

NMDANDRÉ LUIZ PATARO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPÓSITOS DE
POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS EM UMA MATRIZ DE
BIOCERÂMICA COM ADIÇÃO DE TETRACICLINA**

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA – UFMG
2005**

ANDRÉ LUIZ PATARO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPÓSITOS DE
POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS EM UMA MATRIZ DE
BIOCERÂMICA COM ADIÇÃO DE TETRACICLINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Esperanza Cortés

Co-orientador: Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA – UFMG
2005**

CETEA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Ediana e a meu pai Gilberto (*in memoriam*), que sempre souberam que caráter e conhecimento são os maiores legados que se podem deixar a um filho.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Esperanza, pela acolhida desde a iniciação científica à pós-graduação, sempre me impulsionando e me ensinando a enxergar mais distante que os olhos podem alcançar.

Ao Prof. Rubén, pela sua sabedoria e estímulo ao crescimento científico.

Ao Dr. Francisco Henrique Lanna Wykrota, pelo incentivo e compartilhamento de sua experiência clínica e científica.

À Prof^a. Ana Maria Caetano de Faria, por sempre manter abertas as portas de seu laboratório e sempre estar disposta a nos orientar de uma forma precisa e tranqüila.

À Prof^a. Regina Maria De Marco Turchetti Maia e à Prof^a. Miriam Tereza Paz Lopes, pela ajuda nos testes *in vitro* e elucidações da escrita.

Ao Prof. Antônio Paulino, por se mostrar prestativo e cordato no desenvolvimento do projeto.

À Prof^a. Maria Cássia Ferreira de Aguiar, pela ajuda no desenvolvimento do projeto e pelo acesso ao laboratório.

À Prof^a. Isabela de Almeida Pordeus, pelo apoio e amparo junto à coordenação da pós-graduação.

Ao Diretor e Prof. Ricardo Santiago Gomes, pelos esclarecimentos no desenrolar da pesquisa.

Ao Vice-Diretor e Prof. Vagner Santos, pela amizade, acompanhamento e orientação desde a iniciação científica, além de sua alegria contagiante.

À acadêmica Michele Fabiane Oliveira, pelo auxílio na confecção das pastilhas e procedimentos cirúrgicos.

À cirurgia-dentista Karina Imaculada Rosa Teixeira, pelo auxílio nas avaliações microscópicas.

À bióloga Alice Oliffson Kamphorst Leal da Silva, por sempre se mostrar gentil e prestativa junto aos procedimentos *in vivo*.

Às funcionárias Maria (*in memoriam*) e Inês, do laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo auxílio na confecção das lâminas.

À funcionária Ilda do biotério do laboratório de Imunologia e do Instituto de Ciências Biológicas de Universidade Federal de Minas Gerais, pelo cuidado com os animais experimentais.

Ao Sr. Garcia, pela ajuda na criação de imagens tão fantásticas.

Às funcionárias Vanessa, Janeti, Sara e Beth, da pós-graduação, pela ajuda em momentos decisivos.

A todos os colegas da pós-graduação, pelo coleguismo e compreensão, especialmente ao Alfonso Gala Garcia, pelo companheirismo e trabalho em equipe.

Aos alunos do Departamento de Química, pelo ajuda no desenvolvimento de todo o projeto.

Às funcionárias da biblioteca da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo empenho e dedicação.

Aos demais funcionários da Universidade Federal de Minas Gerais, que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

Ao amigo Pedro Mateus, pelos aconselhamentos em horas certas.

Ao meu irmão Danilo, pela amizade e presença em todos os momentos.

À Natália, pelo carinho, compreensão e torcida.

A toda minha família, principalmente a minha mãe Ediana e aos meus avós Belico e Zizi pelo carinho e amor indubitáveis.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

À EINCO Biomaterial Ltda., pelo apoio.

Ao Departamento de Química – ICEX-UFMG, por manter sempre as portas abertas.

Ao Laboratório de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia – ICB-UFMG.

Ao Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB-UFMG.

Ao Laboratório de Imunobiologia e de Imunofisiologia – ICB-UFMG.

Ao Laboratório de Botânica – ICB-UFMG.

Ao Laboratório de Microbiologia – FO-UFMG.

Ao Laboratório de Patologia – FO-UFMG.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise, ICEX-UFMG.

