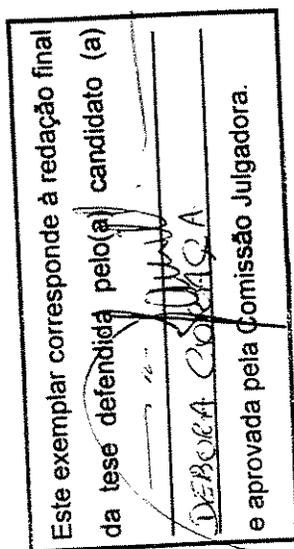


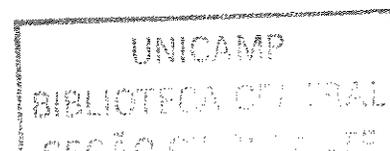
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS****Débora Cristina Coraça**

**“OSTEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE POLI(L-ÁCIDO LÁTICO)PLLA E DA BLENDAS DE POLI(L-ÁCIDO LÁTICO)PLLA/POLI(ÓXIDO DE ETILENO)PEO NA TÍBIA DE RATOS”**



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

Orientador: Prof. Dr. José Angelo Camilli



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	HUNICAMP
	C810
V	EX
TOMBO BC/	64004
PROC.	16-P-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	01/10/05
Nº CPD	

BIBID- 370669

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

**C810**      **Coraça, Débora Cristina**  
Osteointegração de implantes de Poli(L-ácido láctico)PLLA e da  
blenda de Poli(L-ácido láctico)PLLA/Poli(óxido de etileno)PEO  
na tíbia de ratos/Débora Cristina Coraça. –  
Campinas, SP:[s.n.], 2002

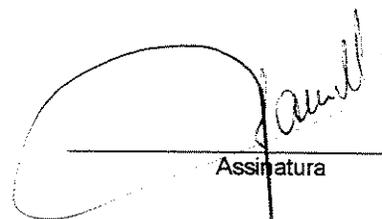
Orientador: José Angelo Camilli  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia

1. Osteointegração. 2. Polímeros. 3. Fraturas Ósseas. I. Camilli,  
José Angelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

**Data da Defesa: 08/02/2002**

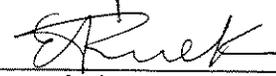
**BANCA EXAMINADORA**

Prof.Dr. José Angelo Camilli (Orientador)



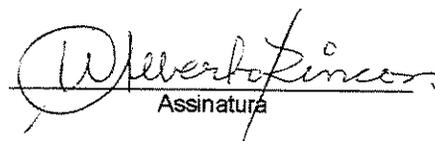
Assinatura

Profa.Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek



Assinatura

Profa.Dra. Maria do Carmo Alberto Rincon

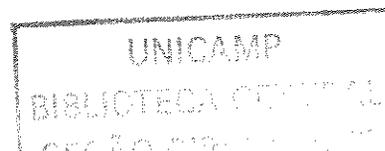


Assinatura

Profa.Dra. Ivanira José Bechara

Assinatura

200510553



## *DEDICO*

*À Nair, minha mãe e amiga  
pelo amor inesgotável.*

*e*

*Ao meu pai, Antonio, em memória,  
por estar sempre ao meu lado acompanhando  
meus passos, e me ajudando a enfrentar  
os obstáculos da vida.*

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

*A Deus, pela minha vida, minha saúde e minha coragem para enfrentar os obstáculos.*

*À minha mãe, Nair, pelo amor e compreensão durante todos os anos da minha vida.*

*Ao Edmundo, pelo amor, compreensão e paciência.*

*À todos lá de casa, Adriana, Alexandre, Tatí, Fernando, Bil e Priscilla pelo incentivo constante.*

*À família Trajano pelo interesse e incentivo.*

*Ao Prof. Dr. José Angelo Camilli pela orientação na realização deste trabalho.*

*À amiga Iara Gomes pelo incentivo e orientação dedicados mesmo a grandes distâncias.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Aparecida Duek e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita Aparecida Zoppi pela orientação com os materiais utilizados neste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Barros pela orientação acadêmica e fornecimento de materiais para a realização deste trabalho.*

## *AGRADECIMENTOS*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Alberto Rincon, à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliane Aparecida de Rezende Duek e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivanira José Bechara pelas sugestões que auxiliaram na realização deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pelas análises estatísticas.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria A. Helena Cagnon Quitete, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivanira José Bechara e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Beatriz Collares Buzato pelas orientações didáticas durante o exame de qualificação.*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia pela formação acadêmica.*

*Aos amigos Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula do Departamento de Anatomia da UNICAMP pela dedicação e auxílio nas técnicas laboratoriais.*

*À Srta Marlene Lima Francisco do Departamento de Anatomia da UNICAMP pelos cuidados dispensados aos animais utilizados neste trabalho.*

*Às Sras Sílvia Helena Burguí Kalaf, Lourdes Pinheiro e Ana Floriana Rodrigues pelo convívio, atenção e respeito dispensados.*

À todos os funcionários do Departamento de Anatomia da UNICAMP que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Lílíam Alves Senne Panagíio do Departamento de Biología Celular da UNICAMP pela atenção e respeito dispensados durante o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os amigos do Departamento de Anatomia (em especial à turma da canequinha) e Departamento de Hístologia e Embriología pelo afeto e companheirismo dedicados durante todo este tempo.

À Fapesp pela bolsa concedida viabilizando a realização deste trabalho.

*“A única derrota no nosso caminho  
é ceder às dificuldades”.*

*Autor desconhecido*

**SUMÁRIO**

Resumo.....	10
Abstract.....	11
I - INTRODUÇÃO.....	12
II - MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
II.1 – Preparação dos Corpos de Prova.....	21
II.2 – Procedimentos Cirúrgicos.....	23
II.3 – Microscopia de Luz.....	27
II.4 – Morfometria em Microscopia de Luz.....	27
II.5 – Análise Estatística.....	30
III – RESULTADOS.....	31
III.1 – Análises Morfológicas.....	32
III.1.1 – Animais Implantados com a blenda PLLA/PEO.....	32
III.1.2 – Animais Implantados com o PLLA.....	40
III.1.3 – Animais Implantados com o PVC.....	47
III.2 – Análise Quantitativa.....	55
IV – DISCUSSÃO.....	58
V – CONCLUSÕES.....	66
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## **RESUMO**

Na ocorrência de fraturas ou patologias que levam a perda de massa óssea, podem ser utilizados materiais naturais ou sintéticos para auxiliar o reparo tecidual. Materiais poliméricos vêm sendo amplamente estudados visando sua aplicação em cirurgias ortopédicas e plásticas reconstrutivas, entretanto, um homopolímero nem sempre atende as necessidades exigidas para uma determinada aplicação. Um dos caminhos para solucionar esse problema é a obtenção de blendas poliméricas tendo como objetivo um sinergismo entre as propriedades dos homopolímeros. O objetivo do presente trabalho foi estudar, de modo comparativo, a resposta tecidual óssea do PLLA e de uma blenda constituída de poli(L-ácido láctico)PLLA/poli(óxido de etileno)PEO. Para isso, pinos de PLLA e da blenda PLLA/PEO foram implantados em cavidades produzidas nas tíbias de 40 ratos da linhagem Wistar. Como controle foram utilizados implantes de poli(cloreto de vinila)PVC. Após 2,4,8 e 16 semanas os animais foram sacrificados e, amostras contendo os implantes foram processadas histologicamente para observação em microscopia de luz. Ocorreu formação de tecido ósseo envolvendo os implantes em todos os períodos. A degradação dos implantes da blenda PLLA/PEO permitiu a migração de células e crescimento de tecido ósseo para o seu interior, o que não ocorreu nos implantes de PLLA e PVC. Não foi observado acúmulo de células inflamatórias nos locais implantados, durante os períodos estudados. A blenda PLLA/PEO apresentou melhor interação com a área receptora, em relação aos outros materiais.

***ABSTRACT***

In fractures or pathologies that has as consequence bone mass loss, can be used natural or synthetic materials to help the tecidual repair. Polymeric materials have been widely studied aiming its use in orthopedics and plastics surgery. The polymeric biodegradable blends obtained by two or more kinds of polymers could present smaller degradation time than homopolymers, besides equivalent physical and mechanical properties. The PLLA is an example of homopolymers that present slow degradation rate. The purpose of this work was compared the bone tecidual response between PLLA and the poly(L-lactic acid)PLLA/poly(ethylene oxide)PEO blend. For this purpose, PLLA and PLLA/PEO pins were implanted into cavities produced in 40 Wistar rats tibiae. As control poly(vinyl chloride)PVC implants were used. After 2,4,8 and 16 weeks the animals were killed and samples with implants were histologically processed for light microscopy. It was verified bone formation around the implants in all periods studied. The degradation process of PLLA/PEO blends allowed cell migration and growth of bone tissue inside the implant, which did not occur with PLLA and PVC implants. Inflammatory cells could not be seen in implantation sites, during the experimental periods. The PLLA/PEO blends showed better osteointegration with receptor area than PLLA and PVC.

## *INTRODUÇÃO*

## ***I - INTRODUÇÃO***

Em casos de fraturas graves ou patologias com perda de massa óssea, os enxertos naturais podem ser utilizados como auxílio para imobilização, fonte de células osteogênicas e/ou moldes que permitirão o reparo. Os enxertos ósseos são classificados de acordo com a sua origem, seu local de doação e sua arquitetura histológica.

Quanto a sua origem, os enxertos podem ser *heterógenos*, quando o organismo doador é de espécie diferente do organismo receptor; enxertos *alógenos*, quando o organismo doador e o receptor são diferentes, porém da mesma espécie; e enxertos *autógenos*, quando o osso provém do mesmo organismo, apenas de local diferente. Os locais para a obtenção dos enxertos ósseos geralmente são o crânio, a crista ilíaca e as costelas. Estruturalmente, os enxertos podem ser compostos de osso compacto, osso esponjoso ou da combinação destes. Os enxertos ósseos podem ser aplicados em reconstituições de defeitos congênitos, ou no reparo de fraturas e falhas criadas após a retirada de tumores.

Mesmo sendo um importante recurso para a reconstrução de falhas ósseas, a utilização de enxertos ósseos se tornou restrita devido a complicações relacionadas à rejeição pelo organismo receptor quando o enxerto não é autógeno, e no caso de uma falha óssea com grandes proporções, a dificuldade para obtenção dos enxertos autógenos com volume suficiente de osso. (CIDARTI, M.J. et al 1994).

Com o intuito de reforçar os enxertos naturais ou até mesmo substituí-los, podem ser utilizados materiais sintéticos. A Food and Drug Administration (FDA) estima a existência de 2.700 tipos de materiais médicos, a maioria destes contendo biomateriais sintéticos como seu principal componente. Os biomateriais são definidos como qualquer substância ou combinação destas que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usada por tempo indeterminado, tendo como finalidade a inserção em sistemas fisiológicos para auxiliar

o seu funcionamento ou reparar um tecido no caso de trauma. Os biomateriais devem estar mecanicamente adaptados para exercerem suas funções. Para isso, antes de sua aplicação são submetidos a testes, como por exemplo, os de força de tensão e resistência. Além disso, os biomateriais devem ser compatíveis e inertes aos tecidos e ao organismo como um todo, comportando-se de maneira não tóxica e não destrutiva para com as células e os fluidos corporais. Nas áreas da ortopedia e odontologia existem biomateriais metálicos, cerâmicos, poliméricos e os compósitos, constituídos da combinação de dois ou mais tipos de materiais (SZYCHER, M. et al 1994).

Implantes metálicos têm sido utilizados na prática médica para a fixação de ossos e articulações. Os metais diferem em força mecânica, propriedades de superfície e compatibilidade tecidual. Como exemplo temos o titânio puro (Ti) e as ligas de titânio (Ti-6Al-4V) sendo por muito tempo considerados como bons materiais. O nitinol (Ni-Ti) vem sendo utilizado como biomaterial em várias aplicações médicas, porém, CASTLEMAN, L.S. et al (1976) e PUTTER, J.L.M. et al (1992) estudando o Ni-Ti como biomaterial, associaram algumas de suas desvantagens a uma possível toxicidade.

Em 1994, MORONI, A. et al testaram pinos de titânio recobertos por hidroxiapatita (HA) com o objetivo de comparar sua interação tecidual nestas condições. Levando em consideração que a HA apresenta capacidade de interação com o osso, os pesquisadores chegaram a conclusão que a composição se tornou um método eficiente para melhorar a interação do metal com o osso.

A utilização de materiais metálicos em cirurgias orais e maxilofaciais para fixação de fraturas, apesar de ter inicialmente proporcionado bons resultados, foi posteriormente recomendada com ressalvas devido à possibilidade de uma reabsorção óssea e conseqüente refratura, que geralmente ocorre quando o estresse de impacto que deveria estar sendo recebido pelo osso, é recebido pelo metal, tornando o osso mais fraco. Além disso, a necessidade de se

efetuar uma nova intervenção cirúrgica após o reparo da fratura traria problemas ao paciente, tanto em relação a infecções como gastos excedentes (AKESON, W.H. et al 1975).

Cerâmicas de fosfato de cálcio bioativas, como a HA vem sendo estudadas a mais de 15 anos visando sua aplicabilidade na prática médica. A HA é relativamente insolúvel e tem mostrado em experimentos, ser biocompatível, não-tóxica e capaz de se integrar com o osso. Isto ocorre porque a HA é semelhante à apatita, mineral que compõe o osso humano, podendo ser utilizada em aplicações de longo tempo (SOBALLE, R. et al 1996). No entanto, apesar de várias aplicações cirúrgicas em odontologia e cirurgia craniofacial, a HA tem sido utilizada com restrições na ortopedia. Pesquisadores relatam a migração de partículas, ausência de reabsorção ou baixa resistência mecânica como os principais inconvenientes (BARTH, E. et al 1988).

No intuito de substituir os materiais metálicos e cerâmicos, ou torná-los mais resistentes e biointegráveis, vários polímeros tem sido estudados e indicados para aplicação na área médica. A década de 70 foi marcada pela obtenção e fabricação de polímeros de alto desempenho, como as poliimidas, poliésteres e poliétersulfonas utilizados na Indústria Aeroespacial que posteriormente tornaram-se alvo do interesse das pesquisas biomédicas, devido às suas propriedades mecânicas superiores a de outros materiais e muito próximas às dos ossos. Alguns estudos utilizaram Teflon (Politetrafluoretileno-PTFE) implantado como prótese acetabular, porém reduziu-se o uso deste material devido ao desgaste e reações de rejeições teciduais às partículas liberadas (PAVANATTI, S.L. 1994).

