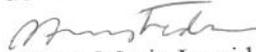


DÉBORA CRISTINA CORAÇA

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área Ciências Biomédicas. do(a) aluno(a) Débora Cristina Coraça.

Campinas, 21 de fevereiro de 2006.


Prof(a). Dr(a). Eliane Maria Ingrid Amstalden
Orientadora.

**ESTUDO EXPERIMENTAL DE IMPLANTES
BIOABSORVÍVEIS DE
POLI(L-ÁCIDO LÁTICO) / POLI(ÓXIDO DE ETILENO)
ASSOCIADOS AO CLORIDRATO DE
VANCOMICINA NO REPARO ÓSSEO**

CAMPINAS

2006

DÉBORA CRISTINA CORAÇA

**ESTUDO EXPERIMENTAL DE IMPLANTES
BIOABSORVÍVEIS DE
POLI(L-ÁCIDO LÁTICO) / POLI(ÓXIDO DE ETILENO)
ASSOCIADOS AO CLORIDRATO DE
VANCOMICINA NO REPARO ÓSSEO**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
doutor em Ciências Médicas, área de concentração
em Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR(A): Prof^ª. Dr^ª Eliane M. Ingrid Amstalden

CAMPINAS

2006

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C81e

Coraça Débora Cristina

“Estudo experimental de implantes bioabsorvíveis de poli(L-ácido láctico) / poli(óxido de etileno) associados ao cloridrato de vancomicina no reparo ósseo.” / Débora Cristina Coraça. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Eliane Maria Ingrid Amstalden

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Regeneração óssea. 2. Vancomicina. 3. Ossos - Histologia. 4. Substitutos ósseos. 5. Polímero. I. Amstalden, Eliane Maria Ingrid. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Sln(fcm)

Título em inglês: Na experimental study of the use of bioabsorbable poly(L-lactic acid)/poly(ethylene oxide) microspheres containing vancomycin for bone repair

Keywords: • Bone regeneration
• Vancomycin
• Bone histology
• Polymer
• Bones histopathology

Área de concentração: Ciências Médicas

Titulação: Doutorado

Banca examinadora: Profa Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

Prof. Dr. João Batista de Miranda

Prof. Dr. José Angelo Camilli

Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinali

Profa. Dra. Sônia Maria Malmonge

JUNIDADE PC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C81e
V EX
TOMBO BC/ 68423
PROC 16-P.00123.06
C
PREÇO 11.00
DATA 17/05/06
Nº CPD

01010: 379331

Data da defesa: 21/02/2006

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

Membros:

- 1. Prof. Dr. João Batista de Miranda**

- 2. Prof. Dr. José Angelo Camilli**

- 3. Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinali**

- 4. Prof.a Dra. Sônia Maria Malmonge**

- 5. Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden**

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/02/06

DEDICATÓRIA

Ao Marcelo, meu esposo e amigo, presente nos momentos mais importantes da minha vida. Quem me apoiou em todas as fases deste trabalho, sem me deixar desanimar. Quem me ensinou e me ensina a ser uma pessoa melhor a cada dia, em todos os sentidos. Obrigada por ser quem é, obrigada por me mostrar o que realmente é importante. Te amo muito!!

e

À Nair, minha mãe, pelos constantes elogios e satisfação ao longo de minha trajetória, o que me deu forças para continuar, independente dos obstáculos que encontrei. É uma das pessoas responsáveis pela pessoa que sou e pelos caminhos que hei de percorrer. Obrigada por tudo!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden, pela estimada orientação em todas as fases deste trabalho e pela dedicação em torná-lo cada vez melhor.

À Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek, pela dedicação não só na orientação dos trabalhos com biomateriais, como pela presença constante ao longo da minha vida acadêmica, sendo para mim, o perfeito exemplo de pesquisadora.

Ao Dr. Maurício Etchebehere, pela orientação na área da ortopedia o que permitiu voltar este trabalho para a realidade médica.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Cassio Menezes Raposo do Amaral (*in memorian*), por permitir a realização da fase experimental deste trabalho nas dependências da SOBRAPAR - Sociedade Brasileira de Pesquisa e Assistência para a Reabilitação Craniofacial de Campinas.

À Andrea Roberta Clemente, bióloga e pesquisadora, que auxiliou nas fases iniciais deste trabalho acompanhando e auxiliando a fase experimental deste no laboratório e biotério da SOBRAPAR.

Ao Alberto Ceroni Filho pela caracterização das microesferas o que contribuiu para o conhecimento do biomaterial estudado.

À Eurofarma pela doação do cloridrato de vancomicina estudado neste trabalho.

À Dra. Glauce Aparecida Pinto pelas orientações durante o exame de qualificação.

Ao Dr. Maurício Ecthebehere pelas orientações durante o exame de qualificação.

À Dra. Maria Letícia Cintra pelas orientações durante o exame de qualificação.

À Maria do Carmo Machado da Silva, secretária da Sub-Comissão de Pós-Graduação do Departamento de Anatomia Patológica, quem sempre foi atenciosa direcionando minha vida acadêmica dentro do departamento.

À Elisabeth Justi Rodrigues, secretária do Departamento de Anatomia Patológica, que sempre me atendeu da melhor maneira possível dentro do departamento.

Ao amigo Adilson Piazza pelo auxílio gráfico nas imagens deste trabalho, quem sempre esteve presente, desenvolvendo seu trabalho com excelência e sempre disposto a resolver nossos problemas.

Ao Dr. André Almeida Schenka pela orientação na histomorfometria, auxiliando com o programa ImageLab[®] e obtenção dos resultados.

Ao Dr. Luis Alberto Magna pelas análises estatísticas realizadas com os dados obtidos neste trabalho.

À todos os funcionários do Departamento de Anatomia Patológica que sempre auxiliaram no que era preciso.

Aos amigos da pós-graduação que sempre se mostraram interessados apoiando a realização deste trabalho.

À amiga Caroline Lucchesi e ao amigo Marcelo Pinto, assim como todos os companheiros do Labiomat – Laboratório de Biomateriais da PUC-SP Campus Sorocaba, que sempre me apoiaram e me apoiam em minha vida acadêmica.

*“O mistério não é um muro onde a inteligência
esbarra, mas um oceano onde ela mergulha”*

Thibon

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	xxxiii
ABSTRACT.....	xxxvii
1 - INTRODUÇÃO.....	41
1.1 - Histofisiologia do Tecido Ósseo.....	43
1.2 - Enxertos Ósseos Naturais.....	46
1.3 - Materiais Metálicos.....	49
1.4 - Materiais Cerâmicos.....	51
1.5 - Materiais Poliméricos.....	52
1.6 - Materiais Poliméricos Bioabsorvíveis.....	54
2 - OBJETIVOS.....	59
2.1 - Objetivos Específicos.....	61
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
3.1 - Animais.....	65
3.2 - Obtenção das Microesferas.....	66
3.3 - Procedimentos Cirúrgicos.....	70
3.4 - Procedimentos Técnicos Histológicos.....	72
3.5 - Análises Histológicas.....	72

3.5.1 - Análise Descritiva.....	72
3.5.2 - Análise Semi-quantitativa.....	73
3.6 - Análise Quantitativa.....	74
3.7 - Análise Estatística.....	75
4 - RESULTADOS.....	77
4.1 - Procedimento Experimental.....	79
4.2 - Análises Histológicas Qualitativas.....	79
4.2.1 - 2 (dois) dias de implante.....	79
4.2.2 - 4 (quatro) dias de implante.....	80
4.2.3 - 1 (uma) semana de implante.....	83
4.2.4 - 2 (duas) semanas de implante.....	83
4.2.5 - 4 (quatro) semanas de implante.....	85
4.2.6 - 8 (oito) semanas de implante.....	85
4.2.7 -16 (dezesesseis) semanas de implante.....	88
4.2.8 - 32 (trinta e duas) semanas de implante.....	88
4.3 - Análise Semi-Quantitativa.....	93
4.4 - Análise Quantitativa (Histomorfometria).....	101
4.4.1 - Animais Implantados com a blenda PLLA/PEO associada ao cloridrato de vancomicina.....	101
4.4.2 - Animais Implantados com a blenda de PLLA/PEO sem a associação com o cloridrato de vancomicina.....	102

4.4.3 - Comparação entre os Grupos.....	103
5 - DISCUSSÃO.....	105
5.1 - Metodologia.....	107
5.2 - Análises Qualitativas e Quantitativas.....	113
6 - CONCLUSÕES.....	119
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
8 - ANEXOS.....	135
9 - APÊNDICES.....	149

Análogo - lat. analògus,a,um 'proporcionado, simétrico, análogo, semelhante', do gr. análogos,os,on 'proporcional, que está em relação com, análogo'; ver an(a)- e logo.

Artroplastia - operação de uma articulação para restituir-lhe o maior grau possível de integridade, mobilidade e função.

Banco de ossos – Local de armazenamento de ossos.

Bioabsorvível - que pode ser absorvido por um organismo; bioabsorbível.

Biomaterial - substância compatível com os tecidos vivos.

Carcinogênico - relativo a carcinógeno: agente que provoca o desenvolvimento de um carcinoma (neoplasia maligna) no organismo.

Células tronco – células não-diferenciadas ou seja, que não adquiriram função e morfologia específica, podendo se diferenciar de acordo com o estímulo que receberem (fatores de crescimento).

Cinética - parte da físico-química que investiga a velocidade das reações químicas, os mecanismos destas reações e os fatores que as determinam.

Cisalhar – causar cisalhamento: ato ou efeito de cisalhar: fenômeno de deformação ao qual um corpo está sujeito quando as forças que sobre ele agem provocam um deslocamento em planos diferentes, mantendo o volume constante.

Citocinas – moléculas peptídicas envolvidas na comunicação entre células.

Corrosão - transformação química de metais ou ligas em óxidos, hidróxidos etc., ou transferência destes sob forma iônica para o meio em que estejam imersos, por processos de oxidação, pelo contato com agentes oxidantes como o oxigênio, umidade, etc.

Craniosinostose - Fusão precoce das suturas cranianas, ocorrendo mais freqüentemente na sutura coronária.

Cristalinidade - pertencente a, da natureza do cristal ou formado por cristalização.

Diafanização – método químico que permite o clareamento de um tecido preparando-o para outras colorações.

Difusão - migração de átomos ou moléculas em um sistema físico (sólido, líquido ou gás), em geral devido a sua própria agitação térmica, muitas vezes também causada pela influência de um gradiente de temperatura, pressão, ou por um potencial químico ou elétrico.

Emulsão - dispersão coloidal de um líquido em outro.

Estresse mecânico – intensidade de estímulo mecânico.

Hematoma - acúmulo de sangue em um órgão ou tecido após uma hemorragia.

Histomorfometria - análise quantitativa de componentes da morfologia tecidual como volume, área, perímetro e quantidade de células.

Inerte - sem atividade ou movimento próprios; que não provoca reações químicas, físicas ou biológicas.

Lamelação - ato ou efeito de lamelar; organização ou divisão em lamelas; lamelado: disposto ou dividido em lâminas; camadas.

Líquido sinovial - humor transparente e viscoso que lubrifica as articulações e que é secretado pela membrana sinovial.

Líquido tissular – líquido relativo a tecido orgânico.

Microtomia - dissecação anatômica de tecidos; microtomia, obtenção de cortes de um tecido.

Morbidade - conjunto de causas capazes de produzir uma doença; característica, qualidade ou estado do que é mórbido.

Osteocondutor – que conduz/direciona a formação óssea durante o reparo de uma lesão.

Osteoindutor – que induz a formação óssea.

Osteointegração - união estável e funcional entre o osso e a superfície de um biomaterial. Este fenômeno ocorre após a inserção do material dentro do osso e a migração das células ósseas para a sua superfície.

Osteossíntese - intervenção cirúrgica em um osso fraturado visando manter unidas as bordas por meio de sutura, anel, placa ou outros meios mecânicos.

Polímero bioabsorvível – material polimérico não absorvível que quando inserido em um meio orgânico sofre reações químicas que o convertem em um material facilmente metabolizado pelo organismo.

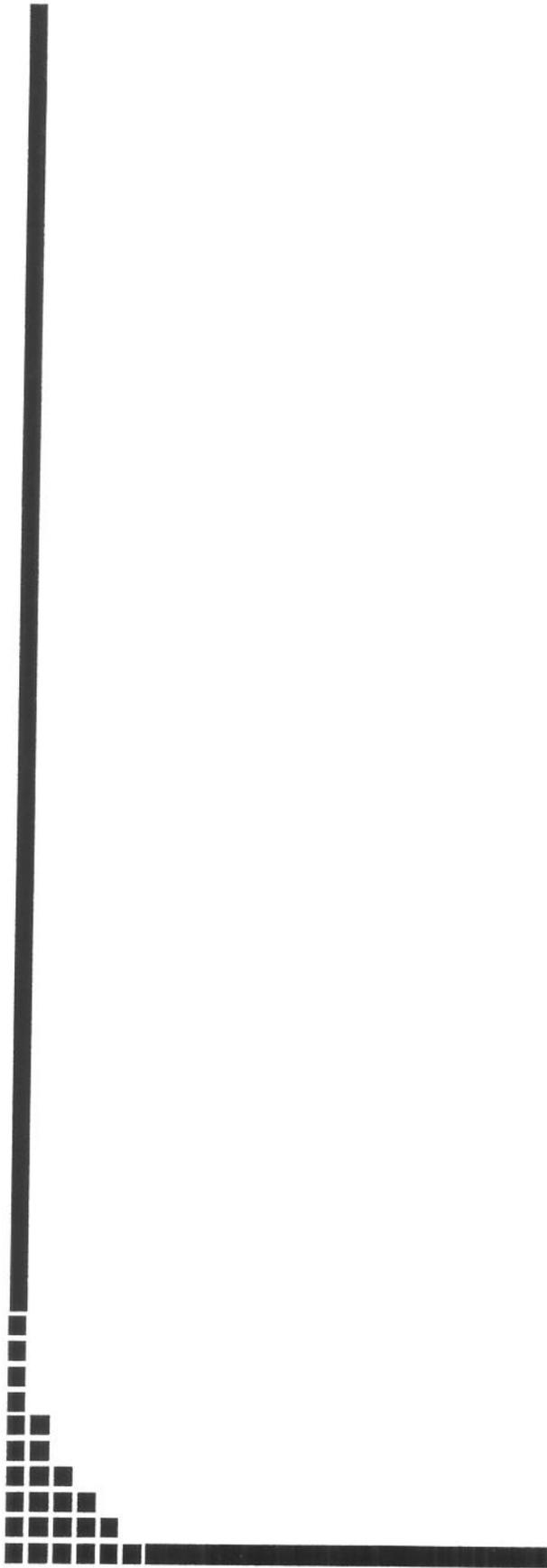
Prótese acetabular – peça interna de material sintético que substitui o acetábulo; acetábulo: no homem e nos vertebrados tetrápodes, cavidade cotilóide do osso do quadril, na qual se articula a cabeça do fêmur; prótese acetabular:..

Tricotomia –raspagem de pelos e/ou cabelos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina di-fosfato ou monofosfato de adenosina
BMP	bone morphogenetic protein
Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂	hidroxiapatita
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
DCM	diclorometano, solvente
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ethylenediaminetetraacetic, descalcificador
e-PTFE	politetrafluoretileno expandido
FDA	Food and Drug Administration
FGF	fibroblast growth factor
HA	hidroxiapatita sintética
HE	hematoxilina e eosina, coloração
H.I.V.	human immunodeficiency virus
IC	intervalos de confiança
PCL	poli (ε-caprolactona)
PCL/PLLA	blenda de poli (ε-caprolactona) e poli(L-ácido láctico)
PDGF	platelet-derived growth factor
PEO	poli(óxido de etileno)
PEG	poli(etileno glicol)

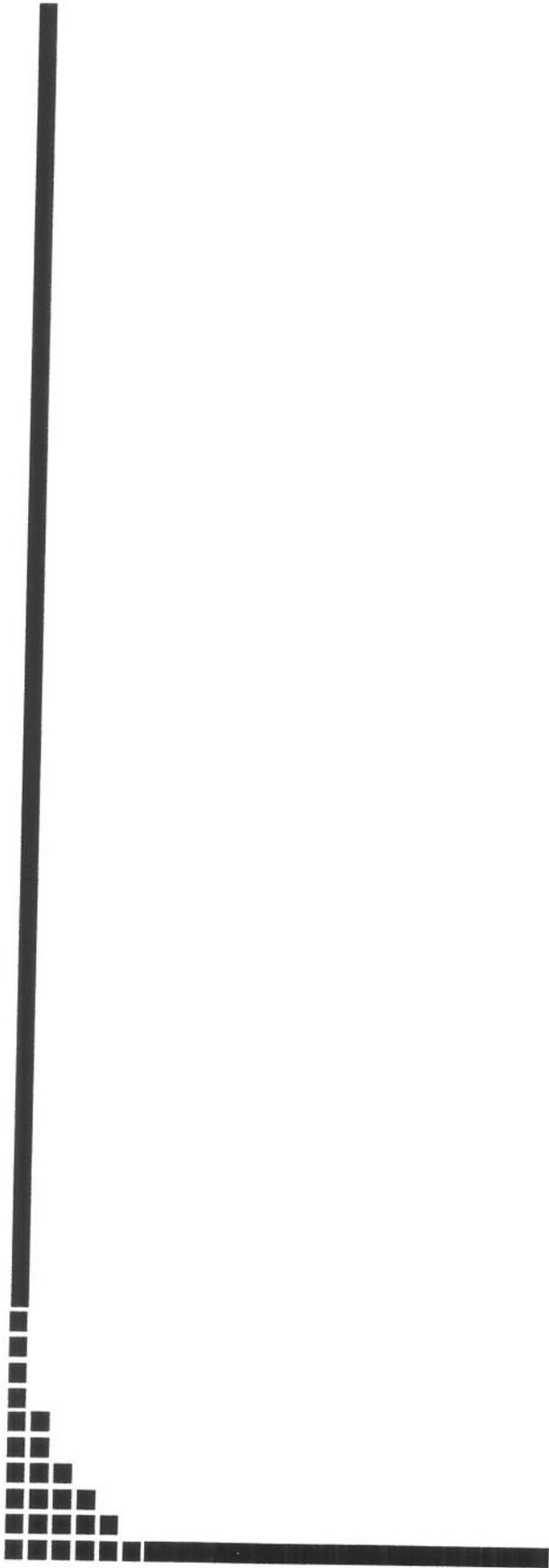
PGA	poli(ácido glicólico)
PLDLA	poli(DL-ácido láctico)
PLL	poli(L-lisina)
PLLA	poli(L-ácido láctico)
PLLA/PEO	blenda de poli(L-ácido láctico) e poli(óxido de etileno)
PLLA/PGA	blenda de poli(L-ácido láctico) e poli(ácido glicólico)
PMMA	poli(metacrilato de metila)
PTFE	politetrafluoretileno
PVA	poli(álcool vinílico)
RPM	rotações por minuto
SOBRAPAR	Sociedade Brasileira de Pesquisa e Assistência para a Reabilitação Craniofacial
Teflon[®]	politetrafluoretileno, polímero não bioabsorvível (marca registrada)
TGF-β	transforming growth factor beta
Ti-Ni	liga metálica de titânio e níquel
TM	tricroômio de Masson, coloração
μm	micrômetro
w/o	water/oil - primeira emulsão do processo de dupla emulsão
w/o/w	water/oil/water – processo de dupla emulsão



RESUMO

A necessidade da utilização de enxertos naturais e/ou materiais sintéticos para auxiliar no reparo ósseo é diretamente proporcional a perda tecidual nas lesões. A administração de substâncias antibióticas é necessária para prevenir, ou mesmo combater a ação de agentes bacterianos que possam vir a retardar o reparo tecidual. Este estudo teve como objetivo avaliar a aplicação de um polímero bioabsorvível associado à uma droga antibiótica na regeneração óssea. Foram realizados implantes ósseos de microesferas da blenda de poli(L-ácido láctico)PLLA/poli(óxido de etileno)PEO na composição 80:20 associadas ao cloridrato de vancomicina e não associadas ao cloridrato de vancomicina em ratos. Os implantes foram colocados em cavidades de 3 mm de diâmetro realizadas em tíbias de ratos da linhagem Wistar. Grupos com 5 animais cada, foram submetidos a períodos experimentais de 2 e 4 dias e 1, 2, 4, 8, 16 e 32 semanas. Os achados morfológicos foram semelhantes em ambos grupos. Houve primeiramente a formação de malha de fibrina e hemorragia ao redor das microesferas, as quais foram gradualmente sendo substituídas por tecido de granulação. A partir do quarto dia, houve a formação inicial de matriz óssea envolvendo as microesferas centripetamente, tornando-se mais evidente e madura da primeira até a trigésima segunda semana de implantação. A comparação entre os achados histomorfométricos e semi-quantitativos, quanto à formação óssea, demonstraram não ter havido diferença significativa entre os dois grupos. Reações de rejeição tecidual não foram observadas. Pode-se concluir, portanto, que além da evidente osteointegração das microesferas de PLLA/PEO, a associação com o cloridrato de vancomicina não prejudicou a regeneração óssea podendo ser este material utilizado como enxerto, bem como ser útil na prevenção de infecções bacterianas.

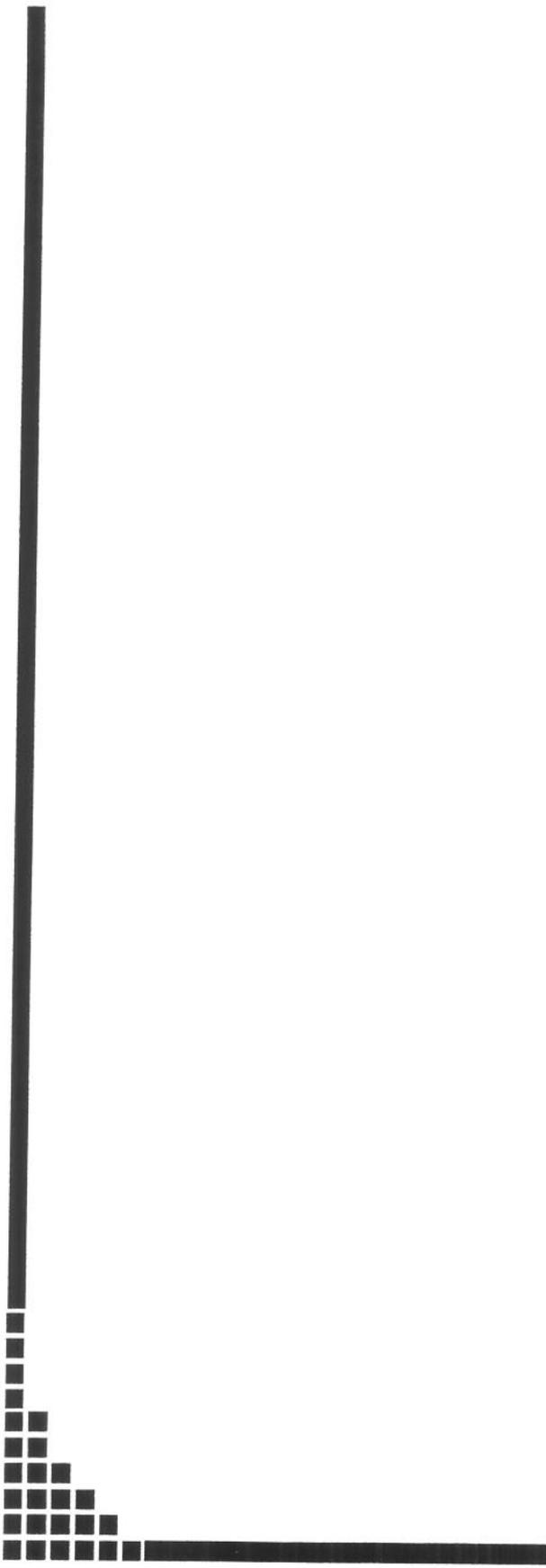
Palavras-chave: microesferas da blenda de poli(L-ácido láctico)PLLA, poli(óxido de etileno)PEO, vancomicina, histomorfometria óssea, enxertos ósseos.



ABSTRACT

The use of natural graft and synthetic materials to help bone regeneration is directly relative to cause of bone injury and bone requirement to compose a graft. The antibiotics drugs management is necessary to prevent and combat bacterial agents that could retard the tissue repair. The aim of this study was to evaluate the bioabsorbable polymeric implants antibiotic associated behavior during the bone healing. Poly(L-lactic acid)PLLA/poly(ethylene oxide)PEO microspheres blends 80:20 vancomycin associated bone implants, was compared with PLLA/PEO blend without vancomycin. The implants were inserted in a 3 mm proximal tibiae defect in adult Wistar rats. Periods from 2 and 4 days and 1, 2, 4, 8 16 and 32 weeks were evaluated in 5 animals per group. The histological findings were similar among groups. A fibrin net and hemorrhage were observed primarily around the microspheres and both were progressively replaced by granulation tissue. In four-day implant, the initial bone formation around microspheres was noted. The growth of bone tissue was initially characterized by wolvern bone with progressive maturation to lamellar bone, centripetally to microspheres group. The quantity of new bone growth, measured by histomorphometric method and semi-quantitative analysis showed no differences between groups in each experimental interval. Therefore we conclude that mixing vancomycin chloridrate into PLLA/PEO microspheres did not affect the bone regeneration. Besides, the PLLA/PEO vancomycin associated microspheres allowed the osteointegration. For those reasons, the material could be used as bone graft, helping the bone repair. In addition, the associating with antibiotic drugs could be useful to prevent infections during bone healing.

Keywords: microspheres blend of poly(L-lactide acid)PLLA / poli(ethylene oxyde)PEO, vancomycin, bone infections, bone histomorphometry.



1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Histofisiologia do Tecido Ósseo

O sistema esquelético é composto de 206 ossos que variam em sua forma e tamanho sendo esta variação diretamente relacionada com sua função. Os ossos são interconectados por uma variedade de articulações que permitem uma extensa gama de movimentos e, ao mesmo tempo, garantem estabilidade corporal. Bioquimicamente o tecido ósseo é definido por uma mistura de matriz orgânica e matriz inorgânica. O componente inorgânico, hidroxiapatita de cálcio $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, é o mineral que confere força e resistência aos ossos, armazenando 99% do cálcio, 85% do fósforo e 65% do sódio e magnésio corporais. O componente orgânico inclui as células ósseas e as proteínas da matriz. As células formadoras de osso incluem as células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos (ROSEMBERG, 2000). A geração e estimulação destas células são reguladas por citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento para fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (MUNDY, 1995).

As células *osteoprogenitoras* são células tronco mesenquimais, pluripotenciais localizadas ao longo das superfícies ósseas. Quando estimuladas elas têm a capacidade de entrar em processo de divisão celular e se diferenciar em osteoblastos. Este mecanismo é essencial para o crescimento, remodelagem e reparo ósseo. Os *osteoblastos* localizam-se na superfície óssea e sintetizam, transportam e organizam as proteínas da matriz, dentre elas o colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, fibronectina e sialoproteína óssea. Os osteoblastos possuem receptores na superfície celular que se ligam a muitos hormônios (dentre eles paratormônio, vitamina D e estrogênio), citocinas e fatores de crescimento e proteínas de matriz extracelular. Com a produção da matriz óssea, os osteoblastos são aprisionados passando a ser denominados de *osteócitos*. Os *osteócitos* são mais numerosos que os osteoblastos e encerrados por osso, comunicam-se entre si através da emissão de prolongamentos citoplasmáticos denominados canalículos. Através destes canalículos os osteócitos promovem a troca de substratos e potenciais de membrana. Os osteócitos têm a capacidade de

detectar forças mecânicas exercidas sobre os ossos e traduzí-las em atividade biológica, como a ativação de células progenitoras através da liberação de mediadores químicos e monofosfato de adenosina (ADP). No tecido ósseo encontram-se também os *osteoclastos*, células com capacidade de promover a reabsorção da matriz óssea, importante em processos de remodelagem tecidual. Durante esta remodelagem, à medida que o osso é degradado até suas unidades elementares, são liberadas substâncias que iniciam sua renovação (ROSEMBERG, 2000).

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteoprogenitoras e tecido conjuntivo, constituindo o *endósteeo* e o *periósteeo*. As principais funções do endósteeo e do periósteeo são, respectivamente, a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento, remodelagem e reparo ósseo. O tecido ósseo é formado por *osso compacto*, também conhecido como osso cortical, e por *osso esponjoso*, constituído pelas trabéculas ósseas. As cavidades dos ossos esponjosos são preenchidas por medula óssea composta por tecido hematopoiético e/ou tecido adiposo. Histologicamente o osso compacto e o esponjoso diferenciam-se por sua organização. O osso compacto apresenta as fibras colágenas organizadas paralelamente em sentido único, o que é chamado de lamelação. Esta lamelação é encontrada ao redor de canais que servem de espaço para a passagem de vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição e trocas metabólicas do osso, sendo denominados de canais de Havers. Já o osso esponjoso não possui canais de Havers e apresentam somente a lamelação das fibras colágenas. A nutrição e trocas metabólicas do tecido, neste caso, são realizadas por difusão através do endósteeo. O tecido ósseo também se diferencia em *imaturó* ou primário e *maduro* ou secundário. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes de matriz. Durante a formação óssea ou o reparo de lesões, é o tecido primário que aparece primeiro, sendo posteriormente substituído por tecido secundário. A característica morfológica do tecido primário consiste em fibras colágenas que se dispõem irregularmente, sem orientação definida, conhecido como osteóide ou "wolver bone". No tecido ósseo secundário ou lamelar, também

conhecido como osso maduro, essas fibras se organizam em lamelas adquirindo uma organização paralela em sentido único (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O osso é singular na sua capacidade de se reparar, reconstituindo-se completamente por processos de reativação que envolvem estágios histológicos, bioquímicos e biomecânicos. Imediatamente após uma fratura, a ruptura de vasos sanguíneos produz um hematoma, que preenche a lacuna da fratura e circunda a área da lesão óssea. Isso também gera uma malha de fibrina que ajuda a vedar o local da fratura, servindo de arcabouço para o influxo de células inflamatórias, crescimento de fibroblastos e formação de novos vasos sanguíneos (ROSEMBERG, 2000). Ao mesmo tempo, plaquetas e células inflamatórias migratórias liberam fatores de crescimento (PDGF, TGF- β e FGF), os quais ativam as células osteoprogenitoras no periósteo, cavidade medular e tecidos moles circundantes, estimulando a atividade osteoblástica e osteoclástica. Subseqüentemente, as células osteoprogenitoras ativadas depositam tecido ósseo dentro da cavidade medular. As células mesenquimais ativadas dos tecidos moles podem diferenciar-se em condroblastos, células produtoras de cartilagem que auxiliam envolvendo o local da fratura. Desse modo, as extremidades da fratura se unem por um calo-ósseo, que se mineraliza gradualmente aumentando a resistência mecânica do local fraturado. Nos estágios iniciais da formação do calo, um excesso de tecido fibroso, cartilagem e osso são produzidos. A medida que o calo amadurece e transmite as forças de sustentação do peso, as partes não estimuladas sofrem reabsorção, fazendo o calo diminuir até o osso readquirir sua arquitetura e formato inicial (ROSEMBERG, 2000). Entretanto, na ocorrência de perda óssea, e na dependência de seu volume, frequentemente é necessária a utilização de enxertos ósseos para auxiliar no reparo da lesão. Fraturas traumáticas, patológicas, neoplasias e doenças infecciosas são algumas das lesões mais comuns que podem afetar os ossos. Estas lesões podem causar desde distúrbios de locomoção ou movimentação até perdas significativas de massa óssea, trazendo dificuldades relacionadas ao reparo da área lesada, bem como à estabilidade do osso e manutenção de suas propriedades funcionais.

