

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**

**ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO DA HISTOTOXICIDADE ENTRE O
COPOLÍMERO DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) E A BLENDAS POLI
(ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) / POLI (ISOPRENO)**

JUNG HO KIM

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCUS VINÍCIUS COLLARES

Coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências Cirúrgicas UFRGS

Dr Cleber Dario Pinto Kruel

Dissertação de Mestrado

PORTO ALEGRE

2012

ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO DA HISTOTOXICIDADE ENTRE O COPOLÍMERO DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) E A BLENDAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) / POLI (ISOPRENO)

JUNG HO KIM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração Ciências Cirúrgicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Collares

PORTO ALEGRE

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Kim, Jung

ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO DA HISTOTOXICIDADE ENTRE O COPOLÍMERO DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) E A BLENDAS DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) / POLI(ISOPRENO) / Jung Kim. -- 2012. 97 f.

Orientador: Marcus Collares.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. biomaterial. 2. histotoxicidade. 3. biocompatibilidade. 4. blendas poli(ácido láctico-co-glicólico) / poli(isopreno). 5. copolímero poli(ácido láctico-co-glicólico). I. Collares, Marcus, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha esposa Lisiane Cruz e a meu filho Igor Kim pelo AMOR e compreensão nos momentos em que não pude estar presente. Aos meus pais, Ki Sung Kim e ChunKang Kim, pelo exemplo de ÉTICA, verdadeira bússola apontando o caminho a seguir.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares**, pela sua orientação e confiança em ter me aceito sem nenhum contato prévio. É um modelo de organização, competência e otimização do tempo.

Ao **Dr. Luis Gustavo Calieron**, meu sócio e amigo, que me deu suporte incondicional enquanto me ausentava das minhas atividades profissionais.

Ao **Dr. Rubens Rodriguez**, pela disponibilidade, bom humor e simplificação na análise histológica.

Ao **Dr. Gustavo Juliani Faller**, que me deu uma luz, encaminhando outro projeto quando o primeiro falhou.

Ao **Dr. Diego da Silva Dias**, pela dedicação e entusiasmo com que me ajudou nas atividades práticas. Sem ele, esta dissertação não se concluiria.

À **Dra. Fabíola Schons Meyer**, pela dedicação, disponibilidade e competência no manejo dos animais.

À **Enfermeira Marta Justina Gnoato**, pela competência e sensatez na coordenação da Unidade de Experimentação Animal.

Ao **Dr. Ludgero Frankini Cruz e Sra Rejane Cruz**, pela amizade, exemplo de vida e condições logísticas que me proporcionaram bem-estar durante o todo meu tempo de mestrado.

À **Sra. Andréia Ceres de Oliveira**, pela análise estatística e disponibilidade.

Ao **Dr. Osmar Valadão Lopes Jr**, meu sócio, amigo e colega do programa de mestrado, pelo companheirismo nas centenas de viagens entre Passo Fundo e Porto Alegre.

Ao **Engenheiro Douglas Ramos Marques**, a quem não conheço pessoalmente, porém proporcionou-me a maioria das informações físicas, químicas e mecânicas para realização desta dissertação.

Aos **Funcionários da UEA – HC – POA**, pela amizade e dedicação no cuidado dos animais.

À **Sra. Keli Melo**, minha secretária, que fez a harmonização entre minhas atividades profissionais e acadêmicas.

Ao **Dr. Estefano Kim**, meu irmão, que sacrificou seu tempo com a família e trabalho para me ajudar.

Ao **Dr. Rogério Knebel**, meu colega de mestrado, pelos ensinamentos que me proporcionaram melhor qualidade de vida em Porto Alegre

Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da FAMED da UFRGS, seus professores e funcionários**, pelo aprendizado e pela atenção dispensada a cada um dos seus alunos.

Ao **Laboratório de Bio-Materiais do Departamento de Materiais da Escola de Engenharia UFRGS**, que confeccionou e disponibilizou o material usado neste estudo.

Aos **animais** necessários à realização deste estudo.

RESUMO

Introdução: A aplicação clínica de biomateriais está se expandindo para diversas especialidades médicas. Dentre os diversos tipos de biomateriais, os classificados como temporários merecem atenção especial, pois são assimilados pelo organismo após exercerem sua função, evitando, assim, procedimento cirúrgico para sua retirada. O copolímero de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é um tipo de biomaterial temporário, rotineiramente utilizado na medicina na forma de fios de sutura e implantes ortopédicos. A mistura do PLGA com o poli (isopreno) resulta em uma blenda (PLGA / PI), de alta resistência e tenacidade, que foi desenvolvida pelo Laboratório de Biomateriais do Instituto de Engenharia da UFRGS. Entretanto, não existem estudos *“in vivo”* testando a reação óssea desta blenda. **Objetivo:** Testar a histotoxicidade da blenda de PLGA / PI em relação ao biopolímero já consagrado PLGA. **Método:** Foram utilizados 46 ratos machos wistar (*Rattus norvegicus* - linhagem albina), divididos em 2 grupos conforme o material implantado (PLGA ou PLGA / PI) na calota craniana, e subdivididos em tempos de morte (15, 30, 60 e 90 dias). Os procedimentos foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Após a morte, a calota craniana foi retirada, submetida ao exame histopatológico e aplicado o escore de Dadas e cols (14) modificado. **Resultados:** A diferença da histotoxicidade dos dois materiais não foi significativa nos períodos 15, 30 e 90 dias, porém foi significativa no período 60 dias. **Conclusão:** A histotoxicidade do PLGA / PI, ao final do estudo (90 dias), foi semelhante ao PLGA, demonstrando equivalência em longo prazo. O período de 60 dias pós-cirúrgico (grupo da blenda) foi o único em que a histotoxicidade mostrou-se significativamente maior. Mais estudos devem ser feitos para melhorar o entendimento desta variação.

Palavras-chave: biomateriais, histotoxicidade, biocompatibilidade, blenda de pc (ácido láctico-co-glicólico) / poli (isopreno), copolímero de poli (ácido láctico-co-glicólico).

ABSTRACT

Introduction: Clinical application of biomaterials is expanding to various medical specialties. Among the different types of biomaterials, those classified as temporary deserve special attention because they are assimilated by the body after exercising their function, thereby avoiding surgical procedure for their removal. Co-polymer poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a type of temporary biomaterial, routinely used in medicine as suture threads and orthopedic implants. The mixture of PLGA with poly (isoprene) results in a high-strength and toughness blend (PLGA / PI), developed by the Biomaterials Laboratory of the Engineering Institute/ UFRGS. However, there are no studies “*in vivo*” testing the bone reaction of that blend. Objective: To Test histotoxicity of PLGA / PI blend over the already established biopolymer, PLGA. Method: Forty six male Wistar rats (*Rattus norvegicus* – albino strain), divided into 2 groups according to the material (PLGA or PLGA / PI) implanted in the skull and sub divided into periods of death (15, 30, 60 and 90 days). The procedures were developed in the Animal Experiment Unit (AEU) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). After death, the skull was removed, submitted to histopathologic examination and the modified Dadas’ et all score was used (14). Results: The histotoxicity difference of the two materials was not significant in the periods of 15, 30 and 90 days, but it was significant in the period of 60 days. Conclusion: At the end of the study (90 days), the PLGA / PI histotoxicity was similar to PLGA, showing long-term equivalence. The 60-day post-surgical period was the only one in which histotoxicity was significantly higher (blend group). More studies shall be done in in order to better understand that variation.

Key words: biomaterials, histotoxicity, biocompatibility, poly (lactic-co-glycolic acid) / poly (isoprene), poly (lactic-co-glycolic acid) copolymer.

LISTA DAS ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AHA: alfa hidróxi ácidos

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

a.C.: Antes de Cristo

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CIOMS: Council for International Organization of Medical Sciences

CCG: Crescimento de cadeia catalizado

CHCl₃: Clorofórmio

GB: Grupo da blenda

GC: Grupo do copolímero

HCl: Ácido clorídrico

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: Hematoxilina Eosina

MoM: Artroplastia tipo metal - metal

PDMS: Poli (dimetilsiloxano)

PDLLA: Poli (ácido D-L láctico)

PGA: Poli (ácido glicólico)

PHB: Poli (β - hidroxibutirato)

PI: Poli (isopreno)

PLA: Poli (ácido láctico)

PLGA: Poli (ácido láctico-co-glicólico)

PLGA/PI: Poli (ácido láctico-co-glicólico)/Poli (isopreno)

PLLA: Poli (L-ácido láctico)

PMMA: Poli (metacrilato de metila)

PPD: Poli (p-doxanona)

PU: Poliuretanas

PVA: Poli (ácido vinílico)

PVP: Poli (vinilpirolidona)

TMC: Trimetileno carbonato

UEA: Unidade de Experimentação Animal

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSM: Universidade Federal de Santa Maria

UHMWPE: Polietileno

UNESCO: Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Cultura

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO EM PORTUGUÊS

Figura 1: Composição química de um poliéster alifático.....	42
Figura 2: Copolímero de poli(ácido láctico-co-glicólico).....	45
Figura 3: Blenda de poli(ácido láctico-co-glicólico) / poli(isopreno).	45
Figura 4: Rato anestesiado, posicionado, tricotomizado e marcado local da incisão.	47
Figura 5: Abertura do periósteo no local da osteotomia.....	48
Figura 6: Material colocado bem justo em falha óssea.	49
Figura 7: Sutura realizada.	49
Figura 8: Período pós-operatório	50
Figura 9: Presença de corpo estranho com reação e célula gigante multinucleada ao redor.....	53
Figura 10: Inflamação leve: raros neutrófilos, raros mononucleares em meio a fibrose e proliferação vascular.	53
Figura 11: Presença de reação inflamatória moderada com frequentes neutrófilos (A) e macrófagos (B).....	53
Figura 12: Presença de reação inflamatória grave com presença de numerosos mononucleares e neutrófilos (seta).....	54
Figura 13: Fibrose leve: faixas de fibrose em meio ao tecido ósseo.	54
Figura 14: Fibrose moderada: fibroblastos jovens, com vasos dilatados e congestos.	54
Figura 15: Fibrose grave: área extensa de fibrose com fibroblastos maduros e fibrose espessa.....	55
Figura 16: Tecido de granulação: proliferação vascular (A), mononucleares, edema e polimorfonucleares (B).	55
Figura 17: Tecido ósseo normal: lamelas ósseas de distribuição regular (seta), osteócitos pequenos e fusiformes.....	55
Figura 18: Tecido ósseo proliferativo: lamelas ósseas de distribuição irregular (seta), osteócitos maiores em espaços irregulares.....	56
Figura 19: Calo ósseo proliferativo.....	56
Figura 20: Tecido fibrocartilaginoso proliferativo: (A) cartilagem (B) fibrose.....	56
Figura 21: Avaliação da concordância entre os avaliadores conforme Bland-Altman. A linha central representa a média das diferenças. As linhas pontilhadas inferior e superior representam o intervalo de 95% de concordância.....	58
Figura 22: Comportamento da histotoxicidade de ambos os materiais conforme os dias de morte.	59
Figura 23: Escore histológico conforme grupo e dias de morte (* P<0,05).....	60
Figura 24: Copolímero PLGA aos 60 dias pós-operatório	61
Figura 25: Blenda de PLGA / PI aos 60 dias de pós-operatório.	61

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO EM INGLÊS

Figure 1: Chemical composition of aliphatic polyester	72
Figure 2: Poly (lactic-co-glycolic acid)/ poly(isoprene) blend	75
Figure 3: Poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer	75
Figure 4: Rat anesthetized, positioned, trichotomized and the incision place marked	77
Figure 5: Opening of the periosteum at the osteotomy site.....	78
Figure 6: Material placed tightly in the bone defect.....	79
Figure 7: Suture.....	79
Figure 8: Postoperative period	80
Figure 9: Presence of foreign body with reaction and multinucleated giant cell around.	83
Figure 10: Mild inflammation: rare neutrophils, rare mononuclear amid fibrosis and vascular proliferation.	83
Figure 11: Presence of mild inflammatory reaction with frequent neutrophils (A) and macrophages (B).....	83
Figure 12: Presence of severe inflammatory reaction with the presence of several mononuclear and neutrophils (arrow).	84
Figure 13: Mild fibrosis; tracks of fibrosis amid the bone tissue.	84
Figure 14: Moderate fibrosis: Young fibroblasts, with dilated and congested blood vessels.	84
Figure 15: Severe fibrosis: extensive area of fibrosis with mature fibroblasts and thick fibrosis.	85
Figure 16: Granulation tissue: vascular proliferation (A), mononuclears, edema and polymorphonuclears (B).	85
Figure 17: Normal bone tissue: lamellar bones with regular distribution (arrow), small and fusiform osteocytes.	85
Figure 18: Proliferative bone tissue: lamellar bones with irregular distribution (arrow), larger osteocytes in irregular spaces.	86
Figure 19: Proliferative bone callus.....	86
Figure 20: Fibrocartilaginous proliferative tissue: (A) cartilage (B) fibrosis.	86
Figure 21: Concordance evaluation among the evaluators according to Bland-Altman. The central line represents the average of differences. The inferior and superior dotted lines represent the 95% concordance interval.	88
Figure 22: Histotoxicity behavior of both materials according to days of death.	89
Figure 23: Histological score according to the group and days of death (* P<005).	90
Figure 24: PLGA Copolymer at postoperative 60 days.....	91
Figure 25: PLGA / PI Blend at postoperative 60 days.....	91

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO EM PORTUGUÊS

Tabela 1: Avaliação do escore histológico por grupo e por dias de morte.....	58
Tabela 2: Avaliação dos itens do escore histológico conforme dias de morte e grupo.	60

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO EM INGLÊS

Table 1: Evaluation of histological score per group and per death days.....	88
Table 2: Evaluation of items of the histological score according to days of death and group	90

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Biomateriais	19
2.1.1	Aço inoxidável	22
2.1.2	Titânio.....	22
2.1.3	Cromo cobalto	23
2.1.4	Ossos liofilizados	23
2.2	Polímeros.....	23
2.3	Utilização clínica dos biopolímeros.....	24
2.3.1	Poliésteres alifáticos.....	25
2.4	Poli ácido láctico-co-glicólico).....	26
2.5	Poli(Isopreno).....	27
2.6	Blenda PLGA/PI.....	28
2.7	Histotoxicidade	29
2.8	Tendências atuais.....	31
3.	JUSTIFICATIVA	32
4.	REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
5.	OBJETIVOS	39
5.1	Objetivo geral.....	39
5.2	Objetivos específicos.....	39
6.	ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS	40
7.	ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	70

1. INTRODUÇÃO

Várias áreas do conhecimento humano têm-se empenhado no desenvolvimento de biomateriais. Sua aplicação clínica é um dos fatores responsáveis pelo avanço da Medicina nos últimos 50 anos (1). Os benefícios englobam todas as faixas etárias e grande gama de patologias.

Com a evolução de novos implantes e aparelhos que diminuem a morbidade do procedimento cirúrgico e melhoram a qualidade de vida, pessoas com malformações e deformidades congênitas têm uma abordagem mais reconstrutiva e menos invasiva (2-4).

Pacientes vítimas de traumatismos, têm uma recuperação mais rápida com retorno da função do membro afetado graças à evolução dos sistemas de reconstrução ligamentares, ósseas e articulares (5, 6) e, mesmo pacientes amputados têm à disposição próteses cada vez mais sofisticadas (7, 8) que reproduzem com fidelidade a função do membro normal.

Finalmente, o idoso não almeja somente viver mais; ele quer viver melhor. Para isto, lança mão de diversas atividades físicas e comportamentais (9), assim como da tecnologia que não só o auxilia tanto na otimização da utilização do corpo, mas também provê equipamentos, medicamentos e implantes que auxiliam na melhora da função dos tecidos encanecidos (10).

O primeiro relato de um material não biológico no corpo humano data da Pré-história. Recentemente, arqueólogos encontraram, nos Estados Unidos da América, um indivíduo mumificado em bom estado de conservação que tinha a ponta de uma lança encravada no quadril (Kennewick Man), fato que não o impediu de praticar as

atividades diárias. Os Maias, em 600 a.C., usavam o nácar para substituir os dentes. Os antigos egípcios faziam suturas com linho. Na Idade Média, os europeus desenvolveram o “catgut”, e, em 1957, Dr. Willem Kolff testou o primeiro coração artificial em cães (11).

Atualmente, há uma revolução em andamento. Onde antes eram só pesquisas, hoje existe um mercado que movimenta aproximadamente 35 bilhões de dólares anuais com uma taxa de crescimento de 11% ao ano (12). Assim, a necessidade de aprofundar o conhecimento e a otimização de cada propriedade química, física e forma de assimilação pelo organismo também aumentam.

A otimização de algumas propriedades e consequente desempenho dos biomateriais podem ser conseguidas com a copolimerização ou com a confecção de blendas (13, 14). Copolímero é a mistura de monômeros distintos ou polímeros, com afinidades semelhantes, que são obtidos por iniciação radicalar ou iônica (15). Blenda polimérica é a mistura física de dois ou mais polímeros ou copolímeros que não estão ligados por ligações covalentes (16, 17). Esse artifício é muito usado com materiais derivados dos poliésteres alifáticos, cujos principais representantes são os ácidos poli (ácido láctico) (PLA) e poli (ácido glicólico) (PGA) (18), e também com elementos naturais como as poliuretanas (PU) (derivadas da mamona) (19, 20), quitosana (derivada da quitina dos crustáceos) (21, 22), gutta-percha (23, 24) e isopreno (25-27).

A utilidade dos biomateriais é ampla nas Ciências da Saúde, dentre as quais destacam-se: promotores de regeneração celular, “*scaffolds*”, dispositivos protéticos, material de osteossíntese e “*stents*” de expansão vascular, brônquica e óssea (craniossinostoses). Para medir a segurança dos materiais, devem ser realizados testes

“in vivo”, que definam a sua viabilidade, estipulando a toxicidade através da observação de reação inflamatória, corpo estranho, produção de fibroblastos e resposta do tecido ósseo (18, 28-33).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais

Biomateriais são elementos sintéticos ou naturais que desempenham sua função em contato com sistemas biológicos (1). No Brasil, a ANVISA, que controla a pesquisa, desenvolvimento e comercialização destes materiais, define-os como: “materiais e artigos de uso médico ou odontológico, destinados a serem introduzidos total ou parcialmente no organismo ou em orifício do corpo, ou destinados a substituir uma superfície epitelial ou superfície do olho, através de intervenção médica, permanecendo no corpo após o procedimento por um período superior a 30 dias, e podendo ser removido unicamente por intervenção cirúrgica” (34). Todavia, grande parte da comunidade científica ainda aceita o consenso adotado na Conferência em Biomateriais para Aplicações Clínicas de 1982 como sendo “toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que, durante um período de tempo indeterminado, é empregada como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais” (35).

O uso destes elementos exige cuidados extremos devido ao risco que impõe à vida do usuário (16). Esses conhecimentos foram sendo adquiridos durante a evolução da ciência médica com a consolidação de conceitos como biocompatibilidade, bioadaptabilidade e biofuncionalidade.