*“... e o mago, através das visões proporcionadas pelos
falcões, conduzia sua tribo no deserto, com todas as
regalias de um líder.
Mas sabia que as aves não ficariam ali para sempre.
Eis o dilema: como conduzir a aldeia sem as visões?
Mentir para si mesmo e para os outros ou perder a inércia
dos benefícios e acompanhar os falcões para seguir o
seu real destino?”*

Guiados por Deus, escolhemos nosso próprio destino.

É necessário ter discernimento, sensibilidade e ao mesmo tempo ousadia para seguir o melhor caminho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	13
LISTA DE GRÁFICOS.....	15
LISTA DE TERMINOLOGIAS E DEFINIÇÕES	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	19
RESUMO.....	20
1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 Biocompatibilidade	31
2.2 Andaimos para crescimento ósseo	34
2.2.1 Porosidade	36
2.2.2 Propriedades mecânicas	37
2.2.3 Características da degradação	38
2.2.4 Esterilização de materiais para crescimento ósseo.....	40
2.3 Polímeros biodegradáveis	41
2.3.1 Resistência mecânica e morfologia.....	44
2.3.2 Biodegradação dos poliésteres.....	46
2.4 Biocerâmicas	49
2.5 Compósitos: associação de biomateriais para a reconstrução óssea	54
2.6 Utilização da tetraciclina para a neoformação óssea	55
2.7 A resposta tecido/implante	58
3 OBJETIVOS	60
4 MATERIAIS E MÉTODOS	62
4.1 Substâncias, reagentes, células e animais utilizados	63
4.2 Testes de Citotoxicidade	64
4.2.1 Preparação dos compostos.....	65
4.2.1.1 Incorporação de tetraciclina aos compósitos.....	66
4.2.1.2 Preparação de pastilhas dos compósitos.....	66
4.2.2 Avaliação da citotoxicidade.....	66
4.2.3 Cultivo de linhagens celulares animais.....	67
4.2.3.1 Método por contato direto - norma ASTM F-813.....	67

4.2.3.2 Método por Eluição - USP XXIII.....	69
4.3 Testes de avaliação biológica <i>in vivo</i>	70
4.3.1 Preparação dos compostos.....	70
4.3.2 Preparação de pastilhas dos compósitos.....	71
4.3.3 Avaliação da resposta biológica <i>in vivo</i>	71
4.3.4 Animais.....	73
4.3.5 Implantes.....	74
4.3.6 Remoção dos implantes.....	76
4.3.7 Histologia.....	76
4.3.8 Análise estatística.....	77
4.4 Avaliação microscópica da superfície das pastilhas implantadas	77
5 RESULTADOS	78
5.1 Obtenção dos compósitos entre polímeros e biocerâmica	79
5.2 Teste de citotoxicidade	80
5.2.1 Teste de contato direto - norma ASTM F- 813.....	80
5.2.2 Teste por eluição - USP XXIII.....	82
5.3 Análise histológica dos testes <i>in vivo</i>	83
5.3.1 Análise descritiva semiquantitativa e análise estatística	83
5.3.2 Análise histológica por imagens de microscopia ótica.....	112
5.4 Avaliação microscópica da superfície das pastilhas implantadas	122
através de MEV	
6 DISCUSSÃO	132
7 CONCLUSÕES	145
SUMMARY.....	148
REFERÊNCIAS	149
ANEXOS	163

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química dos polímeros dos ácidos glicólico (PGA) e láctico (PLA)	42
FIGURA 2	Estrutura química da tetraciclina	56
FIGURA 3	Implantação dos compósitos. A) animal anestesiado; B) tricotomia; C) incisão; D) divulsão do tecido; E) pastilha; F) Implantação da pastilha; G) sutura; H) aplicação de analgésico e anti-séptico tópicos	75
FIGURA 4	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo: A) hígado, 40x, B) 1 dia após cirurgia, 40x, C) 7 dias após cirurgia, 100x e D) 14 dias dia após cirurgia 100x. Hematoxilina-eosina	112
FIGURA 5	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação da pastilha de PLA:BC + TCN 0,1%. Infiltrado inflamatório intenso localizado. A) 40x. B)100x. C) Predomínio de neutrófilos polimorfonucleares. 400x. Hematoxilina-eosina.....	113
FIGURA 6	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação da pastilha de PLA. A) Infiltrado inflamatório intenso localizado, vasos hiperemiados e deposição de tecido fibroso. B) Vaso hiperemiado. A) 40x e B)100x. Hematoxilina-eosina.....	113
FIGURA 7	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação de pastilhas do compósito PLGA:BC. A) e B) Infiltrado inflamatório leve e deposição de tecido fibroso. C) Infiltrado inflamatório intenso localizado, vasos hiperemiados e deposição de tecido fibroso. Região onde a pastilha foi removida (seta), 40x; D) Neutrófilo em processo de diapedese (seta), 400x. A) 40x, B) 100x, C) 40x e D) 400x. Hematoxilina-eosina	114

