétrico; ÑP = não piezelétrico

3.2.5-Procedimentos²

Todos os animais foram submetidos à implantação dos materiais na região intercondiliana do fêmur, da pata esquerda, e ventre do músculo tríceps sural, da pata direita, sendo portanto implantados 40 tubos de PVDF não piezelétricos e 40 tubos de PVDF piezelétricos.

² Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Biomecânica Ortopédica (LABIMO) do Núcleo de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências médicas da UNICAMP.

3.2.5.1-Preparo pré-operatório

Os animais permaneceram em jejum pré-operatório de 8 horas e foram submetidos a anestesia por meio de injeção intravenosa de Pentobarbital sódico na dose 50mg/Kg.

Foi realizada tricotomia da área a ser operada e as patas posteriores foram lavadas com solução de álcool iodado a 2%, seguindo-se o isolamento da área cirúrgica com campo estéril fenestrado.

3.2.5.2- Procedimento cirúrgico para implantação dos tubos no tecido ósseo

O acesso cirúrgico foi feito na face lateral do joelho dos ratos. A patela foi lateralizada, expondo-se a região intercondiliana fêmur (Figura 5).



Figura 5-Exposição dos cõndilos

Para a introdução dos tubos foi realizada perfuração no centro da região intercondiliana, com broca de diâmetro equivalente ao do tubo e com profundidade

de 5 mm. A espessura da broca variou de acordo com o diâmetro do material a ser implantado, a fim de que o implante ficasse bem adaptado à cavidade.

3.2.5.3-Acesso cirúrgico para o músculo tríceps sural

A musculatura adutora foi exposta por meio de incisão na face medial da pata, que era aberta por divisão longitudinal de suas fibras, expondo-se o músculo tríceps sural. Com um afastador isolava-se esse músculo e, com auxílio de uma trefina e de um êmbolo, o tubo era implantado na massa muscular. O afastador era retirado e o músculo adutor era aproximado sem sutura. Logo após era realizado o fechamento dos planos cirúrgicos (Figura 6).



Figura 6-Colocação do implante no músculo.

3.2.5.4-Coleta do material

Após o tempo de seguimento pré estabelecido, os animais foram sacrificados com dose letal de pentobarbital sódico para coleta dos tecidos. A articulação do joelho era exposta, a fim de se desarticular o fêmur, que era seccionado no seu terço distal.

O corpo do músculo tríceps sural era exposto pelo mesmo acesso utilizado para a colocação dos implantes e retirado pela secção da sua porção proximal e distal. Tanto o fragmento distal do fêmur, quanto o corpo do músculo tríceps sural eram lavados com soro fisiológico e fixados em solução de formaldeído a 10% por 24 horas.

3.2.5.5-Microscopia Óptica Convencional (MOC)

Após a fixação do músculo em solução de formaldeído a 10% por 24 horas, os tubos foram retirados e permaneceram em solução alcoólica a 70%. Após a descalcificação dos ossos em ácido nítrico 5% por 3 dias, os tubos foram armazenados em solução alcoólica a 70% para a análise histológica convencional.

Os implantes retirados dos ossos (n=32) e músculos (n=40) foram desidratados com soluções de etanol em concentrações crescentes (70% à 100%) e por xilol para tornar o material translúcido. Em seguida o material foi mergulhado em parafina fundida à 60°C, mantido em temperatura ambiente para solidificação, a fim de se obter blocos consistentes para serem cortados no micrótomo rotatório (Leica RM 2155), com espessura de 6µm, e corados com Hematoxilina eosina (HE) e Tricômico de Masson (TM)

3.2.5.6-Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os tubos retirados permaneceram em solução alcoólica à 70%, em temperatura ambiente, até a metalização (com "sputtering" de um alvo de ouro, camada de 7 nm - tempo 90 segundos). Foram então analisadas pela microscopia eletrônica de varredura (n= 72)., realizada com detetor de elétrons secundário para avaliação de sua superfície e áreas com adesão celular e tecidual. As imagens foram obtidas no Laboratório Nacional de Luz – Sincrotron, com o microscópio eletrônico da marca JOEL, modelo JSM- 5900 LV, e os parâmetros utilizados foram "spotsize" 25-30, voltagem de 10-15 kV, e UD 20mm. Os aumentos foram de 100x, 500x e 2000x.

3.2.5.7-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) por retroespalhamento

As análises por Microscopia Eletrônica de Varredura na modalidade de retroespalhamento foram realizadas no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNICAMP. Os ossos sem descalcificação (n=8) foram submetidos a desidratação com soluções crescentes de etanol e embutidas em resina acrílica³ para obtenção de blocos. Esses blocos foram cortadas com o auxílio de um disco de diamante e velocidade baixa, a fim de obter-se cortes transversais com 0,5 mm .

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com detetor de elétrons retroespalhados na modalidade composição, para avaliação da interface do implante com o tecido. As peças foram desidratadas e submetidas a recobrimento metálico por "*sputtering*" com alvo de ouro-paládio, resultando em uma camada com espessura inferior a 5nm (tempo de 10 segundos). As imagens foram obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Química da UNICAMP, com o microscópio eletrônico da marca JOEL (modelo JSM- 630 ILV). Os parâmetros utilizados foram "*spotsize*" 70, voltagem de 15 kV, e WD 10mm. A magnitude das imagens foi de 30x, 70x, 200x e 500x.

³ Resina Orto Centerpol 603 S/UV. Fiber Center Industrial e Comércio.

4- RESULTADOS

4.1-CARACTERIZAÇÃO DOS TUBOS

4.1.1-Análise termogravimétrica (TGA)

As Medidas de Termogravimetria permitiram demonstraram a estabilidade térmica dos materiais até 400°C, quando há uma grande perda de massa ou seja degradação do material, como ilustra o gráfico 1:

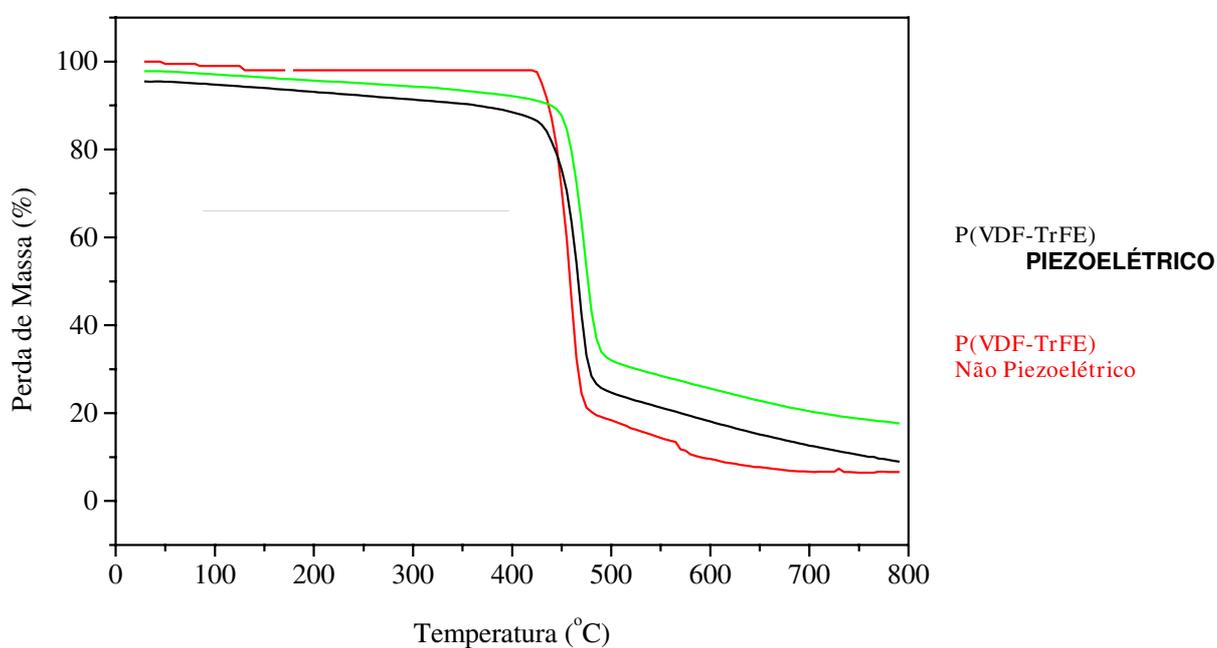


Gráfico 1-Medida termogravimétrica realizada nos tubos de P(VDF-TrFE) piezoelétricos e não piezoelétricos.

4.1.2-Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As medidas de DSC mostraram que os materiais implantados eram o PVDF piezelétrico e não piezelétrico, já que as temperaturas de cristalização foram diferentes para ambos os materiais. Para o P(VDF-TrFE) piezelétrico o pico de fusão foi de 115 e 150°C, enquanto que para o P(VDF-TrFE) não piezelétrico o pico de fusão foi de 180°C (Gráfico 2).