Segundo Ravaglioli & Krajewski (28), biocompatibilidade é a tolerância do tecido hospedeiro ao material e seus produtos de degradação, sem prejuízos ao organismo a curto e longo prazo.

Bioadaptabilidade é a habilidade de o material se tornar integrado (histologicamente) a um tecido hospedeiro e, possivelmente, também agir de acordo com os valores bioquímicos locais (28).

Biofuncionalidade é a habilidade de o material desempenhar imediatamente e de maneira bem sucedida as funções (estática ou dinâmica) específicas do tecido substituído (28).

Portanto, na prática clínica, o material ideal deve conter as características acima mencionadas além de ser esterilizável (36). Mas, infelizmente o material ideal ainda não está disponível.

Clinicamente muitos materiais têm sido empregados como biomateriais, variando dentro dos limites aceitáveis nas diversas características antes citadas, sendo que os principais são: titânio, aço inoxidável, cromo cobalto, polimetilmetacrilato, uretano, teflon, silicone, gutta-percha, quitosana, osso liofilizado e os poliésteres alifáticos (1).

Os biomateriais podem ainda ser classificados conforme seu comportamento fisiológico:

- Biotoleráveis: tolerados pelo organismo com formação de camada envoltória de tecido fibroso. Essa camada é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão por parte do material

implantado. Quanto maior a espessura do tecido formado, menor a tolerabilidade (29).

- Bioinertes: a formação do envoltório fibroso é mínima ou inexistente (29).
- Bioativos: ocorrem ligações químicas entre o material e o tecido ósseo (osteointegração) (8,28).
- Biodegradáveis: sofrem degradação macromolecular e dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo (18, 30).
- Bioreabsorvíveis: mostram degradação através da diminuição de tamanho, e são reabsorvidos *in vivo* e eliminados por rotas metabólicas (18, 30).
- Bioabsorvíveis: podem-se dissolver em fluidos corpóreos sem clivagem da cadeia macromolar ou diminuição de massa molecular (18, 30).

As últimas três qualidades referem-se especialmente a alguns poli (alfa-hidróxi ácidos) (AHA) cujos principais representantes são: Poli (ácido glicólico) (PGA), Poli (ácido láctico) (PLA), Poli (ácido láctico-co-glicólico)(PLGA), Poli (ácido L láctico)(PLLA), Poli (ácido D-L láctico)(PDLLA) e Trimetileno carbonato (TMC). Esses compostos são também chamados de poliésteres alifáticos e classificados como biomateriais sintéticos temporários, pois não necessitam de procedimento cirúrgico para sua retirada (16, 18).

Seguindo a tendência ecológica mundial, está cada vez mais em voga o uso de biomateriais não sintéticos (naturais), de fontes renováveis, que não agriam a natureza. O poli (isopreno) (PI), polímero derivado da *Hevea brasiliensis* (látex), é um

dos mais promissores, pois além da biocompatibilidade é um estimulador da angiogênese (37, 38).

2.1.1 Aço inoxidável

Implantes de aço inoxidável são de fácil obtenção e baratos, por isso são amplamente usados em cirurgias ortopédicas e craniofaciais. French e cols. (39) relataram liberação mínima de produtos tóxicos e reação tecidual. Porém, em um ensaio clínico aberto de Dugal e cols. (40), que investigou corrosão do implante e reação tecidual ao redor do implante em pacientes submetidos à osteossíntese por fratura facial, observou-se reação inflamatória nos tecido adjacentes, criação de capa de fibrose e até corrosão da borda do implante.

2.1.2 Titânio

O titânio é uma alternativa para o uso do aço inoxidável, pois possui melhor biocompatibilidade e menor módulo de elasticidade além de ser resistente à corrosão (41, 42). Porém, é mais caro e, se não preparado para uso médico, podem ocorrer reações eletroquímicas com desprendimento de íons metálicos formando uma cápsula de cor escura denominada metalose (43).

2.1.3 Cromo cobalto

A liga de cromo cobalto está sendo extensamente usada em artroplastias dos quadris tipo metal-metal (MoM). Essa liga, por ser mais biocompatível, tem feito com que as artroplastias durem mais de 20 anos, sendo então indicadas para pacientes jovens (44). Porém, Devitt e cols. demonstraram a toxicidade do íon cobalto tanto localmente quanto disseminado em tecidos como rim, pele, intestino e estômago (45).

2.1.4 Osso liofilizado

O osso xenogênico submetido a um método de processamento e armazenamento (liofilização) visando à diminuição da antigenicidade e capacidade de esterilização está sendo cada vez mais utilizado em Odontologia e Ortopedia em razão da fácil obtenção, disponibilidade e similaridade. Galia (46) descreve que a composição química, porosidade, tamanho, forma e comportamento biológico do osso bovino são semelhantes ao humano, fornecendo excelente estrutura de suporte e osteocondução, essenciais para neoformação do tecido ósseo.

2.2 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas de várias classes químicas, elevada massa molecular e formadas por unidades repetidas chamadas *meros* através da reação de polimerização (16, 17, 26, 47). Quando um polímero apresenta biocompatibilidade,

biofuncionalidade e bioadaptabilidade, pode ser chamado de biopolímero, pois preenche os requisitos para uso clínico (48).

2.3 Utilização clínica dos biopolímeros

O biopolímero de maior demanda na medicina é a borracha de silicone ou Poli (dimetilsiloxano)(PDMS), principalmente usada na cirurgia plástica como próteses para preenchimento em várias áreas. Possui excelente flexibilidade, estabilidade e é menos sensível à ação térmica devido à baixa temperatura de transição vítrea (47). Porém é apenas biotolerável, e a ruptura do envoltório pode causar encapsulamento e granuloma.

O polietileno (UHMWPE) é um biopolímero usado principalmente como superfície articular em artroplastias recobrando a porção metálica. Possui alta estabilidade química e, portanto, baixa reação tecidual, porém, com a movimentação articular, libera debris e como não é absorvível, os debris causam osteólise, instabilizando a interface osso metal.

O poli (metacrilato de metila)(PMMA) é um biopolímero utilizado como cimento de fixação de implantes ósseos e odontológicos através da polimerização do monômero metilmetacrilato com a utilização do acrílico líquido. Essa reação exotérmica atinge temperaturas de 70°C, ocasionando, por vezes, danos aos tecidos (49).

Esses polímeros são exemplos de biopolímeros permanentes, e têm a função de substituição, porém possuem um período de duração média de 15 anos (1), portanto, não são ideais quando se objetiva uma recuperação gradual dos tecidos.

Em outras situações, o biopolímero serve como um suporte temporário enquanto há restabelecimento tecidual. Exemplos são as osteossínteses, que fornecem estabilidade temporária, propiciando ao tecido ósseo a recuperação gradativa da funcionalidade (4, 16), evitando a blindagem de tensão e conseqüente enfraquecimento ósseo. Os poliésteres alifáticos incluem-se nessa classe.

2.3.1 Poliésteres alifáticos

Os hidróxi ácidos, ou ácidos hidróxicarboxílicos, são compostos orgânicos ácidos que contêm tanto uma hidroxila quanto um grupo carboxila. De acordo com a posição (alfa, beta, gama) do carbono com a hidroxila em relação ao carbono da carboxila, têm-se os vários tipos de hidróxi ácidos (50).

Poliésteres alifáticos são materiais derivados dos poli (alfa-hidróxi ácidos), polímeros dos hidróxi ácidos com um grupo carboxila terminal, grupamento hidroxila na posição alfa e uma cadeia carbônica de comprimento variável. Alguns exemplos utilizados como biomateriais são: PDMS, PDLLA, PGA, PLA, PLGA e PLLA (18).

O uso médico dos poliésteres alifáticos remonta à II Guerra Mundial, quando uma solução de poli (vinilpirolidona)(PVP) foi usada como expansor plasmático (51).

Atualmente, encontram-se no mercado vários produtos derivados dos poliésteres alifáticos como fios de sutura (Dexon®, Vicryl®, PDS®) e dispositivos para fixação óssea (Biofix®, FixSorb®, Neofix®, Resorpin®). Esses produtos são classificados como biomateriais temporários.

2.4 Poli ácido láctico-co-glicólico)

Esse material (PLGA) é um produto da co-polimerização do ácido láctico e ácido glicólico que, apesar de ter uma baixa flexibilidade, hidrolisa lentamente dentro do corpo e entra no metabolismo dos carboidratos através do ciclo de Krebs (bioreabsorvível) (16).

O poli (ácido glicólico) (PGA) é o mais simples poliéster linear alifático, tem a conversão de seus fragmentos moleculares em glicina e posteriormente em ácido pirúvico, podendo ser eliminado na urina ou pela respiração (ciclo de Krebs); no entanto, sua maior limitação está na instabilidade hidrolítica com baixo tempo de reabsorção (6 meses - 1 ano) (16).

O poli (ácido láctico) também é um poliéster linear alifático simples, mas com uma metila como ramificação de cadeia. Devido à isomeria, proporciona a forma destrógira (ácido D-láctico) e levogira (ácido L-láctico). Dentre os polímeros gerados o poli (ácido L-láctico) (PLLA), é o que possui alta resistência à tração, plasticidade

térmica e boa processabilidade, além de permanecer no organismo por até 24 meses. Por isto, é o escolhido para fazer parte do copolímero (16).

Tais materiais despertaram interesse na confecção de implantes temporários sem a necessidade de uma segunda cirurgia para retirada (52-56). Outra vantagem do PLGA frente aos implantes metálicos é a ausência de processos inflamatórios decorrentes da liberação de íons pelo metal.

O PLGA e seus homopolímeros têm fácil processamento em formatos específicos, podendo se adaptar de acordo com o local de aplicação.

2.5 Poli (Isopreno)

É um polímero originado do látex de borracha natural que é extraído em forma leitosa do caule da árvore *Hevea brasiliensis* (seringueira). O polímero natural tem a fórmula cis-1,4-poliisopreno (57), sendo adicionada amônia, centrifugado e removido os contaminantes naturais com acetona. O polímero obtido então tem cerca de 97% do isômero cis-1,4-poliisopreno, que pode ser também obtido por sintetização em laboratório, porém a borracha natural possui melhor resistência à tração, propagação de rasgo e excelente estabilidade térmica (58).

O uso clínico do Poli (isopreno) é relatado desde o tempo Pré-colombiano. No Brasil, as tribos indígenas ainda utilizam-no como cicatrizante, provavelmente pelo fenômeno de aumento da vascularização local (25), propriedade que pode ser

melhorada com a adição de poli (lisina). Todavia sua principal qualidade é a tenacidade, que “é a medida da capacidade de um material absorver energia até a fratura” (59).

Balabanian e cols. implantaram grânulos de látex em alvéolo dentário de ratos, observando tecido conectivo ósseo circundante sem inflamação ou reação de corpo estranho (37). Resultado semelhante é relatado por Oliveira e cols. no tratamento da perfuração timpânica com membrana de látex. Foi observada formação tecidual ao redor do implante sem formação de envoltório fibroso (60). No entanto, segundo Lopes (57), a hipersensibilidade cutânea ao látex se mostra em cerca de 1-3% da população, sendo que este valor se expande para 5-12% em trabalhadores da área da saúde, como médicos, enfermeiros, dentistas e cientistas. Esta parcela da população apresenta uma exposição contínua ao contato com o látex, principalmente pelo uso de luvas, desenvolvendo reações adversas como dermatites.

2.6 Blenda PLGA/PI

Blenda polimérica é a mistura física de dois ou mais polímeros ou copolímeros que não estão ligados por ligações covalentes.

Para confecção de uma blenda, é necessário levar em conta a composição química dos polímeros ou co-polímeros envolvidos e suas características de solvência. A solubilidade dos AHA e a aplicabilidade ao PI fazem do clorofórmio (CHCl_3) um solvente adequado para obtenção desta mistura, portanto a blenda de PLGA/PI na proporção 50/50 é classificada como uma blenda de solução. Os polímeros são

dissolvidos em CHCl₃ que, após, é removido por secagem, o que é bem conveniente, pois o CHCl₃ é extremamente volátil (16).

Como o PLGA e o PI não são solúveis entre si, a blenda na proporção 50/50 é imiscível, porém homogênea com propriedades adequadas de resistência à tensão, fricção e tração (16).

Com o objetivo de maximizar as qualidades de diversos biomateriais, o desenvolvimento de blendas tem-se tornado uma das áreas com mais rápido crescimento na ciência dos polímeros (13). A blenda de PLGA/PI pretende ser um material biocompatível, com alta resistência e tenacidade, além de possuir uma ótima resposta vascular (neovascularização). São necessários estudos “*in vivo*” para avaliar a viabilidade do uso clínico deste material.

2.7 Histotoxicidade

Para avaliação da biocompatibilidade, vários testes são necessários. Os materiais são submetidos a testes “*in vitro*”, citotoxicidade (em laboratório) e “*in vivo*” (histotoxicidade) (16, 23).

Os testes “*in vitro*” avaliam, através de meios químicos, físicos e mecânicos, as diversas propriedades ligadas à biocompatibilidade.

Testes de citotoxicidade utilizam linhagens celulares (geralmente HepG2) semeadas em placas, e verificam a contagem de células vivas remanescentes.

Já os testes “*in vivo*”, que verificam histotoxicidade, são realizados com implantação do material em organismo vivo.

Os testes de histotoxicidade são os mais fidedignos e são autorizados geralmente após a verificação de viabilidade dos outros testes (23, 31, 32).

A histotoxicidade é medida pelo grau de reação inflamatória, presença de cápsula fibrosa, necrose tecidual e reação de corpo estranho (23, 37, 61). Isto foi definido há vários anos, em um estudo de Kulkarni e cols., de 1971, onde foram implantados filmes de poli (L ácido láctico) (PLLA) no subcutâneo de porcos, com uma reação inflamatória muito leve na primeira semana, atividade fibroblástica na segunda e ausência de inflamação na quarta semana (62).

Garcia-Garcia, em uma revisão sistemática com diversos *stents* coronarianos, concluiu ausência de efeitos inflamatórios crônicos, melhorando a liberação dos fármacos do dispositivo em *stents* bioreabsorvíveis (63).

O PLGA em nanopartículas, utilizado como carreador de drogas e aplicado em ratos, não revelou toxicidade (inflamação ou dano tecidual) em amostras cerebrais, baço e rins (64).

Já o poli (isopreno) não é um polímero absorvível; as membranas induzem regeneração celular, mas não se incorporam ao tecido receptor, sendo eliminado do contato tecidual em aproximadamente 15 dias. Todavia em implantes alveolares, não houve reação inflamatória ou reação de corpo estranho. Portanto, percebe-se que a

presença de proteínas na composição do polímero nem sempre apresenta hipersensibilidade (37).

Na escassez de estudos que meçam o efeito da histotoxicidade no tecido ósseo, Dadas e cols. (65) criaram uma escala de graduação simples, reproduzível e objetiva que leva em conta o processo inflamatório, reação de corpo estranho, formação de fibroblastos, tecido de granulação e resposta tecidual.

2.8 Tendências atuais

O Brasil ainda vive um período de grandes contrastes sociais. Alguns têm acesso à medicina de última geração, outros não possuem sequer saneamento básico. Essa situação restringe o acesso de grande parte da população à área da bioengenharia (66). Como a maioria dos biomateriais é importada e de alto custo, o desenvolvimento da blenda PLGA/PI pelo Laboratório de BioMateriais do Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS abre um novo caminho para desenvolvimento da tecnologia e inclusão social.

3. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento da blenda de PLGA/PI introduz um material de maior resistência e tenacidade se comparada ao material padrão comercializado de copolímero PLGA, todavia são necessários testes de histotoxicidade para verificar viabilidade *“in vivo”*.

4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J. Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavour. Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine. 2nd ed: Elsevier; 2004.
2. Oliveira C, Zamakhshary M, Alfadda T, Alhabshan F, Alshalaan H, Miller S, et al. An innovative method of pediatric chest wall reconstruction using Surgisis and swinging rib technique. *Journal of Pediatric Surgery*. 2012 5//;47(5):867-73.
3. Biskup NI, Singh DJ, Beals S, Joganic EF, Manwaring K. Pediatric Cranial Vault Defects: Early Experience With [beta]-Tricalcium Phosphate Bone Graft Substitute. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2010;21(2):358-62 10.1097/SCS.0b013e3181cf606b.
4. Sena P, Manfredini G, Barbieri C, Mariani F, Tosi G, Ruozi B, et al. Application of poly-L-lactide screws in flat foot surgery: histological and radiological aspects of bio-absorption of degradable devices. *Histology and histopathology*. 2012 Apr;27(4):485-96. PubMed PMID: 22374726.
5. Barber FA, Dockery WD, Hrnack SA. Long-Term Degradation of a Poly-Lactide Co-Glycolide/ β -Tricalcium Phosphate Biocomposite Interference Screw. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2011 5//;27(5):637-43.
6. Sagherian BH, Claridge RJ. Porous tantalum as a structural graft in foot and ankle surgery. *Foot & ankle international / American Orthopaedic Foot and Ankle Society [and] Swiss Foot and Ankle Society*. 2012 Mar;33(3):179-89. PubMed PMID: 22734278.
7. Klute GK, Glaister BC, Berge JS. Prosthetic Liners for Lower Limb Amputees: A Review of the Literature. *Prosthetics and Orthotics International*. 2010 June 1, 2010;34(2):146-53.
8. Tillander J, Hagberg K, Hagberg L, Brånemark R. Osseointegrated Titanium Implants for Limb Prostheses Attachments: Infectious Complications. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2010;468(10):2781-8.
9. Kemmler W, von Stengel S, Bebenek M, Engelke K, Hentschke C, Kalender WA. Exercise and fractures in postmenopausal women: 12-year results of the Erlangen Fitness and Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2012 Apr;23(4):1267-76. PubMed PMID: 21625881.

10. Burston BJ, Barnett AJ, Amirfeyz R, Yates PJ, Bannister GC. Clinical and radiological results of the collarless polished tapered stem at 15 years follow-up. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*. 2012 July 1, 2012;94-B(7):889-94.
11. Ratner B. *Biomaterials Science: A History of Biomaterials*. In: Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J, editors. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed: Elsevier; 2004 p. 10-5.
12. Oréfice R. Biomateriais [cited 2012 11/11]. Available from: <http://www.demet.ufmg.br/docentes/rodrigo/biomateriais.htm>.
13. Chen C-C, Chueh J-Y, Tseng H, Huang H-M, Lee S-Y. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. *Biomaterials*. 2003 3//;24(7):1167-73.
14. Vanin M, Santana CC, Torriani ÍL, Privelic T, Duek EAR. Estudo da degradação "in vitro" de blendas de poli(b-hidroxibutirato) (PHB) / poli(L-ácido lático) (PLLA) na forma de filmes. *Polímeros*. 2004;14:187-93.
15. Valente A, Zinck P, Mortreux A, Visseaux M. Catalytic Chain Transfer (co-)Polymerization: Unprecedented Polyisoprene CCG and a New Concept to Tune the Composition of a Statistical Copolymer. *Macromol Rapid Commun*. 2009 04/01;30(7):528-31. eng.
16. Marques DG. Obtenção e caracterização de blendas poliméricas de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) para aplicação como biomaterial. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
17. Stevens MP. *Polymer Chemistry: An Introduction*. New York: Oxford University Press; 1999.
18. Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and Biocompatibility of Aliphatic Polyesters. *J Mater Sci-Mater M*. 1992 Nov;3(6):432-46. PubMed PMID: WOS:A1992JY82000008. English.
19. Barsam MF, Bittar RC, Mazzer N, Barbieri CH, Neto JB. Reação tecidual induzida pelos implantes de silicone e de polímero da mamona usados como espaçadores de tendão: estudo Experimental Comparativo. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2003;38(5):291-300.
20. Maria PP, Padilha Filho JG, Castro MB. Análise macroscópica e histológica do emprego da poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicada na tibia de cães em fase de crescimento. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2003;18:332-6.