A necessidade da utilização de enxertos naturais e/ou materiais sintéticos para auxiliar no reparo ósseo é diretamente proporcional a perda tecidual nas lesões. Os enxertos ósseos naturais e os materiais sintéticos, neste caso, podem ser utilizados ainda como coadjuvantes na aplicação de próteses em grandes cirurgias, melhorando assim a osteointegração dos materiais. Na abordagem cirúrgica ortopédica destes casos, é igualmente importante a administração de substâncias antibióticas para prevenir e combater a ação de agentes bacterianos que possam vir a prejudicar o reparo da lesão.

1.2 - Enxertos Ósseos Naturais

Os enxertos ósseos naturais são classificados quanto à sua origem como *heterógenos*, *alógenos* e *autógenos*. São conhecidos por *heterógenos* os enxertos cujo organismo doador é de espécie diferente do organismo receptor; enxertos *alógenos*, quando o organismo doador e o receptor são diferentes, porém da mesma espécie; enxertos *autógenos*, quando o osso provém do mesmo organismo, apenas de local diferente. Os locais comuns de obtenção dos enxertos ósseos são a crista ilíaca, fíbula e tíbia. Estruturalmente, os enxertos podem ser compostos de osso compacto, osso esponjoso ou da combinação destes (figura 1). Quando existe a necessidade de força mecânica, o enxerto deve ser constituído de osso compacto. O osso esponjoso possui pouca força mecânica e por este motivo deve ser utilizado em locais que não exijam força ou deve ser associado ao osso compacto quando enxertado. Neste caso, seria combinada a força mecânica do osso compacto com a propriedade de rápida incorporação do osso esponjoso. Os enxertos são necessários para auxiliar no suporte, no preenchimento e, no caso dos enxertos autógenos, como fonte de células osteogênicas durante o reparo (CHAPMAN e MADISON, 1988).

Os uso de enxertos é uma alternativa para o reparo ósseo, entretanto, a sua obtenção pode limitar seu uso. O uso de enxertos autólogos em crianças é limitado pois o volume de reserva óssea é pequeno, e a necessidade de retirada

de fragmentos dos dois ossos ilíacos aumenta a morbidade. O risco de sangramento excessivo é maior e conseqüentes cicatrizes muitas vezes extensas e dolorosas permanecem nos locais doadores, levando ao desconforto maior do paciente. Em pacientes adultos, a retirada de fragmentos do osso ilíaco e da fíbula para enxertos, dependendo da extensão da lesão a ser reparada, pode não ser suficiente havendo a necessidade do cirurgião recorrer a banco de ossos. Existe ainda a restrição na retirada de ossos para enxertos autógenos em pacientes com mutações genômicas, como a displasia fibrosa polioestótica, uma vez que a mutação poderá estar presente no tecido ósseo de forma generalizada, mesmo que esse não desenvolva a doença. Outra situação limitante na enxertia, são pacientes portadores de diabetes mellitus, pacientes imunossuprimidos e transplantados, onde é maior o risco de infecções pós-operatórias (BOYCE, et al. 1999, SKINNER, 2000).

Sabe-se que os enxertos ósseos autógenos possuem, além de suas propriedades mecânicas, células osteogênicas e fatores de crescimento ósseo, caracterizando-o como importante agente osteoindutor no reparo tecidual. Já os enxertos alógenos, provindos de banco de ossos, por serem submetidos à processos de esterilização por exposição ao óxido de etileno, irradiação por raios gama ou serem submetidos à processos de resfriamento convencional em congeladores biológicos e resfriamento à seco (liofilização) (BOYCE et al., 1999), perdem sua capacidade osteoindutora, devido a morte de células osteogênicas e inativação de fatores de crescimento. Existe ainda, com relação aos enxertos alógenos, o risco de rejeição e contaminação viral e bacteriana. O processo de esterilização e resfriamento utilizados comumente nestas amostras, pode não ser suficiente para eliminar, por exemplo, o vírus da imunodeficiência adquirida – H.I.V e o vírus da hepatite (COOK et al., 2000).

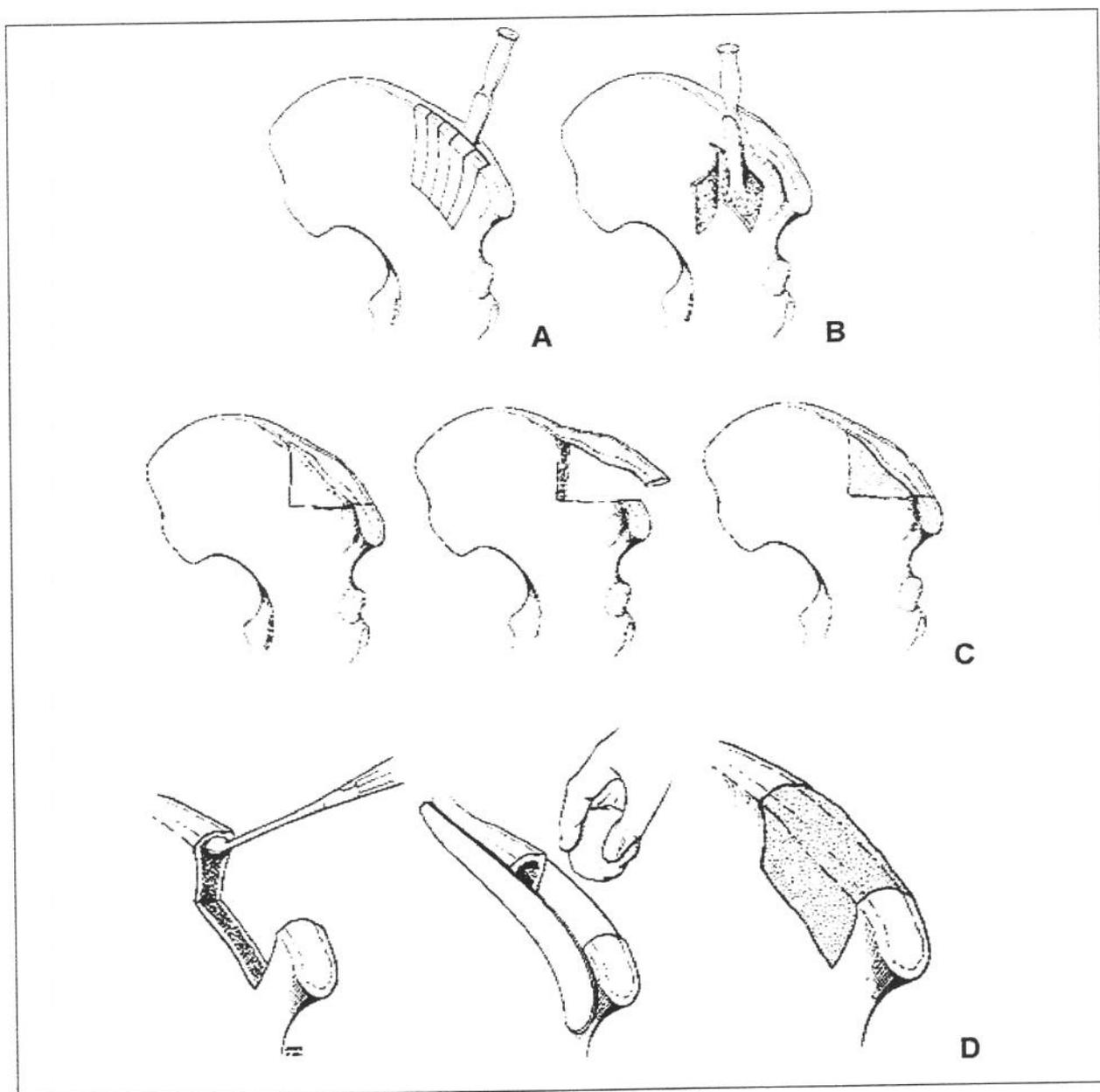


Figura 1 - Esquema ilustrando o método de retirada de enxertos ósseos da crista ilíaca. **A.** Obtenção de osso corticoesponjoso da superfície ilíaca lateral com a utilização de cortes longitudinais paralelos. **B.** Obtenção de "janela" no osso cortical para acesso ao osso esponjoso. **C.** Grandes fragmentos de osso ilíacos são obtidos com a manutenção do contorno da crista. **D.** A restauração do contorno do osso ilíaco após a retirada do enxerto pode ser feita com cimentos ósseos, moldados no próprio local. (HSU et al., 1995).

Frente às limitações na utilização de enxertos ósseos naturais, as pesquisas biomédicas voltaram-se para estudos com materiais sintéticos que pudessem substituir os naturais. Estes materiais sintéticos são denominados de biomateriais e vêm sendo utilizados na terapêutica substituindo ou sendo utilizados junto aos enxertos ósseos, ou até mesmo na substituição de segmentos ósseos, reparo de fraturas ou reparo de malformações ósseas congênitas. Dentre os biomateriais pode-se citar os *metais*, *cerâmicos*, *poliméricos não-bioabsorvíveis* e os *poliméricos bioabsorvíveis*.

1.3 - Materiais Metálicos

A primeira fixação óssea interna data de 1775, a qual foi contestada devido as reações teciduais que os implantes poderiam causar. Mais tarde, em 1829, iniciou-se um estudo com implantes constituídos de vários tipos de materiais, constatando ser a platina mais compatível com os tecidos quando implantada. Em 1880, os cirurgiões deram início aos implantes metálicos estéreis, para evitar as reações infecciosas que vinham sendo constatadas. Em 1866 foi dado início ao uso de placas e parafusos para reconstruções ósseas após fraturas. Desde então, as pesquisas voltaram-se para testes com vários tipos de metais, dentre eles o cobalto, vanádio, cromo, níquel e tungstênio. As pesquisas foram realizadas em humanos e animais onde o objetivo era estudar as reações inflamatórias causadas pela liberação de partículas que ocorriam durante a corrosão destes materiais. Desde o início de 1950, a utilização de ligas metálicas em cirurgias de reconstrução óssea crescia progressivamente. Até os dias atuais, a clínica ortopédica continua utilizando-se destes materiais para cirurgias reconstrutivas, onde as pesquisas voltadas para esta área permitem a confecção de implantes metálicos mais adaptados química e mecanicamente para o tecido ósseo (CHEUNG et al.,2003).

Aço inoxidável e ligas metálicas a base de ferro são utilizadas por exemplo como próteses acetabulares sendo utilizado também como placas de fixação interna, pinos, parafusos, superfícies articulares e segmentos de ossos

longos (figura 2-A). Avanços na ciência de materiais têm tornado materiais a base de cobalto e ligas a base de titânio mais resistentes para o uso ortopédico como implantes de uso permanente (COOK et al., 2000).

O uso de materiais metálicos (titânio, aço inoxidável e algumas ligas metálicas como titânio e níquel Ti-Ni) na confecção de placas e parafusos tem sido considerado um método seguro, entretanto, existem desvantagens relacionadas ao uso destes metais. Dentre elas, necessidade de novas cirurgias para retirada do material implantado após o reparo da lesão, e a transferência de estresse mecânico que leva a refraturas, as quais inibem o uso destes produtos. No caso de implantes metálicos permanentes, existe ainda a possibilidade de oxidação do material, o que é morfológicamente demonstrado através de metalose tecidual (OTTOVIANI et al., 2005). A oxidação leva à corrosão do material o que é caracterizada por um processo de reações químicas que enfraquecem o metal. Todos os metais corroem quando implantados e a intensidade da corrosão é determinada pela composição química do metal. O aço inoxidável, por exemplo, corroe mais facilmente que os metais a base de cobalto e ligas a base de titânio (COOK et al., 2000).

Além da corrosão, o desenvolvimento de neoplasias junto à implantes metálicos tem sido constatada. Desde os últimos 40 anos, quando o primeiro caso foi reportado, a causa específica ainda está para ser estabelecida. A incidência de neoplasias adjacentes a implantes de aço inoxidável foi relatada por Mc DONALD et al. (2002), onde se discute a incidência de angiossarcoma adjacente à placas de aço inoxidável utilizadas para fixação de fraturas de fêmur. Mc DONALD et al. (2002) afirma que, apesar da literatura registrar casos de neoplasias malignas adjacentes à implantes metálicos, a evidência concreta que estes implantes levam ao desenvolvimento de tumores não foi constatada. Mesmo assim os autores sugerem uma vigilância continuada sobre o uso destes materiais.

1.4 - Materiais Cerâmicos

Uma alternativa aos materiais metálicos tem sido o uso de cerâmicas à base de fosfato de cálcio, como por exemplo a hidroxiapatita sintética (HA) (NINOMIYA et al., 2001). A HA é um exemplo de substância que vem sendo investigada devido à sua característica estrutural semelhante ao osso, além de sua capacidade osteoindutiva.

Através da história, a busca por materiais análogos aos ossos e que pudessem substituí-lo em cirurgias ortopédicas é longa. Em 1668 houve um relato isolado de enxerto ósseo bem sucedido realizado por JOB van MEEKEREN que reparou o defeito de calota craniana de um soldado russo com osso de crânio de cão (MIRANDA, 1996). Desde 1978, além dos materiais metálicos, outros materiais sintéticos vêm sendo testados. Dentre eles citam-se os materiais cerâmicos por serem muitas vezes osteocondutores. Esta capacidade é explicada pela constituição destes materiais, que são a base de fosfato de cálcio, componente presente no tecido ósseo. A porção inorgânica da matriz óssea consiste em 90% de HA. Em 1978, pesquisadores relataram a partir de observações em raio-X a similaridade das características da HA com o osso. Testes biológicos com a HA demonstraram ainda um potencial osteogênico e a ausência de sinais carcinogênicos em implantes deste material (HEISE et al., 1990).

Apesar destas qualidades, os materiais cerâmicos (figura 2-B) de maneira geral são frágeis e suscetíveis à fragmentação quando implantados. Além disso, existe o cuidado a ser tomado com relação à escolha do material e o lugar a ser implantado pois as reações químicas que ocorrem em contato com o líquido tissular e líquido sinovial, por exemplo, podem comprometer ainda mais sua resistência mecânica. As propriedades mecânicas da cerâmica dependem do tamanho dos grânulos que a compoem, porosidade, densidade e cristalinidade. A força do material geralmente aumenta com o aumento da densidade, da cristalinidade e com a diminuição dos poros. Neste caso, o material teria sua resistência aumentada e sua capacidade de interação com o tecido diminuída, devido às alterações de superfície (COOK et al., 2000).



Figura 2 - **A.** Exemplos de dispositivos metálicos utilizados na ortopedia para substituição de superfícies ósseas e próteses de ossos longos. **B.** Exemplos de dispositivos cerâmicos utilizados como substitutos de enxertos ósseos.

1.5 - Materiais Poliméricos

Polímeros são moléculas de cadeias longas que consistem em um número de pequenas repetições de seus monômeros. Dentre a grande variedade de polímeros pode-se citar os naturais como as proteínas, a celulose, latex e o ácido desoxirribonucléico (DNA). Além destes polímeros naturais, existe uma gama de polímeros sintéticos disponíveis atualmente no mercado. A tarefa da engenharia biomédica neste caso, é selecionar biomateriais poliméricos com propriedades compatíveis para sua aplicação clínica.

No intuito de buscar alternativas aos materiais metálicos e cerâmicos, ou torná-los mais resistentes e biointegráveis, vários polímeros tem sido estudados e indicados para aplicação na área biomédica. A década de 70 foi marcada pela obtenção e fabricação de polímeros de alto desempenho, como as poliimidas, poliésteres e poliétersulfonas utilizados na indústria aeroespacial que posteriormente tornaram-se alvo de interesse das pesquisas biomédicas, devido

às suas propriedades mecânicas superiores a de outros materiais e muito próximas às dos ossos. Alguns estudos utilizaram Teflon® (politetrafluoretileno-PTFE) implantado como prótese acetabular, porém reduziu-se o uso deste material devido ao desgaste e reações de rejeições teciduais às partículas liberadas (PAVANATTI 1994).

BATNIJI et al. (2002) estudaram o politetrafluoretileno expandido (ePTFE) e o silicone como enxertos subperiostais em coelhos da Nova Zelândia. Após 7, 30 e 90 dias de implantação, os autores observaram formação de cápsula de tecido fibroso ao redor dos implantes. No entanto, não houve sinais de rejeição, extrusão ou infecção persistente. Os autores concluíram ser o e-PTFE e o silicone, materiais biocompatíveis e seguros para aplicações biomédicas. Resultados semelhantes foram obtidos por GENÇ e MUTAF (2002) onde nove crianças de aproximadamente 6 anos de idade com deformidades nos ossos peitorais foram operadas e implantadas com barras de PTFE. As barras foram removidas após 6 meses da cirurgia. Os resultados foram satisfatórios em todos os casos.

Um outro polímero não-bioabsorvíveis utilizado em cirurgias ortopédicas e em implantes experimentais é o poliéster (LIU et al., 1998, KUIJER et al., 1998, DU et al., 2002 e PUUMANEN et al., 2005) . GOSAL et al. (2001) aplicaram fios de poliéster em pacientes com fratura de patela. Este procedimento foi comparado com o uso de metais em fraturas patelares. Os autores observaram que a incidência de infecções nos pacientes implantados com metais era maior em relação aos implantados com poliéster.

O poli(metacrilato de metila)PMMA, comumente usado como cimento ósseo (figura 3 – A) no reparo de lesões com perda de massa, costuma ser descrito como “ligação fraca” em uma artroplastia. Comparado com o osso cortical, o PMMA possui baixa elasticidade e propriedades mecânicas significativamente menores. A moldagem de implantes (figura 3 – B) e o uso de cimentos a base de PMMA deve ser compensada com materiais mais fortes para se evitar falhas na fixação. A baixa resistência à fadiga do PMMA deve ser atribuída primeiramente à sua porosidade. Estudos relatam que a porosidade do

PMMA aumenta e a resistência é reduzida pela mistura do polímero com monômeros de baixa temperatura. Esta mistura é realizada para aumentar a porosidade do cimento a fim de aumentar sua integração com o tecido. Além da baixa resistência mecânica, o processo de polimerização do cimento a base de PMMA causa efeitos biológicos locais. No local do implante, tecidos adjacentes tornam-se necróticos devido ao calor extremo do processo de polimerização, o qual gera temperaturas de até 100°C (COOK et al 2000).

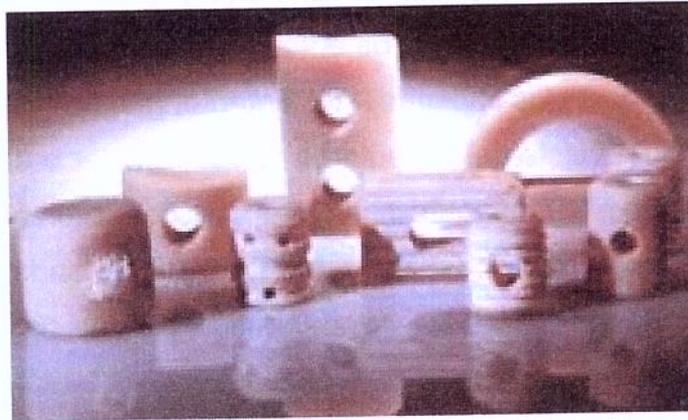


Figura 3 - Implantes para substituição de segmentos ósseos a base de polímeros não-bioabsorvíveis.

1.6 - Materiais Poliméricos Bioabsorvíveis

Os materiais poliméricos podem ser *biodegradáveis* ou *bioabsorvíveis*, podendo ambos serem *biocompatíveis*. Os materiais *biodegradáveis* são aqueles capazes de serem decompostos por bactérias ou por outros organismos. Os materiais *bioabsorvíveis* são materiais insolúveis em água que, uma vez em contato com os líquidos tissulares do organismo, sofrem reações químicas que o convertem lentamente em materiais solúveis em água (DUNN, 1991). A vantagem destes materiais está na sua degradação que ocorre em meio aquoso gerando produtos de degradação facilmente metabolizados pelo organismo (PISTNER et al., 1993). Os materiais *biocompatíveis*, são aqueles com comportamento inerte uma vez implantados em tecidos vivos ou quando expostos em culturas celulares e teciduais.

Materiais poliméricos bioabsorvíveis têm sido estudados de forma crescente nos últimos tempos, atuando como alternativa aos materiais metálicos e cerâmicos e poliméricos não biorreabsorvíveis ou, se associados a estes, auxiliando na osteointegração (GOURLAY et al., 1978, DUNN e OTTENBRITE, 1991, DESAI e HUBBELL, 1991, PISTNER et al., 1993, MEIKLE et al., 1994, HUATAN et al., 1995, BERGSMA et al., 1995, NIJENHUIS et al., 1996, MAINIL-VARLET et al., 1996, LOWRY et al., 1997, KREITZ et al., 1997, SAHLI et al., 1997, MAINIL-VARLET et al., 1997, NIE et al., 1998, KANELAKOPOULOU et al., 1999, BICHARA et al., 1999, ROKKANEN et al., 1999, RAGEL e VALLET-REGÍ, 2000, ROESSLER et al., 2000, ZOPPI et al., 2001, CIAPETTI et al., 2003, ELFICK et al., 2004, UENG et al., 2004).

Como exemplo de materiais bioabsorvíveis existem alguns polímeros que apresentam vantagens sobre os materiais metálicos, pois durante o processo de reparo, esses polímeros mantêm a fixação do osso, degradando-se lentamente e transferindo o estresse mecânico recebido pelo material para o tecido. Além disso, estes materiais não precisam ser removidos cirurgicamente, reduzindo além de custos, traumas relacionados a cirurgias para retirada de implantes (ROKKANEM et al., 1999).

O poli(L-ácido láctico) PLLA é um dos polímeros mais investigados para aplicação clínica, como por exemplo na liberação controlada de drogas, em fios de sutura e implantes para a fixação de fraturas ósseas, oferecendo vantagens sobre os sistemas convencionais usados na terapêutica, devido a sua característica bioabsorvível (ANDREOPOULOS et al., 2000).

Baseados em resultados favoráveis obtidos com modelos experimentais (ROZEMA et al., 1990 e BOS et al., 1991), os autores BERGSMA et al. (1995) iniciaram a observação do PLLA em humanos. Neste estudo, pacientes com fraturas de zigomático foram tratados com placas e parafusos de PLLA. Os autores observaram reparo completo das áreas ósseas lesadas e presença do polímero por longo período, causando inchaço local em alguns pacientes, no

entanto, sem prejudicar a osteossíntese. KANKARE e ROKKANEM (1998) também utilizaram implantes de PLLA em pacientes com fratura de tálus. Radiografias pós-operatórias mostraram a exata redução da fratura em todos os pacientes, não encontrando sinais de infecções ou qualquer complicação relacionada ao biomaterial.

ARAI et al. (2000) utilizaram o PLLA como fixação em reconstruções cranianas em pacientes com craniosinostose. Três pacientes foram submetidos à cirurgia onde o PLLA foi utilizado na forma de placas e parafusos. Como todos os pacientes apresentaram reparo satisfatório com ausência de sinais de infecção e inflamação local, os autores concluíram que os implantes de PLLA foram eficazes como placas e parafusos para reconstruções cranianas no caso de craniosinostose infantil.

Embora o PLLA esteja atraindo a atenção da área biomédica, sabe-se que sua velocidade de absorção é lenta, o que pode ser indesejável em algumas aplicações, principalmente em lesões de pequena proporção (ROKKANEN et al., 1999). Uma alternativa é controlar a velocidade de absorção deste polímero promovendo sua mistura a outro polímero que se degrade em velocidade maior, o que é chamado de blenda polimérica (do inglês *blend*=mistura).

EDWARDS et al. (1999) e EDWARDS et al. (2001) utilizaram parafusos compostos de poli (L-ácido lático/poli ácido glicólico) PLLA-PGA para fixação de osteotomias maxilares e mandibulares. Os autores concluíram que os parafusos de PLLA/PGA apresentaram resultados clínicos comparáveis às fixações com parafusos metálicos, sem apresentar sinais de osteólise e outras reações indesejáveis.

Um outro exemplo de blenda composta por polímeros bioabsorvíveis é a de poli(L-ácido lático) PLLA e poli(óxido de etileno) PEO. Assim como o PLLA, a aplicação biomédica do PEO é de especial interesse devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade (DESAI e HUBBELL, 1991). Entretanto,

apesar de o PLLA e o PEO apresentarem boa compatibilidade, a realização de mais testes faz-se necessária para o total conhecimento de suas propriedades e de seu comportamento no reparo ósseo tecidual, antes de prosseguir com aplicações clínicas.

Ensaio *in vitro* para caracterização da blenda PLLA/PEO foram realizados por ZOPPI et al. (2001), o que permitiu a utilização de implantes subcutâneos de membranas de PLLA e da blenda PLLA/PEO em ratos. Estes autores observaram a formação de camada de tecido fibroso ao redor dos implantes que diminuiu de espessura gradualmente durante a absorção do material. Os autores observaram também, que a blenda PLLA/PEO tornou-se porosa durante o período experimental, absorvendo-se mais rápido que as membranas de PLLA puras.

Resultados semelhantes foram encontrados em implantes ósseos destes materiais, onde pinos desta blenda foram implantados na tíbia de ratos. Neste trabalho, CORAÇA (2002) observou a formação de fendas nos pinos de PLLA/PEO que permitiu o crescimento tecidual para seu interior e melhor interação com o osso, quando comparado com implantes de PLLA puros.

O PLLA também tem sido utilizado em pesquisas biomédicas envolvendo a liberação controlada de drogas. As primeiras pesquisas com polímeros voltadas para esta área, foram autorizadas e aprovadas pela FDA – Food and Drug Administration, sendo vários os polímeros que demonstram sucesso na associação com drogas para liberação controlada, podendo ser estes materiais administrados via oral, injetável, implantável, de uso tópico e de administração transdermal (DUNN e OTTENBRITE, 1991).

Dentre os trabalhos que investigam os biomateriais e sua aplicação clínica, alguns investigam o comportamento do PLLA associado a drogas antibióticas no reparo tecidual, na presença de infecções (KREITZ et al., 1997, NIE et al., 1998). Entretanto, não existem trabalhos realizados com o PLLA associado ao PEO e drogas antibióticas nestas circunstâncias.

A morfologia do material a ser associado com drogas para implantes é um fator importante devido à cinética de liberação das drogas. A associação polímero/droga mais comumente utilizada na terapêutica de lesões ósseas acompanhadas de infecção é a de esferas de PMMA com drogas antibióticas. Entretanto como já foi discutido, as desvantagens do PMMA envolvem a necessidade de retirada do material em implantes temporários já que o PMMA não é um polímero bioabsorvível. Materiais poliméricos bioabsorvíveis são melhores neste caso por permitir a liberação da droga por um tempo controlado, não requerer novas cirurgias para retirada dos mesmos, e como já demonstrado em estudos anteriormente citados, são materiais inertes que afastam possibilidade de rejeição ou intensas reações inflamatórias (UENG et al., 2004).

Visto que em estudos anteriores, a blenda de PLLA/PEO apresentou biocompatibilidade e se integrou de maneira satisfatória ao tecido ósseo durante o reparo (CORAÇA, 2002), este trabalho promoveu a continuidade nas investigações deste material em associação com antibiótico buscando verificar sua aplicação como adjuvante de cirurgias ortopédicas reparadoras seguidas de osteotomias, conciliando o efeito da blenda na reparação óssea e do antibiótico na prevenção de infecção da ferida cirúrgica.



2 - OBJETIVOS

Avaliar o comportamento de implantes compostos por microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina no reparo ósseo tecidual.

2.1 - Objetivos Específicos

A - Análise morfológica (qualitativa e semi-quantitativa) do reparo ósseo tecidual na presença de implantes compostos por microesferas de PLLA/PEO associadas à vancomicina, comparando com implantes de PLLA/PEO sem associação com a vancomicina, em diferentes períodos experimentais.

B - Estudo quantitativo de osso neoformado junto aos implantes de PLLA/PEO ao longo dos períodos experimentais nos dois grupos propostos.

C - Estudo comparativo entre achados quantitativos e semi-quantitativos quanto à proliferação óssea junto aos implantes.



3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) de acordo com RISSING et al. (1985) e MEHRARA et al. (1999). Para as cirurgias os animais contavam com oito semanas de idade e foram obtidos do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram divididos em 2 (dois) grupos sendo:

- ♦ **A** – 40 animais implantados com microesferas de PLLA/PEO associados a vancomicina.
- ♦ **B** – 40 animais implantados com microesferas de PLLA/PEO puras, utilizadas como controle.

Foram avaliados 5 animais por subgrupo (tempo de exposição ao implante) nos dois grupos experimentais, sendo:

Tabela 1 - Divisão dos grupos experimentais.

Sub / Grupos	2 dias	4 dias	1 semana	2 semanas	4 semanas	8 semanas	16 semanas	32 semanas
Microesferas de PLLA/PEO + vancomicina	5	5	5	5	5	5	5	5
Microesferas de PLLA/PEO puras	5	5	5	5	5	5	5	5

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no centro cirúrgico do biotério da SOBRAPAR – Sociedade Brasileira de Pesquisa e Assistência para Reabilitação Crânio-Facial. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em gaiolas de plástico com três animais cada, em biotério sob luz e ventilação controladas, fornecimento de ração sólida Nuvilab CR-1 marca Nuvital e água sem restrição.

Os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (COBEA-IB-UNICAMP) de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal sob certificado de número 339-1.

3.2 - Obtenção das Microesferas

As microesferas obtidas de PLLA/PEO estudadas neste trabalho, foram testadas previamente em ensaios *in vitro* onde detectou-se que a liberação do cloridrato de vancomicina ocorria em um período de 24 horas à 6 dias (figura 4). Nestes ensaios constatou-se também o melhor comportamento da blenda PLLA/PEO 80:20 em relação à outras concentrações, no que diz respeito ao tempo de liberação da droga (CERONI-FILHO,2004), o que possibilitou a escolha desta concentração da blenda para a realização deste estudo.