FIGURA 8	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação da pastilha do composto PLA:BC. A) Infiltrado inflamatório moderado e deposição de tecido fibroso. Região onde a pastilha foi removida (seta), 40x. Hematoxilina-eosina.....	115
FIGURA 9	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação de pastilha de biocerâmica. Infiltrado inflamatório leve e pequena deposição de tecido fibroso. 40x. Hematoxilina-eosina.....	115
FIGURA 10	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 7 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC. Infiltrado inflamatório leve e vasos hiperemiados. A) 40x e B)100x. Hematoxilina-eosina.....	116
FIGURA11	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 7 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC + TCN 0,1%. Infiltrado inflamatório leve e vasos hiperemiados. Aumento no número de fibroblastos e deposição de tecido fibroso (seta). A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina.....	116
FIGURA 12	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 13 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC. Poucas células inflamatórias e deposição de tecido fibroso. A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina.....	117
FIGURA 13	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 13 dias após implantação da pastilha de PLA:BC. Poucas células inflamatórias e grande número de fibroblastos. 40x. Hematoxilina-eosina	117
FIGURA 14	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 13 dias após implantação da pastilha de PLA:BC + TCN 0,1%. Poucas células inflamatórias e grande número de fibroblastos. * Imagem negativa da pastilha. A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina.....	118

FIGURA 15	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 21 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC. Poucas células inflamatórias e deposição de tecido fibroso. A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina.....	118
FIGURA 16	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 21 dias após implantação da pastilha de PLGA. Poucas células inflamatórias, deposição de tecido fibroso e sinais de hemorragia (seta). 40x. Hematoxilina-eosina.....	119
FIGURA 17	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 28 dias após implantação da pastilha de PLA:BC. Poucas células inflamatórias. A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina..	119
FIGURA 18	Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 28 dias após implantação da pastilha de PLA. Poucas células inflamatórias. 40x. Hematoxilina-eosina.....	120
FIGURA 19	- Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 56 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC + TCN 0,1%. Poucas células inflamatórias. 40x. Hematoxilina-eosina.	120
FIGURA 20	MEV da pastilha BC antes de ser implantada.....	122
FIGURA 21	MEV das pastilhas dos controles A) PLGA e B) PLA não implantadas	123
FIGURA 22	MEV da pastilha do compósito PLA:BC não implantada. Micro-porosidades (seta superior) e macroporosidades (seta inferior). BC - biocerâmica; P - PLA	124
FIGURA 23	MEV da pastilha do compósito PLA:BC + 0,01% TCN não implantada. A) Macro-porosidades. B) Micro-porosidades	124
FIGURA 24	MEV das pastilhas de A) compósito PLGA:BC 13 dias após implantação e B) compósito PLGA:BC + 0,01% TCN 21 dias após implantação. Aumento da porosidade	125
FIGURA 25	MEV da pastilha do compósito PLA:BC + 0,01% TCN 21 dias após implantação. Aumento da porosidade, maior arredondamento e reabsorção das partículas de biocerâmica. P - PLA; BC – biocerâmica	126