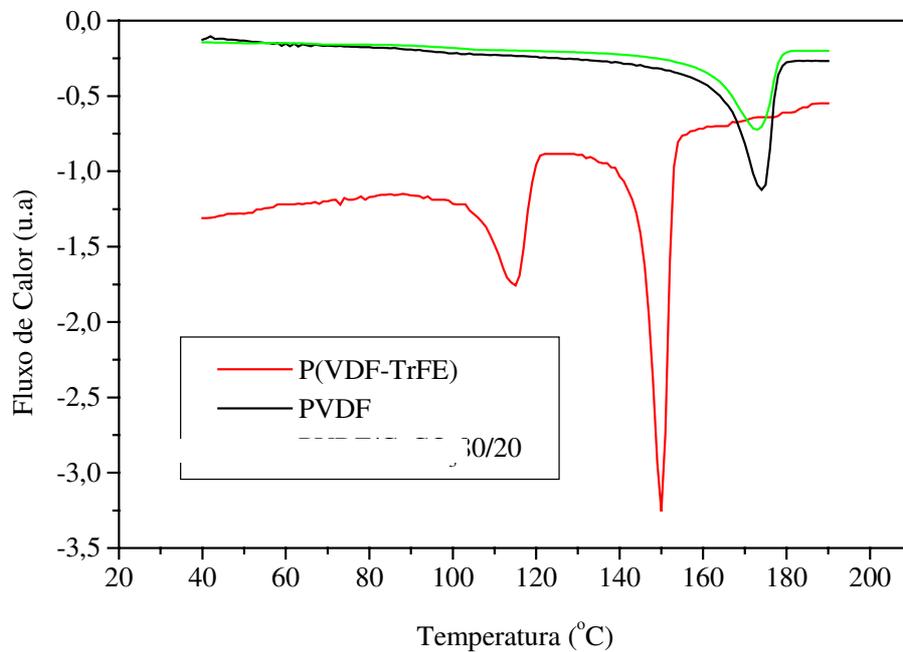


Gráfico 2-Medida de calorimetria diferencial de varredura realizada tubos de P(VDF-TrFE) piezelétricos e não piezelétricos.

4.2-ANÁLISE MACROSCÓPICA

A cicatrização da pele e dos tecidos moles foi evidente a partir do sétimo dia. A fáscia do músculo tríceps sural após esse período já estava refeita, com aspecto normal.

O material implantado, tanto no músculo como no osso, era facilmente identificado, mas em algumas amostras percebia-se migração e extrusão dos tubos do tecido muscular, o que provocou a necessidade de reposição de 5 animais com implantes musculares (3 tubos de PVDF não piezeletricos no grupo de 6 semanas de seguimento e 2 tubos de PVDF não piezeletricos no grupo de 12 semanas).

A partir de 3 semanas de seguimento os tubos de PVDF piezelétricos implantados no músculo mostraram-se mais aderidos do que os não piezelétricos, dificultando a sua retirada. Nos implantes ósseos essa aderência foi notada apenas a partir da sexta semana de seguimento, quando também pôde-se observar que a superfície articular da região intercondiliana estavam mais regulares e preenchidas nos animais em que havia se implantado os tubos de PVDF piezelétricos (Figura 7).



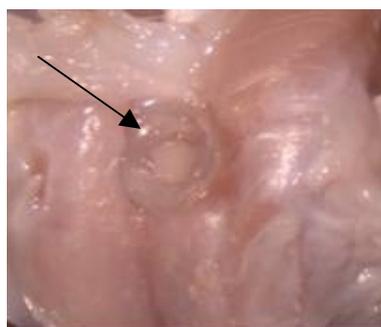
A-Tubos de PVDF piezolétricos com 6 semanas de seguimento



B-Tubos de PVDF piezolétricos com 12 semanas de seguimento



C-Tubos de PVDF não piezeletricos com 6 semanas de seguimento



D-Tubos de PVDF não piezeletricos com 12 semanas de seguimento

Figura 7-Fotos do preenchimento das cavidades no sacrifício (tubos piezolétricos e não piezolétricos)

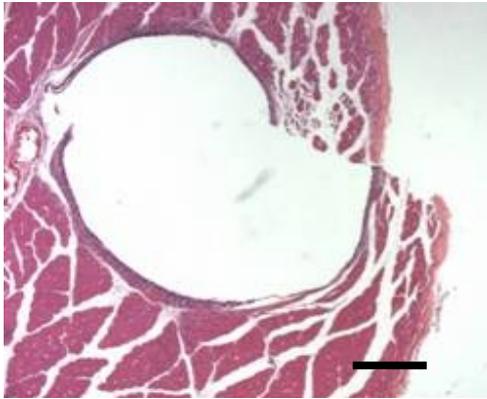
Observou-se que os animais que foram submetidos a implantação de tubos de PVDF piezolétricos tiveram os defeitos com maior preenchimento, quando

comparado aos animais com tubos de PVDF não piezelétricos, nos quais após 12 semanas ainda se visualizava a presença do tubo na superfície do tecido.

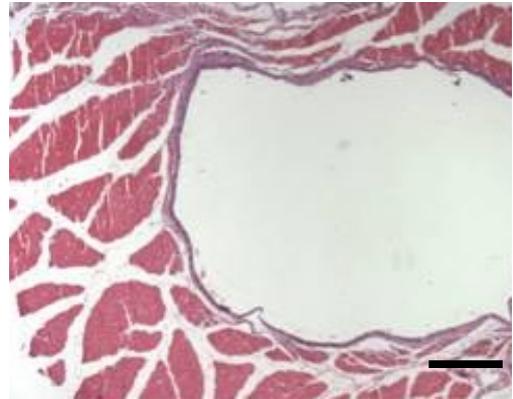
4.3-ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL (MOC)

4.3.1-Tecido muscular

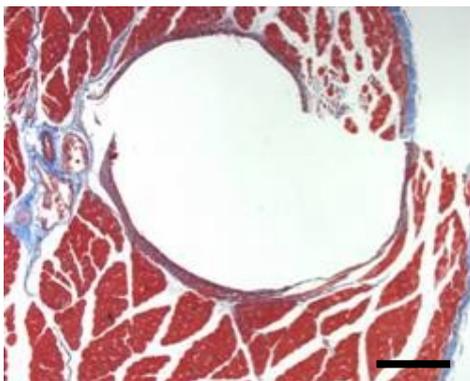
Houve formação de cápsula envolvendo os tubos piezelétricos e não piezelétricos em todos os grupos e a celularidade dessa cápsula era maior no grupo de 7 semanas e menor no grupo de 12 semanas. A avaliação da espessura da cápsula neoformada ao redor do tubo ficou comprometida devido à dificuldade de retirá-lo do leito muscular em função da aderência do mesmo. Nas figuras abaixo (8 à 11) foram selecionadas algumas imagens da cápsula neoformada ao redor dos tubos piezelétricos e não piezelétricos, coradas com Hematoxilina/ Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).



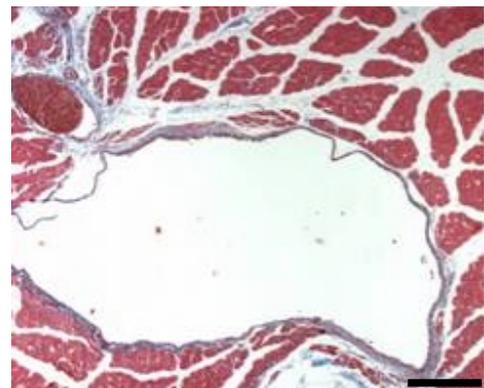
A-Tubos de PVDF piezelétricos com 7 dias de seguimento (r54) (HE)



B-Tubos de PVDF não piezeletricos com 7 dias de seguimento (r117) (HE)

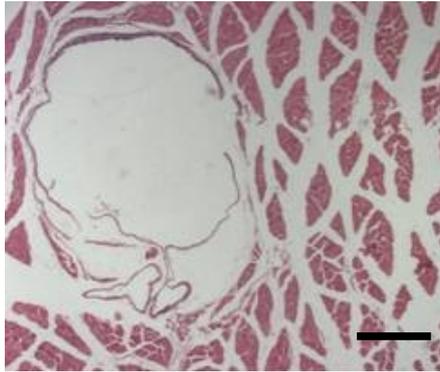


C-Tubos de PVDF piezeletricos 7 dias (r54) TM

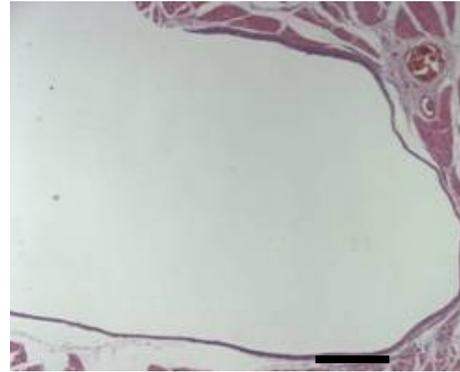


D-Tubos de PVDF não piezeletricos 7 dias (r117) TM

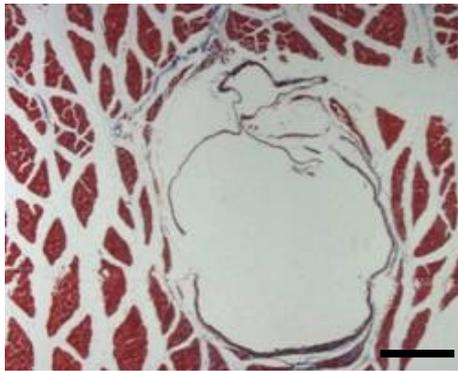
Figura 8-Cortes histológicos transversais do tecido muscular após retirada dos tubos de PVDF piezelétricos (esquerda) e não piezelétricos (direita), corados com HE (A e B) e TM (C e D). (50x) Barra = 0,57mm