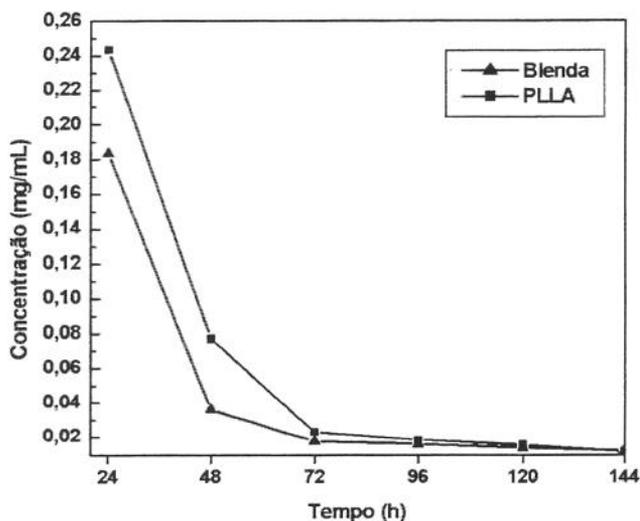


Figura 4 - Curva de liberação do cloridrato de vancomicina pelas microesferas de PLLA/PEO 80:20 em testes *in vitro* (CERONI-FILHO, 2004).

As microesferas de PLLA/PEO foram obtidas através da fundição do poli(L-ácido lático)PLLA e do poli(óxido de etileno)PEO na composição de 80/20 (figura 5). Foi utilizada para isso uma injetora Mini Max Molder modelo LMM-2017 onde as quantidades dos polímeros foram adicionadas na injetora previamente aquecida a 190°C. Os polímeros foram aquecidos por 1 (um) minuto no interior do molde sob pressão do pistão e posteriormente cisalhados por dois minutos com

leve pressão para que o material misturado pudesse ser coletado por gravidade. A blenda em forma de bastão foi então resfriada a temperatura ambiente. A sequência dos eventos encontram-se na figura 5.

Meio grama da blenda PLLA/PEO 80/20 na forma de bastão foi então solubilizada em 10 ml de diclorometano (DCM) até a completa dissolução. A solução polimérica, foi adicionada 0.75 ml de solução do cloridrato de vancomicina à 6,65% (MADER et al., 1999) sob severa agitação formando assim uma emulsão. A esta emulsão adicionou-se solução de poli(álcool vinil) PVA 1%. Esta foi colocada em uma solução de PVA 0,2 %. Esta emulsão, composta por estruturas em forma de bolhas quando adicionada ao polialcool vinil permitiu a obtenção da blenda polimérica na forma de microesferas, separadas da solução pela formação de um sobrenadante. Uma vez formadas as microesferas estas foram coletadas adicionando-se solução de isopropanol a 2%. A solução foi submetida à agitação severa até a evaporação total do DCM e as microesferas foram coletadas por filtração e secas por filtração a vácuo. Sequência de eventos ilustrada na figura 6.

As microesferas obtidas foram posteriormente comprimidas para facilitar o manuseio durante os procedimentos cirúrgicos. Uma vez comprimidas, as esferas foram esterilizadas em óxido de etileno. As microesferas de PLLA/PEO apresentaram diâmetro médio de 200 à 300 μm . Poros foram observados em sua superfície após a caracterização do material, realizada previamente à implantação (figura 7 e 8 e anexos 4 e 5). Os procedimentos envolvidos na obtenção das blendas poliméricas e sua caracterização foram realizados na Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP.

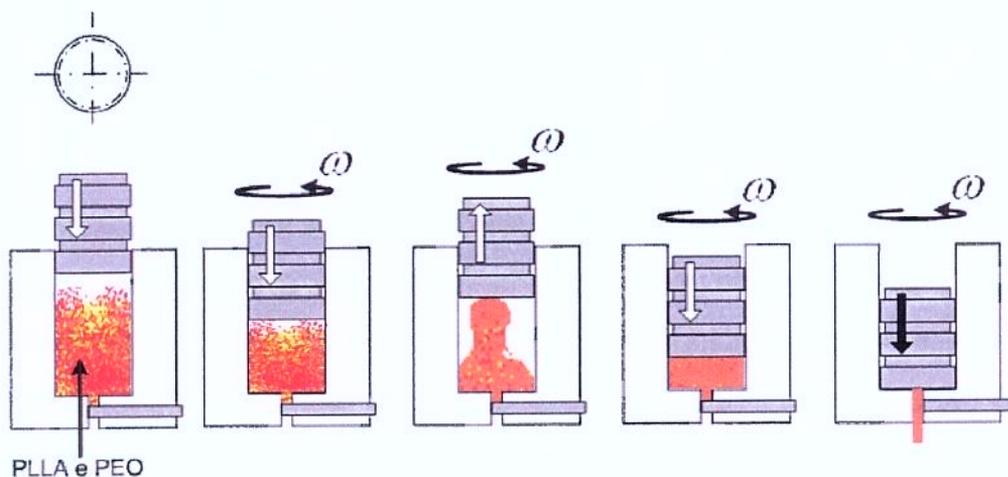


Figura 5 - Representação gráfica da obtenção da blenda PLLA/PEO (80:20) com o uso da injetora Mini Max Molder.

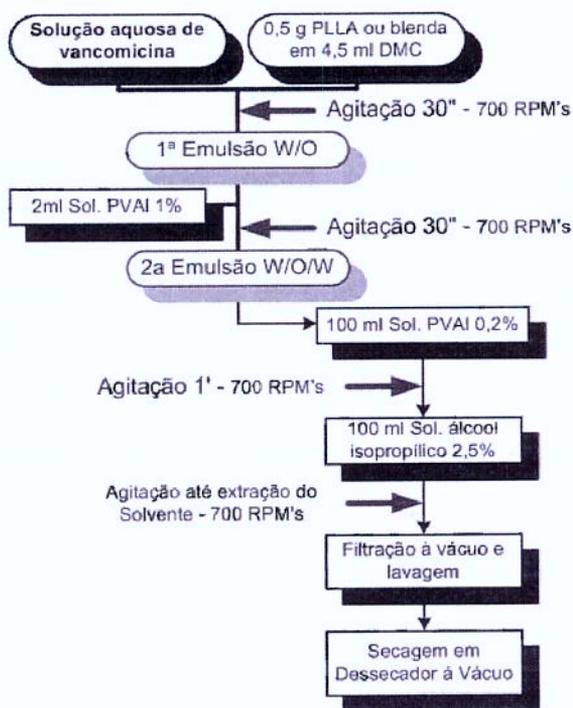


Figura 6 - Fluxograma da metodologia aplicada na obtenção das microesferas de PLLA/PEO 80:20 com o cloridrato de vancomicina.

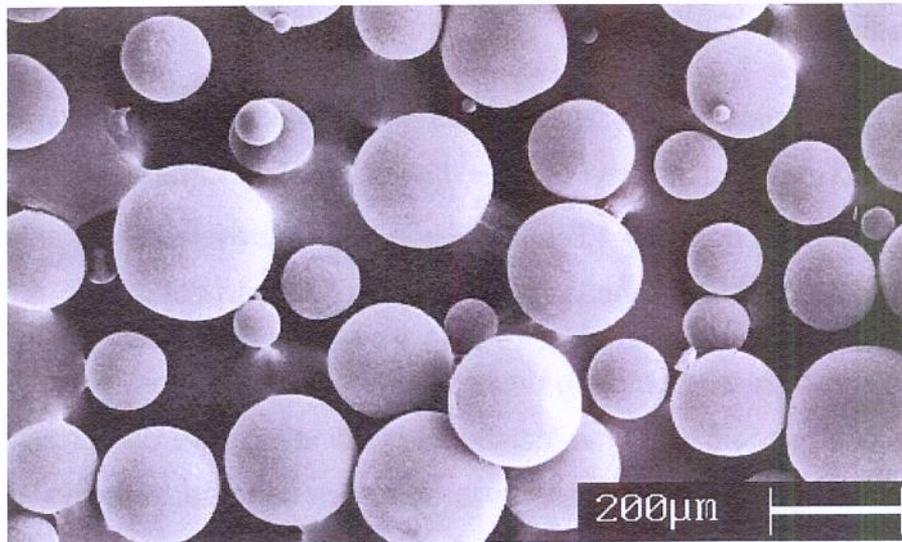


Figura 7 - Fotomicrografia de varredura das microsferas da blenda de PLLA/PEO 80:20 (CERONI-FILHO, 2004).

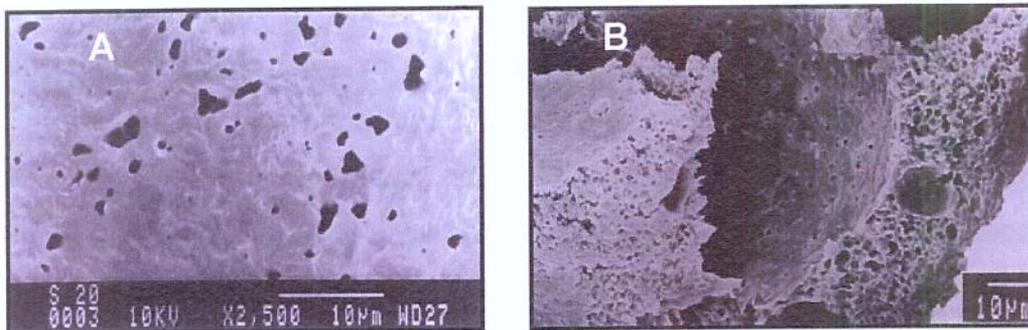


Figura 8 - Fotomicrografia de varredura das microsferas da blenda PLLA/PEO 80:20 durante o estudo *in vitro*. **A.** Após a vigésima semana de degradação *in vitro*. **B.** Fotomicrografia obtida após fratura de uma microsfera mostrando a estrutura de poros em seu interior. (CERONI-FILHO, 2004).

3.3 - Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram submetidos à anestesia geral com solução de Cloridrato de Xylasina (Virbaxyl 2%®) + Ketamina (Francotar®), administrada por via intramuscular na dose de 1,5 ml/kg. Uma vez anestesiados os animais foram colocados em placa de contenção na posição de decúbito dorsal.

Foi realizada tricotomia da região medial do membro traseiro esquerdo e assepsia local, seguida de uma incisão longitudinal na pele de aproximadamente 1(um) cm ao longo da borda anterior da tíbia. Em seguida, o tecido muscular foi seccionado e afastado até a exposição do periósteo. Exposto o periósteo, este foi rebatido até a exposição do tecido ósseo. Com o uso de um motor odontológico e uma broca, foi produzida uma cavidade de 3 mm de diâmetro no terço proximal da tíbia, a partir da camada cortical até atingir o canal medular. Durante este procedimento a área foi continuamente irrigada com solução fisiológica para evitar o aquecimento local e lesões no tecido. Após a obtenção da cavidade, o conteúdo da cavidade medular foi sugado e as trabéculas ósseas rompidas com auxílio de uma agulha. As amostras compactadas contendo as microesferas foram colocadas diretamente no interior do canal medular. Imediatamente após a colocação dos implantes, o periósteo foi reposicionado em seu local original e o tecido muscular suturado. Em seguida a pele foi suturada e em sua superfície aplicou-se solução anti-séptica. A sequência dos procedimentos cirúrgicos está ilustrada na figura 9.

Finalizado os períodos experimentais de 2 dias, 4 dias, 1, 2, 4, 8 e 16 e 32 semanas, todos os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia. Em seguida as tíbias foram dissecadas, removidas e imersas em solução de formalina 10%.

O planejamento previu a reposição de animais na ocorrência de perdas visando a manutenção do número de casos por grupo, nos diferentes períodos experimentais.

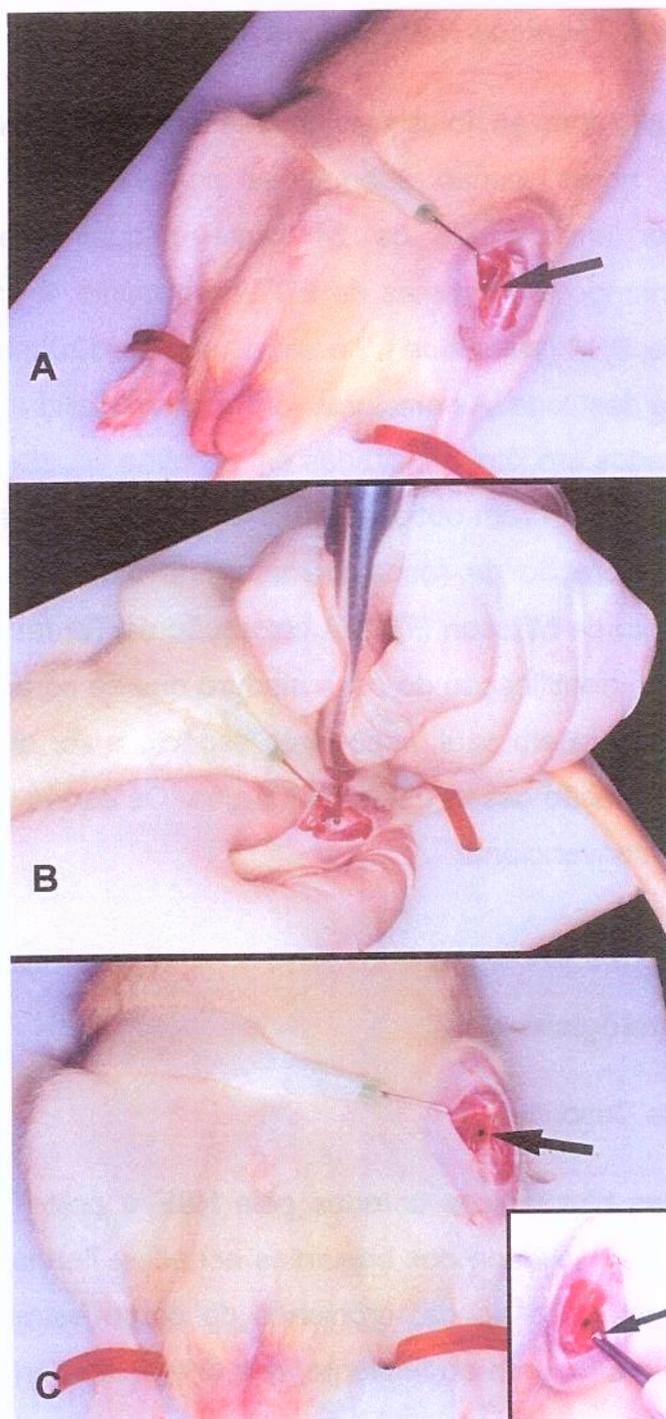


Figura 9 - **A.** Animal posicionado em decúbito dorsal com incisão realizada na pele e exposição da tíbia (seta). **B.** Obtenção da cavidade na tíbia com auxílio de broca acoplado em motor odontológico. **C.** Cavidade obtida no terço proximal da tíbia pronta para a colocação do implante (seta). **Detalhe:** após raspagem interna do canal medular, colocação do implante com auxílio de uma pinça (seta).

3.4 - Procedimentos Técnicos Histológicos

Foram utilizadas as tíbias previamente fixadas em formalina 10% por 48 (quarenta e oito) horas, sendo submetidas posteriormente ao processo de descalcificação por um período de 24 (vinte e quatro) horas em solução descalcificante contendo: 0,7 gramas de EDTA tetrasódio, 8 gramas de tartarato de sódio e potássio, 0,14 gramas de tartarato de sódio e 120 ml de ácido clorídrico em 900 ml de água destilada. As amostras foram então desidratadas em gradiente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina líquida para confecção de blocos para microtomia. Foram obtidos cortes de 6 μm de espessura, submetidos aos métodos de coloração de rotina Hematoxilina e Eosina (HE) e coloração especial de Tricrômio de Masson (TM). A coloração de TM foi realizada pois esta permite uma melhor identificação do osso maduro que se cora em vermelho, e do osso jovem que se cora em azul, importante aspecto a ser observado durante a avaliação da neoformação óssea e sua maturação. Os cortes foram avaliados em microscopia de luz convencional.

3.5 - Análises Histológicas

3.5.1 - Análise Descritiva

Os cortes histológicos corados pela H&E e pelo TM foram avaliados quanto à presença e qualidade dos seguintes achados: fibrina/hemorragia; tecido de granulação; inflamação aguda; crônica e de corpo estranho, e proliferação óssea imatura e madura junto ao implante, nos diferentes períodos experimentais em ambos os grupos.

3.5.2 - Análise Semi-quantitativa

O estudo semi-quantitativo foi baseado na avaliação de cortes histológicos corados pela H&E e/ou TM. Foram considerados os seguintes quesitos morfológicos e quantificados da seguinte forma:

Tabela 2 - Quesitos morfológicos e método de quantificação das análises semi-quantitativas.

		Intensidade			
		Ausente (0)	Leve (1)	Moderado (2)	Intenso (3)
Quesitos Morfológicos	Fibrina/hemorragia H&E/Objetiva 10X	-	Ocupando até 1/3 do campo microscópico	Ocupando até 2/3 do campo microscópico	Ocupando de 2/3 à totalidade do campo microscópico
	Inflamação Aguda H&E/Objetiva 40X	-	Ocupando até 1/3 do campo microscópico	Ocupando até 2/3 do campo microscópico	Ocupando de 2/3 à totalidade do campo microscópico
	Tecido de Granulação H&E e TM	-	Presente apenas periféricamente ao implante	Periféricamente e se projetando para o interstício do grupo de esferas	Periféricamente e preenchendo todo o interstício do grupo de esferas
	Proliferação óssea H&E e TM	-	Presente apenas periféricamente ao implante	Periféricamente e se projetando para o interstício do grupo de esferas	Periféricamente e preenchendo todo o interstício do grupo de esferas
			Grau 1	Grau 2	Grau 3
	Septos Conjuntivos H&E e TM	Tecido conjuntivo frouxo	Tecido conjuntivo denso	Tecido conjuntivo com ossificação parcial	Tecido conjuntivo com ossificação total

Os quesitos morfológicos observados foram revertidos em níveis de intensidade (0=ausente, 1=leve, 2=moderado, 3=intenso) para: fibrina/hemorragia, inflamação, tecido de granulação e proliferação óssea. Os septos conjuntivos, no interstício entre as microesferas, foram classificados de acordo seu grau de maturação (1=tecido conjuntivo frouxo, 2=tecido conjuntivo denso, 3=tecido conjuntivo com ossificação parcial, 4= tecido conjuntivo com ossificação total). Os dados obtidos nestas análises foram posteriormente submetidos à testes estatísticos.

3.6 - Análises Quantitativas

Este estudo baseou-se na análise quantitativa da proliferação óssea formada junto às microesferas através da técnica de histomorfometria.

Para o estudo histomorfométrico foi utilizado o programa ImageLab[®]. As fotomicrografias obtidas através de cortes histológicos corados pelo TM de todos os casos foram abertas no programa onde este permitia a marcação das áreas a serem contadas. Para a marcação foi padronizado uma área da fotomicrografia abrangendo o interior da cavidade medular contendo as microesferas e o tecido mole ou ósseo proliferado adjacientemente. Para isso foram fotografadas somente a área de crescimento tecidual ao redor do implante, onde as imagens foram captadas da borda do implante em direção ao seu interior. As fotos foram obtidas em microscópio Axiophot da marca Zeiss com câmara digital Cannon de 5Mp modelo Powershot G5, em objetiva de 20x e ocular de 10x. Foram marcadas as áreas de tecido ósseo formado junto às esferas (Figura 10). O estudo histomorfométrico foi realizado para a quantificação de área (%) de osso neoformada após os implantes. As áreas ósseas demarcadas eram medidas em percentagem e o programa emitia uma planilha (apêndice 7) com o valor correspondente de cada área marcada e do total de áreas demarcadas. O valor em percentagem total obtido nas análises foram submetidos à testes estatísticos.

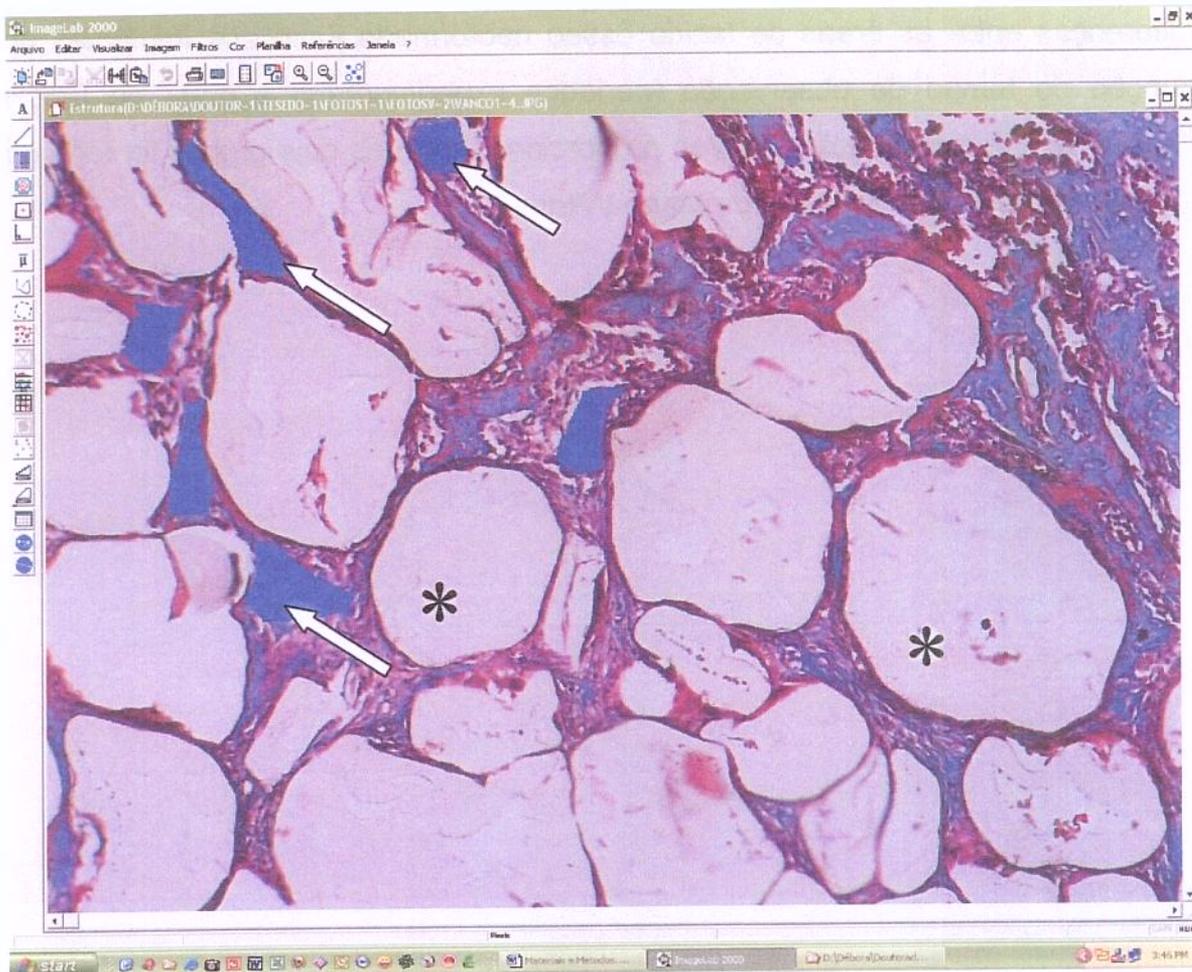


Figura 10 - Fotografia do programa ImageLab demonstrando áreas demarcadas de osso neoformado para quantificação de volume (%) ósseo (setas). Microesferas (*).

3.7 - Análise Estatística

Para as análises semi-quantitativas, a comparação da intensidade de cada variável, entre os grupos, foi feita segundo o método de Mantel-Haenszel, adotando-se a interpretação bicaudal e o nível de significância em 5% ($p < 0,05$). Os dados das análises histomorfométricas foram comparados entre animais implantados com a blenda de PLLA/PEO associada a vancomicina e animais implantados com a blenda PLLA/PEO sem associações. Foram avaliadas as

diferenças entre as áreas de tecido ósseo neoformado junto aos implantes em função do tempo de observação (períodos experimentais) a partir de função logarítmica. A comparação da área proporcional entre os dois grupos foi feita por análise de covariância e teste de Mann-Witney.



4 - RESULTADOS

4.1 - Procedimento Experimental

Durante todo o experimento entre os dois grupos, houve a perda de 6 animais, que ocorreu devido à intolerância anestésica, na fase de recuperação pós-cirúrgica. Estes animais foram repostos imediatamente após a constatação da morte, onde se respeitou a metodologia do procedimento cirúrgico, da colocação do implante, assim como o tempo de exposição aos implantes, respeitando desta forma os períodos experimentais propostos. Todos os demais animais apresentaram estado físico satisfatório sem quaisquer sinais clínicos de infecção ou outras complicações relacionadas ou não com o procedimento cirúrgico.

4.2 - Análises Histológicas Qualitativas

Os achados histológicos foram semelhantes nos grupos avaliados, nos diferentes períodos experimentais.

As microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina e as microesferas de PLLA/PEO puras foram facilmente visualizadas no interior do canal medular ao longo de todo período experimental, em todos os animais entre os grupos avaliados.

4.2.1 - 2 (dois) dias de implante

Nesta fase chamou a atenção a presença de fibrina e hemorragia junto ao implante e ao longo da cavidade medular, com extensão distal. Tecido de granulação leve a moderado ao redor e projetando-se para o interior do agregado de microesferas. Presença de malha intersticial conjuntiva delicada envolvendo as esferas marginais, esboçando septos. Focos de células inflamatórias ao redor das esferas com predomínio de neutrófilos. Não foi observada formação óssea. (Figuras 11 - A e B e 12 - A e B).

4.2.2 - 4 (quatro) dias de implante

Evidente tecido de granulação envolvendo o conjunto e todo o interstício entre as microesferas projetando-se em direção ao canal medular substituindo o lago fibrino-hemorrágico (figuras 11- C e D e 18 – A). Presença de focos de hemorragia e fibrina somente em dois animais do grupo PLLA/PEO sem vancomicina. Formação de septos conjuntivos com progressão centrípeta. Presença de proliferação óssea imatura leve na periferia do conjunto das microesferas. Raros focos de infiltrado inflamatório neutrofílico em apenas 2 animais do grupo PLLA/PEO com vancomicina. Presença de granuloma do tipo corpo estranho focal, periférico ao implante em 3 animais sendo 2 do grupo PLLA/PEO sem associação com a vancomicina e 1 animal do grupo PLLA/PEO associado à vancomicina (figura 19 – C e D).

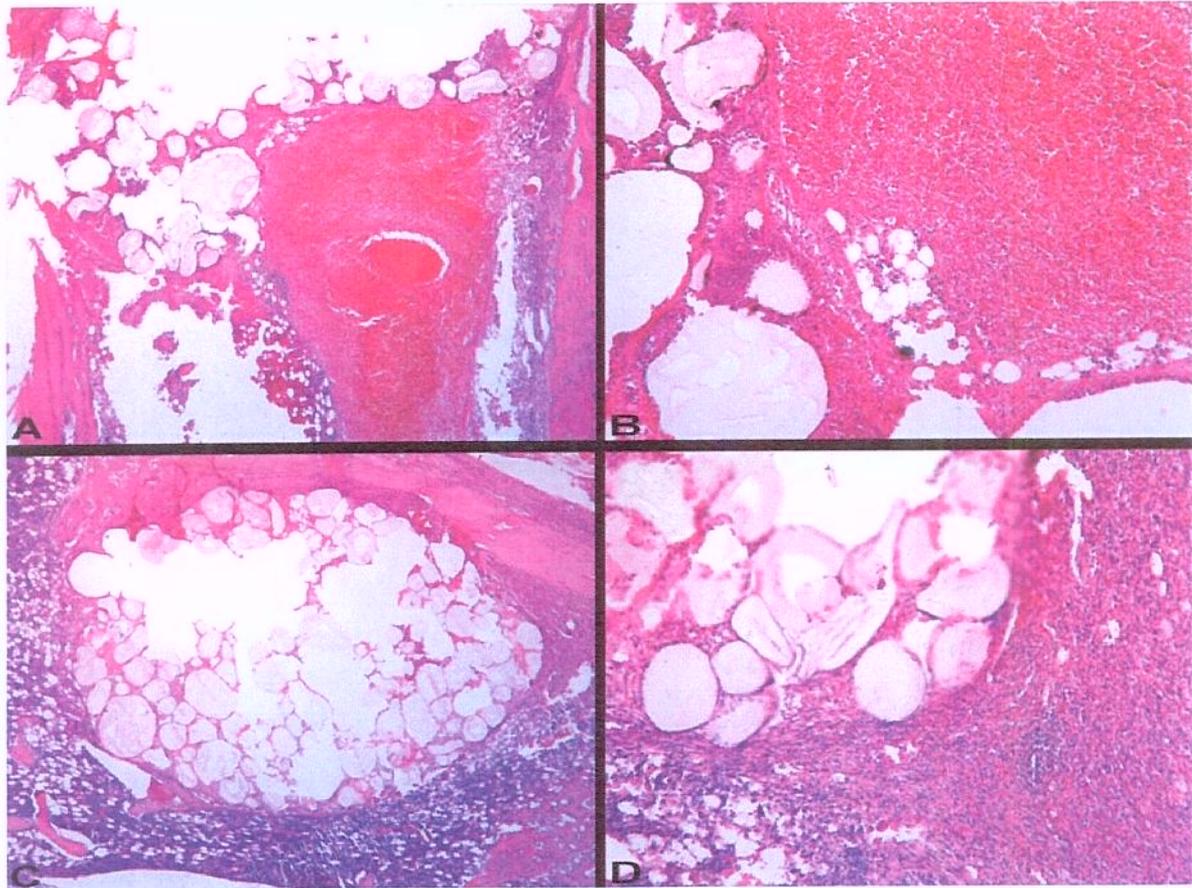


Figura 11 - Fotomicrografias dos animais implantados com microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina. **A.** 2 dias pós-implante nota-se exuberante lago fibrino-hemorrágico junto às microesferas Original 10X H&E. **B.** Detalhe do lago fibrino-hemorrágico junto às microesferas. Original 20X H&E. **C.** 4 dias após o implante, presença de tecido de granulação perifericamente e no interstício do agregado de microesferas. Original 10X H&E. **D.** 4 dias após implante, detalhe do tecido de granulação junto às microesferas, notar presença de vasos sanguíneos neoformados. Original 20X H&E.

