

Débora Regina Machado Silva

**DEGRADAÇÃO *IN VIVO* DE MEMBRANAS DE
POLI(L-ÁCIDO LÁTICO) CONTENDO
PLASTIFICANTE TRI-ETIL-CITRATO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Débora Regina Machado Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Alberto Rincon

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Estrutural
na área de Histologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon

UNIDADE	B C
Nº CHAMADA	T/UNICAMP Si 38d
V	BY
TELEFONO	48946
FAX	16-837102
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/05/02
Nº CPD	

CM00167271-1

SiB ID 239961

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Si38d **Silva, Débora Regina Machado**
 Degradação *in vitro* de membranas de poli(L-ácido láctico) contendo
 plastificante tri-etil-citrato/ Débora Regina Machado Silva. --
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

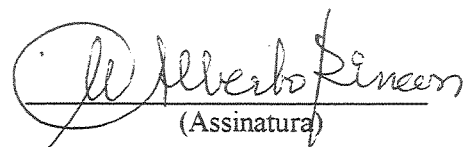
Orientadora: Maria do Carmo Alberto-Rincon
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia

1. Membrana (Biologia). 2. Degradação. I. Alberto-Rincon,
 Maria do Carmo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Biologia. III. Título.

DATA DA DEFESA: 05/02/2002

BANCA EXAMINADORA:

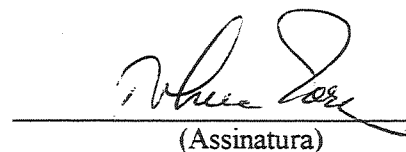
Profa. Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon (Orientadora)


(Assinatura)

Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia


(Assinatura)

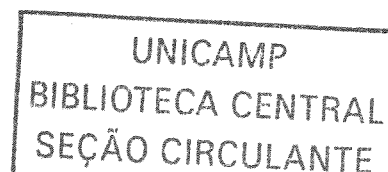
Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn


(Assinatura)

Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

(Assinatura)

80702222



DEDICATÓRIA:

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Gilmar e Elisabete, exemplos de vida que sempre souberam me apoiar e que fizeram de mim o que sou hoje. Ao meu irmão, Rogério, amigo eterno. Ao meu marido, Alex, companheiro diário de batalha, que me escora e me atura. A minha gracinha, Beatriz, que seu sorriso continue a me motivar e me enfeitiçar.

AGRADECIMENTOS

Foram valiosas as contribuições de muitas pessoas para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, às quais presto meus mais sinceros agradecimentos:

A minha orientadora, Profa. Maria do Carmo, que sempre soube enobrecer nossos achados, solucionar problemas emergentes e me guiar na vida acadêmica e pessoal com muita dedicação, respeito e afeto.

À professora Eliana Duek, elo de ligação com a ciência dos materiais, sempre prestativa e esclarecedora. Ao amigo de trabalho, Rubinho, pessoa que nos inspira e nos faz continuar.

Aos professores: Áureo T. Yamada, Luís Antonio Violin Dias Pereira, e, em especial, ao professor Paulo Pinto Joazeiro, que sempre estavam prontos a me ajudar no que fosse preciso. Aos demais professores do Departamento, que direta ou indiretamente contribuíram para a conquista desta etapa.

Aos funcionários do Departamento de Histologia: à secretária Rita que esclarecia minhas dúvidas e gentilmente ajudava a resolver questões de diversas naturezas; ao funcionário e amigo Baltazar, sempre pronto a contribuir nas cirurgias dos animais e nos alegrar com suas canções; à Marta Leonardo pela experiência e competência profissional que me foi passada. Não esquecendo de muitos outros funcionários como a “Dona” Raquel, Marta, Beatriz e Claudinete, que sempre me permitiam contar com apoio.

À coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, profa. Shirlei, pela paciência e disposição em sanar minhas dúvidas. À secretária do curso, Lílian, sempre muito responsável e dedicada em sua função.

Aos amigos de laboratório, dentre eles, Márcia, Eliane, Monique, Alex, Júnior, Suzana, Fabíola, Silvana e muitos outros, que sempre estiveram próximos e compartilharam os bons momentos desses últimos anos.

À amiga e companheira de trabalho, Sandrinha, obrigada por poder contar com sua amizade e companheirismo neste período em que estive comigo.

Aos familiares que sempre se mostraram curiosos e preocupados em entender o que eu fazia.

À amiga, Vânia, que mesmo distante está sempre presente.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, que através de seus funcionários, permitiu a obtenção de grande parte dos resultados demonstrados neste trabalho.

Aos animais de laboratório, seres imprescindíveis para a idealização e resolução deste projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro que me foi concedido.

Às professoras da banca examinadora, que me cederam parte de suas experiências acadêmico-profissionais para o aprimoramento deste trabalho.

O uso de materiais artificiais para restaurar parte do corpo humano tem exigido o desenvolvimento de tecnologias diferenciadas para fabricação de produtos que atendam às solicitações de materiais implantáveis para próteses. Com esse intuito, o desenvolvimento de materiais biodegradáveis vem despertando o interesse para o estudo de suas interações com o organismo hospedeiro, a fim de que se tornem adequados como materiais de próteses temporárias.

Membranas de poli-ácido láctico (PLLA) biodegradáveis têm sido utilizadas para diversas finalidades, como liberação controlada de drogas, separação entre tecidos, suporte para cultura celular e preenchimento de tecidos lesados. Sabe-se que é possível modificar as propriedades físicas destes polímeros através da adição de plastificante, como o tri-etil-citrato, fornecendo maleabilidade e porosidade aos implantes. A quantidade de plastificante utilizada pode fornecer membranas com porosidades diferentes, possibilitando o controle do tempo de degradação do polímero e da invasão de elementos teciduais por entre os poros da membrana e, por conseguinte, permitindo uma degradação do material compatível com reconstituição tecidual.

O objetivo deste trabalho consistiu na análise *in vivo* das propriedades biológicas de uma membrana de PLLA porosa adicionada de 7% de tri-etil-citrato até 180 dias pós-implantação no tecido subcutâneo de ratos. As amostras coletadas de ratos Wistar fêmeas de 2 a 180 dias após o procedimento cirúrgico foram processadas para análise por

microscopia de luz, com inclusão em parafina e em resina sintética glicol metacrilato, microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.), microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T.) e imunocitoquímica de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

Os resultados indicam que as membranas são envolvidas por tecido conjuntivo frouxo, com aumento da invasão de elementos teciduais no decorrer dos dias de implantação. A análise por M.E.V. mostra que o processo de degradação do polímero se inicia com o aparecimento de fraturas centrípedas nas unidades globulares, ganhando maiores proporções nos períodos finais de análise. Através da análise por imunocitoquímica de PCNA, foi possível observar núcleos de células marcadas, indicando proliferação celular no local do implante.

The increasing use of artificial materials for prostheses has led to the development of products that meet the demands of implantable materials. The development of biodegradable materials has stimulated interest in the study of their interactions with host tissue in order to improve the likelihood of success in prostheses.

Biodegradable poly(L-lactic acid) membranes have been used for several purposes, including controlled release of drugs, as a barrier for soft and hard tissues and for replacing of damaged tissues. The physical properties of these materials can be modified by the addition of a plasticizer, such as the triethylcitrate, to provide flexibility and porosity to the implants and to enhance the control of the polymer degradation time. The accurate addition of plasticizer thus allows the production of material for different applications so that the degradation time of the polymer can be made compatible with the proliferation of new tissue.

The aim of this work was to examine the biological and morphological properties of a porous membrane of PLLA containing 7% triethylcitrate until 180 days after implantation in the subcutaneous tissue of rats. Samples of skin obtained from female Wistar rats 2-180 days after implantation with PLLA-based membrane were processed for light microscopy, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) Immunocytochemistry.

The results indicated that the membranes became surrounded by a delicate network of connective tissue which gradually invaded the membrane structure. Analysis by SEM indicated that the polymer degradation began with the appearance of radial fractures in the globular units of the biodegradable membrane, especially by 90 and 180 days after implantation. By immunocytochemistry, was possible to observe labeled nucleus, indicating cellular proliferation into the site of implantation.

*“Não basta dar os passos que nos devem levar
um dia ao objetivo, cada passo deve ser
ele próprio um objetivo em si mesmo,
ao mesmo tempo que nos leva para diante”.*

Von Goethe

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais	2
1.2. Aplicações dos polímeros bioabsorvíveis de PLLA	6
1.2.1. Implantes ósseos e cartilaginosos	6
1.2.2. Liberação controlada de drogas	7
1.2.3. Suporte para cultura celular	8
1.3. OBJETIVOS	12
1.4. ESTRUTURA DA TESE	13
II. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1. Obtenção dos animais	15
2.2. Obtenção das membranas porosas de PLLA	15
2.3. Implantação	16
2.4. Retirada das amostras	17
2.5. Processamento do material	17
2.5.1. Embebição em parafina	18
2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.)	18
2.5.3. Imunocitoquímica	19
2.6. Formas de análise do material	21
2.6.1. Análise do material preparado para M.E.T.	21
2.6.2. Análise do material preparado para Imunocitoquímica	22
III. ARTIGO CIENTÍFICO	23
IV. RESULTADOS	43
4.1. Análise macroscópica	44
4.2. Análise microscópica	44
4.2.1. Análise das amostras após a implantação	44
4.2.1.1. Microscopia de transmissão	45
4.2.1.2. Imunocitoquímica	47

4.3. Documentação Fotográfica	51
V. DISCUSSÃO	94
VI. CONCLUSÕES	102
VII. APÊNDICE	105
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

I. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais.

Os biomateriais foram definidos, segundo estabelecimento do *Consensus of European Society for Biomaterials* dado por Willians, 1987, como todo material não vivo usado em dispositivo médico (ou biomédico), que interage com um sistema biológico. Além disso, os biomateriais podem ser classificados como *permanentes e temporários* (TÖRMÄLÄ *et al.*, 1998). Se por um lado os biomateriais permanentes são compostos utilizados com o objetivo de substituir um tecido lesado por tempo indeterminado, sendo produzidos de modo a reter as suas características mecânicas e físico-químicas por longos períodos (TÖRMÄLÄ *et al.*, 1998), por outro lado, existem tecidos que necessitam de um suporte que preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se complete, ou ainda que direcione o processo regenerativo. São nesses casos que os biomateriais temporários são de grande valia. (SANTOS Jr., 2001).

A ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar cujo objetivo geral é, não apenas o desenvolvimento de compostos a serem utilizados como substitutos de tecidos lesados, mas também o entendimento das interações deste com o organismo receptor. Desse modo, profissionais de diversas áreas de atuação, entre eles médicos, engenheiros, químicos e biólogos, têm se dedicado à criação e aperfeiçoamento de dispositivos que sejam biocompatíveis e funcionais que, quando implantados cirurgicamente, possibilitem uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes que os utilizam.

Dentre a variedade de compostos utilizados, os poliésteres bioabsorvíveis de poli (ácido lático) e poli (ácido glicólico) representam famílias de atrativos materiais para confecção de suportes para regeneração de tecidos, já que possuem um longo e favorável uso clínico em consagradas aplicações cirúrgicas e oferecem uma grande variedade de propriedades físicas e taxas de degradação (NAM *et al.*, 2000; MIDDLETON & TIPTON, 2000). Estes compostos correspondem a polímeros bioabsorvíveis sintetizados a partir de monômeros e que fazem parte do metabolismo natural do organismo, sofrendo degradação por hidrólise, ou seja, após um período em contato com o meio aquoso sofrem cisões em suas ligações ésteres. Os monômeros desses materiais são então incorporados no ciclo do ácido tricarboxílico e excretados na forma de gás carbônico e água (ATHANASIOU *et al.*, 1996; MIDDLETON & TIPTON, 2000).

Pesquisas realizadas na primeira metade do século XX com polímeros sintetizados de ácido glicólico e outros α -hidroxiácidos foram abandonadas devido aos polímeros resultantes serem muito instáveis para uso em escala industrial. No entanto, esta instabilidade, inclusive tendendo à biodegradação, tem provado ser muito importante para uso médico nas últimas três décadas (MIDDLETON & TIPTON, 2000). Copolímeros preparados de ácido glicólico e ácido lático têm encontrado uma rica variedade de usos na indústria médica, começando com suturas biodegradáveis aprovadas a partir de 1960 (GILDING & REED, 1979).

Dispositivos implantáveis em pele, ossos, vasos sanguíneos, fígado, cartilagens, intestino e nervos podem ser obtidos a partir destes materiais absorvíveis e estão em vários estágios de investigação e desenvolvimento como produtos clínicos (PARK & CIMA, 1996). Dispositivos de poli(ácido láctico) apresentam potenciais aplicações de acordo com a forma dos implantes, como esponjas (DrylacTM) (BARROWS, 1991), pinos (VAN der ELST *et al.*, 1995), matrizes de dupla camada (BEUMER *et al.*, 1994), monocamada (LUCIANO, 1997) ou, ainda, materiais mistos (VON RECUM *et al.*, 1995).

Dentre muitos outros campos de pesquisa explorados, não se pode esquecer a importância de diversos fatores que influenciam a reação do organismo à presença de um implante biodegradável. Essa resposta pode ser relacionada com o tamanho e composição do implante bem como com o sítio de implantação. A taxa de degradação do polímero e a capacidade do tecido de eliminar os produtos desta degradação são características-chave na reação tecidual ao implante. Se o tecido adjacente não pode eliminar os subprodutos ácidos de um implante que se degrada rapidamente, possivelmente resultará em uma resposta inflamatória ou tóxica (SUGANUMA & ALEXANDAR, 1993).

A degradação do polímero é um fator importante, pois determina o tipo e a intensidade da resposta inflamatória, já que o surgimento de partículas poli, oligo e monoméricas liberadas durante a degradação do polímero *in vivo* está diretamente relacionada ao tipo da resposta inflamatória. Este processo pode ser oriundo de produtos tóxicos provenientes da degradação ou da mudança na rugosidade superficial e forma do

implante durante a liberação dos fragmentos. Além disso, a própria fagocitose dos fragmentos atua como fator importante na modificação da resposta inflamatória. A fagocitose modifica a função do macrófago, o qual é o pivô na resposta inflamatória tecidual e na reação de corpo estranho. Ademais, fragmentos fagocitados podem acarretar morte celular, e a liberação do conteúdo destas células mortas pode levar a uma resposta inflamatória aguda (LAM, *et al.*, 1993).

Sabe-se que cada tecido possui necessidades especiais, muitas das quais podem ser contempladas através da adaptação destes materiais a partir do desenvolvimento de tecnologias diferenciadas, que modificam as propriedades originais. Do ponto de vista das aplicações na área médica, a fase inicial de síntese e caracterização das propriedades do PLLA bem como de sua biocompatibilidade já foi superada (BENDIX *et al.*, 1998). Hoje, a ênfase das pesquisas está na busca da adequação de suas propriedades mecânicas, no controle da velocidade de sua degradação, na formação de copolímeros e no desenvolvimento de estruturas tridimensionais (BARBANTI, 2001).

1.2. Aplicações dos Polímeros bioabsorvíveis de PLLA.

1.2.1. Implantes ósseos e cartilaginosos.

Na ortopedia é comum o uso de metais que não correspondem aos biomateriais ideais para este tipo de aplicação. O tempo no qual a prótese metálica funciona como um desvio à tensão aplicada ao osso tem como consequência o desenvolvimento de uma estrutura óssea mecanicamente inferior devido à atrofia, pois o osso pára de ser submetido aos esforços. Outros problemas são refraturas após remoção, corrosão, liberação de partículas ou íons e inflamações (TÖRMÄLÄ *et al.*, 1991; GRULKE, 1989; VAN der ELST *et al.*, 1995). Acima de tudo, a necessidade de remoção das próteses metálicas representa uma grande desvantagem, pois demanda uma segunda cirurgia, acarretando em um maior tempo de recuperação para o paciente, com consequente aumento dos custos e dos riscos de complicações cirúrgicas (BEUMER *et al.*, 1994; MIDDLETON & TIPTON, 2000).

A geração de tecido ósseo e cartilaginoso através do transplante autólogo de células/tecido corresponde a uma das mais promissoras técnicas da cirurgia ortopédica e engenharia biomédica, resultando na eliminação de problemas como grandes extensões de lesão do tecido doador, rejeição imunológica e contaminação (PATRICK Jr. & MIKOS, 1998; NAUGHTON *et al.*, 1995). Além disso, recentes inovações têm aprimorado os sistemas de transplante de células e tecidos autólogos através da incorporação de fatores de crescimento apropriados e da manipulação genética das células isoladas dos pacientes antes

da preparação de implantes, possibilitando o reparo de lesões teciduais severas tais como as cartilaginosas ou deficiências enzimáticas, sanadas através da terapia gênica no sistema de cultivo celular (SITTINGER *et al.*, 1996).

Os resultados da aplicação de implantes ortopédicos bioabsorvíveis em humanos são muito favoráveis existindo apenas alguns relatos negativos. Complicações envolvendo implantes ortopédicos biodegradáveis de ácido lático e glicólico ocorrem a uma taxa inferior a 10% (ATHANASIOU *et al.*, 1998). Embora inicialmente significantes, estes problemas poderão ser solucionados no futuro, graças à intensiva pesquisa na área de implantes biodegradáveis (MIDDLETON & TIPTON, 2000).

1.2.2. Liberação controlada de drogas.

A possibilidade de associação de diferentes compostos poliméricos e alteração de suas características mecânicas permitem a produção de diferentes materiais de acordo com o propósito requerido. É possível associar esses compostos com diferentes drogas e, conhecendo-se a velocidade de degradação dos biomateriais, é possível controlar a taxa de liberação da substância adicionada. Sistemas baseados em Al_2O_3 (alumina)/PLA/PMMA (poli metil-metacrilato) são compostos de aplicações cirúrgicas que podem ser produzidos para a liberação controlada de agentes antiinflamatórios como o ibuprofeno (VALLET-REGÍ *et al.*, 1998).

1.2.3. Suporte para cultura celular.

A literatura tem mostrado uma inovadora aplicação para os polímeros absorvíveis na Engenharia de Tecidos (TÖRMÄLÄ, 1993; FREED *et al.*, 1993). Esta se baseia na reconstrução de tecidos através de cultura de células, tendo como suporte os polímeros absorvíveis, como avaliado por DAVIS & VACANTI, 1996. Este tipo de aplicação tem apresentado várias vantagens sobre o transplante de órgãos, pois há um controle preciso das características do material utilizado, fazendo-se necessário apenas um pequeno número de células do doador. A expansão *in vitro* promove a remoção de células indesejáveis, diminuindo a rejeição entre as células cultivadas e as do receptor. Dessa forma, os custos de todo o processo são reduzidos de forma significativa. Aliado a isso, pesquisas recentes têm buscado a construção de suportes poliméricos especificamente desenhados, apresentando distribuição tridimensional e com taxa de degradação controlada (FREED *et al.*, 1994).

Inúmeros métodos têm sido propostos para a produção de suportes poliméricos altamente porosos tais como a adição de sal no processo de secagem do solvente (MIKOS *et al.*, 1993; MIKOS *et al.*, 1994), “freeze drying” (WHANG *et al.*, 1995), expansão com dióxido de carbono (MOONEY *et al.*, 1996), separação de fase (LO *et al.*, 1996) além de suportes tridimensionais (PARK *et al.*, 1998).

Matrizes porosas promovem espaço adequado para a semeadura e crescimento das células e produção de matriz extracelular. A distribuição da uniformidade e a interconexão da estrutura dos poros são importantes, facilitando o crescimento dos tecidos na forma de

uma rede organizada, tendo grande aplicação na reconstrução de tecidos ósseos e cartilagosos (WALD *et al.*, 1993; VAN SLIEDREGT *et al.*, 1994; MIKOS & TEMENOFF, 2000).

Membranas delgadas, não porosas e flexíveis de poli(L-ácido láctico) e de copolímero poli(DL ácido láctico-ácido glicólico) foram utilizadas como suporte para cultura de células epiteliais pigmentares de retina retiradas de fetos humanos. Notou-se uma boa fixação celular e os autores concluíram que estas membranas poderiam ser uma maneira de se transportar células alogênicas para terapia de um grande número de doenças oculares relacionadas com disfunção da retina (THOMSON *et al.*, 1996).

É possível associar cultura de células com suportes de biomateriais de uma forma anatômica pré-formada. Esse princípio foi utilizado na obtenção de implantes de septo nasal tendo como suporte um sistema tridimensional para cultura de condrócitos. Dessa maneira, conseguiu-se obter um material com forma e flexibilidade apropriadas para substituir a cartilagem lesada, além de se fornecer células que poderiam reconstituir o tecido original (PUELACHER *et al.*, 1994).

Células obtidas de cartilagem articular humana, mantidas em cultura sobre diferentes poliésteres bioabsorvíveis mostraram que o processo de adesão era proporcional a hidrofilicidade dos polímeros. Apesar disso, não foram observadas variações no espalhamento das células sobre os diferentes materiais. Embora as células estudadas tivessem uma menor adesividade às membranas de PLLA que ao PGA, sobre o PLLA, as

células mostraram uma melhor capacidade proliferativa (ISHAUG-RILEY *et al.*, 1997). Quanto aos resultados de experimentos de reconstituição de lesões de meniscos que utilizaram suportes de PLLA porosos é sabido que possibilitaram o crescimento vascular para o interior da região lesada (KLOMPMAKER *et al.*, 1991).

Pesquisadores têm apontado potenciais vantagens no uso de suportes poliméricos biodegradáveis sintéticos em substituição a materiais naturais, incluindo: a produção de materiais com formas tridimensionais específicas para uso clínico, a seleção de polímeros que degradam em paralelo com a secreção celular de elementos da matriz extracelular, além da redução da resposta inflamatória do hospedeiro através do emprego de suportes poliméricos consagradamente biocompatíveis (FREED *et al.*, 1993).

LUCIANO (1997) sintetizou membranas absorvíveis de poli(ácido láctico) cujas características teriam potenciais aplicações como substrato para cultura de células, regeneração cutânea e regeneração guiada de tecido. Estas membranas podem ter suas características físico-químicas modificadas através da variação da concentração polímero-solvente. Além disso, podem ser obtidas membranas porosas através da adição de tri-etil-citrato, um plastificante biocompatível, como utilizado por DA-SILVA *et al.*, 1985. Segundo LUCIANO (1997), nas membranas sem plastificante há uma menor adesão com o tecido hospedeiro, degradando-se mais lentamente, sendo, portanto indicadas como suporte para regeneração guiada de tecido. Por outro lado, membranas porosas (obtidas pela adição

de tri-etil-citrato) degradam mais rapidamente em relação às primeiras, e permitem adesão proliferativa e migração de células do tecido conjuntivo, seriam importantes em casos de reconstrução de tecidos.

1.3. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos a análise das propriedades biológicas de uma membrana de PLLA porosa adicionada de 7% de plastificante tri-etil-citrato, verificando sua interação com o tecido adjacente quando implantada no tecido subcutâneo de ratos, bem como o processo de degradação neste local. Ainda foram analisados os seguintes aspectos:

1. Estudo temporal da degradação do polímero através da análise pela microscopia eletrônica de varredura das amostras colhidas após 2, 7, 14, 21, 28, 60, 90 e 180 dias da implantação;

2. Estudo da invasão de elementos teciduais entre as unidades globulares do polímero através da análise à microscopia de luz e eletrônica de transmissão em amostras coletadas nos dias descritos no item anterior;

3. Estudo da proliferação celular no sítio de implantação. Para essa finalidade foi utilizada a imunocitoquímica de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) para amostras embebidas em parafina correspondentes aos dias de implantação já mencionados.

O presente trabalho é composto de uma introdução geral já apresentada, incluindo objetivos (Cap I), materiais e métodos referentes às técnicas empregadas para obtenção dos resultados de microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T.) e imunocitoquímica de PCNA (Cap. II), de um artigo científico contendo resultados referentes à utilização de Microscopia de luz e eletrônica de varredura, aceito para publicação (Cap. III), resultados da análise por M.E.T. e imunocitoquímica (Cap. IV), discussão geral (Cap. V), conclusões finais (Cap. VI), trabalho em paralelo submetido à publicação (Cap. VII) e referências bibliográficas (Cap. VIII).

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos animais.

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar fêmeas, com idade aproximada de três meses, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Esses animais permaneceram no Biotério do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biológicas da Unicamp, recebendo ração comercial e água “ad libitum”. Os animais foram mantidos em um regime de claro-escuro correspondente a 12 horas e à temperatura controlada de cerca de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

2.2. Obtenção das membranas porosas de PLLA.

O método utilizado para a obtenção das membranas de PLLA correspondeu ao de *casting* com adição de um plastificante para modificação das propriedades mecânicas e morfológicas da membrana formada, de acordo ao realizado por LUCIANO, 1997 no Departamento de Engenharia de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP. O processo de obtenção será descrito de modo sucinto nas etapas que se seguem:

1. Dissolução do PLLA e do plastificante em solvente cloreto de metileno e homogeneização da solução à temperatura ambiente;
2. Manutenção da solução à temperatura ambiente em recipientes fechados por 24 horas;

3. Escoamento da solução em um molde de placa de vidro liso com ressalto nas bordas;
4. Manutenção da placa em uma cuba de vidro com fluxo de ar seco para evaporação do solvente por 20 horas;
5. Armazenamento da membrana em dessecador a vácuo;
6. Corte do material sob a forma de discos de 6 mm de diâmetro por 1mm de espessura para a realização dos implantes.

2.3. Implantação.

Para este processo foram utilizados 16 animais, sendo que cada um deles abrigou duas membranas em seu dorso. As amostras foram previamente mergulhadas em solução fisiológica e retirado o ar do interior de seus poros, através de vácuo, a fim de não prejudicar a interação com o tecido.

O procedimento cirúrgico consistiu da anestesia dos animais em solução de Cloridrato de Xilazina (Virbaxyl 2 %, Virbac, Brasil). Logo após este processo, permaneceram em decúbito ventral, prosseguindo-se com a tricotomia do dorso, próximo à região cervical. As membranas foram implantadas através de duas incisões laterais de cerca de 1 cm, na pele do animal, onde foi inserida uma amostra por incisão. Portanto, dois implantes foram colocados no espaço subcutâneo de cada animal. Seguida a implantação,

os cortes foram suturados com fio de nylon 5-0 e álcool iodado foi utilizado como solução asséptica.

