



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA – FOP  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA BUCO-MAXILO-FACIAL**



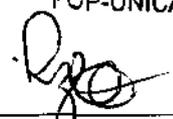
## **CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

### ***Monografia de Final de Curso***

**Aluno: Roberto Kazutoshi Tanaka Junior**

**Orientador: Renato Mazzonetto**

*Prof. Dr. Renato Mazzonetto*  
Professor Livre Docente da  
Área de Cirurgia Buco Maxilo Facial  
FOP-UNICAMP



---

Assinatura do Orientador

**Ano de conclusão: 2006**

TCC 336

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
BIBLIOTECA**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA – FOP  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA BUCO-MAXILO-FACIAL**



**AVALIAÇÃO            TECIDUAL            EM            IMPLANTES  
SUBCUTÂNEOS DE PARAFUSOS BIOABSORVÍVEIS DE  
POLI (ÁCIDO L,D-LÁTICO) (PL-DLA) EM SUBCUTÂNEO  
DE COELHOS.**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Cirurgião-Dentista.

***Roberto Kazutoshi Tanaka Junior***

PIRACICABA – SP

2006

## **AGRADECIMENTOS**

***Agradeço aos meus pais, amigo e namorada por tornar mais este projeto concretizado.***

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>6</b>
<b>PROPOSIÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>10</b>
<b>1. OBTENÇÃO DOS PARAFUSOS</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Síntese do copolímero PL-DLA</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Caracterização do PL-DLA</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Obtenção e caracterização do parafusos</b>	<b>18</b>
<b>2. PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	<b>20</b>
<b>3. SELEÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS</b>	<b>20</b>
<b>4. PRIMEIRA FASE CLÍNICA: COLOCAÇÃO DOS IMPLANTES EM LOJAS SUBCUTÂNEAS</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Profilaxia Antimicrobiana e Anestesia</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Procedimento Cirúrgico</b>	<b>22</b>
<b>5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO HISTOLÓGICO</b>	<b>24</b>
<b>5.1 Períodos e Forma de Sacrifício</b>	<b>24</b>
<b>5.2 Preparo Histológico</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>30</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>35</b>

## **RESUMO**

Os polímeros do ácido poli-lático são biodegradáveis e bioabsorvíveis. Suas propriedades físico-químicas têm sido estudadas com o intuito de modular sua suscetibilidade à degradação e suas interações com células e fluidos biológicos para aplicações na área médica e odontológica. Na prática odontológica, estes dispositivos aloplásticos, na forma de parafusos, são alternativas para fixação interna rígida do complexo buço-maxilo-facial das fraturas. O objetivo desse trabalho foi estudar a reação do tecido conjuntivo subcutâneo ao implante de parafusos de poli (ácido L,D-lático) (PL-DLA). Foram utilizados neste estudo 18 coelhos fêmeas Nova Zelândia com idade de 5 meses e aproximadamente 4 kgs. Divididos em 3 grupos e sacrificados em 3, 8 e 12 semanas. Ao exame histológico pode-se constatar encapsulamento dos com tecido conjuntivo frouxo em 3 e 8 semanas, envolvendo para um tecido conjuntivo denso na semana 12.

## **INTRODUÇÃO**

A fixação interna rígida é tida como o método mais eficaz nas reduções de fraturas mandibulares, possibilitando uma melhor contenção das fraturas, além de uma estabilização em longo prazo e uma diminuição do tempo do reparo ósseo. Outra vantagem dessa técnica é a eliminação do bloqueio intermaxilar, proporcionando maior conforto ao paciente, oferecendo condições favoráveis à alimentação, higienização, assim como o retorno precoce à função (TOLEDO et al., 1998).

KULKARNI, 1966 foi o primeiro a utilizar de implantes de polímeros bioabsorvíveis. Desde então, foi testada uma grande variedade de materiais bioabsorvíveis *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente os implantes foram preparados moldando-se os polímeros em folhas ou películas, que permitiram investigações básicas no comportamento biológico das composições no tecido ósseo, mas os dispositivos não eram apropriados para fixação de fraturas, mostrando que as propriedades mecânicas dos polímeros sofrem uma variação considerável. A cristalinidade, a quantidade de monômeros livres e a taticidade são outros fatores que influenciam as propriedades mecânicas do material biodegradável. Apesar de muitos compostos macromoleculares serem bioabsorvíveis, apenas alguns possuem as propriedades adequadas para serem dispositivos de fixação interna óssea.

Na fixação rígida, o material mais comumente utilizado é o Titânio (Ti), sendo a liga mais utilizada a Titânio-6-Alumínio-4-Vanádio. Entre suas propriedades, este material apresenta excelente biocompatibilidade, é inerte,

excelente resistência à corrosão, à tração e ao cisalhamento. O módulo de elasticidade do Ti é 5 vezes maior do que o osso compacto e da liga é aproximadamente 5,6 vezes maior (PETERSON, 2000). Todavia, em se tratando das propriedades dos polímeros, temos a biocompatibilidade, capacidade de condutibilidade térmica e elétrica mínimas, fornecendo uma barreira física e química para o transporte de íons (por exemplo: íons metálicos), módulo de elasticidade mais semelhantes ao osso do que outros materiais de implante utilizado para o suporte de cargas, cor semelhante ao osso, além de não necessitar de uma intervenção cirúrgica para retirada do material (PETERSON, 2000).

Os polímeros mais comumente investigados são os poli ( $\alpha$ -hidroxi ésteres) dentre estes, os poli (L-ácido láctico) (PLLA), poli (ácido glicólico) (PGA). O PLA degrada lentamente gerando unidades cristalinas que podem causar uma resposta longa e prolongada por parte do tecido. Por outro lado, o PGA degrada tão rapidamente que se torna inconveniente para a maioria das aplicações.

A velocidade de degradação e o grau de reação de corpo estranho são determinados pela massa molar inicial e pela composição química do material. Clinicamente, a absorção dos polímeros PGA e PLA e seus copolímeros são freqüentemente acompanhados pela reação local de corpo estranho, especialmente se a velocidade de degradação é alta ou se os polímeros não são absorvidos completamente (AN et al, 1998).