Os polímeros são moléculas de cadeia longa que consistem em um número repetido de pequenas unidades. Dentre os grupos de polímeros, temos polímeros naturais, como a celulose, as colas naturais e borracha natural. Esses polímeros são, sem dúvida, interessantes e têm sido usados em numerosas aplicações, sendo às vezes ofuscados por uma infinidade de polímeros sintéticos, que vem sendo estudados todos os dias.

A utilização de polímeros biodegradáveis e bioabsorvíveis é uma alternativa para substituir metais em fixações de fraturas, osteotomias, artroses e lesões de ligamentos, pois durante o processo de reparo, o material mantém a fixação, e transmite o estresse recebido para o tecido. Além disso, estes materiais não precisam ser removidos cirurgicamente, reduzindo-se assim, além de custos, os traumas relacionados a cirurgias para retirada do implante (ROKKANEM, P. et al 1999). O termo “polímeros biodegradáveis” é usado para denominar polímeros insolúveis em água que em contato com os fluidos orgânicos sofrem reações químicas e são convertidos lentamente em um material solúvel em água (DUNN, R.L. 1991).

FURUKAWA, T. et al (2000) buscando obter implantes ortopédicos que apresentassem boas propriedades mecânicas e osteocondutivas, testaram compósitos de poli(L-ácido láctico)/PLLA/hidroxiapatita em fêmur de coelhos, submetendo-os a períodos experimentais de 2 a 25 semanas. Após a obtenção dos resultados, os autores afirmaram que a combinação PLLA/HA trouxe estabilidade ao material durante o reparo ósseo, devido a osteocondutividade da HA e resistência mecânica do PLLA.

Em estudo realizado por WENZ, L.M. et al (1990), compósitos de poli(éter cetona) e polissulfona, foram colocados sob forma de extrato, em contato direto com fibroblastos de ratos. Como controle, foram usadas secções de um tubo de látex ureteral e como parâmetro para avaliação da biocompatibilidade foi medida a percentagem de lactatodesidrogenase (LDH), enzima liberada quando ocorre citólise das células. Os autores concluíram que estes polímeros são biocompatíveis em experimentos *in vitro*, recomendando-os para estudos *in vivo*, especialmente em placas de osteosíntese. MAINIL-VARLET, P. et al (1997) utilizaram o poli(L-lático), poli(L/D lático) e poli(L/DL lático) sob forma de pinos implantados em tibia de ovelhas, e verificaram que após um ano da implantação, os materiais não tinham sido completamente

reabsorvidos, porém sua massa molar havia sido reduzido de 40.000-50.000 para 500-3000 g/mol.

MEIKLE, M.C., et al (1994), implantaram compostos nas concentrações de 50:50 de poli (DL-ácido lático) PDLLA/poli(ácido glicólico)PGA em calvária de coelhos sob a forma de discos nas dimensões de 5mm x 2mm, usando como controle a regeneração óssea espontânea. Os autores verificaram em análises histomorfométricas resultados estatísticos não significantes entre a regeneração óssea nos dois casos, em 1, 2 e 3 meses de experimento.

A degradação e a biocompatibilidade do poli(L-ácido lático) (PLLA) vem sendo investigada em ratos. A degradação do PLLA é lenta e sua total reabsorção não foi observada em estudos com ratos, porém, estima-se que o tempo seja cerca de 3,5 anos (BERGSMA, J.E. et al 1995).

Baseados em resultados positivos com animais iniciou-se a investigação do PLLA em humanos, onde placas e parafusos foram utilizados para fixação de fraturas no osso zigomático. Este estudo demonstrou que no período de 3,5 anos pós-implante, os pacientes retornaram a clínica apresentando inchaço no local, causado pela lenta degradação do material, porém, sem a necessidade da retirada do mesmo (BOS,R.R.M. et al 1987; BERGSMA, J. E. et al 1995).

ROKKANEN,P. et al (1999), investigaram os polímeros bioabsorvíveis poli(ácido glicólico)PGA, poli(ácido lático)PLA e o poli(dioxanona)PDS em fixações de fraturas ósseas em mais de 3.000 cirurgias desde 1985. Estes materiais foram utilizados como pinos, placas e parafusos em diferentes tipos de fraturas ósseas, em adultos e crianças, onde os autores puderam concluir que estes materiais oferecem certas vantagens sobre outros tipos de materiais e sugeriram a continuidade em sua utilização em casos clínicos.

De agosto de 1990 a junho de 1992, sete pacientes com diferentes tipos de fraturas de tálus foram operados com parafusos biodegradáveis de PLLA para fixação. Os resultados

demonstraram serem estes materiais suficientemente estáveis para a fixação de fraturas ósseas. Além disso, no decorrer do experimento nenhuma complicação foi relatada em relação ao biomaterial (KANKARE, J. et al. 1998).

Além das vantagens de ser biocompatível e proporcionar estabilidade no reparo de fraturas ósseas, os implantes de PLLA podem ser associados a drogas para sua liberação controlada, que ocorre durante sua degradação. ANDREOPOULOS, A.G. et al (2000) estudaram implantes de PLLA associados a pefroxacina em tíbias de coelhos. Os autores concluíram que o PLLA pode ser associado a drogas como modelo de sistema de liberação controlada de drogas.

As blendas poliméricas, assim denominadas por serem obtidas da mistura física de dois ou mais tipos de polímeros, vem sendo investigadas nos últimos anos, pois podem apresentar melhores propriedades físicas e mecânicas quando comparadas aos polímeros puros (PARK, T.G. et al 1992; NIJENHUIS, A.J. et al 1996). Algumas blendas incluindo um polímero sintético e um polímero biológico (por exemplo, colágeno) tem sido preparadas com a finalidade de melhorar a biocompatibilidade do primeiro (GIUSTI, P. et al 1994).

A preparação de blendas tem sido realizada com o objetivo principal de controlar a velocidade de degradação de polímeros biodegradáveis. O tempo de degradação de um material constituído de polímeros biodegradáveis para aplicações biomédicas pode variar de meses a anos, dependendo dos balanços hidrofílico/hidrofóbico e amorfo/cristalino. Estes balanços podem ser controlados em função da quantidade e do tipo de constituinte usados na preparação de uma blenda (PARK, T.G. et al 1992; PENNING, J.P. et al 1996).

ZOPPI, R.A. et al (1999), investigaram o processo de degradação e a morfologia de blendas de poli(L-ácido lático)PLLA e poli(óxido de etileno)PEO, onde o objetivo foi alterar a velocidade de degradação do PLLA. Neste trabalho, as blendas de PLLA/PEO tornaram-se porosas quando submetidas a ensaios de degradação *in vitro*. Esta formação de poros ocorreu

devido à dissolução da fração PEO que ocorre em meio líquido. A dissolução ocorreu em solução tampão fosfato pH 7,4 à 37°C simulando os líquidos tissulares de organismos vivos.

A morfologia porosa é desejável em muitas aplicações biomédicas. Em alguns casos, a matriz polimérica deve apresentar uma estrutura de poros uniforme e interconectada de modo a permitir um crescimento celular homogeneamente distribuído no dispositivo, de tal forma a promover a formação de uma rede organizada. Em estudos *in vivo*, BARROS, P.P. et al (1999), demonstraram em implantes subcutâneos de blendas de PLLA/PEO, a presença de células e fibras colágenas nos poros produzidos pela dissolução do PEO.

Tendo visto que as blendas poliméricas biodegradáveis podem auxiliar no tratamento de fraturas ósseas, o presente trabalho tem como objetivo estudar a resposta tecidual óssea frente a implantes constituídos de poli (L-ácido láctico)PLLA e implantes constituídos de poli(L-ácido láctico)PLLA/poli(óxido de etileno)PEO na composição de 50:50 em tíbias de ratos.

## *MATERIAIS E MÉTODOS*

## **II - MATERIAIS E MÉTODOS**

O protocolo experimental utilizado neste trabalho está de acordo com os padrões da American Society for Testing and Materials (ASTM F-981-93), e com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) IB-UNICAMP sob protocolo número 097-02.

Para a realização deste trabalho foram utilizados 40 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem Wistar com quatro semanas de idade.

### **II.1 – Preparação dos Corpos de Prova**

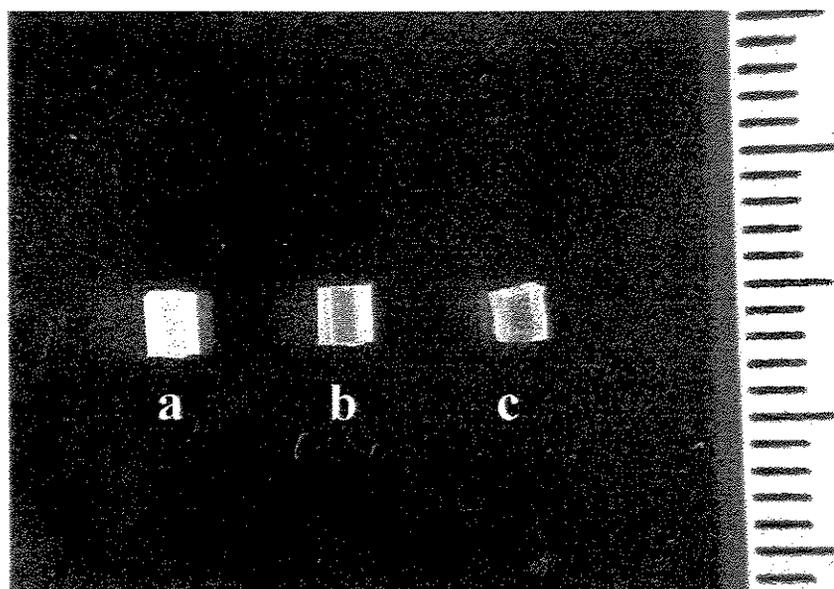
Os materiais poliméricos utilizados neste trabalho foram o poli(L-ácido láctico)PLLA, da marca Medisorb com massa molar de 300.000 gr/mol, poli(óxido de etileno)PEO, da marca Aldrich, com massa molar de 200.000 gr/mol e poli(cloreto de vinila)PVC, da marca Aldrich.

Para a preparação dos corpos de prova, sob forma de bastões, foi utilizada uma mini injetora Mini Max Molder modelo LMM-2017. Bastões de PLLA e PLLA/PEO na composição 50/50 em massa foram preparados por fusão dos polímeros a 190°C utilizando um molde com dimensões internas de 2,0 mm de diâmetro e 9,3 cm de comprimento, sendo a temperatura do molde de 120°C. Após a estabilização da temperatura, os polímeros foram misturados e aquecidos durante 1 minuto e cisalhados durante 2 minutos, seguida da injeção no molde. O molde foi resfriado durante 20 minutos a temperatura ambiente. Os bastões de 9,3 cm de comprimento foram posteriormente cortados em bastões menores de 2 mm de comprimento (Fig.1 – A e B).

Bastões de PVC foram obtidos dissolvendo-se o polímero em tetrahidrofurano (THF), obtendo-se uma solução 15% massa/volume. Após a dissolução, a solução foi transferida para

uma placa de petri e um filme foi obtido por evaporação do solvente durante 15 horas. Posteriormente o filme foi cortado sob forma de bastões, com o auxílio de um vazador no diâmetro de 2 mm (Fig.1-C).

Os procedimentos químicos envolvendo a preparação das amostras de polímeros foram realizados em colaboração com a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliana A. de Rezende Duek, pesquisadora do Departamento Engenharia de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp - Campinas.



**Figura 1-** Corpos de prova utilizados no experimento: **a-** bastão da blenda de poli(L-ácido láctico)PLLA/poli(óxido de etileno)PEO 50:50; **b-** bastão de poli(L-ácido láctico)PLLA e **c-** bastão de poli(cloreto de vinila)PVC.

## **II.2 – Procedimentos Cirúrgicos**

Depois de pesados, os animais foram submetidos à anestesia geral com uma solução 1:1 de Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) + Ketamina (Francotar), administrada por via intramuscular na dose de 1,5 mL/kg de peso corporal. Depois de convenientemente anestesiados os animais foram colocados em placa de contenção na posição decúbito dorsal.

Tendo a região medial das patas traseiras tricotomizadas, foi realizada a assepsia local. Uma incisão longitudinal na pele de aproximadamente 1 (um) cm foi realizada ao longo da borda anterior da tibia. Com o auxílio do bisturi, o tecido muscular foi seccionado e afastado até a exposição do periósteo. Exposto o periósteo, este foi rebatido até a exposição do tecido ósseo (Fig.2 – A).

Com o uso de um mini motor de baixa rotação Bethil e uma broca Carbide de 3 mm de diâmetro, foi produzida uma cavidade no terço superior da tibia. A falha foi produzida na camada cortical atingindo o canal medular, de modo a permitir a introdução do corpo de prova na forma de pino nas dimensões de 2 mm de diâmetro por 2 mm de comprimento. Este procedimento foi realizado nas duas patas de todos os animais (Fig.2–B). Durante este procedimento, a área foi continuamente irrigada com solução fisiológica para evitar o aquecimento local.

Os animais foram divididos em três grupos, da seguinte maneira:

### **GRUPO I - Animais implantados com a blenda PLLA/PEO 50:50**

20 animais receberam na tibia esquerda a blenda de poli(L-ácido láctico)PLLA/poli(óxido de etileno)PEO.

### **GRUPO II - Animais implantados com o PLLA**

20 animais receberam na tibia esquerda o poli(L-ácido láctico)PLLA.

Os animais dos dois grupos (PLLA/PEO e PLLA) receberam nas tíbias direitas o poli(cloreto de vinila)PVC, utilizado como controle.

Imediatamente após a preparação das cavidades e colocação dos corpos de prova (Fig.2-C), o periósteo foi reposicionado e o tecido muscular suturado com agulha e fio 4-0 Ethicon. Em seguida foi suturada a pele e aplicado em sua superfície solução anti-séptica. Durante o período de 24 horas pós-cirúrgicas os animais receberam analgésico dipirona diluído em água na dose de 2,5 mL/L.