Os animais foram observados diariamente para a avaliação de suas condições de saúde e comportamento, permanecendo em gaiolas individuais até a coleta das amostras.

2.4. Retirada das amostras.

Para este procedimento, os animais passaram por uma nova tricotomia de dorso, sendo posteriormente sacrificados em atmosfera saturada de éter etílico. Em seguida, através da orientação da cicatriz do implante e da impressão da membrana na pele do animal, foi retirado um segmento de tecido abrangendo toda a região do implante.

Em cada coleta foram obtidas quatro amostras provenientes de dois animais. Os implantes coletados foram devidamente separados de acordo com o processamento e, a seguir, fixados. O excesso de tecido encontrado ao redor das membranas foi retirado e as amostras seccionadas de acordo com seus respectivos processamentos.

2.5. Processamento do material.

As amostras foram fixadas e processadas de acordo com a finalidade e formas de análise.

2.5.1. Embebição em parafina.

O processamento consistiu, inicialmente, na fixação do material em líquido de Bouin, por um período de 24 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada, desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados e embebidos em parafina.

Os preparados foram seccionados em navalhas descartáveis em micrótomo Leica RM 2145 a uma espessura de 5µm. Prosseguiu-se com a coloração por Tricrômico de Masson (T.M.) e Picrosírius.

2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão.

As amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído a 2%, paraformaldeído a 2% e ácido tânico a 0,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), durante 3 horas a 4° C.

O material fixado foi processado conforme o seguinte protocolo:

1. Lavagem em tampão fosfato-salina (PBS) 0,1 M (pH 7,4);
2. Pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1%;
3. Lavagem em PBS 0,1 M (pH 7,4);
4. Desidratação em gradiente crescente de etanol;
5. Imersão em óxido propileno e etanol a 100%, 1:1. Em seguida, óxido propileno puro;

6. Embebição em óxido de propileno e resina Epon na proporção de 1:1. Em seguida, resina pura;

7. Polimerização.

Os fragmentos de implante com seu tecido adjacente foram embebidos em resina, sendo posteriormente desgastados e cortados com navalhas de vidro a fim de localizar o implante. Os cortes obtidos foram corados por uma solução de azul de toluidina a 0,5 % em Borax a 5%. Após a localização da membrana de PLLA e seu tecido adjacente por microscopia de luz e a escolha da região adequada a ser estudada, os blocos foram cortados na espessura de 70 nm, utilizando-se navalha de diamante. Os cortes ultrafinos foram depositados em telas de cobre de 300 mesh.

As telas foram contrastadas por uma solução de acetato de uranila a 2% por 20 minutos e, posteriormente, por citrato de chumbo por 10 minutos.

2.5.3. Imunocitoquímica.

O material embebido em parafina foi seccionado em micrótomo Leica RM 2145 a uma espessura de 5µm. Os cortes foram colocados em lâminas revestidas previamente em solução de 3-aminopropiltietoxi-silano a 4% para propiciar a adesão dos cortes. Posteriormente, os mesmos foram desparafinizados e hidratados em gradiente decrescente de etanol. O procedimento posterior consistiu nas etapas que se seguem:

II. Materiais e Métodos

1. Incubação em tampão citrato de sódio 0,05M pH 6,2 (banho-maria) em forno de microondas convencional por dois ciclos de 2 minutos na potência alta para exposição do antígeno.
2. Lavagem em tampão Tris-salina 0,05M pH 7,4 durante 15 minutos.
3. Bloqueio da peroxidase endógena utilizando solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% durante 30 minutos.
4. Lavagem em tampão Tris-salina 0,05M pH 7,4 durante 15 minutos.
5. Bloqueio em solução de leite Molico a 5% durante 45 minutos.
6. Incubação com anticorpo primário monoclonal anti-PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Upstate Biotechnology, U.S.A.) diluído a 1:200 em solução de Tris-HCl/BSA (Soro fetal bovino) a 1%, “overnight” a 4°C.
7. Lavagem em tampão Tris-salina 0,05M pH 7,4 durante 15 minutos.
8. Incubação com anticorpo secundário obtido do Kit universal da NOVOCASTRA (Reino Unido) na diluição de 1:50 durante 45 minutos.
9. Lavagem em tampão Tris-salina 0,05M pH 7,4 durante 15 minutos.
10. Incubação com conjugado marcador Streptoavidina-peroxidase (Kit NOVOCASTRA) na diluição de 1:25 durante 45 minutos.
11. Lavagem em tampão Tris-salina 0,05M pH 7,4 durante 15 minutos.

12. Incubação em solução reveladora contendo 0,05% de Tetrahydroclorato de 3,3-Diaminobenzidina (DAB) e 0.03% de H₂O₂ em tris-salina pH 7,4 e diferenciação ao microscópio de luz.

13. Lavagem em água destilada e contracoloração pelo Azul de anilina durante 10 segundos.

14. Desidratação dos cortes e montagem das lâminas.

Como controle positivo foram utilizados a epiderme, os folículos pilosos e as glândulas sebáceas presentes na próprio corte submetido à imunocitoquímica de PCNA e, como controle negativo, substitui-se o anticorpo primário anti-PCNA pelo tampão tris-BSA com procedimento normal para as demais etapas.

2.6. Formas de análise do material.

2.6.1. Análise do material preparado para M.E.T.

Os cortes ultrafinos depositados sobre as telas de cobre foram observados em microscópio Eletrônico de Transmissão LEO JEO 860, sendo seus negativos revelados e ampliados.

2.6.2. Análise do material preparado para Imunocitoquímica.

Os preparados obtidos foram fotografados em Fotomicroscópio Nikon Eclipse E 800, sendo seus negativos revelados e ampliados.

III. ARTIGO CIENTÍFICO

***IN VIVO* INTERACTION OF CELLS ON
POLY L- (LACTIC ACID) MEMBRANES CONTAINING PLASTICIZER**

D.R.M. Silva¹, S.M.N. Scapin¹, R.M. Luciano², P.P. Joazeiro¹, E.A.R Duek² and M.C.

Alberto-Rincon^{1*}

¹Department of Histology and Embryology, Institute of Biology; ²Department
of Material Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, State University
of Campinas (UNICAMP), PO Box 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

*Mailing adress

Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon

Departamento de Histologia e Embriologia

Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Caixa Postal 6109

13083-970, Campinas, SP, Brazil.

e-mail: arincon@unicamp.br

Fax: (55) (19) 3289-3124

Telephone: (55) (19) 3788-6251

Running Title: PLLA membranes containing a plasticizer

ABSTRACT

The development of biodegradable materials has lead to renewed interest in the study of their interactions with the host organism in order to make the resulting products appropriate for use as temporary materials in protheses. Poly L-(lactic acid)-based biodegradable devices have been used for several purposes. The physical properties of these materials can be modified by the addition of a plasticizer, such as the triethylcitrate, to provide flexibility and porosity to the implants and enhance control of the polymer degradation time. In this work we examined the biological properties of a poly L-(lactic acid) porous membrane containing 7% triethylcitrate, by assessing the process of degradation and the interaction with dermal tissue. Samples of skin obtained from female Wistar rats 2-180 days after implantation with PLLA-based membrane were processed for light microscopy and scanning electron microscopy. The membranes became surrounded by a delicate network of connective tissue which gradually invaded the membrane structure. Polymer degradation began with the appearance of radial fractures in the globular units of the biodegradable membrane, especially by 90 and 180 days after implantation.

Key words: Poly L-(lactic acid), subcutaneous tissue, degradation, tissue invasion, regeneration

INTRODUCTION

Synthetic artificial materials have been used to correct disabilities in the human body. Important advances have been made in the development of products that meet the demands of implantable materials for prostheses. The development of biodegradable materials has stimulated interest in the study of their interactions with host tissue in order to improve the likelihood of success in prostheses.

Poly L-(lactic acid) (PLLA) is a bioabsorbable polymer that is degraded by hydrolysis. The resulting monomers enter the citric acid cycle and are excreted in the form of carbon dioxide and water or by direct renal excretion [1,2].

PLLA-based implantable medical devices have been used in controlled drug-release systems, for fracture repair as a barrier for soft and hard tissues, as a support for cell culturing and for filling damaged tissues [2-6]. The kinetics of biomaterial degradation vary and are determined by the material characteristics, including implant chemistry and surface texture, porosity, pore size, shape and size of the implants, and by the location and technique of implantation, as well as interfacial micromotion [7]. PLLA has potential use in implants with a spongy structure (DrylacTM) [8], pins [9], and double layer [7], monolayer [10] and mixed material [7,11] matrices.

Synthetic polymer matrices are highly reproducible, and their mechanical properties and degradation rates can be readily controlled and manipulated [12]. Previous work [10] showed that adding a plasticizer triethylcitrate to PLLA alters the flexibility of the material, and allows the formation of pores in the polymer. Depending on the quantity of the

plasticizer used, membranes of different porosities can be produced, and this allows control of the degradation of the polymer and of the invasion of the membrane pores by tissue elements. The accurate addition of plasticizer thus allows the production of material for different applications.

The aim of this work was to examine the biological and morphological properties of a porous membrane of PLLA containing 7% triethylcitrate for up to 180 days after implantation in the subcutaneous tissue of rats. Greater knowledge of the interaction between this polymer and tissue should allow the use of this material in the repair of damaged tissue.

MATERIALS AND METHODS

Production of implants

PLLA (MW 300,000) was provided by Medsorb Technologies International L.P., (Cincinnati, OH, U.S.A.) as pellets. Ten grams of polymer were dissolved in 100 mL of methylene chloride (CH_2Cl_2 , Merck) containing 7% triethylcitrate (Aldrich) in a closed recipient at room temperature [8,13].

The mixture was then poured into glass plate (100 cm^2) each, which were air dried (air flow of 1L/min) at room temperature. After 15 h, the membranes were removed from plates and vacuum dried for 24 h. Disks 5 mm diameter and 620 μm thick were cut and used in the studies described below.

Implantation

The membranes were immersed in 70% ethanol and then vacuum dried. Sixteen female Wistar rats 3 months old obtained from University's central animal house (CEMIB) were used. The rats were housed at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ on a 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. Two membranes were implanted in the dorsal subcutaneous tissue of rats (n=16) anesthetized with ketamine and xylazine-HCl (16.6 mg/Kg and 3.33 mg/kg. i.p, respectively) (Virbac, Brazil). The health and behavior of the rats were assessed daily until sample collection. The samples were obtained 2, 7, 14, 21, 28, 60, 90 and 180 days post-implantation.

Light microscopy

Fragments of skin were fixed in Bouin solution and embedded in paraffin. Sections 5 μm thick were stained with Masson's trichromic and sirius red. Membrane fragments that had adhered to adjacent tissue were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in glycol methacrylate. Sections 2 μm thick were stained with toluidine blue. These samples were observed and photographed with a Nikon Eclipse E800 photomicroscope. The samples stained with sirius red were observed and photographed under polarized light to assess invasion by collagen fibers.

Scanning electron microscopy (SEM)

Samples from the different periods of implantation were fixed in 2.5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde containing 0.5% tannic acid in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, followed by post-fixation in 1% osmium tetroxide in the same buffer. After dehydration in a graded ethanol series, the samples were freeze-fractured in liquid nitrogen then critical point-dried (CPD 030 Balzers) and coated with sputtered gold (SCD 050, Balzers). The samples were examined in a Jeol JMS 5800 LV scanning electron microscope (Japan).

RESULTS

Analysis of the membranes by SEM before implantation showed that the membrane pores were delimited by juxtaposed globular units with a rugged surface. Examination of the polymer fracture surface showed that there were also structural differences between the faces of the membrane: one half had globular units intermixed with pores, while the other was composed of a dense layer with no pore but had juxtaposed units of different diameters (Fig. 1). The pores were of various sizes (Fig. 2) and had a heterogenous distribution in the membrane.

Light microscopy

In samples obtained early after implantation (2, 7 and 14 days), there was a separation between the membrane and its adjacent tissue. However, after longer periods of implantation (90 and 180 days), the polymer was surrounded by adjacent tissue in the subcutaneous compartment. Increasing vascularization of the implant area was seen during removal of the samples, but there were no macroscopic signs of an inflammatory response.

Two days after implantation, there was a massive infiltrate of polymorphonuclear cells embedded in a fibrin net and edema was observed (Fig 3). By seven days after implantation, a fibrous capsule had formed around the surface of the implant and there were numerous fibroblasts and macrophages inside the pores of the membrane (Fig. 4). Polarized light microscopy revealed that the fibrous capsule consisted of a delicate meshwork of collagen fibers. On the 14th day post-implantation, a massive cellular infiltrate was observed inside the membrane including the presence of giant multinucleated cells (Fig. 5). Twenty-one days after implantation, the blood vessels present in the capsule were observed penetrating the pores of the implant (Fig. 6). Analysis of the samples obtained 28 days after implantation revealed that a highly vascularized connective tissue infiltrate within the polymer particles, whose organization can be seen by conventional (Fig. 7) or picrosirius-polarization microscopy (Fig. 8).

Sixty days after the implantation, intense tissue invasion was noticed. A marked process of degradation isolated the globular units from the membrane (Fig. 9). Samples collected 90 days after the implantation showed that the implant was surrounded by a

capsule with a great number of collagen fibers. In this case, the polymer was intensely fragmented and invaded by an extensive amount of connective tissue (Fig. 10).

By 180 days after implantation, the connective tissue inside the membrane was observed to be subdividing the polymer in small fragments surrounded by a delicate network of connective tissue (Fig. 11). Polarized light revealed that groups of collagen fibers surrounded the units of the membrane and thereby separated them from each other (Fig. 12). A more detailed examination of these samples revealed the presence of giant cells containing many nuclei (Fig. 13) and irregular polymeric units surrounded by connective tissue with conspicuous blood vessels. PLLA membrane fragments were observed within cells in the connective tissue (Fig. 14).

Scanning electron microscopy (SEM)

Samples collected two days after the implantation showed intact polymer units surrounded by cells (Fig. 15) and a fibrin network.

No auto-degradation of the globular units was seen. Cells and extracellular matrix components (mainly collagen fibrils) were present among the membrane units (Fig. 16).

Fourteen days after implantation, connective tissue had adhered to the surface of the membranes (Fig. 17), and by the 21st day a considerable amount of connective tissue was present into the pores of the polymer, and resulted in separation of the globular units (Fig. 18). Polymer degradation process started with the appearance of centrifugal fractures in the membrane units (Fig. 19) and involved cellular invasion.

By 60 days after implantation, most of the units had extensive fractures, indicating pronounced degradation (Fig. 20) that intensified so that 90 days after implantation the polymeric units were submerged in connective tissue (Fig. 21).

Finally, massive polymer degradation was observed 180 days after implantation, with the presence of membrane fragments within the connective tissue (Fig. 22).

DISCUSSION

The first use of triethylcitrate as a plasticizer [14] was intended to give a certain flexibility to tubular implants in order to allow the application of sutures to the implant surface.

The degradation time for membranes containing 7% of plasticizer was longer than for implants with 10% plasticizer [10]. The smaller amount of plasticizer reduced the porosity of the membrane and this apparently resulted in a lower invasion than that seen by LUCIANO [10].

Analysis of the samples obtained two days after the implantation revealed an inflammatory reaction with many neutrophils, macrophages and, more rarely, eosinophils. Local trauma following surgical procedures provoked a strong inflammatory reaction for up to seven days after the implantation. After this period, the strong inflammatory reaction gave place to a reaction against the implant [7, 15].

The presence of blood vessels within the samples obtained 21 days after implantation suggested that revascularization, made the regeneration of damaged tissue possible.

PADERA *et al.* [3] claimed that porous materials have areas of low partial O₂ pressure. This hypoxia should stimulate the secretion of angiogenic factors by macrophages to act directly on endothelial cells. Some of these substances, such as angiotropine and tumor necrosis factor, stimulate the migration of endothelial cells, while others, such as epidermal growth factor, promote mitosis of these cells.

The presence of giant cells was observed from the seventh day onwards. According to LAM *et al.* [16], the giant cells observed in foreign body reactions originate from the fusion of macrophages, a process induced by cytokines such as interleukin 4 and gamma-interferon. These cells showed a large number of mitochondria and this may be associated with the elimination (degradation) of PLLA via the tricarboxylic acid cycle to generate carbon dioxide. BRADY *et al.* [17] used implants of D, L-poly(lactic acid) labeled with ¹⁴C in the abdominal wall of mice. After 168 days, 36.8% radioactivity had been eliminated most of this through exhaled CO₂ (29.4% through respiration, 4.6% through the urine, and 2.8% through the feces).

Multinucleated giant cells containing phagocytosed PLLA membrane particles in their cytoplasm were seen in samples collected 90 and 180 days after implantation. The products of the enzymatic degradation of these fragments could enter the tricarboxylic acid cycle of mitochondria, which could provide an additional means of degrading PLLA besides hydrolysis.

BEUMER *et al.* [7] used double-layered implants with no added plasticizer. During degradation, mono- and multinucleated macrophages (foreign body giant cells) containing

polymeric fragments were observed at the implant-tissue interface in the 13th week after implantation, indicating intracellular implant degradation.

In agreement with the above authors, we observed the formation of vascularized fibrous tissue with the presence of collagen, indicating a rebuilding of damaged tissue following implantation. However, there was no cellular reaction to a foreign body.

No neoplastic areas were observed up to 180 days after implantation. The addition of triethylcitrate minimized the rigidity of the polymer and reduced its degradation time, thereby limiting the risks of a neoplastic reaction in the area of the implant. Our results differ from those by NAKAMURA *et al.* [18], which reported that the implantation of PLLA membranes with no added plasticizer induced the formation of neoplastic areas at the implantation site. The authors attributed this response to the constant mechanical irritation by the polymer at the site of implantation, which in turn resulted from the extremely long degradation time of the polymer.

Based on the results obtained here, we conclude that the presence of a subcutaneous PLLA implant not only provokes an inflammatory reaction, but also helps to rebuild the damaged tissue. A knowledge of the appropriate percentage of plasticizer for each implantation site is thus important so that the degradation time of the polymer can be made compatible with the proliferation of new tissue.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by FAPESP (98/13339-4, 98/15 373-1 99/10918-6 and 99/09730-2). The authors thank the Electron Microscopy Laboratory (I.B., UNICAMP) for use of their facilities, Dr. Maria Alice da Cruz Höfling for critically reading the manuscript, and Mr. Baltazar Pereira de Paula for technical assistance.

LEGENDS:

Figure 1: PLLA membrane before implantation. Note the presence of porous (**A**) and dense (**B**) layers containing globular units (*). Bar: 100 μ m.

Figure 2: PLLA membrane before implantation showing polymer globular units (**U**) and pores (**P**). Bar: 100 μ m.

Figure 3: PLLA membrane on second days post-implantation. Observe polymorphonuclear infiltrate (**arrows**), vascular edema (**e**) and fibrin network (**f**). Bar: 100 μ m.

Figure 4: PLLA membrane on seven days after implantation. Note capsule surrounding the membrane (**c**) and cellular infiltration within the polymer (**arrowheads**). Bar: 100 μ m.

Figure 5: PLLA membrane on fourteen days after implantation showing giant cell (**arrowhead**) around the polymer fragment (**U**). Bar: 100 μ m.

Figure 6: PLLA membrane on twenty-one days after implantation. Observe blood vessel (**v**) of the capsule (**c**) within the membrane. Bar: 100 μ m.

Figure 7: PLLA membrane on twenty-eight days after implantation. Note connective tissue infiltrate (*) within the polymer particles (**p**). Bar: 100 μ m.

Figure 8: PLLA membrane on twenty-eight days after implantation under polarized light. Observe collagen fibers of the capsule (**c**), some of them penetrating the membrane (*). Note crystalline disposition of polymer units (**p**). Bar: 100 μ m.

Figure 9: PLLA membrane on sixty days after implantation showing polymer particles (*) isolated in the capsule (**c**). Bar: 100 μ m.

Figure 10: PLLA membrane on ninety days after implantation. Note intensive connective tissue infiltration (**t**) surrounding the polymer fragments (*). Bar: 100 μ m.

Figure 11: PLLA membrane on one hundred and eighty after implantation. Observe collagen fibers (**cf**) around the polymer particles group (**p**). Bar: 100 μ m.

Figure 12: PLLA membrane on one hundred and eight days after implantation under polarized light. Observe groups of collagen fibers (**arrowheads**) surrounding the membrane units and thereby separated them from each other. Bar: 100 μ m.

Figure 13: PLLA membrane on one hundred and eight days post-implantation. Note the presence of vascularized tissue (**t**) within the polymer (**p**) containing giant cell (*). Bar: 100 μ m.

Figure 14: PLLA membrane on ninety days after implantation. Observe cells of connective tissue with phagocytosed polymer particles (**arrows**). Bar: 100 μ m.

Figure 15: PLLA membrane on second day after implantation. Note great number of cells and fibrin network (**arrows**). Bar: 20 μ m.

Figure 16: PLLA membrane on seven days post-implantation. Observe tissue fibril elements (*) within the pore. Bar: 20 μ m.

Figure 17: PLLA membrane on fourteen days after implantation. Note tissue (t) adherence to membrane face. Bar: 20 μ m.

Figure 18: PLLA membrane on twenty-one days post-implantation. Tissue invasion (t) can be noted. Bar: 20 μ m.

Figure 19: PLLA membrane on twenty-eight days after implantation. Observe the presence of centripetal fractures of the globular units (arrow). Bar: 20 μ m.

Figure 20: PLLA membrane on sixty days after implantation showing extensive fractures. Bar: 20 μ m.

Figure 21: PLLA membrane on ninety days post-implantation. Note polymer fragments (U) submerged in the tissue (t). Bar: 20 μ m.

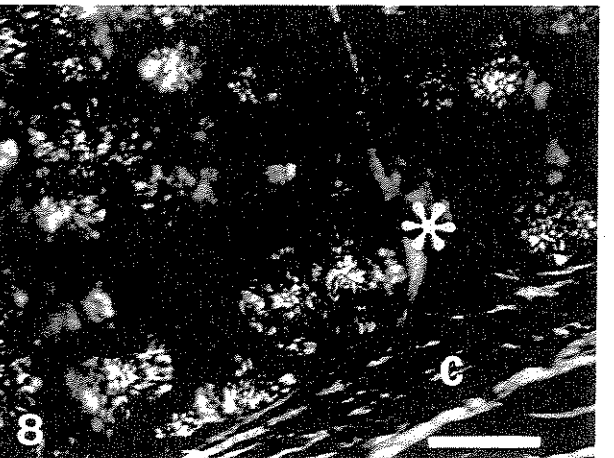
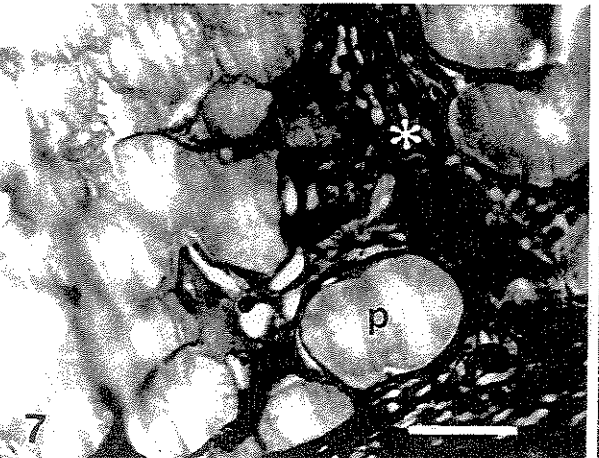
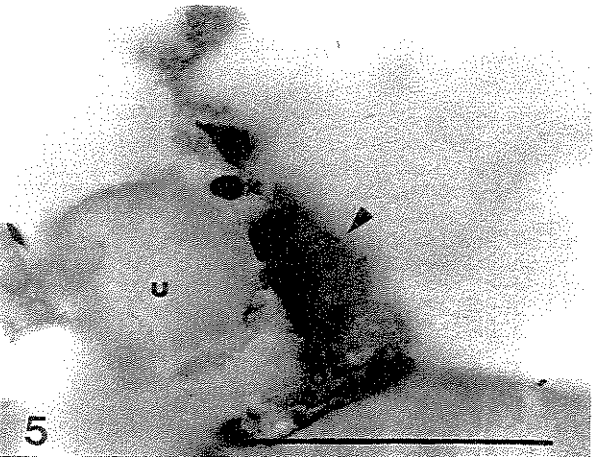
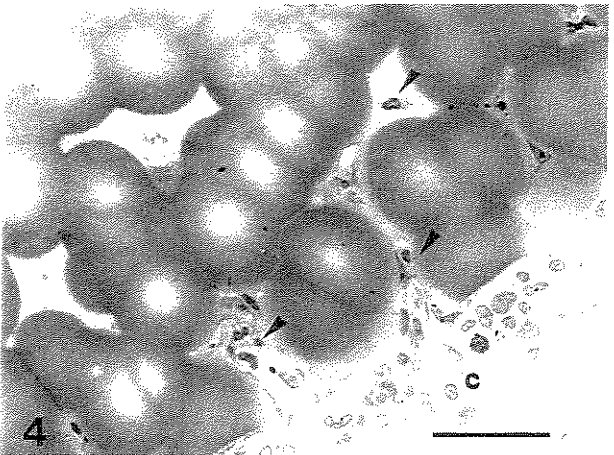
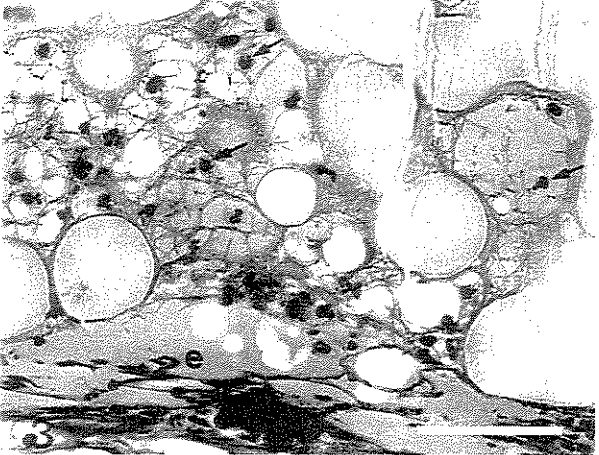
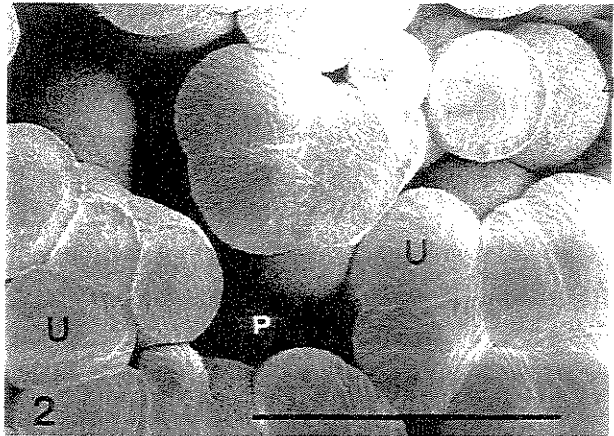
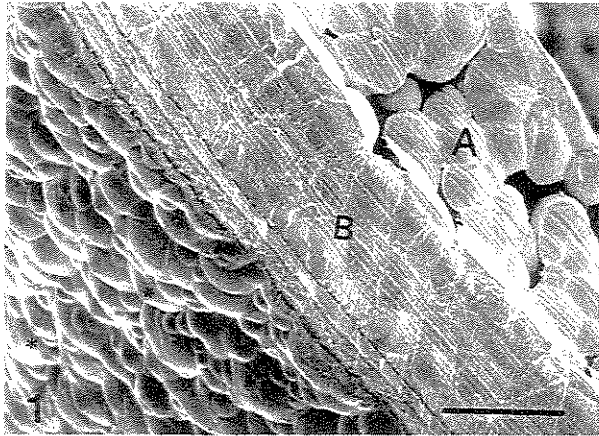
Figure 22: PLLA membrane on on hundred and eight days after implantation. Observe massive degradation process with polymer particles (*) within the connective tissue. Bar: 20 μ m.