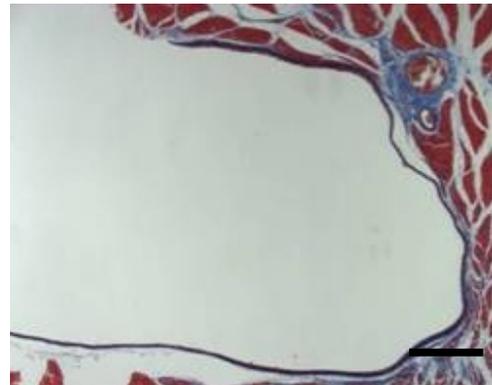
A-Tubos de PVDF piezeletricos com 3 semanas de seguimento (r51) (HE)



B-Tubos de PVDF não piezeletricos com 3 semanas de seguimento (r100) (HE)

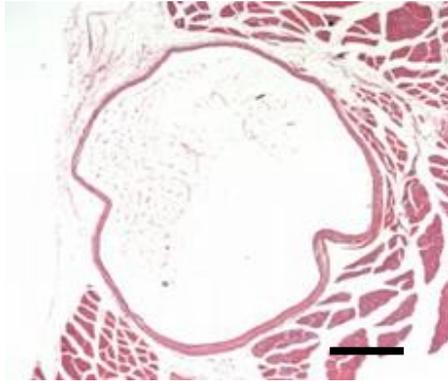


C-Tubos de PVDF piezeletricos com 3 semanas de seguimento (r51) (TM)

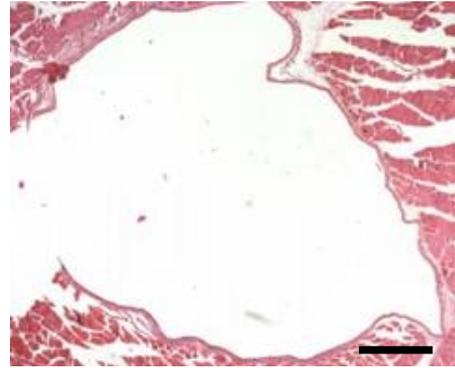


D-Tubos de PVDF não piezeletricos com 3 semanas de seguimento (r100) (TM)

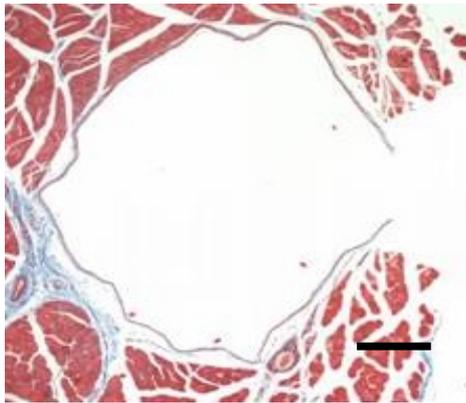
Figura 9-Cortes histológicos transversais do tecido muscular após retirada dos tubos de PVDF piezeletricos (esquerda) e não piezeletricos (direita), corados com HE (A e B) e TM (C e D) (50x) Barra = 0,50mm



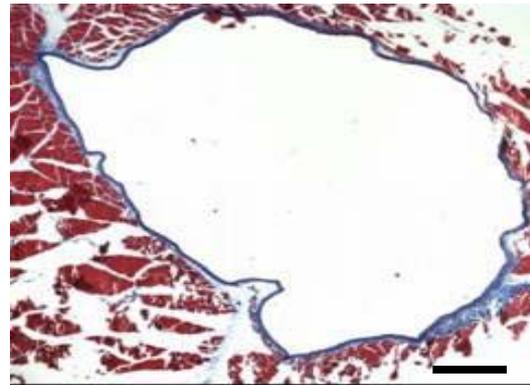
A-Tubos de PVDF piezeletricos com 6 semanas de seguimento (r42) (HE)



B-Tubos de PVDF não piezeletricos com 6 semanas de seguimento (r94) (TM)

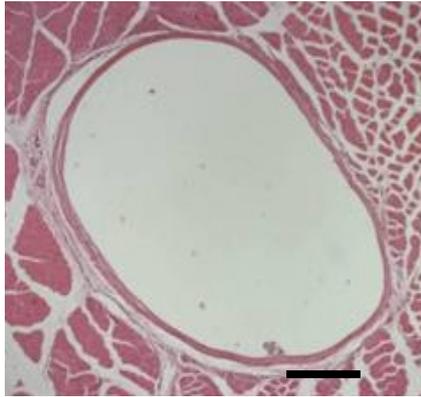


C-Tubos de PVDF piezeletricos com 6 semanas de seguimento (r42) (TM)

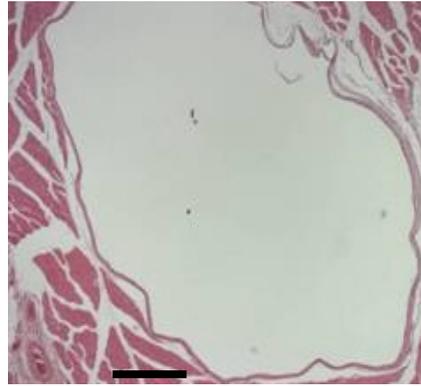


D-Tubos de PVDF não piezeletricos com 6 semanas de seguimento (r94) (TM)

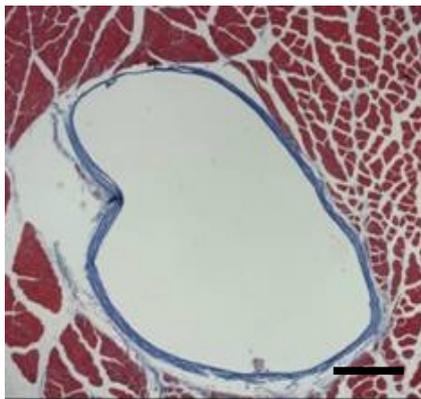
Figura 10-Cortes histológicos transversais do tecido muscular após retirada dos tubos de PVDF piezeletricos (esquerda) e não piezeletricos (direita), corados com HE (A e B) e TM (C e D) (50x) Barra = 0,40mm



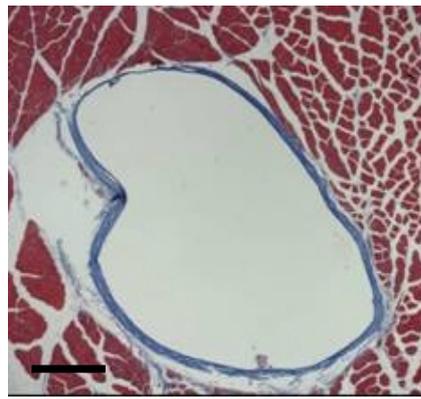
A-Tubos de PVDF piezeletricos com 12 semanas de seguimento (r77) (HE)



B-Tubos de PVDF não piezeletricos com 12 semanas de seguimento (r91) (HE)



D-Tubos de PVDF piezeletricos com 12 semanas de seguimento (r77) (TM)

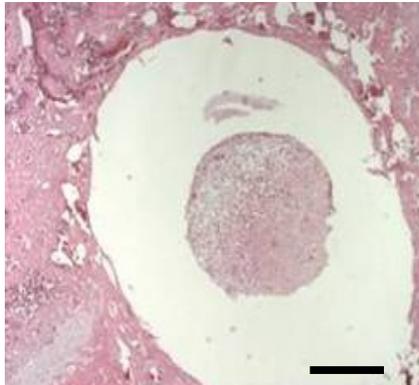


E-Tubos de PVDF não piezeletricos com 12 semanas de seguimento (r91) (TM)

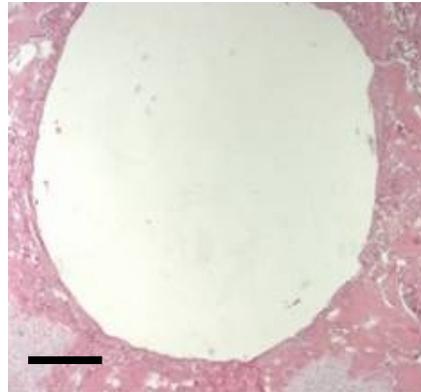
Figura 11-Cortes histológicos transversais do tecido muscular após retirada dos tubos de PVDF piezeletricos (esquerda) e não piezeletricos (direita), corados com HE (A e B) e TM (C e D) (50x) Barra = 0,44mm

4.3.2-Tecido ósseo

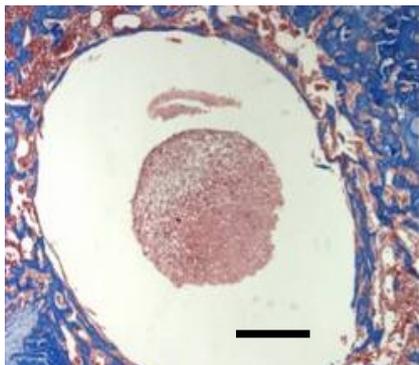
Ao contrário do tecido muscular, não houve formação evidente de cápsula de tecido conjuntivo fibroso envolvendo os tubos. De qualquer modo a retirada dos tubos piezelétricos foi sempre mais trabalhosa do que dos tubos não piezelétricos por estarem mais firmemente aderidos no tecido ósseo. Nas lâminas pôde-se notar que havia crescimento de tecido com características de osso no interior apenas dos tubos piezelétricos como pode-se notar nos cortes abaixo corados com hematoxilina e tricrômico de Masson (Figuras 12 à 15).