Os animais permaneceram alojados em gaiolas com três animais cada, em biotério com luz e ventilação controladas, com fornecimento de ração sólida Nuvilab CR-1 marca Nuvital e água sem restrição.

Finalizado os períodos de 2, 4, 8 e 16 semanas pós-cirúrgicas, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia com solução de Hidrato de Cloral 10% na dose de 400 mg/kg. Em seguida as tíbias foram dissecadas e o segmento de cada uma delas contendo o material implantado foi removido com auxílio de um disco de carborundum.

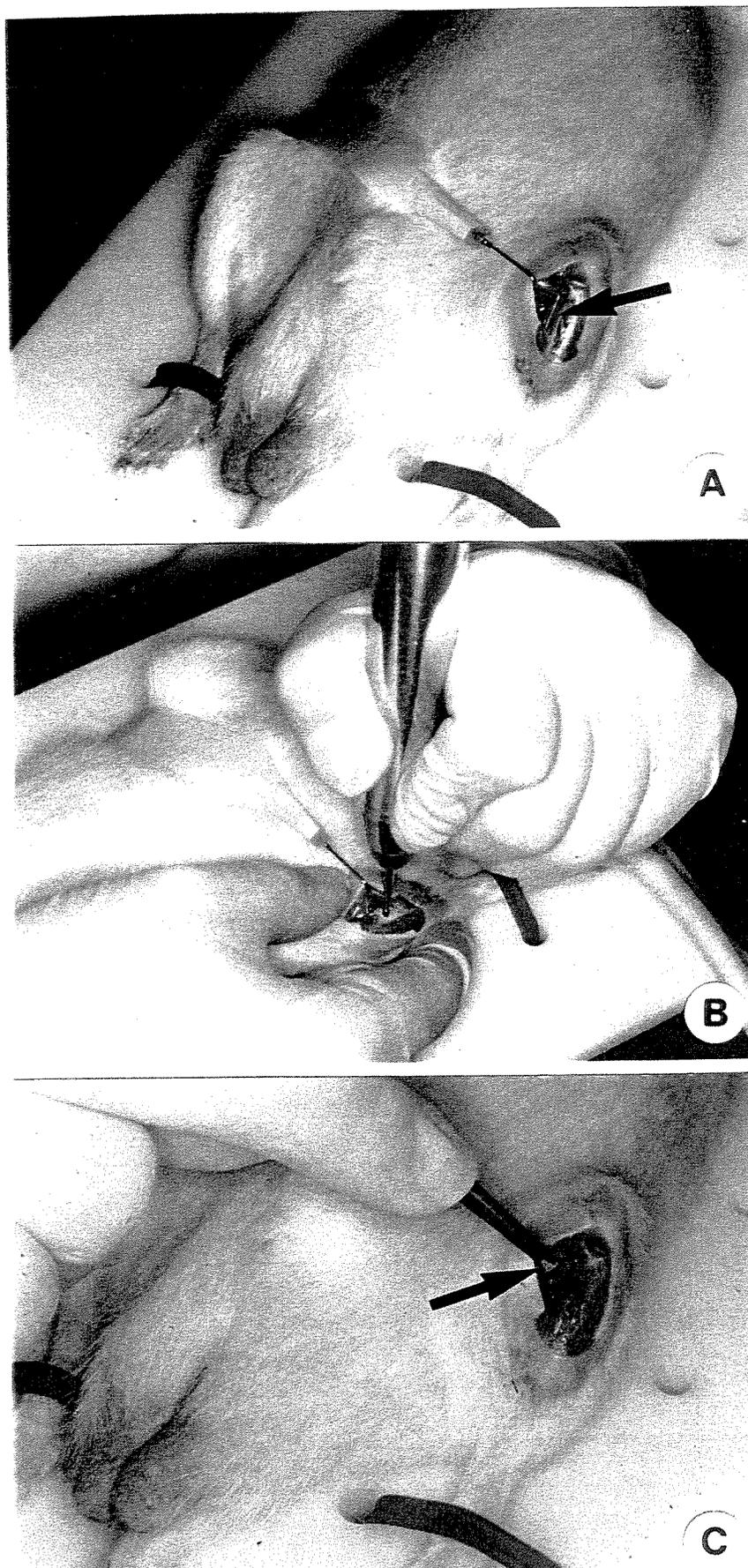
***Figura 2***

Fig. A – Animal com região medial da pata esquerda tricotomizada, mostrando incisão na pele e músculo com exposição do osso (seta).

Fig. B – Preparação da cavidade no terço superior da tíbia com mini-motor e broca acoplada, para colocação do implante.

Fig. C – Animal durante colocação do corpo de prova (seta) na cavidade produzida na tíbia

*Figura 2*



### ***II.3 - Microscopia de Luz***

Após a remoção, as amostras contendo os implantes foram imediatamente fixadas em solução de formalina a 10% em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,3, a temperatura ambiente pelo período de 48 horas, e logo em seguida imersas em solução EDTA para a descalcificação. Os materiais foram desidratados em gradiente de álcool, diafanizados em xilol e embebidos em parafina líquida a 60° para confecção dos blocos para microtomia. Foram obtidos cortes transversais das tíbias com 6µm de espessura e em seguida corados com Hematoxilina-Eosina.

### ***II.4 – Morfometria em Microscopia de Luz***

Para estudo morfométrico foram utilizados 5 (cinco) animais de cada grupo (PLLA, PLLA/PEO e PVC).

Para quantificação do volume (%) de osso neoformado ao redor dos implantes, foram realizadas mensurações através de uma ocular de 10X contendo retículo de integração quadrilátero com 100 pontos acoplado ao microscópio de marca Carl Zeiss e objetiva 10X (MANDARIM-DE-LACERDA, C.A 1999). Com esse retículo foram observados e contados os pontos localizados sobre o osso neoformado presente ao redor do implante. A fração de volume de osso neoformado foi calculada de acordo com Princípio de Delesse, utilizando a seguinte fórmula:

$$\boxed{V_v = p/P}$$

Onde:  $V_v$  = densidade de volume ou fração de volume (%)

$p$  = número de pontos do retículo presente sobre osso neoformado.

$P$  = número total de pontos do retículo.

As contagens foram realizadas através da varredura de toda a superfície do implante. Foram levadas em consideração as camadas de osso formadas na base do implante, em suas laterais e na extremidade voltada para a falha realizada na cortical.

A diferenciação do osso neoformado com osso pré-existente, principalmente próximo à região da cortical, foi feita de acordo com o aspecto do osso neoformado que adquire padrão aleatório de organização das fibras colágenas, além da diferença da morfologia dos osteócitos entre osso neoformado e maduro. A partir disso, iniciou-se as contagens com a colocação do retículo sobre uma das extremidades da falha na cortical contando as intersecções presentes sobre osso neoformado. Como este procedimento era repetido ao longo de toda a superfície do implante, uma quantidade diferente de campos (100 pontos) poderia ser utilizado em cada corte (Fig.8).

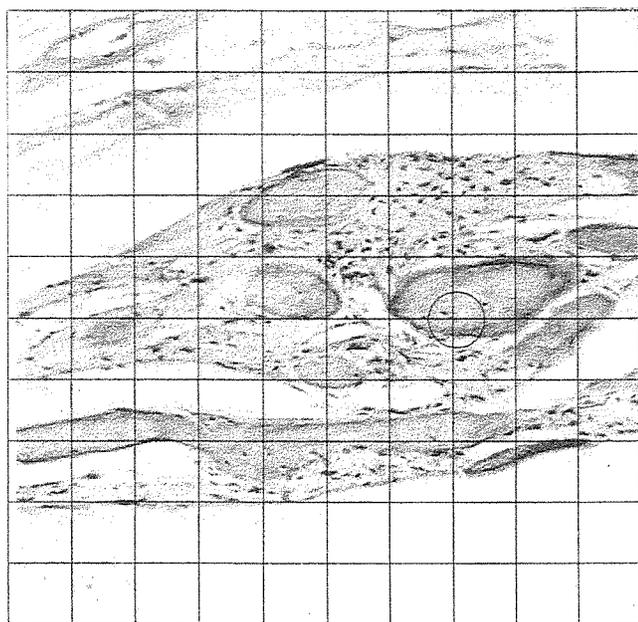
*Figura 8*

Fig. A – Modelo da utilização do retículo quadrilátero de 100 pontos. Nesta figura o retículo está esquematicamente colocado sobre um corte corado com o método HE e visualizado em microscopia de luz convencional. A área marcada com círculo é um exemplo de intersecção presente sobre osso neoformado.

***II.5 – Análises Estatísticas***

O estudo estatístico foi realizado para duas variáveis, sendo elas o tipo de material implantado (PLLA, PLLA/PEO e PVC) e o tempo de exposição do material no tecido ósseo (2, 4, 8, e 16 semanas). Para isso foi realizada a técnica de análise de variância não paramétrica, complementada com os respectivos testes de comparações múltiplas (STREINER, D.L. et al 1994). As análises dos testes estatísticos foram realizadas no nível de 5% de significância.

*RESULTADOS*

### **III - RESULTADOS**

#### **III.1 – Análise Morfológica**

##### **III.1.1 - Animais implantados com a blenda PLLA/ PEO**

Após duas semanas, em todos os animais a região lesada na cortical produzida para a colocação do implante estava preenchida por tecido conjuntivo, células indiferenciadas e componentes do infiltrado inflamatório. Em dois animais houve a formação de pequenas áreas de tecido ósseo neste local.

O implante ocupou a falha produzida na cortical e quase a totalidade do diâmetro do canal medular. Houve a formação de uma camada óssea ao redor do implante envolvendo-o ao longo de sua superfície e extremidade voltada para o canal medular. Não houve formação óssea na extremidade do implante voltada para a região da falha (Fig.1-A).

O osso formado ao redor do implante apresentava desorganização das fibras colágenas da matriz e os osteócitos nela presentes apresentavam forma arredondada, indicando ser esse osso primário.

A camada óssea existente ao redor do implante era contínua com as trabéculas existentes no interior do canal medular e com a cortical da tibia na região da falha óssea. Esta camada manteve uma espessura uniforme ao longo da superfície do implante, exceto nas regiões onde se uniu com a cortical, onde era mais espessa.

Em certas áreas ao longo desta camada havia espaços ocupados por células da medula óssea mantendo contato direto com o implante. Osteoblastos ativos puderam ser observados ao redor do osso neoformado. Na interface osso/implante houve a formação de delgada camada de células semelhantes a fibroblastos (Fig.2-A).

Em todos os animais houve a formação de fendas no interior do implante que estavam preenchidas por células fusiformes indiferenciadas e osteoblastos. Em dois animais, além destas células, foi observado tecido ósseo primário preenchendo estas fendas (Fig.1-A).

O periósteo em regeneração, presente sobre a cortical lesada era espesso e apresentava suas duas camadas, fibrosa e celular, não bem definidas. Nas outras áreas da cortical opostas a falha, o periósteo era delgado sem sinais de proliferação e com as camadas fibrosa e celular evidentes.

Quatro semanas após o implante, ainda era possível observar o local da lesão na cortical preenchido por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e componentes do infiltrado inflamatório. Em quatro animais houve a formação de tecido ósseo neste local (Fig.1-B).

Houve diminuição das proporções do implante em relação ao período anterior, entretanto, ele continuou ocupando quase todo o diâmetro do canal medular. A camada óssea formada ao seu redor estava presente ao longo de sua superfície e em contato com o osso neoformado na região da falha na cortical (Fig.1-B). O osso formado apresentou contato também com as trabéculas do canal medular. Foram observados osteoblastos em contato com esta camada (Fig.2-B).

A camada óssea ao redor do implante era mais espessa quando comparado aos animais de duas semanas. Em todos os animais, um espessamento maior foi observado próximo a cortical na região da lesão.

Havia ao longo da superfície do implante, espaços formados na camada óssea preenchidos por células fusiformes. Uma delgada camada destas células foi observada na interface osso/implante.

Em todos os animais houve a formação de fendas no interior do implante. Estas fendas estavam ocupadas por osso primário, células indiferenciadas, osteoblastos e vasos sanguíneos.

O periosteio presente sobre a cortical lesada era espesso em relação a outros locais distantes à falha, apresentando duas camadas.

Após oito semanas, a lesão produzida na cortical era difícil de ser localizada por estar totalmente preenchida por tecido ósseo. Em todos os casos houve diminuição das proporções do material implantado em relação aos outros períodos, porém, o implante ainda estava envolvido pela camada óssea ao longo de toda sua superfície e ocupando parte do canal medular (Fig.1-C).

A camada presente ao redor do implante era mais espessa quando comparada aos outros períodos, apresentando regiões de osso primário e de osso secundário, onde os feixes de fibras colágenas da matriz estavam mais organizados e os osteócitos achatados. Esta camada manteve menor contato com as trabéculas presentes no interior do canal medular, em relação aos outros períodos. Manteve contato também com a cortical nos locais próximos a região da falha óssea. Regiões de ossificação endocondral foram encontradas na região da falha na cortical.

Foi observada maior quantidade de fendas presentes no interior do implante preenchidas com tecido ósseo, em todos os animais. Além de osso, células fusiformes, osteoblastos e vasos sanguíneos estavam presentes no interior das fendas (Fig.2-C).

O periosteio existente sobre a lesão na cortical era delgado em relação aos outros períodos, sendo possível observar as duas camadas. Nas regiões opostas, o periosteio manteve-se inalterado.

Dezesseis semanas após o implante, o local da lesão na cortical estava totalmente preenchido por osso, sendo difícil de ser localizado. Áreas de ossificação endocondral foram observadas nesta região. Houve pouca diferença nas proporções do implante em relação aos animais de oito semanas.

O implante além de estar ocupando parte do canal medular, estava envolvido pela camada óssea ao longo de toda sua superfície. Esta formação óssea apresentou aspecto secundário.

A camada óssea ao redor do implante apresentou continuidade com as trabéculas presentes no interior do canal medular e com a cortical da tíbia na região da lesão.

Em dois animais, maior quantidades de fendas estavam preenchidas por tecido ósseo no interior do implante, em relação aos períodos anteriores. Além de osso, havia nas fendas células fusiformes e vasos sanguíneos (Fig.2-D). Em três animais, não foram observadas fendas ou células no interior do implante.