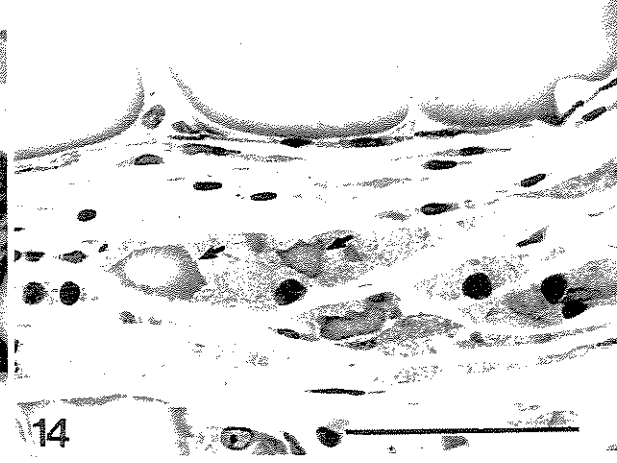
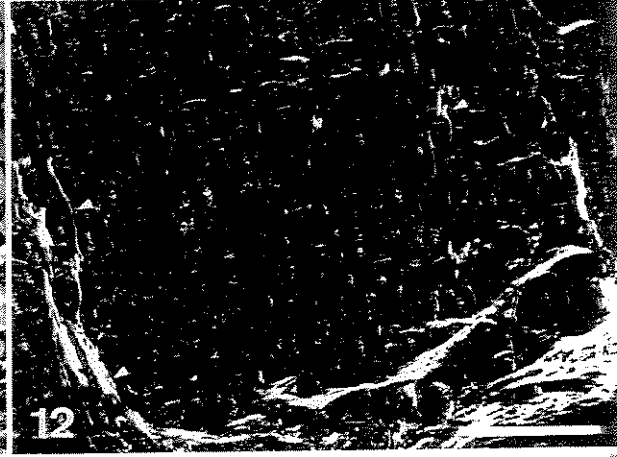
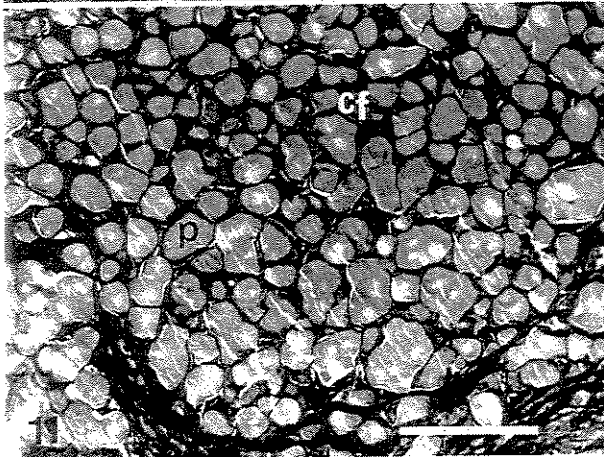
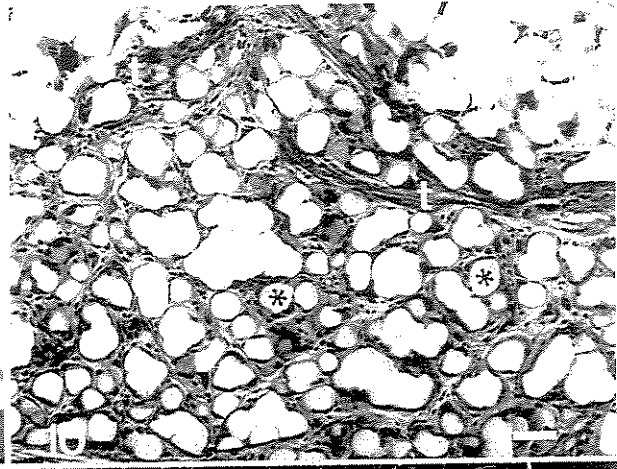
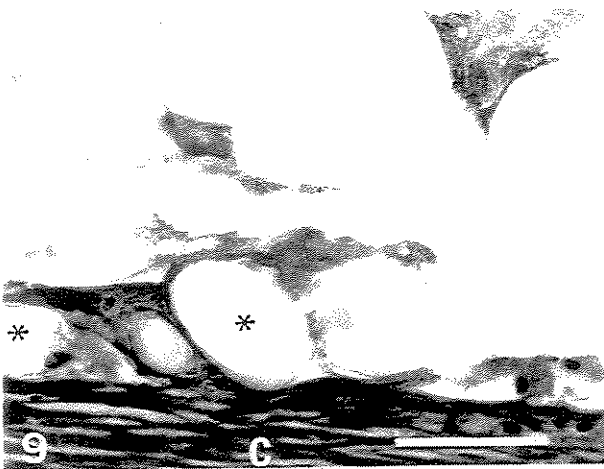
REFERENCES

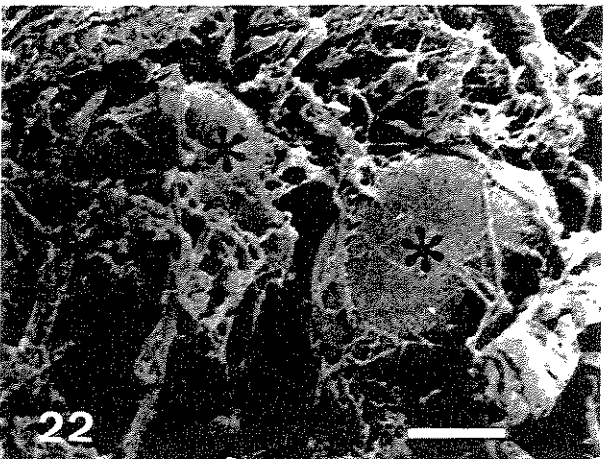
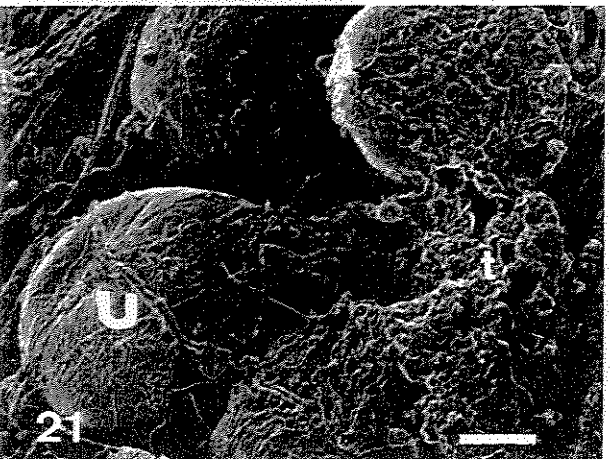
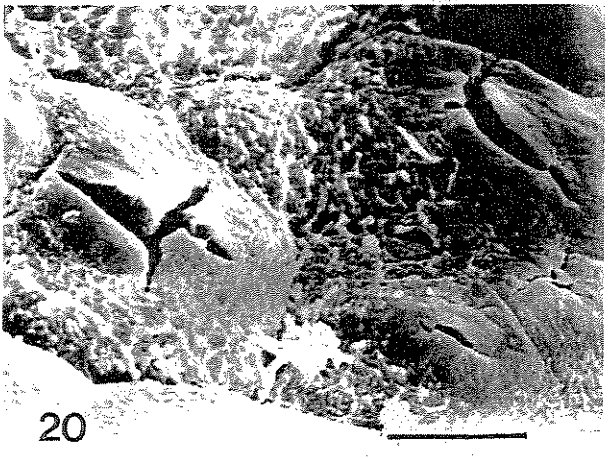
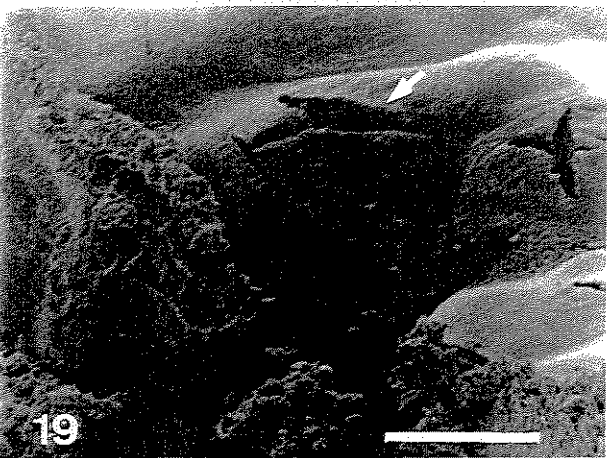
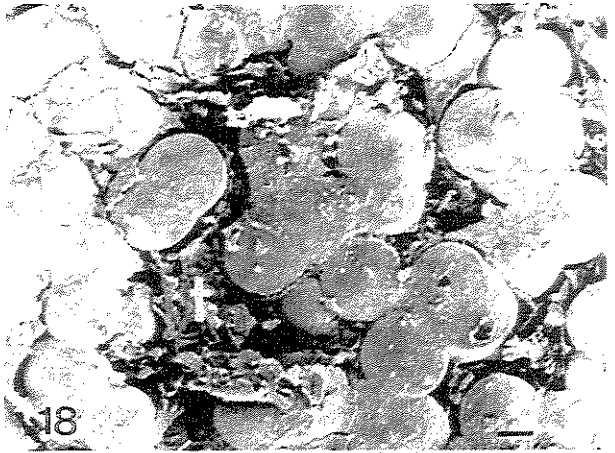
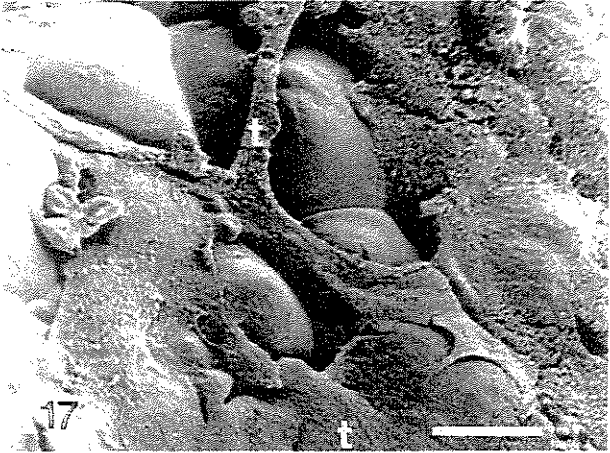
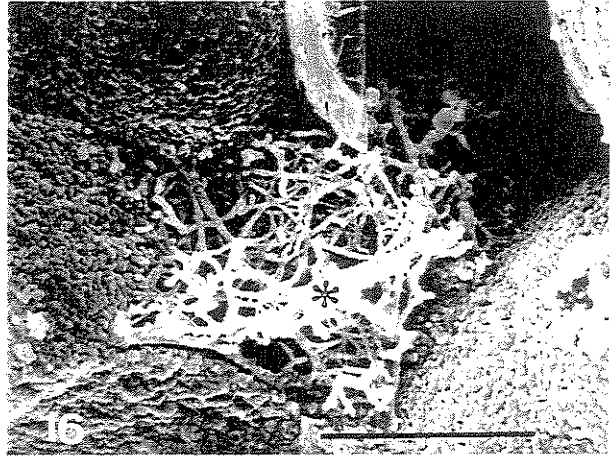
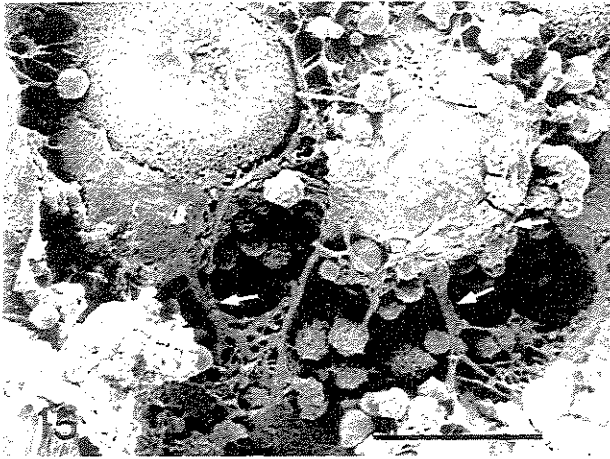
1. K. A. ATHANASIOU; G. G.NIEDERAUER and C. M. AGRAWAL, *Biomaterials* **17** (1996) 93.
2. S. L. ISHAUG; M. J. YASZEMSKI; R. BIZIOS and A. G. MIKOS, *J. Biomed. Mat. Res.* **28** (1994) 1445.
3. R. F. PADERA and C. K. COLTON, *Biomaterials* **17** (1996) 277.

4. A. G. MIKOS; M. D. LYMAN; L. E. FREED and R. LANGER, *Biomaterials* **15** (1994) 55.
5. L. CALANDRELLI; B. IMMIRZI; M. MALINCONICO; M. G. VOLPE; A. OLIVA and F. DELLA RAGIONE, *Polymer* **41** (2000) 8027.
6. A. R. SANTOS JR.; S. H. BARBANTI; E. A. R. DUEK; H. DOLDER; R. S. WADA and M. L. F. WADA, *Artificial Organs* **25** (2001) 7.
7. G. J. BEUMER; C. A. VAN BLITTERSWIJK and M. PONEC, *Biomaterials* **15** (1994) 551.
8. T. H. BARROWS, in "Synthetic Bioabsorbable Polymers" (Technomic Publishing Company, 1991) p. 243.
9. M. VAN DER ELST, A. R. A. DIKEMA, C. P. A. T. KLEIN, P. PATKA and H. J. TH. M. HAARMAN, *Biomaterials*, **16** (1995) 103.
10. R. M. LUCIANO in "Síntese, Caracterização e Degradação de Membranas de Poli(ácido láctico), um polímero bioabsorvível" . UNICAMP, Masters dissertation. 1997.
11. H. A. VON RECUM; R. L. CLEEK; S. GESKIN; and A. G. MIKOS, *Biomaterials* **16** (1995) 441.
12. B. S. KIM, and D. J. MOONEY, *J. Biomed. Mat. Res.* **41** (1998) 322.
13. R. M. LUCIANO, in "Proceedings of the European Medical & Biological Engineering Conference", Vienna, November 1999, edited by P. Peregrius (Published for International Federation for Medical & Biological Engineering, 1999) p. 214.

14. C. F. SILVA; R. MADISON; P. DIKKES; T. CHIU; R. L. SIDMAN, *Brain Res.* **342**, (1985) 307.
15. J. E. BERGSMA; F. R. ROZEMA; R. R. M. BOS; G. BOERING; W. C. DE BRUIJN and A. J. PENNING, *J. Biomed. Mat. Res.* **29** (1995) 173.
16. K. H. LAM; J. M. SCHAKENRAAD; H. ESSELBRUGGE; J. FEIJEN and P. NIEUWENHUIS, *J. Biomed. Mat. Res.* **27** (1993) 1569.
17. J. M. BRADY; D. E. CUTRIGHT; A. MILLER and G. C. BATTISTONE, *J. Biomed. Mat. Res.* **7**, (1973) 155.
18. S. NAKAMURA; S. NINOMIJA; Y. TAKATORI; S. MORIMOTO; I. KUSABA and T. KUROKAWA, *Acta Orthop. Scand.* **64** (1993) 301.







IV. RESULTADOS (M.E.T. e IMUNOC.)

4.1. Análise macroscópica.

Durante a retirada das amostras, sete dias após a implantação, foi possível observar que as membranas implantadas se destacavam facilmente do tecido que as envolvia. Assim, durante o seccionamento do material necessário para o seu processamento, notou-se que a membrana não se aderiu ao tecido adjacente, o que dificultava sua preservação. No entanto, nos períodos mais longos com o implante, a aderência do polímero ao tecido tornou-se cada vez maior, de modo que nas últimas coletas (noventa e cento e oitenta dias de implante) observou-se maior envolvimento da membrana pelo tecido conjuntivo. Além disso, houve um aumento aparente no número de vasos sanguíneos na região do implante, auxiliando na localização das membranas no tecido animal.

Não foi observada nenhuma característica macroscópica que indicasse um processo inflamatório, como edema ou rubor.

4.2. Análise microscópica.

4.2.1. Análise das amostras após a implantação.

A análise do material revelou diferenças entre as amostras, permitindo caracterizá-las de acordo com seus respectivos dias pós-implantação.

4.2.1.1. Microscopia de transmissão.

4.2.1.1.1. Segundo dia de implante.

A análise das amostras extraídas após dois dias de implante revelou uma maciça invasão de polimorfonucleares, destacando-se neutrófilos (Figs. 01 e 02) e raros eosinófilos (Fig. 03), através dos poros, para o interior da membrana.

4.2.1.1.2. Sétimo dia de implante.

Após sete dias de implante observou-se no interior dos poros, macrófagos, rodeados por uma rede de fibrina (Figs. 04 e 05) e fibroblastos (Fig. 04). Polimorfonucleares não foram observados.

4.2.1.1.3. Décimo quarto dia de implante.

O material obtido após quatorze dias de implante evidenciou a presença de fibroblastos, apresentando retículo endoplasmático granular muito desenvolvido, cromatina frouxa e nucléolo evidente; e macrófagos, contendo grande quantidade de lisossomos e prolongamentos celulares (Fig. 06). Além disso, células gigantes de corpo estranho estavam presentes em íntimo contato com a membrana implantada, apresentando cisternas do retículo endoplasmático granular dilatadas e numerosos prolongamentos celulares (Figs. 07 e 08).

4.2.1.1.4. Vigésimo primeiro dia de implante.

A análise das amostras coletada após vinte e um dias de implante mostra fibroblastos típicos, uma delicada rede de colágeno e células gigantes aderidas ao polímero (Fig. 09). Estas células apresentam um grande número de mitocôndrias e gotículas de lipídio (Fig. 10).

4.2.1.1.5. Vigésimo oitavo dia de implante.

No vigésimo oitavo dia de implante estavam presentes células gigantes de corpo estranho contendo numerosas gotículas de lipídio e extensos prolongamentos citoplasmáticos imbricados (Figs. 11 e 12).

4.2.1.1.6. Sexagésimo dia de implante.

Após sessenta dias de implante foi possível observar elementos teciduais adjacentes à membrana, tais como fibras de colágeno e vasos sanguíneos (Fig. 13). Células gigantes de corpo estranho estão presentes em íntimo contato com o polímero (Fig. 14).

4.2.1.1.7. Nonagésimo dia de implante.

A análise das amostras retiradas noventa dias após o implante mostrou a presença de células como fibroblastos e células gigantes próximas ao polímero, além de fibras de colágeno ao redor destas células (Figs. 15 e 16).

4.2.1.1.8. Centésimo octogésimo dia de implante.

Foram observadas, após cento e oitenta dias de implante, células gigantes adjacentes ao polímero, bem como fibroblastos e vasos sanguíneos envoltos por matriz extracelular rica em colágeno (Fig. 17). Notam-se regiões ricas em feixes de colágeno ao redor da membrana de PLLA (Fig. 18). No citoplasma de células multinucleadas foram vistos inúmeros fagossomos contendo material amorfo (Figs. 19a, b e c).

4.2.1.2. Imunocitoquímica.

4.2.1.2.1. Segundo dia de implante.

A análise do material obtido após dois dias de implante revelou células marcadas pela reação imunocitoquímica próximas à membrana bem como reação de fundo positiva para o conteúdo dos vasos e do plasma extravasado (Fig. 20). Apesar disso, no interior da membrana, os núcleos dos polimorfonucleares não se apresentaram marcados pela reação.

4.2.1.2.2. Sétimo dia de implante.

Após sete dias de implante, a cápsula de tecido conjuntivo ao redor da membrana de PLLA apresentou grande número de células com núcleos marcados pela reação de imunocitoquímica para PCNA (Figs. 21 e 22).

4.2.1.2.3. Décimo quarto dia de implante.

Após quatorze dias de implante, foram observadas células na cápsula de tecido conjuntivo positivamente marcadas (Fig 23).

4.2.1.2.4. Vigésimo primeiro dia de implante.

Células positivamente marcadas pela reação foram observadas no tecido conjuntivo do interior da membrana que se preservou em alguns preparados, após vinte e um dias de implante. Assim como nos períodos anteriores, foram observadas células do tipo fibroblasto marcadas pela reação imunocitoquímica no interior da membrana (Fig. 24), bem como na região adjacente ao polímero (Fig. 25).

4.2.1.2.5. Vigésimo oitavo dia de implante.

Nesse período, algumas células da cápsula apresentaram núcleos marcados pela reação (Fig. 26). Além disso, notou-se células positivamente marcadas também no tecido

conjuntivo que invadiu o interior dos poros da membrana assim como o conteúdo dos vasos (Fig. 27).

4.2.1.2.6. Sexagésimo dia de implante.

Aos sessenta dias pós-implantação, observaram-se núcleos positivamente marcados adjacentes ao polímero (Fig. 28). Grande número de células com núcleos marcados pela reação foi observado na cápsula de tecido conjuntivo que circunda o polímero (Fig. 29).

4.2.1.2.7. Nonagésimo dia de implante.

Após um período de noventa dias de implante, foram observadas células do tipo fibroblasto apresentando núcleos marcados para a reação distribuídas de maneira isolada no tecido conjuntivo do interior da membrana (Figs. 30 e 31).

4.2.1.2.8. Centésimo octogésimo dia de implante.

Foram observadas, após um período de cento e oitenta dias de implante, núcleos de células marcadas pela reação muito próximas aos fragmentos de polímero (Figs. 32 e 33).

O grupo de células previamente observado através de microscopia de luz e que se caracterizava pela presença de citoplasma volumoso e claro apresentou, aos cento e oitenta

dias pós-implante, alguns núcleos positivamente marcados pela reação de imunocitoquímica de PCNA (Fig. 34).

4.2.1.2.9. Controle positivo.

Os folículos pilosos, a epiderme e as glândulas sebáceas da pele apresentaram células marcadas pela reação imunocitoquímica de PCNA (Figs. 35 e 36).

4.2.1.2.10. Controle negativo.

Nos cortes em que se omitiu o anticorpo primário, não foram observadas células com núcleos marcados, seja na epiderme ou folículos pilosos (Fig. 37).

4.3. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Figura 01: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após dois dias de implante. Observar polimorfonucleares e rede de fibrina (setas) próxima ao polímero. 5.300x.

Figura 02: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após dois dias de implante. É possível notar células como neutrófilos (N) e macrófagos (M), bem como rede de fibrina, próximos à superfície da membrana. 15750x.