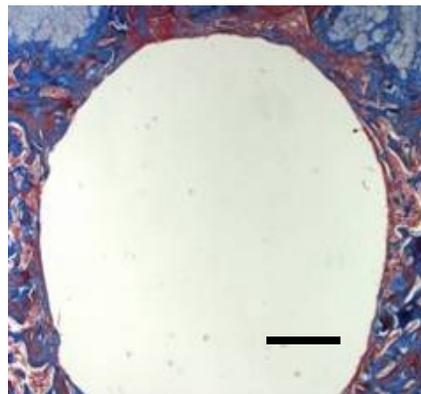
A-Tubos de PVDF piezeletricos com 7 dias de seguimento (R127) (HE)



B-Tubos de PVDF não piezeletricos com 7 dias de seguimento (R116) (TM)

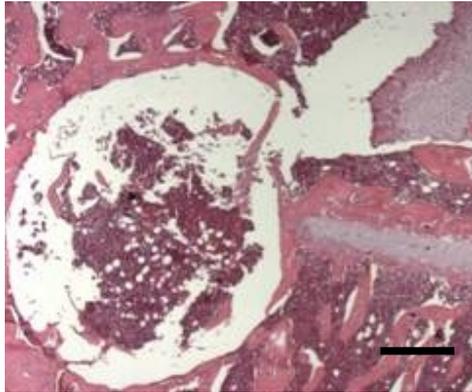


C-Tubos de PVDF piezeletricos com 7 dias de seguimento (r127) (TM)

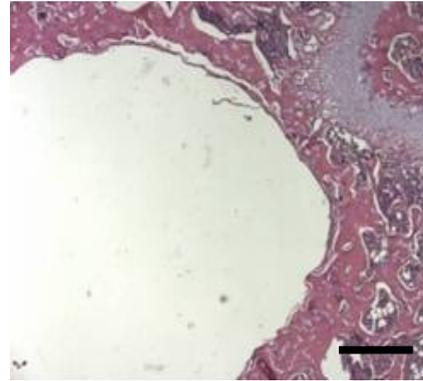


D-Tubos de PVDF não piezeletricos com 7 dias de seguimento (r116) (TM)

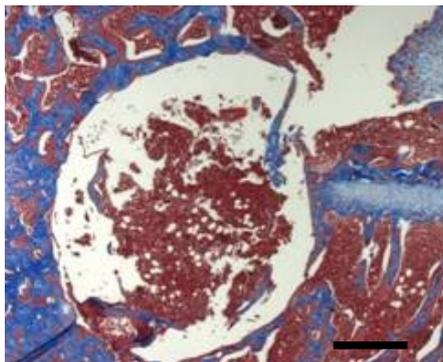
Figura 12-Cortes histológicos transversais do tecido ósseo após retirada dos tubos de PVDF piezeletricos (à esquerda) e não piezelétricos (à direita), corados com HE (A e B) e TM (C e D) (50x) Barra = 0,33mm



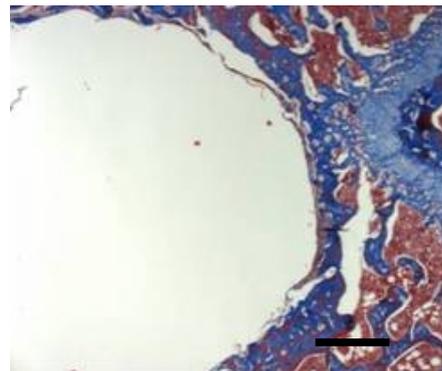
A-Tubos de PVDF piezeletricos com 3 semanas de seguimento (r50) (HE)



B-Tubos de PVDF não piezeletricos com 3 semanas de seguimento (r101) (HE)

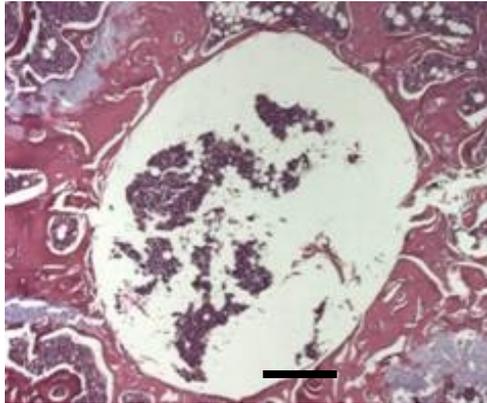


C-Tubos de PVDF piezeletricos com 3 semanas de seguimento (r50) (TM)

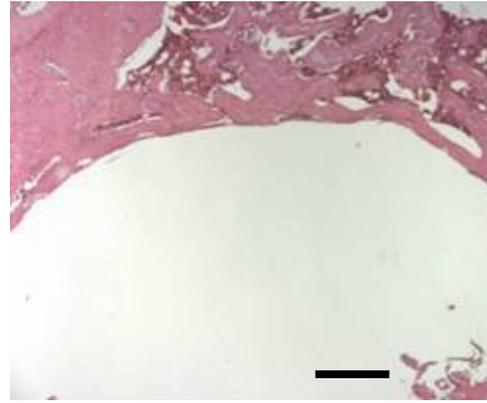


D-Tubos de PVDF não piezeletricos com 3 semanas de seguimento (r101) (TM)

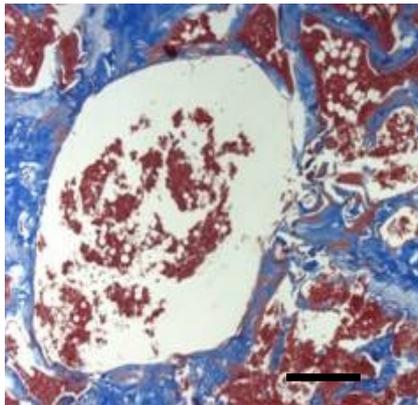
Figura 13-Cortes histológicos transversais do tecido ósseo após retirada dos tubos de PVDF piezeletricos (à esquerda) e não piezelétridos (à direita), corados com HE (A e B) e TM (C e D) (50x) Barra = 0,33mm



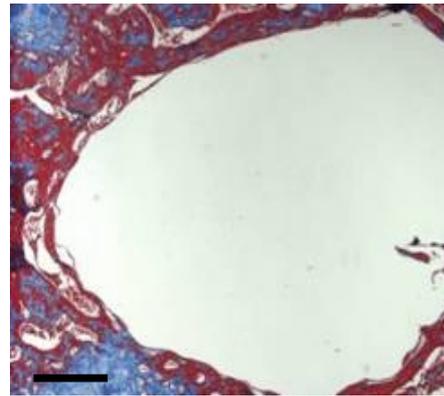
A-Tubos de PVDF piezeletricos com 6 semanas de seguimento (r39) (HE)



B-Tubos de PVDF não piezeletricos com 6 semanas de seguimento (r97) (HE)

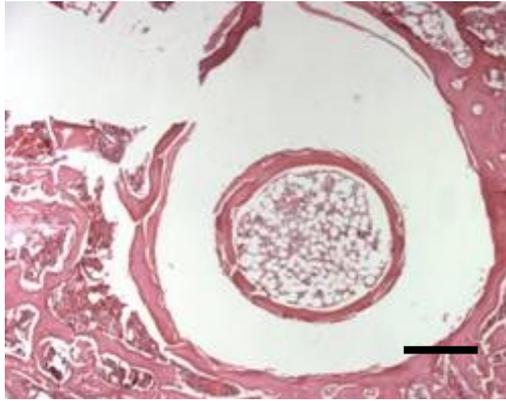


C-Tubos de PVDF piezeletricos com 6 semanas de seguimento (r39) (TM)

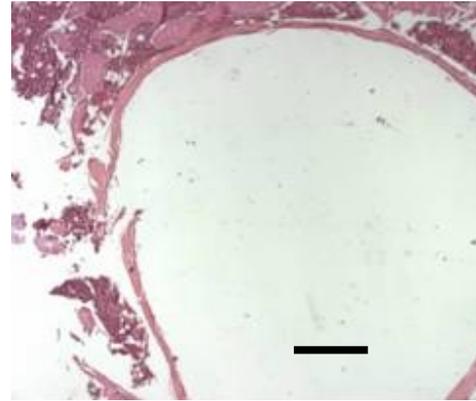


D-Tubos de PVDF não piezeletricos com 6 semanas de seguimento (r97) (TM)

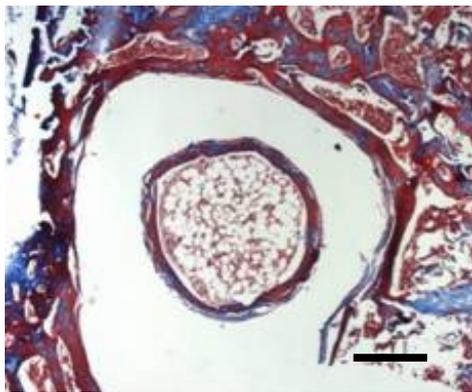
Figura 14-Cortes histológicos transversais do tecido ósseo após retirada dos tubos de PVDF piezeletricos (à esquerda) e não piezelétricos (à direita), corados com HE (A e B) e TM (C e D) (50x) Barra = 0,33mm



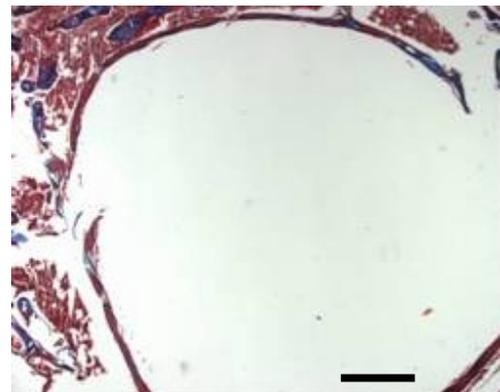
A-Tubos de PVDF piezeletricos com 12 semanas de seguimento (r84) (HE)