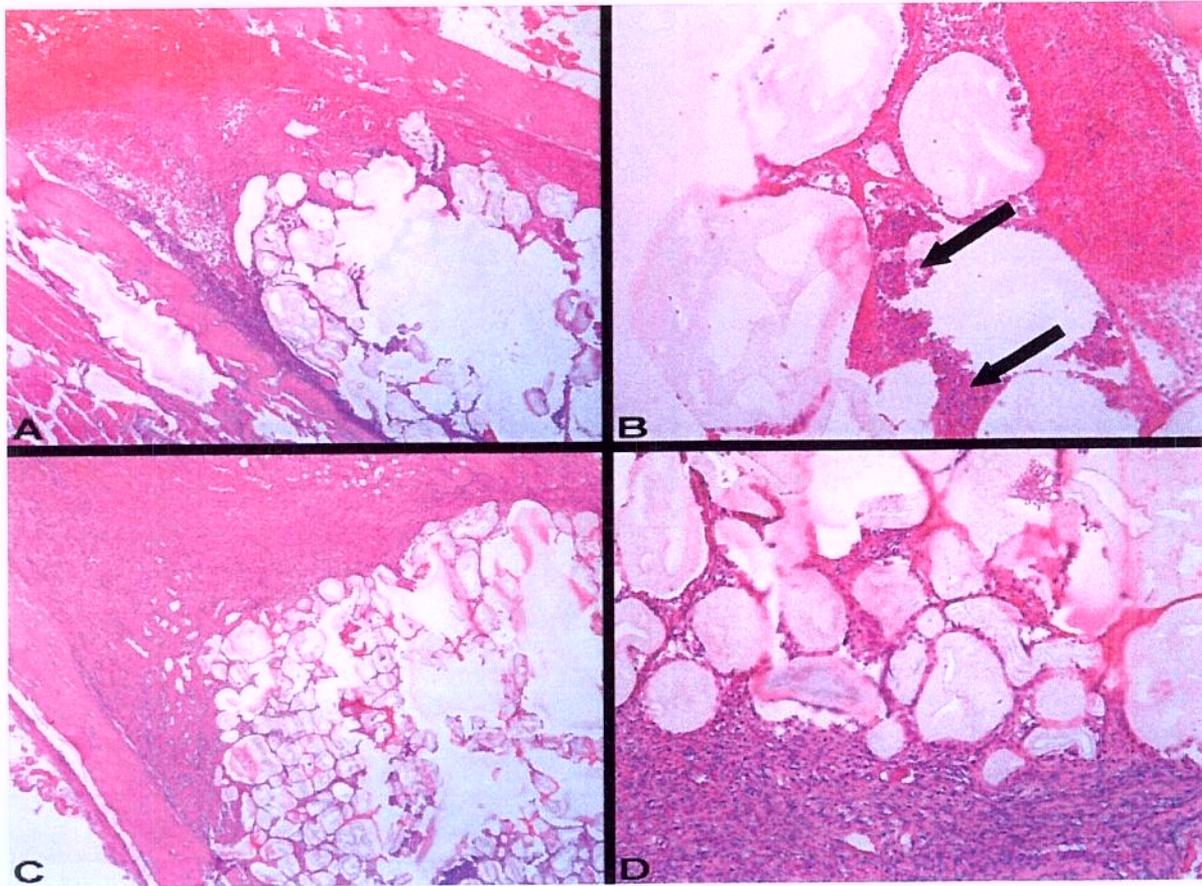


Figura 12 - Fotomicrografias dos animais implantados com microsferas de PLLA/PEO sem associação ao cloridrato de vancomicina. **A.** 2 dias pós-implante nota-se exuberante lago fibrino-hemorrágico junto às microsferas Original 10X H&E. **B.** Detalhe do lago fibrino-hemorrágico junto às microsferas e focos de infiltrado inflamatório neutrofílico (seta). Original 20X H&E. **C.** 4 dias após o implante, presença de tecido de granulação periféricamente e no interstício do agregado de microsferas, com formação de septos. Original 10X H&E. **D.** 4 dias após implante, detalhe do tecido de granulação junto às microsferas, notar presença de vasos sanguíneos neoformados. Original 20X H&E.

4.2.3 - 1 (uma) semana de implante

Observou-se proliferação septal conjuntiva celular envolvendo difusamente as microesferas. Estes septos eram compostos por elementos fusiformes mesenquimatosos do tipo fibroblastos com esboço de lumens vasculares (tecido de granulação). Um dos animais do grupo PLLA/PEO com vancomicina demonstrava ossificação parcial dos septos, periféricamente ao conjunto das esferas. Todos os animais apresentaram ossificação imatura (wolver bone) substituindo o tecido de granulação envolvente ao implante, mais evidente que o observado nos animais de 4 dias (figura 18 – C). Reação inflamatória aguda não era evidente. Presença de granuloma focal, periférico ao implante em apenas 1 animal do grupo PLLA/PEO associado à vancomicina.

4.2.4 - 2 (duas) semanas de implante

Nesta fase chamou a atenção a estruturação septal com predomínio de elementos fibrosos com áreas de substituição óssea em algumas traves. Esta neoformação óssea septal era interligada com a formação óssea marginal ao implante. Presença de remodelação óssea exuberante, caracterizada por rima de osteoblastos e osteoclastos ao redor das traves ósseas neoformadas (figura 18 – B). A proliferação óssea marginal mostrava maturação mais evidente que no grupo anterior, ou seja, com lamelação presente em algumas traves (figura 13 – C 3 D). Reação inflamatória não foi observada.

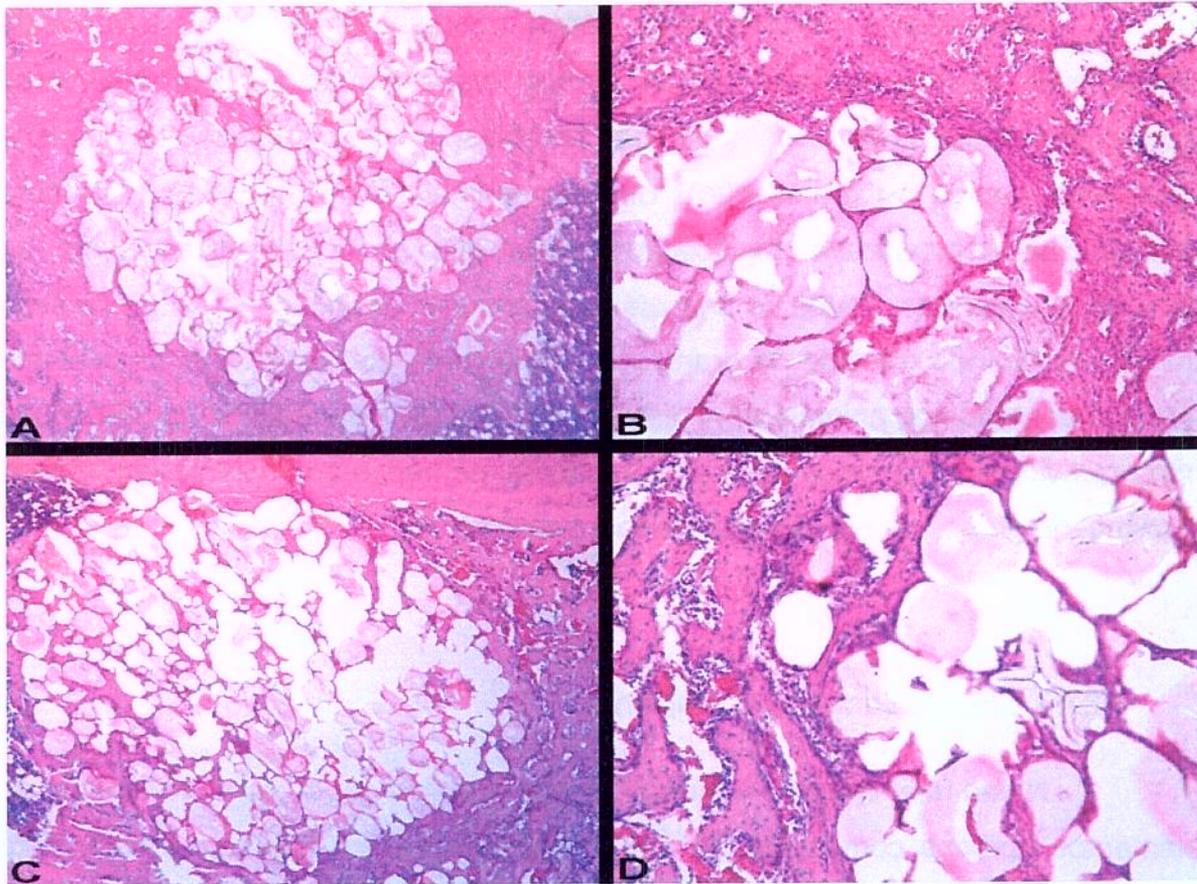


Figura 13 - Fotomicrografias dos animais implantados com microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina. **A.** 1 semana pós-implante nota-se formação de tecido ósseo junto às microesferas Original 10X H&E. **B.** 1 semana pós implante, nota-se septos conjuntivos sendo substituídos por tecido ósseo, ao redor das microesferas. Original 20X H&E. **C.** 2 semanas pós-implante, formação de osso perifericamente e entre as microesferas. Original 10X H&E. **D.** Detalhe do tecido conjuntivo dos septos sendo substituído por tecido ósseo, interligados com neof ormation óssea marginal. Original 20X H&E.

4.2.5 - 4 (quatro) semanas de implante

Septos conjuntivos com ossificação parcial em todos os animais. Proliferação óssea moderada envolvendo o conjunto das microesferas com grau de maturação discretamente maior que no grupo anterior. Reação inflamatória ausente (figura 14 – A e B e figura 15 – A e B).

4.2.6 - 8 (oito) semanas de implante

Septos conjuntivos com substituição óssea parcial em 3 animais e total em 2 animais, nos dois grupos avaliados. Traves ósseas ao redor das microesferas mais delgadas que no grupo anterior (figura 14 – C e D). Proliferação óssea e maturação mais evidente que no grupo anterior, demonstrada pela lamelação presente nas traves ósseas, principalmente na periferia. Nesta fase as traves ósseas mostraram adelgaçamento e maior contato entre as esferas, formando uma cápsula envoltória (figura 15 – C e D). Não foi observada atividade osteoclástica.

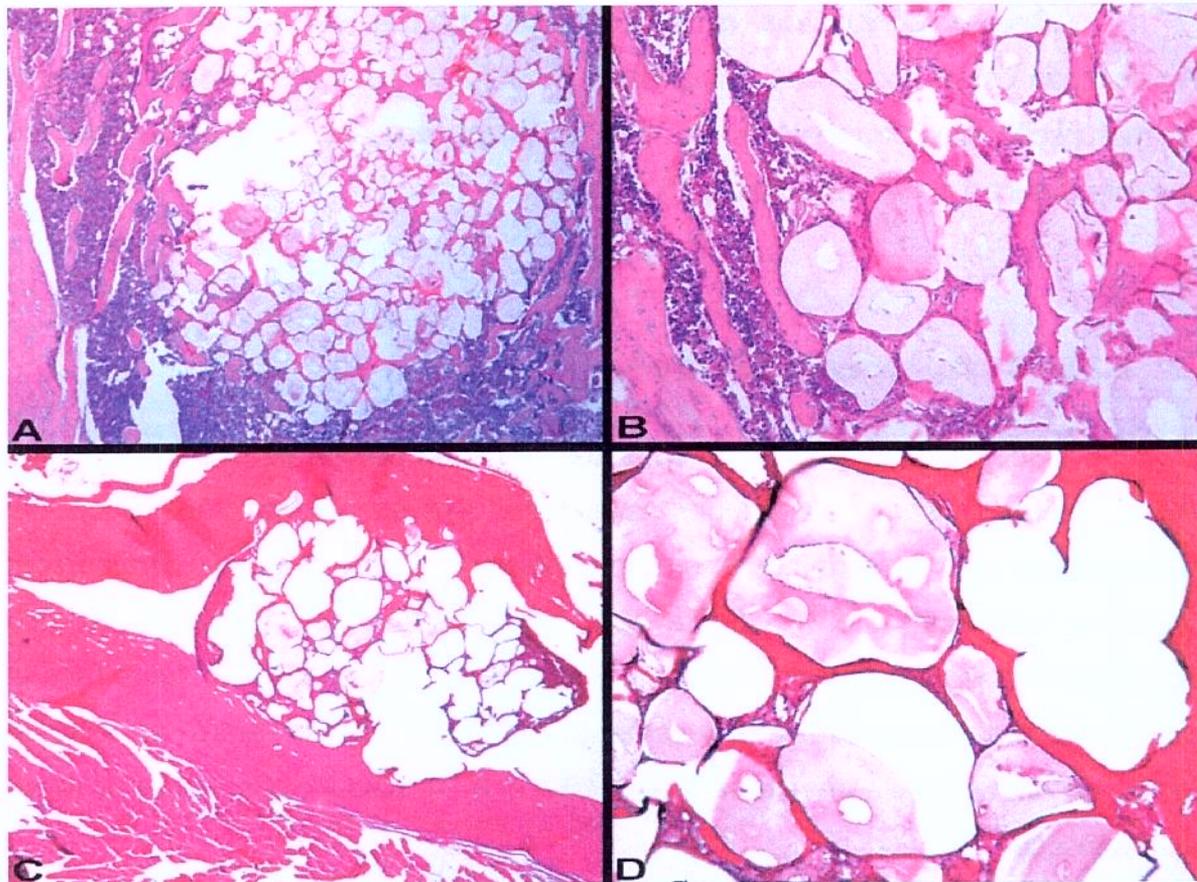


Figura 14 - Fotomicrografias dos animais implantados com microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina. **A.** 4 semanas pós-implante nota-se formação de tecido ósseo junto às microesferas Original 10X H&E. **B.** 4 semanas pós implante, nota-se traves ósseas ao redor das microesferas interpostas por células da medula óssea. Original 20X H&E. **C.** 8 semanas pós-implante, formação de osso periféricamente e entre as microesferas. Formação de cápsula óssea envolvendo o agregado das microesferas (seta). Original 10X H&E. **D.** 8 semans após o implante, detalhe do íntimo contato do tecido ósseo com as microesferas. Original 20X H&E.

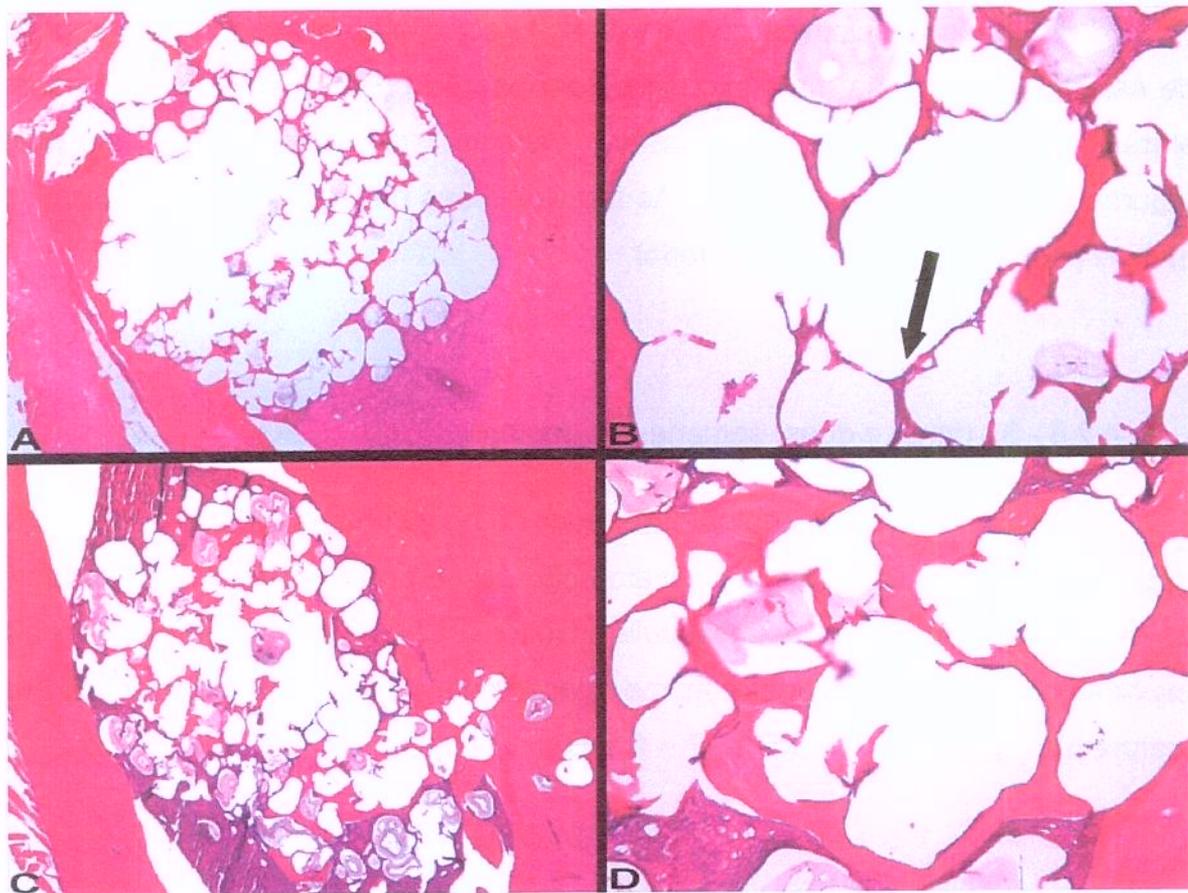


Figura 15 - Fotomicrografias dos animais implantados com microesferas de PLLA/PEO sem associação ao cloridrato de vancomicina. **A.** 4 semanas pós-implante nota-se formação de tecido ósseo junto às microesferas Original 10X H&E. **B.** 4 semanas pós implante, nota-se septos traves ósseas ao redor das microesferas interpostas por células da medula óssea (seta) pré-existente. Original 20X H&E. **C.** 8 semanas pós-implante, formação de osso periféricamente e entre as microesferas. Formação de cápsula envolvendo o agregado das microesferas. Original 10X H&E. **D.** 8 semanas após o implante, detalhe do íntimo contato do tecido ósseo com as microesferas. Original 20X H&E.

4.2.7 -16 (dezesesseis) semanas de implante

Septos conjuntivos com ossificação completa no interior do agregado de esferas. Ossificação mais intensa e com padrão predominantemente maduro entre as microesferas, formando cápsula envolvente ao implante (figuras 16 – A e B e 17 – A e B). As traves ósseas nesta fase apresentaram-se mais espessas que no período anterior.

4.2.8 - 32 (trinta e duas) semanas de implante

Ossificação dos septos e ao redor do conjunto das esferas semelhante aos animais de 16 semanas, com maturação óssea praticamente completa entre as microesferas formando uma cápsula envoltória. Chama a atenção nesta fase a exuberância do osso formado, a íntima relação com as microesferas, além de sua maturação (figuras 16 – C e D e 17 – C e D).

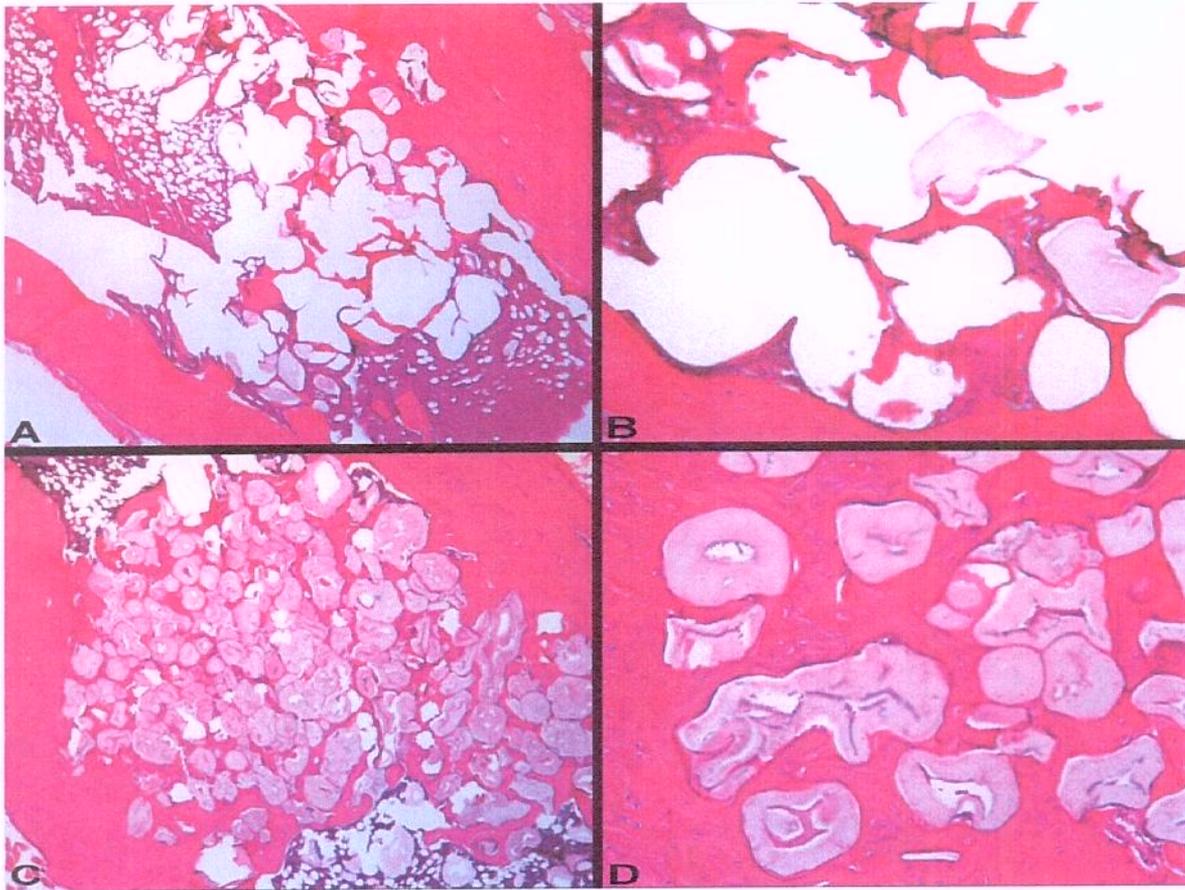


Figura 16 - Fotomicrografias dos animais implantados com microsferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina. **A.** 16 semanas pós-implante nota-se formação de tecido ósseo junto às microsferas Original 10X H&E. **B.** 16 semanas pós implante, nota-se septos traves ósseas ao redor das microsferas interpostas por células da medula óssea. Original 20X H&E. **C.** 32 semanas pós-implante, intensa formação de osso periféricamente e entre as microsferas. Formação de cápsula envolvendo o agregado das microsferas. Original 10X H&E. **D.** 32 semanas após o implante, detalhe do íntimo contato do tecido ósseo maduro com as microsferas. Original 20X H&E.

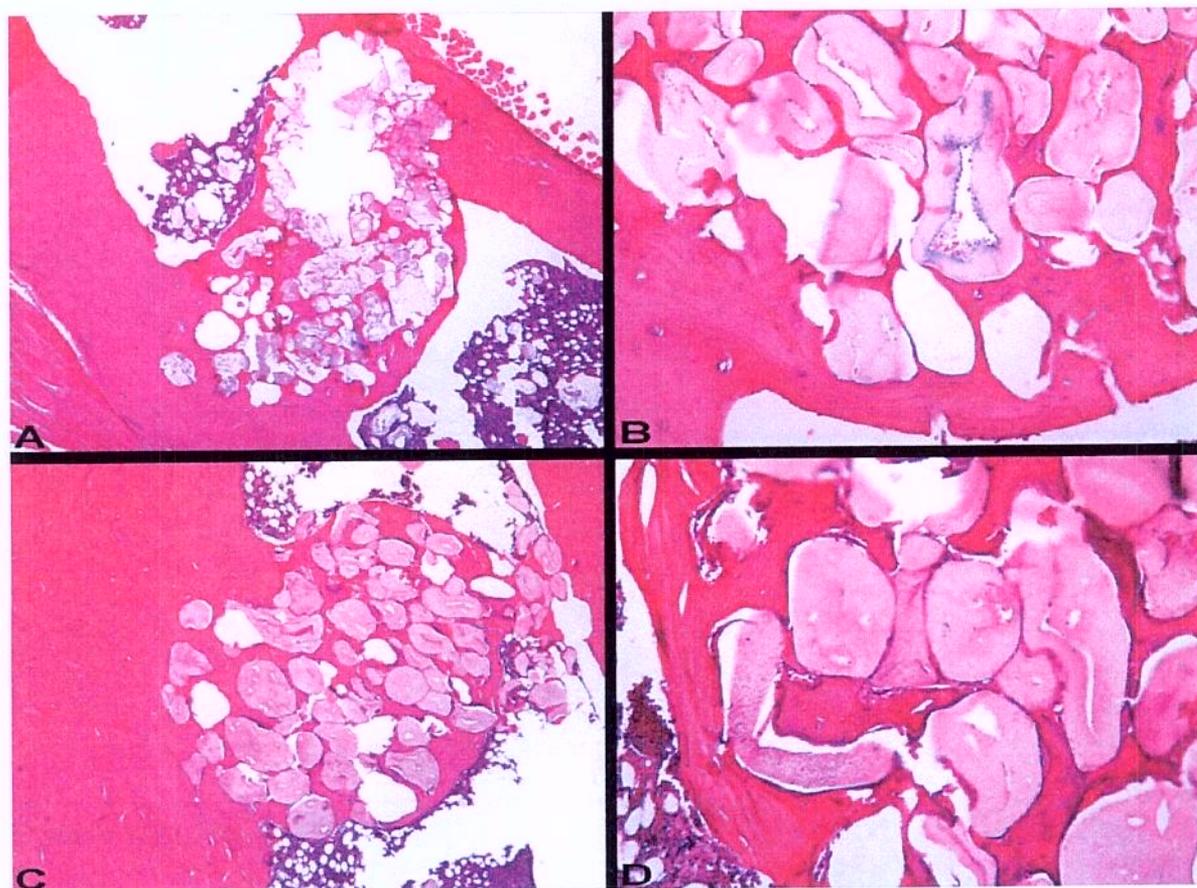


Figura 17 - Fotomicrografias dos animais implantados com microsferas de PLLA/PEO sem associação ao cloridrato de vancomicina. **A.** 16 semanas pós-implante nota-se formação de tecido ósseo junto às microsferas Original 10X H&E. **B.** 16 semanas pós implante, nota-se septos traves ósseas ao redor das microsferas interpostas por células da medula óssea. Original 20X H&E. **C.** 32 semanas pós-implante, intensa formação de osso periféricamente e entre as microsferas. Formação de cápsula envolvendo o agregado das microsferas. Original 10X H&E. **D.** 32 semanas após o implante, detalhe do íntimo contato do tecido ósseo maduro com as microsferas. Original 20X H&E.

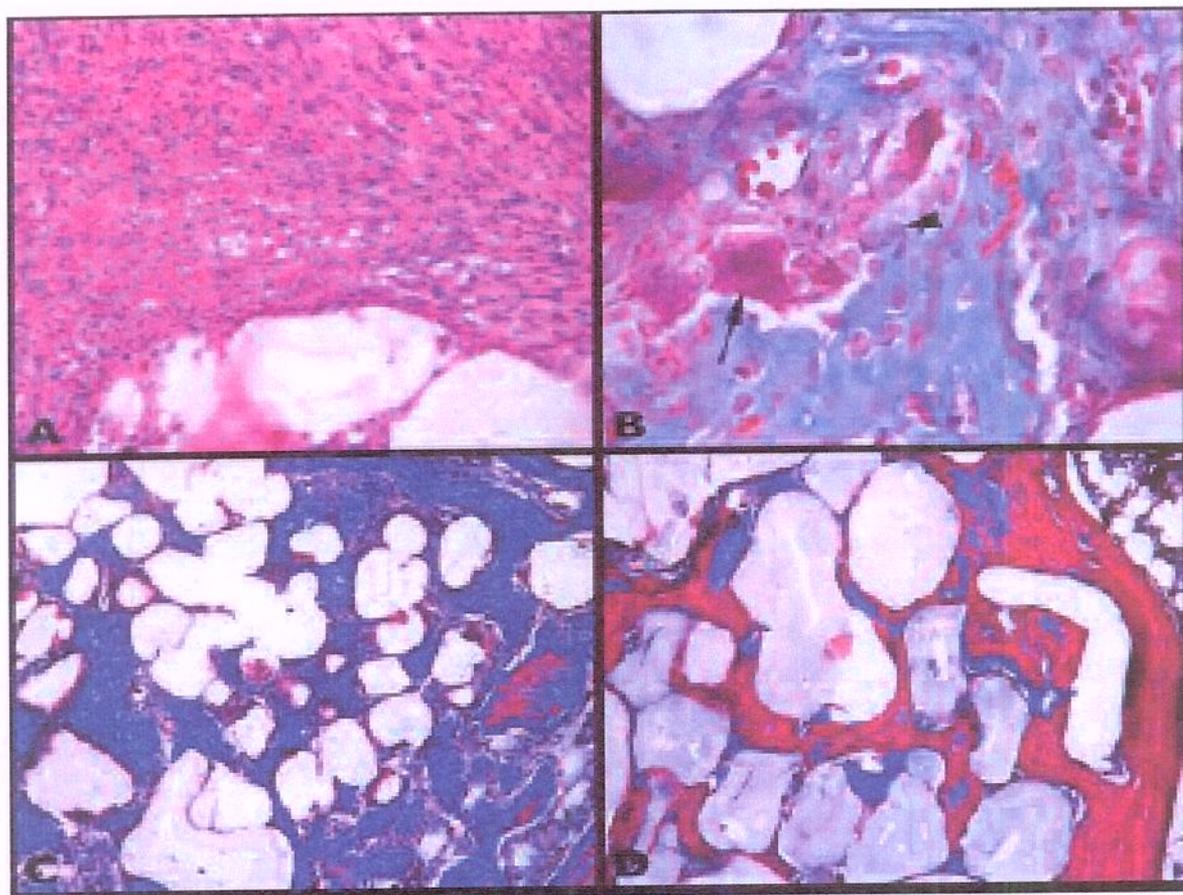


Figura 18 - A. Animal implantado com as microsferas de PLLA/PEO associadas à vancomicina, 4 dias após o implante. Notar exuberante tecido de granulação marginalmente às microsferas. H&E Original 20X. **B.** 2 semanas após o implante, remodelação óssea caracterizada pela presença de rima de osteoblastos (cabeça de seta) e osteoclastos ao redor das travas ósseas (seta). TM Original 40X. **C e D.** Período caracterizado por osso imaturo, de tonalidade azul (woven bone) ao redor das microsferas (1 semana) que torna-se maduro ou lamelar, de tonalidade vermelha (32 semanas). TM Original 10X.