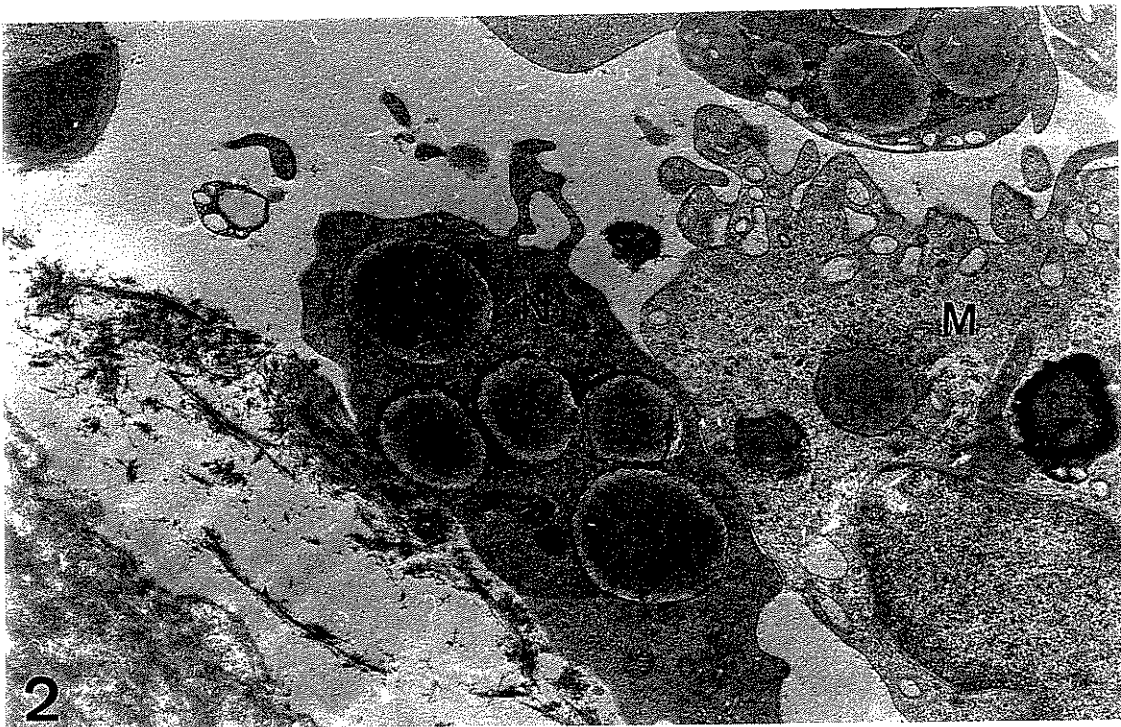
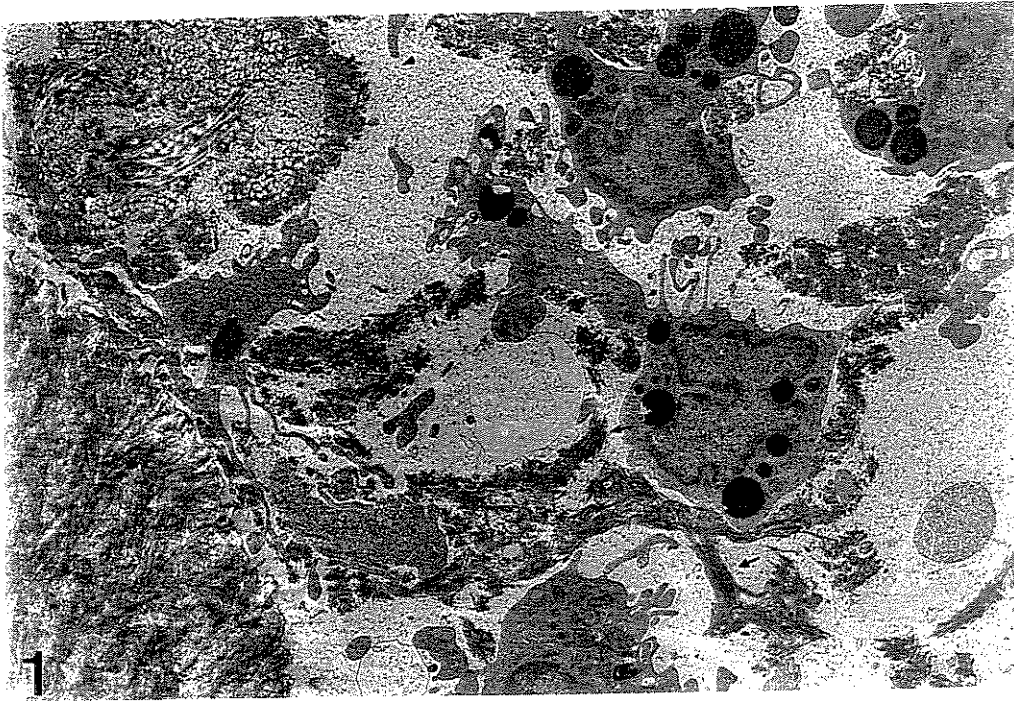


Figura 03: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após dois dias de implante. Observar detalhe de um eosinófilo presente no poro da membrana. 18.300x.

Figura 04: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após sete dias de implante. Notar macrófago (M) e fibroblasto (F) no interior do polímero. 12.450x.

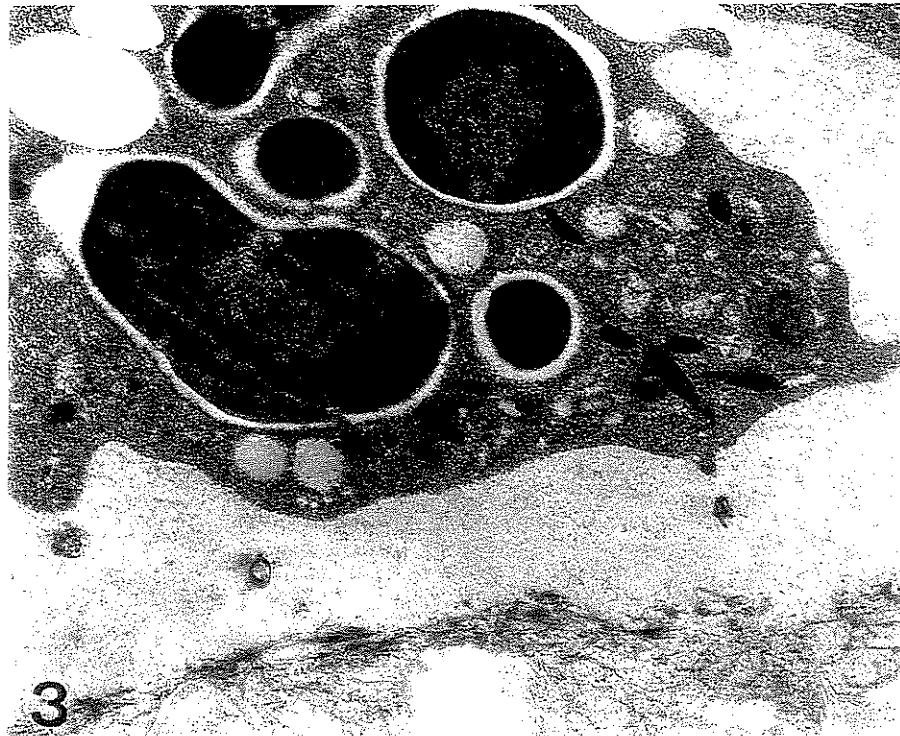


Figura 05: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após sete dias de implante. Observe o detalhe de um macrófago que pode ser visto próximo ao polímero. Fibrina (*). 9.300x.

Figura 06: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após quatorze dias de implante. É possível notar células como fibroblasto (f) e macrófago (m) provavelmente migrando para o interior da membrana. 5.600x

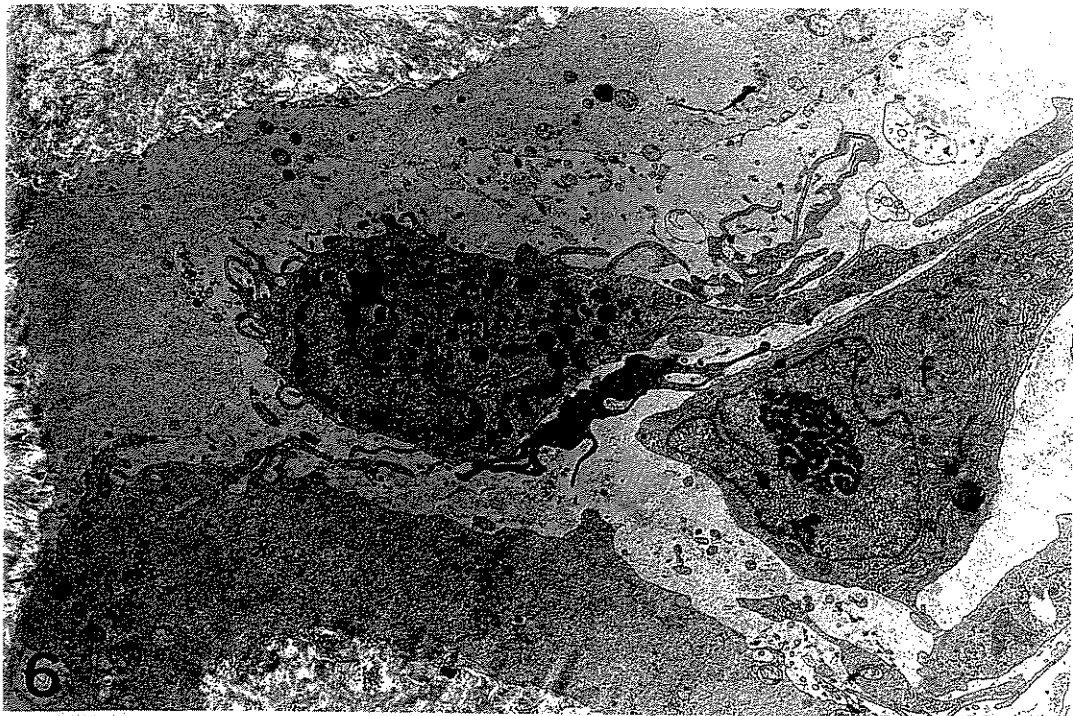
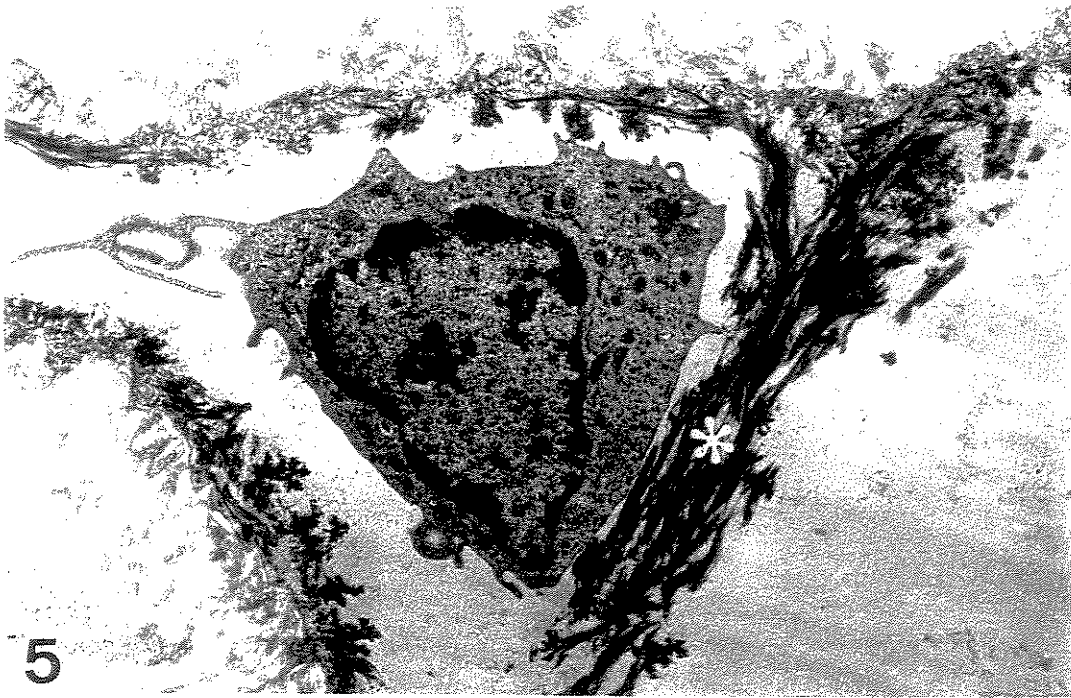


Figura 07: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após quatorze dias de implante. Observe célula gigante multinucleada em contato com a superfície rugosa do polímero. 9.300x.

Figura 08: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após quatorze dias de implante. Em detalhe, observe os prolongamentos da célula gigante intimamente associados às irregularidades da superfície da membrana (**setas**). 11.600x.

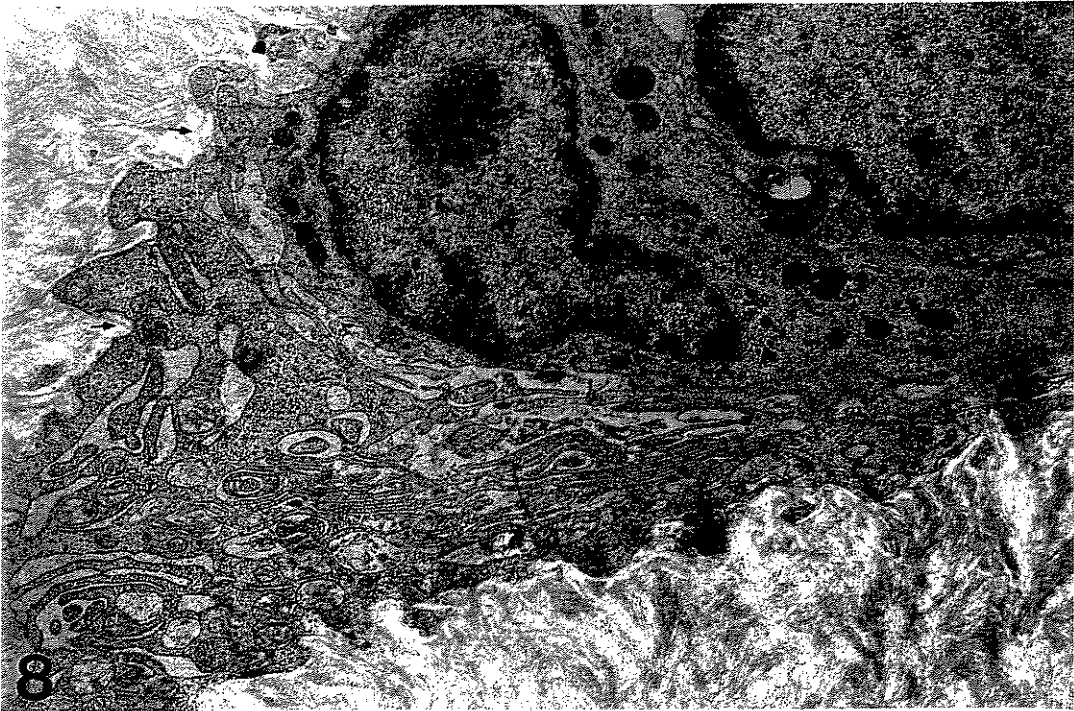
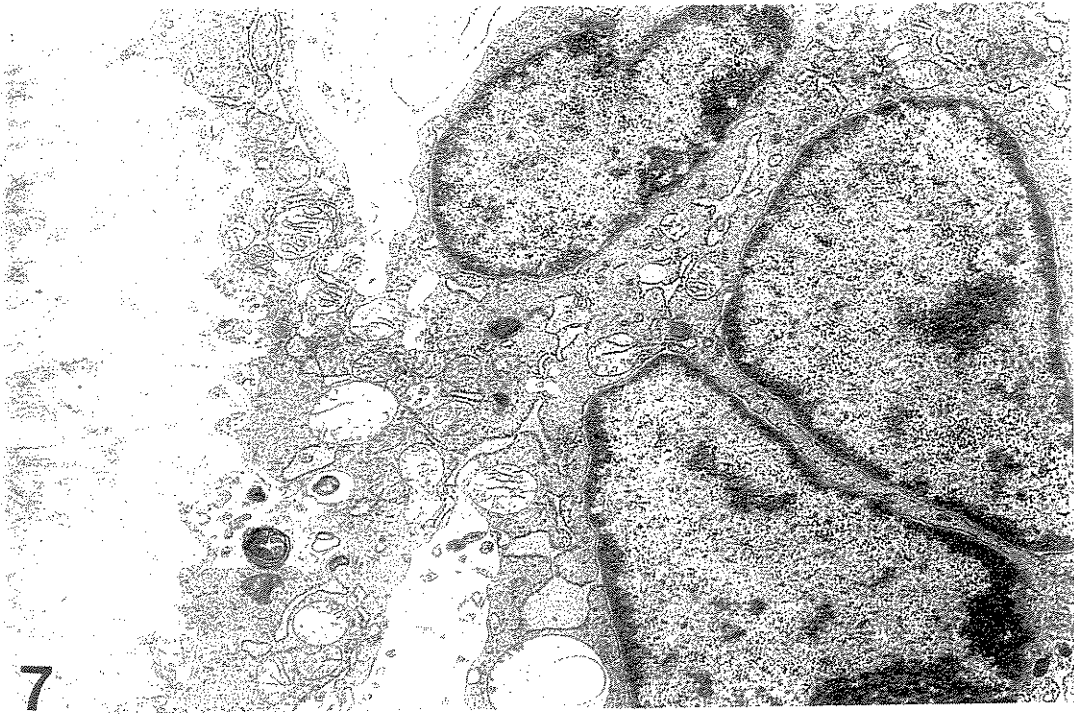


Figura 09: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após vinte e um dias de implante. Observar a invasão de elementos do tecido conjuntivo como fibroblastos (**f**), fibras de colágeno (*), bem como célula gigante multinucleada (**g**) em contato com o polímero. 5.900x.

Figura 10: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após vinte e um dias de implante. Notar, em detalhe, a morfologia de uma célula gigante multinucleada. Mitocôndria (**m**), Gotícula de lipídio (**l**). 6.500x.

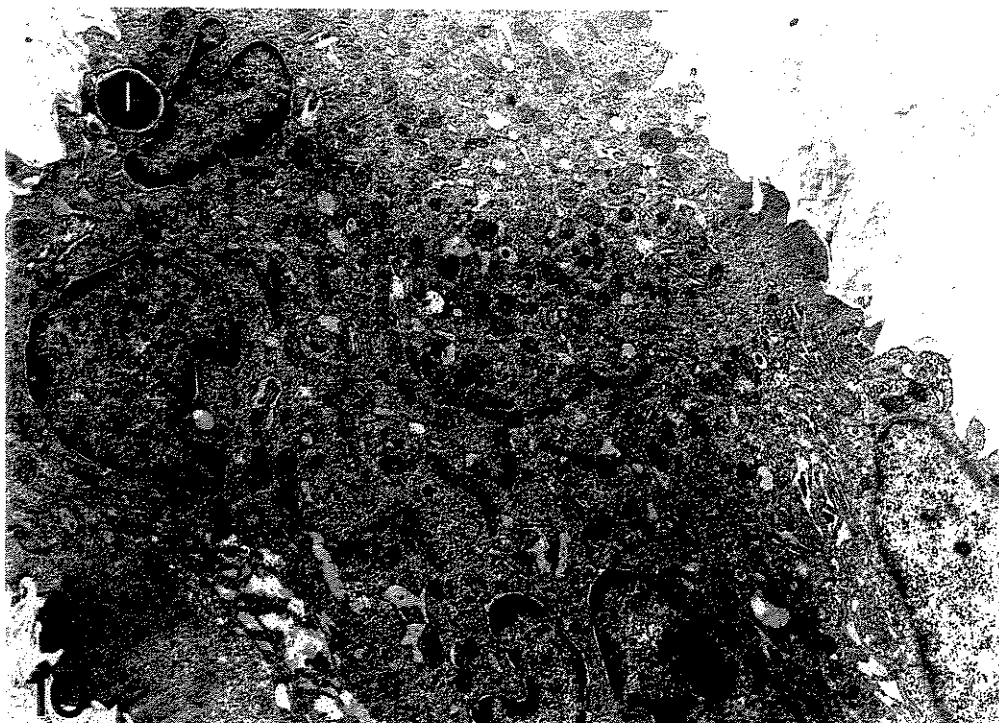
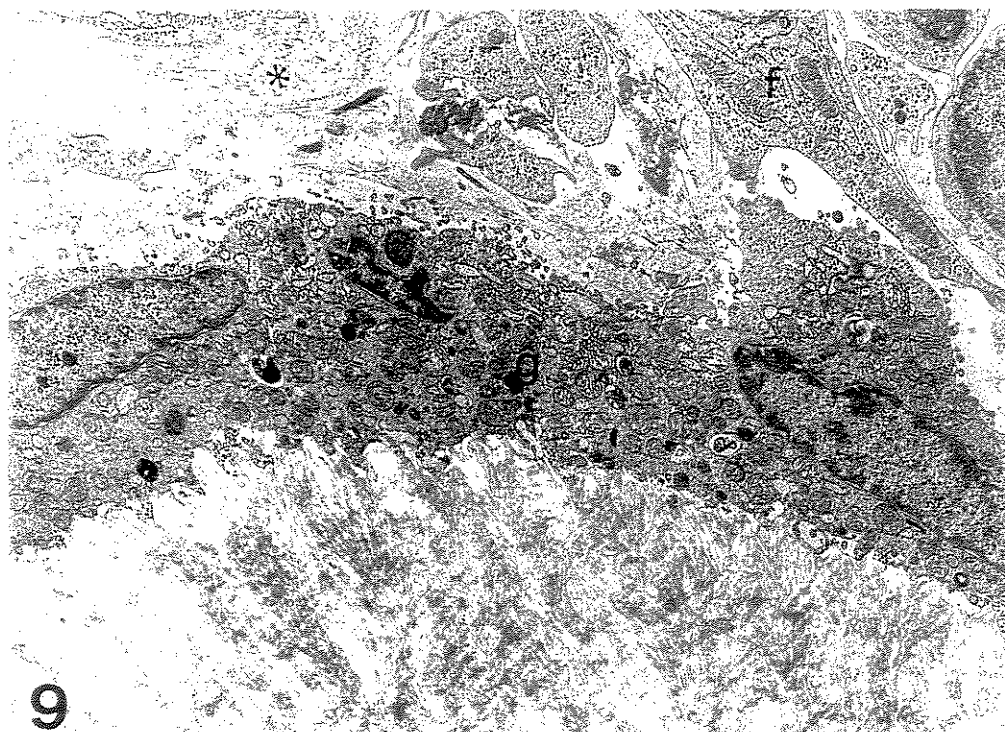


Figura 11: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após vinte e oito dias de implante. Note, em relação à célula gigante, a presença de gotículas de lipídio (I) e seu íntimo contato com a superfície da membrana. 5.250x.

Figura 12: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após vinte e oito dias de implante. Em detalhe, notar a extensa rede de prolongamentos citoplasmáticos. 5.850x.

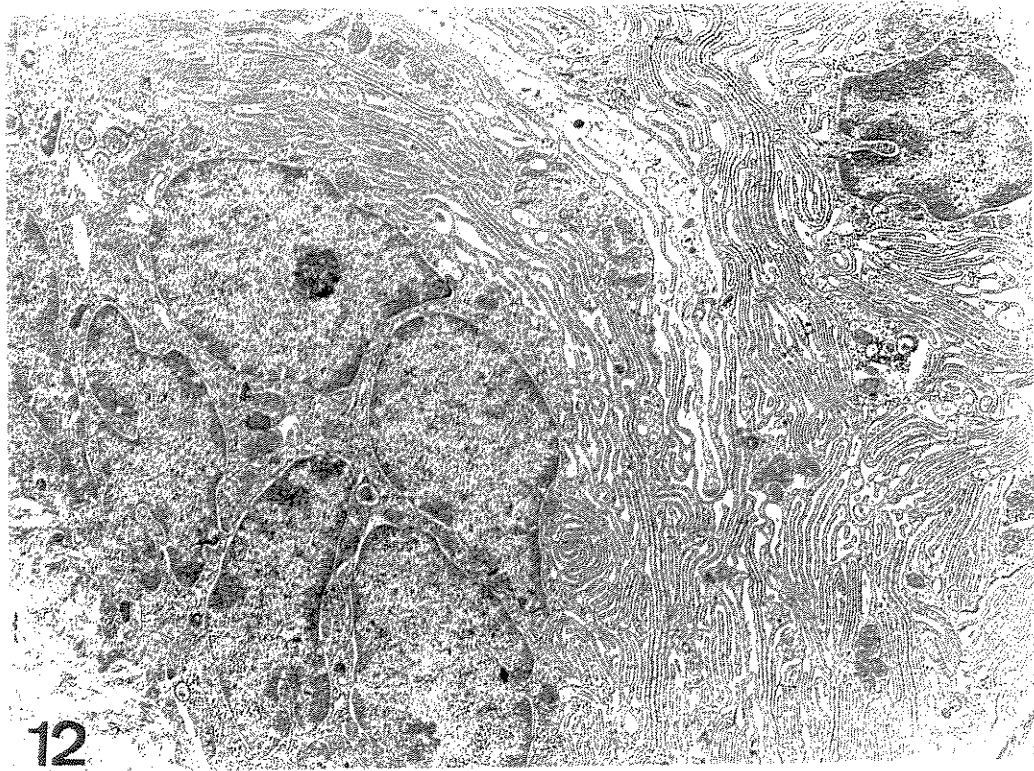
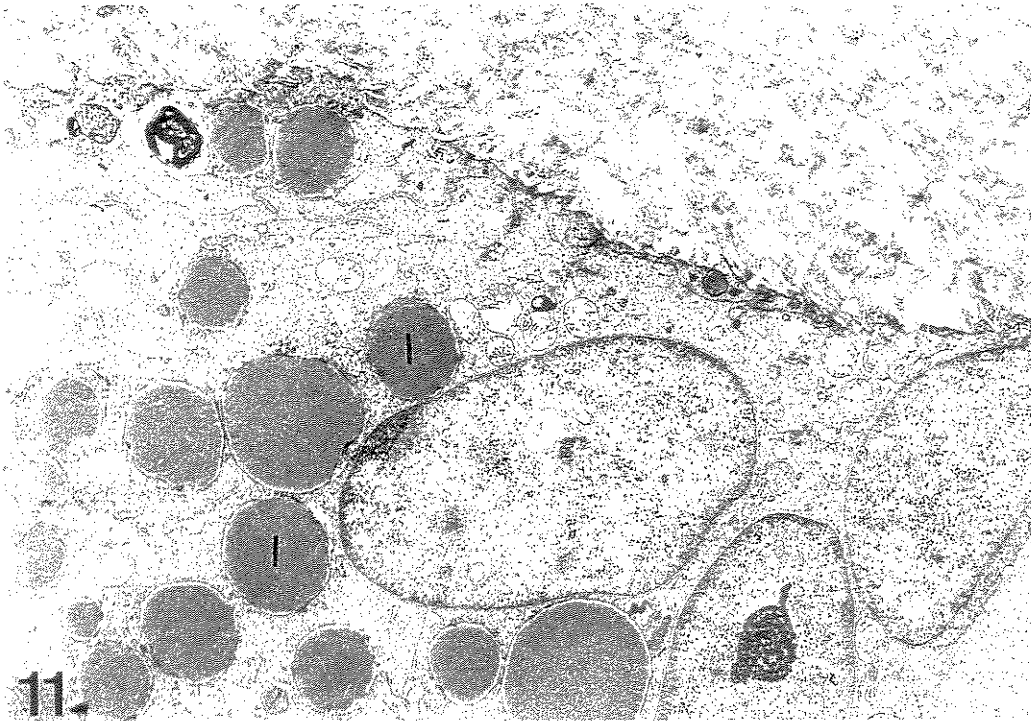


Figura 13: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após sessenta dias de implante. Observar, no detalhe, a invasão de elementos teciduais, como vasos sanguíneos, que se encontram muito próximos à superfície da membrana. 6.500x.

Figura 14: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após sessenta dias de implante. Notar célula gigante intimamente aderida à membrana com grande quantidade de mitocôndrias (**m**) e cisternas dilatadas do Retículo endoplasmático granular (**r**). 8.350x.