B-Tubos de PVDF não piezeletricos com 12 semanas de seguimento (r88) (HE)



C-Tubos de PVDF piezeletricos com 12 semanas de seguimento (r84) (TM)



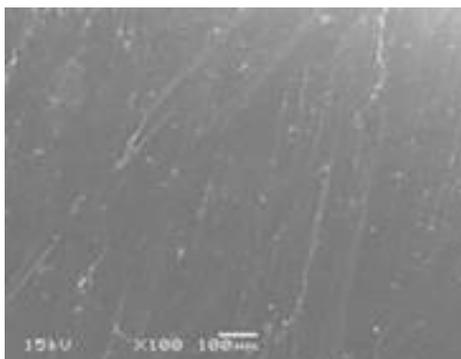
D-Tubos de PVDF não piezeletricos com 12 semanas de seguimento (r88) (TM)

Figura 15-Cortes histológicos transversais do tecido ósseo após retirada dos tubos de PVDF piezeletricos (à esquerda) e não piezeletricos (à direita), corados com HE (A e B) e TM (C e D) (50x) Barra = 0,33mm

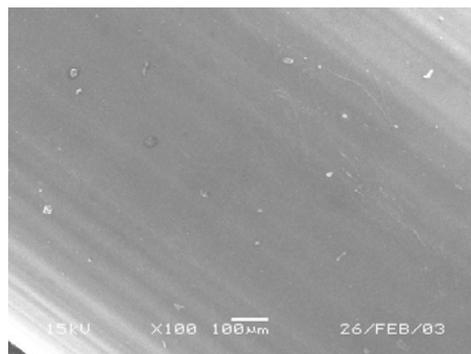
4.4-ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

4.4.1-Tubos de PVDF pré implantação

O acabamento superficial dos tubos era mais regular nos tubos não piezelétricos. A figura 16 mostra imagens dos tubos antes da implantação:



Tubos de PVDF piezelétricos

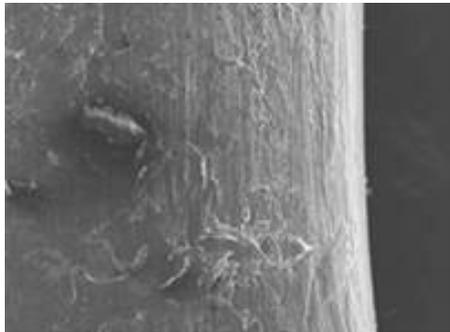


Tubos de PVDF não piezelétricos

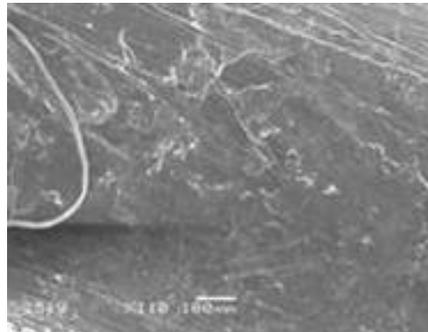
Figura 16-Imagens de MEV da superfície dos tubos antes da implantação (Aumento 100x).

4.4.2-Tubos de PVDF pós implantação no músculo

Observou-se adesão tecidual na superfície dos tubos, variando em intensidade de acordo com o tipo de material implantado e com o tempo de seguimento, conforme observa-se nas imagens abaixo:

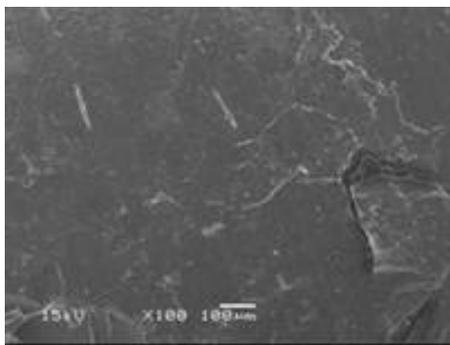


Tubos de PVDF piezelétricos 6 semanas

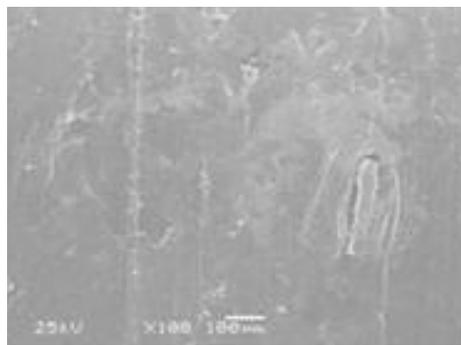


Tubos de PVDF piezelétricos 12 semanas

Figura 17-Imagens de MEV da superfície dos tubos de PVDF piezelétricos retirados do tecido muscular (100X)



Tubos de PVDF não piezelétricos 6 semanas



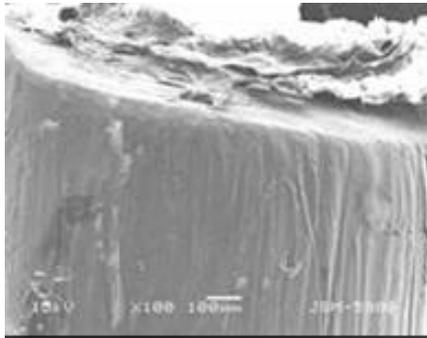
Tubos de PVDF não piezelétricos 12 semanas

Figura 18-Imagens de MEV da superfície dos tubos de PVDF não piezelétricos retirados do tecido muscular (Aumento 100X)

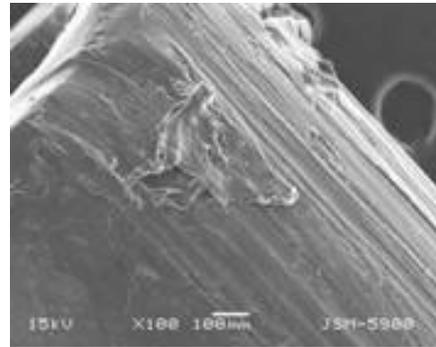
Em todos os materiais implantados, tanto o crescimento tecidual como a adesão celular aumentaram com o tempo de seguimento. Observou-se maior quantidade de tecido ao redor dos tubos de PVDF piezelétricos.

4.4.3-Tubos de PVDF pós implantação no osso

Comparando-se essas imagens com as imagens antes da implantação, observou-se que houve adesão e crescimento de tecido conjuntivo na superfície dos tubos retirados do osso. Apesar de não ter sido quantificado, teve-se a impressão de que esse crescimento e adesão foi maior ao redor dos tubos piezelétricos, em todos os tempos de seguimento. (Figuras 19 e 20).

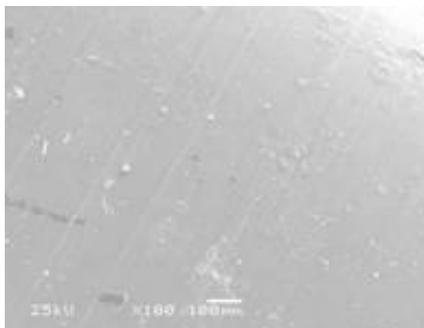


Tubos de PVDF piezelétricos 6 semanas

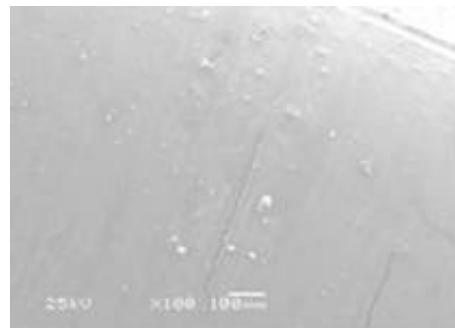


Tubos de PVDF piezelétricos 12 semanas

Figura 19-Imagens de MEV da superfície dos tubos de PVDF piezelétricos retirados do tecido ósseo (Aumento 100X)



Tubos de PVDF não piezelétricos 6 semanas

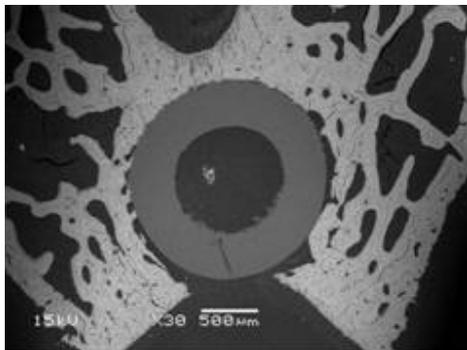


Tubos de PVDF não piezelétricos 12 semanas

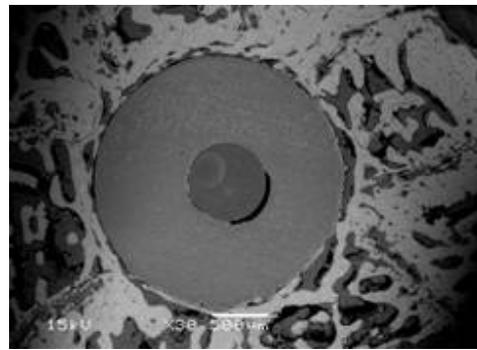
Figura 20-Imagens de MEV da superfície dos tubos de PVDF não piezelétricos retirados do tecido ósseo (Aumento 100X)

4.5-MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) POR RETROESPALHAMENTO

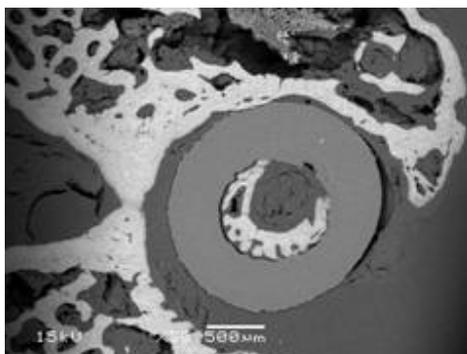
As imagens obtidas pela MEV por feixe de elétrons retroespalhado mostraram a interface formada entre os diâmetros interno e externo dos tubos e o tecido ósseo. Observou-se que houve formação de tecido ósseo ao redor de todos os tubos e no diâmetro interno dos tubos piezelétricos, conforme ilustrado na figura 21.