FIGURA 26	MEV da pastilha do compósito PGLA:BC + TCN 0,1%, retirada 28 dias após a implantação. Perfil de degradação do compósito à esquerda e presença de tecido conjuntivo (TC)	126
FIGURA 27	MEV da pastilha do compósito PLGA:BC, retirada 1 dia após a implantação. A) Tecido conjuntivo (TC) recobrindo a pastilha parcialmente; 20x. B) Presença de algumas células	127
FIGURA 28	MEV da pastilha do compósito PLGA:BC, retirada 13 dias após a implantação. A) Perfil de degradação do compósito e presença de tecido conjuntivo do camundongo. B) Células (setas)	127
FIGURA 29	MEV da pastilha do compósito PLA:BC + TCN 0,1% retirada 28 dias após a implantação. Possíveis cristais de tetraciclina (TCN) e células (seta)	128
FIGURA 30	MEV da pastilha do compósito PLA:BC retirada 28 dias após a implantação. Células (setas)	128
FIGURA 31	MEV da pastilha do polímero PLGA, retirada 1 dia após a implantação. Tecido conjuntivo recobrindo toda a pastilha	129
FIGURA 32	MEV da pastilha do compósito PLGA:BC, retirada 21 dias após a implantação. Formação sugerindo a presença de fibras colágenas (FC) e vasos sanguíneos (V)	129
FIGURA 33	MEV da pastilha do compósito PLGA:BC + TCN 0,1% retirada 56 dias após a implantação. Micro e macroporosidades e a união do tecido conjuntivo à pastilha	130
FIGURA 34	MEV da pastilha de A) controle BC, retirada 27 dias após a implantação e B) compósito PLA:BC + TCN 0,1%, retirada 56 dias após a implantação. Vasos sanguíneos (V) na superfície das pastilhas	131

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	Desenvolvimento histórico dos biomateriais e uma perspectiva para o futuro. (Fonte: HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the Future. <i>Biomaterials</i> , v.19, p.1419, 1998b)	24
QUADRO 2	Relação das possíveis áreas envolvidas no estudo e desenvolvimento de biomateriais e os aspectos abordados pelas mesmas	31
QUADRO 3	Testes recomendados para avaliação biológica de materiais dentários	33
QUADRO 4	Características desejáveis para um andaime/dispositivo de engenharia de tecidos para osso	36
QUADRO 5	Fatores que afetam a degradação do andaime/matriz	39
QUADRO 6	Cristalinidade e propriedades térmicas do PGA, PLA e copolímeros	44
QUADRO 7	Conversão da unidade Mesh para unidade micrômetro	65
QUADRO 8	Descrição da zona afetada e respectivos índices de zona (IZ)	68
QUADRO 9	Descrição da lise provocada e respectivos índices de lise (IL)	68
QUADRO 10	Graus de reatividade para o teste de eluição	70
QUADRO 11	Normas para avaliação da biocompatibilidade dos materiais propostas por ANAND (2000)	72
TABELA 1	Citotoxicidade <i>in vitro</i> de compósitos formados pela associação de biocerâmica com diferentes polímeros biodegradáveis; teste de contato direto (ASTM F-813)*	81
TABELA 2	Citotoxicidade <i>in vitro</i> de compósitos formados pela associação de biocerâmica com diferentes polímeros biodegradáveis; teste de eluição (USP-XXIII)*	82
TABELA 3	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 1	84

	dia após a implantação os materiais.....	
TABELA 4	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 7 dias após a implantação dos materiais.....	86
TABELA 5	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 13 dias após a implantação dos materiais.....	88
TABELA 6	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 21 dias após a implantação dos materiais.....	90
TABELA 7	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 28 dias após a implantação dos materiais.....	92
TABELA 8	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 56 dias após a implantação dos materiais.....	94
TABELA 9	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLGA:BC em diferentes tempos.....	96
TABELA 10	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p em diferentes tempos.....	98
TABELA 11	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLA:BC em diferentes tempos.....	100
TABELA 12	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLA:BC + TCN 0,1 % p/p em diferentes tempos.....	102
TABELA 13	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao polímero PLGA em diferentes tempos.....	104
TABELA 14	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao polímero PLA em diferentes tempos.....	106
TABELA 15	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos à biocerâmica em diferentes tempos.....	108
TABELA 16	Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos em diferentes tempos submetidos somente à incisão inicial	110

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Mudança do peso molecular (MW) de dispositivos fabricados a partir de PLGA 50/50 e liberação de ácido glicólico (GA), D-lático (D-LA) e L-lático (L-LA). As amostras foram dispostas em um meio aquoso <i>in vitro</i> a 37°C. Fonte: WONG & MOONEY (1997), p.59	47
GRÁFICO 2	Perda da massa dos dispositivos fabricados a partir de diferentes polímeros. Fonte: WONG & MOONEY (1997), p.61	48
GRÁFICO 3	Variabilidade e dos valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 1 dia após a implantação os materiais.....	84
GRÁFICO 4	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 7 dias após a implantação os materiais.....	86
GRÁFICO 5	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 13 dias após a implantação os materiais.....	88
GRÁFICO 6	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 21 dias após a implantação os materiais.....	90
GRÁFICO 7	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 28 dias após a implantação os materiais.....	92
GRÁFICO 8	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 56 dias após a implantação os materiais.....	94
GRÁFICO 9	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLGA:BC em diferentes tempos.....	96
GRÁFICO 10	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p em diferentes tempos	98
GRÁFICO 11	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLA:BC em diferentes tempos	100
GRÁFICO 12	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLA:BC + TCN 0,1 % p/p em	102