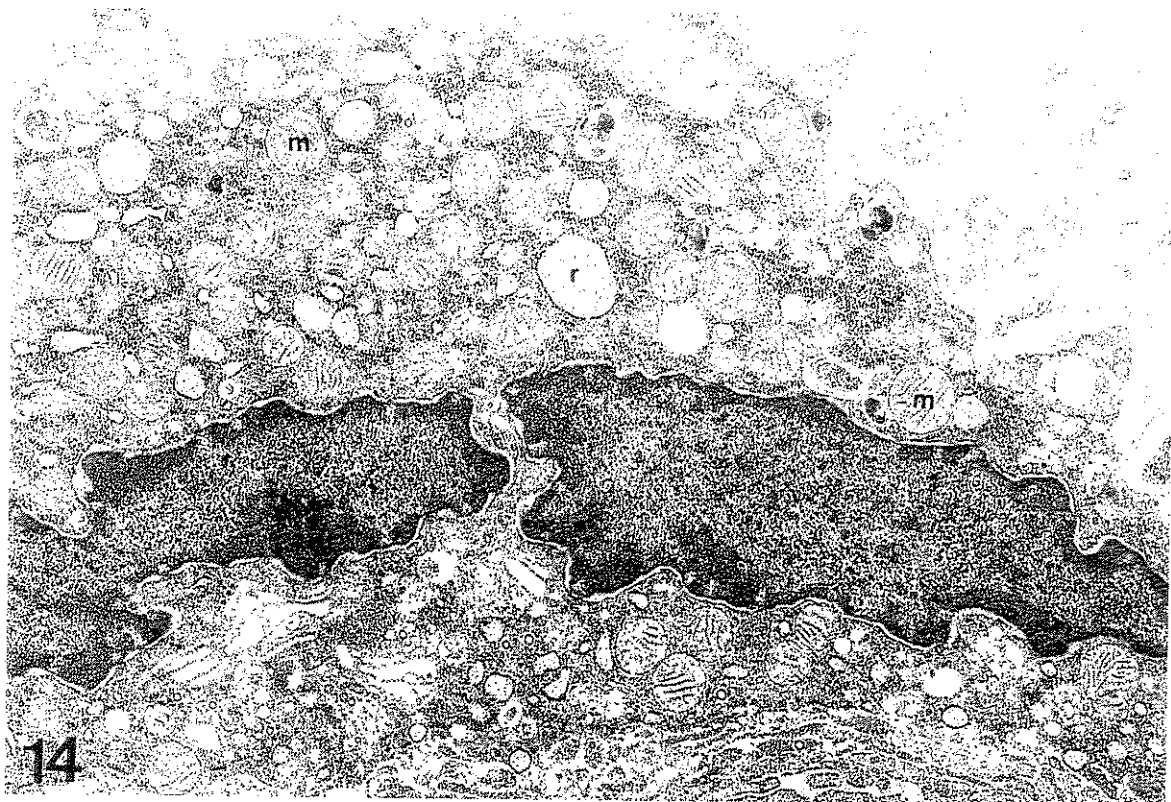


Figura 15: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após noventa dias de implante. Observar as características morfológicas de uma célula gigante rica em mitocôndrias (**m**) e cisternas dilatadas do retículo endoplasmático granular (**r**). Fibroblasto (**f**). 8.400x.

Figura 16: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após noventa dias de implante. É possível notar parte do citoplasma rico em lisossomos (**l**) de uma célula gigante aderida à superfície da membrana. Fibroblasto (**f**). 12.000x.

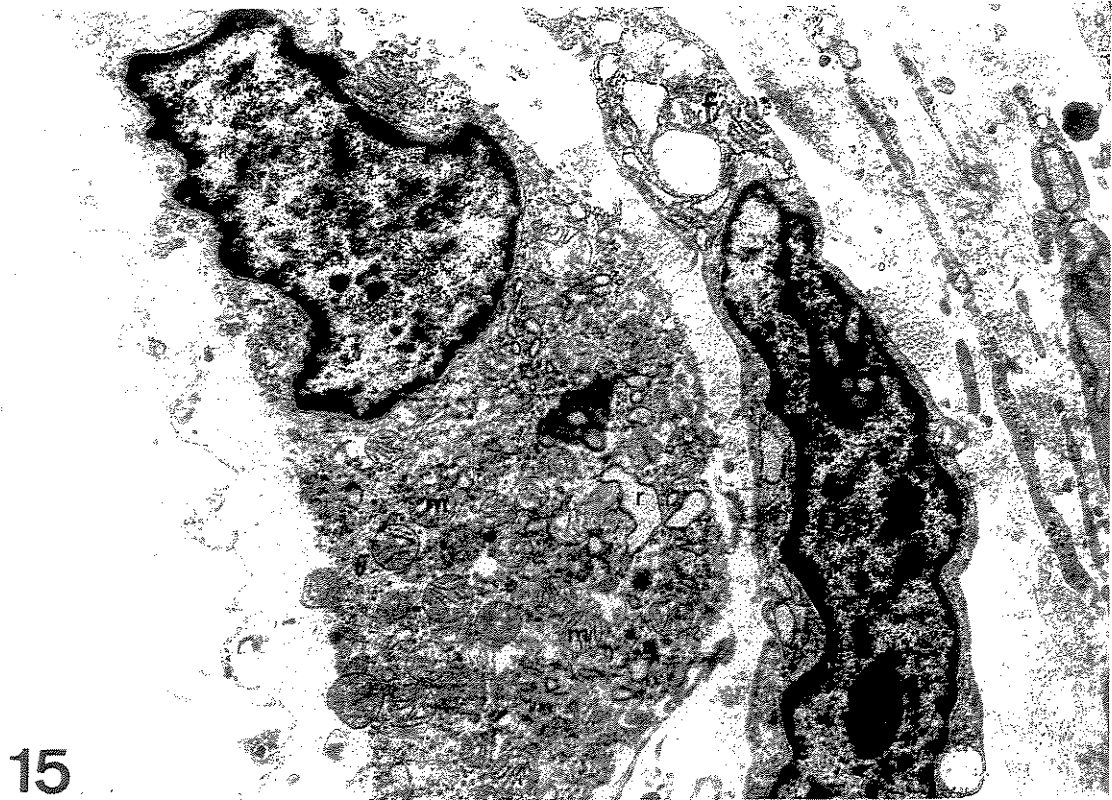


Figura 17: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após cento e oitenta dias de implante. Nota-se célula gigante intimamente justaposta às irregularidades (i) da membrana, bem como parte do citoplasma de fibroblasto (f) e um capilar sanguíneo imerso em fibras colágenas do tecido conjuntivo neoformado. 12100x.

Figura 18: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após cento e oitenta dias de implante. Notam-se fibroblastos imersos em uma matriz extracelular rica em fibras colágenas (setas) seccionadas em diversos planos. Polímero (p). 14.500x.

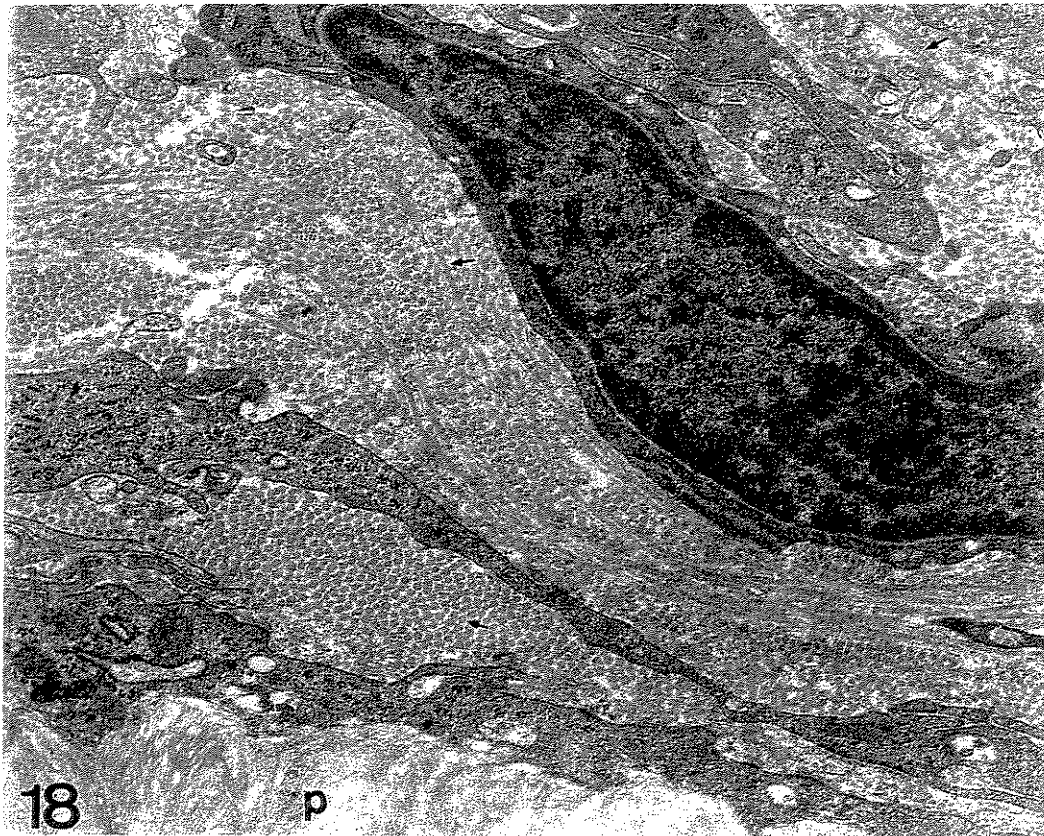
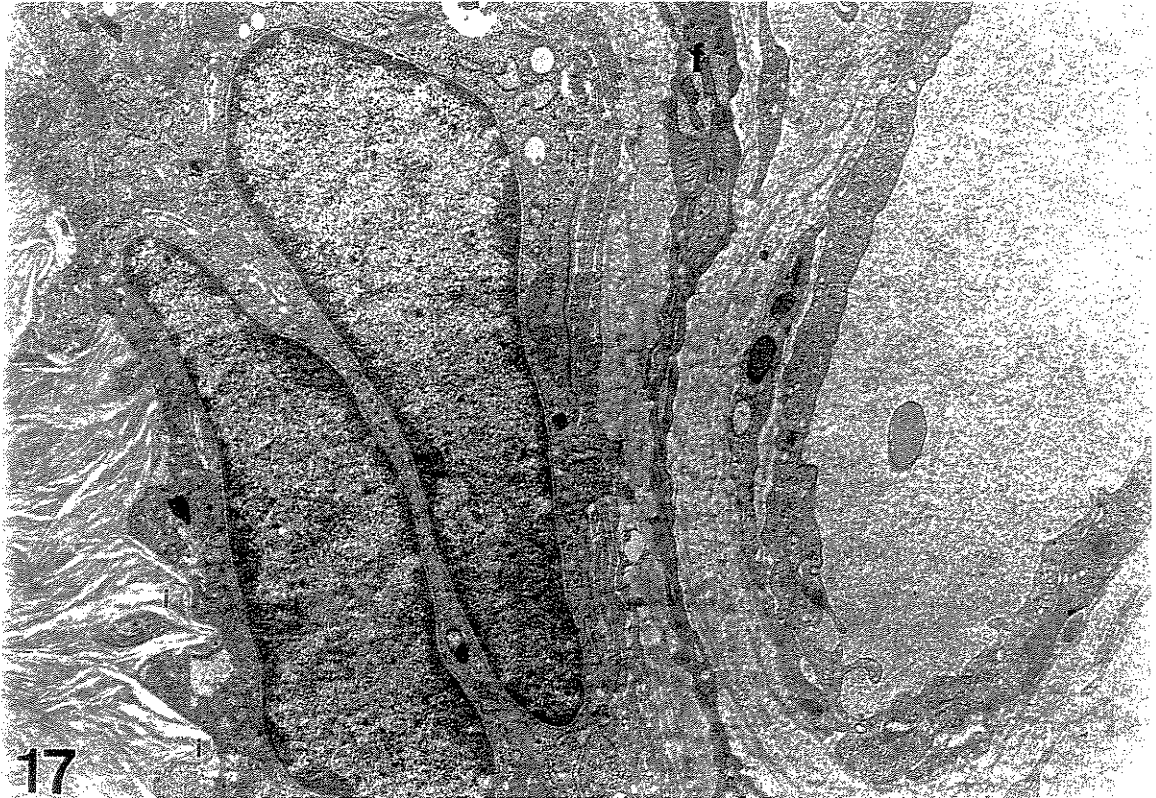


Figura 19: Eletromicrografia de M.E.T. de membrana de PLLA após cento e oitenta dias de implante. Observe em *A*, célula gigante multinucleada com fagossomos (**f**); em *B*, detalhe da área assinalada em *A* mostrando a preservação celular. Note em *C* um maior aumento dos fagossomos (*), nos quais pode-se observar o constituinte de eletrodensidade semelhante ao conteúdo da membrana. *a*, 7.200x; *b*, 17.450x; *c*, 30.200x.

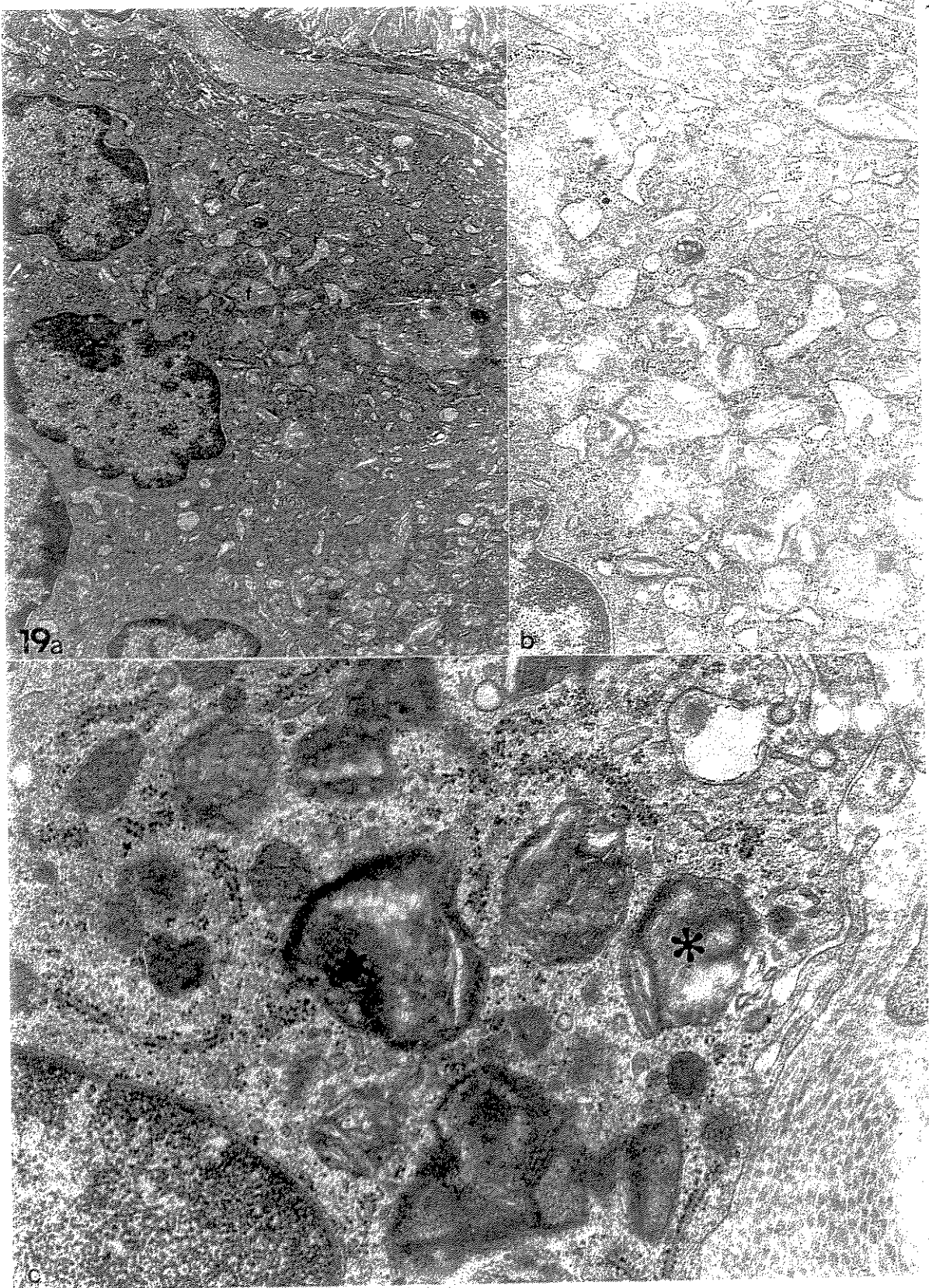


Figura 20: Fotomicrografia de membrana de PLLA após dois dias de implante. Observar núcleos marcados pela reação de PCNA (**cabeças de seta**). Parafina, Azul de Anilina, 125x.



Figura 21: Fotomicrografia de membrana de PLLA após sete dias de implante. Note grande número de células com núcleos (**cabeças de seta**) presentes na cápsula de tecido conjuntivo marcados pela reação de PCNA. Fragmento de polímero (**p**). Azul de Anilina. 250x.

Figura 22: Fotomicrografia de membrana de PLLA após sete dias de implante. Notar células com núcleos marcados pela reação de PCNA. Folículo piloso (**fp**). Azul de Anilina. 625x.

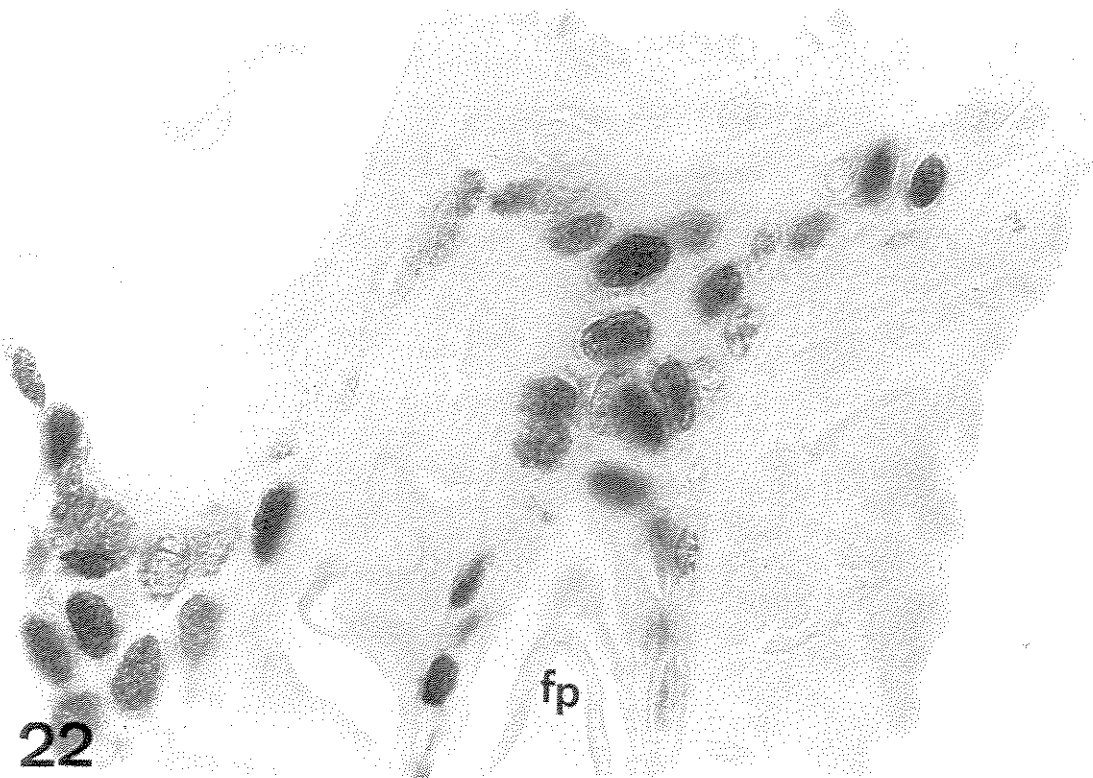
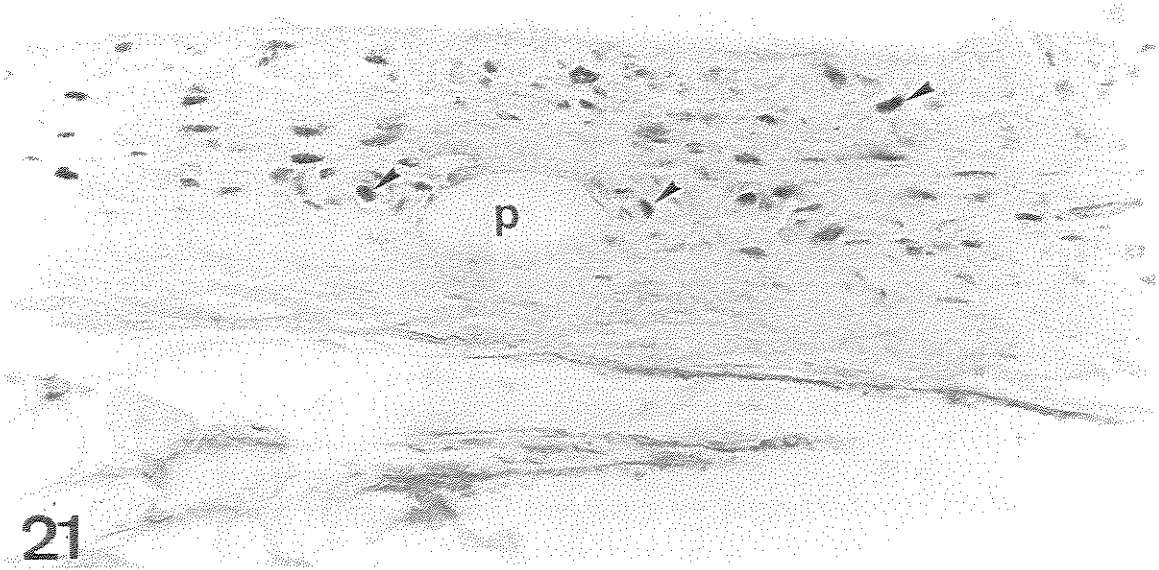


Figura 23: Fotomicrografia de membrana de PLLA após quatorze dias de implante. Observe pequeno número de células com núcleos positivamente marcados (**cabeças de seta**). Espaço previamente ocupado pela membrana (*). Azul de Anilina. 375x.

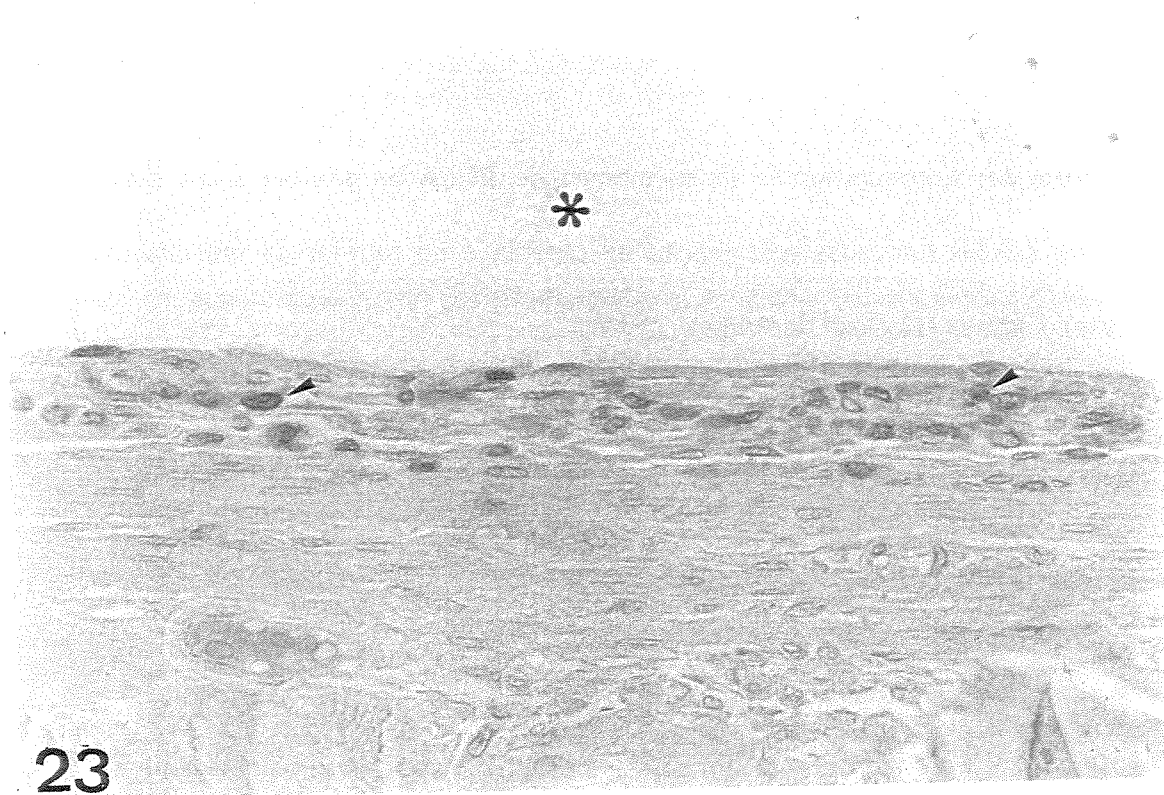


Figura 24: Fotomicrografia de membrana de PLLA após vinte e um dias de implante. Notar células marcadas pela reação na cápsula e no interior da membrana (**cabeças de seta**). Cápsula (**c**). Azul de Anilina. 250 x.

Figura 25: Fotomicrografia de membrana de PLLA após vinte e um dias de implante. Note células positivamente marcadas pela reação (**cabeças de seta**) muito próximas à membrana (*). Azul de Anilina. 375x.