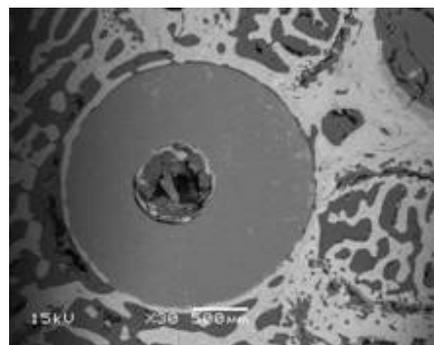
Tubos de PVDF piezelétricos 6 semanas



Tubos de PVDF não piezelétricos 6 semanas



Tubos de PVDF piezelétricos 12 semanas



Tubos de PVDF não piezelétricos 12 semanas

Figura 21-MEV por retroespalhamento dos cortes de tecido ósseo embutidos em resina acrílica (Aumento 30x).

5- DISCUSSÃO

A busca de materiais alternativos para substituir ou promover o crescimento ósseo se faz cada vez mais necessária, devido à complexidade dos procedimentos de reconstrução ortopédica que são hoje realizados. Ao se estudar a eficiência de um determinado material a nível experimental, a escolha do modelo experimental e da metodologia utilizada são fundamentais para que se consiga obter resultados que possam ser posteriormente aplicados em situações clínicas ou que possam sugerir a realização de novos estudos com essa finalidade. É importante que se analise os efeitos que o implante produz no tecido hospedeiro, assim como os efeitos que o tecido hospedeiro possa produzir no implante.

Com relação aos polímeros, a caracterização do acabamento superficial, previamente à sua implantação deve ser feita, mesmo que por amostragem, para que se possa excluir variáveis que possam interferir na resposta inflamatória final, o que no presente estudo foi realizado através das análises pela microscopia eletrônica de varredura. Do mesmo modo, a caracterização do material por métodos físicos também é importante para que os resultados obtidos com o ensaio experimental sejam confiáveis.

Como nesse estudo a unidade básica do PVDF foi modificada [P(VDF-TrFE)] para facilitar o processamento e a polarização do material era importante que ele fosse caracterizado. Essa caracterização foi realizada pela análise termogravimétrica e pela calorimetria diferencial de varredura. Pode ser comprovado que o material utilizado apresentava estabilidade térmica até 400°C e que o ponto de Transição de Curie foi distinto para os tubos piezelétricos e não piezelétricos.

A opção pelo rato como animal de experimentação foi devido a sua isogeneidade e disponibilidade. Os locais para receber os implantes foram escolhidos a fim de possibilitarem não só a análise da resposta inflamatória ao material, como também a análise do crescimento ósseo ao redor do implante, motivo maior desse estudo. De acordo com EID et al. (2001) é permitida a utilização de mais de um local para a colocação de implantes com a finalidade de se obter maior quantidade de informações.

A escolha da extremidade distal do fêmur para receber os tubos de PVDF é utilizada na literatura (HEIKKLÄ, 1993) e nesse estudo mostrou-se adequada. Em primeiro lugar devido à baixa morbidade do procedimento cirúrgico e, também pela facilidade de execução, que permitiu controlar as variáveis envolvidas na técnica cirúrgica e minimizar os seus efeitos, fazendo com que os procedimentos fossem facilmente reproduzíveis.

Após a introdução dos tubos era esperado que se iniciasse o processo inflamatório, decorrente em parte do próprio processo de cicatrização, oriundo da lesão tecidual produzida pela introdução do implante. Em geral, esse processo inflamatório tem como função conter, neutralizar e, se possível, excluir o agente agressor do tecido, além de promover a sua cicatrização (KRIZEK, 1983). Normalmente essa reação é inespecífica e pode progredir ou se manter ativa, dependendo da forma como o implante irá interagir com o tecido vivo (BELANGERO et al., 1993).

As reações observadas ao redor do implante dependem do tipo do tecido receptor. Respostas imediatas ocorrem por via sanguínea e, portanto, quanto mais vascularizado o tecido, mais rápida e mais intensa será a reação inflamatória. Num primeiro momento todo material implantado é envolvido por uma rede de fibrina com a ativação de fatores químicos e mediadores inflamatórios, que serão responsáveis pelo início da angiogênese e pela migração local de células, que terão a função de iniciar o processo de fagocitose e de cicatrização da lesão (SALTHOUSE, 1984; GALANTE et al., 1991; ANDERSON, 1983; EID et al., 2001; MARIOLANI, 1993).

Em geral, os leucócitos e neutrófilos predominam nos primeiros dias após a lesão, sendo paulatinamente substituídos pelos monócitos, que se diferenciam em macrófagos e estes, por sua vez, formam as células gigantes que permanecem por meses no local da lesão, se o agente agressor não for tóxico. O processo inflamatório agudo tem curta duração e muitas vezes, apresenta exteriorização clínica, observada na ferida pela presença de edema, calor e rubor. Nos animais aqui seguidos, tanto após a implantação dos tubos no tecido muscular como no tecido ósseo, pode-se observar após a primeira semana, cicatrização das

feridas, sem que houvesse presença de sinais inflamatórios, com recuperação da função em todos os animais, demonstrando que o material implantado não era agudamente tóxico.

O processo inflamatório crônico, por outro lado, não tem exteriorização clínica evidente e os componentes celulares formadores dessa reação são, principalmente, os macrófagos e células gigantes do tipo corpo estranho, que podem ou não estar associada à proliferação vascular e de tecido conjuntivo denso (BELANGERO et al., 1993). A avaliação da reação inflamatória pode dar idéia da toxicidade do material implantado, de tal modo que reações inflamatórias pouco intensas, que incitem a formação de granulomas e de células gigantes do tipo corpo estranho, podem demonstrar que a toxidade, apesar de presente, é de grau moderado ou leve. A espessura da cápsula de tecido fibroso formada ao redor do implante pode, dar informações indiretas do grau de toxicidade do implante (LAINING, 1973). Os achados histológicos deste estudo mostraram que o material implantado não apresentou toxidade, já que houve formação de cápsula tanto ao redor dos tubos piezelétricos como não piezelétricos e que o tecido das cápsulas foi se tornando menos celular à medida que o tempo de seguimento aumentou.

A análise prévia do acabamento superficial dos tubos (piezelétricos e não piezelétricos) foi importante para que se pudesse aferir a qualidade da superfície dos mesmos, já que o processo de fabricação foi diferente, apesar de serem quimicamente idênticos. Segundo SALTHOUSE e MATLAGA (1983), a padronização do formato do implante é essencial, já que as respostas inflamatórias podem ser influenciadas pelo acabamento superficial e pelo acabamento do material. Esses autores encontraram que a atividade e o metabolismo de células adjacentes à superfície rugosas era significativamente diferente das células adjacentes à implantes com superfície lisa de um mesmo material. Implantes de politetrafluoretileno na forma de bastões, implantados no músculo glúteo do rato, com diversos períodos de seguimento, mostraram que o encapsulamento dos bastões lisos foi maior do que em bastões rugosos e que a análise histoquímica da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase e da fosfatase alcalina ácida foram sempre maiores ao redor dos bastões rugosos, mesmo após 90 dias de implante. Os

achados do presente estudo mostraram que houve crescimento de tecido ao redor dos bastões, com formação de cápsula de tecido fibroso envolvendo os bastões. Esses resultados mostram que a reação inflamatória foi discreta e que a presença da cápsula de fibrose reflete pouca agressão do material ao tecido receptor.

Achados semelhantes foram observados por BELANGERO et al. (1993) no estudo da biocompatibilidade de materiais carbônicos. Apesar de ter composição química perfeitamente igual, partículas de material carbônico amorfo incitavam reação inflamatória menor do que as fibras. Segundo os autores, essa diferença estava relacionada com a presença das fibras de carbono com elevado módulo de elasticidade, já que ao redor dessas estruturas, mesmo após um ano de seguimento, ainda se observava a presença de macrófagos e células gigantes, que eram praticamente inexistentes nos animais sem as fibras.

LAROCHE et al. (1995-a), por exemplo, utilizaram o PVDF como uma alternativa muito atrativa ao polipropileno, justificando a sua utilização em suturas vasculares em função de suas propriedades físico-químicas e boa biocompatibilidade. No presente estudo o tecido formado ao redor dos tubos foi predominantemente composto por fibroblastos, que diminuía em concentração no decorrer do tempo, diferenciando-se em fibrócitos. Ao redor dos tubos piezelétricos, houve maior concentração de fibroblastos, sendo, inclusive, mais difícil de retirá-los do músculo devido à grande aderência tecidual. De acordo com o processo de cicatrização natural, após a implantação dos tubos houve ação de monócitos e macrófagos, seguida de proliferação de fibroblastos e células vasculares endoteliais no sítio do implante, levando à formação de um tecido de granulação correspondente ao início da resposta de cicatrização. A proliferação de fibroblastos acarretou a formação de uma cápsula fibrosa que foi vista, nem sempre íntegra (possivelmente rompida durante a retirada dos tubos), nas lâminas do tecido muscular. Resultados correspondentes foram observados pela MEV.