A degradação do polímero determina o tipo e a intensidade da resposta inflamatória. O surgimento de partículas monoméricas e poliméricas liberadas durante a degradação do polímero *in vivo* está diretamente relacionado ao tipo da resposta inflamatória. Este processo pode ser oriundo de produtos tóxicos provenientes da degradação ou pela mudança de rugosidade superficial e forma de implante durante a liberação de fragmentos. Além disso, a própria fagocitose destes atua como fator importante na modulação da resposta inflamatória. Ela modifica o processo funcional do macrófago, que é o pivô na resposta inflamatória tecidual e na reação de corpo estranho. Além disso, os fragmentos fagocitados podem acarretar morte celular e a liberação do conteúdo destas células pode levar a uma resposta inflamatória aguda (LAM et al, 1993).

À medida que as células crescem e se organizam, o polímero degrada e é absorvido pelo organismo, levando a uma substituição natural do tecido (ZOPPY et al, 1999; NAKAMURA et al, 1998). O polímero do ácido poli-lático, é bastante adequado para aplicações como suporte para células. Um estudo realizado por Peter et al, 1998, mostraram que não ocorre desmineralização do osso durante a degradação do PLA *in vivo*. NAKAMURA et al, 1998, mostraram que não é observado o aparecimento de tumores após o implante até o completo desaparecimento do copolímero implantado.

A biocompatibilidade dos materiais pode ser estudada de diferentes formas, como através de cultura de células, contudo esse meio não reproduz toda a complexidade da reação reparadora do tecido vivo. Em organismos

vivos, a reação tecidual pode ser avaliada após implantação. O mais importante aspecto da biocompatibilidade é o comportamento tecidual em contato com o material. Diversos animais são estudados (cachorros, porcos, coelhos, ratos) com implantação feita em diferentes locais onde são sugeridos (subcutâneo, intramuscular, intra-óssea em mandíbulas, tíbias e fêmures) (PERTOT et al, 1997).

Placas e parafusos de PLA foram usados para a fixação interna de fraturas mandibulares em cachorros. Reparação sem complicações e calo secundário foram mencionados. As placas e parafusos foram quase completamente absorvidos depois de 40 semanas (GETTER et al, 1972).

Placas de PLA reforçadas bi-dimensionalmente por trançados de PLGA (0,1 mm de diâmetro) e parafusos de aço inoxidável, foram usados na fixação interna da tíbia de ovelhas. Calos excessivos foram encontradas. (VERT et al., 1984).

Pequenas placas e parafusos de PLA e aço inoxidável foram usados para a fixação interna em fraturas de crânio de 25 pacientes. Regenerações desiguais recuperações e degradações parciais foram encontradas (VERT et al, 1984).

PLA de alto peso molecular e em forma de placas parafusos foram utilizados na fixação de rádios osteomizados em cachorros. Após 2 anos foi constatado que 93% do PLA foi absorvido (TUNC et al, 1985).

## **PROPOSIÇÃO**

O objetivo desse trabalho foi estudar a reação do tecido conjuntivo subcutâneo ao implante de parafusos de poli (ácido L,D-lático) (PL-DLA). Foram utilizados neste estudo 18 coelhos fêmeas Nova Zelândia com idade de 5 meses e aproximadamente 4 kgs. Divididos em 3 grupos e sacrificados em 3, 8 e 12 semanas. Ao exame histológico pode-se constatar encapsulamento dos com tecido conjuntivo frouxo em 3 e 8 semanas, envolvendo para um tecido conjuntivo denso na semana 12.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. OBTENÇÃO DOS PARAFUSOS**

Os poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos) constituem uma classe de poliésteres representados pela fórmula geral  $-(O-CHR-CO)-_n$  (VERT et al., 1992). Estes polímeros possuem grande potencial em aplicações médicas, pois são biocompatíveis, bioabsorvíveis e sofrem degradação principalmente por hidrólise, através da cisão das ligações ésteres. Esta característica até recentemente não apresentava vantagens, já que buscava-se materiais que apresentassem propriedades estáveis. No entanto estes polímeros ganharam espaço no desenvolvimento de dispositivos médicos temporários.

Como a maioria dos polímeros não atende sozinhos às necessidades exigidas por uma determinada aplicação, uma das estratégias é a obtenção de blendas e copolímeros com o objetivo de se obter um sinergismo das propriedades.

O poli (ácido láctico), pode ser copolimerizada por uma variedade de comônômeros e como consequência dessas copolimerizações, obtêm-se polímeros com diferentes propriedades mecânicas, morfológicas e físico-químicas. Os dois monômeros que são geralmente usados como partida na síntese do poli (ácido láctico), ácido láctico e lactide, apresentam quiralidade, sendo que o ácido láctico apresenta duas formas estereoisoméricas, o *L*- e o *D*- ácido láctico. Já o lactide, o diéster cíclico do ácido láctico, apresenta quatro isômeros diferentes: *L*- lactide, *D*- lactide, a mistura racêmica *D, L*-lactide e o *meso-lactide*, que é opticamente inativo e contém uma unidade *L* e uma unidade *D* no anel. Na literatura pouquíssimo é descrito sobre o *meso-lactide*, já que sua obtenção é muito difícil (VERT et al , 1995; CORDEWENER et al, 1996).

O poli (L-ácido láctico), PLLA, é um polímero semicristalino com ponto de fusão ao redor de 180° C e uma cristalinidade por volta de 70%, tornando-o dentre a classe desses poliésteres, o que possui a menor taxa de degradação. As propriedades mecânicas apresentadas por este polímero são satisfatórias, já que apresentam uma boa resistência à tração e um alto módulo de Young (VERT et al , 1995). O prolongado tempo de degradação do poli (L-lactide) está associado ao aumento do grau de cristalinidade durante sua degradação, o que

leva algumas vezes a incidência de algum tipo de inflamação por parte do tecido circunjacente ao implante (CORDEWENER et al 1996). Estudos demonstram que fragmentos cristalinos do implante de Poli (L-lactide) podem perdurar por mais de 5 anos no organismo, o que é um tempo excessivamente longo (BERGSMA et al 1995; ROHOVSKY et al, 1994).

Já o poli (D, L lactide) é, em contraste ao PLLA, caracterizado por apresentar uma taxa de degradação bem mais rápida, justamente por ser um polímero completamente amorfo (CLAES et al, 1996; HOLLINGER; LEIGGENER et al, 1998).