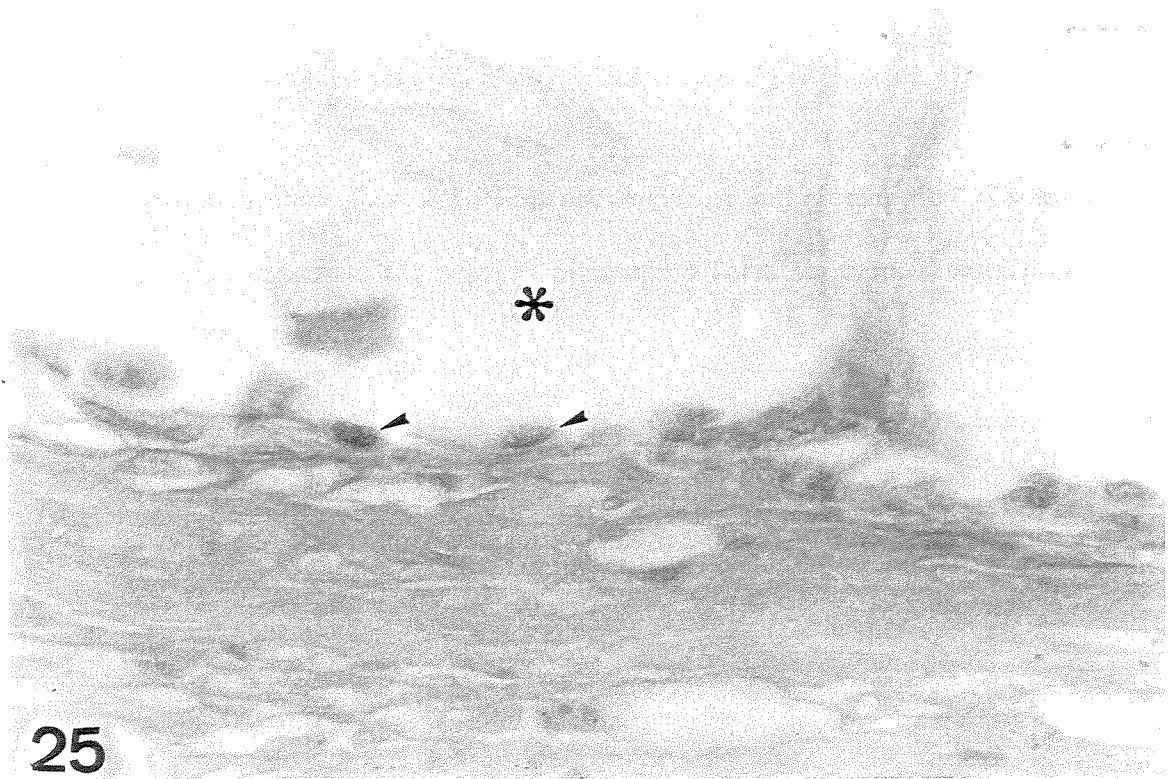
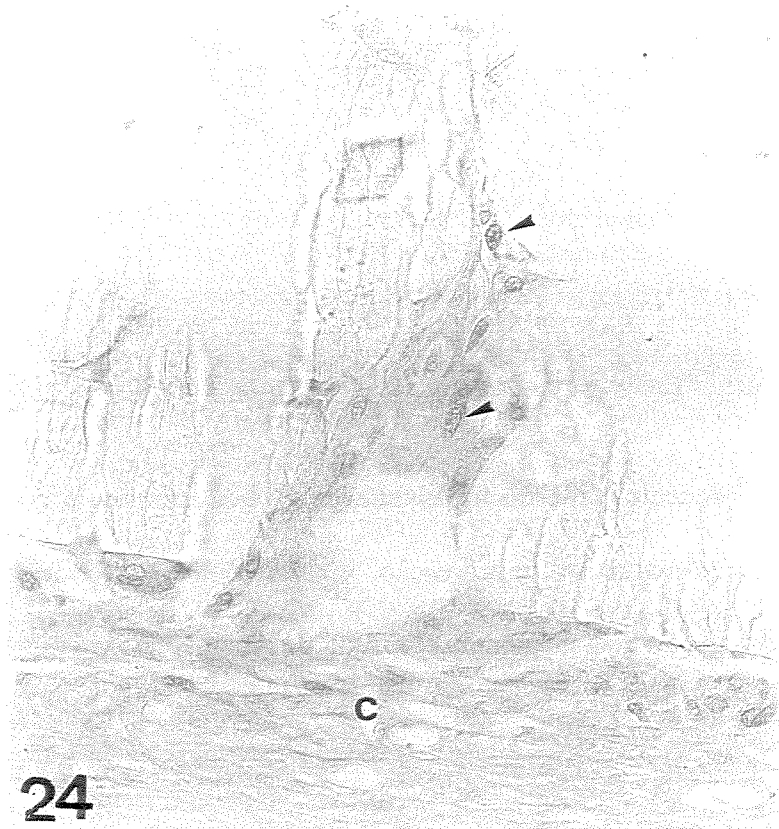


Figura 26: Fotomicrografia de membrana de PLLA após vinte e oito dias de implante. Observe células marcadas pela reação imunocitoquímica (cabeças de seta). Espaço previamente ocupado pela membrana (*). Azul de Anilina. 375x.

Figura 27: Fotomicrografia de membrana de PLLA após vinte e oito dias de implante. Notar núcleo (**cabeça de seta**) e conteúdo de vaso (*) marcados pela reação de PCNA. Azul de Anilina. 375x.

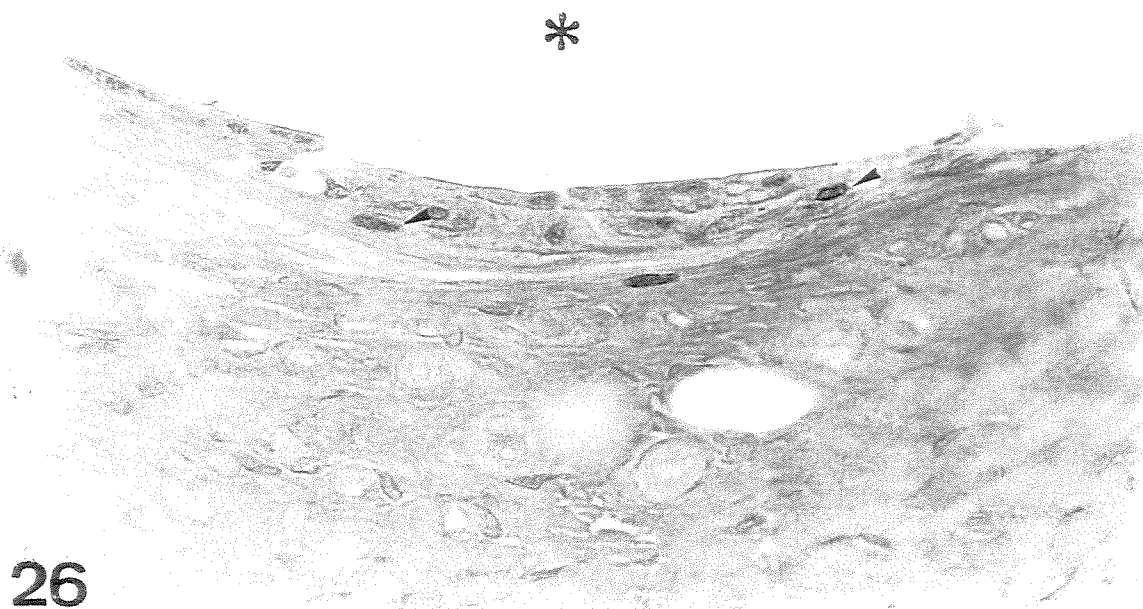


Figura 28: Fotomicrografia de membrana de PLLA após sessenta dias de implante. Notar núcleos marcados pela reação (**cabeças de seta**) muito próximos à membrana. Azul de Anilina. 375x.

Figura 29: Fotomicrografia de membrana de PLLA sessenta dias pós-implante. Observe grande quantidade de núcleos marcados pela reação imunocitoquímica (cabeças de seta). Espaço previamente ocupado pela membrana (*). Azul de Anilina. 375x.

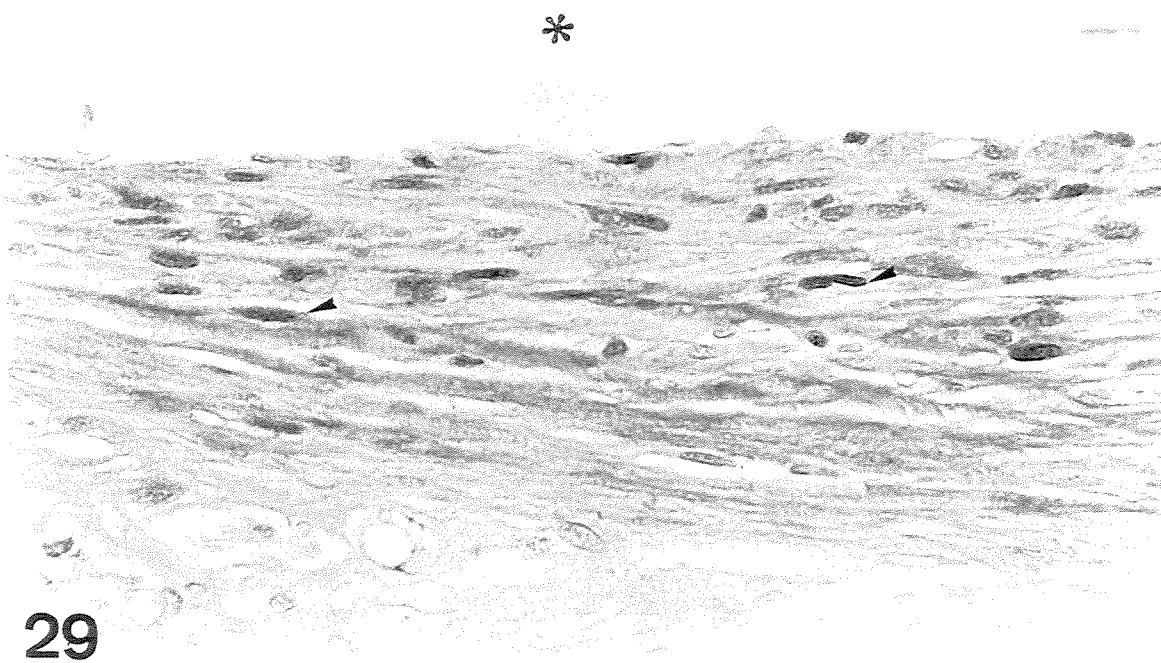
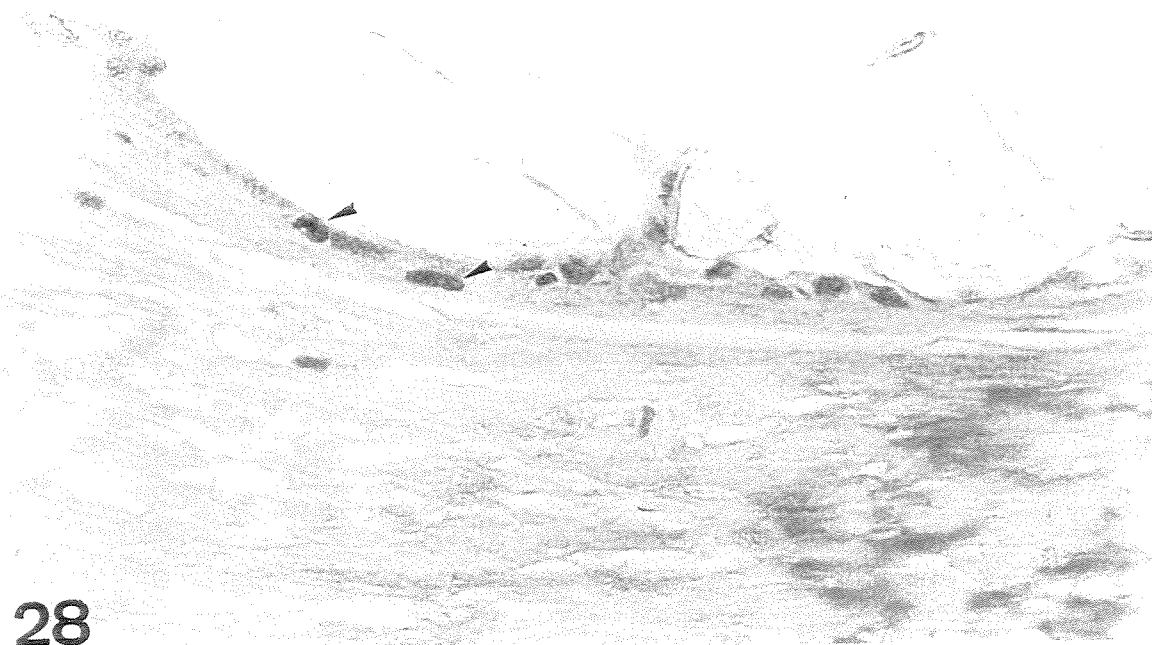


Figura 30: Fotomicrografia de membrana de PLLA após noventa dias de implante. Note núcleos marcados isolados no tecido conjuntivo do interior da membrana (**cabeças de seta**). 125x.

Figura 31: Fotomicrografia de membrana de PLLA após noventa dias de implante. Note núcleos marcados de células do tipo fibroblasto isoladas no tecido conjuntivo do interior da membrana (**cabeças de seta**). Azul de Anilina. 375x

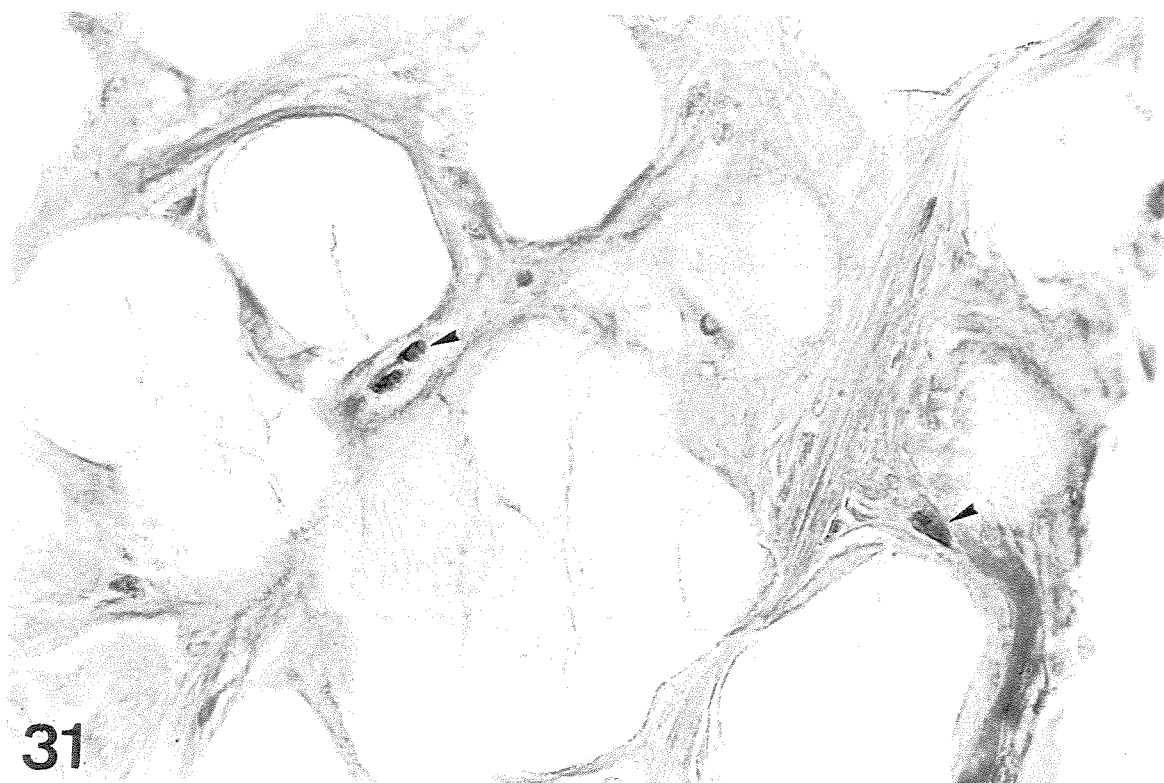
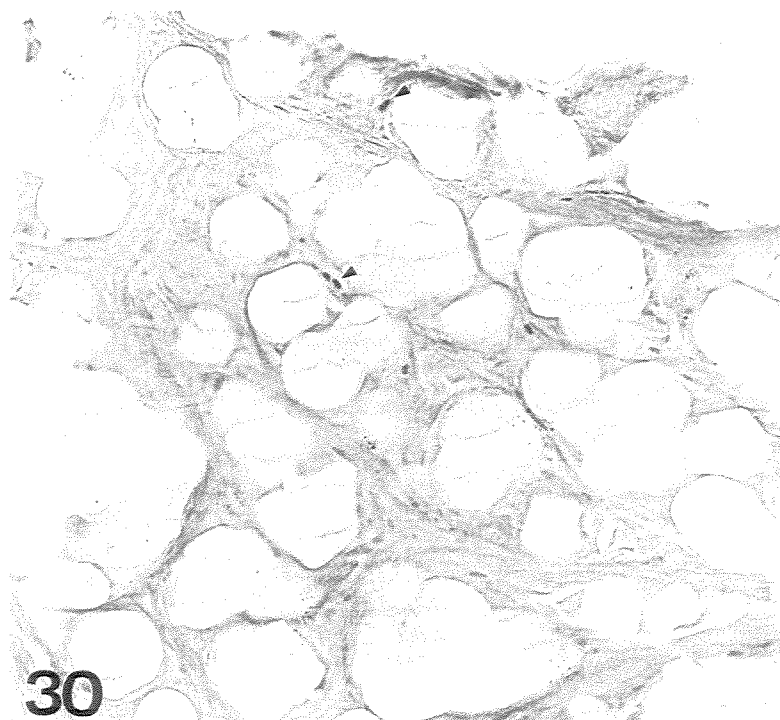


Figura 32: Fotomicrografia de membrana de PLLA após cento e oitenta dias de implante. Note núcleos marcados (**cabeças de seta**) isolados no tecido conjuntivo do interior da membrana (**p**). Azul de Anilina. 125x.

Figura 33: Fotomicrografia de membrana de PLLA após cento e oitenta dias de implante. Note, em maior detalhe núcleos de células do tipo fibroblasto marcados pela reação de PCNA, isolados no tecido conjuntivo do interior da membrana (**cabeças de seta**). Azul de Anilina. 250x.

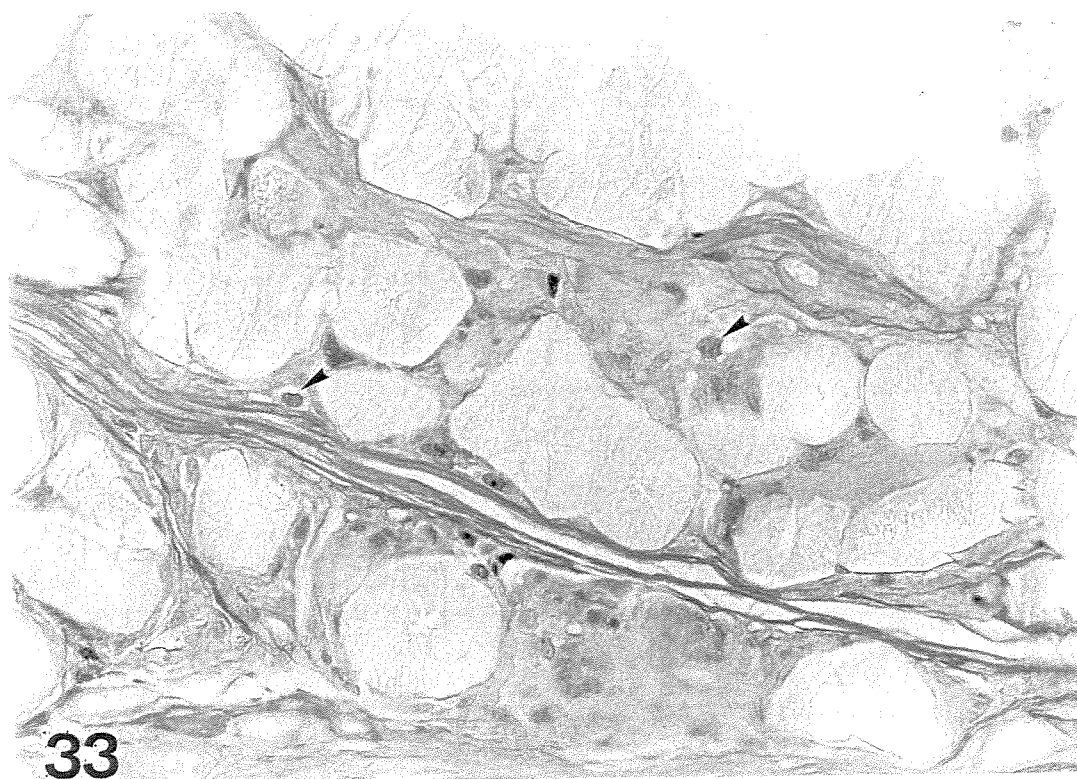
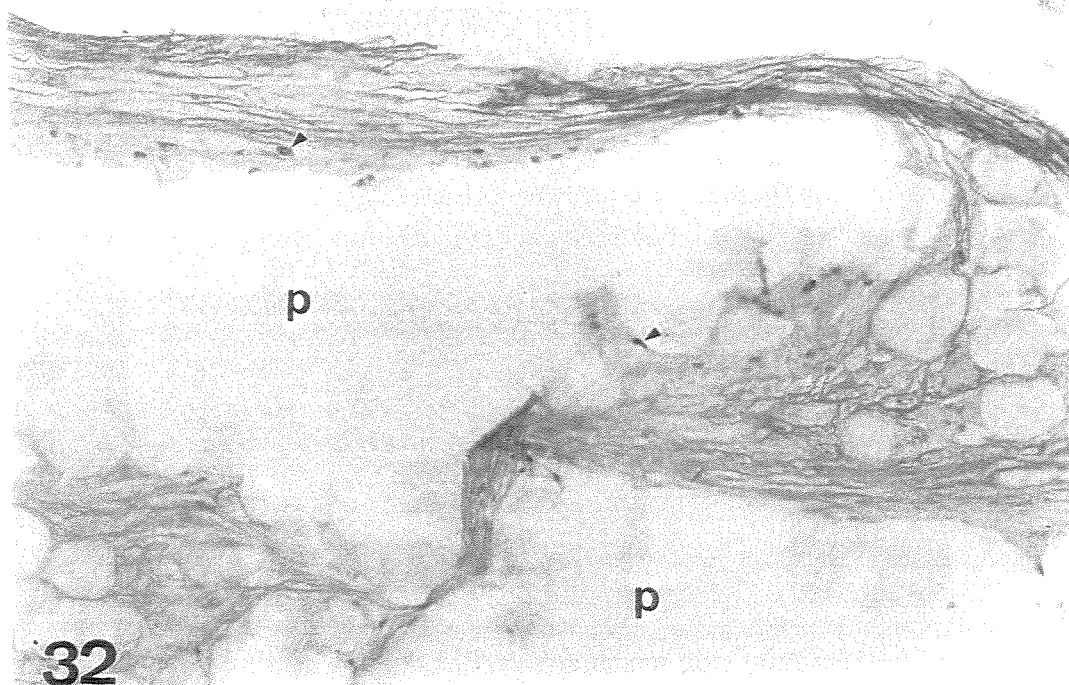


Figura 34: Fotomicrografia de membrana de PLLA após cento e oitenta dias de implante. Note núcleos marcados de células volumosas agrupadas presentes em amostras de períodos maiores de implante. Azul de Anilina. 375x.

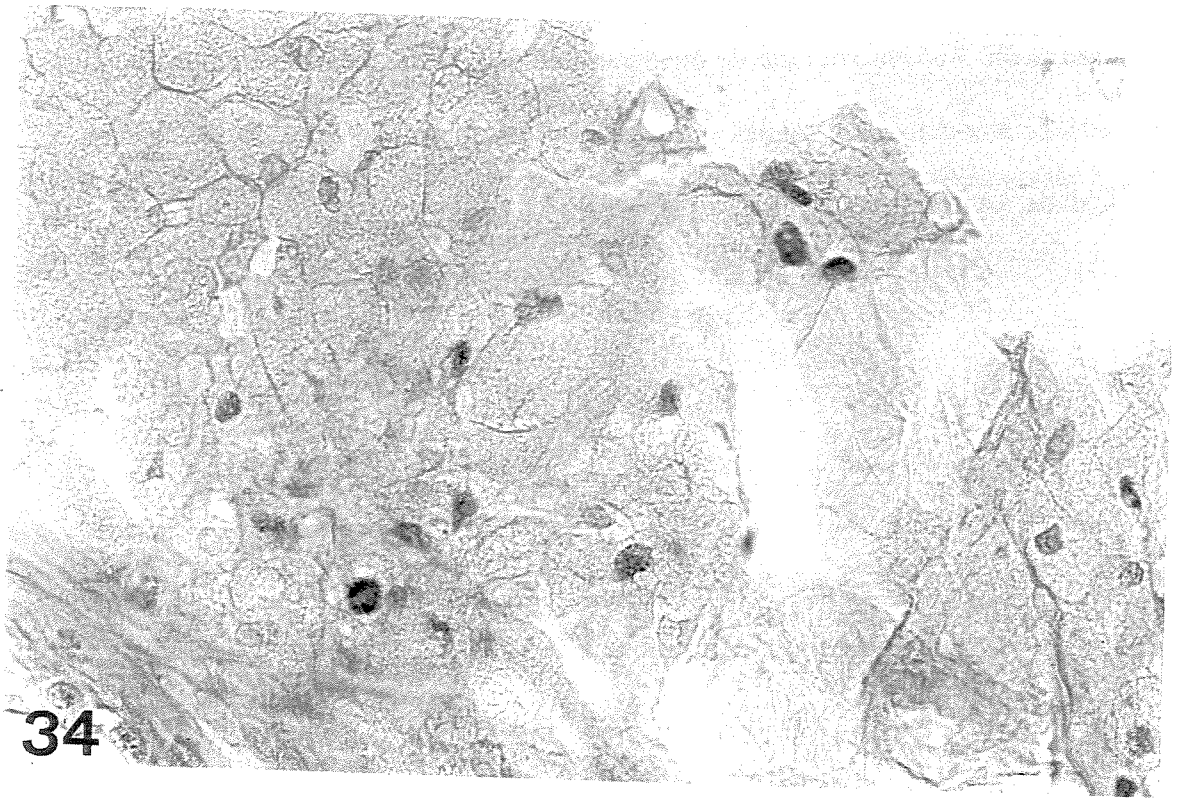


Figura 35: Fotomicrografia de membrana de PLLA utilizada como controle positivo. Note núcleos marcados das células que revestem a parede do ducto de uma glândula sebácea. Azul de Anilina. 250x.

Figura 36: Fotomicrografia de membrana de PLLA utilizada como controle positivo. Note núcleos marcados das células que revestem a parede do bulbo de um folículo piloso. Azul de Anilina. 250x.