A análise histológica do tecido ósseo mostrou que a formação dessa cápsula fibrosa não foi visível, embora as imagens do MEV mostrassem adesão tecidual na superfície dos tubos. IRVING (1973), relata que o colágeno é um

constituente da matriz óssea, sobre a qual os cristais de apatita começam a se nuclear, não havendo dúvida de que em um osso calcificado o colágeno e a fase inorgânica são fortemente ligados. O próprio processo de reparação, decorrente da lesão óssea provocada pela broca no momento da perfuração, deve ter resultado em rompimento de vasos sanguíneos e formação de hematoma no local. Parte do osso adjacente foi gradualmente reabsorvido. Houve proliferação de células precursoras dos osteoblastos que, na presença de suprimento sanguíneo adequado, diferenciaram-se em osteoblastos, células responsáveis por formação óssea (EINHORN, 1998).

Provavelmente, o principal estímulo para que ocorresse esse crescimento de células e fibras de colágeno foi o gradiente de pressão gerada durante a marcha do rato transmitida à cavidade articular do joelho. Como esta cavidade mantinha-se perfeitamente fechada, com líquido sinovial, pode-se supor que o bombeamento cíclico e constante desse líquido deve ter produzido microdeformações na superfície interna dos tubos que, por sua vez, devem ter gerado, através do efeito piezolétrico, cargas negativas tanto na superfície interna quanto externa do mesmo (JIANQING et al., 1997)

Como os tubos piezelétricos e não piezelétricos tinham a mesma origem, composição química e acabamentos superficiais, a única variável que poderia justificar a diferença no crescimento ósseo era a presença da piezeletricidade.

Sabe-se que a osteogênese pode ser mediada pela corrente elétrica gerada por materiais piezelétricos por meio das alterações de pressão. Materiais polares, como o colágeno e íons, podem sofrer influência de um campo elétrico que, por sua vez, pode definir não só o arranjo das fibras e a sua direção de deposição, como também estimular células com potencial osteogênico. A corrente elétrica gerada pelos tubos piezelétricos pode ter estimulado o crescimento ordenado dos osteoblastos, a secreção de colágeno e a calcificação da matriz óssea também de forma ordenada. Esta hipótese está baseada nos achados observados dentro dos tubos (piezelétricos e não piezelétricos) implantados nos ratos. O material

encontrado dentro dos tubos não piezelétricos tinha aspecto de material completamente desorganizado e amorfo.

Provavelmente, o crescimento mais ordenado dos osteoblastos, assim como a deposição mais ordenada das fibras de colágeno e a maior calcificação da matriz óssea explicam a osteogênese mais eficiente, observada dentro dos tubos. Os achados desse estudo merecem atenção e continuidade já que há sugestões de que os implantes piezelétricos interferem positivamente no fenômeno da osteogênese (JIANQING et al., 1997)

A microscopia eletrônica de varredura por retroespalhamento foi utilizada neste estudo para se avaliar detalhes da interface entre os tubos e o tecido ósseo, sem que houvesse necessidade de se proceder a descalcificação prévia. Este exame revelou crescimento de tecido semelhante ao tecido ósseo apenas no interior dos tubos piezelétricos, confirmando os achados obtidos com a técnica histológica convencional.

O tipo e magnitude da deformação mecânica sofrida pelos tubos neste estudo pode ser questionada, já que, aparentemente, não deveriam ter sofrido deformação, por estarem implantados na região metafisária distal dos fêmures. Como, então, pode ter sido obtido o efeito piezelétrico? Por estarem implantados na região intercondiliana do fêmur e por esta região ser intraarticular, os tubos passaram a sofrer microdeformações devido à mudança do gradiente de pressão intraarticular, gerada pelo movimento da articulação e pelo carregamento da pata durante a marcha. Essa microdeformação deve ter induzido, pelos efeitos da piezeletricidade, a formação de correntes elétricas na face externa e interna dos tubos, que foram responsáveis pela osteogênese. A explicação para este encontro pode estar baseada no fato de que os tubos tinham nas suas superfícies interna e externa cargas negativas que poderiam sofrer despolarização, de forma semelhante àquela observada nas membranas à medida que o tubo era deformado. Alguns autores sugerem que o aparecimento dessa diferença de potencial poderia estimular a migração de osteoblastos para a superfície do material piezelétrico

(JONES e BOYDE, 1976; HAMAMOTO et al., 1995; NAKAMURA et al., 2002; KIZUK et al., 2003) e a deposição de tecido ósseo.

A relação entre a piezeletricidade e o crescimento do tecido ósseo tem sido estudada (FUKADA e YASUDA, 1957; BASSETT e BECKER, 1962; SHAMOS e LAVINE, 1967; KÖBERLE, 1974; YASUDA, 1977; FUENTES, 1978). Em estudo recente, JIANQING et al. (1997) compararam o desempenho de implantes de hidroxiapatita cerâmica (HA) com implantes de hidroxiapatita piezelétrica (HABT). Neste estudo observaram crescimento ósseo ao redor dos implantes de HABT em uma semana, enquanto que após duas semanas não havia neoformação óssea ao redor dos implantes de HÁ. Os resultados sugeriram que a piezeletricidade deve ter gerado potenciais elétricos pela deformação mecânica dos implantes e, assim, estimulado a osteogênese.

Pode-se concluir que o PVDF é um polímero que no estado piezelétrico não induz reação inflamatória, mesmo quando implantado no tecido muscular de ratos por 12 semanas e, além disso, pode facilitar a deposição de tecido ósseo ao seu redor. Estes achados indicam que este material (PVDF) deve continuar sendo estudado e investigado para futuras aplicações clínicas na área da ortopedia, objetivando-se a neoformação óssea.

-6- CONCLUSÃO

A reação inflamatória observada ao redor dos tubos de PVDF (piezelétrico e não piezelétrico) implantados no músculo triceps sural do rato, podem ser consideradas semelhantes e de pequena intensidade, já que após 12 semanas estes tubos estavam envolvidas por uma cápsula de fibrose praticamente acelular;

A análise histológica convencional e a análise da MEV por retroespalhamento mostrou que a interface formada entre o tubo de PVDF piezelétrico e não piezelétrico com o tecido ósseo não era formada por tecido fibroso e que apenas no interior dos tubos piezelétricos houve formação de tecido ósseo, inclusive com aspecto trabecular.

***7- REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICA***

AJUBI, N.E.; KLEIN-NULEND, P.J.L.; MIJWEIDE, P.L.J.; VRIJHEID-LAMMERS, T.; ALBLAS, M.J.; BUGER, E.H. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes – a cytoskeleton

ALVES, N. **Estudo da polarização ferroelétrica no copolímero P(VDF-TrFe)**. São Carlos/SP. 1992. (Tese – Doutorado – Universidade Federal de São Carlos).

ANDERSON, J.M. The cellular cascades of wound healing in Biomaterials in the Reconstructive Surgery - edited by Leonard R. Rubin, M.D., F.A.C.s. 1983.

ASCHERO, G.; GIZDULICH, P., MANGO, F. Statistical characterization of piezoelectric coefficient $d_{2,3}$ in cow bone. **J. Biomechanics**, 32: 573-7, 1999.

BASSET, C.A.L.; BECKER, R.O. Generation of electric potential by bone in response to mechanical stress. **Science**, 137: 1063, 1962.

BELANGERO, W.D.; KÖBERLE, G.; HADLER, W.A. Inflammatory reaction of rat striated muscle to particles of carbon fiber reinforced carbon. **Brazilian J Med Biol Res**, 26: 819-826, 1993.

BLACK, J.: Elemental carbon as a biomaterial. **J. Biomed Mat Res Symposium**. 2 (Part 1): 41-47, 1971.

BRIGHTON, C.T.; FRIEDENBERG, Z.B.; BLACK, J.; ESTERHAI, J.L.; MITCHELL, J.E.; MONTIQUE, F. Electrically induced osteogenesis: relationship between charge, current density, and the amount of bone formed: introduction of a new cathode concept. **Clin Orthop**. (161):122-32, 1981.

BRIGHTON, C.T.; ADLER, S.; BLACK, J.; ITADA, N.; FRIEDENBERG, Z.B. Cathodic oxygen consumption and electrically induced osteogenesis. **Clin Orthop**. (107):277-82, 1975.

BRIGHTON, C.T.; WANG, W.; SELDES, R.; ZHANG, G.; POLLACK, S.R. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. **J Bone Joint Surg Am**. 83-

A(10):

1514-23, 2001.

BUCKWALTER, A.; GLIMCHER, M.J.; COOPER, R.R.; RECKER, R. Bone biology – Part I. **J. Bone and Joint Surg.** 77-A(8): 1256- 1275, 1995-a.

BUCKWALTER, A.; GLIMCHER, M.J.; COOPER, R.R.; RECKER, R. Bone biology – Part II. **J. Bone and Joint Surg.** 77-A(8): 1276- 1289, 1995-b.

COWIN, S.C. Bone oroeasticity. **J Biomec.** 32:217-38, 1999.

DUNCAN, R.L.; TURNER, C.H.; Mechanotransduction and functional response to mechanical strain. **Calc Tissue Int**, 57: 344-58, 1995.