O periósteeo presente sobre a cortical na região da lesão era delgado em relação aos outros períodos, sendo possível observar suas duas camadas em todos os animais. Nas áreas opostas ao local da lesão, o periósteeo manteve-se inalterado.

*Figura 1*

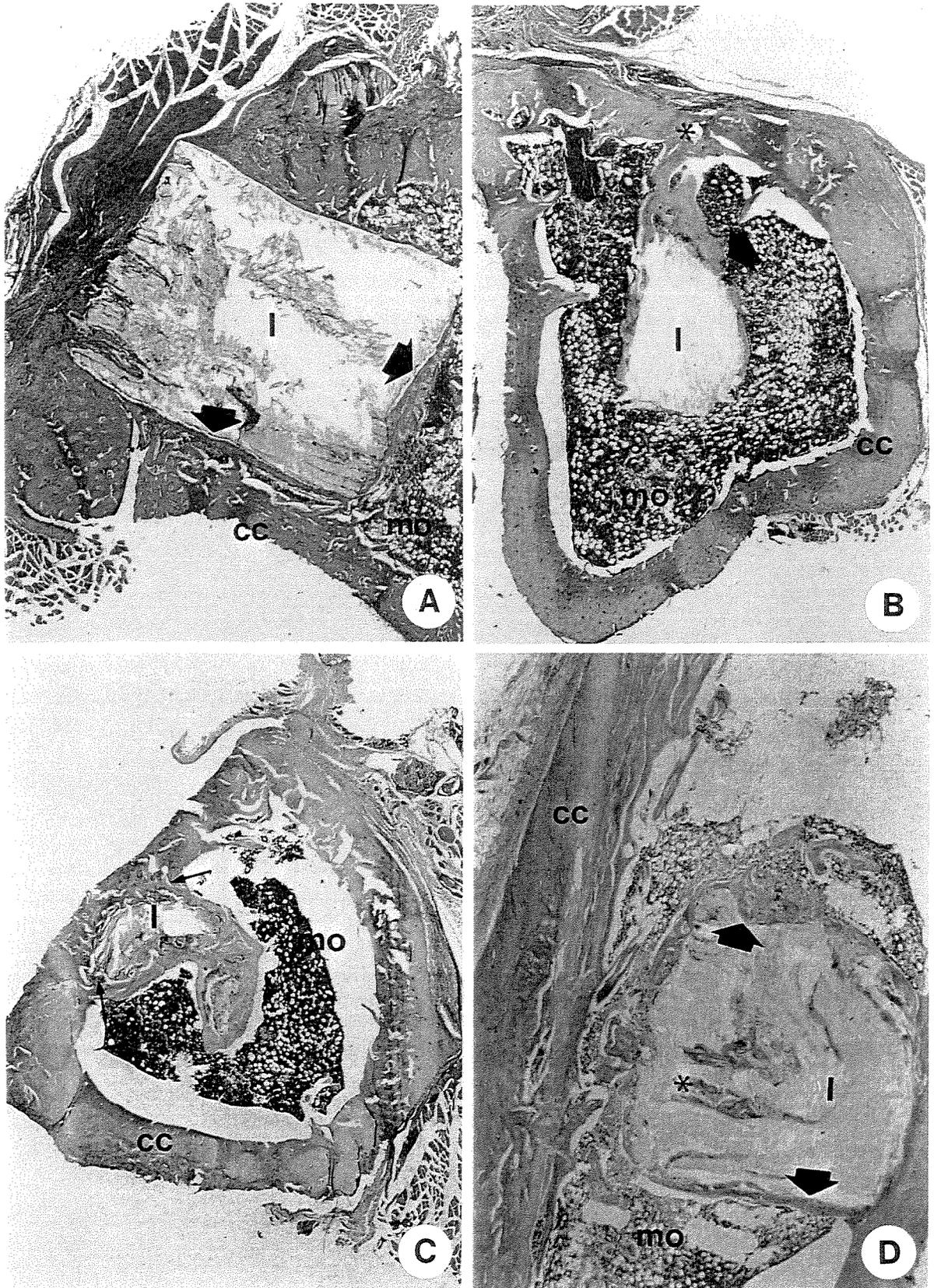
**Fig.A** - Corte transversal da tibia do rato implantado com a blenda PLLA/PEO 2 semanas pós-cirúrgicas. Podemos observar a presença do implante (I) ocupando parte do diâmetro do canal medular e envolvido por uma camada de tecido ósseo neoformado (setas). Observar a presença de fendas no interior do implante. Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 23X HE.

**Fig.B** – Corte transversal da tibia do rato implantado com a blenda PLLA/PEO 4 semanas pós-cirúrgicas. Observar o implante (I) no interior do canal medular envolvido por tecido ósseo (seta). Observar o local da falha óssea na cortical preenchido por tecido ósseo (\*). Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 23X HE.

**Fig.C** – Corte transversal da tibia do rato implantada com a blenda PLLA/PEO 8 semanas pós-cirúrgica. Observar o implante (I) no interior do canal medular envolvido por tecido ósseo e unido à camada cortical (setas). Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 23X HE.

**Fig.D** – Corte longitudinal da tibia do rato implantado com a blenda PLLA/PEO 16 semanas pós-cirúrgicas. Podemos observar o implante (I) ocupando parte do canal medular e envolvido por tecido ósseo (setas). Observar tecido ósseo no interior das fendas formadas no implante (\*). Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 23X HE.

Figura 1



*Figura 2*

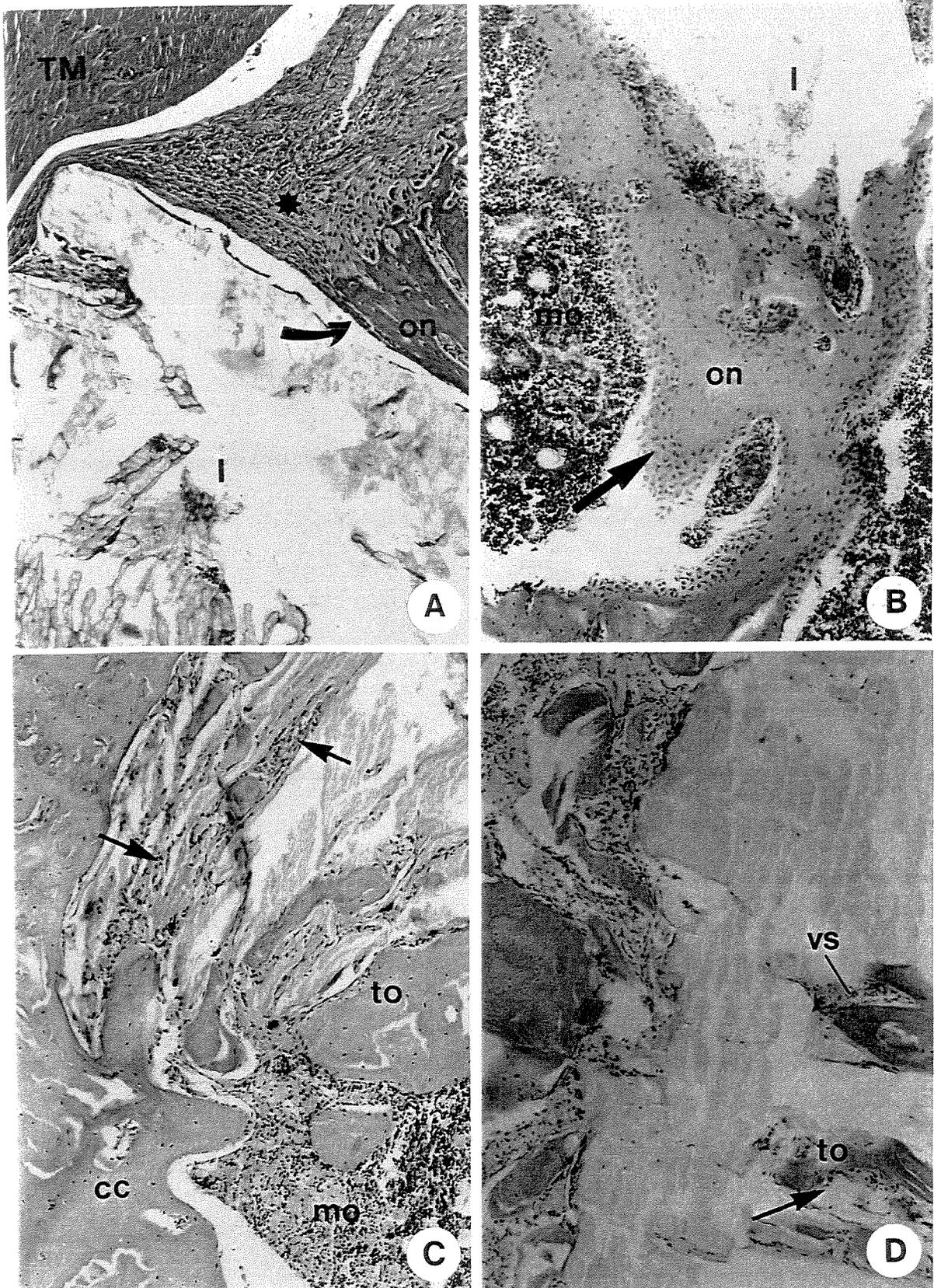
**Fig.A** – Corte transversal da tíbia do rato implantado com a blenda PLLA/PEO 2 semanas pós-cirúrgicas. Observar tecido conjuntivo no local da falha óssea (\*) e células fusiformes (seta) na interface osso neoformado (on) e implante (I). Tecido muscular (TM) 113X HE.

**Fig.B** – Corte transversal da tíbia do rato implantado com a blenda PLLA/PEO 4 semanas pós-cirúrgicas. Observar osso neoformado (on) em contato com o implante (I) em contato com as células da medula óssea (mo). Notar a presença de osteoblastos ativos na periferia deste osso (seta) 113X HE.

**Fig.C** – Corte transversal da tíbia do rato implantado com a blenda PLLA/PEO 8 semanas pós-implante. Observar tecido ósseo (to) no interior do implante além de células e vasos sanguíneos (setas). Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 113X HE.

**Fig.D** – Corte transversal da tíbia do rato implantado com a blenda PLLA/PEO 16 semanas pós-cirúrgicas. Notar a presença de tecido ósseo (to), vasos sanguíneos (vs) e células (setas) no interior do implante (I) 113X HE.

Figura 2



### ***III.1.2 - Animais implantados com o PLLA***

Após duas semanas, em todos os animais, o local da falha óssea na cortical produzida para a colocação do implante, estava preenchido por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e componentes do infiltrado inflamatório. Em três animais, houve formação de osso primário nesta região.

O implante preencheu a falha na cortical e quase todo o diâmetro do canal medular, em todos os animais. Houve formação de uma camada de tecido ósseo primário envolvendo o implante ao longo de suas superfícies laterais e extremidade voltada para o canal medular (Fig.3-A).

A camada óssea presente ao redor do implante apresentou continuidade com as trabéculas presentes no interior do canal medular e com a camada cortical, próximo a região da falha. A espessura desta camada era uniforme ao longo da superfície do implante, entretanto, um espessamento era observado nos locais onde se unia com a camada cortical, próximo a lesão.

Em certos locais ao longo da camada óssea havia regiões de descontinuidade, onde os espaços formados estavam sendo ocupados por células fusiformes, células da medula óssea e osteoblastos. Na interface osso/implante observou-se delgada camada de células fusiformes, em todos os animais (Fig.4-A). Não houve formação de fendas no interior do material implantado, o que não permitiu a migração de células ou crescimento de tecido ósseo em seu interior.

O periósteo presente na superfície da cortical, na região da lesão era espesso, apresentando duas camadas distintas. Nas áreas opostas a falha, o periósteo manteve-se inalterado, sem proliferação celular.

Após quatro semanas, a lesão na cortical estava parcialmente preenchida por tecido ósseo, além de tecido conjuntivo, osteoblastos, vasos sanguíneos e componentes do infiltrado inflamatório, em todos os animais.

Nestes animais, o implante ocupava a falha produzida na cortical e canal medular adjacente. Uma camada de tecido ósseo primário estava presente ao redor do implante ao longo de sua superfície e extremidade voltada para o canal medular (Fig.3-B). Em algumas regiões deste osso neoformado foram observadas áreas de osso secundário.

A formação óssea presente ao redor do implante era contínua com as trabéculas do canal medular e com a cortical próximo ao local da falha. A espessura desta camada óssea era uniforme ao longo da superfície do implante, se espessando somente nas regiões de contato com a cortical.

Esta camada óssea era descontínua em certos locais e os espaços nela criados estavam preenchidos por células fusiformes, osteoblastos e células da medula óssea. Na interface osso neoformado/implante foi observada delgada camada destas células, em todos os animais (Fig.4-B).

Não houve formação de fendas no interior do implante, não permitindo a migração de células ou formação de osso em seu interior. O periósteo da região da lesão na cortical era menos espesso em relação aos animais de duas semanas, com duas camadas distintas. Nas áreas da cortical opostas a lesão o periósteo era delgado.

Após oito semanas, a região da falha na cortical estava preenchida por tecido ósseo secundário e tecido conjuntivo com fibras organizadas, em todos os animais. Áreas de ossificação endocondral foram observadas nessa região.

Nestes animais, o implante ocupava a área lesada na cortical e o interior do canal medular. Uma camada de osso secundário formada ao redor do implante estava presente ao longo de sua superfície, em suas laterais e em sua extremidade voltada para o canal medular. Esta camada apresentou regiões de contato com a cortical e com as trabéculas do canal medular (Fig.3-C).

A camada óssea formada ao redor do implante mostrou-se mais espessa e mais uniforme em relação aos outros períodos. Em alguns locais desta camada, havia espaços preenchidos por

células fusiformes. Uma delgada camada destas células foi observada na interface osso neoformado/implante, em todos os animais. Houve a formação de fendas no interior do implante, somente em um animal (Fig.4-C).

O perióstio da região da lesão na cortical era espesso, com duas camadas distintas. Nas áreas opostas a lesão, o perióstio manteve-se inalterado.

Dezesseis semanas após o implante, a falha na cortical estava preenchida por tecido ósseo secundário, vasos sanguíneos e pouca quantidade de componentes do infiltrado inflamatório em relação aos outros períodos, em todos os casos. Uma camada de tecido ósseo secundário estava presente ao redor do implante, em suas laterais e extremidade voltada para o canal medular (Fig.3-D). Presença de áreas de ossificação endocondral em algumas regiões próximas a lesão da cortical.