21. Costa Jr. EdS, Mansur HS. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova*. 2008;31:1460-6.
22. Rodrigues IR. Síntese e caracterização de redes poliméricas a base de quitosana com PVP e PVA para aplicação na liberação controlada de fármacos. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
23. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: A review. *Australian Endodontic Journal*. 2008;34(1):30-5.
24. Schäfer E, Nelius B, Bürklein S. A comparative evaluation of gutta-percha filled areas in curved root canals obturated with different techniques. *Clinical Oral Investigations*. 2012;16(1):225-30.
25. Brydson JA. *Rubbery Materials and their compounds*: Elsevier Science Publisher; 1988.
26. Mano EB, Mendes LC. *Introdução a polímeros*. São Paulo: Editora Edgard Blucher; 1999.
27. Zimmermann M. *A membrana de látex para correção de defeitos musculares em cães e coelhos*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2007.
28. Ravaglioli A, Krajewski A. *Bioceramics: materials, properties, applications*. New York: Chapman & Hall; 1992.
29. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*. 2005;15:13-21.
30. Hench LL, Wilson J. *Introduction to Bioceramics*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Ltd; 1993.
31. Knight PT, Kirk JT, Anderson JM, Mather PT. In vivo kinetic degradation analysis and biocompatibility of aliphatic polyester polyurethanes. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Aug;94A(2):333-43. PubMed PMID: WOS:000279482600001. English.
32. Scislowska-Czarnecka A, Pamula E, Tlalka A, Kolaczowska E. Effects of Aliphatic Polyesters on Activation of the Immune System: Studies on Macrophages. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012 //;23(6):715-38.
33. De Feo F, Jacobson S, Nyska A, Pagani P, Traverso CE. Histological Biocompatibility of a Stainless Steel Miniature Glaucoma Drainage Device in Humans: A Case Report. *Toxicologic Pathology*. 2009 June 1, 2009;37(4):512-6.

34. BRASIL, ANVISA. Produtos para saúde: Conceitos técnicos [cited 2012 11/11]. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br>
35. Williams DF. Definitions in biomaterials. In: William DF, editor. Progress in Biomedical Engineering. Amsterdam Elsevier; 1987.
36. Fischmann GS. Characterization of Bioceramics. Bioceramics: Material and applications. Westerville 1994. p. 59-71.
37. Balabanian C, aacute, udia ACA, Coutinho-Netto J, Lamano-Carvalho TL, Lacerda SA, et al. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. Journal of Oral Science. 2006;48(4):201-5.
38. Mrue F, Netto JC, Ceneviva R, Lachat JJ, Thomazini JA, Tambelini H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. Materials Research. 2004;7:277-83.
39. French HG, Cook SD, Haddad RJ. Correlation of tissue reaction to corrosion in osteosynthetic devices. Journal of Biomedical Materials Research. 1984;18(7):817-28.
40. Dugal A, Thakur G. Surface analysis of indigenous stainless steel miniplates used in facial fractures. Journal of maxillofacial and oral surgery. 2010 Dec;9(4):403-6. PubMed PMID: 22190833. Pubmed Central PMCID: 3177475.
41. Harris W. Long term biocompatibility of fiber titanium composites, in advanced concepts in total hip replacement. New Jersey: Slack; 1985.
42. Oonishi H, Yamamoto M, Ishimaru H, Tsuji E, Kushitani S, Aono M, et al. The effect of hydroxyapatite coating on bone growth into porous titanium alloy implants. Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume. 1989 March 1, 1989;71-B(2):213-6.
43. Gatcher A, Galante J. Titanium-fiber-metal. Hirexperimentele und klinischeuntersuchungen. Morscher. Die zementlosefixation von huftendoprothesen. Verlag: Springer; 1983.
44. Schmalzried TP, Peters PC, Maurer BT, Bragdon CR, Harris WH. Long-duration metal-on-metal total hip arthroplasties with low wear of the articulating surfaces. The Journal of arthroplasty. 1996 Apr;11(3):322-31. PubMed PMID: 8713913.
45. Devitt BM, Queally JM, Vioreanu M, Butler JS, Murray D, Doran PP, et al. Cobalt ions induce chemokine secretion in a variety of systemic cell lines. Acta orthopaedica. 2010 Dec;81(6):756-64. PubMed PMID: 21110705. Pubmed Central PMCID: 3216089.
46. Galia CR. Enxertos ósseos liofilizados impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.

47. Lucas EF, Soares BG, Monteiro EEC. Caracterização de Polímeros. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda; 2001.
48. Visser SA, Hergenrother RW, Cooper SL. Polymers Biomaterials Science. San Diego 1996. p. 50-60.
49. Hautamäki M, Meretoja V, Mattila R, Aho A, Vallittu P. Osteoblast response to polymethyl methacrylate bioactive glass composite. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2010;21(5):1685-92.
50. Ren Q, Ruth K, Thöny-Meyer L, Zinn M. Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010;87(1):41-52.
51. Hassig A, Stampfli K. Plasma substitutes past and present. Bibliotheca haematologica. 1969;33:1-8. PubMed PMID: 4911197.
52. Jahno VD. Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
53. Lunt J. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. Polymer Degradation and Stability. 1998 1/3;/59(1-3):145-52.
54. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. Biomaterials. Birmingham 2000. p. 2335-46.
55. Pezzin APT, Zavaglia CAC, Duek EAR. Estudo da Degradação In Vitro de Blendas de Poli(p-dioxanona)/Poli(l-Ácido Láctico) (PPD/PLLA) Preparadas por Evaporação de Solvente. Polímeros. 2002;12:285-94.
56. Rezende CA, Duek EAR. Blendas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)/ poli (ácido láctico): degradação in vitro. Polímeros. 2003;13:36-44.
57. Lopes RAM. Exposição ocupacional e hipersensibilidade ao latex nos trabalhadores das equipes de enfermagem e medica da UTI neonatal de um hospital universitario. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2002.
58. Amnuaypornsrri S, Sakdapipanich J, Tanaka Y. Highly purified natural rubber by saponification of latex: Analysis of green and cured properties. J Appl Polym Sci. 2010;118(6):3524-31.
59. Callister W. Material Science and Engineering, an introduction: John Willey & Sons Inc; 1991.

60. Oliveira JAAd, Hyppolito MA, Coutinho Netto J, Mrué F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2003;69:649-55.
61. Toriumi DM, Raslan WF, Friedman M, Tardy ME. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 1990 May;116(5):546-50. PubMed PMID: 2183824.
62. Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, Leonard F. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J Biomed Mater Res*. 1971 May;5(3):169-81. PubMed PMID: 5560994.
63. Garcia-Garcia HM, Vaina S, Tsuchida K, Serruys PW. Drug-eluting stents. *Archivos de cardiologia de Mexico*. 2006 Jul-Sep;76(3):297-319. PubMed PMID: 17091802.
64. Semete B, Booyesen L, Lemmer Y, Kalombo L, Katata L, Verschoor J, et al. In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2010;6(5):662-71.
65. Dadaş B, Alkan S, Cifci M, Başak T. Treatment of tripod fracture of zygomatic bone by N -2-butyl cyanoacrylate glue fixation, and its effects on the tissues. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2007;264(5):539-44.
66. Victoria C, Barreto M, Leal M, Monteiro C, Schmidt M, Paim J, et al. Condições de saúde e inovações nas políticas de saúde no Brasil: o caminho à percorrer. *The Lancet Saúde no Brasil*. 2012.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Avaliar a histotoxicidade da blenda Poli(ácido láctico-co-glicólica).

5.2 Objetivos específicos

- Verificar a presença de reação de corpo estranho tecidual.
- Medir o grau de inflamação tecidual com os dois materiais.
- Medir a o grau de fibrose tecidual reacional com os dois materiais.
- Verificar a presença de tecido de granulação.
- Medir o grau de reação tecidual com os dois materiais.
- Verificar o grau de organização do tecido reacional.

6. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO DA HISTOTOXICIDADE ENTRE O COPOLÍMERO DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) E A BLENDAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) / POLI (ISOPRENO)

Jung Ho Kim, Gustavo Juliani Faller, Diego da Silva Dias, Rubens Rodriguez, Marcus Vinícius Martins Collares. Luis Alberto dos Santos, Douglas Marques Ramos

Estudo realizado na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Biomateriais e Cerâmica avançada de Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências Cirúrgicas FAMED-UFRGS.

RESUMO

Introdução: A aplicação clínica de biomateriais está se expandindo para diversas especialidades médicas. Dentre os diversos tipos de biomateriais, os classificados como temporários merecem atenção especial, pois são assimilados pelo organismo após exercerem sua função, evitando, assim, procedimento cirúrgico para sua retirada.

O copolímero de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é um tipo de biomaterial temporário, rotineiramente utilizado na medicina na forma de fios de sutura e implantes ortopédicos. A mistura do PLGA com o poli (isopreno) resulta em uma blenda (PLGA / PI), de alta resistência e tenacidade, que foi desenvolvida pelo Laboratório de Biomateriais do Instituto de Engenharia da UFRGS. Entretanto, não existem estudos “*in vivo*” testando a reação óssea desta blenda. **Objetivo:** Testar a histotoxicidade da blenda de PLGA / PI em relação ao biopolímero já consagrado PLGA. **Método:** Foram utilizados 46 ratos machos wistar (*Rattus norvegicus* - linhagem albina), divididos em 2 grupos conforme o material implantado (PLGA ou PLGA / PI) na calota craniana, e subdivididos em tempos de morte (15, 30, 60 e 90 dias). Os procedimentos foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Após a morte, a calota craniana foi retirada, submetida ao exame histopatológico e aplicado o escore de Dadas (14) modificado. **Resultados:** A diferença da histotoxicidade dos dois materiais não foi significativa nos períodos 15, 30 e 90 dias, porém foi significativa no período 60 dias. **Conclusão:** A histotoxicidade do PLGA / PI, ao final do estudo (90 dias), foi semelhante ao PLGA, demonstrando equivalência em longo prazo. O período de 60 dias pós-cirúrgico (grupo da blenda) foi o único em que a histotoxicidade mostrou-se significativamente maior. Mais estudos devem ser feitos para melhorar o entendimento desta variação.

Palavras-chave: biomateriais, histotoxicidade, biocompatibilidade, blenda de poli (ácido láctico-co-glicólico) / poli (isopreno), copolímero de poli (ácido láctico-co-glicólico).

Introdução

A descoberta e aplicação clínica dos biomateriais são fatores responsáveis pela evolução das ciências da saúde nos últimos 50 anos (1).

Segundo Williams, "biomateriais são substâncias (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que, durante um período de tempo, são empregados como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de qualquer tecido, órgão ou função corporal" (2).

Os diversos tipos de biomateriais são separados em permanentes e temporários.

Dispositivos permanentes são aqueles que desempenham sua função, e são, após, retirados por intervenção cirúrgica (2).

Em outras situações o organismo assimila gradualmente o biomaterial após o cumprimento da função, são os chamados temporários. Destacam-se aí os poliésteres alifáticos (3, 4) que são compostos orgânicos ácidos que contêm tanto um grupamento carboxila quanto hidroxila (5) (Fig.1).

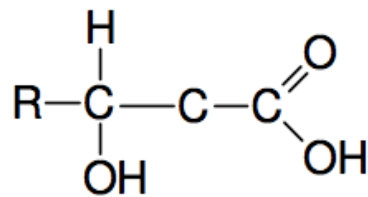


Figura 1: Composição química de um poliéster alifático.

Nos procedimentos que necessitam osteossíntese, os dispositivos mais usados são compostos de metais (biomateriais permanentes), porém, há um crescente

aumento da demanda por biomateriais temporários (Biofix®, FixSorb®, Neofix®, Resorpin®) nas diversas apresentações (6).

Em especial, o tratamento da craniossinostose por meio da distração osteogênica através de molas metálicas tem-se mostrado eficaz (7). Todavia, além da necessidade de remoção há o risco de migração intracraniana ocasionando fístula liquórica e reação de corpo estranho (8). Esses exemplos mostram a importância da busca de novos materiais que sejam resistentes, tenazes, absorvíveis e esterilizáveis (9, 10).

Nesta senda, desenvolveu-se uma mistura do poli (ácido láctico-co-glicólico) com o poli (isopreno) resultando em uma blenda de grande resistência e tenacidade (3), abrindo um leque para novas funções, inclusive distração osteogênica. A análise de sua histotoxicidade é imprescindível para assegurar a saúde do usuário.

O objetivo deste estudo é avaliar a histotoxicidade da blenda de poli (ácido láctico –co- glicólico) / poli (isopreno) em tecido ósseo de ratos.

Delineamento

Estudo experimental, aberto, prospectivo.

Hipóteses

Hipótese nula – A histotoxicidade entre o copolímero de PLGA e a blenda de PLGA / PI é igual.

Hipótese alternativa - A histotoxicidade entre o copolímero de PLGA e a blenda PLGA / PI é diferente.

Materiais e métodos

Obtenção dos materiais

Foram utilizados no estudo 2 modelos de materiais: um copolímero de PLGA e uma blenda de PLGA / PI (3, 11).

O copolímero de PLGA foi obtido junto a PuracBiomaterials (Netherlands), na proporção de 84% de comonômero L-lactide, e 16% de glicolide, sem processamento prévio, enquanto que o PI foi obtido junto à Mafer LTDA (Brasil) na conformação de látex natural centrifugado 60%. Como o pH do material era em torno de 10,0, foi neutralizado com solução de HCl, submetido à secagem e purificado com reprecipitação, usando clorofórmio como solvente.

As blendas de PLGA / PI foram separadas nas proporções desejadas (50/50), dissolvidas em clorofórmio e submetidas à agitação magnética. Após homogeneização da solução, foram secadas em estufa por 72 horas.

Todo esse processo foi realizado no Centro de Pesquisas de Engenharia da UFRGS, pelo Laboratório de Biomateriais do Instituto de Engenharia da UFRGS.

Tanto o copolímero quanto as blendas foram cortados em forma quadrangular de 2 por 2 mm e esterilizados em autoclave de peróxido de hidrogênio conforme rotina do HCPA (Figs. 2 e 3).

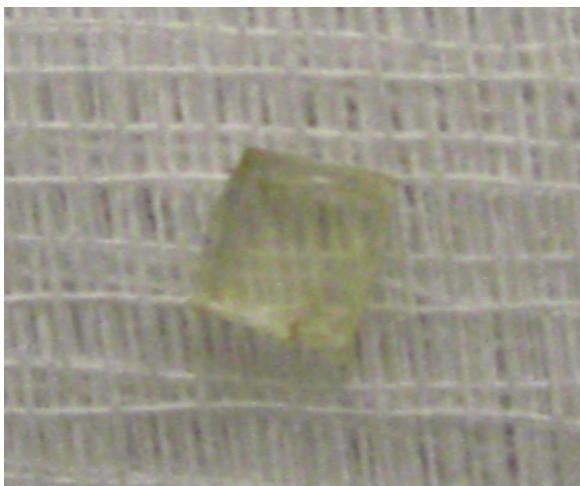


Figura 2: Copolímero de poli(ácido láctico-co-glicólico).

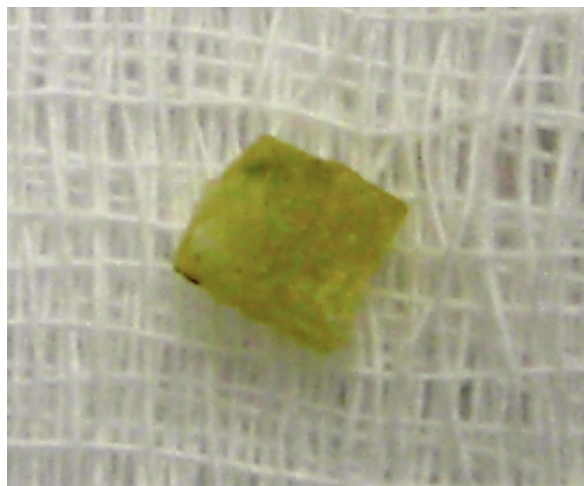
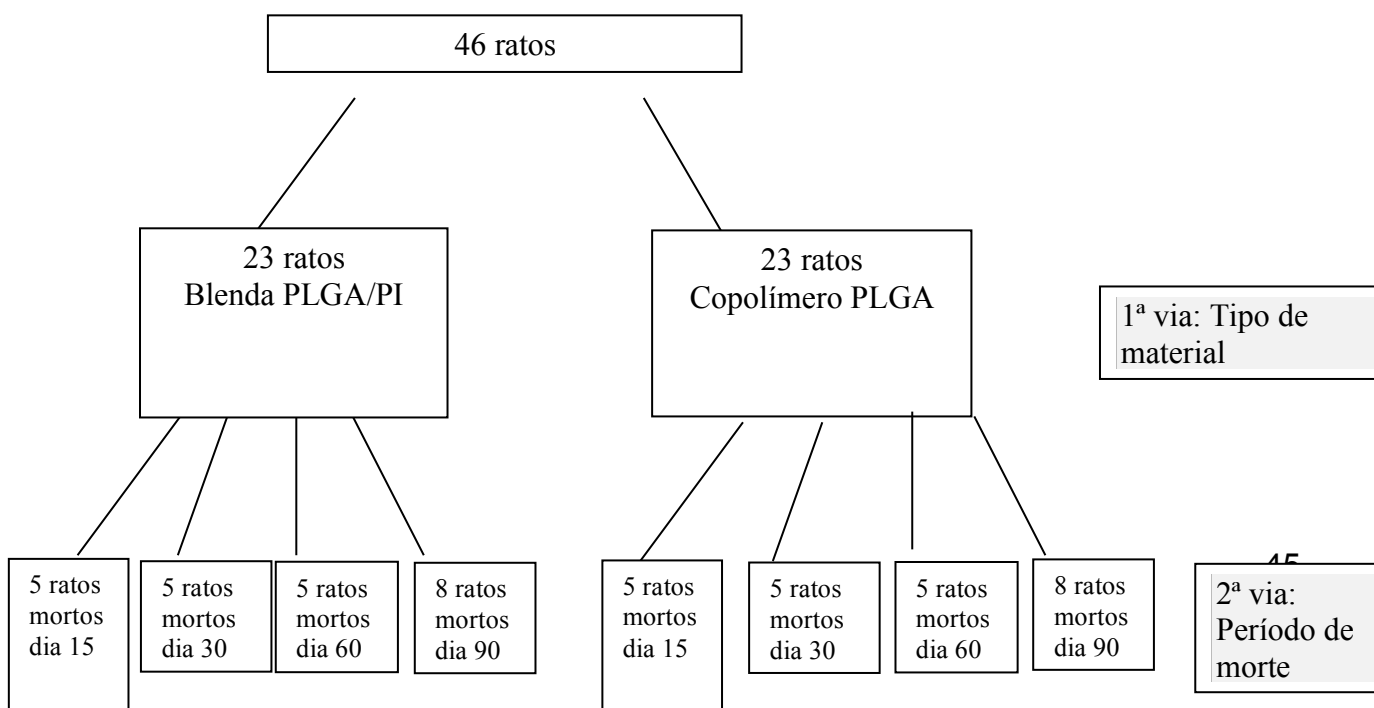


Figura 3: Blenda de poli(ácido láctico-co-glicólico) / poli(isopreno).