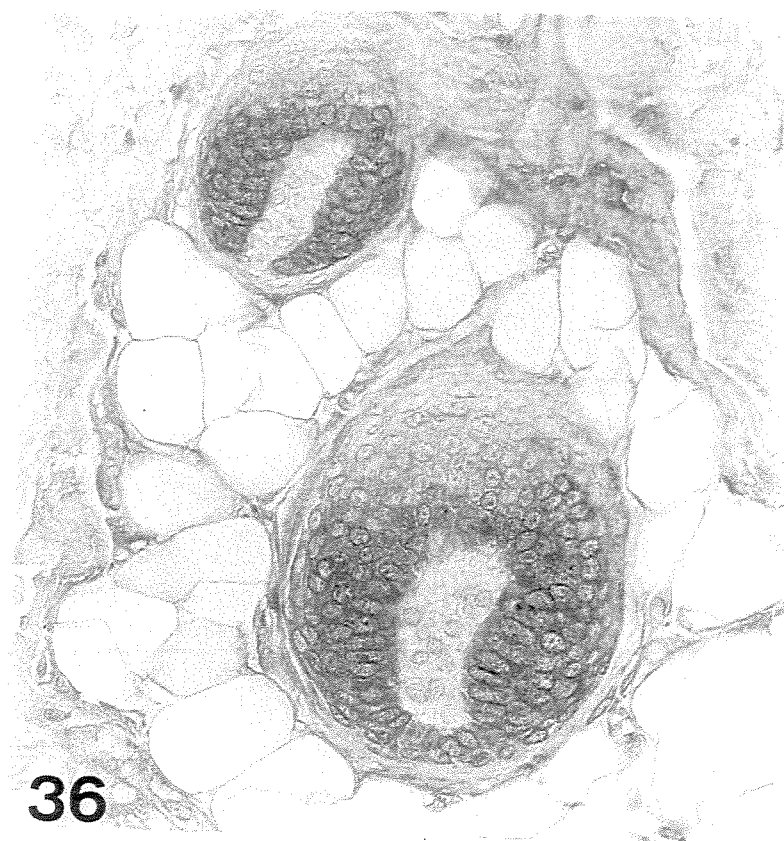
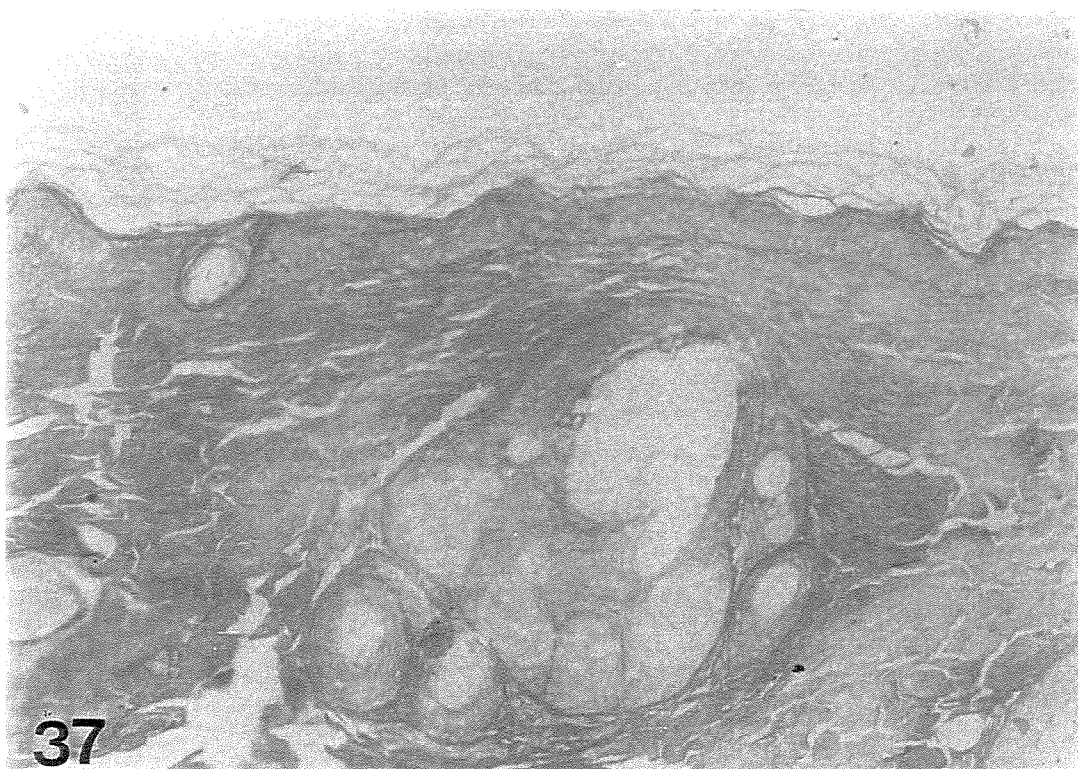


Figura 37: Fotomicrografia de membrana de PLLA utilizada como controle negativo. Note ausência de marcação nas células basais da epiderme e glândula sebácea. Azul de Anilina.
125x



V. DISCUSSÃO

A adição de tri-etil-citrato como plastificante foi empregada por DA-SILVA *et al.* (1985) com o intuito de fornecer uma certa maleabilidade aos implantes tubulares utilizados, permitindo a aplicação de suturas na superfície dos mesmos.

Como observado por LUCIANO (1997), os implantes de PLLA que não contêm plastificante em sua composição não possuem poros e, conseqüentemente, não permitem a invasão celular. Segundo o autor, membranas com estas características poderiam ser empregadas em regeneração guiada de tecido ou qualquer outra técnica de recuperação que necessite isolamento entre tecidos através de uma membrana densa com longo tempo de degradação.

Em relação aos implantes obtidos através da adição de 10% de plastificante, LUCIANO (1997) observou que a porosidade fornecida modifica totalmente a reação do tecido ao implante. Dessa maneira, ao se comparar as amostras retiradas após 30 dias de implantação, notou-se que a membrana foi totalmente invadida por células em toda a sua espessura, encontrando-se muito degradada. Neste trabalho, os resultados obtidos após a implantação de uma membrana contendo 7% de plastificante indicaram que a porcentagem de tri-etil-citrato utilizada influencia muito no tempo de degradação do material.

Os resultados obtidos comparados com os de LUCIANO (1997) mostram que a velocidade de degradação do polímero implantado adicionado de 7% de plastificante foi menos intensa. Ademais, uma menor quantidade de plastificante adicionado provavelmente

reduziu a porosidade, fazendo com que o implante apresentasse uma menor invasão tecidual quando comparado ao obtido pelo autor no mesmo período analisado.

Através da análise microscópica da região dos implantes foi possível perceber que todas as amostras apresentaram uma cápsula fibrosa ao redor da membrana semelhante à descrita por SPECTOR & TONG-LI (1989), porém, a resposta inflamatória a esse polímero pôde ser considerada como de pouca intensidade. Notou-se ainda que a presença de poros contribuiu para a invasão dos elementos teciduais no interior das membranas.

A análise dos resultados das amostras extraídas de animais após dois dias de implante revela uma resposta inflamatória com muitos neutrófilos, macrófago e raros eosinófilos. Sabe-se que o procedimento operatório provoca uma reação inflamatória aguda (até sete dias de implante) que é normalmente vista após um trauma cirúrgico. Após este período a reação inflamatória aguda dá lugar a uma reação ao implante (BEUMER *et al.*, 1994; BERGSMA *et al.*, 1995).

A presença de vasos sanguíneos no interior das amostras obtidas após vinte e um dias de implantação sugere uma neovascularização, possibilitando a regeneração do tecido lesado. PADERA & COLTON (1996) postulam que materiais porosos apresentem locais com pressão parcial reduzida de O₂. Esta hipóxia induz a secreção de fatores angiogênicos por macrófagos, agindo diretamente nas células endoteliais. Alguns destes fatores, como a angiotropina e o fator-alfa de necrose tumoral, estimulam a migração de células endoteliais,

enquanto outros, como o fator de crescimento epidérmico, promovem a mitose destas células.

A presença de células gigantes em nossos preparados observadas a partir do sétimo dia de implante foi notada por vários autores. Segundo LAM *et al.* (1993) as células gigantes observadas em reações de corpo estranho se formam pela fusão de macrófagos, um processo mediado por algumas citocinas como interleucina 4 e interferon- γ . Além disso, nossas observações destas células mostraram um grande número de mitocôndrias, a partir disso, postula-se que a eliminação (degradação) do PLLA seja a partir do ciclo do ácido tricarboxílico, gerando gás carbônico. BRADY *et al.* (1973) utilizaram implantes de D,L-poli(ácido láctico) marcados com C_{14} na parede abdominal de ratos. Os autores observaram, após 168 dias, uma perda de radioatividade de 36,8%, dos quais 4,6% foi eliminada através da urina, 2,8% pelas fezes e 29,4% através da respiração. Portanto, afirmam que a maior taxa de eliminação é através do CO_2 expirado.

Células gigantes multinucleadas contendo fagossomos com material amorfo estão presentes nas amostras de cento e oitenta dias de implante sugerindo a fagocitose de fragmentos da membrana. Os produtos da degradação enzimática destes fragmentos poderiam seguir para o ciclo do ácido tricarboxílico mitocondrial, possibilitando a existência de uma segunda via de eliminação do PLLA, além da hidrólise.

BEUMER *et al.* (1994) utilizaram implantes degradáveis de dupla camada sem adição de plastificante. No que diz respeito ao processo de degradação, macrófagos mono e multinucleados (células gigantes de corpo estranho) contendo fragmentos de polímero foram observados na interface implante-tecido durante a décima terceira semana pós-implantação, indicando uma degradação intracelular do implante.

De acordo com o estudo desses autores, a análise histológica da área do implante, mostrou a formação de um tecido fibroso vascularizado com presença de colágeno, indicando reconstituição dos tecidos lesados no processo de implantação e não só uma resposta celular de corpo estranho. A degradação dos implantes, segundo os autores, está adequadamente ligada a biocompatibilidade *in vivo*, pois nenhum efeito sistêmico foi detectado nos órgãos dos animais devido à degradação do implante ou acúmulo de fragmentos poliméricos no decorrer de um ano pós-implantação.

Dessa maneira, é possível afirmar que a presença do implante de PLLA no sítio subcutâneo não estimula apenas a reação inflamatória, mas também a reconstituição do tecido lesado. Para isso, é importante conhecer a porcentagem de plastificante apropriada para cada sítio de implantação, a fim de que o tempo de degradação do polímero seja compatível com a proliferação de um novo tecido. Segundo BRADY *et al.* (1973), a persistência do implante absorvível pode ser controlada pela adição de outros tipos de materiais absorvíveis ao PLLA, como o poli(ácido glicólico).

A análise das amostras preparadas para M.E.V. mostra que a face porosa da membrana, invadida por grande quantidade de células, apresenta maior velocidade de degradação quando comparada à face sem porosidade, sugerindo participação do componente celular no processo de degradação do polímero.

Estudos com membranas de PLLA sem a adição de plastificante (NAKAMURA *et al.*, 1994) indicaram a formação de áreas neoplásicas no sítio de implantação. Segundo os autores, esse processo está relacionado à constante irritação mecânica do polímero no local do implante.

Em nossos estudos não foram observadas áreas neoplásicas durante os cento e oitenta dias de implantação. A adição do plastificante tri-etil-citrato minimizou a rigidez do polímero e reduziu o tempo de degradação, diminuindo as chances de ocorrência de neoplasias na área do implante.

Segundo ROBBINS *et al.* (1994), as etapas que estão envolvidas no processo de cicatrização e reparo de lesões normais envolvem, em um primeiro passo, preenchimento e oclusão da ferida com fibrina e hemáceas. Dentro de 24 horas, neutrófilos aparecem nas margens da lesão, movendo-se através do coágulo, o que é observado em nossos resultados após dois dias de implante. Após três dias, os neutrófilos são substituídos por macrófagos com presença de fibras colágenas nas bordas da ferida. No quinto dia, o processo de neovascularização é máximo. Nossos resultados obtidos por microscopia de luz corroboram

com essas prerrogativas visto que vasos sanguíneos, colágeno e macrófagos foram observados no interior da membrana a partir de quatorze dias. Durante a segunda semana, há uma acumulação contínua de colágeno e proliferação de fibroblastos, enquanto ao término do primeiro mês, está presente um tecido conjuntivo muito celularizado derivado do infiltrado inflamatório.

A análise dos resultados obtidos através do emprego de imunocitoquímica de PCNA mostra que células do tipo fibroblasto estão iniciando o processo de mitose. Estas células se localizam (preferencialmente) na cápsula de tecido conjuntivo que circunda o polímero e, mais raramente, no tecido conjuntivo situado no interior da membrana. Dessa maneira, é possível afirmar que o procedimento de implante das membranas de PLLA no tecido subcutâneo dos animais gera um processo de reconstituição tecidual normal como descrito por ROBBINS *et al.* (1994) e, além disso, as células presentes no tecido da cápsula e que invadem o polímero, não apenas migram de regiões adjacentes à membrana, mas também proliferam neste local e no seu interior, resultando no preenchimento da membrana por tecido conjuntivo, como observado após noventa dias de implante.

A diferença marcante entre a reparação normal do tecido e a resposta tecidual resultante ao implante de PLLA seria a presença de uma cápsula de tecido conjuntivo observada a partir do sétimo dia pós-implante, que caracteriza uma resposta a um corpo estranho, na tentativa de isolá-lo do restante do organismo e, além disso, a presença de células gigantes multinucleadas que apresentam importante papel na tentativa de remoção de elementos estranhos, células estas amplamente citadas na literatura específica.

VI. CONCLUSÕES

No presente trabalho ficou demonstrado que existe uma estreita correlação entre a concentração de plastificante e a obtenção de membranas com diferentes propriedades, propiciando uma invasão de elementos teciduais para o interior da membrana, a qual é proporcional à concentração de tri-etil-citrato utilizada. A partir disso, é possível controlar a degradação do polímero, tornando-se compatível com a velocidade de reconstituição tecidual. Esta conclusão principal foi baseada nas seguintes observações:

- Em comparação com os resultados obtidos com o implante de membranas de 10% de plastificante tri-etil-citrato (LUCIANO, 1997), o implante de membranas de 7% de plastificante apresentou menor velocidade de degradação.
- A invasão celular foi menos intensa quando comparada aos implantes de membrana com 10% de plastificante.
- Houve em aumento gradativo na invasão e reconstituição tecidual na medida em que tempos maiores de implantação foram realizados.
- Notou-se que em todos os períodos de implante estavam presentes células em divisão mitótica, em maior ou menor número, localizadas ao redor da membrana, bem como em seu interior, contribuindo para um aumento da invasão celular do polímero.

A presença de células com acúmulo de fagossomos contendo material polimérico sugere uma possível via de eliminação do polímero por ação celular, além da degradação por hidrólise.

VI. Conclusões

Este tipo de membrana adicionada de 7% de plastificante com as características acima mencionadas teriam importante aplicação em tecidos de regeneração mais lenta.

VII. TRABALHO EM PARALELO

**USE OF TRIETHYLCITRATE PLASTICIZER IN THE PRODUCTION OF
POLY-L-LACTIC ACID IMPLANTS WITH DIFFERENT DEGRADATION TIMES**

S.M.N. Scapin¹, D.R.M. Silva¹, R.M. Luciano², P.P. Joazeiro¹, E.A.R Duek² and M.C.

Alberto-Rincon^{1*}

¹Department of Histology and Embryology, Institute of Biology; ²Department
of Material Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, State University
of Campinas (UNICAMP), PO Box 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

***Mailing address**

Dr. Maria do Carmo Alberto-Rincon

Departamento de Histologia e Embriologia

Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Caixa Postal 6109

13083-970, Campinas, SP, Brazil.

e-mail: arincon@unicamp.br

Fax: (55) (19) 3289-3124

Telephone: (55) (19) 3788-6251

Running Title: PLLA membranes containing a plasticizer

ABSTRACT

Bioabsorbable materials have been widely used the repair of damaged tissue as well as in the, controlled release of drugs and as a supports for cultured cells. The degradation time of poly L-(lactic acid) (PLLA) may be controlled by altering the polymer porosity through the addition of the plasticizer triethylcitrate. This in turn influences the extent cellular infiltration. In this study, we examined the degradation of PLLA membranes containing different concentrations of plasticizer. PLLA discs were implanted subcutaneously in rats and withdrawn 2, 14 and 60 days after implantation. The samples were processed for light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Polymer degradation was proportional to the concentration of plasticizer, indicating that triethylcitrate could affect the degradation time of the implants, without damaging the polymer biocompatibility.

Key words: poly L-(lactic acid), polymer degradation, bioabsorbable materials, tissue regeneration, plasticizer.

INTRODUCTION

The increasing use of artificial materials to repair human tissues has led to development of new products to meet this demand. The availability of polymers that can be absorbed by the host organism has eliminated the need for a second surgery to remove the implanted material, and this in turn has reduced hospital expenses, surgical complications and the time needed for recuperation (1).

Poly-L-(lactic acid) (PLLA) is a semi-crystalline polyester that can be degraded through hydrolysis of its ester bonds, and has considerable strength retention capacity and excellent biocompatibility. Non-toxic degradation products are excreted by the kidneys or eliminated as carbon dioxide and water through the tricarboxylic acid cycle (2). Although bioabsorbable materials are recognized by the organism as “foreign bodies” before their absorption, their finite exposure time and the mild inflammatory response they elicit are clearly advantageous.

Biomaterials have a variety of applications, including the construction of orthopedic prostheses and guided tissue regeneration (3), controlled release of drugs (4, 5), as a type support for cultured cells (6) and tissue engineering (7, 8). The extent of polymer degradation influences not only the type and intensity of the inflammatory response (9), but also its functional application, faster or slower degradation depending on the tissue to be repaired. Many factors may influence the kinetics of biomaterials degradation, including the molecules chemical structure, mass, superficial texture, porosity, pore dimensions, size

and shape of the implant, site of implantation, and the microlocomotion of polymer fragments at the interface with adjacent tissue (10).

The inclusion of a plasticizer in polymer chains decreases the interaction among them but increases the flexibility, porosity and degradation of the polymer (11, 12). In this work, we examined the biological properties and degradation process of PLLA membranes containing different concentrations (5, 9 and 11%) of the plasticizer triethylcitrate and assessed their interaction with adjacent tissue *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Production of implants

PLLA (MW 300,000) was provided as pellets (Medsorb Technologies International L.P., Cincinnati, OH, U.S.A.). Ten grams of polymer were dissolved in 100 ml of methylene chloride (CH_2Cl_2 , Merck KGaA, Darmstadt, Germany) containing 5 %, 9% or 11% triethylcitrate (Aldrich, Milwaukee, WI, U.S.A.) in a closed recipient at room temperature. The mixture was then poured on to a glass plate (100 cm^2), which was air-dried (air flow of 1 L/min) at room temperature. After 15 h, the membranes were removed from the plates and vacuum dried for 24 h. Disks 5 mm in diameter and 620 μm thick were cut and used in the studies described below.

Implantation

The membranes were immersed in 70% ethanol and then vacuum dried. Eighteen female Wistar rats 3 months old obtained from university's central animal house (CEMIB) were used. The rats were housed at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ on a 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. Two membranes of each plasticizer concentration were implanted in the dorsal subcutaneous tissue of each rat (n=18) anesthetized with ketamine and xylazine-HCl (16.6 mg/kg and 3.33 mg/kg. i.p., respectively) (Virbac, Roseira, São Paulo, Brazil). The health and behavior of the rats were assessed daily until sample collection at 2, 14 and 60 days post-implantation.

Light microscopy

Fragments of skin were fixed in Bouin solution and embedded in paraffin (Merck). Sections 5 μm thick were stained with Masson's trichrome and sirius red. Membrane fragments that had adhered to adjacent tissue were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) and embedded in glycol methacrylate resin (Kulzer, Zweigniederlassung, Wehrheim, Germany). Sections 2 μm thick were stained with toluidine blue. These samples were observed and photographed with a Nikon Eclipse E800 photomicroscope. The samples stained with sirius red were observed and photographed under polarized light to assess invasion by collagen fibers.

Scanning electron microscopy (SEM)

Samples from the different periods of implantation were fixed in 2.5% paraformaldehyde (Sigma) and 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Science, Washington, P.A., U.S.A.) containing 0.5% tannic acid (Sigma) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, followed by post-fixation in 1% osmium tetroxide (Sigma) in the same buffer. After dehydration in a graded ethanol series, the samples were freeze-fractured in liquid nitrogen then critical point dried (CPD 030 Balzers) and sputtered with gold (SCD 050, Balzers). The samples were examined in a Jeol JMS 5800 LV scanning electron microscope (Japan).

RESULTS

No signs of a strong inflammatory process, such as an increase in local blood flow, edema, blush or necrosis were seen during tissue sampling. The membranes with more plasticizer (9% and 11%) adhered more to the adjacent tissue, whereas those with 5% plasticizer easily detached from it. SEM analysis of membranes not implanted revealed different size pores delimited by globular units of the wrinkled surface. Examination of the polymer fracture surface showed that the membrane faces differed in porosity (Fig. 1). As the amount of plasticizer increased, the pores extended deeper and the porous area became thicker than the dense area (of low porosity) so that in samples containing 11% plasticizer it was not possible to distinguish a non-porous face (Fig. 2).

Light microscopy

Independently of the percentage of plasticizer, two days after implantation the samples showed the typical features of acute phase inflammation, including neutrophil infiltration, fibrin nets and soft tissue edema (Figs. 3 and 4). In the chronic phase (14 and 60 days after implantation), fibrous capsule formation around the implant and invasion of the pores by vascular connective tissue and giant cells were observed (Figs. 5 and 6).

Samples containing 5% plasticizer retained a dense aspect 60 days after implantation, which made cellular invasion and adhesion to adjacent tissue difficult. Examination under polarized light revealed break-up of the implant, with the fracture area being invaded by collagen fibers proceeding of the capsule (Fig. 7). In samples containing 9% plasticizer there was an intense penetration of blood vessels through the membrane pores (Fig. 8). Polarized light showed extensive invasion by collagen fibers from the capsule (Fig. 9). Within 14 days of implantation, samples containing 11% plasticizer were invaded by large amounts of connective tissue and were surrounded by a capsule rich in blood vessels (Fig. 10). After 60 days, those implants were covered with tissue (Fig. 11).

Scanning electron microscopy.

SEM provided little information about the tissue component since with this technique it is not possible to distinguish among different types of cells. However, SEM provided greater insight into the pores of polymer degradation.

Two days after implantation, when the degradation process had not yet started, acute phase cells and fibrin nets were seen through the membrane pores (Fig. 12), independently of the amount of plasticizer used. Fourteen days after implantation, the polymer units of membranes containing 5% and 9% plasticizer were still intact. Although in the 9% samples there was greater cell infiltration, with some of the cells adhering firmly to the polymer surface (Fig. 13). In samples containing 11% plasticizer, the initiation of polymer degradation was observed after 14 days, with the appearance of centrifugal fractures in the membrane units (Fig. 14).

Sixty days after implantation, the samples containing 5% plasticizer remained dense, with little invasion by tissue elements, although some globular units showed signs of degradation (centrifugal fractures) (Fig. 15). After 60 days, implants containing 9% and 11% plasticizer were in an advanced state of degradation in which the polymer units were extensively disrupted and immersed in a large amount of connective tissue (Fig. 16).

DISCUSSION

According to MAINIL-VARLET *et al.* (13), the inflammatory response to biomaterials is determined by the composition, purity, conformation, superficial properties, implantation site, porosity, chemical structure, and other properties of the material. In the case of absorbable polymers, these factors also influence the extent of degradation by tissue. The tissue reaction to PLLA was reflected by the presence of fibroblasts, macrophages, giant cells and polymorphonuclear cells.

The type of inflammatory response to PLLA implants depended on the time since implantation time rather than on the concentration of plasticizer, although implants with a containing higher of concentration plasticizer, had greater porosity and a more intense cell response. An acute inflammatory reaction was seen in all the samples obtained two days after implantation and reflected the local surgical trauma. Subsequently, a chronic reaction was observed in response to the implant. In this chronic phase, the formation of a fibrous capsule around the membrane and the presence of giant cells suggested that the organism was trying to isolate and absorb the implant. The invasion of the membrane by vascular connective tissue indicated that, in addition to stimulating the inflammatory reaction, the membrane also enhanced regeneration of the damaged tissue.

PLLA implants devoid of plasticizer do not have pores (12) and, consequently, do not allow cellular invasion. The addition of plasticizer provides malleability and porosity, and modifies the tissue reaction to the implant. As shown here, the greater amount of plasticizer added, the greater implant porosity, cellular invasion and speed of degradation.

The membranes containing 5% plasticizer had a very dense structure, which hindered the tissue invasion and vascularization of the implant. These membranes were unable to accommodate the natural malleability of subcutaneous tissue, and in some samples they even tore. Such membranes may be useful in guided tissue regeneration or other techniques of recuperation that require tissue isolation through a thick membrane with a long degradation time.

In contrast, membranes containing 9% and 11% plasticizer were much more porous and malleable. The presence of blood vessels in these samples suggested a first step to neovascularization, with regeneration the damaged tissue and perfect polymer integration into the site of implantation. These membranes would be more indicated for soft tissue regeneration or as a support for cultured cells, where the tissue reposition is faster. These membranes may be beneficial in tissue engineering because it would allow a higher number of cell to be cultivated in the polymer mold, it would facilitate the diffusion of factors among transplanted cells and adjacent tissue and would contribute to tissue vascularization (14). In a comparative study of polymers with different degradation features, relevant to cartilage reconstruction, ROTHER *et al.* (15) concluded that polymer supports with a shorter degradation time were more appropriate for formation of the cartilage matrix, while polymers that were more stable apparently inhibited matrix production.

SEM confirmed that membranes with more pores degraded much quicker, probably because of the greater cellular infiltration and consequently greater participation of cells in the polymer degradation process.

Based on these results, we conclude that the addition of the plasticizer triethylcitrate to PLLA membranes can be useful for producing implants with different degradation time for various applications. The concentration of plasticizer affects the porosity and malleability of the implants without compromising biocompatibility of the polymer.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by FAPESP (98/13339-4, 98/15373-1 99/10918-6 and 99/09730-2). The authors thank the Electron Microscopy Laboratory (I.B., UNICAMP) for use of their facilities and Mr. Baltazar Pereira de Paula for technical assistance.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Electron micrograph of PLLA membrane with 5% plasticizer before implantation. Note that there is one porous face and another with a denser structure.