EID, K.; ZELICOF, S.; PERONA, B.P.; SLEDGE, C.B.; GLOWACKI, J. Tissue reactions to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation. **J Orthop Res.** 19: 962-69, 2001.

EINHORN, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin Orthop Rel Res.** 355: 7-21, 1998.

FARIA, R.M., **Estudos de processos termicamente estimulados em PVDF e copolímeros: transições ferroelétricas e cargas espaciais.** São Carlos: Universidade de São Paulo – Instituto de Física e Química de São Carlos. 106p. Dissertação (Livre-Docência junto ao DFCM do Instituto de Física e Química de São Carlos), 1989.

FICAT, J.J.; THICHART, M.; FICAT, P.; LACABANNE, C. Piezoelectric induction of bone formation: ultrastructural observations. **Medical Applications of Piezoelectric. Polimers**, 5: 265-8, 1988.

FROST, H.M. **Orthopaedic Biomechanics.** Illinois (EUA), Charles C. Thomas (publisher), 1973, 652p, volume 5.

FUENTES, A.E.R. **Efeitos da estimulação elétrica em pseudoartrose provocada experimentalmente em cães**. Ribeirão Preto/SP. 1978. (Tese – Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP/SP)

FUKADA, E.; YASUDA, I. Piezoelectric Effects in Colagen. **Japanese Journal of Applied Physics**, 3(2): 117-21, 1964.

FUKADA, E. Piezoelectric of wood. **J. Physical Society of Japan**, 10(2): 149-54, 1955.

FUKADA, E.; YASUDA, I. On the piezoelectric effects of bone. **Journal of the Physical Society of Japan**, 12(10): 1158-62, 1957.

FURUKAWA, T. Phenomenological aspect of a ferroelectric vinylidene fluoride/trifluorethylene copolymer. **Ferroelectrics**. V.57, p.63-72, 1984.

GALANTE, J.O.; LEMONS, J.; SPECTOR, M.; WILSON, P.D.; WRIGHT, T.M. The biologic effects of implant materials. **Journal of Orthopaedic Research** v.9, p.760-75, 1991.

GJEELSVIK, A. Bone remodeling and piezoelectricity – I. **J Biomechanics**, 6:69-77, 1973-a.

GJEELSVIK, A. Bone remodeling and piezoelectricity – II. **J Biomechanics**, 6:187-93, 1973-a.

HAM, A.W. **Tratado de Histologia**, México, Editorial Interamericana S.A., 4ª edição, 1963, p. 268-331.

HAMAMOTO N; HAMAMOTO Y; NAKAJIMA T; OZAWA H. Histological, histochemical and ultrastructural study on the effects of surface charge on bone formation in the rabbit mandible. **Arch Oral Biol**; 40(2): 97-106, 1995.

HEIKKILÄ, J.T. KANGASNIEMI, A.J., YLY-URPO, A. HEIKKILÄ, J. T., KANGASNIEMI, A.J., YLY-URPO, A. Polymethylmethacrylate composites:

disturbed bone formation at the surface of bioactive glass and hydroxyapatite. **Biomaterials**, v.17, p.1755-1760, 1996.

IRVING, J.T. Theories of mineralization of bone. **Clin Orthop Rel Res.** 97: 225-36, 1973.

JIANQING,F.; HUIPIN,Y.; XINGDONG,Z. Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic. **Biomaterials**, 18: 1531-34, 1997.

JONES, S.J.; BOYDE, A. The migration of osteoblasts. *Cell Tissue Research.* v.184, p.179-93, 1977.

KIZUKI T; OHGAKI M; KATSURA M; NAKAMURA S; HASHIMOTO K; TODA Y; UDAGAWA S; YAMASHITA K. Effect of bone-like layer growth from culture medium on adherence of osteoblast-like cells. *Biomaterials*; 24(6): 941-7, 2003.

KLEIN-NULEND, J.; VAN DER PLAS, A.; SEMEINS, C.M.; AJUBI, N.E.; FRANGOS, J.A.; NIJWEIDE, P.J.; BURGER, E.H. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J*, 9: 441-5, 1995.

KLINGE,U.; KLOSTERHALFEN,B.; OTTINGER,A.P.; JUNGE,K.; SCHUMPELICK,V. PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes. **Biomaterials**, 23: 3487-93, 2002.

KÖBERLE, G. **Estudos físicos e biológicos em tecido ósseo**. Ribeirão Preto – São Paulo, 1974. (Tese - Livre docência - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto)

KRIZEK,T.J. The normal body defenses against foreign implants. In: RUBIN, L.R. (Editor) **Biomaterials in reconstructive surgery**. EUA: Mosby Company, 1983, p. 9 -16.

LAING, P.G. Compatibility of biomaterials. *Orthop Clin North America*, 1: 249-73, 1973.

LAROCHE, G. ; MAROIS, Y.; SCHWARZE,E.; GUIDOIN,R. KING, M. PARIS, E.; DOUVILLE, Y. Polyvinylidene fluoride monofilament suturs: can they be used

safely for long-term anastomoses in the thoracic aorta? **Artificial Organs**, 19(11): 1190-9, 1995.

LAROCHE, G. ; MAROIS, Y.; SCHWARZE,E.; GUIDOIN,R. KING, M. PARIS, E.; DOUVILLE, Y. Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: from polymeric raw material to monofilament vascular suture. **J Biomed Mat Res**. 29: 1525-36, 1995.

LAVINE, 1967 dependent process. *Biochem Biophys Res Commun*, 225: 62-8, 1996.

LOVINGER, A.J., Poly(vinylidene fluoride). In: **Developments in crystalline polymers I**, 1982, p.195-262, 1982

MALMONGE, S.M. Hidrogel sintético para reparo de defeitos da cartilagem articular. Campinas, 1997. (Tese - Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).

MARINO A.A.; SODERHOLM, S.C.; BECKER, R.O Piezoelectric effect and growth control in bone. **Nature**, 2: 8474, 1970.

MARINO A.A. ; BECKER, R.O; SODERHOLM, S.C. Origin of the piezoelectric effect in bone. **Calcif Tissue Res**, 8: 177-80, 1971.

MARINO,A.A.; GROSS, B.D. Piezoelectricity in cementum, dentine and bone. **Archives of Oral Bbiology**, 34(7): 507-9, 1989.

MARIOLANI,J.R.L.; BELANGERO,W.D.; ARRUDA,A.C.F. Resposta interfacial provocada pelas interações biológicas e mecânicas entre material de implante e tecido receptor. **Acta Orthop Bras** v.1, n.2, p. 48-53, 1993.

MAROIS et al 1998

MASCARENHAS, S.: The electrical effect in bone and biopolymer and the bound-water problem. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 238:36, 1974.

NAKAMURA S; KOBAYASHI T; YAMASHITA K. Extended bioactivity in the proximity of hydroxyapatite ceramic surfaces induced by polarization charges. *Journal of Biomedical Material Research*. 61(4): 593-9, 2002.

PASCHOAL, A.L.: Estudo da viabilidade de aplicação do polímero piezelétrico fluoreto de polivinilideno (PVDF) entre osso cortical e placa de osteossíntese para estimulação de crescimento ósseo. São Carlos/SP. 2003 (Tese – Doutorado - Universidade de São Paulo).

POHLER, O.E.M. Degradation of metallic orthopedic implants. In: RUBIN, L.R. (Editor) **Biomaterials in reconstructive surgery**. EUA: Mosby Company, 1983, p. 40 -45.

RIBEIRO, P.A.M.F. **Influência da umidade nas propriedades elétricas do Fluoreto de Polivinilideno**. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia, 1994.

SALTHOUSE, T.N.; MATAGLA, B.F. Some cellular effects related to implant shape and surface. In: RUBIN, L.R. (Editor) **Biomaterials in reconstructive surgery**. EUA: Mosby Company, 1983, p. 40 -45.

SALTHOUSE, T.N.; Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *Journal of Biomedical Material Research* v.18, p.395-401, 1984.

SHAMOS, M.; LAVINE, L. Piezoelectricity as a fundamental property of biological tissues. **Nature**, 213: 267-69, 1967.

SHERRY, T.M.; BITENSKY, L.; CHAYEN, J.; LANYON, L.E. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J. Bone Mineral Res*, 4: 783:8, 1989.

SIKAVITSAS, V.I.; TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, 22: 2581-2593, 2001.

SILVA, N.G., Preparação e caracterização dos Copolímeros P(VDF-TRFE). São Carlos : Universidade Federal de São Carlos, 1992. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Física Aplicada), 1992

SMITH, G.K. Systemic aspects of metallic implant degradation. In: RUBIN, L.R. (Editor) **Biomaterials in reconstructive surgery**. EUA: Mosby Company, 1983, p. 229-242.

TURNER, C.H.; FORWOOD, M.R. What role does the osteocyte network play in bone adaptation? **Bone**, 16:283-5, 1995.

WILLIAMS, D.F. Definitions in biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials. Chester, England, march 3-5, 1986, Elsevier, 1987.

WILLIAMS, W.S.; BREGER, L. Piezoelectricity in tendon and bone. **J. Biomechanics**, 8(6): 407-13, 1975.

WOLFF, J.: The Internal Architecture of normal bone and its mathematical significance. In: Julius Wolff. **The Law of Bone Remodelling**, p. 3-21, Tradução P. Maquet and R. Furlong Springer-Verlag, EUA, 1986.

YASUDA, I. Electrical callus and callus formation by electret. **Clinical Orthopaedic and Related Research**, 124: 53-56, 1977.