Amostra

Foi realizado cálculo do tamanho da amostra no programa *winpepi* versão 10.5 e baseado nos estudos de Dadas e cols. (14) para um nível de significância de 5%, poder de 80%, obtendo-se um total mínimo de 5 animais em cada subgrupo, totalizando 40 ratos para um tamanho de efeito de no mínimo 2 desvios padrão entre os grupos.

Figura 4: Distribuição dos ratos de acordo com o material implantado



População

Quarenta e seis ratos wistar (*Rattus norvegicus* - linhagem albina), machos com 67 dias de idade e 273,63 (235,63 – 329,35) gramas de massa média, divididos em 2 grupos e 4 subgrupos submetidos à cirurgia de implante de biomaterial em calota craniana. (Fig.4)

Grupos experimentais

Os grupos 1 e 2 foram randomizados, separados de acordo com o tipo de material que foi implantado, e os 4 subgrupos, de acordo com o número de dias até a morte, que foi de 15, 30, 60 ou 90 dias, conforme citado anteriormente. Então, cada subgrupo continha representantes de ambos materiais. Os subgrupos 15, 30 e 60 dias possuíam 10 animais, e, no subgrupo 90 dias, foram acrescentados 6 animais (3 para cada tipo de material), pois no estudo de Cardoso e cols. (15) este foi o tempo de degradação do copolímero poli (dioxanona) / poli (L-ácido láctico) em joelho de coelhos.(Fig. 4)

Técnica operatória

Todos os animais foram operados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA.

A anestesia foi realizada com quetamina (100 mg/kg intraperitoneal; Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e xilazina (10 mg/kg subperitoneal; Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil). Como anestesia local, foi realizada infiltração na calota craniana com

bupivacaína 0,5% (1mg/kg). Após, os ratos foram pesados e submetidos à tricotomia da área, deixando dessa forma exposta a região da cabeça.

Os animais foram colocados sobre a mesa operatória, na posição pronada, realizado antissepsia com clorhexidina aquosa seguido de colocação de campos estéreis.



Figura 5: Rato anestesiado, posicionado, tricotomizado e marcado local da incisão.

Foi realizada uma incisão em forma de “L” de forma a deixar a área do material isolada da área incisada e suturada (Fig. 5). Após, foi descolado o retalho e posteriormente foi aberto e rebatido o periósteo da calota craniana no local da futura

falha (Fig. 6). Em seguida, foi marcado com o auxílio de uma caneta cirúrgica o tamanho da falha.



Figura 6: Abertura do periósteo no local da osteotomia

Foram criadas falhas ósseas com uso de disco flexível diamantado, dupla face, de corte (KG Sorensen, Brasil, 7mm, modelo 1802.7043); na hemicalota direita, de espessura total na região do osso parietal da forma e do tamanho do material a ser implantado. A seguir, um descolador de periósteo delicado foi empregado para abrir a falha, minimizando lacerações meníngeas.

Após a remoção da porção de calota, o respectivo material foi adicionado sob leve pressão, conforme o grupo em questão, e realizada a sutura com pontos simples (Figs. 7 e 8). Posteriormente, os animais foram colocados em incubadora apropriada para a recuperação cirúrgica.

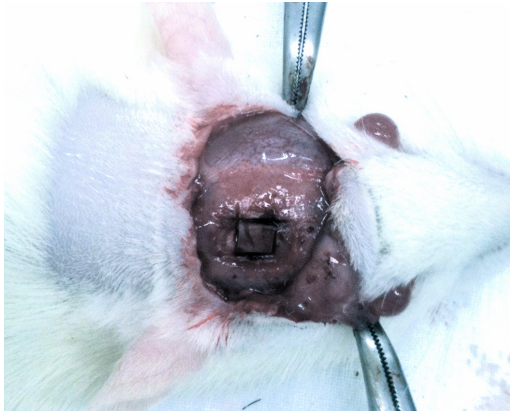


Figura 7: Material colocado bem justo em falha óssea.



Figura 8: Sutura realizada.

No período pós-operatório, os animais foram mantidos em gaiolas com ciclos de 12 horas de luz, com acesso à água e à comida *ad libitum*, sendo que cada gaiola continha 5 animais (Fig 9). A analgesia foi realizada com tramadol (1 mg/kg, intramuscular, 8/8 horas, duas doses; Carlo Erba S. A., Duque de Caxias, Rio de Janeiro).



Figura 9: Período pós-operatório

Os animais foram mortos após quinze, trinta, sessenta e noventa dias de pós-operatório em câmara de CO₂ (Biotécnicas, modelo Biocam-001, Pat. Req.-MU8202442-1, São Paulo, SP), conforme rotina da Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisa – HCPA.

Questões éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA sob o número 10-511 e desenvolvida visando a minimizar o sofrimento dos animais. Todos os procedimentos seguiram as normas bioéticas estabelecidas pelo Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do HCPA e da Unidade de Experimentação Animal (UEA-HCPA). A legislação vigente sobre pesquisa com animais foi obedecida: Declaração dos direitos

dos animais (UNESCO – janeiro 1978), Princípios Internacionais Orientadores para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (CIOMS) e lei brasileira nº11.794/2008.

Análise histológica

Após a morte, a calota craniana foi removida juntamente com o material para possibilitar a análise histológica. As peças foram colocadas em formol 10% e encaminhadas à Unidade de Patologia do Instituto de Patologia de Passo Fundo (Passo Fundo-RS) para preparação histológica e posterior coloração com hematoxilina-eosina (HE).

Os fragmentos contendo o biomaterial e tecido ósseo foram ressecados e fixados em formalina a 10%. Após, o material foi descalcificado em solução de ácido nítrico a 10% por um período mínimo de 36 horas, incluído em parafina e cortado longitudinalmente em fatias de 4 micras. Após, foi submetido ao processamento histológico de rotina, e corado pela HE resultando em 46 lâminas.

A análise histológica foi realizada por observação das reações teciduais por 2 patologistas cegados, e pontuadas pelo escore de Dadas e cols. (14) modificado. A modificação no escore original foi adotada devido a uma inversão de gravidade no item 5. O escore original mostrava uma insensatez com piora do escore com melhora da reação óssea.

Escore de Dadas modificado:

1. Reação de corpo estranho (0 ausente, 1 presente).

2. Grau de inflamação (0 ausente, 1 leve, 2 moderada, 3 grave, 4 grave e necrose do tecido).

3. Fibrose (0 ausente, 1 leve, 2 moderado, 3 grave).

4. Tecido de granulação (0 ausente, 1 presente).

5. Reação tecidual (0 formação óssea, 1 calo ósseo, 3 fibrocartilagem).

6. Estrutura do tecido neoformado (0 normal, 1 proliferativo)

O escore total será a soma dos 6 itens, podendo variar de 0 a 13.

Como alguns itens são de interpretação subjetiva, a pontuação foi estabelecida conforme os critérios a seguir (Figs. 10 a 21):

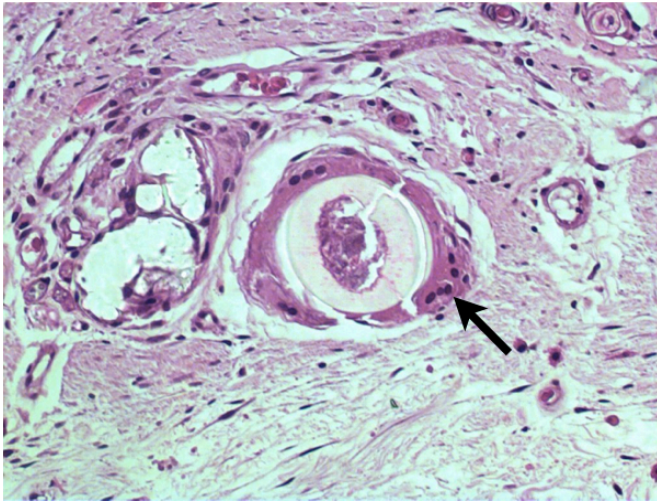


Figura 10: Presença de corpo estranho com reação e célula gigante multinucleada ao redor (seta).

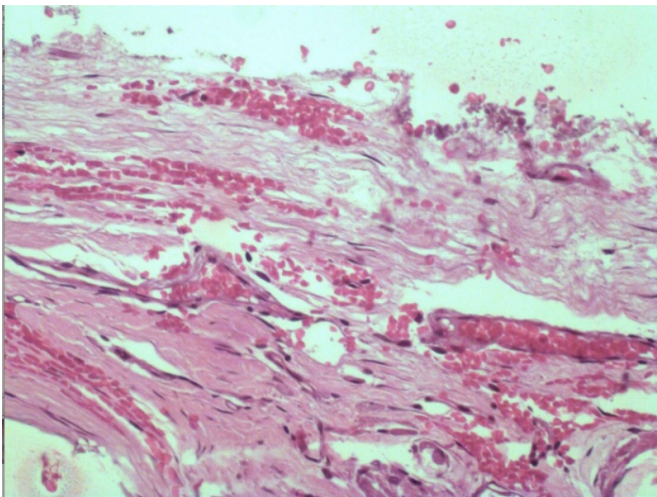


Figura 11: Inflamação leve: raros neutrófilos, raros mononucleares em meio a fibrose e proliferação vascular.

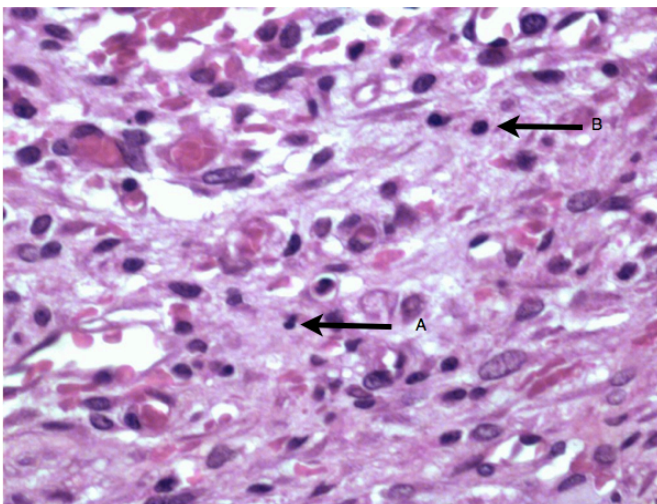


Figura 12: Presença de reação inflamatória moderada com frequentes neutrófilos (A) e macrófagos (B).

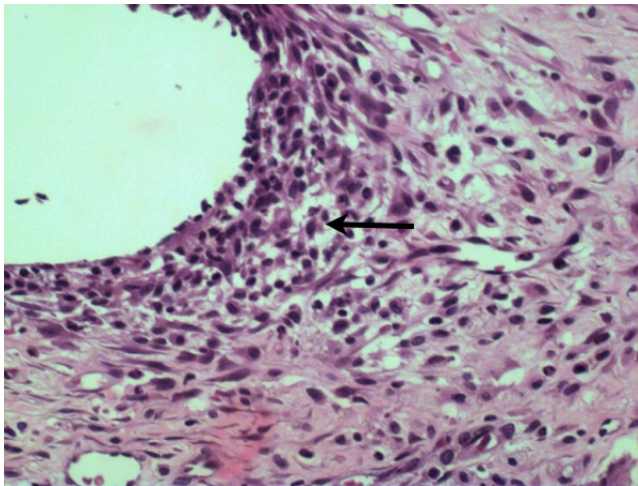


Figura 5: Presença de reação inflamatória grave com presença de numerosos mononucleares e neutrófilos (seta).

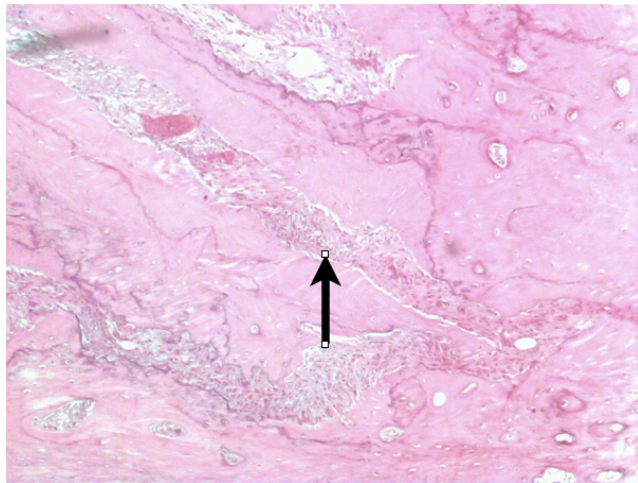


Figura 14: Fibrose leve: faixas de fibrose em meio ao tecido ósseo (seta).

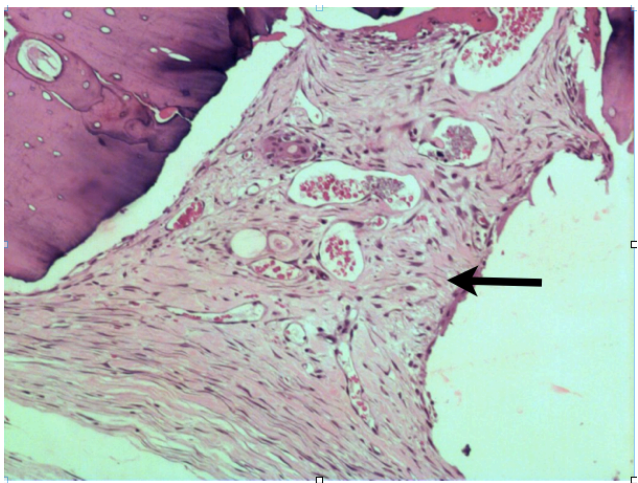


Figura 15: Fibrose moderada: fibroblastos jovens, com vasos dilatados e congestionados (seta).

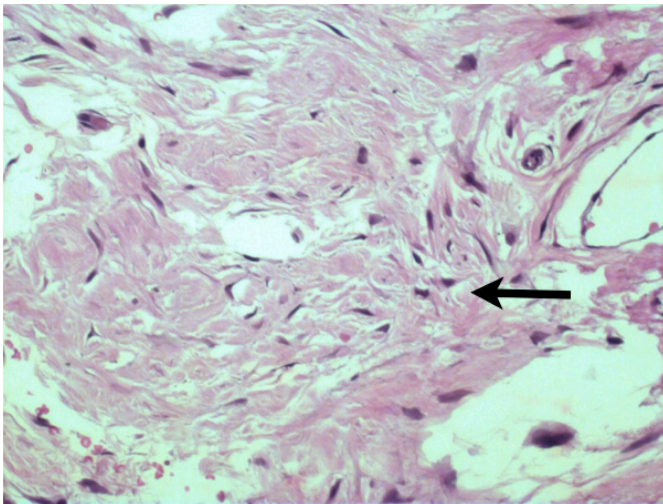


Figura 16: Fibrose grave: área extensa de fibrose com fibroblastos maduros e fibrose espessa (seta).

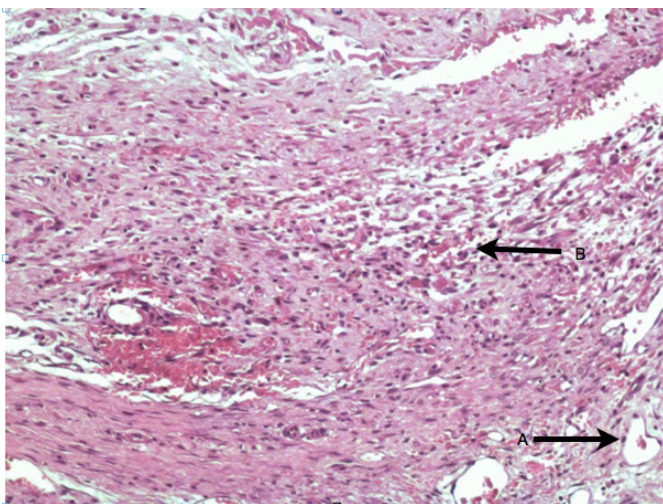


Figura 17: Tecido de granulação: proliferação vascular (A), mononucleares, edema e polimorfonucleares (B).

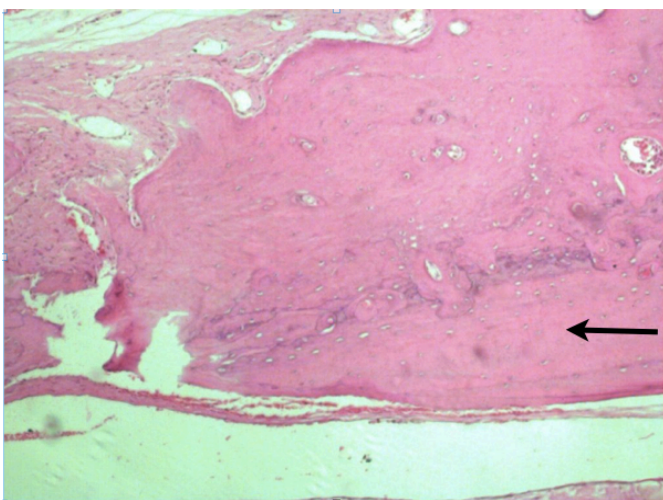


Figura 18: Tecido ósseo normal: lamelas ósseas de distribuição regular (seta), osteócitos pequenos e fusiformes.