Portanto através da combinação do L-lactide ao D, L lactide se obtém um copolímero, poli (L-lactide –co- D, L lactide), que apresenta características muito interessantes que são inerentes a cada monômero utilizado, ou seja, se verifica ainda no copolímero satisfatórias propriedades mecânicas, o que é uma qualidade que a presença do L-lactide assegura, bem como uma maior taxa de degradação, que está associada à presença do monômero D,L lactide.

A inserção das unidades D,L lactide na cadeia do polímero tem como resultado um aumento da biocompatibilidade do material. (BENDIX, 1998).

Para o projeto em questão, a proporção escolhida entre os monômeros L-lactide e D,L-lactide na síntese do poli (L-lactide-co-D,L,lactide) foi de 70:30, respectivamente. Esta escolha foi baseada no vasto espectro de aplicações que esse material tem comercialmente, como por exemplo:

- Reparos ósseos na região crânio-maxilo-facial devido a algum trauma sofrido ou mesmo síndrome, através da estabilização dos ossos da mandíbula em conjunto com a fixação maxilo-madibular;
- Fraturas na região abaixo dos olhos;
- Cirurgias que envolvam reparos na região crânio-facial em pediatria, entre outras;

O poli (L lactide-co-D,L,lactide) 70:30 tem como característica ser amorfo e degradar completamente num intervalo entre 18-36 meses, sendo seu processo de degradação idêntico ao do PLLA, sem a desvantagem apresentada por este, que é a formação de fragmentos altamente cristalinos, tem-se, portanto para o copolímero a geração no processo final de degradação CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (CLAES et al, 1996).

A polimerização do PLLA tem sido realizada por vários processos. A rota mais simples para a obtenção do polímero é através da policondensação do ácido láctico, entretanto, por esta rota obtém-se polímero com baixa massa molar (VERT et al, 1995). A rota que leva a obtenção de PLLA de alta massa molar é a abertura do anel de monômeros cíclicos, sendo que, neste tipo de rota existe a necessidade da presença de um catalisador. Polimerizações por emulsão, solução e em bulk são descritas na literatura (NIJENHUIS, 1995).

Uma grande variedade de compostos, principalmente óxidos e sais metálicos, tem sido investigadas para serem empregadas como catalisadores.

Entretanto para a produção de polímeros para uso biomédico, somente dois sais de estanho têm sido empregados: Cloreto de estanho II, e 2-ethyhexanoate de estanho II, mais conhecido como  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ .

Ambos sais de estanho são aprovados para serem usados como aditivos alimentares, pelo FDA (Food and Drug Administration), mas o maior destaque vem sendo dado ao  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ , devido ao fato de: ser altamente eficiente e permite quase uma conversão completa da relação monômero/catalisador, podendo apresentar uma razão da ordem  $10^4:1$  (NIJENHUIS & GRIJPMA, 1992); o risco de racemização é baixo quando se faz uso deste catalisador, sendo possível obter poli (ácido láctico) com uma pureza óptica de até 99% , quando a síntese é realizada em temperaturas de até  $150^\circ\text{C}$ , por poucas horas (KRICHELDORF et al, 1995; além destes fatores, o  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  , como já mencionado anteriormente, é empregado como um aditivo alimentar em vários países , o que significa que sua toxicidade é extremamente baixa, quando comparado a outros sais de metal pesado (KRICHELDORF, et al, 1995).

Dependendo das condições de reação, resíduos do monômero L-lactide podem ser encontrados em quantidades superiores a 15%. O monômero tem uma influência negativa sob a estabilidade global do polímero, já que pode ser facilmente hidrolisado a ácido láctico o que tem como consequência uma aceleração no processo de degradação da cadeia de poliéster.

Além disso, a presença do monômero L-lactide no polímero PLLA também conduz a uma intensa degradação durante o processamento térmico deste polímero, especialmente se este material não tiver sido eficientemente seco antes de ser processado. O monômero residual é frequentemente removido através de extrações com vários solventes, ou sistemas de solventes, ou ainda através de passos de dissolução e precipitação. Entretanto, solventes são difíceis de serem removidos do poli (ácido láctico), e, portanto, a biocompatibilidade e a aceitabilidade de um solvente particular para uso em dispositivos médicos são essenciais.

Já é sabido que uma vez implantados no corpo, dispositivos biodegradáveis devem manter suas propriedades mecânicas pelo tempo necessário, e só então, serem degradados, reabsorvidos e eliminados sem deixar traços. A degradação dos poliésteres alifáticos e seus copolímeros vem sendo investigada por vários autores, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. A degradação do PLA e PGA foi revisada por KOPECEK & ULBRICH, (1983), HOLLAND et al., (1986) e LEWIS, (1990). O ácido láctico, gerado pela degradação do poli (L-ácido láctico), é incorporado ao ciclo dos ácidos tricarbóxicos e eliminado pelos pulmões como dióxido de carbono e água. O processo de degradação dos polímeros bioreabsorvíveis foi proposto por RAGHUVANSHI e baseia-se em três fases: processo de cisão das cadeias ao acaso onde ocorre uma redução significativa da massa molar do polímero, sem uma perda de massa significativa, pois não existe ainda a formação de monômeros solúveis; na fase intermediária ocorre uma diminuição da massa molar acompanhada por uma rápida perda de massa e a formação de produtos

oligoméricos solúveis; os fragmentos oligoméricos são transformados nos seus respectivos monômeros e ocorre a completa solubilização do polímero (RAGHUVANSHI, 1993).

Assim, o próximo passo é a sintetização e caracterização do copolímero PL-DLA, poli (L-ácido láctico-co-D,L-ácido láctico); além de processar o polímero na forma de parafusos.

### **1.1 Síntese do copolímero PL-DLA**

Copolímeros de L-ácido láctico e D,L ácido láctico (PL-DLA), serão preparados através da reação de polimerização *em bulk* (*sem adição de solvente*), por abertura de seus anéis. A proporção entre os monômeros L-láctide/D,L-láctico escolhida para as sínteses será de 70:30. O catalisador utilizado será o  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ , e a reação monômero catalisador de 5000. As massas dos monômeros (lactide e glicolide) e do catalisador, serão adicionadas numa ampola de vidro.