	diferentes tempos.....	
GRÁFICO 13	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao polímero PLGA em diferentes tempos.....	104
GRÁFICO 14	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao polímero PLA em diferentes tempos.....	106
GRÁFICO 15	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos à biocerâmica em diferentes tempos.....	108
GRÁFICO 16	Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos em diferentes tempos submetidos somente à incisão inicial	110

TERMINOLOGIAS E DEFINIÇÕES

Biocerâmica: cerâmica para uso biológico.

Cerâmicas: Materiais compostos sólidos formados pela aplicação de calor, algumas vezes calor e pressão, constituídos por ao menos um metal (M) e um sólido elementar não-metálico (SENM) ou um não-metal (NM), dois SENM, ou um SENM e NM (BARSOU, 1997).

Compósitos: associação de materiais para uma finalidade comum, buscando otimização de propriedades.

Bioatividade: capacidade do material de induzir a deposição de cristais de apatita sobre sua superfície.

Bioativo: refere-se a um material que induz uma resposta biológica específica, sendo o oposto de bioinerte (WILLIAMS, 1987).

BMP (*Bone Morphogenetic Protein* – Proteína Óssea Morfogenética): nome genérico para proteínas osteoindutivas extraídas da matriz óssea por agentes como a 4M-guanidina hidrocloreídrica, sendo capaz de induzir neoformação óssea (URIST, 1990).

Heterotópico: refere-se à implantação de um enxerto em um sítio anatomicamente inapropriado. Sinônimo de ectópico.

Ortotópico: refere-se à implantação de um enxerto em um sítio anatomicamente apropriado.

Osteocondução: processo no qual é provido um arcabouço micro e macroscópico para possibilitar a migração de elementos celulares envolvidos na formação óssea (p.e. células mesenquimais, osteoblastos, osteoclastos e vasculatura) (FITCH *et al.*, 1997).

Osteoindução: processo de recrutamento de células mesenquimais circundantes que diferenciarão em células formadoras de cartilagem e osso, sob a influência de BMPs (URIST, 1980; STEVENSON, 1999), onde a bioação envolvida é a osteogênese (RIPAMONTI, 1996).

Osteogênese: em um senso comum, osteogênese refere-se à formação óssea sem a indicação de origem celular, ou seja, o osso neoformado pode se originar de células

vivas do enxerto ou de células derivadas do hospedeiro (STEVENSON, 1999). Uma definição mais estrita e mais comumente utilizada para osteogênese refere-se à formação óssea pelo transplante de células vitais (MULLIKEN *et al.*, 1984; FITCH *et al.*, 1997).

Polímeros: longas cadeias de moléculas que consistem em um número de pequenas unidades repetidas (RATNER *et al.*, 1996).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM:	“American Society for Testing and Materials”
BC:	Biocerâmica
BMP:	“Bone Morphogenetic Protein” – Proteína Óssea Morfogénica
CDTN:	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
FDA:	“Food and Drug Administration”
HA:	Hidroxiapatita
M:	Metal
MEV:	Microscopia eletrônica de varredura
MO:	Microscopia ótica
NM:	Não metal
OP:	“Osteogenic protein” – proteína osteogénica
PLA:	Poli (Ácido Lático)
PLGA:	Poli (Ácido Lático-Glicólico)
PRP:	Plasma rico em plaquetas
SENM:	Sólido elementar não-metálico
TCN:	Tetraciclina
TCP:	Tricálcio fosfato
Tg:	Transição vítrea
MHW	“Ministry of Health and Welfare” – Ministério de Saúde e Bem-Estar do Japão