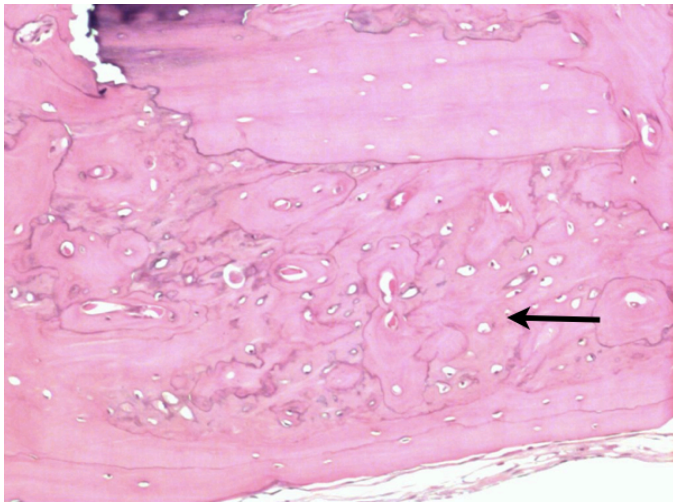


Figura 19: Tecido ósseo proliferativo: lamelas ósseas de distribuição irregular (seta), osteócitos maiores em espaços irregulares.

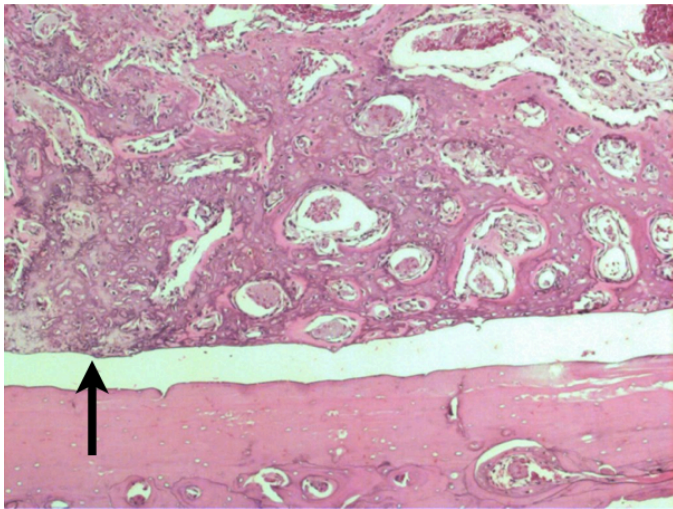


Figura 20: Calo ósseo proliferativo (seta).

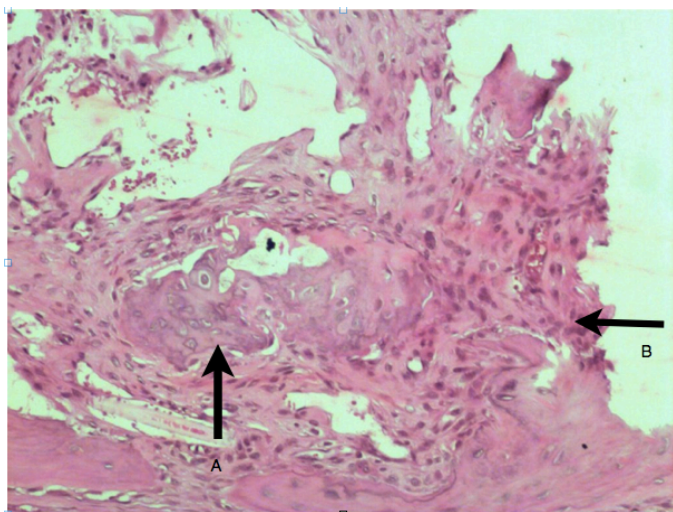


Figura 21: Tecido fibrocartilagenoso proliferativo: (A) cartilagem (B) fibrose.

Análise estatística

A variável dependente no estudo é o escore histológico, e as variáveis independentes são os tipos de material e os períodos de morte. Foram comparados os escores dos dois materiais individualmente.

Para avaliar a distribuição do escore histológico, o teste Shapiro-Wilk foi aplicado, e apresentou o valor de $p=0,256$, ou seja, a distribuição foi considerada normal. Então, foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA – as 2 vias estão explicadas na fig. 4), considerando significativo um p menor a 0,05, avaliado através do SPSS versão 18.0.

Para observar a concordância interobservador, foi adotado o coeficiente de Bland Altman (16) com randomização de 20 ratos da sequência de observação patológica.

Resultados

Não houve diferença significativa no escore histológico médio dos dois avaliadores ($6,0 \pm 2,1$ vs $6,4 \pm 1,9$; $p=0,185$). Quando avaliada a concordância pelo método de Bland Altman, apenas em 1 rato houve discordância (5%), conforme apresenta a fig. 22. Considerando que os itens do escore de maior subjetividade são o grau de inflamação e grau de fibrose, houve concordância significativa entre os avaliadores através do coeficiente kappa ($k>0,5$; $p\leq 0,001$).

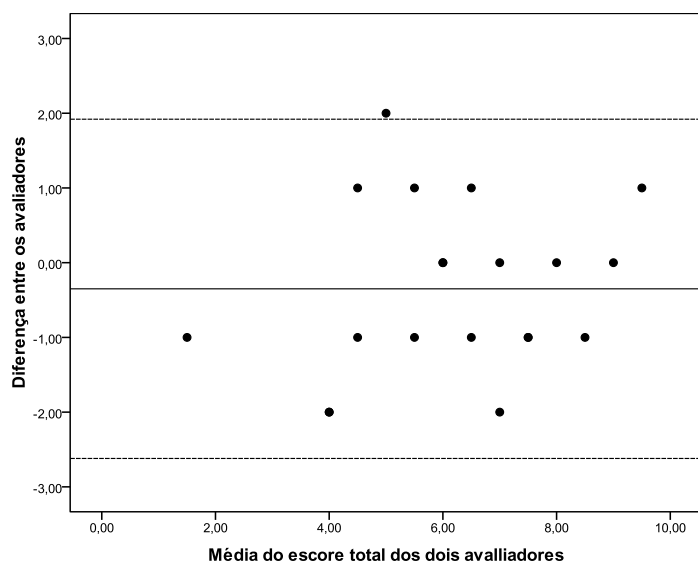


Figura 22: Avaliação da concordância entre os avaliadores conforme Bland-Altman. A linha central representa a média das diferenças. As linhas pontilhadas inferior e superior representam o intervalo de 95% de concordância.

Tabela 1: Avaliação do escore histológico por grupo e por dias de morte. Mostrando aumento significativo do score dos 30 para os 60 dias no grupo da blenda.

Grupo	Dias de morte	Escore histológico			
		Média ±DP	15-30 dias	30-60 dias	60-90 dias
Blenda	15	7,6 ±0,5	-2,0	2,9	-2,6
	30	5,6 ±1,1			
	60	8,5 ±0,5			
	90	5,9 ±0,6			
Copolímero	15	8,4 ±0,9	-3,2	1,4	-1,3
	30	5,2 ± 0,8			
	60	6,6 ±0,5			
	90	5,3 ±1,6			

As médias do escore histológico por grupo e dias de morte estão apresentadas na Tabela 1. No grupo da blenda, houve redução significativa do escore histológico dos 15 para os 30 dias ($p=0,002$) e dos 60 para os 90 dias ($p<0,001$), porém houve aumento significativo dos 30 para os 60 dias ($p<0,001$). No grupo do copolímero,

resultado semelhante foi obtido dos 15 para os 30 dias ($p=0,002$). No entanto, dos 30 para os 60 dias ($p=0,403$), e dos 60 para os 90 dias ($p=0,310$), a diferença não foi estatisticamente significativa; todavia a curva de comportamento foi semelhante (figura 23).

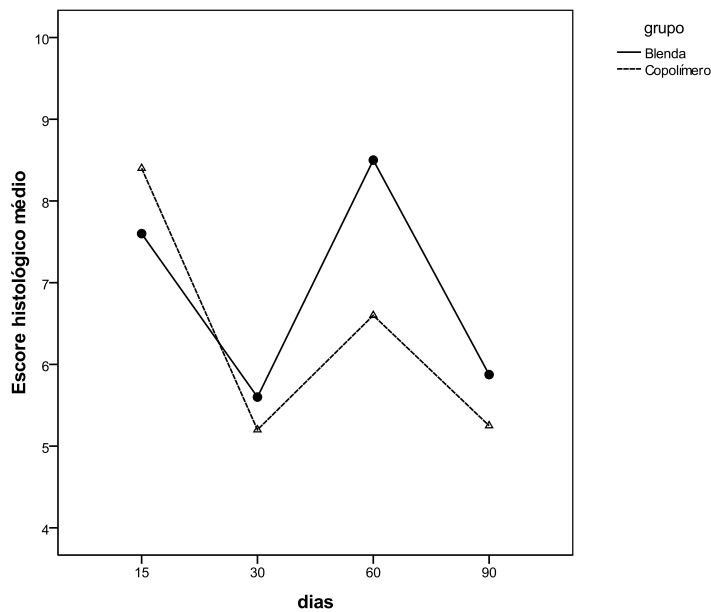


Figura 23: Comportamento da histotoxicidade de ambos os materiais conforme os dias de morte.

Quando comparados os grupos em relação aos dias de morte, houve interação estatisticamente significativa pela ANOVA 2 vias ($F=3,52$; $gl=3,39$; $p=0,024$). Conforme observado na figura 24, houve diferença significativa entre os grupos nos 60 dias de morte ($p<0,001$). Observa-se que essa diferença provavelmente se deve aos itens de grau de inflamação, fibrose e tecido de granulação presente (Tabela 2).

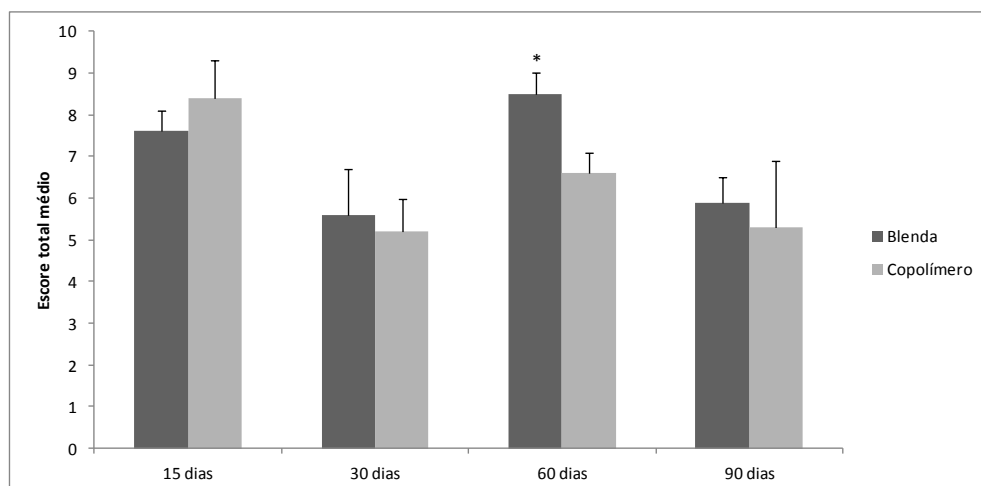


Figura 24: Escore histológico conforme grupo e dias de morte (* P<0,05).

Tabela 2: Avaliação dos itens do escore histológico conforme dias de morte e grupo. Mostrando que o aumento significativo da histotoxicidade aos 60 dias de morte no Grupo da Blenda (GB) em relação ao Grupo do Copolímero (GP) se deu provavelmente pelas variáveis Grau de inflamação, Fibrose e Tecido da Granulação.

Variáveis	15 dias		30 dias		60 dias		90 dias	
	GB	GC	GB	GC	GB	GC	GB	GC
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Corpo estranho	5 (100)	5 (100)	5 (100)	4 (80)	6 (100)	5 (100)	8 (100)	6 (75)
Inflamação								
Ausente	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)
Leve	2 (40)	1 (20)	5 (100)	5 (100)	3 (50)	5 (100)	7 (87,5)	7 (87,5)
Moderada	2 (40)	3 (60)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)
Grave	1 (20)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Fibrose								
Leve	1 (20)	0 (0)	2 (40)	3 (60)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)
Moderada	4 (80)	3 (60)	3 (60)	2 (40)	0 (0)	5 (100)	7 (87,5)	6 (75,0)
Grave	0 (0)	2 (40)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)
Tecido granulação	5 (100)	5 (100)	1 (20)	0 (0)	6 (100)	3 (60)	8 (100)	7 (87,5)
Reação tecidual								
Osso	0 (0)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)	8 (100)
Calo	5 (100)	5 (100)	4 (80)	5 (100)	6 (100)	5 (100)	0 (0)	0 (0)
Neoformação								
Normal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (37,5)	2 (25,0)

Macroscopia

A Análise macroscópica do material implantado mostrou estabilidade do copolímero PLGA em todos os tempos de morte dos animais; já a blenda PLGA / PI demonstrou alteração semelhante à erosão das bordas a partir dos 60 dias pós-operatórios (Figs. 25 e 26)

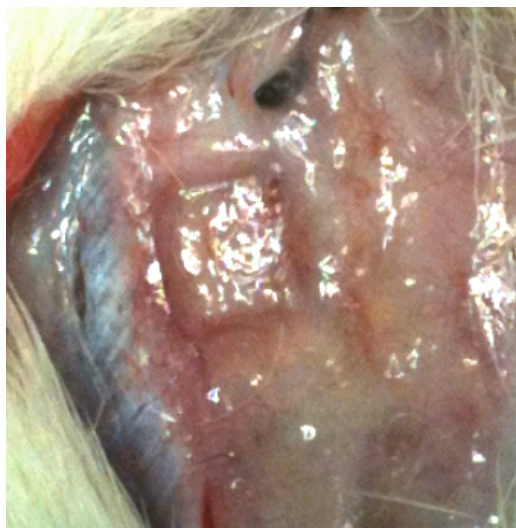


Figura 25: Copolímero PLGA aos 60 dias pós-operatório



Figura 26: Blenda de PLGA / PI aos 60 dias de pós-operatório.

Discussão

Do desenvolvimento ao uso clínico, os biomateriais devem passar por diversas etapas onde vários critérios devem ser obedecidos. Segundo Sittinger (17), os

biomateriais devem ser atóxicos, ter velocidade de absorção adequada, baixa resposta imunológica, acarcinogênicos e atrombogênicos.

Vert e cols (18), em sua revisão sobre uso dos poliésteres alifáticos, conceitua as respostas teciduais de biocompatibilidade e bioreabsorção.

O PLGA usado neste estudo é um copolímero constituído de 84% de L lactide e 16% de glicolide. Conceitualmente, ele é biocompatível, biotolerável e bioreabsorvível, ou seja, é bem tolerado pelos tecidos sem causar prejuízo para o organismo, induz a formação de cápsula fibrosa e seus metabólitos são eliminados pelo organismo por rotas metabólicas (9, 18, 19).

Já o poli(isopreno) é biocompatível, biotolerável, porém não é absorvível (9, 18-20).

Segundo Balabanian e cols (20), a viabilidade tecidual de um biopolímero é definida por testes histológicos, histométricos e radiográficos, não foram definidas variáveis quantitativas ou padrões de normalidade ou gravidade.

Dadas e cols. (14) elaboraram um escore de histotoxicidade racional com a avaliação de corpo estranho, grau de inflamação e fibrose; tecido de granulação e tipo de tecido neoformado. Sua amostra era pequena (sem cálculo de tamanho) e no item do tipo de neoformação tecidual a graduação está invertida. Porém, é uma classificação lógica e reprodutível, que avalia quantitativamente os valores histológicos e histométricos. Neste estudo, o escore apresentou evidência de possuir validade interna bem como apresentou boa concordância interobservador.

A espinha dorsal da degradação dos AHA é a hidrólise, que transforma cadeias grandes em menores até se tornarem hidrossolúveis para ação enzimática e, finalmente, metabolização através dos macrófagos (21-24), por isso a velocidade de degradação do biopolímero depende de fatores facilitadores da hidrólise e ação enzimática. São eles: grau de cristalinidade, estabilidade química, presença de catalizadores, aditivos, impurezas, localização, geometria e tamanho do implante (18, 21).

Também existem variações na magnitude e cronologia da resposta inflamatória. Getter e cols. encontraram células inflamatórias dispersas em mandíbula de ratos operados até 40 semanas após a implantação material de poli (ácido láctico) (25).

Kulkarni e cols. implantaram filmes de poli (ácido láctico) em subcutâneo de porcos e notou que, após um período de 2 semanas, houve intensificação da reação inflamatória com presença de reação de corpo estranho e edema que duraram até a 4^o semana (26).

Estudos com polímeros de poli (ácido glicólico) na forma de fios datam desde a década de 70 (27), e constata que o período de degradação com persistente reação inflamatória leve é em média de 90 dias. Resultados similares também foram constatados com os primeiros copolímeros PLGA na forma de fios (Vicryl®).

A análise histológica de Balabanian e cols. (20) demonstrou reação inflamatória aguda até os 7 dias pós-implante do látex em alvéolo de ratos. Como o poli (isopreno) não é absorvível, ele gerou uma reação de corpo estranho com fibrose acentuada que

foi gradativamente sendo substituída por tecido ósseo lamelar até os 42 dias de pós-operatório.

Neste estudo, observou-se um comportamento histotóxico similar em ambos os grupos (Fig. 23), com diminuição da histotoxicidade dos 15 para os 30 dias, aumento dos 30 para os 60 dias e, novamente, diminuição dos 60 para os 90 dias. Essa variação foi significativa no grupo da blenda (GB) e significativa somente dos 15 para os 30 dias no grupo do copolímero (GC). A explicação para o fenômeno observado pode estar no fato da diminuição da reação inflamatória do trauma cirúrgico dos 15 para os 30 dias, hidrolização do PLGA (presente em ambos os materiais) com liberação dos grânulos de PI no GB, o que aumentou a reação inflamatória e produção de fibrose. No GC, pode-se supor que a hidrolização iniciou a quebra superficial, ativou o sistema enzimático que processou o material, não sendo significativo o aumento da histotoxicidade aos 60 dias de pós-operatório. Isso pode ser evidenciado observando-se a irregularidade da superfície da blenda aos 60 dias pós-operatório (60 dias de morte) (Figs. 25 e 26). Portanto, percebe-se que a variação da reação tecidual no GC é muito mais suave que no GB.

Houve interação estatisticamente significativa com aumento da histotoxicidade no GB aos 60 dias pós-operatório. Para uso em humanos, é fundamental avaliar se este aumento da histotoxicidade é clinicamente prejudicial. Estudos já realizados com aplicação do poli(isopreno) em tímpanos e membrana conjuntival de humanos não mostraram toxicidade clínica significativa (28, 29).

O fator primordial para aplicação clínica do PLGA/PI é a avaliação desse duplo pico de toxicidade. Neste estudo (em ratos), os picos ocorreram nos 15 e 60 dias simultaneamente. Segundo Vert e cols. (18), os tempos de aumento de reação tecidual de um copolímero (por exemplo PLGA) dependem do local implantado e da proporção de cada polímero.

Percebe-se também que a histotoxicidade do GB aos 60 dias não foi estatisticamente maior que a do GC aos 15 dias (Fig 24). Supõe-se, então, que o aumento da histotoxicidade do GB aos 60 dias não oferece risco potencial para uso clínico, pois o copolímero de PLGA já é usado.