Essa mistura será congelada em  $\text{N}_2$  líquido, fazendo-se a seguir vácuo na ampola, a fim de que a reação ocorra na ausência de  $\text{O}_2$ . A ampola selada será imersa em um banho de óleo à  $130^\circ\text{C}$  por 72 horas. Decorrido esse tempo o polímero será dissolvido em clorofórmio,  $\text{CHCl}_3$  (Merck). Logo após, o polímero será precipitado em metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Merck). A precipitação ocorrerá através do gotejamento da solução (polímero +  $\text{CHCl}_3$ ) no solvente  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

O processo de secagem do polímero se dará primeiramente num dessecador a vácuo e em seguida, numa estufa a vácuo (mantida a 60 °C por 8 horas), para eliminação de qualquer resíduo de solvente ainda presente. Finalmente, o polímero poderá ser pesado, calculado o rendimento da reação e caracterizado através das técnicas citadas abaixo. Uma vez caracterizado, o polímero será especificado quanto à monômero residual, resíduos de solvente, água, resíduos de catalisador e viscosidade inerente.

## **1.2 Caracterização do PL-DLA**

### ***Cromatografia de permeação a gel (GPC)***

As massas molares médias em número ( $M_n$ ), em massa ( $M_w$ ) e o índice de polidispersão (IP) serão obtidos em um cromatógrafo líquido CLWA-1, utilizando-se colunas ultrastyrigel e detector de índice de refração Waters 410. Serão utilizados padrões de poliestireno para a calibração e THF (tetrahidrofurano) como fase móvel. Este ensaio será realizado no IPT.

### ***Espectroscopia na região do infravermelho (IV)***

Os espectros de infravermelho serão obtidos na região de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , em amostras na forma de filmes sobre KBr, em um espectrofotômetro BOMEN MB-Séries. Este ensaio será realizado no IQ/Unicamp.

### ***Ressonância magnética (RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )***

Os espectros de RMN serão obtidos em um espectrofotômetro GEMINI 300BB operando a 75 MHz para RMN $^{13}\text{C}$  e 300 MHz para RMN $^1\text{H}$ . Foram utilizados tubos de vidro 5mm de diâmetro e clorofórmio deuterado como solvente. Este ensaio será realizado no IQ/Unicamp

### ***Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)***

Amostras, aproximadamente 10 mg, serão aquecidas de 25 a 200°C a uma velocidade de 10°C/ min e logo após resfriadas até -50 °C , sendo a seguir reaquecidas até 200 °C , sob purga de N<sub>2</sub> através do equipamento Ta modelo MDSC291.

### ***Análise Termogravimétrica (TGA)***

As curvas termogravimétricas serão obtidas com equipamento STA 409C-NETZSCH- Geratebau Gmbr Thermal Analysis. Amostras pesando aproximadamente 20 mg serão submetidas ao aquecimento na faixa de 25-500°C, a 10°C/min sob atmosfera de He.

### ***1.3 Obtenção e caracterização dos parafusos***

A partir dos dados obtidos na caracterização térmica serão estipuladas condições para o processamento do polímero na forma de parafusos. A

temperatura de processamento será baseada nos valores da temperatura de transição vítrea e na temperatura onde o material começa a perder massa devido à degradação. Após o processamento os parafusos serão caracterizados por DSC, TGA, ensaio mecânico flexão, microscopia eletrônica de varredura e GPC, para verificarmos uma possível degradação devido às condições de processamento. As dimensões dos parafusos serão de 12 mm de comprimento por 2 mm de largura.

### ***Ensaio Mecânico***

Os parafusos serão submetidos a ensaios de flexão pelo método de três pontos, segundo a norma ASTM D 790-95a, em uma MTS TestStar II, utilizando uma célula de carga de 100 kgf (com fundo de escala de 20kgf), a uma velocidade de 1,2 mm/min. A distância entre as duas extremidades foi de 2 cm.

### ***Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

Amostras da superfície da fratura dos parafusos, fraturados em N<sub>2</sub> líquido, serão colados em um suporte metálico e recobertos com ouro, utilizando-se um metalizador de amostras Sputer Coater BAL-TEC SCD 050. Em seguida, as membranas serão observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JXA 840A, utilizando tensão de 10 a 20 kv.

## **2. PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA**

Previamente ao início da fase laboratorial, o presente projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, a qual aprovou a realização do mesmo. **(Anexo I)**

## **3. SELEÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS**

Para realização deste estudo, foram utilizados 18 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, fêmeas, com idade de 5 meses, e com peso aproximado de 3 kg, os quais foram obtidos do Biotério Central do campus de Botucatu – Universidade Estadual de São Paulo.

Durante a realização do estudo, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, com água *ad libitum* e alimentação com ração Purina para coelhos (SP, Brasil), sob responsabilidade dos realizadores do estudo e sob supervisão de funcionário designado para tal função. **(Figura 1)**



**Figura 1** – Coelhos mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba

#### **4. FASE CLÍNICA**

##### **4.1 Profilaxia Antimicrobiana e Anestesia**

Os animais receberam, 30 minutos antes da cirurgia, uma injeção intramuscular na dose 80 000 UI/Kg do antibiótico pentabiótico veterinário de benzilpenicilina benzatina (Wyeth, Itapevi SP, Brasil), na dose padrão de 1 ml. Associada a esta, uma injeção intramuscular de antiinflamatório e antiálgico, cetoprofeno, na dose de 5 mg/kg.