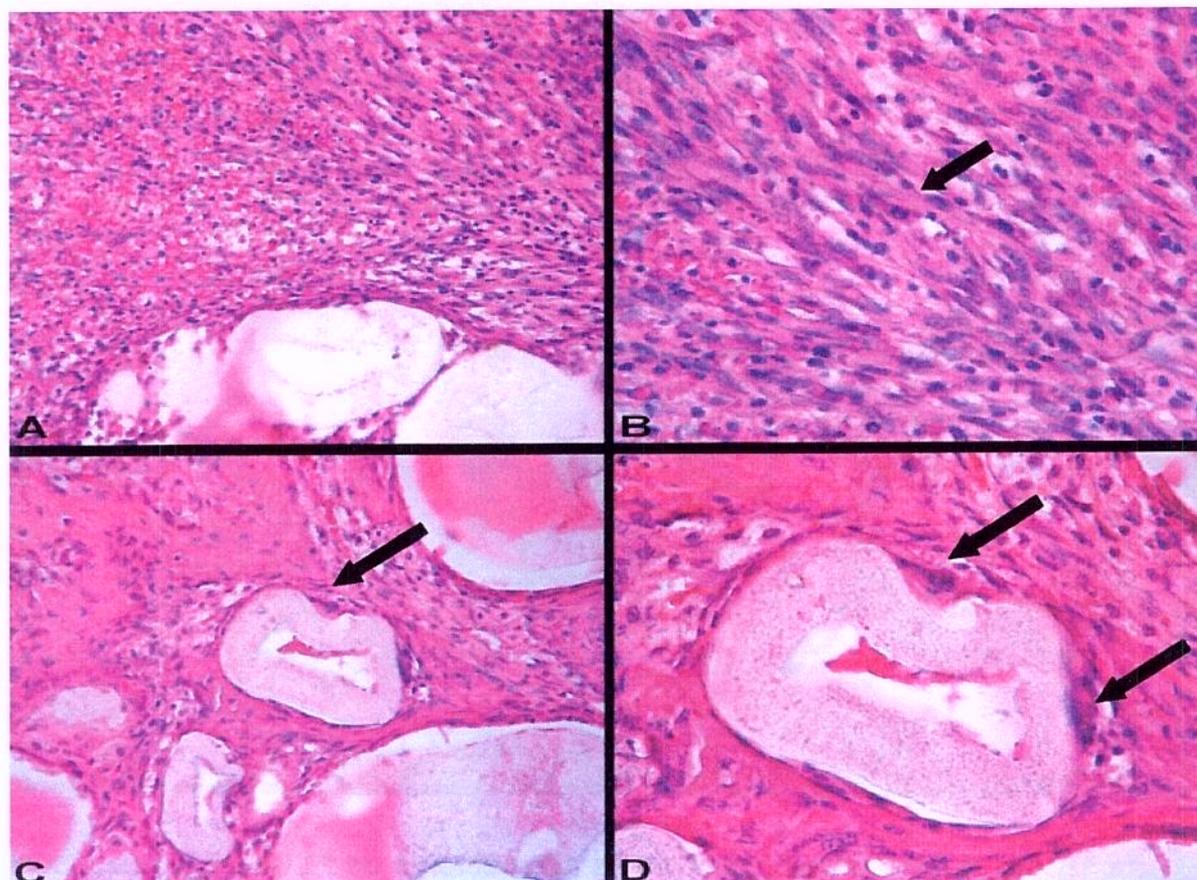


Figura 19 - A. Animal implantado com as microsferas de PLLA/PEO associadas à vancomicina, 4 dias após o implante. Notar exuberante tecido de granulação marginalmente às microsferas. H&E Original 20X. **B.** Detalhe da figura A mostrando intensa proliferação celular no tecido de granulação demonstrado por figura de mitose (seta) H&E Original 40X. **C.** No mesmo animal, presença de células gigantes de corpo estranho envolvendo a microesfera (seta) H&E Original 20X. **D.** Detalhe da figura C. H&E Original 40X.

4.3 - Análise Semi-Quantitativa

A aplicação do método estatístico escolhido permitiu não somente a comparação da ocorrência dos eventos entre os grupos analisados, em cada intervalo do período experimental, bem como sua intensidade. Os quesitos morfológicos analisados quanto ao: tecido de granulação, inflamação e proliferação óssea não mostrou diferença significativa entre os grupos nos diferentes períodos experimentais, assim como o grau de maturação dos septos conjuntivos nas diversas fases evolutivas. A tabela abaixo mostra os valores médios obtidos para as variáveis acima citadas:

Grupo		Tecido de granulação	Inflamação aguda	Proliferação óssea	Septo conjuntivo
Vancomicina	Observações	16	8	28	32
	Média	1,4375	,8750	2,1786	2,4688
	Mediana	1,0000	1,0000	2,0000	3,0000
	Moda	1,00	,00	2,00	1,00
	Desvio-padrão	,89209	,83452	,66964	1,26960
	Mínimo	,00	,00	1,00	1,00
	Máximo	3,00	2,00	3,00	4,00
Controle	Observações	16	4	28	32
	Média	1,5625	1,5000	2,0000	2,8125
	Mediana	2,0000	1,5000	2,0000	3,0000
	Moda	2,00	1,00	2,00	3,00
	Desvio-padrão	,96393	,57735	,90267	1,09065
	Mínimo	,00	1,00	,00	1,00
	Máximo	3,00	2,00	3,00	4,00
Valor de P		0,6076	0,2570	0,6383	0,4672

Os gráficos abaixo demonstram a comparação entre as intensidades e grau de maturação dos quesitos morfológicos avaliados nas análises semi-quantitativas. Estas comparações foram realizadas com os valores médios obtidos por grupo para cada variável.

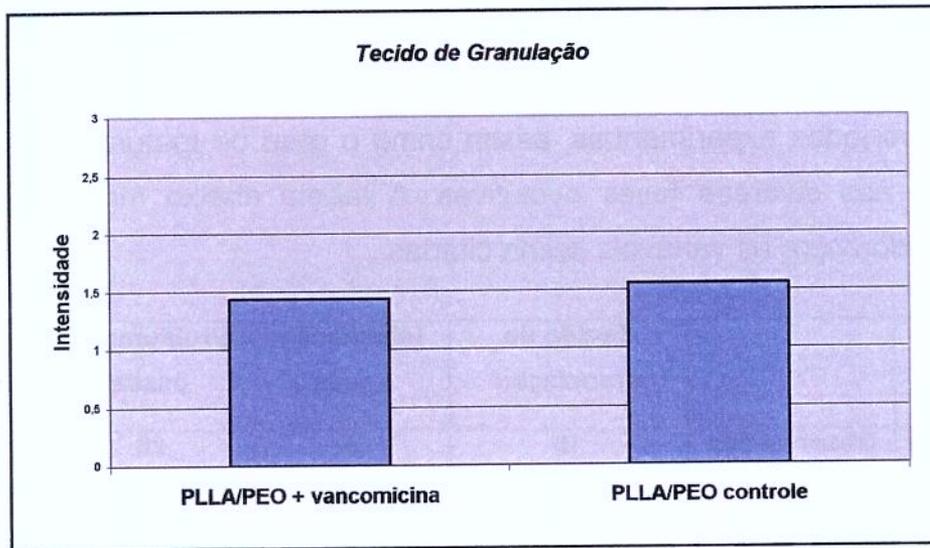


Figura 20 - Intensidade de proliferação de tecido de granulação junto às microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina e PLLA/PEO sem associação com a vancomicina (controle) onde 0=ausente, 1=leve, 2=moderado e 3=intenso.

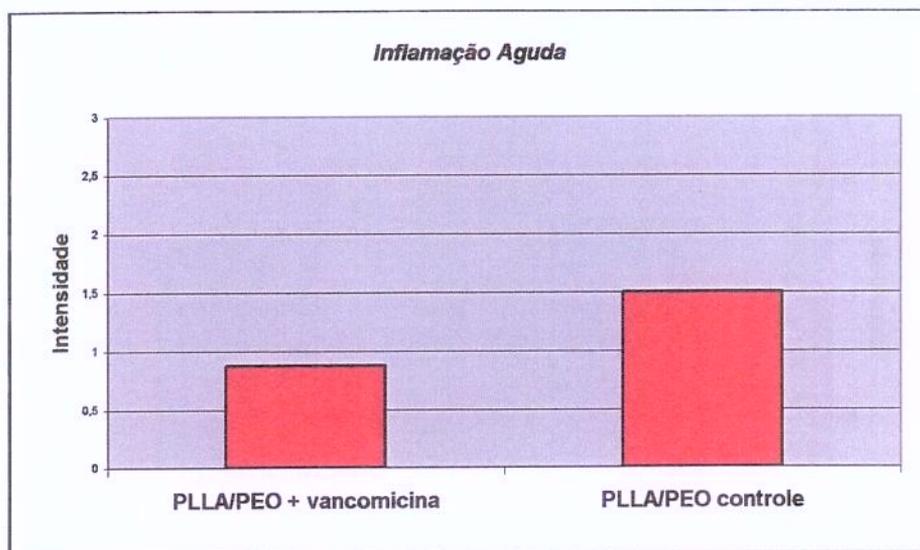


Figura 21 - Intensidade de reação inflamatória junto às microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina e PLLA/PEO sem associação com a vancomicina (controle) onde 0=ausente, 1=leve, 2=moderado e 3=intenso.

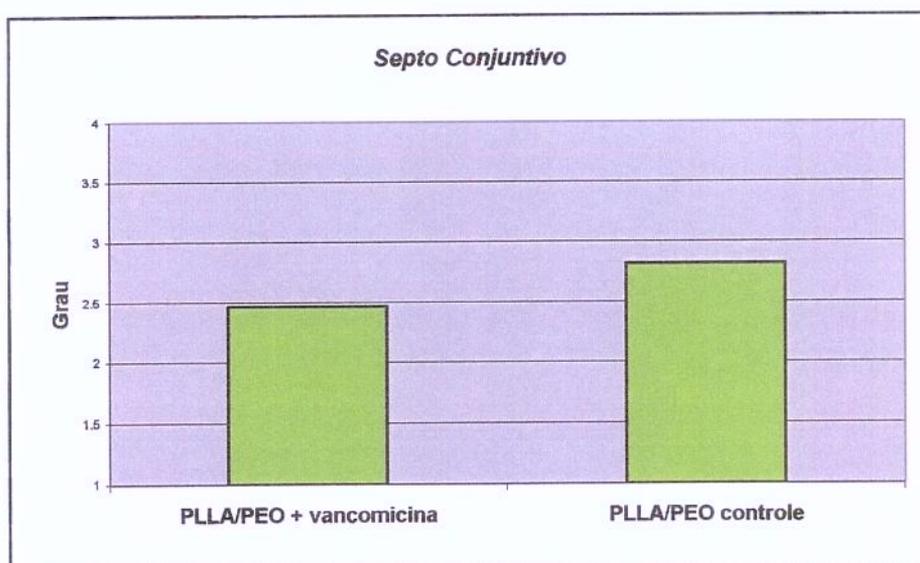


Figura 22 - Grau de maturação dos septos conjuntivos formados junto às microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina e PLLA/PEO sem associação com a vancomicina (controle) onde 1= tecido conjuntivo frouxo, 2=tecido conjuntivo denso, 3=tecido conjuntivo com ossificação parcial e 4=tecido conjuntivo com ossificação total.

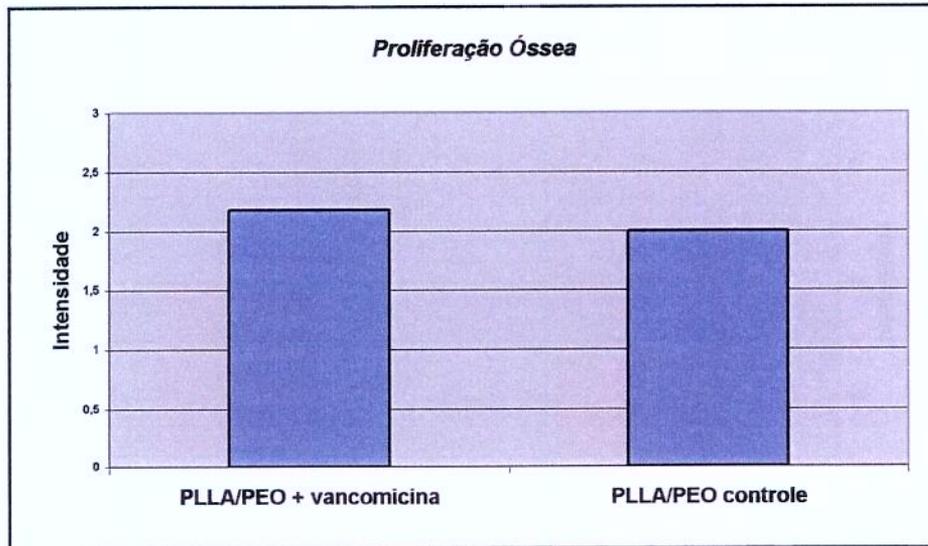


Figura 23 - Intensidade de proliferação óssea junto às microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina e PLLA/PEO sem associação com a vancomicina (controle) onde 0=ausente, 1=leve, 2=moderado e 3=intenso.

Os gráficos abaixo demonstram a progressão da formação e maturação dos quesitos morfológicos obtidos para as análises semi-quantitativas, ao longo do período experimental avaliado entre os grupos estudados.

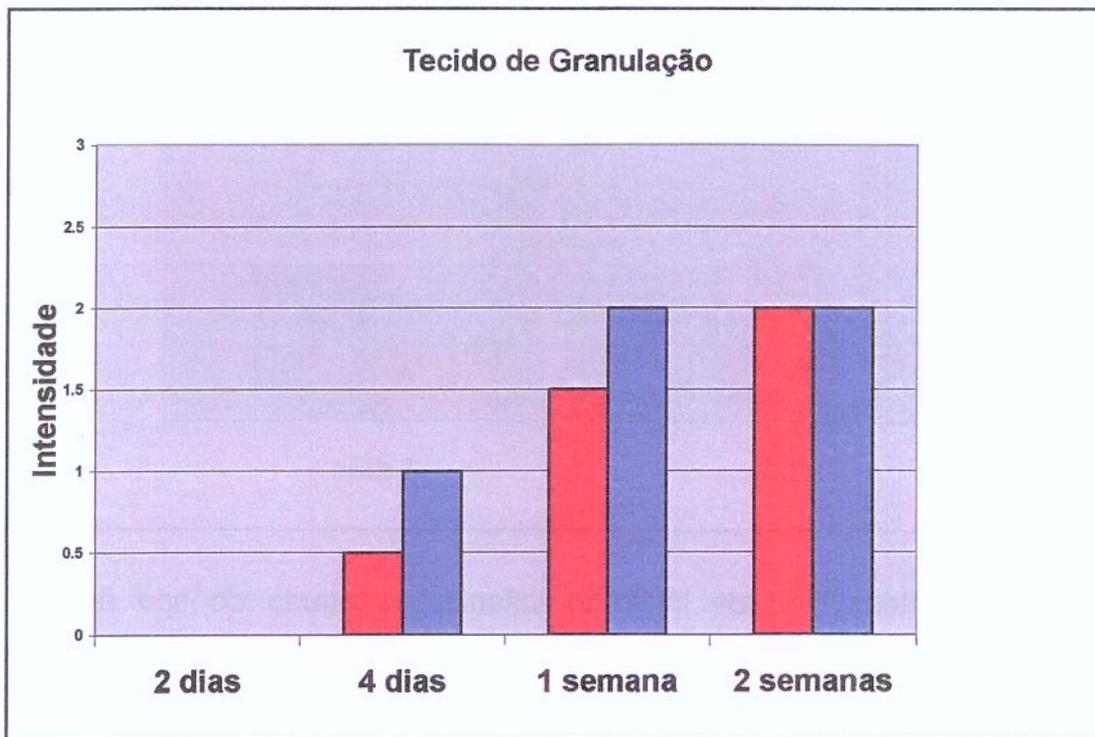


Figura 24 - Intensidade de formação de tecido de granulação. Tecido de granulação presente somente até a segunda semana de implantação, estando ausente nos outros períodos. 0=ausente, 1=leve, 2=moderado e 3=intenso. **VERMELHO = PLLA/PEO + vancomicina / AZUL= PLLA/PEO controle.**

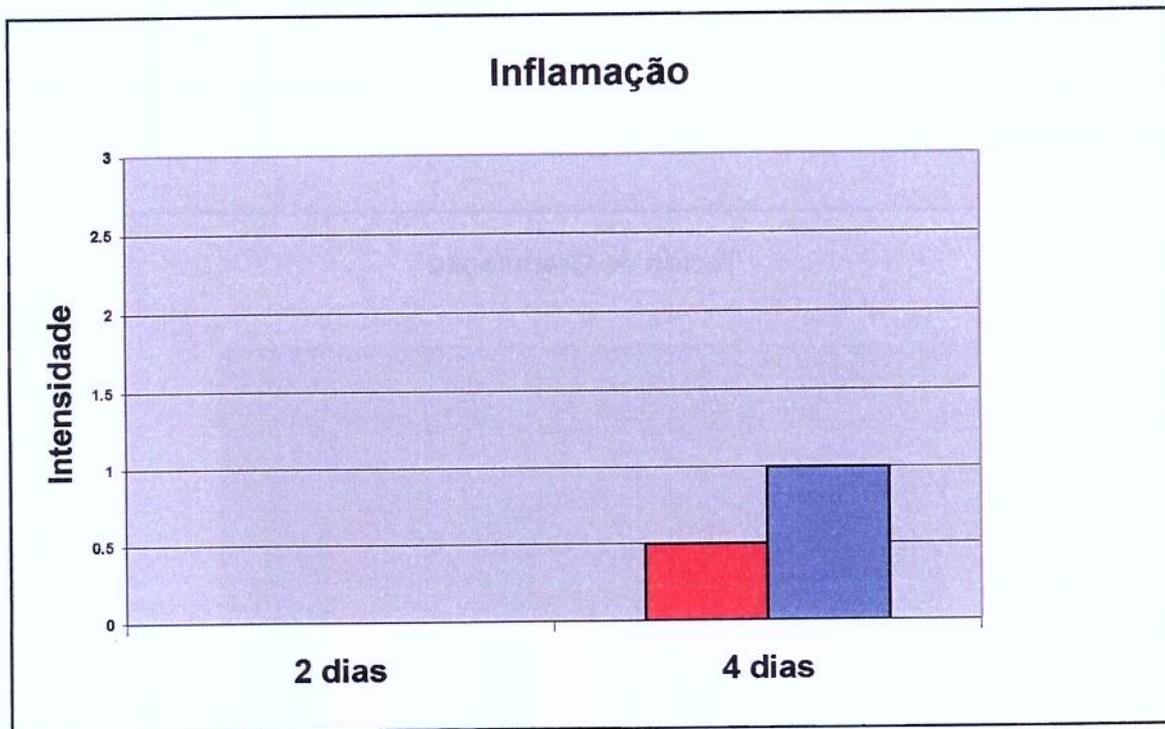


Figura 25 - Intensidade de infiltrado inflamatório agudo do tipo neutrofílico. Presente somente até o quarto dia de implantação, estando ausente nos outros períodos avaliados. 0=ausente, 1=leve, 2=moderado e 3=intenso. **VERMELHO = PLLA/PEO + vancomicina / AZUL= PLLA/PEO controle.**

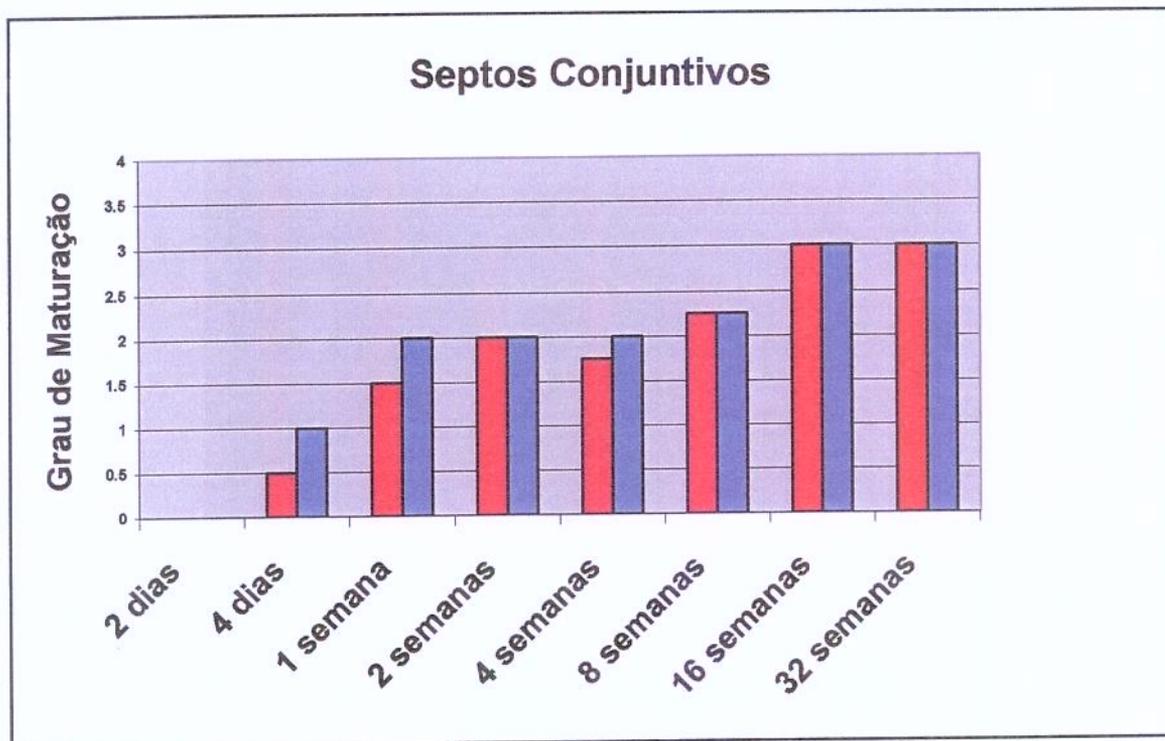


Figura 26 - Grau de maturação dos septos conjuntivos formados junto às microesferas de PLLA/PEO. Presente ao longo de todo o período experimental, onde 1= tecido conjuntivo frouxo, 2=tecido conjuntivo denso, 3=tecido conjuntivo com ossificação parcial e 4=tecido conjuntivo com ossificação total. **VERMELHO = PLLA/PEO + vancomicina / AZUL= PLLA/PEO controle.**

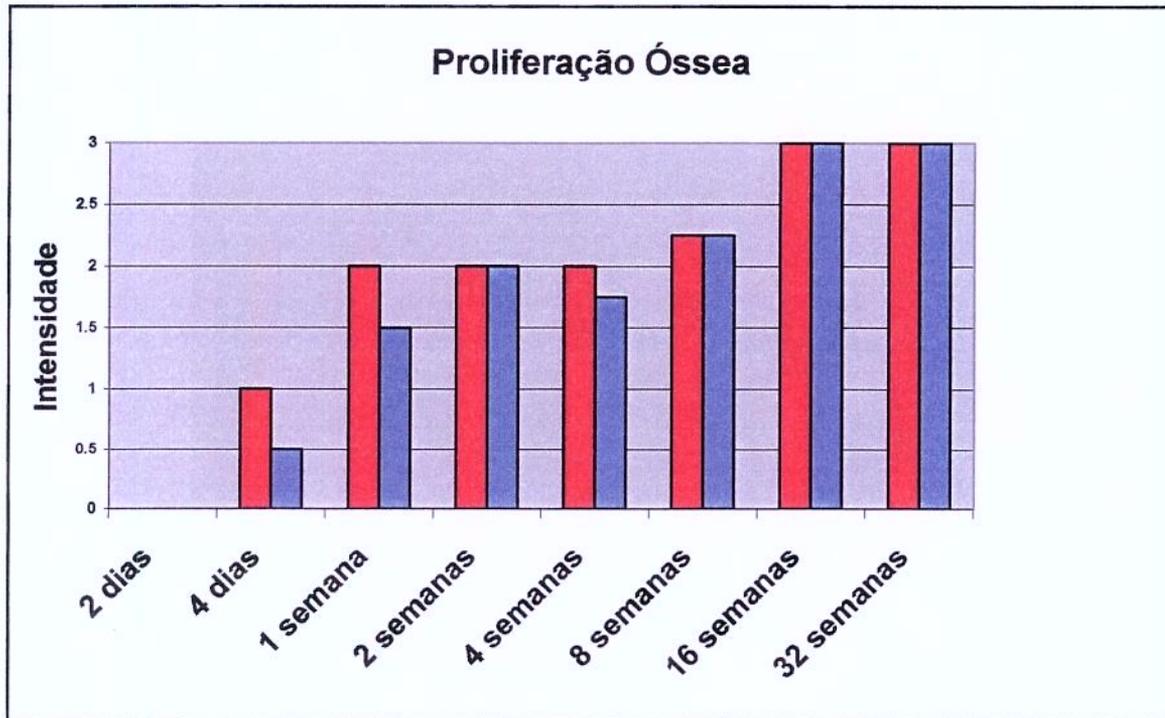


Figura 27 - Intensidade de proliferação óssea junto ao implante. Presente a partir do quarto dia de implantação. 0=ausente, 1=leve, 2=moderado e 3=intenso. **VERMELHO = PLLA/PEO + vancomicina / AZUL= PLLA/PEO controle.**

A comparação realizada entre os grupos experimentais, dentro do período experimental proposto, não mostrou diferenças significantes com relação à intensidade e grau de maturação dos achados, demonstrando a não interferência da vancomicina no processo de regeneração óssea tecidual quando associada às microesferas de PLLA/PEO.

4.4 - Análise Quantitativa (Histomorfometria)

4.4.1 - Animais Implantados com a blenda PLLA/PEO associada ao cloridrato de vancomicina

A função matemática que melhor se ajustou à distribuição dos dados neste estudo foi a função logarítmica, cujos parâmetros são abaixo apresentados:

Função logarítmica: $y = a + b \times \ln(x)$, onde y corresponde à área de osso formado junto ao implante, e x ao tempo decorrido, em dias. Os parâmetros obtidos neste grupo foram: "a" = 0,0132; e "b" = 0,0632 ($p < 0,05$).

De acordo com esta função pode-se acompanhar, dentro do período de tempo avaliado, a proporção (em área) do tecido ósseo neoformado com um desvio-padrão de 0,082 ou 8,2% (em relação ao total da área observada). O crescimento foi rápido até o 28.º dia, quando se dá um ponto de inflexão, havendo redução da velocidade de crescimento do tecido ósseo neoformado (gráfico 1).

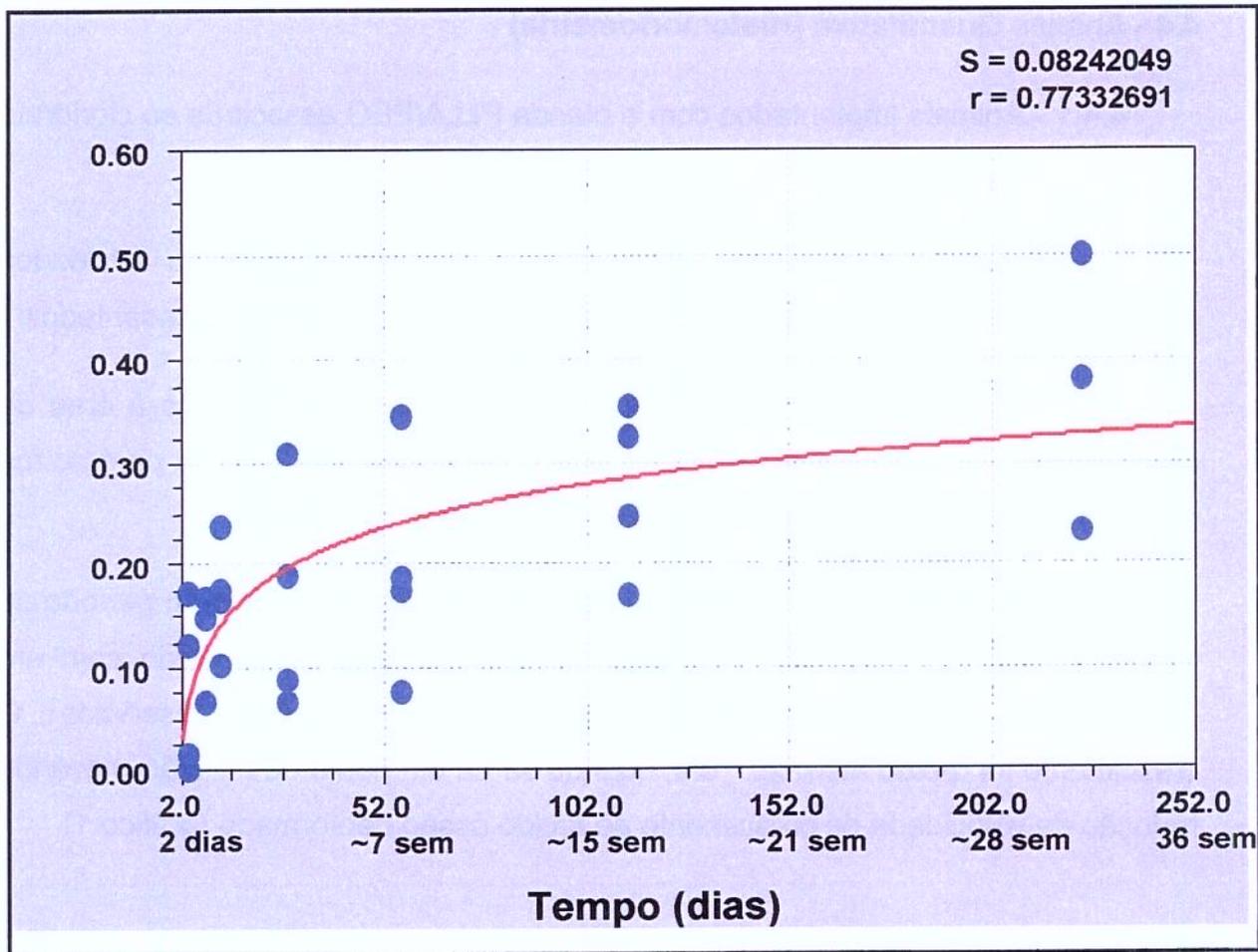


Figura 28 - Curva de crescimento ósseo junto ao implante ao longo dos períodos experimentais no grupo PLLA/PEO com vancomicina

4.4.2 - Animais Implantados com a blenda de PLLA/PEO sem a associação com o cloridrato de vancomicina

A função matemática que melhor se ajustou à distribuição dos pontos neste caso foi, igualmente, a função logarítmica, cujos parâmetros foram:

Função logarítmica: $y = a + b \times \ln(x)$, onde y corresponde à área de osso formado junto ao implante, e x ao tempo decorrido, em dias. Os parâmetros obtidos neste grupo foram: "a" = 0,0183; e "b" = 0,0627 ($p < 0,05$).

Neste caso o ponto de inflexão ocorreu por volta do 20.º dia, a partir do qual o crescimento do tecido ósseo neoformado se faz mais lentamente (gráfico 2).