Também existem procedimentos que podem ser adotados na vigência da confirmação do risco aumentado com o uso da blenda de PLGA/PI. O PI pode ser tratado com enzimas proteolíticas ou adição de solventes polares, o que reduz a antigenicidade em até 50% (30,31).

Portanto, o aumento da tenacidade e resistência conferido pelo PLGA/PI abre novas opções para pesquisa e eventual uso em seres humanos. Dentre as utilidades deste novo biomaterial, destacam-se expansão óssea (*stents* em craniossinostoses), parafusos de interferência em reconstruções ligamentares, reconstruções tendíneas e *scaffolds* para obtenção de tecidos maleáveis. Porém mais pesquisas devem ser feitas para avaliar e quantificar o aumento da histotoxicidade no 2º pico de reação tecidual.

Conclusões

1- A blenda de PLGA / PI mostrou histotoxicidade similar nos grupos 15 e 30 dias e no mais longo prazo, 90 dias, de morte comparada com o copolímero PLGA.

2- A blenda de PLGA / PI mostrou maior histotoxicidade aos 60 dias de morte.

3- A blenda de PLGA/PI mostrou histotoxicidade similar aos 60 dias de morte se comparada com o copolímero PLGA aos 15 dias de morte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

1. Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J. Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavour. Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine. 2nd ed: Elsevier; 2004.
2. Williams DF. Definitions in biomaterials. In: William DF, editor. Progress in Biomedical Engineering. Amsterdam Elsevier; 1987.
3. Marques DG. Obtenção e caracterização de blendas poliméricas de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) para aplicação como biomaterial. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
4. Sena P, Manfredini G, Barbieri C, Mariani F, Tosi G, Ruozi B, et al. Application of poly-L-lactide screws in flat foot surgery: histological and radiological aspects of bio-absorption of degradable devices. Histology and histopathology. 2012 Apr;27(4):485-96. PubMed PMID: 22374726.
5. Ren Q, Ruth K, Thöny-Meyer L, Zinn M. Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010;87(1):41-52.
6. Pihlajamäki H, Salminen S, Tynninen O, Böstman O, Laitinen O. Tissue Restoration After Implantation of Polyglycolide, Polydioxanone, Polylactide, and Metallic Pins in Cortical Bone: An Experimental Study in Rabbits. Calcified tissue international. 2010;87(1):90-8.
7. David LR, Gewalli F, Guimãraes-Ferreira J, Sanger C, Glazier S, Argenta LC. Dynamic Spring-Mediated Cranioplasty in a Rabbit Model. Journal of Craniofacial Surgery. 2002;13(6):794-801.

8. Ferreira MP, Collares MV, Ferreira NP, Kraemer JL, Pereira Filho Ade A, Pereira Filho Gde A. Early surgical treatment of nonsyndromic craniosynostosis. *Surgical neurology*. 2006;65 Suppl 1:S1:22-1:6; discussion S1:6. PubMed PMID: 16427442.
9. Ravaglioli A, Krajewski A. *Bioceramics: materials, properties, applications*. New York: Chapman & Hall; 1992.
10. Callister W. *Material Science and Engineering, an introduction*: John Willey & Sons Inc; 1991.
11. Valente A, Zinck P, Mortreux A, Visseaux M. Catalytic Chain Transfer (co-Polymerization): Unprecedented Polyisoprene CCG and a New Concept to Tune the Composition of a Statistical Copolymer. *Macromol Rapid Commun*. 2009 04/01;30(7):528-31. eng.
12. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*. 2005;15:13-21.
13. Vanin M, Santana CC, Torriani ÍL, Privelic T, Duek EAR. Estudo da degradação "in vitro" de blendas de poli(b-hidroxibutirato) (PHB) / poli(L-ácido lático) (PLLA) na forma de filmes. *Polímeros*. 2004;14:187-93.
14. Dadaş B, Alkan S, Cifci M, Başak T. Treatment of tripod fracture of zygomatic bone by N -2-butyl cyanoacrylate glue fixation, and its effects on the tissues. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2007;264(5):539-44.
15. Cardoso TP, Duek EAdR, Amatuzzi MM, Caetano EB. Prótese meniscal de polímero bioabsorvível: estudo em coelhos. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2010;45:247-59.
16. Hirakata V, S. C. Análise de Concordância entre métodos de Bland Altman. *Rev HCPA*. 2009;29(3):261-68.
17. Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, et al. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res*. 1996 Summer;33(2):57-63. PubMed PMID: 8736023.
18. Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and Biocompatibility of Aliphatic Polyesters. *J Mater Sci-Mater M*. 1992 Nov;3(6):432-46. PubMed PMID: WOS:A1992JY82000008. English.
19. Hench LL, Wilson J. *Introduction to Bioceramics*. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Ltd; 1993.

20. Balabanian C, aacute, udia ACA, Coutinho-Netto J, Lamano-Carvalho TL, Lacerda SA, et al. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. *Journal of Oral Science*. 2006;48(4):201-5.
21. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. Birmingham2000. p. 2335-46.
22. Jahno VD. Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
23. Smith R, Oliver C, Williams DF. The enzymatic degradation of polymers in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1987 Aug;21(8):991-1003. PubMed PMID: 2958461.
24. Schindler A, Pitt CG. Polymer preparation. *Amer Chem Soc Poly Chem Dir*. 1983;23:111-2.
25. Getter L, Cutright DE, Bhaskar SN, Augsburg JK. A biodegradable intraosseous appliance in the treatment of mandibular fractures. *Journal of oral surgery*. 1972 May;30(5):344-8. PubMed PMID: 4503101.
26. Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, Leonard F. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J Biomed Mater Res*. 1971 May;5(3):169-81. PubMed PMID: 5560994.
27. Devi KS, Vasudevan P. Absorbable surgical sutures. *JMS Rev Macromol Chem Phys*. 1985;25:315-.
28. Pinho ECCM. O uso da biomembrana de látex natural comparado ao transplante conjuntival autólogo na superfície ocular. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2011.
29. Oliveira JAA, Hypolito MA, Coutinho – Netto J, Mrué F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biosintético. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*.
30. Amnuayporn Sri S, Sakdapipanich J, Tanaka Y. Highly purified natural rubber by saponification of latex: Analysis of green and cured properties. *J Appl Polym Sci*. 2010;118(6):3524-31.
31. Brydson JA, *Rubbery Materials and their compounds*. New York: Elsevier Science Publisher. 1988.

7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

EXPERIMENTAL COMPARATIVE STUDY OF THE HYSTOTOXICITY BETWEEN CO-POLYMER OF POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) AND THE POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) /POLY (ISOPRENE) BLEND

Jung Ho Kim, Gustavo Juliani Faller, Diego da Silva Dias, Rubens Rodriguez, Marcus Vinícius Martins Collares, Luis Alberto dos Santos, Douglas Marques Ramos.

ABSTRACT

Introduction: Clinical application of biomaterials is expanding to various medical specialties. Among the different types of biomaterials, those classified as temporary deserve special attention because they are assimilated by the body after exercising their function, thereby avoiding surgical procedure for their removal. Co-polymer poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a type of temporary biomaterial, routinely used in medicine as suture threads and orthopedic implants. The mixture of PLGA with poly (isoprene) results in a high-strength and toughness blend (PLGA / PI), developed by the Biomaterials Laboratory of the Engineering Institute/ UFRGS. However, there are no studies “*in vivo*” testing the bone reaction of that blend. Objective: To Test histotoxicity of PLGA / PI blend over the already established biopolymer, PLGA. Method: Forty six male Wistar rats (*Rattus norvegicus* – albino strain), divided into 2 groups according to the material (PLGA or PLGA / PI) implanted in the skull and sub divided into periods of death (15, 30, 60 and 90 days). The procedures were developed in the Animal Experiment Unit (AEU) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). After death, the skull was removed, submitted to histopathologic examination and the modified Dadas’ score was used (14). Results: Results: The histotoxicity difference of the two materials was not significant in the periods of 15, 30 and 90 days, but it was significant in the period of 60 days. Conclusion: At the end of the study (90 days), the PLGA / PI histotoxicity was similar to PLGA, showing long-term equivalence. The 60-day post-surgical period was the only one in which histotoxicity was significantly higher. More studies shall be done in in order to better understand that variation.

Key words: biomaterials, histotoxicity, biocompatibility, poly (lactic-co-glycolic acid) / poly (isoprene), poly (lactic-co-glycolic acid) copolymer.

Introduction

The discovery and clinical application of biomaterials have been factors responsible for the evolution of health sciences in the last 50 years (1).

According to Williams "biomaterials are substances (except drugs) or combination of substances, synthetic or natural, which, during a period of time, are used as a whole or an integrating part of a system for the treatment, enlargement or replacement of any tissue, organ or bodily function" (2).

The different types of biomaterials are separated into permanent and temporary.

Permanent devices are those that perform their function and after are removed through surgical procedure (2).

In other situations, the body gradually assimilates the biomaterial after the completion of function; they are called temporary. Among them there are the aliphatic polyesters (3, 4) which are organic compounds containing both carboxyl and hydroxyl grouping. (5) (Fig.1).

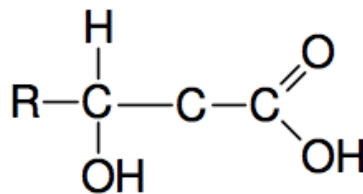


Figure 1: Chemical composition of aliphatic polyester

In procedures requiring osteosynthesis, the most used devices are metal compounds (permanent biomaterial); however there is an increasing demand for temporary biomaterials (Biofix®, FixSorb®, Neofix®, Resorpin®) in various presentations (6). In particular, the use of metal springs in the treatment of craniosynostosis by distraction osteogenesis has proven to be effective (7). However, besides the need of removal there is the risk of intracranial migration causing CSF and foreign body reaction (8).

These examples show the importance of the search for new materials that are resilient, tenacious, absorbable and sterilizable (9, 10).

Thus, it has been developed a blend of poly (lactic-co-glycolic acid) with poly (isoprene) resulting in a blend of high strength and toughness (3) and opening a range for new functions, including the distraction osteogenesis. The analysis of its histotoxicity is essential to ensure the user's health.

This study aims at testing the histotoxicity of the poly (lactic-co-glycolic acid) / poly (isoprene) blend compared to the copolymer already established in the market poly (lactic-co-glycolic acid) in bone tissues of rats.

Delineation

Experimental, open and prospective study.

Hypotheses

Null Hypothesis – Histotoxicity between the PLGA copolymer and de PLGA / PI blend is the same.

Alternative Hypothesis - Histotoxicity between the PLGA copolymer and PLGA / PI blend is different.

Materials and methods

Obtention of materials

Two models of materials were used in the study: a PLGA copolymer and a PLGA / PI blend (3, 11).

The PLGA copolymer was obtained from Purac Biomaterials (Netherlands), at a ratio of 84% L-lactide comonomer and 16% glycolide, without prior processing, while the PI was obtained from Mafer LTDA (Brazil) at a conformation of Centrifuged Natural Latex 60%. As the pH of the material was approximately 10,0, it was neutralized with HCl solution, subjected to drying and purified by reprecipitation using chloroform as solvent.

The PLGA / PI blends were separated in the desired proportions (50/50), dissolved in chloroform and subjected to magnetic stirring. After the solution homogenization, they were dried in an oven for 72 hours.

All this process was performed at the Engineering Research Center / UFRGS, by the Biomaterials Laboratory of the Engineering Institute/ UFRGS.

Both the copolymer and the blends were cut into 2/2mm square samples and sterilized in peroxide according to the routine of HCPA (Fig. 2, 3).

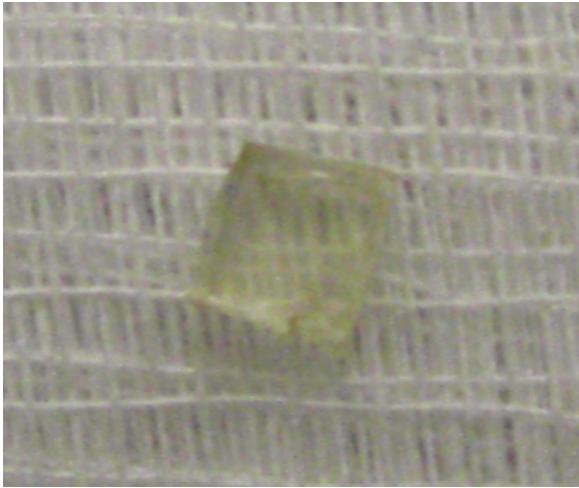


Figure 3: Poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer

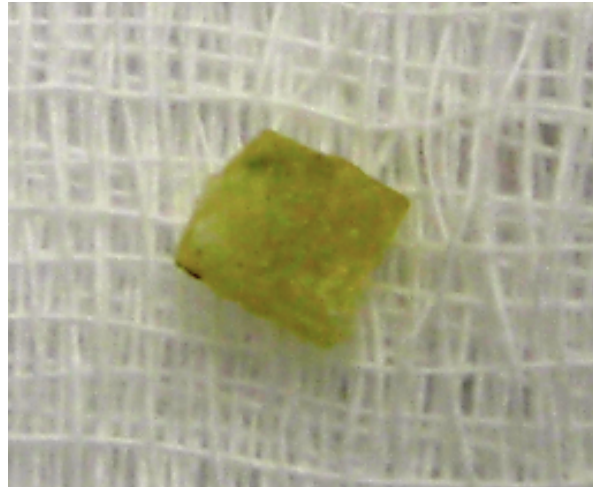
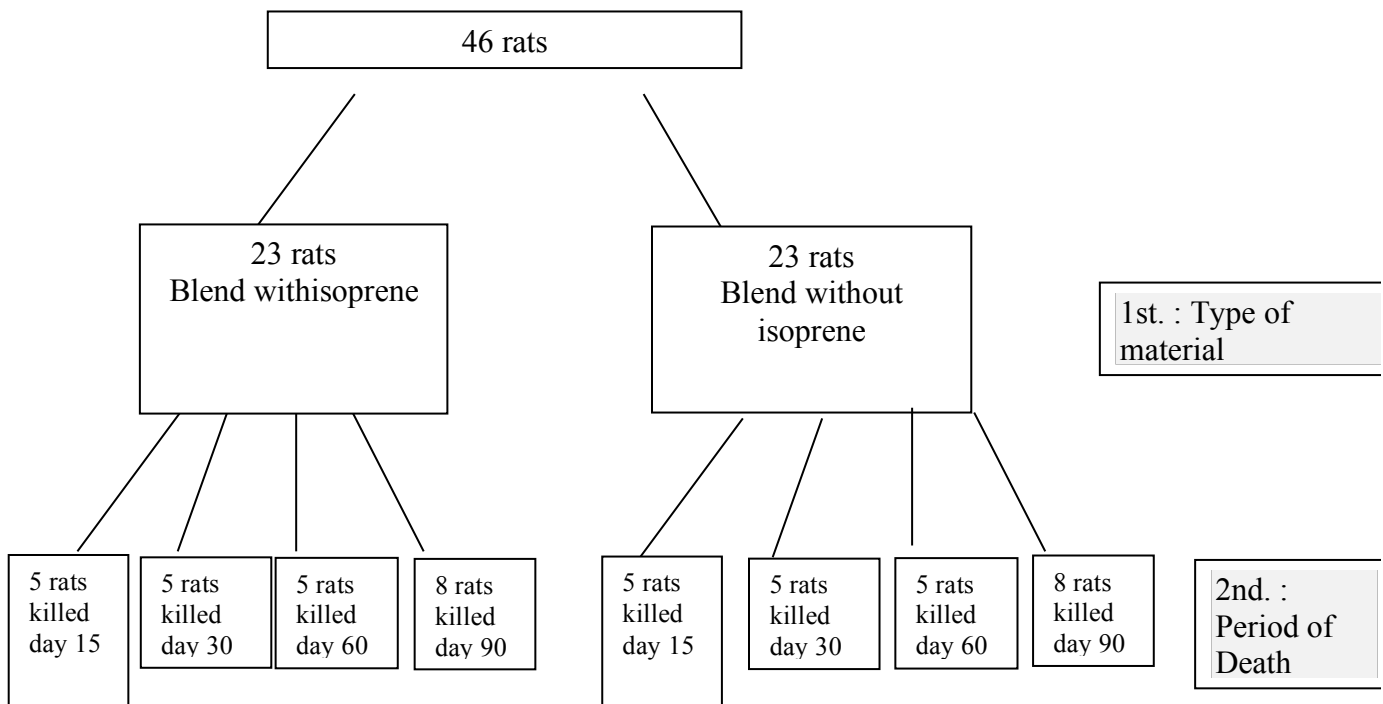


Figure 2: Poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(isoprene) blend

The PLGA copolymer was chosen for this comparative study because it is a material already marketed as suture threads and bone fixation material (3, 12, 13).

Sample

The sample size calculation was done using the *winpepi* program version 10.5 and it was based on studies of Dadas e cols (14) to a level of significance of 5%, 80% power, yielding a total of at least 5 individuals in each subgroup, totaling 40 rats to an effect size of at least 2 standard deviations between the groups.



Population

Forty six male wistar rats (*Rattus norvegicus* – albino lineage), aging 67 days and weighing 273.63 grams of average mass, divided into 2 groups and 4 subgroups undergoing surgery for the biomaterial implant in the skull.

Experimental Groups

Groups 1 and 2 were divided according to the type of material that has been implanted and the four subgroups, according to the number of days to death, which was 15, 30, 60 or 90 days, as mentioned above. Then, each group had representatives of both materials. The subgroups 15, 30 and 60 days had 10 animals and in the subgroup 90 days, 6 animals were added (3 for each type of material), totaling 16 animals. In the

study by Cardoso e cols (15). 90 days was the time of hydrolization of copolymer [poly (dioxanone) / poly (L-lactic acid)] implanted in the knee of rabbits (15).

Surgical Technique

All the animals underwent surgical procedures in the Animal Experimentation Unit of HCPA.

Anesthesia was administered with ketamine (100 mg/kg intraperitoneally; Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brazil) and xilazine (10 mg/kg subperitoneally; Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brazil). As local anesthesia, it was used 0.5% bupivacaine (1mg/kg). Then, the rats were weighed and submitted to trichotomy of the area, exposing the region of the head.

The animals were placed on the operating table, antisepsis performed with aqueous iodoform followed by the placement of sterile gauze.



Figure 4: Rat anesthetized, positioned, trichotomized and the incision place marked

An L-shaped incision was made so as to leave the area of the material isolated from the excised and sutured area. (Fig. 4). After, the flap was detached and later, opened and folded the periosteum of the skull cap at the site of the future defect. (Fig. 5). Then it was marked with a pen the size of the defect.



Figure 5: Opening of the periosteum at the osteotomy site

Bone defects were created (with flexible double faced diamond cutting disc, KG Sorensen, Brazil) total thickness in the region of the parietal bone with the shape and size of the material to be implanted. Then, a delicate periosteal peeler was used to open the defect, minimizing the meningeal lacerations.

After removing the portion of the cap, the respective material was added under a slight pressure, according to the group in question, the respective material and made

simple sutures (Fig. 6, 7). Subsequently the animals were placed in an appropriate incubator for surgical recovery.