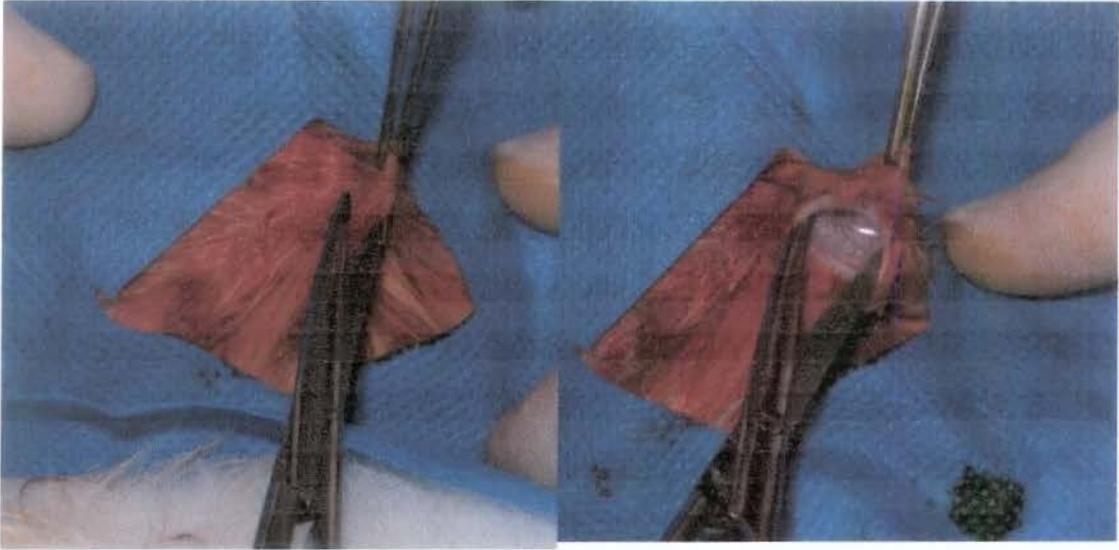
15 minutos antes da cirurgia, uma injeção subcutânea de sulfato de atropina 10% SC 0,08 mg/kg, na dose padrão de 0,3 ml, com o objetivo de prevenir a bradicardia provocada pelo anestésico.

A indução anestésica foi realizada através da via intramuscular profunda, pela injeção de cloridrato de quetamina (Dopalen) na dose de 35 mg/kg, sendo a dose padrão 1,2 ml. Também foi realizada a aplicação intramuscular profunda de xilazina (Rompun) na dose de 6 mg/kg, sendo a dose padrão de 1 ml.

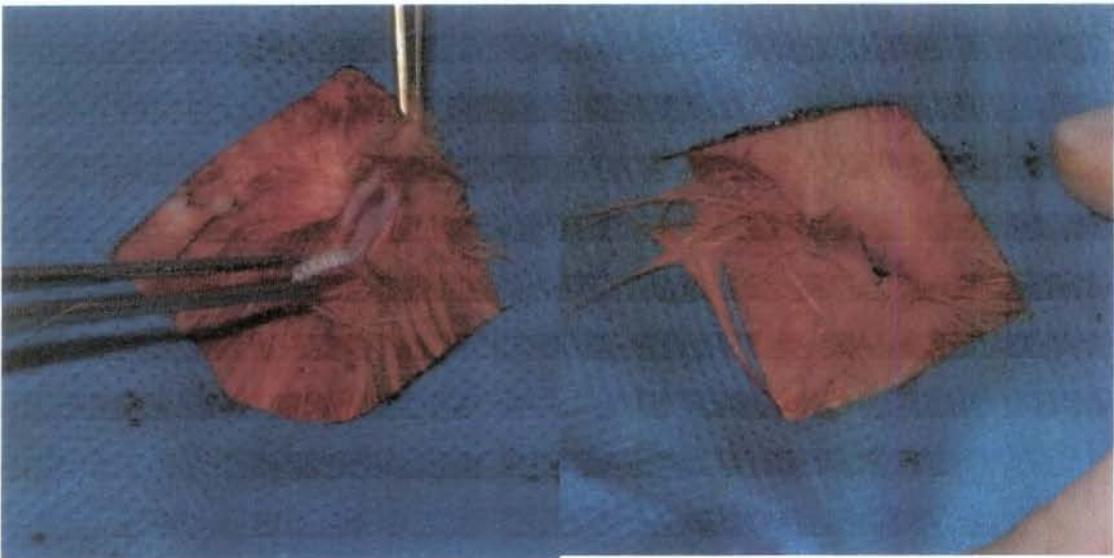
#### **4.2 Procedimento Cirúrgico**

Após a anestesia e em decúbito ventral, foi realizada a tricotomia na região ingnal na perna direita do coelho, e anti-sepsia da região com solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodo a 10%. O campo operatório foi isolado através da aposição de campos esterilizados descartáveis. Foram utilizados pelos cirurgiões gorro e máscara, luvas cirúrgicas estéreis e roupa cirúrgica limpa. Os instrumentos foram autoclavados previamente (ALBERIUS, KLINGE & ISAKSSON, 1989).

O procedimento cirúrgico consistiu na colocação de um parafuso de 12 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro, cortado ao meio, subcutâneamente. Para tanto, será necessária uma pequena incisão na região ingnal direita e divulsão do tecido subcutâneo para colocação do parafuso onde serão fixados por ponto através de fio nylon monofilamentar número 4-0, não-bioabsorvível, para posterior identificação do local. **(Figuras 2-A, 2-B, 2-C e 2-D)**



**Figuras 2-A e 2-B** – incisão realizada após tricotomia e divulsão dos tecidos.



**Figuras 2-C e 2-D** – colocação dos hemi-parafusos e posterior sutura.

## **5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO HISTOLÓGICO**

### **5.1 Períodos e forma de sacrifício**

O sacrifício foi realizado através de overdose endovenosa de Dopalen (Agribands Brasil Ltda.), após o período de 4, 8 e 12 semanas (6 coelhos em cada período).

### 5.2 Preparo Histológico

Os preparos foram imersos em solução de formaldeído 4% em tampão fosfato por um período de 24 horas, lavados em água corrente por 24 horas. A partir desta fase procederam a realização das etapas de processamento laboratorial. Inicialmente foram retirados os parafusos das amostras de 1 e 2 meses para que possam ser cortados em micrótomo de 4  $\mu\text{m}$ . Nas amostras de 4 meses não foram necessárias a remoções dos parafusos, pois foi possível realizar os cortes no micrótomo. Após isso, foi feita a desidratação com álcool a 70% (12 horas), álcool a 80% (1 hora), álcool a 90% (1 hora), álcool absoluto (1 hora), diafanização com  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$  (xilol) através de três trocas a cada 20 minutos, infiltração em parafina (1 hora) em estufa a 70° Celsius realizando-se 3 trocas. Cortes seriados com 4  $\mu\text{m}$  de espessura serão realizados e em seguida corados pela Hematoxilina de Carazzi e Eosina, para posterior análise de microscopia óptica. (figura 3)