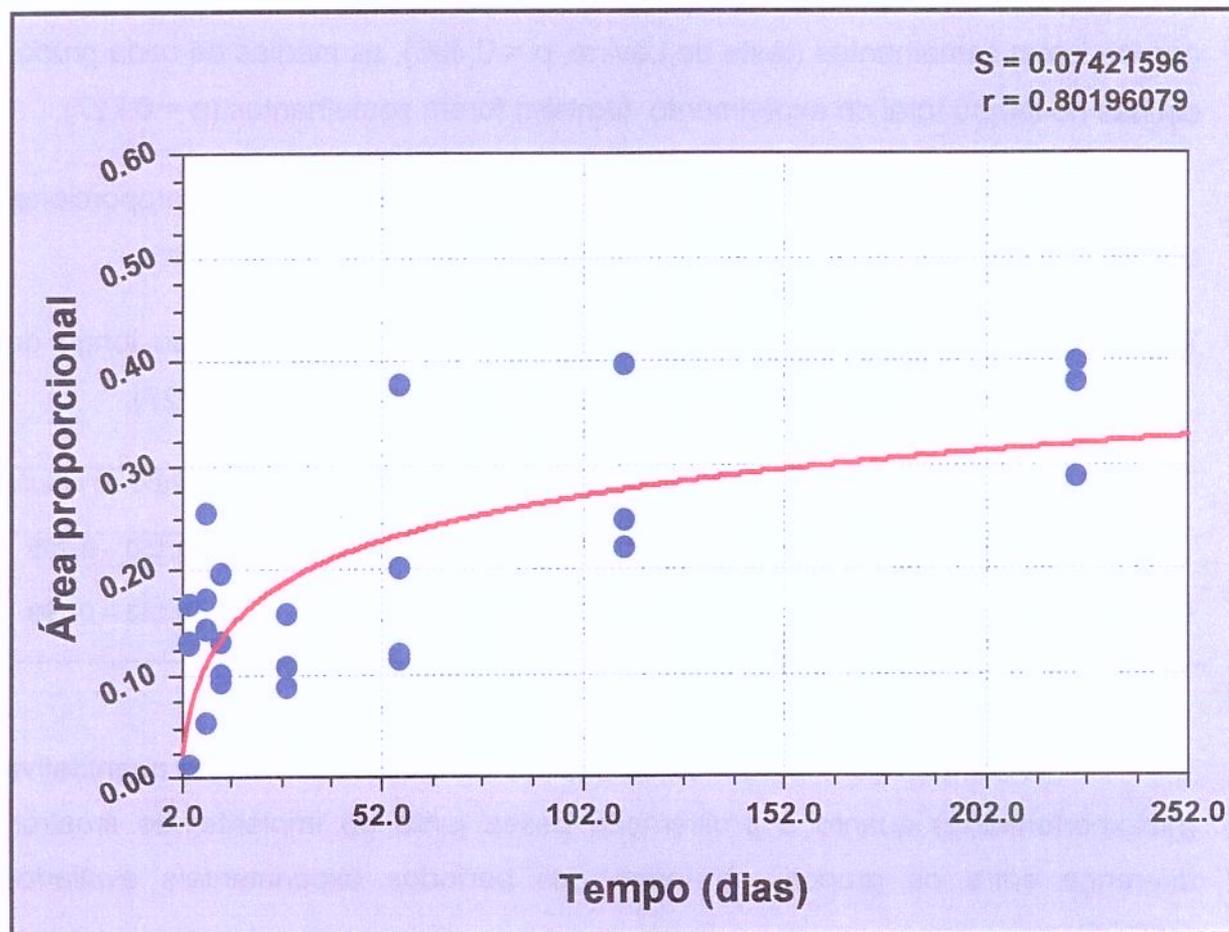


Figura 29 - Curva de crescimento ósseo junto ao implante ao longo dos períodos experimentais no grupo PLLA/PEO sem vancomicina

4.4.3 - Comparação entre os Grupos

Os gráficos acima mostram a evolução do crescimento ósseo neoformado, expresso pela área proporcional, em função do tempo de observação, pode ser explicado pela mesma função matemática (função logarítmica), com parâmetros cuja ordem de grandeza é a mesma. A

comparação da área proporcional entre os dois grupos foi, portanto, feita por meio de análise da covariância, tomando como covariável o logaritmo natural do tempo, cujo resultado demonstrou não haver diferença significativa entre os dois grupos ao longo de todo o experimento. Após a verificação de que as variâncias dos dois grupos foram semelhantes (teste de Levine, $p = 0,496$), as médias de cada grupo, obtidas no tempo total do experimento, também foram semelhantes ($p = 0,727$).

A tabela abaixo resume os parâmetros das médias de área proporcional obtidas, ao longo de todo o período de observação, para os dois grupos:

Tabela 3 - Parâmetros das médias de área proporcional obtidas ao longo do período de observação nos dois grupos analisados ($p=0,727$).

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Erro da média</i>	<i>IC95% da média</i>
PLLA/PEO+ vancomicina	0,1775	0,1279	0,014	0,150 – 0,205
PLLA/PEO sem vancomicina	0,1707	0,1222	0,014	0,143 – 0,198

A comparação dos dados da análise semi-quantitativa e da quantitativa (histomorfometria) quanto à proliferação óssea junto ao implante, não mostrou diferença entre os grupos, ao longo dos períodos experimentais avaliados ($p>0,05$).



5 - DISCUSSÃO

5.1 - Metodologia

A blenda de PLLA/PEO foi selecionada após revisão de estudos anteriores baseados em testes de biocompatibilidade deste material realizados por pesquisadores da área biomédica. MEIKLE, M.C et al. (1994) vêm testando blendas de PLLA no reparo ósseo. Estes autores testaram o PLLA associado ao poli(ácido glicólico)PGA implantados em calvária de coelhos. Com o término dos períodos experimentais foi constatado que o polímero não havia sido reabsorvido totalmente, porém não houve formação de tecido fibroso ao redor deste ou reação inflamatória crônica. Ao contrário disso, a neoformação óssea constante ao longo do experimento permitiu aos autores sugerir ser o PLLA e suas associações um importante substituto para enxertos ósseos. Além do uso direto do PLLA como enxertos ósseos sintéticos, existe a possibilidade ainda de sua associação com drogas, sejam elas antibióticas ou osteoindutoras, como afirma RAGEL e VALLET-REGÍ (2000). Neste caso os autores realizaram testes *in vitro* com o material a fim de estudar a liberação controlada das drogas, obtendo ao final resultados satisfatórios.

Além dos resultados favoráveis obtidos na literatura, a escolha da blenda de PLLA/PEO neste trabalho foi baseada em estudos realizados por CORAÇA (2002) onde pinos da blenda de PLLA/PEO foram testados nas concentrações de 100/0 e 50/50 em tíbias de ratos, mostrando ser a blenda PLLA/PEO 50/50 mais osteointegrável que o PLLA/PEO 100/0 devido à sua capacidade de formar poros e fendas durante o processo de reabsorção (apêndices 1, 2, 3 e 4). No presente trabalho a blenda de PLLA/PEO também apresentou comportamento favorável à osteointegração, sem apresentar sinais de rejeição. Entretanto, a blenda apresentava forma de microesferas e não pinos sólidos. Esta morfologia do implante melhorou sua interação com o tecido quando comparado com os pinos de PLLA/PEO.

A opção pelo uso da blenda na concentração de 80/20 se deu após a realização de testes *in vitro* para caracterização do material e da cinética de liberação da droga. Neste caso testes anteriormente realizados mostraram que

microesferas de PLLA puras apresentaram uma velocidade de liberação da droga maior quando comparado às microesferas constituídas por misturas poliméricas de PLLA/PEO. As microesferas de PLLA liberaram a droga, *in vitro*, em um período máximo de 48 horas, sendo que as blendas PLLA/PEO liberaram a droga em até 6 dias (CERONI-FILHO, 2004). Segundo GOODMAN e GILMAN (2001), o tratamento antibiótico sistêmico ou local deve ser administrado de 6 a 10 dias, havendo a necessidade de substituição da droga no caso do microorganismo não ter sido eliminado. Este cuidado evita a resistência do agente infectante ao tratamento. Além disso, testes realizados com microesferas da blenda PLLA/PEO na composição 50/50 apresentaram degradação acelerada após 5 horas em meio aquoso, não permitindo a fixação da droga (CERONI-FILHO, 2004). Com base nestas informações, optou-se pelo uso das microesferas da blenda de PLLA/PEO 80/20 para associação com o cloridrato de vancomicina.

Além do tempo de liberação, a quantidade da droga liberada é um importante fator quando se trata de tratamento local de infecções. No caso de tratamento de infecções causadas pelo *Staphilococcus aureus*, por exemplo, um dos agentes bacterianos causadores da osteomielite, a MIC (Concentração Mínima Inibitória) da vancomicina é 0,001 mg/ml (MADER, 1999). Os testes anteriores realizados com as microesferas de PLLA/PEO 80/20 pela técnica de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) mostraram a liberação de aproximadamente 0,18 mg/ml nos períodos iniciais de 24 à 48 horas e 0,04 à 0,02 mg/ml nos períodos finais de 72 horas à 6 dias. Sendo assim, a concentração da droga possivelmente liberada quando implantada nos animais, durante os períodos experimentais iniciais, pode ter sido maior em relação à concentração necessária para inibição da atividade bactericida do *S. aureus*. (CERONI-FILHO, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a vancomicina quando associada às microesferas de PLLA/PEO não interferiram no processo regenerativo tecidual, o qual não demonstrou sinais de inflamação crônica ou rejeição tecidual ao longo do experimento. Sabe-se que o tratamento antibiótico sistêmico associado ao tratamento antibiótico local pode elevar os níveis de toxicidade no local do implante (MADER, 1999). Neste caso, sugere-se a

realização de novos testes com a liberação da droga das microesferas de PLLA/PEO visando sua aplicação clínica, para que problemas de rejeição tecidual possam ser evitados.

A cinética de liberação da droga apresenta diferenças entre os polímeros devido ao modo de degradação das amostras (anexo 6). Nos testes prévios de caracterização das microesferas da blenda de PLLA/PEO com cloridrato de vancomicina realizados por CERONI-FILHO (2004) constatou-se que tanto PLLA puro, quanto PLLA/PEO 80/20 apresentaram uma liberação acentuada da vancomicina nas primeiras 48 horas de testes in vitro, uma segunda etapa da liberação mostra um processo de difusão para liberação da droga e o terceiro e último, mostra a liberação do fármaco sendo regido pela degradação do material. Além disso, a superfície das esferas também influencia na liberação da droga, sendo que nas amostras de microesferas de PLLA/PEO 80/20 apresentaram porosidade promovendo uma liberação gradual. A porosidade das microesferas de PLLA/PEO 80/20 ocorreu após a dissolução da fração PEO. O PEO é um polímero que se dissolve em meio aquoso tendo seu processo de degradação ocorrendo lentamente junto aos líquidos tissulares. Esta dissolução leva a formação de poros na fração PLLA restante (ZOPPI et al., 2001).

A escolha pelo cloridrato de vancomicina (anexo 1) para ser associado à blenda de PLLA/PEO 80/20 neste estudo foi feita após consulta de relatos clínicos na literatura mostrando ser uma das drogas de escolha para tratamento de infecções ósseas. A vancomicina é utilizada na terapêutica de infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus*, microorganismo mais comum na osteomielite endógena (MADER et al., 1999).

A busca por biomateriais associáveis à drogas antibióticas visando a prevenção e tratamento local de infecções vem sendo realizada através de estudos experimentais e clínicos. UENG et al. (2004) estudaram esferas de poli(L-lisina)PLL associadas à vancomicina em coelhos com objetivo de prevenção de infecções ósseas. Os resultados histológicos demonstraram que o material demorou para ser reabsorvido não causando no entanto, reações teciduais de

rejeição. Os autores sugerem que as esferas de PLL associadas à vancomicina podem ser utilizadas como dispositivos para liberação controlada de drogas no tratamento de infecções musculoesqueléticas. No presente trabalho, os achados histológicos não indicaram diferenças entre os animais tratados com o PLLA/PEO associado à vancomicina e os animais tratados somente com PLLA/PEO, resultado este que se assemelha aos resultados de UENG, et al. (2004) no que diz respeito à não interferência da droga no reparo ósseo.

O rato Wistar foi utilizado neste trabalho devido as vantagens que este modelo oferece. De acordo com RISSING et al. (1985) e MEHRARA et al. (1999), o rato é resistente à procedimentos cirúrgicos, tolerante à tratamentos com antibióticos e o custo de manutenção de cada animal é relativamente baixo, conseqüentemente, o número de animais por grupo pode aumentar. Foram escolhidas as tíbias dos animais para a colocação das microesferas de PLLA/PEO e a razão desta escolha está de acordo com MONZÓN et al. (2002) quando se diz respeito ao fácil acesso deste osso durante o ato cirúrgico.

Apesar das vantagens oferecidas pelo rato e roedores em geral como modelos de experimentação, a baixa similaridade com os processos biológicos do homem limitam sua aplicação quando o objetivo de um trabalho é a aplicação clínica de um material (MIRANDA, 1996). O objetivo deste trabalho é a utilização de microesferas de PLLA/PEO associadas ao cloridrato de vancomicina em pacientes que apresentem lesões ósseas com perda tecidual. No entanto, para que seu uso clínico seja uma realidade, é necessária a continuidade dos testes deste material em animais de maior porte, que apresentem similaridade com o reparo ósseo humano. MIRANDA (1996) afirma serem os cães animais indicados para esta finalidade. Apesar da falta de uma lei efetiva para a proibição no uso de cães em pesquisas biomédicas, este animal não vem sendo utilizado atualmente nas pesquisas (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Neste caso, a espécie animal mais indicada para a continuidade de testes com as microesferas da blenda de PLLA/PEO para aplicação clínica futura é a suína, a qual não possui restrições atuais em seu uso uma vez que este animal é rotineiramente abatido para corte.

Os animais implantados foram expostos à períodos experimentais de 2 e 4 dias e 1, 2, 4, 8, 16 e 32 semanas. A escolha por um período experimental longo, com intervalos que variassem de poucos dias à alguns meses apresenta dois motivos. Primeiro devido ao tempo de liberação da vancomicina (anexo) pela blenda que ocorre em até 6 (seis) dias (CERONI-FILHO, 2004) e em segundo lugar, pelo longo tempo de degradação do PLLA, constatado por ROKKANEN et al (1999), CORAÇA (2002) e ITO et al (2004). Em osteotomias acetabulares fixadas com parafusos de PLLA, ITO, H. et al em 2002 observaram 68 pacientes de 18 à 46 meses pós-cirúrgicos. Neste estudo todas as osteotomias foram unidas, com excessão apenas de 4 pacientes que apresentaram falhas na união. Em todos os pacientes os parafusos de PLLA permaneceram no local até o final das avaliações.

Este trabalho não utilizou falhas ósseas sem a colocação de implantes como grupo controle, para observação da regeneração óssea espontânea. A razão disso é a proposta do trabalho em comparar dois tipos de blendas de PLLA/PEO, associadas e não associadas ao cloridrato de vancomicina. Para comparação entre biomateriais implantados a utilização de regeneração espontânea não é necessária pois não haveria dados a serem comparados. Sabe-se que a regeneração óssea espontânea pode ocorrer de maneira mais rápida que a regeneração adjacente à implantes quando a lesão é de pequena proporção (CORAÇA, 2002), no entanto, em lesões ósseas com perda de massa tecidual sempre é necessária a utilização de materiais naturais ou sintéticos para auxiliar no reparo. CORAÇA (2002) realizou lesões ósseas sem a colocação de implantes (apêndices 5 e 6) para comparar com lesões ósseas implantadas com blendas de PLLA/PEO, provando não ser necessária a realização destes grupos neste caso. Além do objetivo de comparar dois biomateriais no reparo tecidual, a realização de um grupo nestas condições levaria à obtenção de mais animais, gerando gastos desnecessários.

Após o término dos períodos experimentais, todos os animais foram sacrificados e as amostras contendo os implantes foram submetidos ao processamento histológico para obtenção de lâminas permanentes. Foram obtidas

duas lâminas de cada caso, sendo que uma foi corada pela técnica de rotina em H&E e a outra pela técnica de TM. O TM além de evidenciar núcleos e citoplasmas, ajudam na diferenciação do colágeno e sua organização, informação importante para o estudo da maturação óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO,2004). Neste trabalho, a coloração pelo HE foi importante para as análises qualitativas enquanto que a coloração pelo TM foi importante para diferenciar osso secundário e osso primário, o que auxiliou durante as análises quantitativas.

SAITO et al (1999) investigando blendas de poli(DL-ácido láctico)PLDLA e poli(etileno glicol)PEG e associada com proteínas ósseas morfogênicas (BMP) na musculatura esquelética dorsal de ratos, detectaram a formação óssea através da coloração pela HE. Neste estudo os autores evidenciaram a formação óssea assim como a reação inflamatória adjacente aos implantes. No presente trabalho, o HE foi importante instrumento para a avaliação da reação tecidual cicatricional, como a presença de tecido de granulação, fibrina e hemorragia, como para a observação da neoformação óssea junto às esferas.

Assim como foi observado por HOLLINGER et al (1998), no presente estudo verificou-se, além dos tecidos de granulação e fibrina, a orientação das fibras colágenas auxiliando na diferenciação dos ossos primários e secundários. As análises qualitativas neste casos forneceram dados relativos à intensidade dos achados, sendo estes, tecido de granulação, fibrina e hemorragia, reação inflamatória aguda e crônica, proliferação óssea periosteal, endosteal e intersticial. Os dados de intensidade foram revertidos em dados numéricos e permitiram a confecção de gráficos para ilustrar a curva de intensidade dos achados (análise semi-quantitativa). A maioria dos autores apresentam em seus trabalhos somente a descrição histológica (HOLLINGER et al., 1998, SAITO et al., 1999, PINHOLT et al., 1991, LI et al., 2003, HECKMAN et al., 1999, FURUKAWA et al., 2000, ROESSLER et al., 2000, LITTLEWOOD-EVANS et al.,1997, ITOKAZU et al 1997) deixando de graduar as observações em intensidade. Neste trabalho, este método de exposição dos resultados mostrou-se claro e efetivo quando associado com a exposição dos dados qualitativos e comparados com os dados quantitativos.

Já as análises quantitativas possuem importância para a obtenção de diferenças quanto à morfologia e resposta tecidual ao longo dos períodos experimentais. ITO et al. (2004) utilizaram o programa Osteoplan-2, Carl Zeiss para quantificar a densidade de osso neoformado junto à poros da cerâmica de hidroxiapatita hibridizada com culturas de células mesenquimais. O programa utilizado permitiu a obtenção de uma curva de crescimento ósseo ao longo dos períodos experimentais. De acordo com ITO et al (2004), a utilização de softwares para morfometria é de extrema utilidade em pesquisas com biomateriais, para a quantificação de neoformação tecidual. Concordando com os autores acima citados, utilizou-se no presente trabalho o software ImageLab[®] que permitiu quantificar a porcentagem de osso neoformado em uma determinada área de cada corte. Após obtenção das análises, os dados em porcentagem foram submetidos à testes estatísticos para a obtenção de desvio padrão e significância das diferenças obtidas.

5.2 - Análises Qualitativas e Quantitativas

As microesferas se mantiveram no interior do canal medular durante todo o período experimental avaliado, em todos os animais nos dois grupos estudados. Duas razões explicam a manutenção das microesferas neste local, primeiramente o crescimento tecidual envolvente ao implante, retendo-o nesta região do osso. E em segundo o longo tempo de degradação da fração de PLLA da blenda de PLLA/PEO. ITOKAZU et al. (1997), demonstraram esta retenção do implante no interior do canal medular, junto à cavidade realizada na cortical, em implantes de HA realizados em tíbias de ratos. Neste estudo, os autores observaram a formação de tecido fibroso e cápsula óssea formados junto ao implante. De acordo com ROKKANEN et al. (1999), a velocidade de degradação do PLLA pode variar de acordo com sua concentração e grau de cristalinidade, porém este sempre apresenta um longo tempo de degradação. As observações realizadas no presente trabalho, demonstraram a presença das microesferas de PLLA/PEO em todos os animais até o último período experimental, de 32 semanas.

Observou-se irregularidade no tamanho das amostras implantadas, havendo casos de esferas com dimensões diferentes em um mesmo corte. Além disso, as microesferas apresentaram estruturas semelhantes a poros em seu interior (anexo 2 e 5). A caracterização das microesferas (anexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6) foi realizada previamente aos implantes *in vivo* onde constatou-se esta variação quanto aos diâmetros das amostras. Neste caso, CERONI-FILHO (2004) realizou as análises de distribuição de diâmetros entre as amostras (anexo 4) com um espectrofotômetro de luz laser MATERSIZER modelo S.MAM-5005 (Malvern Instruments UK) que adquiriu diâmetros de 100 à 400 μm , apresentando mais de 60% das amostras, um diâmetro que variava de 200 a 300 μm . O tamanho das microesferas sofreu variação devido ao modo de obtenção das mesmas, não afetando as propriedades mecânicas do material, assim como a liberação da droga.

Nos períodos iniciais de experimentação, foi observado áreas com hemorragia, deposição de fibrina e tecido de granulação. A presença destes tecidos faz parte do processo de cicatrização do osso e de outros tecidos. Áreas com hemorragia foram detectadas apenas nos períodos iniciais de 2 e 4 dias em decorrência do trauma realizado para a colocação do implante. A fibrina e o tecido de granulação observados, estava presente entre as microesferas não formando portanto cápsula fibrosa. A formação de cápsula constituída por tecido conjuntivo denso, geralmente na interface osso e implante está relacionado com complicações e processos de rejeição, de acordo com NG et al. (2004). Estes autores observaram estas reações teciduais em implantes orbitais e malares realizados em pacientes afirmando serem complicações relacionadas aos biomateriais.

O processo inflamatório observado neste estudo foi discreto e presente apenas nos períodos iniciais, 2 e 4 dias, estando ausente nos períodos finais. A inflamação era constituída de pequenos focos de neutrófilos. A presença de neutrófilos em baixa intensidade, sem formar abscessos, predominantemente nos períodos iniciais, pode ser interpretada como processo inflamatório ligado ao

reparo tecidual. Este é caracterizado pelo extravasamento de líquido dos vasos sanguíneos (edema) e presença de células polimorfonucleares (ROSEMBERG, 2000) Não foi detectada inflamação crônica inespecífica. A presença de infiltrado inflamatório persistente também pode ser interpretado como sinal de complicações relacionadas aos implantes. Reação granulomatosa do tipo corpo estranho foi escassa, nos períodos iniciais, estando presente apenas em 4 do total de 80 animais avaliados, demonstrando a baixa suscetibilidade do material à rejeição. Esta afirmação está de acordo com HOLMBOM et al (2005) que testou uma blenda de poli(ϵ -caprolactona-L-ácido láctico)PCL/PLLA em fêmur de ratos. Estes autores observaram uma moderada reação inflamatória com a presença de células gigantes, porém, sem o acúmulo de fluídos e concluíram que esta reação não comprometeu a integridade do material implantado nem a regeneração óssea.

A partir da segunda semana pós implante, o tecido cicatricial formado pela fibrina, hemorragia e tecido de granulação, foi substituído por septos conjuntivos compostos por tecido conjuntivo, que gradualmente se converteram em tecido ósseo. Neste caso, o osso contornou o implante das microesferas além de preencher os espaços formados entre elas. Esta reação do tecido ósseo foi constatada também por UENG et al. (2004), onde esferas de poli(L-lisina)PLL associadas à vancomicina foram envolvidas por osso após 8 semanas de implantação. Implantes constituídos por esferas e microesferas são facilmente acoplados em falhas ósseas por compressão, não precisando ser moldados antes do procedimento cirúrgico, o que leva a uma economia de tempo e custos ao médico e ao paciente, dependendo de sua aplicação. UENG et al. (2004) também relataram esta vantagem dos implantes na forma de microesferas quando relacionados ao reparo de cavidades ósseas realizadas após retirada de tumores, ou após curetagem de material infeccioso, como é o caso da osteomielite. Além de sua morfologia, implantes na forma de microesferas associados à drogas antibióticas, como o utilizado no presente trabalho, auxiliam na prevenção e tratamento destas infecções.

As traves ósseas formadas junto às microesferas foram decorrentes da estimulação do endósteo, ocorrida durante a realização da cavidade para colocação do implante. Estas traves no entanto, apresentaram um adelgaçamento a partir da oitava semana pós implante, voltando a se espessar a partir da décima sexta semana. Esta alteração na arquitetura das trabéculas ósseas durante a regeneração tecidual foram também observadas por RIBEIRO et al. (1996) após obtenção de cavidades em tíbias de cães para modelo experimental de regeneração óssea espontânea. Neste caso, durante a sexta e décima semana de implantação, os autores observaram um aspecto osteoporótico das traves ósseas que se apresentavam delgadas com relação aos outros períodos, atribuindo este fenômeno à uma atividade osteoclástica. Além deste adelgaçamento, houve também crescimento celular adiposo promovendo o distanciamento das trabéculas. Após 12 semanas no entanto, as traves ósseas observadas apresentavam espessura e distribuição semelhantes ao tecido ósseo envolvente. Este momento de transição observado tanto no presente estudo, como no trabalho de RIBEIRO et al. (1996) não comprometeram no entanto, a remodelagem da lesão.

A partir destas observações, surgem discussões sobre a origem da neoformação óssea, que pode ser iniciada a partir de osteoblastos presentes em fragmentos ósseos presentes no local da lesão, como a partir de células mesenquimais presentes na medula óssea que se diferenciam em osteoblastos e dão início à deposição de matriz óssea (KATTHAGEN e MITTELMEIER, 1984). Estas observações foram encontradas no presente estudo onde a neoformação óssea junto às microesferas teve início tanto de osteoblastos de traves ósseas presentes no canal medular, como por células mesenquimais da medula óssea e do endósteo e periósteo estimulados no ato da lesão.

As análises estatísticas realizadas com os dados obtidos nas análises semi-quantitativas e quantitativas (histomorfométricas) demonstraram uma discreta involução da neoformação óssea, vista como uma redução na velocidade da formação tecidual. Esta involução foi detectada a partir da 4ª semana após o

implante, nos dois grupos avaliados. Esta involução e decréscimo na velocidade de crescimento tecidual óssea pode ser explicada pela atividade de remodelação óssea observada nos animais a partir da 4ª semana de implantação. Esta atividade foi caracterizada pela presença de osteoclastos junto às traves ósseas presentes ao redor das microesferas. Além dos osteoclastos, a presença constante de osteoblastos ativos nesta região demonstram a atividade de renovação e moldagem do tecido ósseo neoformado.

O grupo implantado com a blenda de PLLA/PEO associada ao cloridrato de vancomicina apresentou uma média de área de osso neoformado discretamente maior quando comparado com o grupo implantado com a blenda de PLLA/PEO sem a droga. Esta diferença não foi significativa, demonstrando assim a eficiência das microesferas de PLLA/PEO associadas à vancomicina na regeneração óssea.

Os resultados obtidos neste trabalho, contribuem para a busca de biomateriais, principalmente voltados para aplicação ortopédica, bucomaxilofacial e odontológica. Esta pesquisa possibilitou aos pesquisadores um maior conhecimento do PLLA e do PEO como biomaterial e seu comportamento na associação com drogas antibióticas. Toda a metodologia utilizada neste trabalho, desde a obtenção dos materiais, cirurgias de implantação até a obtenção dos resultados possibilitou o engrandecimento profissional dos pesquisadores envolvidos. A interdisciplinalidade inicialmente proposta a qual foi concretizada neste trabalho foi de grande valia, pois uniu os conhecimentos da área médica, biológica, da engenharia de materiais e matemática, provando que nenhuma ciência se faz sozinha. Assim como é necessária a continuidade deste trabalho, é necessária a manutenção desta interdisciplinalidade que possibilitará um maior aprendizado dos pesquisadores envolvidos no que se diz respeito à ciência e ao convívio interpessoal.

Vimos de forma relevante que a continuidade deste trabalho envolve a escolha de um modelo experimental com características mais similares às do homem no que se refere aos processos de reparo tecidual e pelo porte físico. Uma

sugestão é a simulação de uma cirurgia de remoção de tumores ósseos em um suíno, por exemplo, e posterior preenchimento local com microesferas de PLLA/PEO. Um trabalho que deve ser explorado também é a indução de doenças infecciosas, como a osteomielite, nestes animais e posterior tratamento com microesferas associadas à droga antibiótica, para verificar assim sua ação no reparo ósseo na vigência de infecções.

Vimos com bastante otimismo a aplicação clínica deste material, o que poderia auxiliar muitos pacientes facilitando também o trabalho dos profissionais de saúde. Frente à toda esta discussão, pode-se afirmar que a perspectiva é boa e como não nos falta entusiasmo, as pesquisas terão continuidade.



6 - CONCLUSÕES

Considerando a osteointegração obtida com implantes de microesferas de poli(L-ácido láctico)PLLA/poli(óxido de etileno)PEO, bem como a não interferência na regeneração óssea quando associados ao cloridrato de vancomicina, e a característica inerte deste biomaterial, sugere-se que este possa ser útil como enxerto ou como adjuvante nos processos de reparo ósseo. Este material pode contribuir ainda como suporte na prevenção de possíveis infecções que possam vir a retardar a regeneração óssea tecidual.



**7 - REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

ANDREOPOULOS, A.G.; HATZI, E.C.; DOXASTAKIS, M. Controlled released systems based on poly(lactic acid). An in vivo and in vitro study. **J Materials Science: Materials in Medicine**. 11:393-397,2000.

ARAI, H.; SATO, K.; OKUDA, O.; MIYAJIMA, M.; HISHII, M.; NAKANISHI, H. et al. Early experience with poly L-lactic acid bioabsorbable fixation system for paediatric craniosynostosis surgery. Report of 3 cases. **Acta Neurochirurgica**. 142:187-192, 2000.

BATNIJI, R.K.; HUTCHISON, J.L.; DAHIYA, R.; LAM, S.L.; WILLIAMS, E.F. 3rd. Tissue response to expanded polytetrafluoroethylene and silicone implants in a rabbit model. **Arch Facial Plast Surg**. 4(2):111-113,2002.

BERGSMA, J.E.; BRUIJIN, W.C. de; ROZEMA, F.R.; BOS, R.R.M.; BOERING, G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. **Biomaterials**. 16(1):25-31,1995.

BICHARA, J.; GREENWELL, H.; DRISKO, C.; WITWER, J. W.; VEST, T. M.; YANCEY, J. et al. The effect of postsurgical naproxen and a bioabsorbable membrane on osseous healing in intrabony defects. **Periodontol**. 70:869-877,1999.

BOS, R.R.M.; ROZEMA, F.R.; BOERING, G. Degradation of and tissue reaction to biodegradable poly(L-lactide) for use as internal fixation of fractures. A study in rats. **Biomaterials**. 12:32-36,1991.

BOYCE, T.; EDWARDS, J.; SCARBOROUGH, N. Allograft bone: the influence of processing on safety and performance. **Orthopedic Clinics of North America**, 30(4): 571-581,1999.