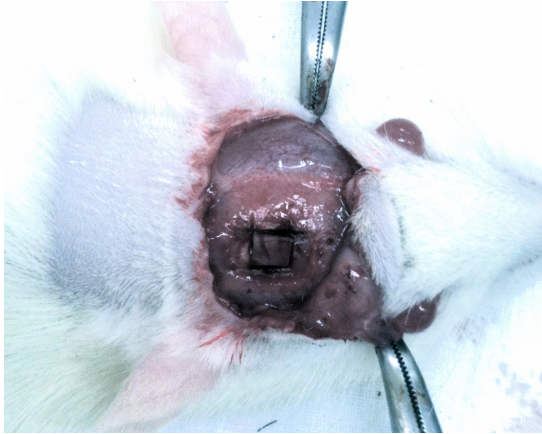


Figure 6: Material placed tightly in the bone defect



Figure 7: Suture

In the postoperative period, the animals were kept in cages with 12-hour cycles, with access to water and food *ad libitum*, each cage with 5 animals (Fig 8). Analgesia was treated with tramadol (1 mg/kg, intramuscular, 8/8 hours, two doses; Carlo Erba S. A., Duque de Caxias, Rio de Janeiro).



Figure 8: Postoperative period

The animals were euthanized after fifteen, thirty, sixty and ninety days of postoperative period in CO₂ chamber (Biotécnicas, Biocam-001model, Pat. Req.-MU8202442-1, São Paulo, SP), according the routine of the Animal Experimentation Unit- Research Center – HCPA.

Ethical Issues

The reserach was approved by the Ethics Committee (CEP), HCPA under the number 10-511 and developed aiming at minimizing the animals' pain. All the procedures followed the bioethical rules established by the Research and Post-Graduation Group of HCPA and the Animal Experimentation Unit (UEA-HCPA). The current legislation on animal research was obeyed: Declaration of Animal Rights animals

(UNESCO – January 1978), International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS) and the Brazilian Law number 11.794/2008.

Histological Analysis

After death, the skull cap was removed together with the material to enable the histological analysis. The parts were placed in formalin and sent to the Pathology Unit of the Pathology Institute of Passo Fundo (Passo Fundo-Rio Grande do Sul / Brazil) for the histological preparation and subsequent histological staining with hematoxylin-eosin (HE). So was subjected to histological processing and stained with HE resulting in 46 slides.

The fragments containing the biomaterial and the bone tissue were resected and fixed in 10% formalin. After, the material was decalcified in a 10% nitric acid solution for at least 36 hours, embedded in paraffin and cut lengthwise into four-micron slices. Then, it was submitted to routine histological processing and stained with HE, resulting in 46slices.

Histological analysis was performed by observing tissue reaction by two blinded pathologists and scored by the modified score of Dadas e cols. (14). The modification in the original score was made because the original showed an evolution from worst to best in item 5. The original score presented fatuity with worsening scores and recovery of bone reaction.

Modified Dadas Score:

2. Foreign body reaction (0 absent, 1 present).
3. Degree of Inflammation (0 absent, 1 slight, 2 moderate, 3 severe, 4 severe and tissue necrosis).
4. Fibrosis (0 absent, 1 slight, 2 moderate, 3 severe).
7. Granulation tissue (0 absent, 1 slight).
8. Tissue reaction (0 bone formation, 1 bone callus, 3 fibrocartilage).
9. Structure of the newly formed tissue (0 normal, 1 proliferative).

The total score will be the sum of the 6 items, varying from 0 to 13.

As some items are subjectively interpreted, the score was established according the following criteria (Fig. 9 to 20):

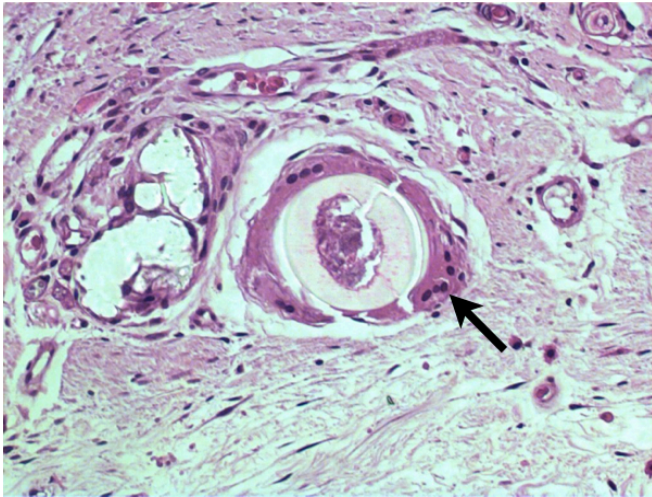


Figure 9: Presence of foreign body with reaction and multinucleated giant cell around.

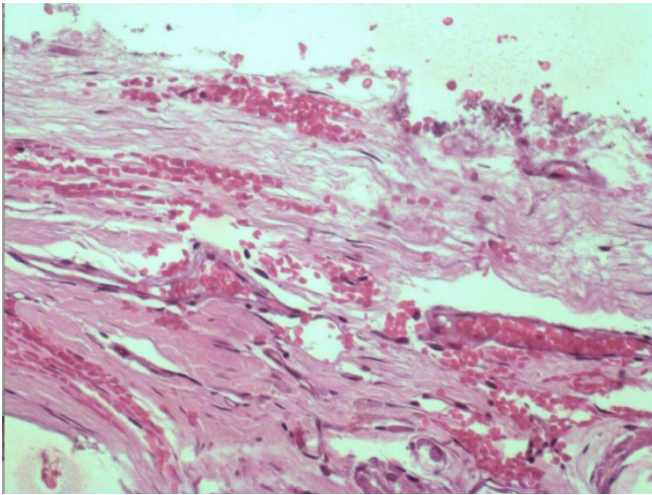


Figure 10: Mild inflammation: rare neutrophils, rare mononuclear amid fibrosis and vascular proliferation.

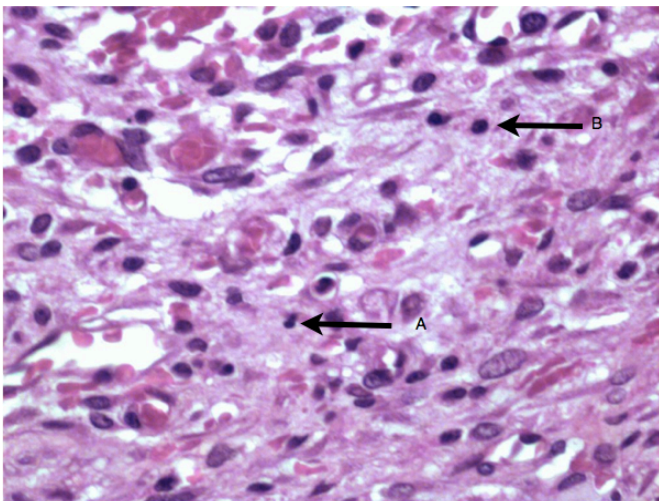


Figure 11: Presence of mild inflammatory reaction with frequent neutrophils (A) and macrophages (B).

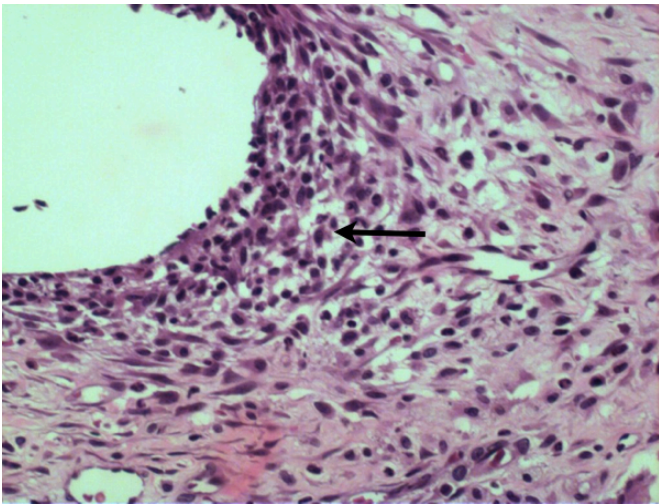


Figure 12: Presence of severe inflammatory reaction with the presence of several mononuclear and neutrophils (arrow).

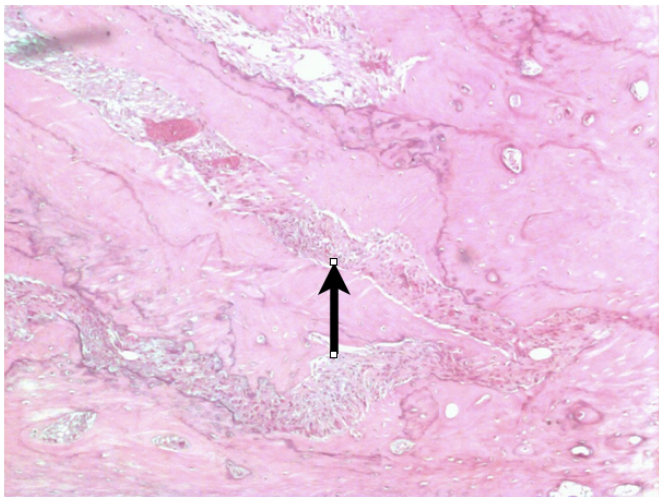


Figure 13: Mild fibrosis; tracks of fibrosis amid the bone tissue.

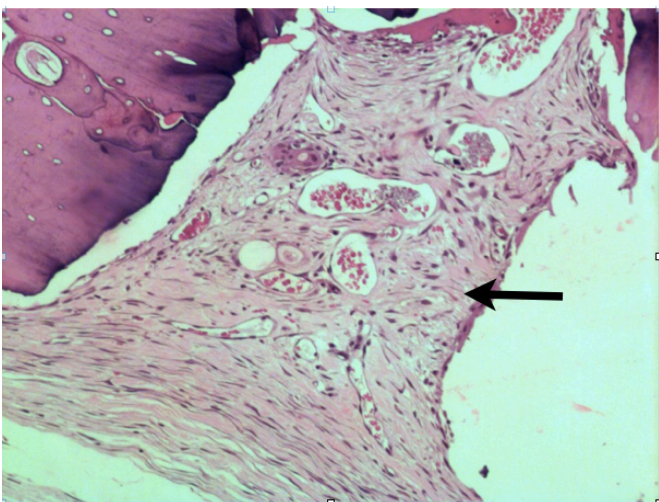


Figure 14: Moderate fibrosis: Young fibroblasts, with dilated and congested blood vessels.

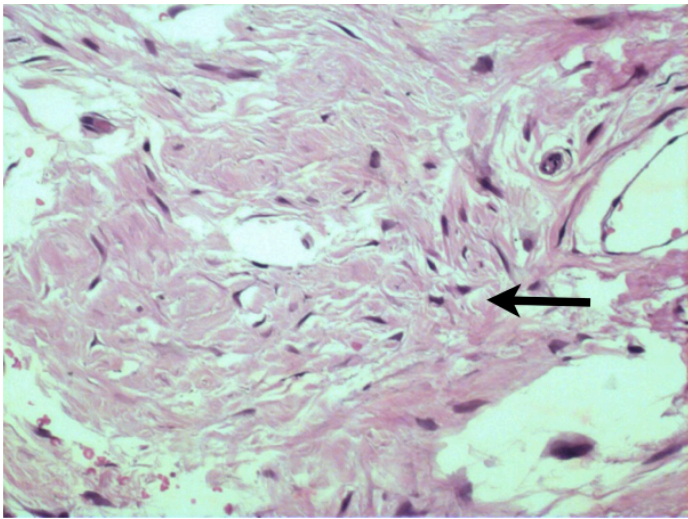


Figure 15: Severe fibrosis: extensive area of fibrosis with mature fibroblasts and thick fibrosis.

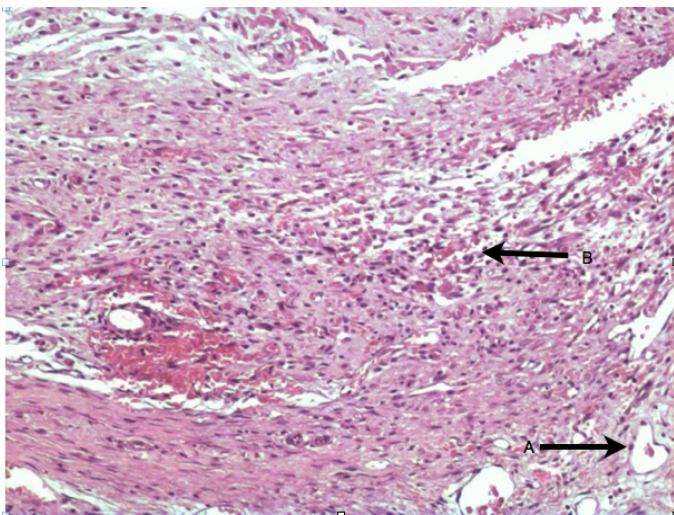


Figure 16: Granulation tissue: vascular proliferation (A), mononuclears, edema and polymorphonuclears (B).

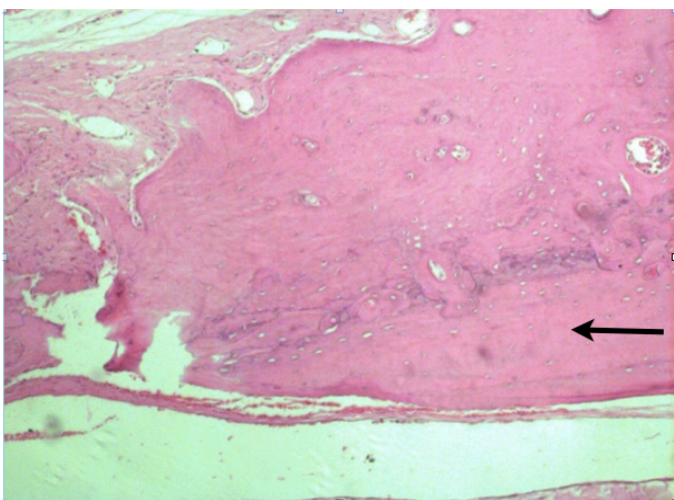


Figure 17: Normal bone tissue: lamellar bones with regular distribution (arrow), small and fusiform osteocytes.

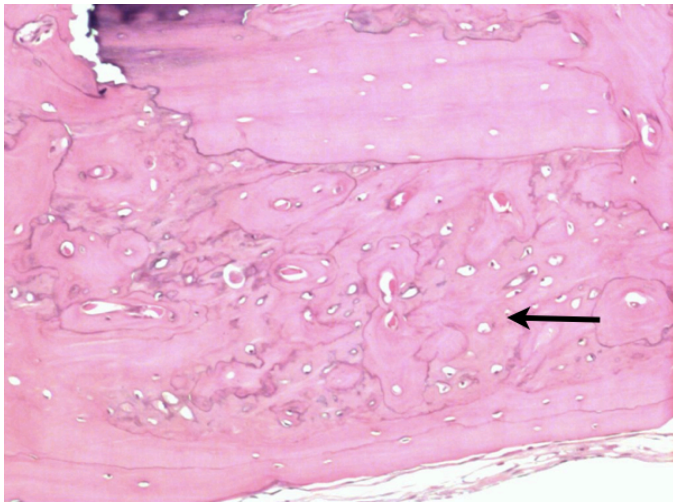


Figure 18: Proliferative bone tissue: lamellar bones with irregular distribution (arrow), larger osteocytes in irregular spaces.

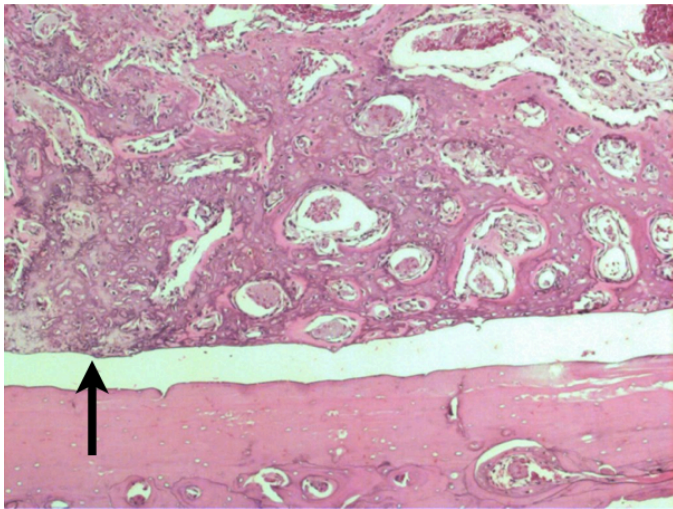


Figure 19: Proliferative bone callus.

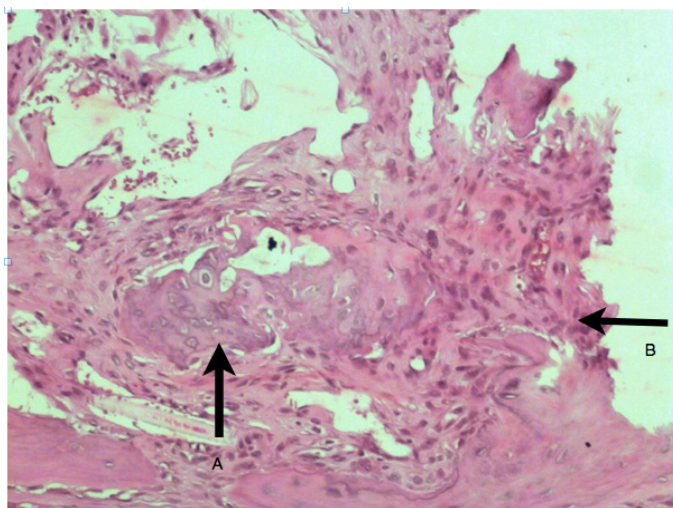


Figure 20: Fibrocartilaginous proliferative tissue: (A) cartilage (B) fibrosis.

Statistical Analysis

The dependent variable in the study is the histological score and the independent variables are the types of material and the periods of death. The scores of the two materials were individually compared.

In order to evaluate the distribution of the histological score, the Shapiro-Wilk test was used presenting a $p=0.256$ value, that is, the distribution was considered normal. Then, it was used the two-way analysis of variance (ANOVA – the 2 ways are explained in the flowchart aforementioned), considering significant a P lower than 0.05, evaluated by SPSS version 18.

To observe the inter-observer concordance, it was used the Bland Altman coefficient (16) with the randomization of 20 rats from the sequence of pathological observation.

Results

There was no significant difference in the average histological score of the two evaluators (6.0 ± 2.1 vs 6.4 ± 1.9 ; $p=0.185$). When the concordance was evaluated using the Bland Altman method, only in one rat there was discordance (5%), according to fig. 21. Whereas the scoring items of greater subjectivity are the degree of inflammation and the fibrosis degree, there was a significant agreement among evaluators using the Kappa coefficient ($k>0.5$; $p\leq 0.001$).