RESUMO

Biocerâmicas de fosfato de cálcio (BC) e polímeros biodegradáveis têm se mostrado materiais interessantes para a engenharia de tecidos óssea. As biocerâmicas de fosfato de cálcio apresentam características físico-químicas e arquitetônicas importantes que possibilitam respostas biológicas como osteocondutividade e osteoindutividade intrínseca. Por outro lado, os polímeros biodegradáveis têm sido utilizados como andaimes na engenharia de tecidos, principalmente pela cinética previsível de biodegradação e plasticidade. No entanto, a formação de compósitos parece otimizar a resposta biológica reparadora. Todavia, a tetraciclina apresenta propriedades farmacológicas e biológicas favoráveis para a reconstrução óssea, como antibiótico de amplo espectro, atividade anticolagenásica, inibição de reabsorção de osso, ação antiinflamatória e uma habilidade para promover a adsorção de fibroblastos e tecido conectivo em superfícies radiculares. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a influência da associação de polímeros biodegradáveis em uma matriz biocerâmica, adicionando-se ou não tetraciclina, mediante: (1) graus de citotoxicidade *in vitro*; (2) padrões de resposta inflamatória *in vivo*; (3) características da superfície dos biomateriais; e (4) padrões de degradação. Os compósitos foram preparados utilizando-se os polímeros biodegradáveis D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) (PLGA) 50:50 ou D,L Poli (Ácido Lático) (PLA) (Birmingham Polymers, Inc.) dispersos em uma matriz da biocerâmica Osteosynt[®] de granulometria 80x60 Mesh (Einco Biomaterial Ltda.), na proporção 1:3 p/p respectivamente, adicionando-se ou não cloridrato de tetraciclina (Merck) 0,01% p/p para os testes *in vitro* e 0,1% p/p para os testes *in vivo*. Os materiais foram conformados em pastilhas de aproximadamente 7mm de diâmetro sob pressão constante de 250 kg/m² por 5 minutos e esterilizados por óxido de etileno. Estabeleceram-se os grupos teste: PLGA:BC, PLGA:BC + TCN, PLA:BC, PLA:BC + TCN e controle: BC, PLA, PLGA, tecido de animal apenas incisionado e tecido de animal hígido. Realizaram-se: (1) testes de citotoxicidade *in vitro* pelo contato direto dos mesmos com células de camundongo (fibroblastos tumorigênicos L-929) (ASTM F-813; ISO 10993-5) e testes de eluição a partir de extratos dos materiais (USP XXIII; ISO 10.993-5) assim como (2) resposta biológica *in vivo* através de análises macro e microscópicas (MO e MEV) após 1, 7, 13, 21, 28 e 56 dias de implantação dos materiais nos camundongos machos Swiss (aprovado pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal da UFMG, parecer 014/04) (ISO 10993-6; MHW 1995). Os resultados mostram baixa citotoxicidade *in vitro* dos compósitos quando comparados aos controles, sendo que o compósito PLA:BC apresentou um índice resposta melhor que o PLA e a BC isoladamente. O compósito PLGA:BC apresentou baixa citotoxicidade, semelhantemente ao PLGA e à BC. *In vivo*, a maioria dos compósitos e dos controles apresentou um infiltrado inflamatório de leve a moderado com predomínio de PMNs do 1º ao 7º, a partir do qual se observou a presença de um infiltrado inflamatório mononuclear. A resposta tecidual ao compósito PLGA:BC exibiu um acúmulo moderado de células inflamatórias mononucleares por mais tempo. Em todos os grupos, ao 21º dia, o padrão de organização tecidual demonstrou-se próximo da normalidade. A adição de tetraciclina influenciou favoravelmente a resposta biológica dos materiais, apresentando menor grau de inflamação. A adsorção de células a partir do 1º dia de implantação, assim como angiogênese, foram verificadas microscopicamente por MEV e MO, sendo que a angiogênese foi observada também macroscopicamente. As superfícies dos materiais implantados apresentaram uma microestrutura semicristalina, com os grânulos de BC recobertos por uma fase contínua e plástica de polímero em íntimo contato com os mesmos. As pastilhas sofreram erosão, principalmente as formadas por PLGA, diminuindo a porção superficial de polímero com aumento da exposição das partículas de biocerâmica, as quais apresentaram-se com formato mais arredondado. A porosidade dos compósitos foi aumentando em relação ao tempo. Os materiais testados apresentaram biocompatibilidade aceitável, demonstrando baixos graus de citotoxicidade para os testes *in vitro* e uma resposta inflamatória aguda inicial *in vivo*, a qual diminuiu progressivamente. Os resultados *in vivo* corroboram os *in vitro*, de forma que possibilitam a continuação da avaliação da biocompatibilidade, como em sítios ortotrópicos de outros modelos animais e humanos. As propriedades de modelagem do compósito sugerem o seu possível uso como material para reposição óssea, embora maiores testes sejam necessários para a comprovação desses usos.