Figure 2: Electron micrograph of PLLA membrane with 11% plasticizer before implantation. Note the completely porous structure.

Figure 3: Photomicrograph of PLLA membrane with 9% plasticizer two days after implantation. Observe the presence of fibrin nets (*) and the large number of neutrophils (arrows) inside the polymer pores. The capsule (c) is in the initial stages of formation.

Figure 4: Photomicrograph of PLLA membrane with 11% plasticizer two days after implantation. Note the vascular edema (e) and neutrophils (*) inside the polymer.

Figure 5: Photomicrograph of PLLA membrane with 9% plasticizer 60 days after implantation. Note the presence of the fibrous capsule (c) and giant cells (arrow). There is also an infiltration of blood vessels (arrowhead) and connective tissue (*).

Figure 6: Photomicrograph of PLLA membrane with 5% plasticizer 60 days after implantation. The membrane is separated from the adjacent tissue (*) and is still dense, with low porosity.

Figure 7: Photomicrograph of PLLA membrane with 5% plasticizer 60 days after implantation. Note the rupture region of membrane being invaded for many collagen fibers from the capsule (c).

Figure 8: Photomicrograph of PLLA membrane with 9% plasticizer 60 days after implantation. There is an extensive infiltration of blood vessels (arrows) through the polymer pores.

Figure 9: Photomicrograph of PLLA membrane with 9% plasticizer 60 days after implantation. Polarized light shows pore invasion by collagen fibrils (arrows) from the capsule (c).

Figure 10: Photomicrograph of PLLA membrane with 11% plasticizer 14 days after implantation. Note the fibrous capsule (c) with many blood vessels (arrowheads) surrounding the implant and the intense connective tissue infiltration (*).

Figure 11: Photomicrograph of PLLA membrane with 11% plasticizer 60 days after implantation. Note the thick capsule (c) and the tissue invasion (arrowheads) that eventually leads to separation of the polymer units.

Figure 12: Electron micrograph of PLLA membrane with 5% plasticizer two days after implantation. Fibrin nets (arrowheads) and inflammatory cells are present (arrows).

Figure 13: Electron micrograph of PLLA membrane with 9% plasticizer 14 days after implantation. Note the presence of a cell firmly adhered to the polymer surface (arrow). The membrane units do not show fractures at this stage.

Figure 14: Electron micrograph of PLLA membrane with 11% plasticizer 14 days after implantation. The globular units of the membrane show the typical centrifugal fractures (arrows) of the degradation process.

Figure 15: Electron micrograph of PLLA membrane with 5% plasticizer 60 days after implantation. The polymer shows some signs of degradation (arrows). Although the membrane is still dense, some breaks are present (*).

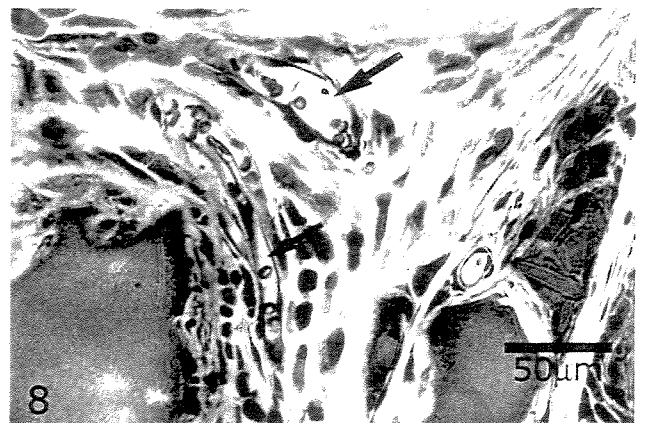
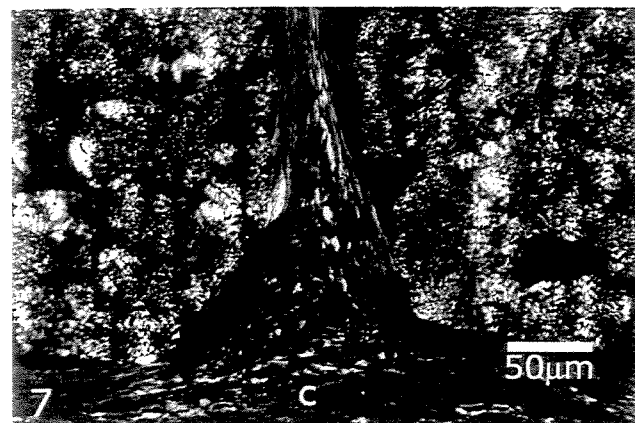
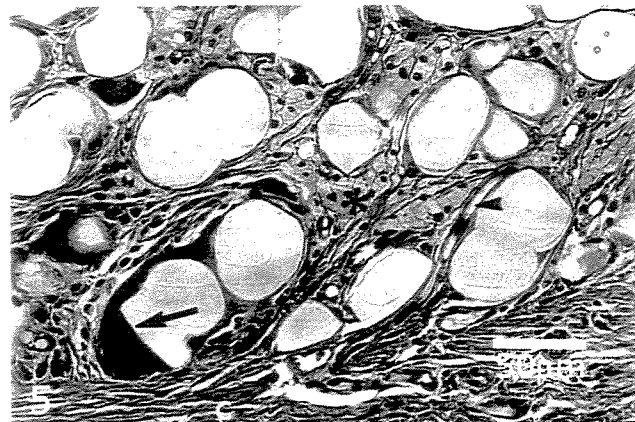
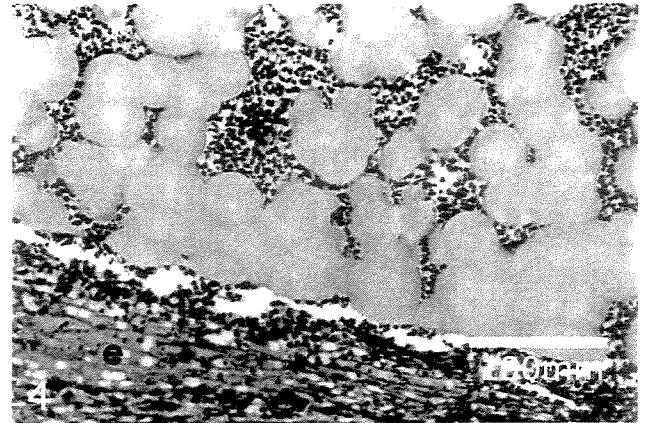
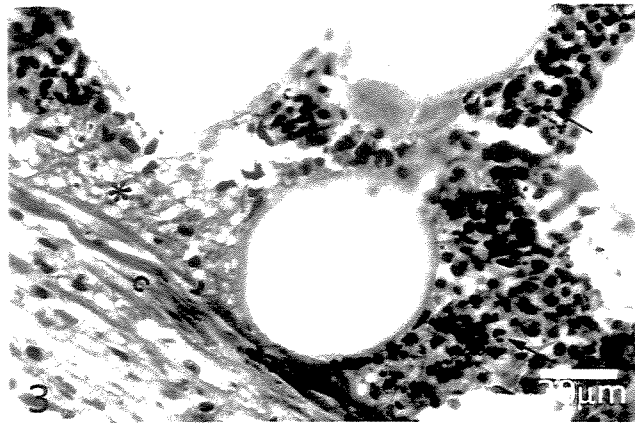
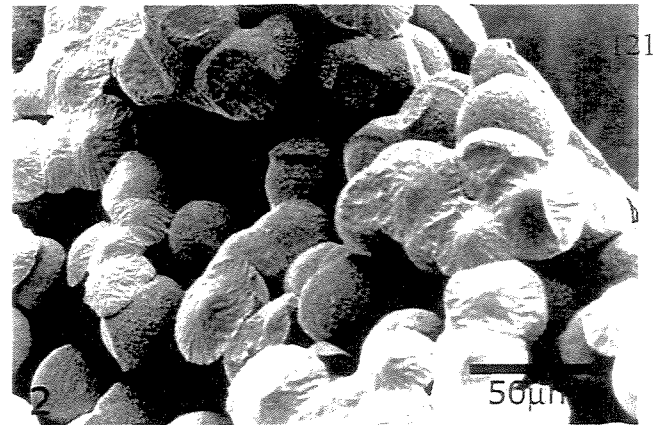
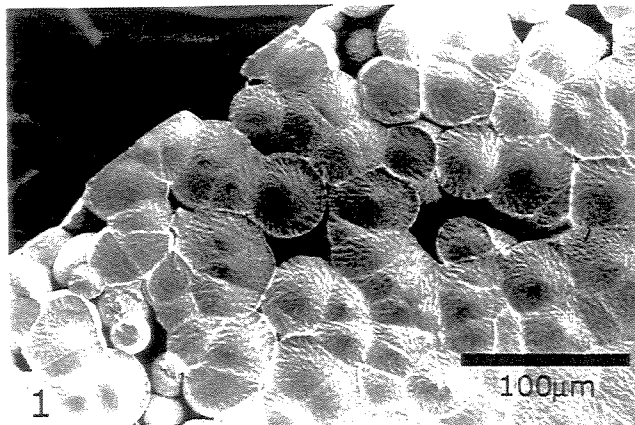
Figure 16: Electron micrograph of PLLA membrane with 9% plasticizer 60 days after implantation. Note the extensively degraded membrane units (arrow) and the abundant tissue invasion (*).

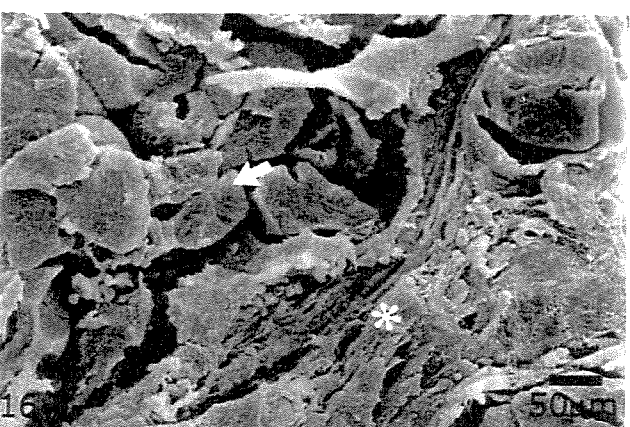
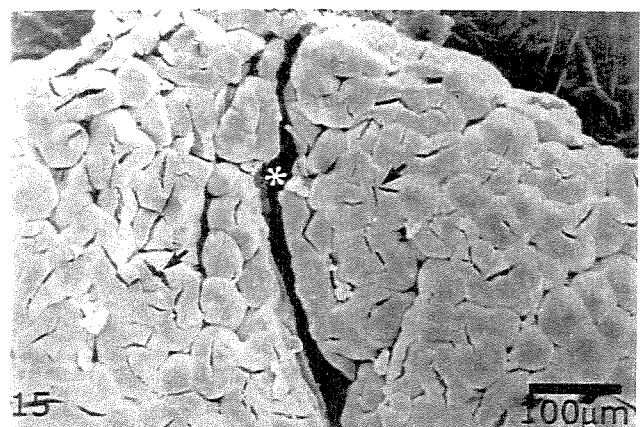
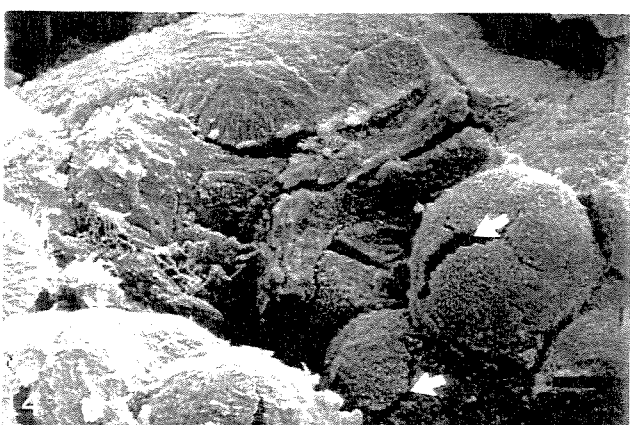
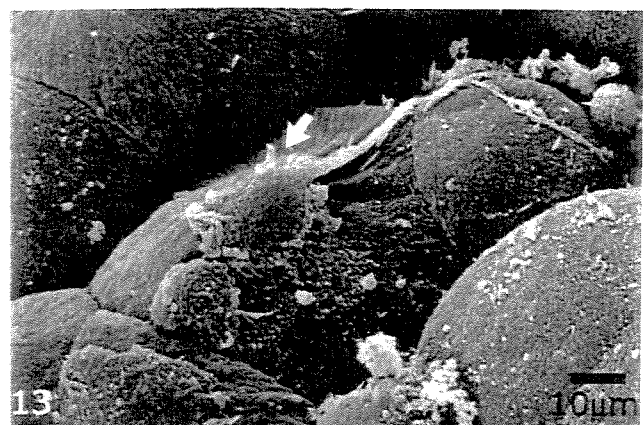
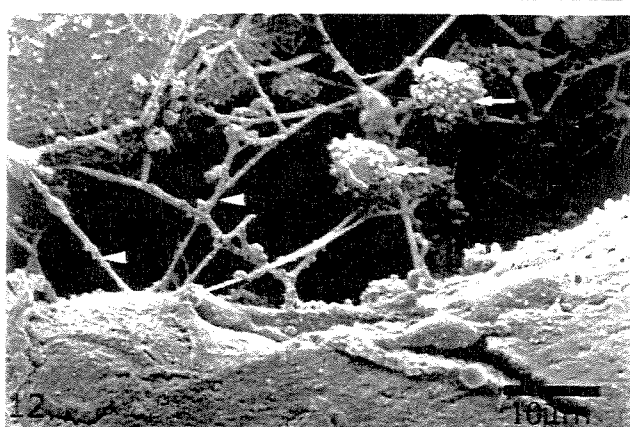
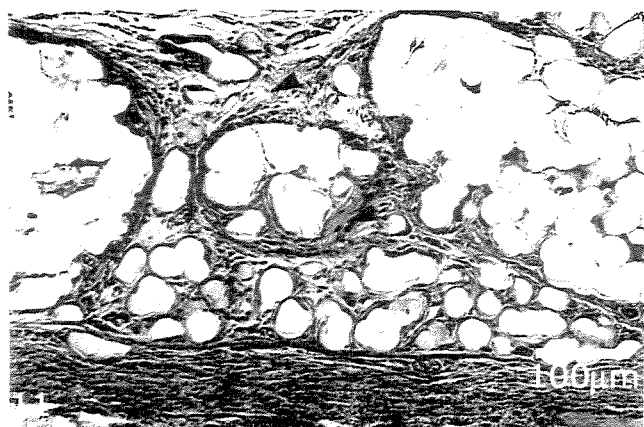
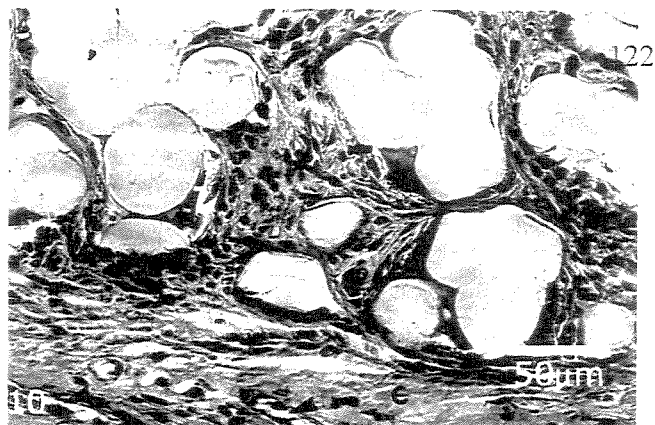
REFERENCES

1. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000;21: 2335-46.
2. Bendix D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Pol Degrad Stab* 1998;59:129-35.
3. Pineda LM, Büsing M, Meinig RP, Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membrane. III. Effect of poly (L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *J Biomed Mat Res* 1996;31:385-94.
4. Vallet-Regí M, Granado DA, Gordo M, Cabañas MV, Ragel CV, Salinas AJ, Doadril AL, San Román J. Preparation, characterization, and *in vitro* release of ibuprofen from Al₂O₃/PLA/PMMA composites. *J Biomed Mat Res* 1998;39:423-28.

5. Kawai K, Suzuki S, Tabata Y, Ikada Y, Nishimura Y. Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials* 2000;21:489-99.
6. Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Culture of organized cell communities. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33:15-30.
7. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-26.
8. Kim B-S, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998;16:224-30.
9. Lam KH, Schakenraad JM, Esselbrugge H, Feijen J, Nieuwenhuis P. The effect of phagocytosis of poly(L-lactic acid) fragment on cellular morphology and viability. *J Biom Mat Res* 1993;27:1569-77.
10. Beumer GJ, Van Blitterswijk CA, Ponc M. Degradative behavior of polymeric matrices in (sub)dermal and muscle tissue of rat: quantitative study. *Biomaterials* 1994;15:551-9.
11. Schugens C, Grandfils C, Jeromes R, Teyssie PH, Delree P, Martin D, Malgrange B, Moonen G. Preparation of macroporous biodegradable polylactide implant for neuronal transplantation. *J Biom Mat Res* 1995;29:1349-62.
12. Luciano RM in "Síntese, Caracterização e Degradação de Membranas de Poli(ácido láctico), um polímero bioabsorvível". UNICAMP, Masters dissertation. 1997.
13. Mainil-Varlet P, Gogolewski S, Nieuwenhuis P. Long-term soft tissue reaction to various polylactides and their *in vivo* degradation. *J Mat Sci Mat Med* 1996;7:713-21.

14. Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, Vacanti JP, Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* 1996;17:1417-22.
15. Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittinger M. Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mat Res* 1998;42:347-56.





VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. Referências Bibliográficas

Athanasίου, K.A.; Niederauer, G.G.; Agrawal, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17(2): 93-102, 1996.

Athanasίου, K.A.; Agrawal, C.E.; Barber, F.A.; Burkhart, S.S. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg*, 14 (7): 726-737, 1998.

Barbanti, S.H. "Estruturas tridimensionais de poli(ácido láctico) para cultura de células". Tese de mestrado apresentada à faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, 2001.

Barrows, T.H. "Synthetic Bioabsorbable Polymers", in High Performance Biomaterials. Schyzer, M., ed. Technomic Publishing Company, pp. 243-244, 1991.

Bendix, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degrad. Stab.* 59: 129-135, 1998.

Bergsma, J.E.; Rozema, F.R.; Bos, R.R.M.; Boering, G.; de Bruijn, W.C.; Pennings, A.J. Biocompatibility study of as-polymerized poly(L-lactide) in rats using a cage implant system. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29: 173-179, 1995.

VIII. Referências Bibliográficas

- Beumer, G.J.; Van Blittreswijk, C.A.; Ponec, M. Biocompatibility of a biodegradable matrix used as a skin substitute: An *in vivo* evaluation. *J. Biomed. Mater. Res.* 28: 545-552, 1994.
- Brady, J.M.; Cutright, D. E.; Miller, R.A.; Battistone, G.C. Resorption rate, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat. *J. Biomed. Mater. Res.* 7: 155-166, 1973.
- Da-Silva, C.F., Madison, R., Dikkes, P., Chiu, T.H.; Sidman, R.L. An *in vivo* model to quantify motor and sensory peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides. *Brain Res.* 342: 307-315, 1985.
- Davis, M.D. & Vacanti, J.P. Toward development of an implantable tissue engineered liver. *Biomaterials* 17: 365-372, 1996.
- Freed, L.E.; Marquis, J.C.; Nohria, A.; Emmanuel, J.; Mikos, A.G. Langer, R. Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultures on synthetic biodegradable polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 11-23, 1993.
- Freed, L.; Vunjak-Novakovic, G.; Biron, R.J.; Eagles, D.B.; Lesnoy, D.C.; Barlow, S.K.; Langer R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology*, 12: 689-93, 1994.

VIII. Referências Bibliográficas

Grulke, E.A. "Sutures" in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. A. Wiley - Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, v.16, p.473, 1989.

Ishaug-Riley, S.L.; Crane, G.M.; Gurlek, A.; Miller, M.J.; Yasko, A.W.; Yaszemski, M.J. Mikos, A.G. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(L-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J. Biomed. Mater. Res.* 36: 1-8, 1997.

Klompmaaker, J.; Jansen, H.W.; Verth, R.P.; de Groot, J.H.; Nijenhuis, A.J.; Pennings, A.J. Porous polymer implant for repair of meniscal lesions: a preliminary study in dogs. *Biomaterials* 12: 810-16, 1991.

Lam, K. H.; Schakenraad, J.M.; Esselbrugge, H.; Feijen, J.; Nieuwenhuis, P. The effect of fagocytosis of poly (L-lactic acid) fragment on cellular morphology and viability. *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 1569-1577, 1993.

Lo, H.; Kadiyala, S.; Guggino, S. E.; Leong, K.W. Poly (L- lactic acid) foams with cell seeding and controlled-release capacity. *J. Biomed. Mater. Res.* 30: 475-484, 1996.

VIII. Referências Bibliográficas

Luciano, R.M. “Síntese, Caracterização e Degradação de membranas de Poli(ácido láctico), um polímero bioabsorvível”. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, 1997.

Middleton, J.C. & Tipton, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21: 2335-2346, 2000.

Mikos, A.G.; Sarakinos, G.; Leite, S.M.; Vacanti, J.P.; Langer, R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials* 14: 323-330, 1993.

Mikos, A.G. & Temenoff, J.S. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biotechnol. Human Disorders* 3 (2): 1-6, 2000.

Mikos, A.G.; Thorsen A.J.; Czerwonka, L.A.; Bao, Y.; Langer, R.; Winslow, D.N.; Vacanti, J.P. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer* 35: 1068-1077, 1994.

VIII. Referências Bibliográficas

Mooney, D.J.; Baldwin, D.F.; Suh, N.P.; Vacanti, J.P. Langer, R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* 17: 1417-1422, 1996.

Nakamura, S.; Ninomiya, S.; Takatori, Y.; Morimoto, S.; Kusaba, I.; Kurokawa, T. Polylactide screws in acetabular osteotomy. *Acta Orthop. Scand.* 64: 301-302, 1993.

Naughton B.A., Sibanda B., Weintraub J.P., San Roman J., Kamali V. A stereotypic, transplantable liver tissue-culture system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 54(1-3): 65-91, 1995.

Padera, R.F.; Colton, C.K. Time course of membrane microarchitecture-driven neovascularization. *Biomaterials*, 17(3): 277-284, 1996.

Park, A & Cima, L.G. In vitro cell response to differences in poli-L-lactide crystallinity. *J. Biomed. Mater. Res.* 31: 117-130, 1996.

Park, A.; Wu, B.; Griffith, L.G. Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 9: 89-110, 1998.

VIII. Referências Bibliográficas

Patrick Jr., C.W. & Mikos, A.G. McIntire. Prospectus of tissue engineering. In: Patrick Jr. C. W., Mikos, A. G. McIntire L. V., editors. *Frontiers in tissue engineering*. New York, USA: Elsevier Science, p. 3-14, 1998.

Puelacher, W.C.; Mooney, D.; Langer, R.; Upton, J.; Vacanti, J.P.; Vacanti, C.A. Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials* 15 (10): 774-778, 1994.

Robbins, S. L.; Cotran, R. S.; Klumar, V. "Inflammation and repair" in *Pathologic Basis of disease*. W. B. Saunders Company, Chapter Three, p.85-86, 1994.

Santos Jr., A.R. "Cultura de células vero sobre polímeros bioabsorvíveis a base de poli(L-ácido láctico)". Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia. 2001.

Spector, M.C.C. & Tong-LI, X. The local tissue response to biomaterials. *Crit. Rev. Biocomp.* 5: 269-295. 1989.

Suganuma, J. & Alexandar, H. Biological response of intramedullary bone to poly(L-lactic acid). *J. Appl. Biomater* 4: 13-27, 1993.

VIII. Referências Bibliográficas

Thomson, R.C.; Giordano, G.G.; Collier, J.H.; Ishau, S.L.; Mikos, A.G.; Lahiri-Munir, D.; Garcia, C.A. Manufacture and characterization of poly (-hidroxy ester) thin films as temporary substrates for retinal pigment epithelium cells. *Biomaterials* 17: 321-327, 1996.

Törmälä, P.; Alitalo, I.; Toivonen, T.; Vasenius, J.; Laitinen, O.; Vainionpää, S. Tissue response to a braided poly-L-lactide implant in an experimental reconstruction of anterior cruciate ligament. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 4: 547, 1993.

Törmälä, P.; Pohjonen, T.; Rokkanen, P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc. Instn. Mech. Engrs (Part H)* 212: 101-111, 1998.

Vallet-Regí, M.; Granado, D.A.; Gordo, M.; Cabañas, M.V.; Ragel, C.V.; Salinas, A.J.; Doadrio, A.L.; San Román, J. Preparation, characterization, and *in vitro* release of ibuprofen from Al₂O₃/PLA/PMMA composites. *J. Biomed. Mat. Res.* 39 (3): 423-428. 1998.

Van der Elst, M.; Dijkema, A.R.A.; Klein, C.P.A.T.; Patka, P.; Haarman, H.J.Th.M. Tissue reaction on PLLA versus stainless steel interlocking nails for fracture fixation: an animal study. *Biomaterials*, 16(2): 103-106. 1995.

VIII. Referências Bibliográficas

Van Sliedregt, A.; Van Loon, J.A.; Van Der Brink De Groot, K.; Van Blitterswijk, C.A. Evaluation of polylactide monomers in an *in vitro* biocompatibility assay. *Biomaterials* 15: 251. 1994.

Von Recum, H.A.; Cleek, R.L.; Eskin, S.G.; Mikos, A.G. Degradation of polydispersed poly(L-lactic acid) to modulate lactic acid release. *Biomaterials* 16(6): 441-447. 1995.

Wald, H.L.; Sarakinos, G.; Layman, M.D.; Mikos, A.G.; Vacanti, J.P.; Langer, R. Cell seeding in porous transplantations devices. *Biomaterials* 14: 270. 1993.

Whang, K.; Thomas, C.H.; Healy, K.E.; Nuber, G.A. Novel methods to fabricate Bioabsorbable scaffolds. *Polymer* 36: 837-842, 1995.

Willians, D.F. (ed.). "Definitions in biomaterials", in Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials. Chester, England, Elsevier. March 3-5, 1986.