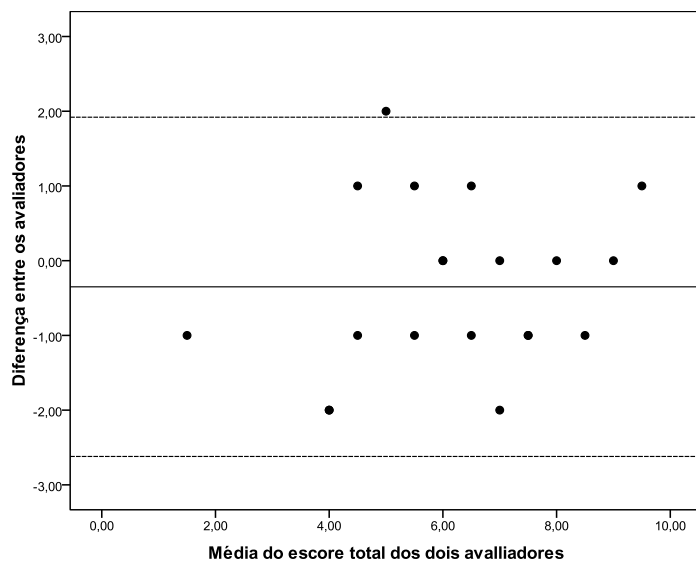


Figure 21: Concordance evaluation among the evaluators according to Bland-Altman. The central line represents the average of differences. The inferior and superior dotted lines represent the 95% concordance interval.

Table 1: Evaluation of histological score per group and per death days

Group	Death days	Histological score			Differences		
		Average \pm DP	15-30 days	30-60 days	60-90 days		
Blend	15	7.6 \pm 0.5	-2.0	2.9	-2.6		
	30	5.6 \pm 1.1					
	60	8.5 \pm 0.5					
	90	5.9 \pm 0.6					
Copolymer	15	8.4 \pm 0.9	-3.2	1.4	-1.3		
	30	5.2 \pm 0.8					
	60	6.6 \pm 0.5					
	90	5.3 \pm 1.6					

The averages of the histological score per group and days of death are shown in Table 1. In the blend group, there was a significant reduction of the histological score from 15 to 30 days ($p=0.002$) and from 60 for 90 days ($p<0.001$); however there was a

significant increase from 30 to 60 days ($p < 0.001$). In the copolymer group, it was obtained a similar result from 15 to 30 days ($p = 0.002$). But, from 30 to 60 days ($p = 0.403$) and from 60 to 90 days ($p = 0.310$), the difference was not statistically significant, but the behavioral curve was similar (figure 22).

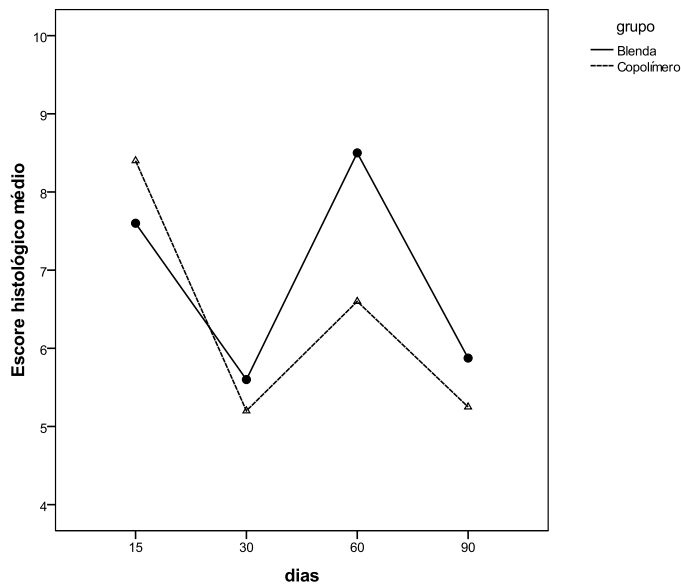


Figure 22: Histotoxicity behavior of both materials according to days of death.

When the groups were compared as to the days of death, there was a statistically significant interaction by 2-way ANOVA ($F = 3.52$; $gl = 3.39$; $p = 0.024$). As it was observed in figure 23, there was a significant difference between the groups in the 60 days of death ($p < 0.001$). With Table 2, it can be noted that this difference is probably due to the items of inflammation degree, fibrosis and present granulation tissue.

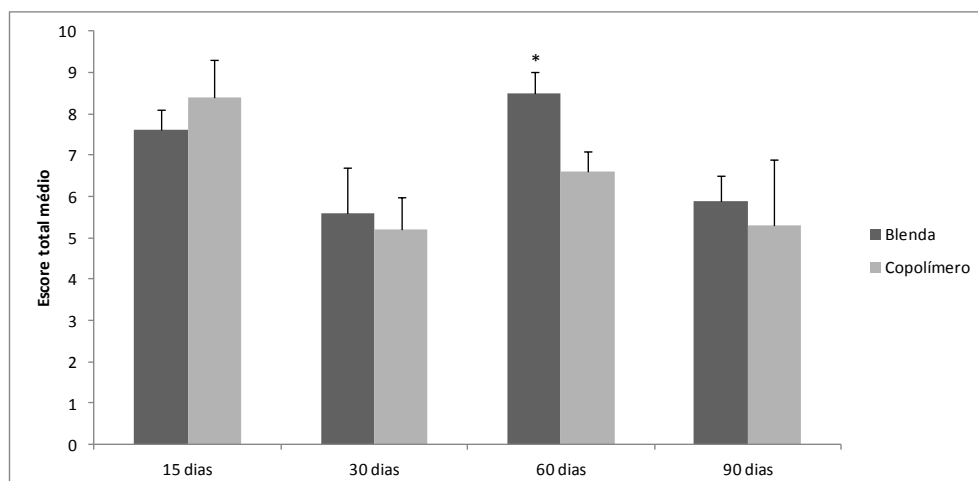


Figure 23: Histological score according to the group and days of death (* P<005).

Table 2: Evaluation of items of the histological score according to days of death and group

Items	15 days		30 days		60 days		90 days	
	GB	GC	GB	GC	GB	GC	GB	GC
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Foreign body	5 (100)	5 (100)	5 (100)	4 (80)	6 (100)	5 (100)	8 (100)	6 (75)
Inflammation								
Absent	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12.5)
Mild	2 (40)	1 (20)	5 (100)	5 (100)	3 (50)	5 (100)	7 (87.5)	7 (87.5)
Moderate	2 (40)	3 (60)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	0 (0)	1 (12.5)	0 (0)
Severe	1 (20)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Fibrosis								
Mild	1 (20)	0 (0)	2 (40)	3 (60)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12.5)
Moderate	4 (80)	3 (60)	3 (60)	2 (40)	0 (0)	5 (100)	7 (87.5)	6 (75.0)
Severe	0 (0)	2 (40)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	1 (12.5)	0 (0)
Tissue granulation	5 (100)	5 (100)	1 (20)	0 (0)	6 (100)	3 (60)	8 (100)	7 (87.5)
Tissue reaction								
Bone	0 (0)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)	8 (100)
Callus	5 (100)	5 (100)	4 (80)	5 (100)	6 (100)	5 (100)	0 (0)	0 (0)
Neoformation								
Normal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (37.5)	2 (25.0)
Proliferative	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	6 (100)	5 (100)	5 (62.5)	6 (75.0)

Macroscopy

The macroscopic visual analysis of the implanted material showed the stability of the PLGA copolymer in all the animal's days of death , but the PLGA / PI blend showed an alteration similar to the erosion of the edges from the postoperative 60 days (Fig. 24, 25)

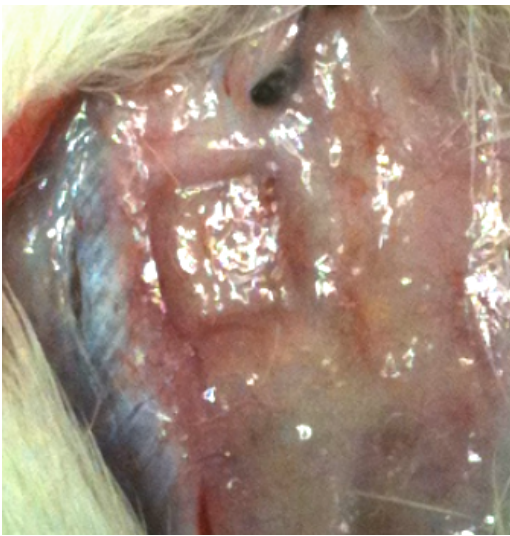


Figure 24: PLGA Copolymer at postoperative 60 days



Figure 25: PLGA / PI Blend at postoperative 60 days

Discussion

From the development to the clinical utilization, the biomaterials shall pass by different steps where several criteria must be obeyed. According to Sittinger (17) the biomaterials must be nontoxic, have adequate speed of absorption, low immunological response, acarcinogenic and atrombogenic .

Vert (18) in his review on the use of aliphatic polyesters conceptualizes the tissue responses of biocompatibility and bioresorption.

The PLGA used in this study is a copolymer with 84% L lactide and 16% glycolide. Conceptually it is biocompatible, bioresorbable and biotolerable, that is, it is well tolerated by the tissues without causing any damage to the body, induces the formation of fibrous capsule and its metabolites are eliminated by the body by metabolic routes. The poly(isoprene) is biocompatible, biotolerable, but it is not absorbable (9, 18-20).

According to Balabanian (20), the tissue feasibility of a biopolymer is defined by histological, histometrical and radiographic tests and defined quantitative variables or normality or severity standards were not defined.

Dadas e cols. (14) elaborated a rational histotoxicity score with the evaluation of foreign body, degree of inflammation and fibrosis; granulation tissue and type of neoformed tissue. Their sample was small (without estimate of size) and in the item related to tissue neoformation, the graduation is inverted. However, it is a logic and reproducible classification, evaluating quantitatively the histological and histometrical values. In this study, the score showed the evidence of having internal validity as well as it showed a good interobserver concordance.

The center of AHA degradation is the hydrolysis, which transforms large chains into small ones until becoming water soluble for enzymatic action and finally the metabolization through macrophages (21-24). For this reason, the speed of biopolymer degradation depends on facilitating factors of hydrolysis and enzymatic action: degree of

crystallinity, chemical stability, chemical stability, presence of catalysts, additives, impurities, location, size and geometry of the implant (18, 21).

There are also variations in the magnitude and chronology of inflammatory response. Getter e cols. found inflammatory cells scattered in mandible of rats operated until 40 weeks after implantation of poly (lactic acid) material (25).

Kulkarni e cols. implanted films of poly (lactic acid) in subcutaneous of pigs and noted that after 2 weeks, there was intensification of inflammatory reaction with the presence of foreign body reaction and edema that lasted up to the 4th. week (26).

Studies with suture poly (lactic acid) polymers have dated from the 70's and they show that the degradation period with persistent mild inflammatory reaction is, in average, 90 days. Similar results were also shown with the first suture PLGA copolymers in threads (Vicryl®).

The histological analysis by Balabanian e cols. (20) showed severe inflammatory reaction up to 7 days after latex implant in alveoli of rats. As poly (isoprene) is not absorbable, it generated a reaction of a foreign body, with a severe fibrosis which was replaced gradually by lamellar bone tissue until the 42 post operative days.

In this study, it was noted a similar histotoxic behavior in both groups (Fig. 23), with a decrease of histotoxicity from 15 to 30 days, increase from 30 to 60 days and once again a decrease from 60 to 90 days. Such variation was significant in the blend group (GB) and only significant from 15 to 30 days in the copolymer group (GC). The explanation for the phenomenon can be the decrease of inflammatory reaction of the

surgical trauma from the 15 to 30 days, hydrolyzation of PLGA (present in both materials) with liberation of Pi granules in GB, which increased the inflammatory reaction and fibrosis production. In GC, it can be supposed that the hydrolyzation began the superficial break, activated the enzymatic system which processed the material, not being significant the increase of histotoxicity at 60 postoperative days>It can be evidenced, taking into account the irregularity of the blend surface at 60 postoperative days (60 days of death) (Fig. 25 and 26). Thus, it can be seen that the variation of tissue reaction in GC is much milder than GB.

There was a statistically significant interaction with the increase of histotoxicity in GB at 60 postoperative days. For the use in humans, it's fundamental to evaluate whether such increase of histotoxicity is clinically adverse. Studies already developed with the application of poly(isoprene) in eardrums and conjunctival membrane of humans did not present significant clinical toxicity (28-29).

The primary factor for clinical application of PLGA/PI is the evaluation of this double peak toxicity. In this study, (in rats) the peaks occurred at 15 and 60 days simultaneously. According to Vert. e cols. (18), the periods of the increase of tissue reaction of a copolymer(for example, PLGA) depend on the implanted site and the proportion of each polymer.

It is observed that the histotoxicity of GB at 60 days was not statistically higher than the GC at 15 days (Fig 24). Then, It is supposed that the increase of histototxicity of GB at 60 days doesn't offer any potential risk for clinical use, because PLGA copolymer is already used.

There are also procedures that can be adopted during the confirmation of increased risk using PLGA/PI blend. The PI can only be treated with proteolytic enzymes or addition of polar solvents, which reduces the antigenicity by 50% (30, 31).

Thus, the increase of toughness and resistance conferred by the PLGA / IP options open new options for the research and possible use in humans. Among the uses of this new biomaterial, the most important are bone expansion (stents in craniosynostosis), interference screws in ligament reconstruction, tendon reconstructions and scaffolds to obtain soft tissues. However, more researches must be done to evaluate and quantify the increase of histotoxicity in the 2nd peak of tissue reaction.

Conclusions

1- PLGA / PI blend showed histotoxicity similar in the groups 15 and 30 days and in the long range, 90 days, of death, in comparison with the PLGA copolymer.

2- PLGA / PI blend showed histotoxicity at 60 days of death.

3- PLGA / PI blend showed more signals of macroscopic degradation from the 60 days of death.

REFERENCES

1. Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J. Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavour. Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine. 2nd ed: Elsevier; 2004.
2. Williams DF. Definitions in biomaterials. In: William DF, editor. Progress in Biomedical Engineering. Amsterdam Elsevier; 1987.
3. Marques DG. Obtenção e caracterização de blendas poliméricas de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) para aplicação como biomaterial. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
4. Sena P, Manfredini G, Barbieri C, Mariani F, Tosi G, Ruozi B, et al. Application of poly-L-lactide screws in flat foot surgery: histological and radiological aspects of bio-absorption of degradable devices. *Histology and histopathology*. 2012 Apr;27(4):485-96. PubMed PMID: 22374726.
5. Ren Q, Ruth K, Thöny-Meyer L, Zinn M. Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;87(1):41-52.
6. Pihlajamäki H, Salminen S, Tynnenen O, Böstman O, Laitinen O. Tissue Restoration After Implantation of Polyglycolide, Polydioxanone, Polylactide, and Metallic Pins in Cortical Bone: An Experimental Study in Rabbits. *Calcified tissue international*. 2010;87(1):90-8.
7. David LR, Gewalli F, Guimãraes-Ferreira J, Sanger C, Glazier S, Argenta LC. Dynamic Spring-Mediated Cranioplasty in a Rabbit Model. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2002;13(6):794-801.
8. Ferreira MP, Collares MV, Ferreira NP, Kraemer JL, Pereira Filho Ade A, Pereira Filho Gde A. Early surgical treatment of nonsyndromic craniosynostosis. *Surgical neurology*. 2006;65 Suppl 1:S1:22-1:6; discussion S1:6. PubMed PMID: 16427442.
9. Ravagloli A, Krajewski A. Bioceramics: materials, properties, applications. New York: Chapman & Hall; 1992.
10. Callister W. Material Science and Engineering, an introduction: John Willey & Sons Inc; 1991.
11. Valente A, Zinck P, Mortreux A, Visseaux M. Catalytic Chain Transfer (co-Polymerization): Unprecedented Polyisoprene CCG and a New Concept to Tune the

Composition of a Statistical Copolymer. *Macromol Rapid Commun.* 2009 04/01;30(7):528-31. eng.

12. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros.* 2005;15:13-21.

13. Vanin M, Santana CC, Torriani ÍL, Privelic T, Duek EAR. Estudo da degradação "in vitro" de blendas de poli(b-hidroxibutirato) (PHB) / poli(L-ácido lático) (PLLA) na forma de filmes. *Polímeros.* 2004;14:187-93.

14. Dadaş B, Alkan S, Cifci M, Başak T. Treatment of tripod fracture of zygomatic bone by N -2-butyl cyanoacrylate glue fixation, and its effects on the tissues. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 2007;264(5):539-44.

15. Cardoso TP, Duek EAdR, Amatuzzi MM, Caetano EB. Prótese meniscal de polímero bioabsorvível: estudo em coelhos. *Revista Brasileira de Ortopedia.* 2010;45:247-59.

16. Hirakata V, S. C. Análise de Concordância entre métodos de Bland Altman. *Rev HCPA.* 2009;29(3):261-68.

17. Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, et al. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res.* 1996 Summer;33(2):57-63. PubMed PMID: 8736023.

18. Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and Biocompatibility of Aliphatic Polyesters. *J Mater Sci-Mater M.* 1992 Nov;3(6):432-46. PubMed PMID: WOS:A1992JY82000008. English.

19. Hench LL, Wilson J. *Introduction to Bioceramics.* Singapore: Word Scientific Publishing Co. Ltd; 1993.

20. Balabanian C, aacute, udia ACA, Coutinho-Netto J, Lamano-Carvalho TL, Lacerda SA, et al. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. *Journal of Oral Science.* 2006;48(4):201-5.

21. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* Birmingham2000. p. 2335-46.

22. Jahno VD. Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

23. Smith R, Oliver C, Williams DF. The enzymatic degradation of polymers in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1987 Aug;21(8):991-1003. PubMed PMID: 2958461.

24. Schindler A, Pitt CG. Polymer preparation. Amer Chem Soc Poly Chem Dir. 1983;23:111-2.
25. Getter L, Cutright DE, Bhaskar SN, Augsburg JK. A biodegradable intraosseous appliance in the treatment of mandibular fractures. Journal of oral surgery. 1972 May;30(5):344-8. PubMed PMID: 4503101.
26. Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, Leonard F. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. J Biomed Mater Res. 1971 May;5(3):169-81. PubMed PMID: 5560994.
27. Devi KS, Vasudevan P. Absorbable surgical sutures. JMS Rev Macromol Chem Phys. 1985;25:315-.
28. Pinho ECCM. O uso da biomembrana de látex natural comparado ao transplante conjuntival autólogo na superfície ocular. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2011.
29. Oliveira JAA, Hypolito MA, Coutinho – Neto J, Mrué F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biosintético. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.
30. Amnuayporn Sri S, Sakdapipanich J, Tanaka Y. Highly purified natural rubber by saponification of latex: Analysis of green and cured properties. J Appl Polym Sci. 2010;118(6):3524-31.
31. Brydson JA, Rubbery Materials and their compounds. New York: Elsevier Science Publisher. 1988.