Em dois animais, a camada óssea formada ao redor do implante era contínua com a cortical. Em três animais, a camada toda se uniu com o osso compacto da cortical, podendo ser identificada pela existência da linha cimentante.

O osso formado ao longo da superfície do implante apresentou descontinuidade em certos locais, sendo os espaços formados ocupados por células fusiformes. Na interface osso/implante estas células formaram uma delgada camada.

Em dois animais foram observadas células ocupando uma única e delgada fenda existente no implante. Em um destes animais foram observados osteoblastos e matriz óssea no interior do material (Fig.4-D). Os outros três animais não apresentaram formação de fendas nos materiais. O perióstio na região da falha apresentou-se espesso e com duas camadas distintas. Na superfície da cortical oposta a falha, o perióstio era delgado sem sinais de proliferação.

**Figura 3**

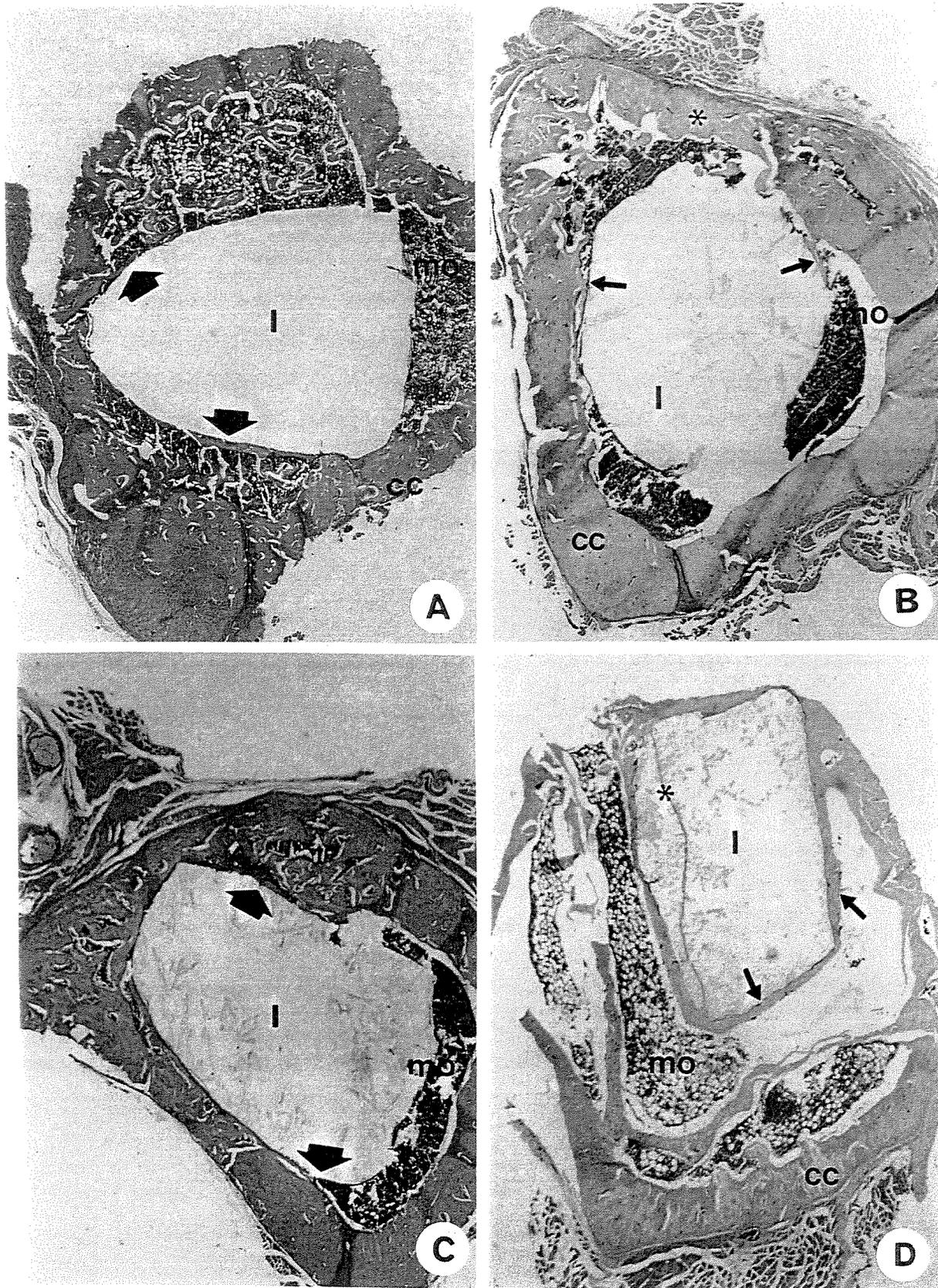
**Fig. A** – Corte transversal da tíbia do rato implantada com o PLLA 2 semanas pós-cirúrgicas. Observar o implante (I) ocupando grande parte do diâmetro do canal medular e envolvido por tecido ósseo neoformado (setas). Presença de osso no local da falha na cortical (\*). Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 23X HE.

**Fig. B-** Corte transversal da tíbia de rato implantado com o PLLA 4 semanas pós-cirúrgicas. Observar o implante (I) ocupando o interior do canal medular e envolvido por tecido ósseo (setas). Notar região da falha na cortical preenchida por tecido ósseo (\*).Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 23X HE.

**Fig. C** – Corte transversal da tíbia do rato implantado com o PLLA 8 semanas pós-cirúrgicas. Presença do implante (I) ocupando parte do canal medular e envolvido pela camada de tecido ósseo (setas). Medula óssea (mo), camada cortical (cc) 23X HE.

**Fig. D** – Corte transversal da tíbia do rato implantada com o PLLA 16 semanas pós-cirúrgicas. Observar o implante (I) no interior do canal medular envolvido pela camada de tecido ósseo (setas). Notar no interior do implante a presença de uma fenda (\*). Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 23X HE.

Figura 3



**Figura 4**

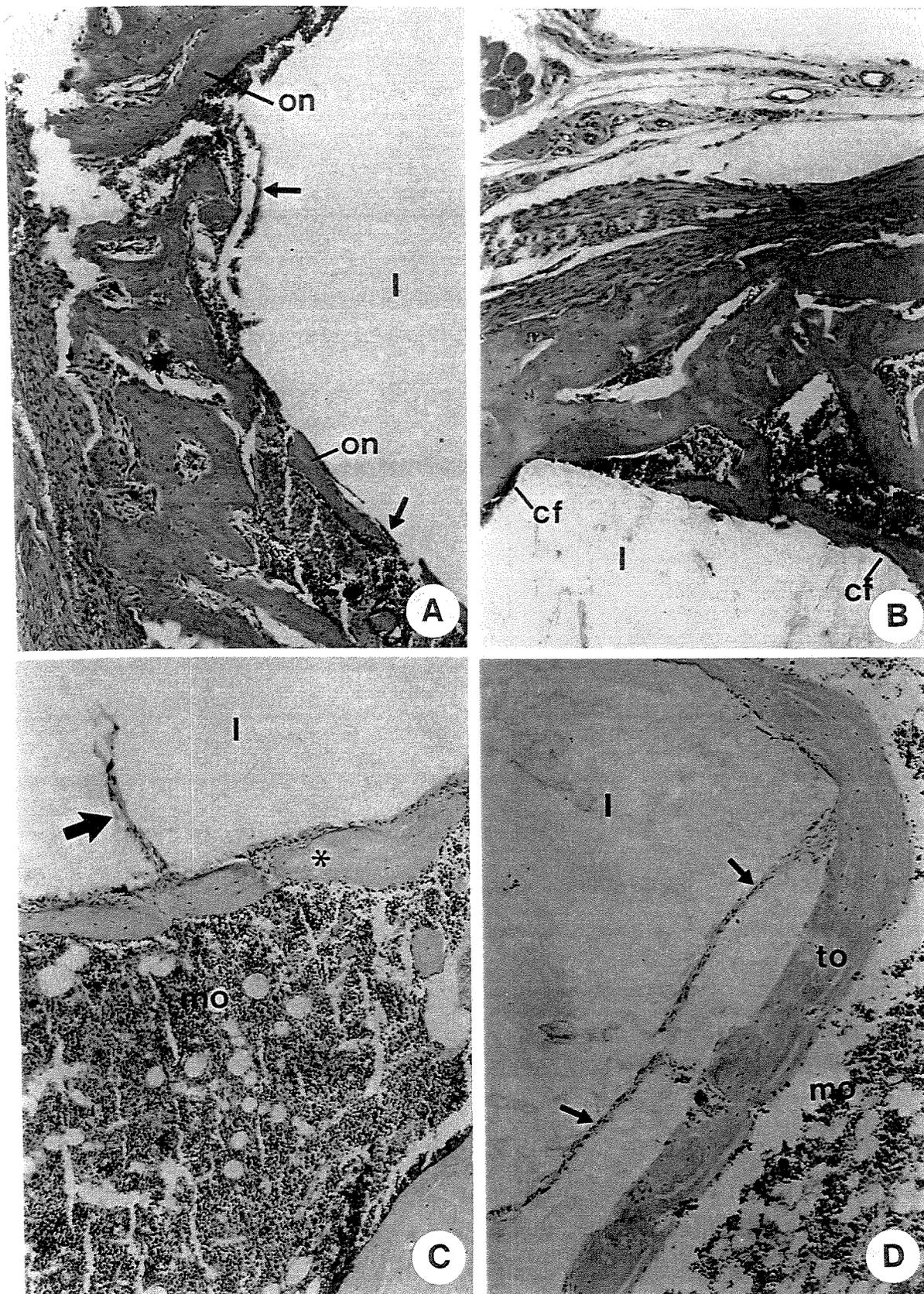
**Fig.A** – Corte transversal da tibia do rato implantado com o PLLA 2 semanas pós-cirúrgicas. Notar o implante (I) em contato com osso neoformado (on) e interposto por células fusiformes (setas). Observar a presença de vasos sanguíneos (\*) entre as trabéculas de osso neoformado 113X HE.

**Fig.B** – Corte transversal da tibia do rato implantado com o PLLA 4 semanas pós-cirúrgicas. Observar camada de tecido ósseo ao redor do implante (I) interposta por células fusiformes (cf) 113X HE.

**Fig.C** – Corte transversal da tibia do rato implantado com o PLLA 8 semanas pós-cirúrgicas. Notar camada de tecido ósseo organizado (\*) envolvendo o implante (I) e em contato com células da medula óssea (mo). Presença de uma fenda preenchida por células no interior do material implantado (seta) 113X HE.

**Fig. D** – Corte transversal da tibia do rato implantado com o PLLA 16 semanas pós-cirúrgicas. Observar camada de tecido ósseo (to) ao redor do implante (I). Notar a presença de uma fenda no interior do implante ocupada por células e capilares sanguíneos (setas). Medula óssea (mo) 113X HE.

Figura 4



### ***III.1.3 - Animais implantados com o PVC***

Duas semanas após o implante, houve áreas de formação de tecido ósseo primário na lesão produzida na cortical. Além de osso, esta região estava preenchida também por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e componentes do infiltrado inflamatório, em todos os animais (Fig.6-A). O implante ocupava a área lesada na cortical e quase a totalidade do canal medular adjacente. Envolvendo o implante, houve a formação de uma camada de tecido ósseo primário. Esta camada estava disposta ao longo da sua superfície e extremidade voltada para o canal medular (Fig.5-A).

A camada óssea presente ao redor do implante manteve contato com as trabéculas presentes no interior do canal medular e com a camada cortical na região da falha óssea. O osso formado ao redor do implante não apresentou espessura uniforme em todos os animais. Nas regiões onde esta formação óssea se uniu ao osso da cortical, próximo a região da falha, foi observado um espessamento maior.

A camada de osso formado ao longo do implante apresentou ainda, locais de descontinuidade onde os espaços criados estavam preenchidos por células fusiformes e células da medula óssea. Na interface osso neoformado/implante, estas células formaram uma delgada camada, em todos os animais (Fig.6-A). Não houve formação de fendas no implante, o que não permitiu a migração de células para o seu interior. Em um animal somente, uma ruptura existente em uma das extremidades do material permitiu o deslocamento de células e tecido ósseo primário para o seu interior. O perióstio da superfície da cortical lesada era espesso, com suas duas camadas distintas. Nas áreas opostas a região da falha, o perióstio era delgado, sem sinais de proliferação celular.

Após quatro semanas, a região da cortical onde foi produzida a falha estava preenchida por tecido ósseo primário, além de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e componentes do

infiltrado inflamatório. Este último mostrou-se menos intenso quando comparado aos animais de duas semanas.

Ao redor do implante, houve a formação de uma camada de tecido ósseo primário, em todos os animais. Esta formação óssea estava presente ao longo da superfície do implante, em suas laterais e extremidade voltada para o canal medular. Não houve formação de fendas no material implantado (Fig. 5-B).

A formação óssea presente ao redor do implante era contínua com as trabéculas do canal medular e com a camada cortical, na região da falha. A espessura desta formação óssea não era uniforme ao longo da superfície do implante, havendo a presença de espaços que estavam ocupados por células fusiformes e células da medula óssea. Na interface osso/implante estas células formavam uma delgada camada (Fig. 6-B).

O periósteo presente na superfície da cortical lesada era menos espesso em relação ao período anterior, porém, com duas camadas distintas. Nas superfícies opostas a região da lesão, o periósteo era delgado.

Oito semanas após a realização do implante, a região lesada da cortical estava preenchida por tecido ósseo secundário e áreas de ossificação endocondral. Além de osso, esta região estava preenchida por tecido conjuntivo com fibras mais organizadas em relação aos outros períodos; vasos sanguíneos e células do infiltrado inflamatório. O implante estava envolvido por uma camada de tecido ósseo primário e secundário.

Houve contato desta camada óssea com as trabéculas existentes no interior do canal medular, e com a camada cortical em várias regiões. A espessura desta camada não era uniforme ao longo de toda a superfície do implante, havendo, portanto um espessamento maior nos locais de contato com a cortical (Fig. 5-C).