BYERS, P. H.; STEINER, R. D. Osteogenesis imperfecta. **Annu Rev Med**, 43:269, 1992.

CHAPMAN, M. W.; MADISON, M. **Operative Orthopaedics**. Pennsylvania: Ed. J. B. Lippincott Company, 1988.822p.v.1.

CHEUNG, J. Y. C.; YU, K. N.; CHAN, J. F. K.; HO, R. T. K.; YU, C. P. Dose distribution close to metal implants in Gamma Knife Radiosurgery: a Monte Carlo study. **Am Assoc Phys Med**, 30(7): 1812-1815, 2003.

CIAPETTI, G.; AMBROSIO, L.; SAVARINO, L.; GRANCHI, D.; CENNI, E.; BALDINI, N. et al. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. **Biomaterials**. 24:3815-3824,2003.

CERONI FILHO, A.S. **Obtenção, caracterização e estudo in vitro de microesferas de PLLA e da blenda de PLLA/PEO para liberação controlada do cloridrato de vancomicina** - Campinas, 2004. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).

CORAÇA,D.C. **Osteointegração de implantes de poli(L-ácido láctico) PLLA e da blenda de poli(L-ácido láctico)PLLA/poli(óxido de etileno)PEO na tíbia de ratos** - Campinas, 2002. (Dissertação – Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

COOK, S. D.; BARRACK, R. L.; SKINNER, H. B. Basic science in orthopedic surgery. In: SKINNER, H. B. **Current diagnosis and treatment in orthopedics**. Singapore: McGraw-Hill, 2000. 1-46.

DESAI,N.P.; HUBBELL,J.A. Solution technique to incorporate polyethylene oxide and other water-soluble polymers into surfaces of polymeric biomaterials. **Biomaterials**. 12(2):144-153,1991.

DU, C.; MEIJER, G. J.; VAN DE VALK, C.; HAAN, R. E.; BEZEMER, J. M.; HESSELING, S. C. et al. Bone growth in biomimetic apatite coated porous Polyactive 1000PEGT70PBT30 implants. **Biomaterials**. 23(23):4649-56,2002.

DUNN, R. L.; OTTENBRITE, R. M. **Polymeric drugs and drug delivery systems**. Washington: Ed. American Chemical Society, 1991. p.615.

EDWARDS, R.C.; KIELY, K.D.; EPPLEY,B.L. Resorbable PLLA-PGA screw fixation of mandibular sagittal split osteotomies. **J Craniofac Surg** 10(3):230-236,1999.

EDWARDS, R.C.; KIELY, K.D.; EPPLEY,B.L. The fate of resorbable poly-L-lactic/polyglycolic acid (LactoSorb) bone fixation devices in orthognathic surgery. **J Oral Maxillofac Surg.**59(1):19-25,2001.

ELFICK, A. P. D.; GREEN, S. M.; McCASKIE, A. W.; BIRCH, M. A. Opsonization of polyethylene wear particles regulates macrophages and osteoblast responses in vitro. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.** 71(B): 244-251,2004.

FURUKAWA, T.; MATSUSUE, Y.; YASUNAGA, T.; NAKAGAWA, Y.; SHIKINAMI, Y.; OKUNO, M. et al. Bone bonding ability of a new biodegradable composite for internal fixation of bone fractures. **Cl Orth Rel Res.** 379:247-258,2000.

GENÇ, A.; MUTAF,O. Polytetrafluoroethylene bars in stabilizing the reconstructed sternun for pectus excavatum operations in children. **Plastic and Reconstructive Surgery.** 110:54-57,2002 .

HARDMAN, J.G.;GILMAN, A.G.;LIMBIRD,L.;RALL,T.W. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Singapore: McGraw-Hill, 2001.

GOSAL, H.S.; SINGH,P.; FIELD,R.E. Clinical experience of patellar fracture fixation using metal wire or non-absorbable polyester- a study of 37 cases. **Injury,** 32(2):129-135,2001.

GOURLAY, S. J.; RICE, R. M.; HEGYELI, A. F.; WADE, C. W. R.; DILLON, J. G.; JAFFE, H. Biocompatibility testing of polymers: in vivo implantation studies. **J Biomed Mater Res.** 12:219-232, 1978.

HEISE, U.; OSBORN, J. F.; DUWE, F. Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. **Intl Orth.** 14:329-338, 1990.

HECKMAN,J.D.; EHLER, W.; BROOKS,B.P.; AUFDEMORTE,T.B.; LOHMANN,C.H.; MORGAN,T. et al. Bone Morphogenetic protein but not transforming growth factor- β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. **J. Bone Joint Surg.** 81 (A):12,1717-29, 1999.

HOINLINGER, J. O.; SCHMITT, J. M.; BUCK, D. C.; SHANNON, R.; JOH, S.; ZEGZULA, H. D. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. **J Biomed Mater Res: Appl Biomater**. 43: 356-364, 1998.

HOLMBOM, J.; SODERGARD, A.; EKHOLM, E.; MARTSON, M.; KUUSILEHTO, A.; SAUKKO, P. et al. Long-term evaluation of porous poly(epsilon-caprolactone-co-L-lactide) as a bone-filling material. **J Biomed Mater Res A**. 75(2):308-15, 2005.

HSU, K. Y.; ZUCHERMAN, J.; WHITE, A. H. Bone graft and implants. **Spine Care**, 2: 1995. Disponível em: http://www.spine-dr.com/site/surgery/s_bone_grafts.html.

HUATAN, H.; COLLETT, J. H.; ATTWOOD, D.; BOOTH, C. Preparation and characterization of poly(epsilon-caprolactone) polymer blends for the delivery of proteins. **Biomaterials**. 16: 1297-1303, 1995.

ITO, Y.; TANAKA, N.; FUJIMOTO, Y.; YASUNAGA, Y.; ISHIDA, O.; AGUNG, M. et al. Bone formation using novel interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic hybridized with cultured marrow stromal stem cells derived from Green rat. **J Biomed Mater Res**. 69(A): 454-461, 2004.

ITOKAZU, M.; OHNO, T.; TANEMORI, T.; WADA, E.; KATO, N.; WATANABE, K. Antibiotic-loaded hydroxyapatite blocks in the treatment of experimental osteomyelitis in rats. **J Med Microbiol**. 46:779-783, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004. p.488.

KANELLAKOPOULOU, K.; KOLIA, M.; ANASTASSIADIS, A.; KORAKIS, T.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; ANDREOPOULOS, A. et al. Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluoroquinolones: an in vitro study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 43(3): 714-716, 1999.

KANKARE, J.; ROKKANEN, P. Dislocated fractures of the talus treated with biodegradable internal fixation. **Arch Ortho Trauma Surgery**. 117:62-64, 1998.

KATTAGEN, B. D.; MITTELMEIER, H. Experimental animal investigation of bone regeneration with collagen-apatite. **Arch Orthop Trauma Surg**, 103: 291-302, 1984.

KREITZ, M. R.; DOMM, J. A.; MATHIOWITZ, E. Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes. II. In vitro degradation and release of heparin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**. 18: 1645-1651, 1997.

KUIJER, R.; BOUWMEESTER, S. J.; DREES, M. M.; SURTEL, D. A.; TERWINDT-ROUWENHORST, E. A.; VAN DER LINDEN, A. J. et al. The polymer Polyactive as a bone-filling substance: an experimental study in rabbits. **J Mater Sci Mater Med**. 9(8):449-55,1998.

LI, W.; DANIELSON, K. G.; ALEXANDER, P. G.; TUAN, R.S. Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(ϵ -caprolactone) scaffolds. **J Biomed Mater Res**. 67(A): 1105-1114, 2003.

LIU, Q.; DE WIJN, J. R.; BAKKER, D.; VAN TOLEDO, M.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Polyacids as bonding agents in hydroxyapatite polyester-ether (Polyactive 30/70) composites. **J Mater Sci Mater Med**. 9(1):23-30,1998.

LITTLEWOOD-EVANS, A.; HATTENBERGER, M.; ZAK, O.; O'REILLY, T. Effect of combination therapy of rifampicin and azithromycin on TNF levels during a rat model of chronic osteomyelitis. **J Ant Chem**. 39: 493-498, 1997.

LOWRY, K. J.; HAMSON, K. R.; BEAR, L.; PENG, Y.B.; CALALUCE, R.; EVANS, M. L. et al. Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model. **J Biomed Mater Res**. 36:536-541, 1997.

MADER, J. T.; SHIRTLIFF, M. E.; BERGQUIST, S. C.; CALHOUN, J. Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. **Cl Orth Rel Res**. 360: 47-65, 1999.

MAINIL-VARLET, P.; GOGOLEWSKI, S.; NIEUWENHUIS, P. Long-term soft tissue reaction to various polylactides and their in vivo degradation. **J Mater Sci:Mater Med**. 7: 713-721, 1996.

- MAINIL-VARLET, P.; RAHN, B.; GOGOLEWSKI, S. Long-term in vivo degradation and bone reaction to various polylactides. **Biomaterials**. 18(257-266), 1997.
- Mc DONALD, D.L.; ENNEKING, W.F.; SUNDARAM, M. Metal-associated angiosarcoma of bone: report of two cases and review of the literature. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, 396:206-214, 2002.
- MEHARA, B. J.; ROWE, N. M.; STEINBRECH, D.S.; DUDZIAK, M. E.; SAADEH, P. B.; McCARTHY, J. G. et al. Rat mandibular distraction osteogenesis: IIMolecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression. **Plast Reconstr Surg**. 103:536-546, 1999.
- MEIKLE, M. C.; PAPAIOANNOU, S.; RATLEDGE, T.J.; SPEIGHT, P. M.; WATT-SMITH, S. R.; HILL, P. A. et al. Effect of poly DL-lactide-co-glycolide implants and xenogeneic bone matrix-derived growth factor on calvarian bone repair in the rabbit. **Biomaterials**. 15(7): 513-521, 1994.
- MIRANDA, J.B. **Renegeração do tecido ósseo esponjoso, em fêmures de cães, com auto-enxerto fragmentado e aloenxerto fragmentado e congelado** – Campinas, 1996. (Tese – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).
- MONZÓN, M.; GARCIA-ÁLVAREZ, F.; LACLÉRIDA, A.; AMORENA, B. Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspension. **Acta Orthop Scand**. 73(1): 11-19, 2002.
- MUNDLOS, S.; OLSEN, B. R. Heritable diseases of the skeleton: Part I. Molecular insights into skeletal development – transcription factors and signaling pathways. **Faseb J**, 11:125, 1997.
- MUNDLOS, S.; OLSEN, B. R. Heritable diseases of the skeleton: Part II. Molecular insights into skeletal development – matrix components and their homeostasis. **Faseb J**, 11:227, 1997.
- MUNDY, G. R. Local control of bone formation by osteoblasts. **ClinOrthop Rel Res**, 313:19, 1995.

- NIE, L.; NICOLAU, D. P.; TESSIER, P.R.; KOUREA, H. P.; BROWNER, B.D.; NIGHTINGALE, C.H. Use of bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment. **J Orthop Res**. 16:76-79, 1998.
- NIJENHUIS, A. J.; COLSTEE, E.; GRIJPMA, D. W.; PENNING, A. J. High molecular weight poly(L-lactide) and poly(ethylene oxide) blends: thermal characterization and physical properties. **Polymer**. 37(26):5849-5857, 1996.
- NINOMIYA, J. T.; STRUVE, J.A.; STELLOH, C.T.; TOTH, J.M.; CROSBY, K.E. Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. **Journal of Orthopaedics Research**. 19:621-628, 2001.
- NG, J. D.; HUYNH, T. H.; BURGETT, R. Complications of bioabsorbable orbital implants and fixation plates. **Ophthal Plast Reconstr Surg**. 20(1):85-6, 2004.
- OTTAVIANI, G.; CATAGNI, M. A.; MATTURRI, L. Massive metallosis due to metal-on-metal impingement in substitutive long-stemmed knee prosthesis. **Histopathology**, 46(2):237-238, 2005.
- PAVANATTI, S.L. **Estudo sobre a biocompatibilidade da resina termoplástica UDEL P-1800 na musculatura de ratos**. Campinas, 1994. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas.
- PINHOLT, E. M.; SOLHEIM, E.; BANG, G.; SUDMANN, E. Bone induction by composite of bioerodible poly-orthoester and demineralized bone matrix in rats. **Acta Orthop Scan**, 62(5): 476-480, 1991.
- PISTNER, H.; GUTWALD, R.; ORDUNG, R.; REUTHER, J.; MÜHLING, J. Poly(L-lactide): a long-term degradation study in vivo. I. Biological results. **Biomaterials**, 14(9):671-677, 1993.
- PUUMANEN, K.; KELLOMAKI, M.; RITSILA, V.; BOHLING, T.; TORMALA, P.; WARIS, T. et al. A novel bioabsorbable composite membrane of Polyactive(R) 70/30 and bioactive glass number 13-93 in repair of experimental maxillary alveolar cleft defects. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 75(1):25-33, 2005.

RAGEL, C.V.; VALLET-REGÍ, M. In vitro bioactivity and gentamicin release from glass-polymer-antibiotic composites. **J Biomed Mater Res**, 51:424-429, 2000.

RIBEIRO, R. F.; AMSTALDEN, E. M. I.; IZATTO, I. C. Modelo experimental de regeneração óssea espontânea. **Rev Bras Orthop**, 31(11): 931-935, 1996.

RISSING, J. P.; BUXTON, T. B.; WEINSTEIN, R. S.; SHOCKLEY, R. K. Model experimental chronic osteomyelitis in rats. **Infection and Immunity**, 47(3): 581-586, 1985.

ROESSLER, M.; WILKE, A.; GRISS, P.; KIENAPFEL, H. Missing osteoconductive effect of a resorbable PEO/PBT copolymer in human bone defects: a clinically relevant pilot study with contrary results to previous animal studies. **J Biomed Mater Res. Appl Biomater**, 53:167-173, 2000.

ROKKANEM, P.; BÖSTMAN, O.; HIRVENSALO, E.; PARTIO, E.K.; MÄKELÄ, E.A.; PÄTIÄLÄ, H. et al. Bioabsorbable implants in orthopaedics. **Current Orthopaedics**, 13:223-228, 1999.

ROSEMBERG, A. Ossos, articulações e tumores de partes moles. In: OTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1087-1134.

ROZEMA, F.R.; BOS, R.R.M.; PENNING, A.J.; JANSEN, H.W.B. Poly(L-lactide) implants in repair of defects of the orbital floor. An animal study. **J Oral Maxillofac Surg**, 48:1305-1309, 1990.

SAHLI, H.; TAPON-BRETAUDIÉRE, J.; FISCHER, A.; STERNBERG, C.; SPENLEHAUER, G.; VERRECCHIA, T. Interactions of poly(lactic acid) and poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles with the plasma factors of the coagulation system. **Biomaterials**, 18: 281-288, 1997.

SAITO, N.; OKADA, T.; TOBA, S.; MIYAMOTO, S.; TAKAOKA, K. New synthetic absorbable polymers as BMP carriers: Plastic properties of poly-D,L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymers. **J Biomed Mater Res**, 47: 104-110, 1999.

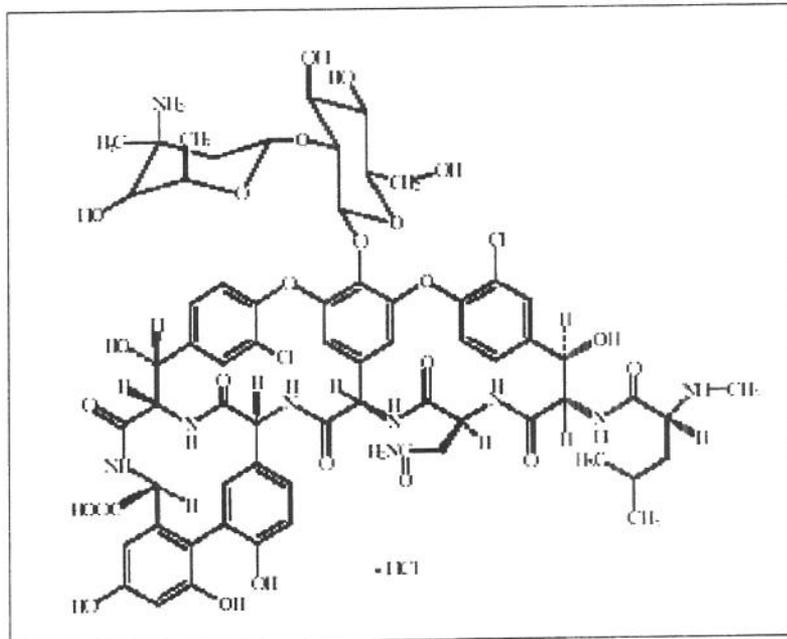
SKINNER, H.B. General considerations in orthopedic surgery. In: SKINNER, H. B. Current Diagnosis and treatment in orthopedics. Singapore: McGraw-Hill, 2000.p. 47-54.

UENG, S. W. N.; YUAN, L.; LEE, N.; LIN, S.; CHAN, E.; WENG, J. In vivo study of biodegradable alginate antibiotic beads in rabbits. **J Orthop Res**, 22: 592-599, 2004.

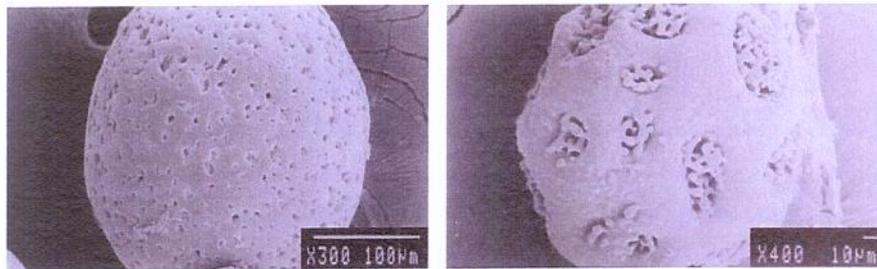
ZOPPI, R.A.; DUEK, E.A.R.; CORAÇA, D.C.; BARROS, P.P. Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) and poly(ethylene oxide) blends. **Materials Research**, 4(2): 117-125, 2001.



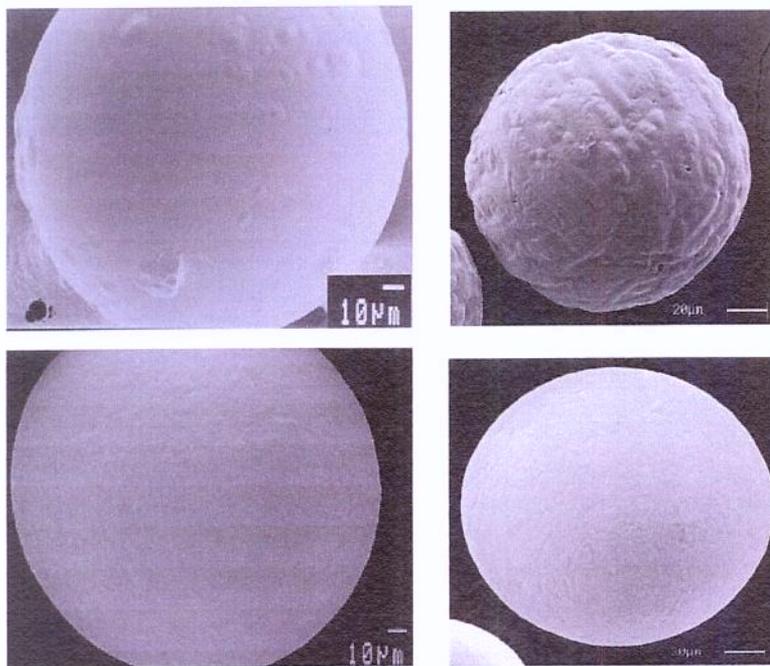
8 - ANEXOS



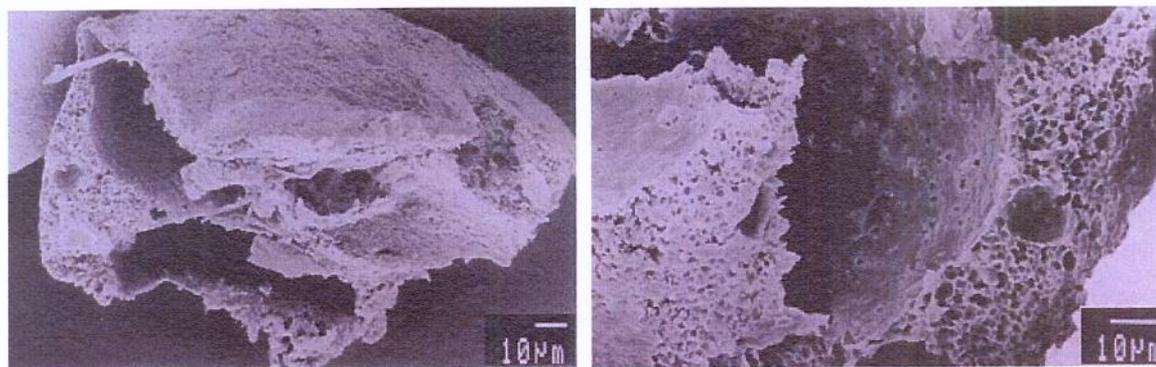
Estrutura molecular do cloridrato de vancomicina



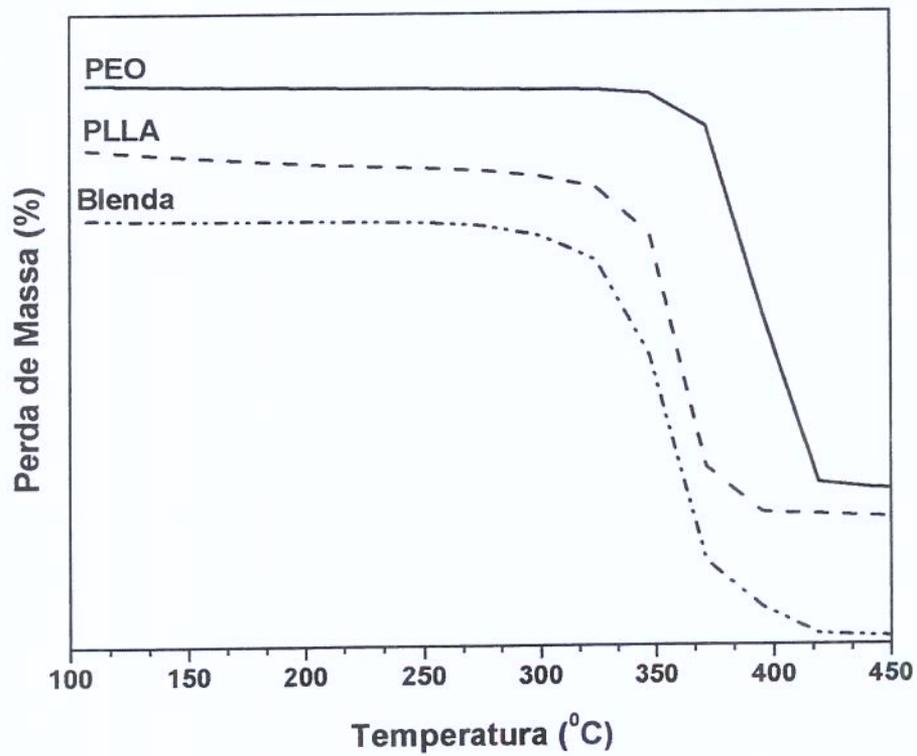
Micrografias de microsferas da blenda PLLA/PEO (50:50) em estágio de degradação após 5 horas (a) e após três dias de sua obtenção (b).



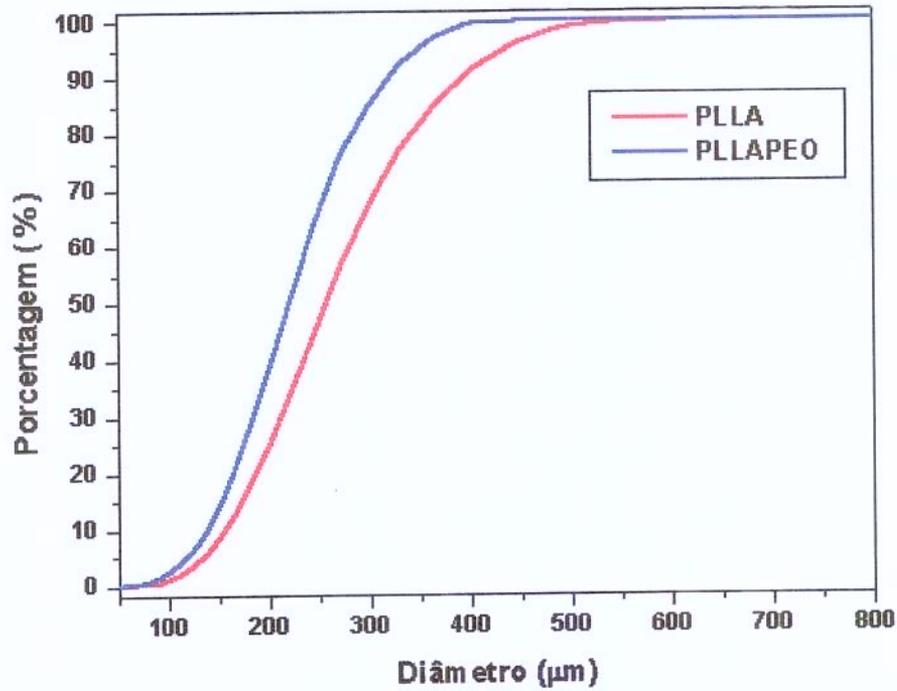
Micrografias mostrando a superfície das microsferas com e sem a vancomicina. PLLA (SV) (a), PLLA (CV) (b), blenda PLLA/PEO (SV) (c) e blenda (CV) (d).



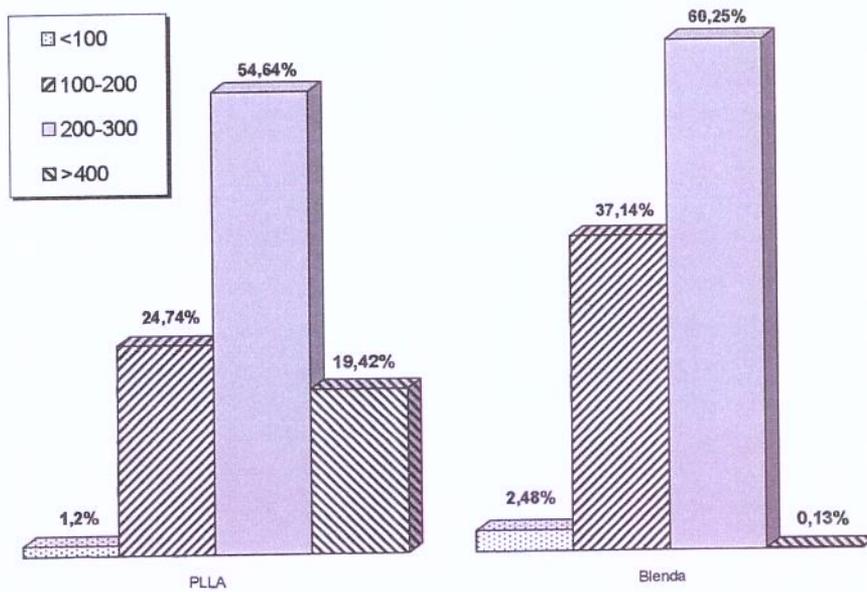
Micrografias de superfície de fratura das microsferas da blenda PLLA/PEO. Aumento de 600x (a) e de 1000x (b).



Curvas de porcentagem de perda de massa das amostras de PEO e PLLA e da blenda PLLA/PEO em função da temperatura.



Distribuição de diâmetros das microesferas de PLLA e da blenda PLLA/PEO.



Histogramas da distribuição de diâmetros.

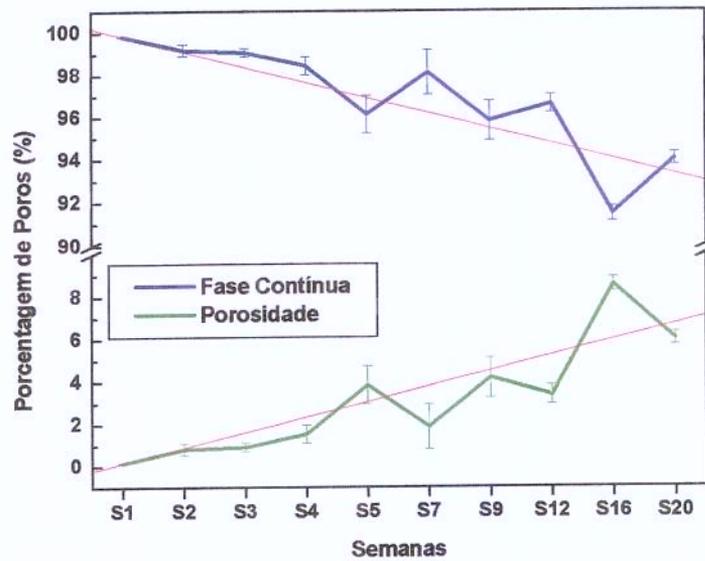
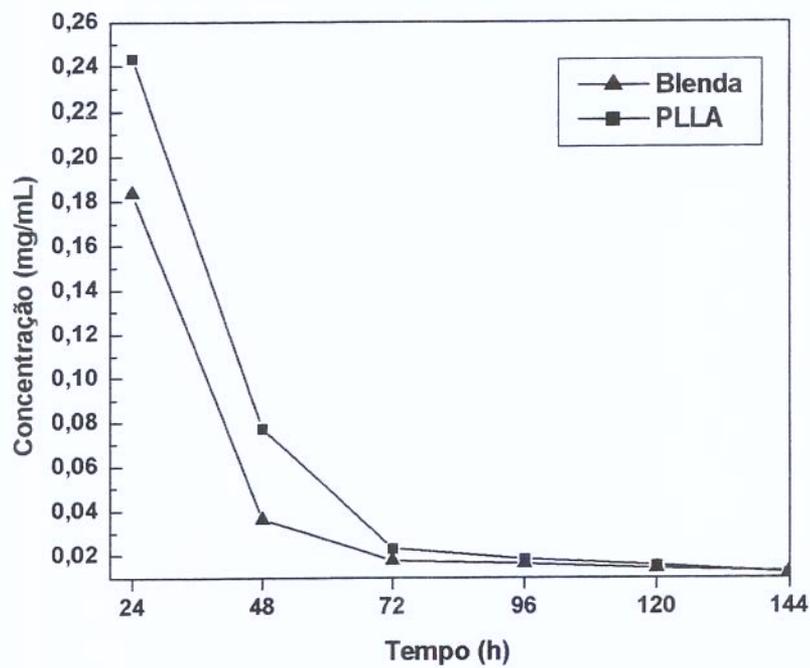


Gráfico do aumento de porosidade na blenda PLLA/PEO (80:20) no decorrer do estudo *in vitro*.