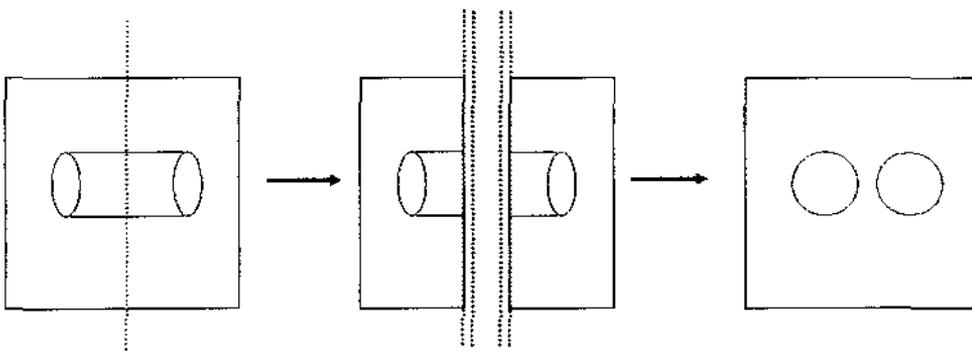
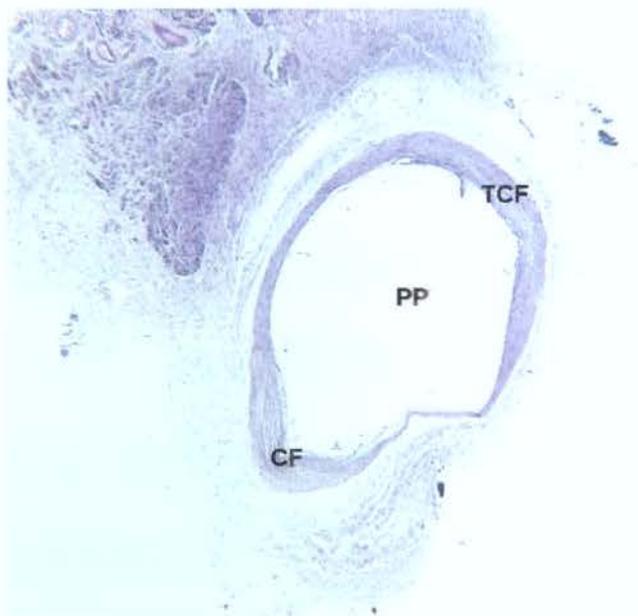


Figura 3 – Divisão das amostras para inclusão e corte

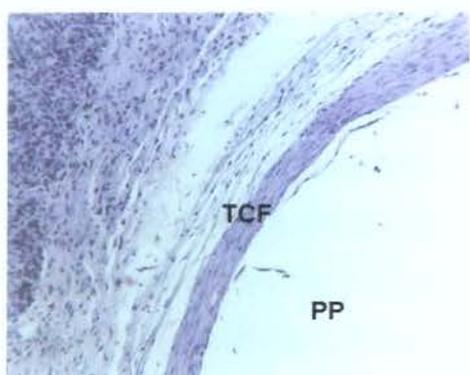
## RESULTADOS

### PERÍODO DE 3 SEMANAS

Circundando o parafuso foi observado a formação de cápsula, com tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado. **(Figuras 4-A e 4-B)** Foi notado também a presença de infiltrado inflamatório leve, com a presença de macrófagos na região peri-implantar.



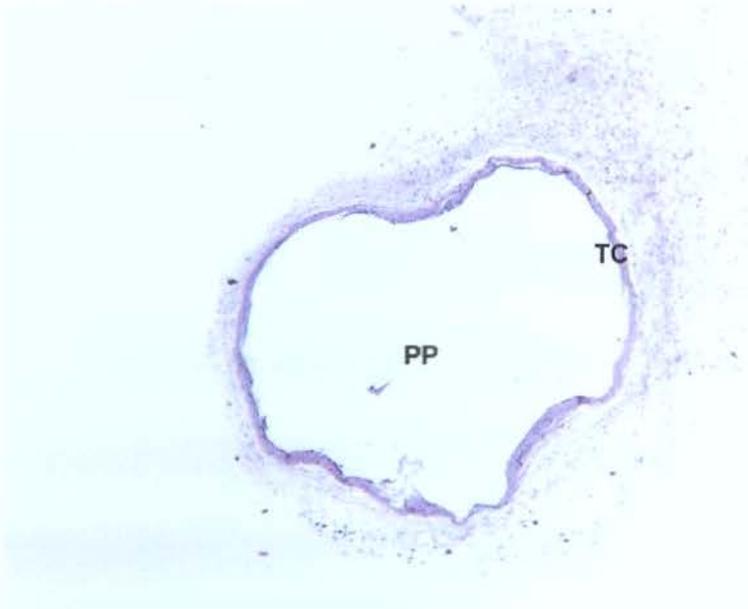
**Figura 4-A** – Observar a formação de cápsula (CF) com tecido conjuntivo fibroso (TCF) envolta do parafuso de polímero (PP).HE.objetiva 2,5x.



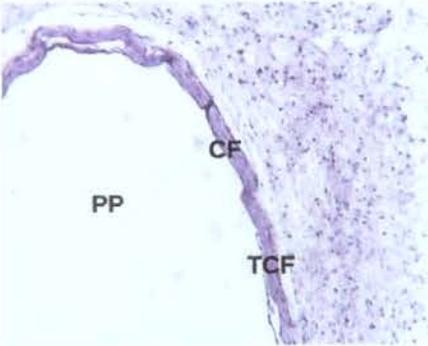
**Figura 4-B** – Notar presença de grande quantidade de núcleos de fibroblastos, notando-se grande atividade celular.HE. Objetiva de 10x.