A camada óssea formada ao redor do implante apresentou descontinuidade em certos pontos. Os espaços formados estavam ocupados por células fusiformes e células da medula óssea. Na interface osso neoformado/implante estas células formavam uma delgada camada, em todos os animais. Não houve formação de fendas no material (Fig.6-C). O periósteo presente na superfície da cortical lesada era mais delgado quando comparado aos animais de outros períodos, porém, suas duas camadas puderam ser observadas. Nas outras áreas da cortical, opostas a lesão, o periósteo estava delgado.

Após dezesseis semanas a região da cortical onde foi produzida a lesão estava preenchida por tecido ósseo secundário, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e componentes do infiltrado inflamatório. Áreas de ossificação endocondral ainda podiam ser observadas nesta região.

O implante ocupava quase a totalidade do diâmetro do canal medular. Ao seu redor houve a formação de uma camada de tecido ósseo secundário envolvendo-o ao longo de sua superfície, em suas laterais e extremidade voltada para o canal medular (Fig.5-D).

A camada presente ao redor do implante era contínua com a cortical da tibia em várias regiões além do local da falha, e com as trabéculas presentes no canal medular. Em três animais esta camada se uniu com o osso compacto de toda a cortical, podendo ser distinguida devido a presença da linha cimentante.

A camada de osso presente ao redor do implante apresentou ainda, descontinuidade em certos locais, estando estes espaços formados ocupados por células da medula óssea e células fusiformes. Na interface osso neoformado/implante estas células formaram uma fina camada, em todos os animais. Não houve formação de fendas e migração de células ou tecido ósseo para o interior do implante (Fig.6-D). O periósteo presente na superfície da cortical, próximo ao local da lesão era menos espesso quando comparado aos outros períodos, sendo possível observar suas

duas camadas. Nas áreas opostas a lesão, o perióstio era delgado sem sinais de proliferação celular.

**Figura 5**

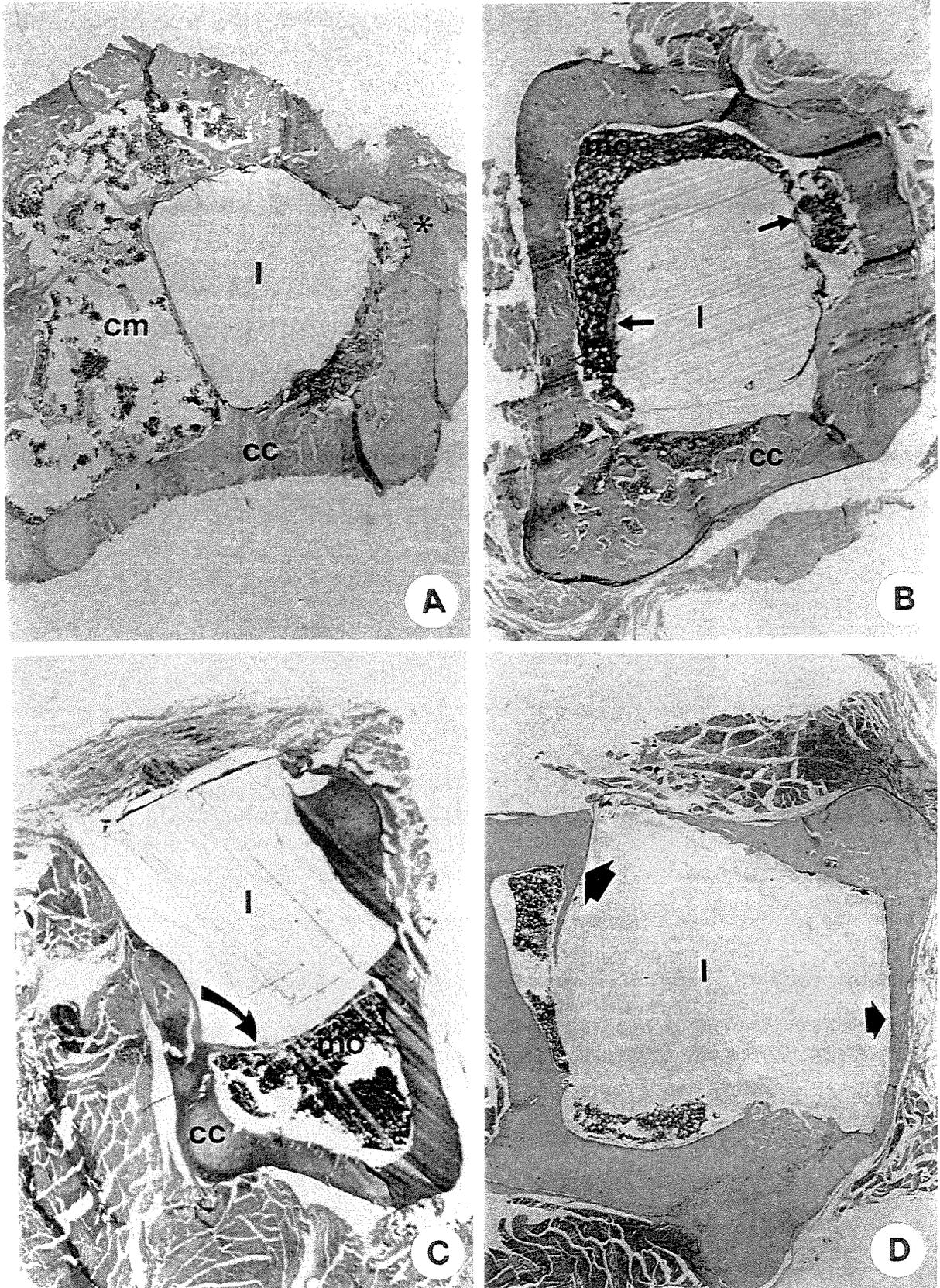
**Fig. A** – Corte transversal da tibia do rato implantado com PVC 2 semanas pós-cirúrgicas. Observar o implante (I) ocupando parte do canal medular (cm). Notar região da falha óssea na cortical preenchida por tecido conjuntivo (\*). Camada cortical (cc) 23X HE.

**Fig. B** – Corte transversal da tibia do rato implantado com PVC 4 semanas pós-cirúrgicas. Notar o implante (I) no interior do canal medular envolvido por tecido ósseo (setas). Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 23X HE.

**Fig. C** – Corte transversal da tibia do rato implantado com PVC 8 semanas pós-cirúrgicas. Notar o implante (I) envolvido pela camada óssea (seta). Medula óssea (mo); camada cortical (cc) 23X HE.

**Fig. D** – Corte transversal da tibia do rato implantado com PVC 16 semanas pós-cirúrgicas. Notar que o implante (I) ocupou quase a totalidade do diâmetro do canal medular. Observar a camada óssea presente ao redor do implante unida com a camada cortical em algumas regiões (setas) 23X HE.

Figura 5



**Figura 6**

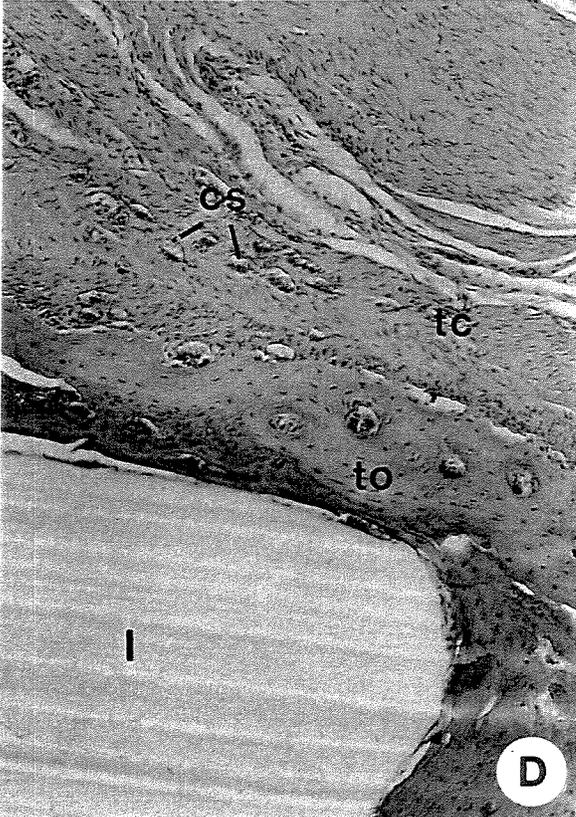
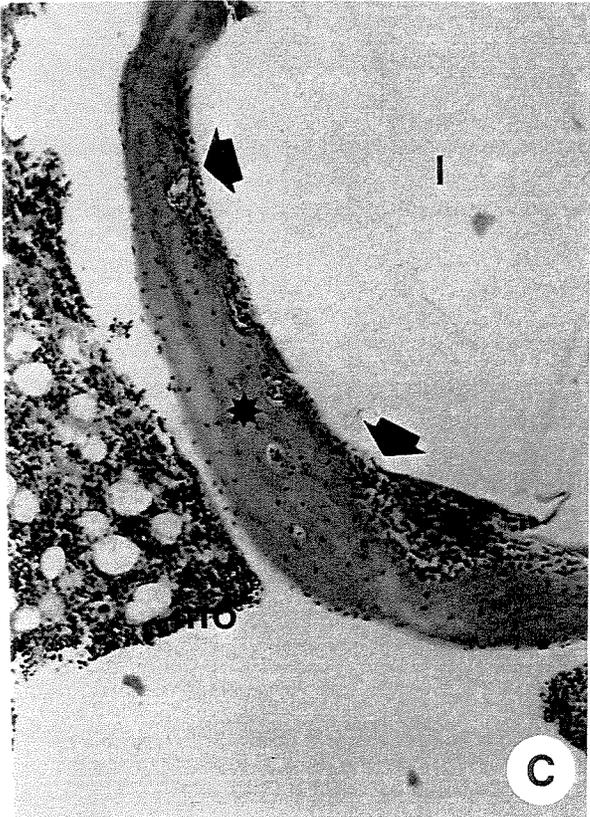
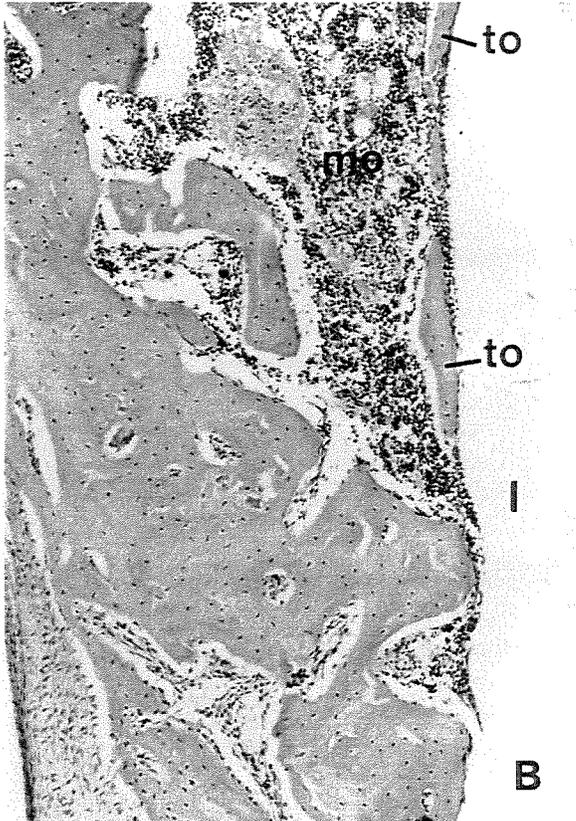
**Fig. A** – Corte transversal da tíbia do rato implantada com PVC 2 semanas pós-cirúrgicas. Notar no local da falha na cortical a presença de tecido conjuntivo (\*) e tecido ósseo neoformado (to) em contato com o implante (I) 113X HE.

**Fig. B** – Corte transversal da tíbia do rato implantado com PVC 4 semanas pós-cirúrgicas. Presença de tecido ósseo (to) em contato com o implante (I), além de células da medula óssea (mo) 113X HE.

**Fig. C** – Corte transversal da tíbia do rato implantado com PVC 8 semanas pós-cirúrgicas. Notar nesta figura, parte da camada de tecido ósseo (\*) formada ao redor do implante (I) interposta por camada de células (setas). Medula óssea (mo) 113X HE.

**Fig. D** – Corte transversal da tíbia do rato implantado com PVC 16 semanas pós-cirúrgicas. Notar tecido ósseo (to) organizado ao redor do implante (I). Adjacente a camada cortical notamos a presença de tecido conjuntivo (tc) rico em capilares sanguíneos (cs) 113X HE.

Figura 6



### **III.2-Análise Quantitativa**

A tabela 1 sumariza as médias dos valores encontrados para o volume de osso neoformado junto aos implantes da blenda PLLA/PEO, PLLA e PVC. Desta maneira, observamos que os volumes de osso neoformado nos animais implantados com a blenda PLLA/PEO sacrificados com 2,4,8 e 16 semanas foram 9,11%, 9,91%, 19,40% e 20%, respectivamente. Nos animais implantados com o PLLA os valores encontrados foram de 7,38%, 10,03%, 13,88% e 13,20%, respectivamente aos períodos experimentais de 2,4,8 e 16 semanas pós-implante. Nos animais implantados com o PVC, os valores encontrados foram de 10,93%,5,55%,12,05% e 15,55%, referentes aos mesmos períodos dos grupos anteriores.

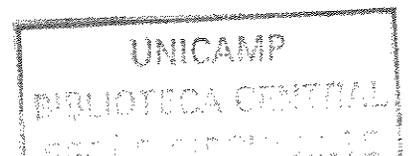
Com relação aos animais implantados com a blenda PLLA/PEO os valores encontrados 2 e 4 semanas pós-implante não tiveram diferenças significativas entre si. Entretanto com 8 semanas o aumento de volume ósseo encontrado foi significativo quando comparado à 2 e 4 semanas. Quando comparado ao valor encontrado nos animais sacrificados com 16 semanas, o volume de osso formado na 8ª semana foi equivalente. O gráfico 1 demonstrou aumento constante no volume ósseo neoformado junto à blenda PLLA/PEO, onde se pôde notar o aumento do volume da quarta à oitava semana.

Nos animais implantados com PLLA ocorreu constante aumento do volume ósseo durante os períodos experimentais. Os valores encontrados na 2ª e 4ª semana foram equivalentes, ocorrendo diferença significativa apenas a partir da 8ª semana. Os valores encontrados 16 semanas pós-implante são equivalentes aos encontrados na 8ª semana.