Semanas	Fase Contínua (%)	Porosidade (%)
S0	100,00	0,00
S1	99,83	0,17
S2	99,60	0,40
S3	99,33	0,67
S4	98,32	1,68
S5	95,98	4,02
S7	99,21	0,79
S9	95,90	4,10
S12	96,21	3,79
S16	91,82	8,18
S20	94,95	5,05

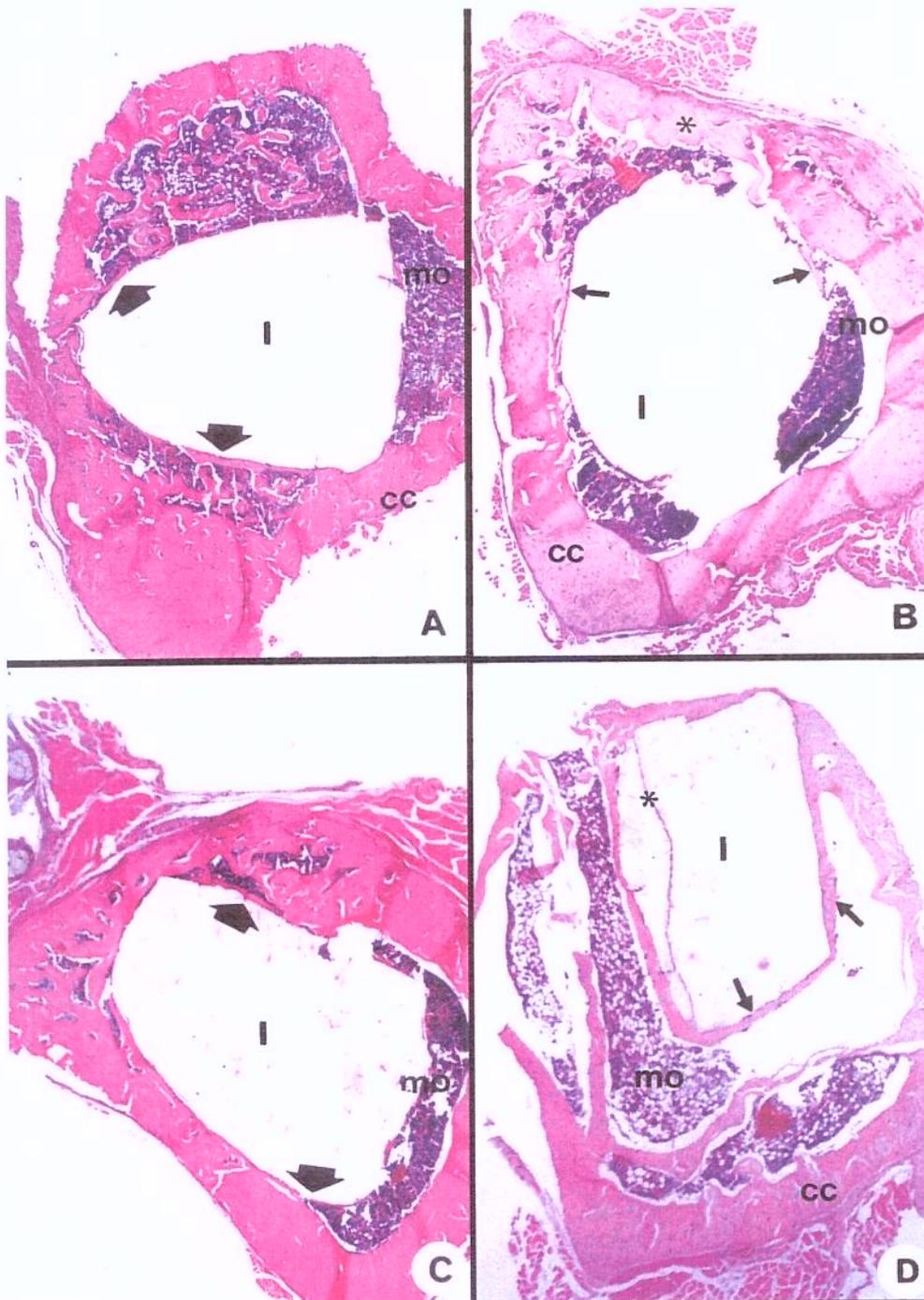
Valores da quantidade de poros obtidos pelo analisador de imagens para a blenda PLLA/PEO.



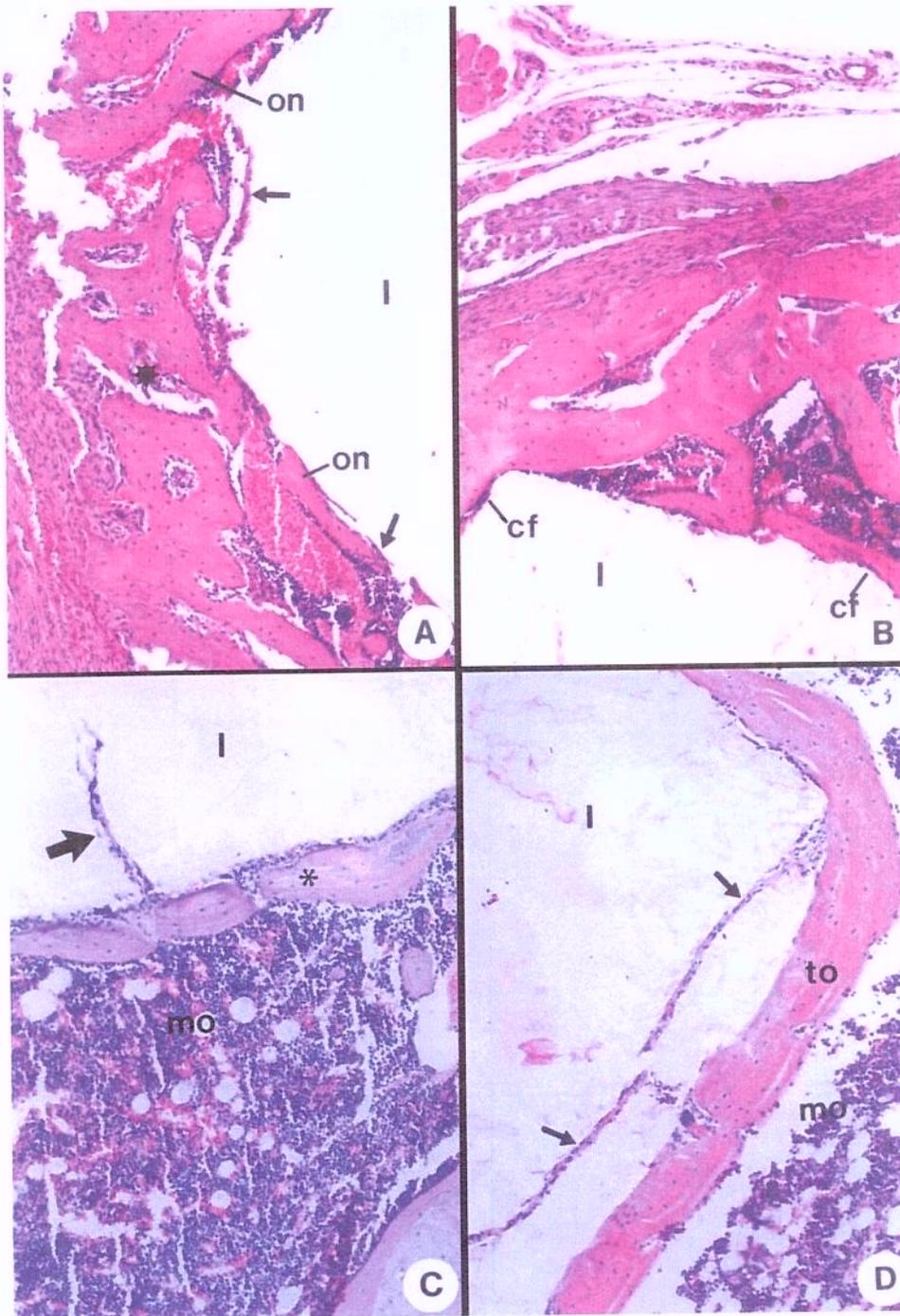
Liberção do cloridrato de vancomicina em função do tempo. Teste em HPLC.



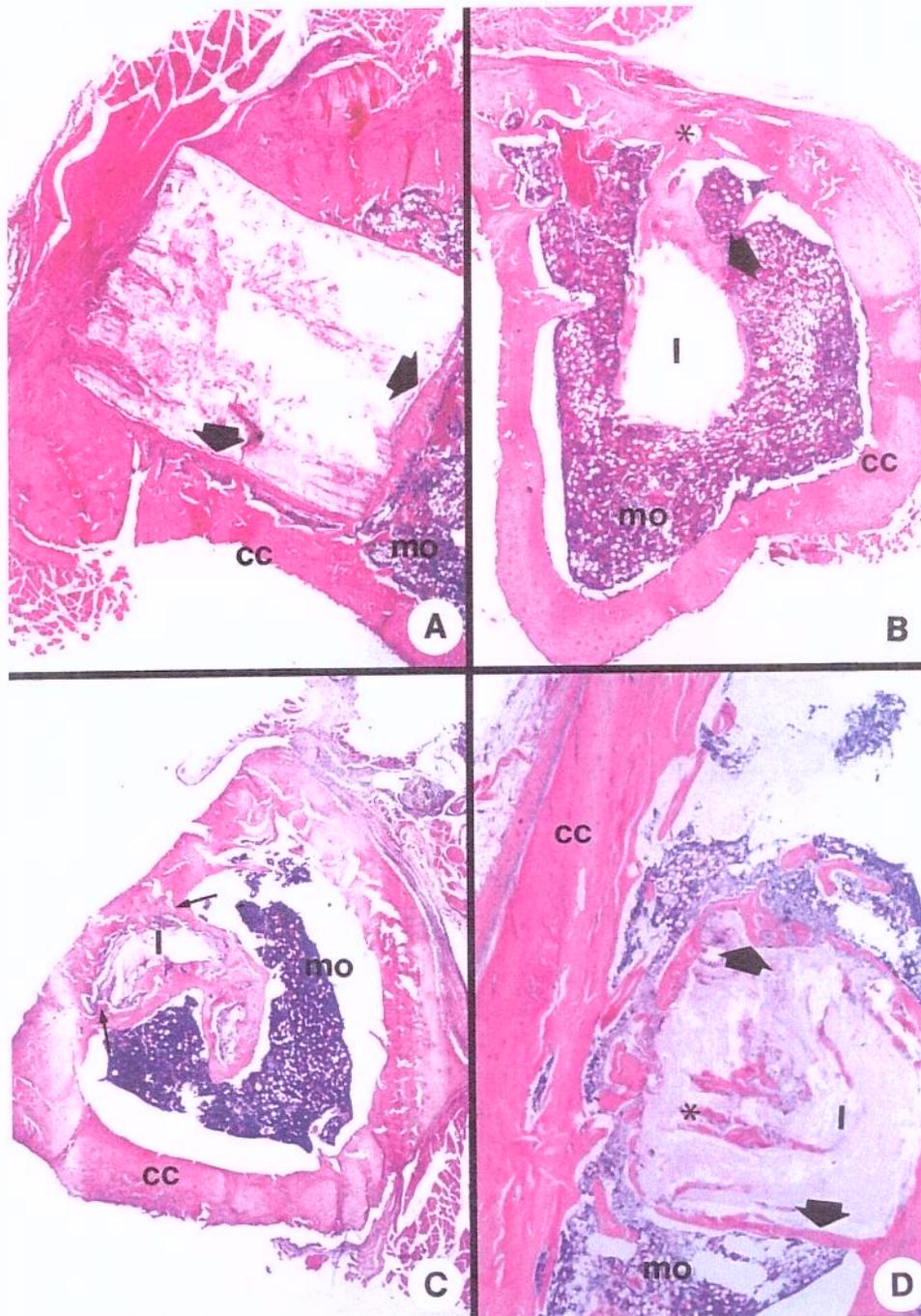
9 - APÊNDICES



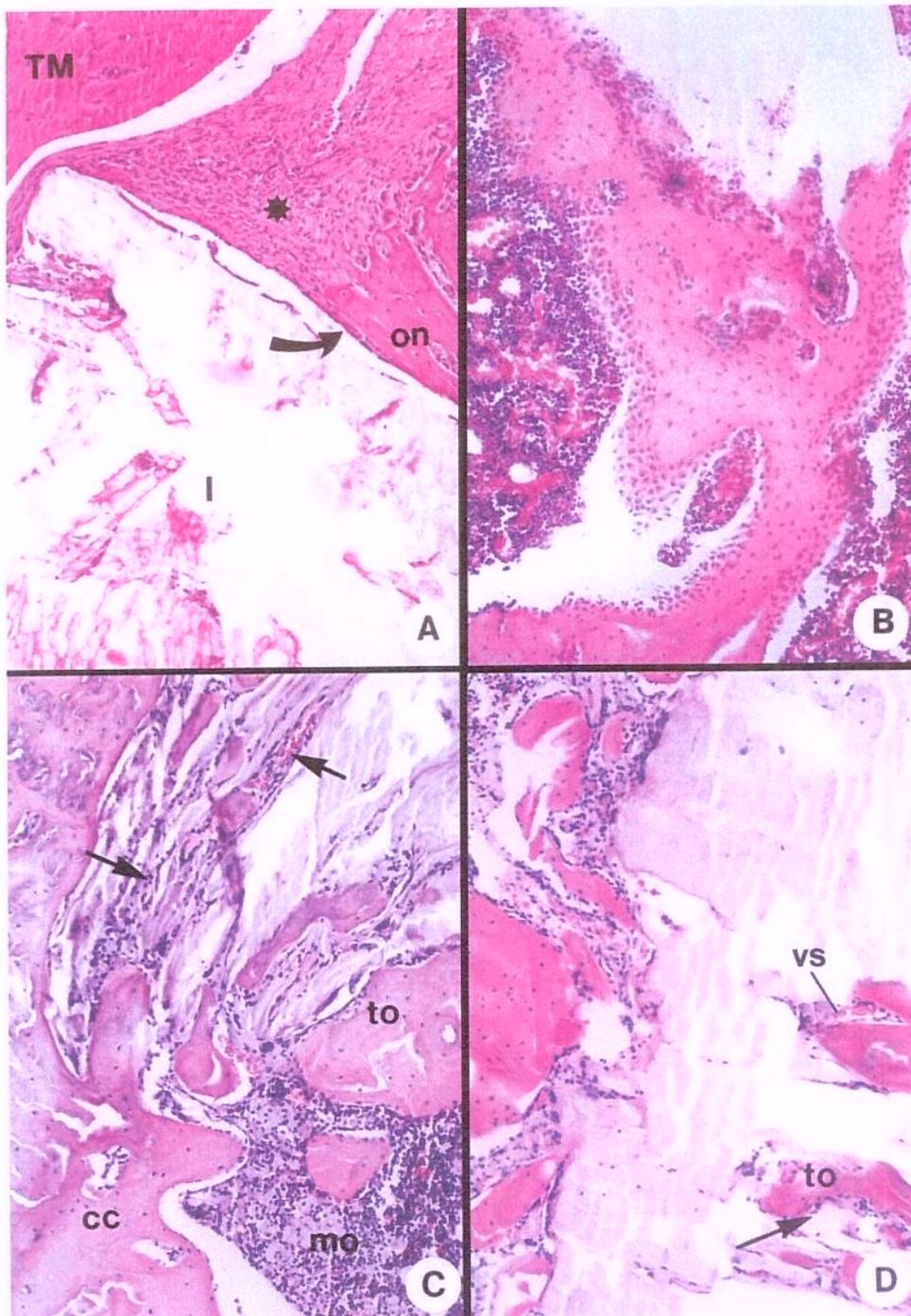
1) Cortes transversal da tibia do rato implantado com PLLA. **A** - 2 semanas pós-implante. Presença do implante (I) no canal medular, tecido ósseo neoformado (setas). Medula óssea (mo); camada cortical (cc). **B**- 4 semanas pós-implante, implante (I), tecido ósseo (setas), preenchimento da cortical (*), medula óssea (mo), cortical (cc). **C**- 8 semanas pós implante, implante (I), envolvido por osso (setas), unido à camada cortical (setas), medula óssea (mo), camada cortical (cc). **D**- 16 semanas pós-implante, implante (I) envolvido por tecido ósseo (setas), fendas formadas no interior do implante (*), medula óssea (mo), camada cortical (cc). 23X H&E.



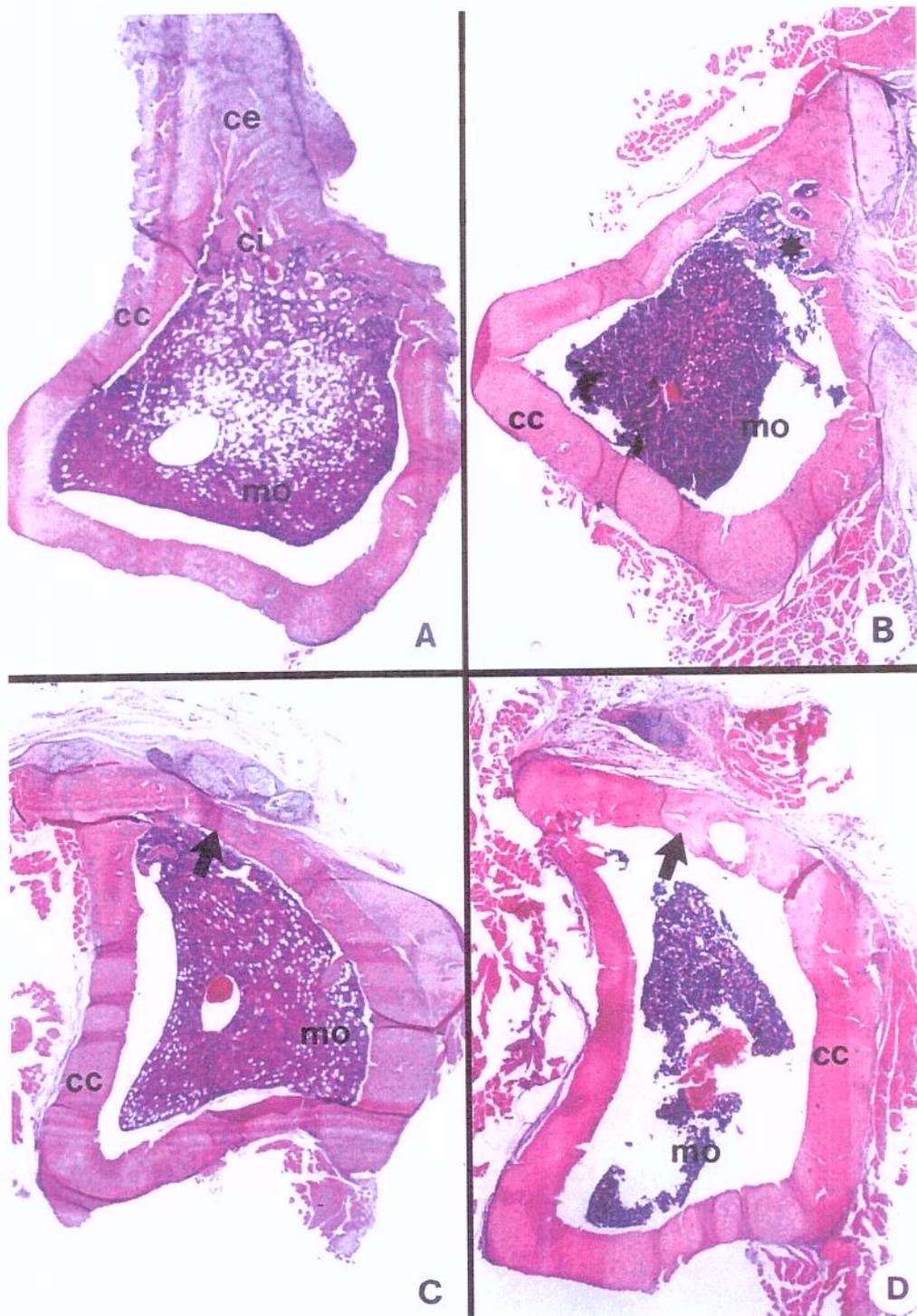
2) Cortes transversal da tibia do rato implantado com PLLA. **A** – 2 semanas pós implante, notar implante (I) em contato com osso neoformado (on) interposto por células fusiformes (setas). Vasos sanguíneos (*). **B** – 4 semanas, camada de tecido ósseo ao redor do implante (I) interposta por células fusiformes (cf). **C** – 8 semanas pós implante, camada de tecido ósseo organizado (*) envolvendo o implante (I). Medula óssea (mo). Fenda preenchida por células (seta). **D** – 16 semanas pós implante, tecido ósseo (to) ao redor do implante (I). Presença de fenda ocupada por células e capilares sanguíneos (setas). Medula óssea (mo). 113X H&E.



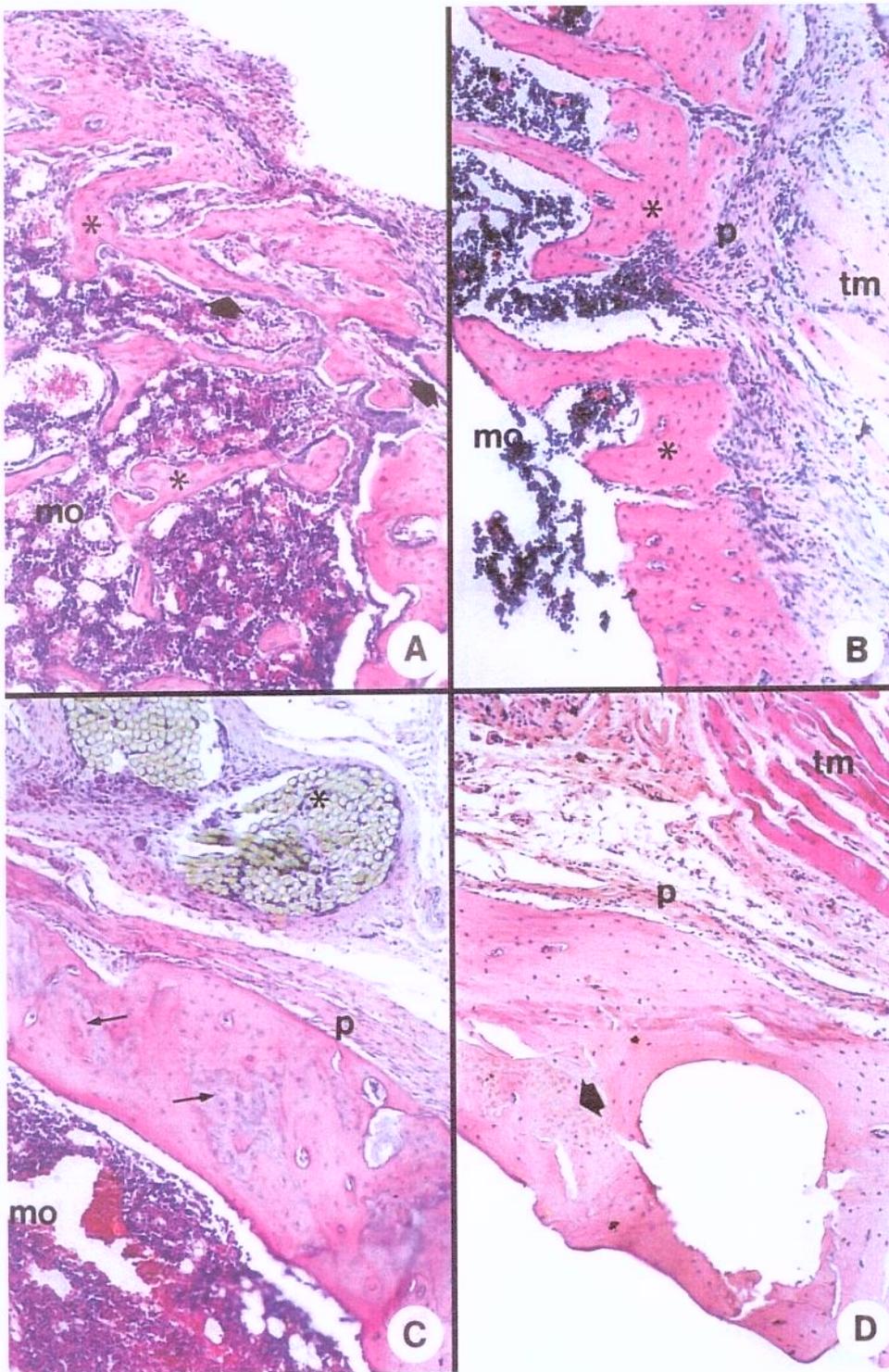
3) Cortes transversal da tibia do rato implantado com a blenda PLLA/PEO **A** – 2 semanas pós-implante, presença do implante (I) no interior do canal medular envolvido por osso neoformado (setas). Presença de fendas no interior do implante. Medula óssea (mo). Camada cortical (cc). **B** – 4 semanas, implante no interior do canal medular envolvido por tecido ósseo (seta). Local da falha preenchido por tecido ósseo (*). Medula óssea (mo). Camada cortical (cc). **C** – 8 semanas, implante (I) no interior do canal medular envolvido por tecido ósseo (setas). Medula óssea (mo). Camada cortical (cc). **D** – 16 semanas, implante (I) no canal medular envolvido por tecido ósseo (setas). Tecido ósseo no interior de fendas formadas no implante (*). Medula óssea (mo). Camada cortical (cc). 23X H&E.



4) Cortes transversal da tibia do rato implantado com a blenda PLLA/PEO **A** - 2 semanas pós-implante, tecido conjuntivo no local da falha óssea (*) e células fusiformes (seta) na interface osso neoformado (on) e implante (I). **B** - 4 semanas pós-implante, osso neoformado (on) em contato com implante (I). Medula óssea (mo). Osteoblastos ativos (setas). **C**- 8 semanas pós implante, Tecido ósseo (to) no interior do implante além de células e vasos sanguíneos (setas). Medula óssea (mo). Camada cortical (cc). **D**- 16 semanas pós-implante, presença de tecido ósseo (to), vasos sanguíneos (vs) e células (setas) no interior do implante (I). 113X H&E.



Cortes transversal da tíbia do rato sem a colocação de implantes A - 2 semanas nota-se formação de trabéculas no local da lesão formando calo ósseo interno (ci) e externo (ce). B - 4 semanas pós-implante, camada cortical (cc) e medula óssea integras. C - 8 semanas e D - 16 semanas já não era visível o local da lesão realizada na cortical. 23X H&E.



Cortes transversal da tíbia do rato sem a colocação de implantes **A** - 2 semanas nota-se formação de trabéculas no local da lesão (setas). **B** - 4 semanas pós-implante, camada cortical (cc) e medula óssea integras em processo de modelagem (*). **C** - 8 semanas e **D** - 16 semanas já não era visível o local da lesão realizada na cortical. **D** - Presença de calo ósseo cartilaginoso (seta). 23X H&E.

APÊNDICE 7

Imagem	PLLA/PEO 4 semanas (4)	
	Largura:	Altura:
	1600	1200

%de regiões: 22.5%
em relação a área total da imagem

Pixel		
Unidade:	Largura:	Altura:
um	0.800131	0.807860

Densidade	R	213.460
óptica média	G	73.361
das áreas	B	110.038
marcadas	Media	132.286

Dados Estatísticos

	MORFOMETRIA		ABSORÇÃO DE COR			Densidade	DIÂMETROS			
	Área	Perímetro	R	G	B	da estrutura	Diâm. Transv.	Diâm.Maior	Diâm.Menor	
Número:	21	21	21	21	21	21	0	21	21	Número:
Soma:	279618.758	11922.567	59687346.765	#####	#####	4934.841	0.000	3862.239	1588.183	Soma:
Média:	13315.179	567.741	2842254.608	976816.129	1465182.316	230.231	#DIV/0!	183.916	75.628	Média:
Desvio Padrão:	41508.738	725.189	8591362.744	1819920.297	3575881.622	62.929	#DIV/0!	219.269	110.920	Desvio Padrão:
Valor Máximo	191489.391	2727.714	39714580.000	8263855.000	#####	290.048	0.000	823.210	450.474	Valor Máximo
Valor Mínimo	17.453	19.250	4968.000	4907.000	4894.000	112.400	0.000	6.401	1.600	Valor Mínimo
Significância 5%	17753.218	310.162	3674511.551	778376.883	1529398.620	26.915	#DIV/0!	93.781	47.440	Significância 5%
Significância 1%	23331.737	407.623	4829137.884	1022052.982	2009975.126	35.372	#DIV/0!	123.249	62.347	Significância 1%

Dados Individuais

Número: 21										
Estrutura	Área	Perímetro	R	G	B	Densidade	Diâm. Transv.	Diâm.Maior	Diâm.Menor	Borda
21	17.453	19.250	4968.000	4907.000	4914.000	282.460		6.401	1.616	Não
20	538.789	144.061	155586.672	151556.063	150777.938	293.313		55.932	16.227	Não
19	1682.564	259.039	448789.531	430709.125	435251.313	260.466		104.970	27.514	Não
18	1536.156	276.582	422486.875	400662.969	408206.719	267.194		91.961	34.758	Sim
17	2332.190	278.505	645478.313	587016.875	602041.688	262.205		101.901	37.504	Não
16	4847.956	704.873	1352267.750	1296960.250	1308104.125	272.096		262.702	56.443	Não
15	9553.704	528.682	2043524.000	935019.000	1205581.625	145.986		167.976	102.888	Não
14	8104.489	1274.926	2201589.250	1965058.125	1995970.125	253.465		437.732	107.457	Sim
13	2377.438	465.160	521618.094	392116.156	430314.906	188.445		176.827	35.338	Não
12	802.821	204.856	237232.141	227810.609	227981.797	287.737		71.279	15.970	Não
11	13041.970	1597.587	3202275.000	2691301.750	2760346.750	221.181		526.242	158.384	Não
10	1026.797	194.414	216527.172	155698.219	175032.531	177.659		71.427	23.805	Não
9	1690.321	222.933	438730.844	387018.000	393403.188	240.418		79.819	33.690	Não
8	4032.530	616.531	688670.125	558065.250	616352.375	154.005		178.894	116.738	Não
7	63.993	58.120	19003.000	18537.000	18106.000	289.855		25.852	1.600	Não
6	23.270	24.189	8904.000	6712.000	6507.000	288.252		8.886	1.600	Não
5	17.453	19.342	5205.000	5047.000	4894.000	289.278		6.463	1.600	Não
4	58.175	53.272	17367.000	16818.000	16436.000	290.048		23.428	1.600	Não
3	33434.410	1956.997	6729083.000	1674490.625	3009418.250	113.785		553.896	296.568	Não
2	2946.911	295.733	615461.000	343779.688	407477.313	154.593		86.441	66.411	Sim
1	191489.391	2727.714	39714580.000	8263855.000	#####	112.400		823.210	450.474	Sim