INTRODUÇÃO

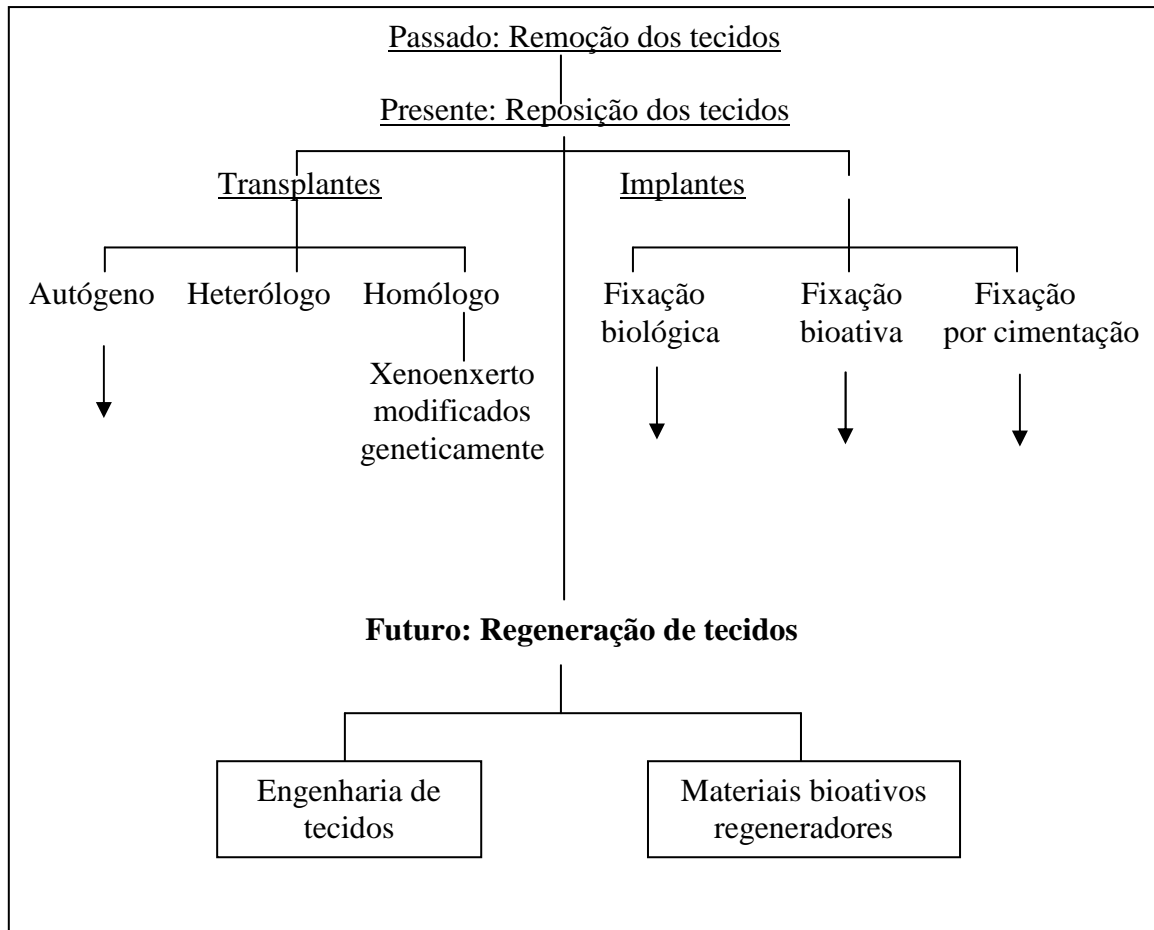
1 INTRODUÇÃO

Durante séculos, quando os tecidos ficavam doentes ou danificados, o médico removia a parte afetada. Entretanto, a taxa de sobrevivência humana raramente excedia o decréscimo progressivo da qualidade dos tecidos. Dessa forma, a necessidade de reposição das partes perdidas era pequena. Durante o último século, a descoberta dos anti-sépticos, da penicilina e de outros antibióticos, o tratamento químico da água, a melhora da higiene e as campanhas de vacinação contribuíram para o aumento da sobrevivência humana nos países desenvolvidos. A expectativa de vida é agora na faixa de 80 anos ou mais. Esse aumento da sobrevivência dos humanos, no entanto, pode resultar [que muitas pessoas em decréscimo da qualidade percam a](#) de seus tecidos (HENCH, 1998b), o que pode implicar na necessidade de reparo ou substituição desses.