Nos implantes de PVC, os valores encontrados para volume de osso neoformado sofreram pequenas variações no decorrer dos períodos experimentais. De acordo com o gráfico 1, de 2 à 4 semanas ocorreu aparente decréscimo do volume, no entanto, os valores foram estatisticamente

equivalentes entre si. O volume voltou a aumentar a partir da 8ª semana pós-implante, se mantendo até a 16ª semana. Os valores de volume ósseo encontrado na 8ª e 16ª semanas foram parcialmente equivalentes entre si (tabela 1).

Quando comparamos os diferentes materiais em cada período experimental, observamos que, após 2 e 4 semanas os valores de osso neoformado foram equivalentes para PLLA/PEO, PLLA e PVC. Já após 8 e 16 semanas ocorreu aumento significativo do volume de osso neoformado junto à blenda PLLA/PEO em relação ao PLLA e PVC ( tabela 1).



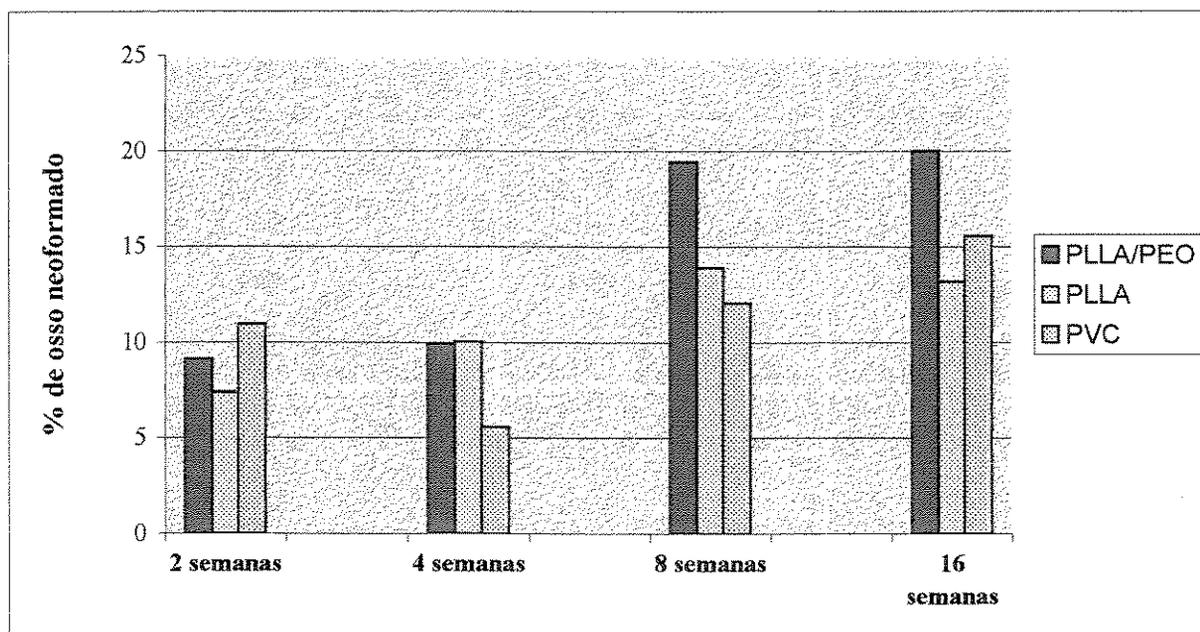
**Tabela 1** – Mediana, semi-amplitude interqualitativa e valores mínimo e máximo da porcentagem de osso formado e respectivo resultado do teste estatístico da comparação dos materiais e tempo de exposição.

Material	Períodos Experimentais (semanas)				Resultado Teste Estatístico
	2	4	8	16	
PLLA/PEO	9,11±2,56aA (7,00;12,11)	9,91±1,79aA (7,25;10,82)	19,40±4,88bB (16,84;26,59)	20,00±5,23bB (12,76;23,22)	12,33 (P< 0,01)
PLLA	7,38±2,19aA (5,38;9,76)	10,03±1,94aA (6,36;10,24)	13,88±3,50aB (12,41;19,41)	13,20±1,45aB (10,89;13,78)	13,23 (P<0,01)
PVC	10,93±1,36 aA (10,06;12,78)	5,55±2,91aA (4,60;10,41)	12,05±3,33aBC (8,22;14,87)	15,55±2,63aC (13,63;18,88)	11,50 (P<0,01)
<b>Resultado do Teste Estatístico</b>	4,22 (P>0,05)	1,58 (P>0,05)	7,22 (P<0,05)	5,99 (P<0,05)	

Obs: As letras maiúsculas indicam a comparação de cada material, nos diferentes períodos experimentais; as letras minúsculas indicam a comparação entre os diferentes materiais tendo fixado os períodos experimentais.

mediana ± semi-amplitude  
(v. mínimo; v. máximo)

**Gráfico 1** – Volume (%) de osso neoformado ao redor dos implantes de PLLA/PEO, PLLA e PVC.



*DISCUSSÃO*

#### ***IV - DISCUSSÃO***

A neoformação óssea ao redor de implantes ósseos tem sido alvo de interesse de pesquisadores que realizam testes de biocompatibilidade de materiais. Em vários trabalhos, os autores avaliaram esta camada levando em consideração aspectos relacionados a sua origem, maturação, contato com o implante e existência de tecido mole em sua interface com o implante (NORDSTRÖM,P.et al 1988,OHASHI,H.et al 2000). MAINIL-VARLET,P. et al (1997) e NORDSTRÖM,P. et al (1998) encontraram neoformação óssea junto a implantes ósseos de poli(L-ácido láctico)PLLA, poli(L/D-ácido láctico)PLDLA, poli(L/DL-ácido láctico)PLDLLA e poli(ácido glicólico)PGA em seus experimentos. Segundo os autores, esta formação é uma resposta do tecido após a implantação, resultado da ativação de células osteogênicas desencadeada pela lesão na cortical e nas trabéculas ósseas.

Nossos achados histológicos revelaram a formação de tecido ósseo envolvendo os implantes de PLLA, PLLA/PEO e PVC. De acordo com TAKESHITA, F. et al (1997), o osso formado ao redor de implantes colocados no interior do osso, tem sua origem a partir das células osteogênicas presentes no perióstio e endóstio, estimuladas durante a produção da falha óssea para a colocação do implante. Durante a produção das cavidades na tíbia de nossos animais o perióstio foi rebatido e, após a colocação dos implantes, reposicionado em seu local original, o que contribuiu para a ativação das células osteogênicas presentes no perióstio. Este mecanismo é semelhante ao que ocorre na formação de calos ósseos externos e internos, freqüentes no reparo de fraturas ósseas.

TAKESHITA,F. et al (1997) observou em implantes ósseos de titânio (Ti) e de algumas ligas metálicas (AO-Ti,Ti-6Al-4v,Ni-Ti), que o osso presente ao redor do implante era contínuo com a cortical na região da falha e com as trabéculas no interior do canal medular. Esta continuidade entre osso neoformado, cortical e trabéculas também esteve presente em nossos

achados, podendo estar relacionada com a origem da camada óssea formada ao redor do implante. Assim como já discutido, o procedimento realizado para a colocação do implante contribuiu para a ativação de células osteogênicas do endósteo e periósteo. Uma vez ativadas, estas células invadiram os espaços presentes entre o implante, as trabéculas no interior do canal medular e a cortical da tibia, produzindo matriz óssea neste local. Este fato explica a continuidade existente entre a cortical e as trabéculas com o osso neoformado ao redor do implante.

Ao longo dos períodos experimentais, ocorreu maturação do osso presente ao redor dos implantes de PLLA, PLLA/PEO e PVC. Na quarta semana pós-implante foi possível observar no osso neoformado, áreas com osso secundário. Esta maturação tornou-se mais evidente na oitava e décima sexta semana pós-implante. Este processo de maturação foi observado também por MAINIL-VARLET,P. et al (1997) em pinos colocados em tíbias de ovelhas. Neste experimento os autores observaram que o osso presente ao redor do implante estava diferenciado em osso lamelar após doze semanas de implantação. A presença de osso jovem e maduro na camada óssea neoformada ao redor do implante se deve ao processo de remodelagem do osso. A remodelagem óssea é um fenômeno que ocorre em todos os ossos, sendo contínua durante toda a vida em resposta a estímulos aos quais são submetidos normalmente.

Células fusiformes semelhantes a fibroblastos foram encontradas na interface do implante com o osso neoformado nos animais implantados com PLLA e PVC a partir da segunda semana pós-implante. Estas células formaram uma camada única que esteve presente ao longo de todo período experimental, o que inibiu o contato direto do osso com o implante. Uma fina camada de células fusiformes na interface osso/implante também foi observada por MAINIL-VARLET,P. et al (1997) em implantes ósseos de PLLA e PLDLA. Neste trabalho, uma delgada camada celular esteve presente após o período de um ano nos implantes de PLLA e, durante o período de três a seis meses pós-cirúrgicos nos implantes de PLDLA. Segundo os autores, variações da resposta

tecidual relacionadas a ausência ou presença de tecido fibroso na interface ou espessura desta camada, podem resultar de diferentes características dos implantes. Implantes que apresentam superfície lisa, por exemplo, tendem a formar camadas fibrosas menos espessas quando comparadas a implantes que apresentam microporos em sua superfície.

A persistência da camada fibrosa nos implantes de PLLA e PVC em nosso trabalho pode ter ocorrido devido à qualidade de suas superfícies. Apesar do PLLA e PVC apresentarem superfície lisa no início dos períodos experimentais, com o decorrer do tempo pode ter ocorrido degradação superficial destes materiais. Esta degradação pode ter tornado a superfície do implante irregular, o que pôde ter contribuído para a formação desta camada. Outro fato que pode explicar a formação da camada está no procedimento realizado para a colocação do material no osso. Como a broca utilizada era de 3,0 mm de diâmetro, as cavidades produzidas nas tíbias apresentaram diâmetro um pouco maior em relação aos pinos, que eram de 2,0 mm de diâmetro. Sendo assim, o posicionamento dos pinos pode ter contribuído para esta resposta tecidual (ANDRADE, J.C.T. 1997).

Nos animais implantados com a blenda PLLA/PEO, também houve a formação de uma única camada de células interpondo osso neoformado e superfície externa do implante, durante todos os períodos experimentais, semelhante ao ocorrido nos implantes de PLLA e PVC. Foi possível observar também, células indiferenciadas e células semelhantes a fibroblastos no interior do implante junto ao osso ali formado. Estas células dispunham-se aleatoriamente nos espaços formados no interior do implante, entretanto, não formaram camadas distintas como observado externamente ao implante. Sendo assim, a presença destas células indiferenciadas não impedia o contato direto do osso com a blenda PLLA/PEO.

Com relação à quantidade de osso neoformado junto aos implantes, podemos afirmar que houve variações em relação aos diferentes materiais implantados. O volume de osso formado até

a quarta semana pós-implante foi equivalente nos implantes de PLLA, PLLA/PEO e PVC. Entretanto, a partir da oitava semana houve um aumento significativo do volume ósseo nos implantes da blenda PLLA/PEO em relação ao PLLA e ao PVC. Esta diferença esteve presente até o término do período experimental. As variações de volume ósseo ocorridas com os diferentes materiais podem estar associadas ao tempo de degradação dos implantes. Os implantes da blenda de PLLA/PEO degradaram-se em uma velocidade maior em relação aos implantes de PLLA e PVC. Sendo assim, com a redução do tamanho dos implantes de PLLA/PEO, o espaço antes ocupado pelo material, foi gradativamente preenchido por osso formado a partir de células osteogênicas do osso pré-existente ao seu redor. Com isso, a camada presente ao redor do implante da blenda espessou-se, fazendo com que seu volume fosse maior em relação aos outros materiais.

A explicação para a maior velocidade de degradação da blenda PLLA/PEO está na fração de PEO presente no implante. O PEO é um polímero que, quando em contato com líquidos tissulares dissolve-se rapidamente. Entretanto, para que esta dissolução seja significativa a ponto de proporcionar uma porosidade adequada à blenda, as proporções dos polímeros envolvidos em sua constituição têm que ser levadas em consideração.

A concentração da blenda PLLA/PEO 50:50 em nosso trabalho foi adequada para que ocorresse melhor interação com o tecido ósseo em relação ao PLLA puro. Na literatura, trabalhos realizados com blendas poliméricas afirmam ser esta concentração indicada para várias aplicações. Como exemplo, MEIKLE, M.C. et al (1994) estudaram blendas de poli(DL-ácido lático)/poli(ácido glicólico) na composição de 50:50 associada à fatores de crescimento ósseo (BMP) no reparo de calvária de coelhos. Neste trabalho, os autores concluíram que a blenda nesta concentração permitiu o reparo ósseo e sua forma de degradação contribuiu para a liberação da BMP que também auxiliou no reparo.

Ao contrário do observado na blenda PLLA/PEO, os implantes de PLLA e PVC por estarem em sua forma pura, não formaram espaços suficientes para permitir a formação de osso em seu interior. O PLLA é um polímero que se degrada lentamente, o que não compromete sua biocompatibilidade. Este fato foi comprovado por BERGSMA, J.E. et al (1995) em implantes de PLLA em humanos. Os autores aplicaram PLLA na forma de placas e parafusos em seus pacientes com fraturas de zigomático, os quais retornaram ao hospital após 3 a 6 anos queixando-se de inchaço local. Biópsias destes pacientes demonstraram a existência de estruturas semelhantes a cristais no interior de várias células e fragmentos de PLLA envolvidos por cápsula fibrosa. A partir destes resultados os autores concluíram que características estruturais do PLLA, como a cristalinidade e peso molecular seriam responsáveis por esta resposta tecidual. Além disso, a presença do inchaço pôde estar relacionada à formação de cristais e sua longa permanência no local implantado.