## PERÍODO DE 8 SEMANAS

Durante este período ainda foi notado a presença de infiltrado inflamatório leve, ainda com presença de macrófagos. Contudo, a cápsula apresentou-se mais fibrosa. **(Figuras 5-A e 5-B)**



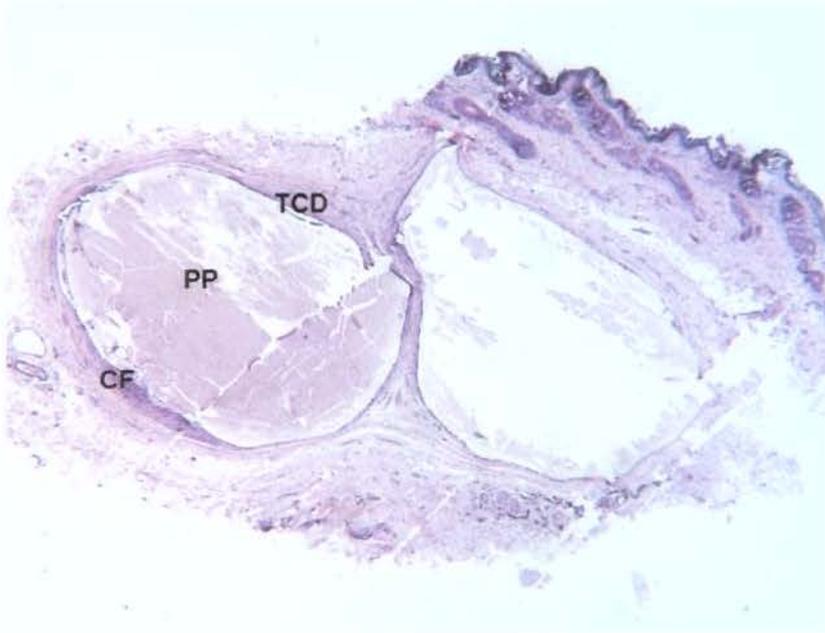
**Figura 5-A** – Visão panorâmica de corte histológico de 2 meses. Observar leve modificação para tecido conjuntivo mais fibroso, quando comparado ao primeiro mês. HE. objetiva 2,5x.



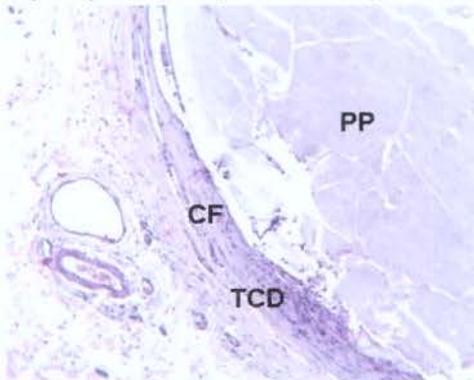
**Figura 5-B** – A cápsula fibrosa (CF) que recobre o parafuso apresenta-se mais fibrosa. Ainda há leve infiltrado inflamatório. HE. objetiva 10x.

## PERÍODO DE 12 SEMANAS

Neste período há a diferenciação da cápsula fibrosa frouxa em tecido conjuntivo denso. Nota-se ainda que não há estágios iniciais de degradação do parafuso. Plasmócitos indicam uma reação inflamatória crônica leve.(Figuras 6-A e 6-B)



**Figura 6-A** – Visão panorâmica do corte histológico aos 4 meses. Percebe-se a diferenciação da cápsula fibrosa (CF) para tecido conjuntivo denso (TCD). Além da presença de plasmócitos. HE. Objetiva 2,5x.



**Figura 6-B** – Nota-se aqui uma diferenciação para cápsula fibrosa (CF) de tecido conjuntivo denso (TCD). Percebe-se também a presença do parafuso de polímero praticamente intacto. HE. objetiva 10x.

## **DISCUSSÃO**

Os polímeros apresentam como vantagens o fato de serem pré-fabricados, e disponíveis em grande quantidade além de não necessitarem um segundo local cirúrgico, reduzindo a morbidade do paciente (WILLIANS, 1982). Além disso, quando desejável, o material implantado deve ser bioabsorvível, degradando-se com o tempo e transmitindo, gradativamente, a carga aplicada do implante ao osso, dispensando uma nova cirurgia para sua remoção.

KALLELA, 2005, estudou a reação tecidual em implantes de polímeros de PL-DLA na mesma proporção (70L:30DL) utilizado por este trabalho. Este estudo foi realizado em fixações internas rígidas após osteotomias mandibulares em ovelhas. Embora fossem utilizadas espécies diferentes, resultados semelhantes foram encontrados. No período de 1, 2 e 4 meses, ambos trabalhos apresentaram boa biocompatibilidade e. KALLELA, 2005, trabalhou com o período de 8 meses, não sendo possível comparação neste caso. Em ambos os trabalhos houve apenas estágios iniciais de biodegradação.

A reação tecidual *in vivo*, de polímeros de poli (ácido láctico) composto por 70% L-lactide e 30% D-lactide (PL-DLA) foram investigados por histologia de 3 a 100 semanas depois de implantação subcutânea em coelhos por PYHALTO, 2005. No período de 3 semanas foi encontrado um leve deslocamento e houve um decréscimo de 39% na resistência de torção e sinais de degradação foram apenas observados após 48 semanas. Mostrando assim

que este trabalho necessitaria de um tempo maior de sacrifício para melhores apreciações sobre as propriedades dos parafusos.

## **CONCLUSÃO**

Dentro do propósito deste estudo, e com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1 Todos os grupos apresentaram reação tecidual de formação de cápsula fibrosa, sendo de tecido conjuntivo frouxo nas semanas 3 e 8 e tecido conjuntivo denso na semana 12. Provando assim, a biocompatibilidade desses implantes sem causar reação inflamatória.
- 2 Até o último período de sacrifício não foi notada nenhuma alteração nos parafusos, somente no período de 4 meses houve um início na degradação dos parafusos. O que foi observado no processo de confecção das lâminas histológicas, sendo possível realizar os cortes no micrótomo sem a necessidade de retirada dos parafusos. Mostrando assim, a propriedade de bioabsorção do material.
- 3 Seriam necessários mais períodos de sacrifícios e mais espaçados para melhores apreciações sobre as propriedades dos parafusos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. BARBANTI, S. H.; SANTOS JR, A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. **Journ. Mater. Sci: Mater in Med.** No prelo.
2. BENDIX, D.; Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications, *Polymer degradation and stability*, 59, 129-135,1998.
3. BERGSMA, J E. ; BRUIJN W. C., ROZEMA F.R.;BOS R.R.M; Late degradation tissue response to poly(L-lactide)) bone plates and screws. **Biomaterials**, 16, 25, 1995.
4. CLAES L.E.; IGNATUS A.A.;REHM K.E.; SCHOLZ C.; New bioreabsorbable pin for the reduction of small bony fragments: desing, mechanical properties and in vitro degradration. **Biomaterials**, 17, 1621,1996.
5. CORDEWENER F.W., BOS R.R., ROZEMA F.R, Poly( L-lactide))) implants for repair of human orbital fllor defects: clinical and magnetic resonance imaging evaluation of long-term results, **J Oral Maxillofac Surg**, 54, 9,1996.
6. DE JONG, WH. **Biomaterials**. 2005 May;26(14):1781-91
7. ELST, M. VAN DER; DIJKEMA, A.R.A.; KLEIN, C.P.A.; PATKA, P. & HAARMAN, H.J. TH.M. - **Biomaterials**, 16, p.103-106 (1995).
8. ELST, M. VAN DER; KLEIN, C. P. A. T.; BLIECK-HOGERVORST, J. M.; PATKA, P.; HAARMAN, H. J. TH. M. – **Biomaterials**, 20, p. 121 (1999).

9. FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J Oral Surg.** V. 38, n.3, p.176-80, Mar. 1980
10. GETTER, L.; CUTRIGHT D.E.; BHASKAR S.N.; AUSBURG, J.K. A biodegradable intraosseous appliance in the treatment of mandibular fractures. **J Oral Surg**, 30: 344-348, 1972
11. HOLLINGER J.O.; BATTISTONE G.C., Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics, **Clin Orthop.**, 207,290,1986.
12. HOLLAND, S.J. AND YASIN, M. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. **J.Controlled Rel.**, 4, 155-180, 1986.
13. KALLELA I.TULAMO RM, HIETANEN J, POHJONEN T, SUURONEN R, LINDQVIST C. et al **J Craniomaxillofac Surg.** 1999 Apr;27(2):124-33
14. KOPECEK, J. AND ULBRICH, K. Biodegradation on biomedical polymers. **Prog. Polym. Sci.**, 9, .1-58, 1983.
15. KRICHELDORF, H.R.; KREISER-SAUNDERS, I.; BOETTCHER, C.; Polylactones: 31. Sn (II) octoate-initiated polymerization of L- lactide: a mechanistic study, **Polymer**, 36, 1253, 1995.
16. KULKARNI RJ, PANI KC, NEUMAN C, LEONARD F. Polylactic acid for surgical implants. **Arch. Surg**, 93, 839-843 (1966)
17. LAM, K.H et al - **J. Biom. Mat. Res.**, 27, p.1569-1577 (1993).
18. LEIGGENER,C.S.; CURTIS R.;RAHN , B.A.: Effects of chemical composition and design of poly( L/DL lactide) implants on the healing of cranial defects. **Journal of Cranio Maxillofacial Surgery**, 26,151,1998.

19. LEWIS, D.H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers in *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (M. Chasin and R. Langer, eds.), Marcel Decker, New York, Chapter 1, 1990.
20. MANNINEN, M.J. & POHJONEN, T. - **Biomaterials**, 14, p.305-312 (1993).
21. NAKAMURA, T.; SHIMIZU, Y.; TAKIMOTO, Y.; TSUDA, T.; LI, Y. H.; KIYOTANI, T.; **Journal Biomed Mater Res**, 42, p. 475 (1998)
22. NIJENHUIS, A J. GRIJPMAN, D.W., PENNING, A J., Lewis acid catalyzed polymerization of L- lactide: Kinetics and Mechanism of the Bulk polymerization, **Macromolecular Biomaterials**, 25, p.6419-6424, 1992.
23. NIJENHUIS, A.J., Thesis Synthesis and properties of lactide polymers, 1995.
24. PETER, S. J.; MILLER, M. J.; YASKO, A. W.; YASZEMSKI M. J.; MIKOS, A. G. - **Journ. Biomed. Mater. Res.**, 43, p. 422 (1998).
25. PYHALTO LAPINSUO M, PATIALA H, NIIRANEN H, TORMALA P, ROKKANEN P. **J Biomater Sci Polym Ed.** 2005;16(6):725-44
26. RAGHUVANSHI RS; SINGH M.; TALWAR GP.; Biodegradable delivery system for single step immunization with tetanus toxin, **.Int J Pharm**,93,R1-5,1993.
27. ROHOVSKY, M.; CHEN E.; CLEMOW, A., and WEISBRODE, S. A five years study of absorbable screws implanted in canine femora and tibiae. In *Biodegradable Implants in Fracture Fixation*, ed. K.S.,

- Leung,L.K.Hung. Chinese University of Hong Kong & World Scientific, 125-134,1994.
28. TERAMACHI, M.; HYON, S. H.; IKADA, Y.; NISHIYA, K. - **Journ. Biomed. Mater. Res.**, 42, p. 475 (1998).
29. TOLEDO FILHO, J. L. et al. Utilização de miniplacas no tratamento de fraturas da mandíbula. **Revista da Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas**. V, 52, n 1, p 55-62, Jan/ Fev,1998
30. TUNC D.C.; ROHOVSKI M.W.; LEHMAN W.B.; STRONGWATER A.; KUMMER F: Evaluation of body absorbable bone fixation devices 31 st **Annual Orthop Pes Soc**, Las Vegas, Nevada, USA, 1985, p 165.
31. VERT, M., LI, S.M., SPENLEHAUER, G. AND GUERIN, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **J. Mater. Sci., Mater. Med**, 3, 432-446,1992.
32. VERT M., SCHWACH G., COUDANE J., Present and future of PLLA polymers, **J. Mater.Sc.Pure Appl. Chem.**, A-32, 593-7, 1995.
33. VERT, M.; CHRISTEL, P; CHABOT, F; LERAY, J : Bioresorbable plastic materials for bone surgery. **Macromolecular Biomaterials**. CRC Press In, Bocaaton, Florida, USA,1984, p 120-142.
34. WAKE, M. C.; GERECHT, P. D.; LU, L.; MIKOS, A. G. - **Biomaterials**, 19, p. 1255 (1998). Yaszemski, M.J.; Payne, R.G.; Hayes, W.C.; Langer, R. & Mikos, A.G.- **Biomaterials**, 17, p.175-185 (1996).
35. WILLIAMS D.F.: Biodegradation of surgical polymers. **J Mater Sci** 17: 1233, 1982.
36. ZOPPI, R. A.; CONTANT, S.; DUEK, E. A. R.; MARQUES, F. R.; WADA, M. L. F.; NUNES, S. P.- **Polymer**, 40, p. 3275 (1999).