Estudando a biocompatibilidade de implantes de PLLA e PGA (poli ácido glicólico) em fêmur de ratos, NÖRDSTROM, P. et al (1998) observaram que durante os períodos experimentais de uma a cinquenta e duas semanas, os implantes de PLLA não apresentaram significantes sinais de degradação em comparação ao PGA. Neste experimento, os autores observaram que ao final dos períodos experimentais o PLLA apresentou as mesmas proporções em relação aos implantes dos primeiros períodos. Apesar disto, os autores concluíram ser tanto o PLLA quanto o PGA biocompatíveis, devido à ausência de infiltrado inflamatório ou outras reações teciduais no decorrer dos períodos experimentais. Em nossos implantes de PLLA, não ocorreu degradação suficiente para notarmos diferenças quanto às proporções do material ao longo do tempo de implantação, no entanto, não foram observadas células de infiltrado inflamatório junto ao material. De acordo com NÖRDSTROM, P, seria de interesse prosseguir os

experimentos com este material, levando em consideração as reações teciduais de implantes de PLLA com longo tempo de duração.

Os implantes de PVC utilizados em nosso trabalho, não apresentaram evidências de degradação. O PVC, ao contrário dos implantes de PLLA, não é indicado como material bioabsorvível em aplicações clínicas. Sua aplicação na área médica está relacionada com dispositivos de uso externo como catéteres de infusão, bolsas de sangue, entre outros materiais plásticos. A razão do uso do PVC em nosso trabalho foi com a proposta de utilizá-lo como um controle positivo. Em 1994, o PVC foi citado por PAVANATTI,S.L como um material supostamente não biocompatível. Neste trabalho, o autor realizou implantes musculares de PES (poli éter sulfona) e UHMWPE (polietileno de ultra alto peso molecular) em ratos, a fim de estudar a biocompatibilidade destes materiais. Neste experimento, o autor submeteu os animais aos períodos experimentais de até 52 semanas. Segundo o autor, houve predomínio de células de infiltrado inflamatório e tecido fibroso junto ao PVC tornando o material menos estável em relação aos outros materiais.

Entretanto, PAVANATTI,S.L. (1994) não afirmou ser o PVC um material não biocompatível, e sim, conclui que a maior incidência de células inflamatórias e tecido fibroso, torna o PVC inadequado para aplicação em implantes com intuito de reparo tecidual. Em nossos animais implantados com o PVC, durante todos os períodos experimentais, não foram observadas respostas teciduais que demonstrassem toxicidade do PVC, como intensa proliferação de células do infiltrado inflamatório ou grande quantidade de tecido fibroso ao redor do implante. Podemos afirmar que, quando implantado em tecido ósseo e nos períodos experimentais por nós avaliados, o PVC se comportou como um material inerte. Devido a este comportamento, podemos afirmar que o PVC não é um material ideal para ser utilizado como controle positivo em implantes ósseos.

A partir das respostas obtidas com o PLLA e com a blenda PLLA/PEO em nosso trabalho, acreditamos ser importante a continuidade das pesquisas com estes materiais. A utilização de implantes ósseos constituídos de PLLA vem sendo feita em humanos com resultados satisfatórios no que diz respeito à reestabilização do osso após fraturas simples e múltiplas, assim como no preenchimento de cavidades ósseas realizadas para retirada de tumores (BERGSMA, J.F. et al 1995, ROKKANEN, P. et al 1999). Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que demonstram a aplicação clínica da blenda PLLA/PEO. As blendas poliméricas de maneira geral apresentam vantagens relacionadas à melhor interação ao tecido hospedeiro, fato este comprovado nos implantes da blenda PLLA/PEO realizado em nosso trabalho. A capacidade de degradar-se formando espaços em seu interior, vista nos implantes de PLLA/PEO, além de promover a interação com o tecido hospedeiro independentemente do tipo tecidual, pode oferecer outras alternativas a serem estudadas. Um exemplo é sua associação à drogas antibióticas para o tratamento de infecções ósseas (NIE, L. et al 1998, MATER, J.T. et al 1999 e SOLBERG, B.D. et al 1999), ou até mesmo sua associação à proteínas osteoindutoras, como as BMP's (Bone Morphogenetic Protein). Implantes biodegradáveis associados a BMP podem ser utilizados no tratamento de fraturas ósseas como substituto efetivo para enxertos ósseos (HOLLINGER, J.O. et al 1998, HECKMAN, J.D. et al 1999 e JEPPSSON, C. et al 1999).

*CONCLUSÕES*

## V - CONCLUSÕES

- O osso presente ao redor dos implantes teve sua origem a partir das células osteogênicas do endóstio e perióstio, que foram estimuladas durante a produção da falha óssea para colocação do implante.
- A quantidade de osso formada junto a blenda PLLA/PEO foi maior em relação aos implantes de PLLA e PVC. Isso se deve a rápida dissolução do PEO que resultou na formação de espaços na blenda PLLA/PEO. Esse fato permitiu o crescimento de osso para o interior do implante.
- A proporção de 50:50 da blenda PLLA/PEO foi suficiente para permitir o crescimento de tecido ósseo para o seu interior.
- Não houve degradação aparente dos implantes de PLLA e PVC durante os períodos experimentais estudados.
- Ocorreu formação de uma camada de células fusiformes na interface osso neoformado/implante na blenda PLLA/PEO, PLLA e PVC, durante todos os períodos experimentais, o que não permitiu o contato direto do osso com os implantes.

- Não houve a presença significativa de células do infiltrado inflamatório junto aos implantes de PLLA/PEO, PLLA e PVC durante todo o período experimental.
- Nos períodos experimentais avaliados, o PVC se comportou como um material inerte, não servindo, portanto de modelo para o controle positivo de toxicidade em implantes ósseos.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

**VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANDREOPOULOS, A.G., HATZLE, C., DOXASTAKIS, M. Controlled release systems based on poly(lactic acid). An in vitro and in vivo study. *J.Mater.Sci: Mater in Medicine*, 11, 393-397. 1999.

ANDRADE, J.C.T. *Osteointegração de corpos cerâmicos densos e porosos de hidroxiapatita em cavidades produzidas no fêmur do rato*. Campinas: UNICAMP, 1997. 70p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

AKESON, W.H., WOO S.L-Y, COUTTS, R.D, MATTHEWS, J.V., GONSALVES, M., AMIEL, D. Quantitative histological evaluation of early fracture healing of cortical bones immobilized by stainless steel and composites plates. *Calcif Tiss Res*, 19, 27-37. 1975.

ASTM. 1993. "Standard practice for assessment of compatibility of biomaterials for surgical implants with respect to effect of materials on muscle and bone". *Annual Book of ASTM Standards*. F 981-93.

BARROS, P.P., CORAÇA, D.C., DUEK, E.A.R., ZOPPI, R.A. *In vivo* study of poly(L-lactic acid)/poly(ethylene oxide) blends. In: EMBEC 99, Viena. 1999.

BARTH, E., RONNINGEN, H., SOLHEIN, L.F. Tissue reactions to ceramics and glass ceramics. *Acta Orthopaedica Scandinava*, 59, 219-220. 1988.

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

BOS, R.R., BOERING, G., ROZEMA, F.R., LEENSLAG, J.W. Resorbable poly(L-lactide) plates and screws for the fixation of unstable zygomatic fractures. *J Oral Maxillofac Surg*, 45, 751-753. 1987.

CASTLEMAN, L.S., MOTZKIN, S.M., ALICANDRI, F.P., BONAWIT, V.L., JOHNSON, A.A. Biocompatibility of nitinol alloy as an implant material. In:

*J.Biomed.Mater.Res.*, 10,695-731,1976,apud Histomorphometric analysis of the response of rat tibial to shape memory alloy (nitinol),18,21.1997.

CITARDI,M.J.,FRIEDMAN,C.D. Nonvascularized autogenous bone grafts for craniofacial skeletal augmentation and replacement. In: *Craniofacial Skeletal Augmentation and Replacement*. Connecticut:Otolaryngologic Clinics of North America,1994. 891-910. ISBN 00306665.

DUNN,R.L. Polymeric Matrices. In: DUNN,R.L.,OTTENBRITE,R.M. *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*. Washington,D.C.:American Chemical Society,1991. 11-23. ISSN 00976156.

FURUKAWA,T.,MATSUSUE,Y.,YASUNAGA,T.,NAKAGAWA,Y.,  
OKADA,Y.,SHIKINAMI,Y., OKUNO,M.,NAKAMURA,T. Histomorphometric study on high-strength hidroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. *J.Biomed.Mater.Res*,50,410-419.2000.

GIUSTI,P.,LAZZERI,L.,DE PETRIS,S.,PALLA,M.,CASCONI,M.G. Collagen-based new bioartificial polymeric materials. *Biomaterials*,15,15,1229-1233.1994.

HECKMAN,J.D.,EHLER,W.,BROOKS,B.P.,AUFDEMORTE,T.B.,LOHMANN,C.H.,MORGAN,T.,BOYAN,B.D. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor- $\beta$  enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *The Journal of Bone and Joint Surgery*,81-1,12,1717-1729.1999.

HOLLINGER,J.O.,SCHMITT,J.M.,BUCK,D.C.,SHANNON,R.,JOH,S.,ZEGZULA,H.D.,WOZNE,Y,J. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res (Appl Biomater)*,43,356-364.1998.

JEPPSSON,C.,BOSTRÖM,M.,ASPENBERG,P. Intraosseous BMP implants in rabbits. *Acta Orthop Scand*,70,1,77-83.1999.

KANTAKE,J.,ROKKANEN,P. Dislocated fractures of the talus treated with biodegradable internal fixation. *Arch.Orthop.Trauma Surg.*,117,62-64.1998.

MAINIL- VARLET, P., RAHN, B., GOGOLEWSKI, S. Long-term *in vivo* degradation and

- bone reaction to various polylactides. *Biomaterials*, 18, 3, 257-266. 1997.
- MADER, J.T., SHIRTLIFF, M.E., BERGQUIST, S.C., CALHOUN, J. Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 360, 47-65. 1999.
- MEIKLE, M.C., PAPAIOANNOU, S., RATLEDGE, T.J. Effect of poly DL-lactide-co-glycolide implants and xenogeneic bone matrix derived growth factors on calvarial bone repair in the rabbit. *Biomaterials*, 15, 7, 513-521. 1994.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of the stereology. *Braz. J. Morphol. Sci.*, 16, 2, 131-139, jul/dez. 1999.
- MORONI, A., CAJA, V.L., EGGER, E.L., TRINCHESE, L., CHAO, E.Y.S. Histomorphometry of hydroxyapatite coated and uncoated porous titanium bone implants. *Biomaterials*, 11, 15, 926-930. 1994.
- NIE, L., NICOLAU, D.P., TESSIER, P.R., KOUREA, H.P., BROWNER, B.D., NIGHTINGALE, C.H. Use of a Bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment. *J. Orthop. Res.*, 16, 76-79. 1998.
- NIJENHUIS, A.J., COLSTEE, E., GRIJPMAN, D.W., PENNING, A.J. High molecular weight poly(L-lactide) and poly(ethylene oxide) blends: thermal characterization and physical properties. *Polymer*, 37, 26, 5849-5857. 1996.
- NORDSTRÖM, P., PIHLAJAMÄKI, H., TOIVONEN, T., TÖRMÄLÄ, P., ROKKANEN, P. Tissue response to polyglycolide and polylactide pins in cancellous bone. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 117, 197-204. 1998.
- OHASHI, H., KOBAYASHI, A., KADOYA, Y., YAMANO, Y., OONISHI, H., IWAKI, H. Effect of particles and interface conditions on fibrous tissue interposition between bone and implant. A particle challenge model in rabbit. *J. Mater. Science: Mater. In Medicine*, 11, 255-259. 2000.
- PARK, T.G., COHEN, S., LANGER, R. Poly(L-lactic acid)/Pluronic blends: characterization of phase separation behavior, degradation, and morphology and use as protein-releasing

matrices. *Macromolecules*, 25,116-122.1992.

PAVANATTI, S.L. *Estudo sobre a biocompatibilidade da resina termoplástica UDEL P-1800 na musculatura de ratos*. Campinas: UNICAMP, 1994. 94p. Tese (Mestrado em Engenharia Mecânica)-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

PENNING, J.P., MANLEY, S.J. Miscible blends of two crystalline polymers. 1. Phase behavior and miscibility in blends of poly(vinylidene fluoride) and poly(1,4-butylene adipate). *Macromolecules*, 29,77-83.1996.

PUTTER, J.L.M., SUKUL, D.M.K.S.K., de Zeuw, G.R., Bijma, A., Besselink, P.A. Comparative cell culture effects of shape memory metal (nitinol) nickel and titanium. In: *Eur. Surg. Res.*, 24,378-382, 1992, apud Histomorphometric analysis of the response of rat tibiae to shape memory alloy (nitinol), 18,21. 1997.

ROKKANEN, P., BÖSTMAN, O., HIRVENSALO, E., PARTIO, E.K., MÄKELÄ, E.A., PÄTIÄLÄ, H., VIHTRONEN, K. Bioabsorbable implants in orthopaedics. *Current Orthopaedics*, 13,223-228.1999

SØBALLE, K., FRIEDMAN, R.J. Calcium hydroxyapatite in total joint arthroplasty. In: WISE, D.L., ALTOBELLI, D.E., TRANTOLO, D.J., YASZEMSKI, M.J., GRESSER, J.D. *Human Biomaterials Applications*. New Jersey: Humana Press, 1996. 462p. 137-167. ISBN 0896033376.

SOLBERG, B.D., GUTOW, A.P., BAUMGAERTNER, M.R. Efficacy of gentamycin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in rat model. *J. Orthop. Trauma*, 13,2,102-106.1999.

STREINER, D.L., NORMAN, G.R. Bioestatística: The basic essentials. Mosby year book, St. Louis, 260p. 1994.

SZYCHER, M., SICILIANO, A.A., REED, A.M. Polyurethane elastomers in medicine. In: DUMITRIUS, S. *Polymeric Biomaterials*. New York: Marcel Dekker, 1994. 845p. 233-275. ISBN 0824789695.

TAKESHITA, F., TAKATA, H., AYUKAWA, Y., SUETSUGU, T. Histomorphometric analysis of the response of rat tibiae to shape memory alloy (nitinol). *Biomaterials*, 18, 1, 21-25. 1997.

WENZ, L. M, MERRITT, K, BROWN, S.A., MOET, A., STEFFEE, A.D. In vitro biocompatibility of polyetheretherketone and polysulfone composites. *J. Biomed. Mat. Res.* vol.24, p207-215. 1990.

ZOPPI, RA., DUEK, EAR., NUNES, SP, CONTANT, S. Blends of poly(L-lactide) and poly(ethylene oxide): *in vitro* study. *Polymer*, submitted.