Existem duas alternativas para a reposição do tecido perdido: transplante e implante. ~~_(FIG 1)_~~ Os transplantes podem ser divididos em: (1) autógenos, onde o tecido a ser enxertado é removido do próprio paciente; (2) aloenxerto, enxerto alógeno ou homólogo, onde o tecido transplantado é removido de um doador humano sem ser o paciente e (3) heterólogo ou xenólogo, no qual o material enxertado é proveniente de outra espécie. Os implantes seriam uma outra linha de ação para a substituição de tecidos e/ou órgãos, sendo obtidos em laboratórios pelo desenvolvimento, modificação ou síntese de materiais a serem interfaceados e/ou incorporados no organismo do hospedeiro. Dessa forma, os implantes a partir de biomateriais, chamados de enxertos aloplásticos, estariam associados à atividade celular do próprio indivíduo ou ainda através de engenharia de tecidos. [Esses materiais têm sofrido diversas modificações com o tempo. Os implantes apresentam vantagens na sua utilização, pois resultam em](#) fácil disponibilidade, reprodutibilidade e biocompatibilidade. Por conseguinte, implantes de materiais bioativos regeneradores associados à engenharia de tecidos correspondem à tendência futura para o desenvolvimento dos biomateriais [como mostrado no QUADRO 1](#) (HENCH, 1998b).

Nesse contexto, inserem-se diversos materiais desenvolvidos para substituir partes ou a função de um sistema vivo para o tratamento de doenças ou injúrias. Esses materiais que estão em íntimo contato com os tecidos são chamados de biomateriais. Um biomaterial é qualquer substância (diferente de um fármaco) ou

combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que pode ser usada a qualquer período de tempo como um todo ou em parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo (BORETOS & EDEN, 1984).



QUADRO 1 - Desenvolvimento histórico dos biomateriais e uma perspectiva para o futuro. Fonte: HENCH (1998b) p.1419

Os biomateriais podem ser divididos em: (1) metais, como titânio, aço inoxidável, ligas de Cr-Co e ouro; (2) polímeros, como nylon, siliconas, Teflon[®], Dacron[®]; (3) cerâmicas, como óxido de alumínio e hidroxiapatita; e (4) compósitos (PARK & LAKES, 1992).

Os biomateriais são usados, por exemplo, em preparações farmacêuticas, para o revestimento de cápsulas, implantes para cirurgia plástica, cardiovascular, ortopédica, dental, neural, etc. Desempenham um papel central em dispositivos

extracorpóreos, que vão desde lentes de contato até aparelhos para hemodiálise. São componentes essenciais de implantes, enxertos vasculares e até marcapassos cardíacos. (PARK & LAKES, 1992).

Embora os biomateriais tenham propiciado um enorme impacto em todas as áreas da saúde e na melhoria da qualidade de vida das pessoas, existe ainda uma grande necessidade de aprimorar o desenvolvimento de novos biomateriais a partir de bases poliméricas, cerâmicas e/ou metálicas, em todas suas fases desde a caracterização das propriedades físico-químicas até os testes clínicos.

Dados econômicos revelam que no Estado de Minas Gerais o SUS (Sistema Único de Saúde) gastou entre outubro de 1998 e abril de 1999 a soma de US\$ 5,7 milhões de dólares com urgências e emergências, calculando-se que 50% desses gastos foram para o atendimento de pacientes que tiveram acidentes de trânsito e/ou acidentes de trabalho urbano deixando como resultado lesões que podem exigir o uso de algum biomaterial para o reparo da função perdida (MINAS GERAIS, 2003).

A Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo informa que os tempos de espera para transplantes de órgãos tais como rim, fígado ou coração é de aproximadamente 3 anos. Esse tempo de espera não é diferente em outras regiões do país, podendo inclusive ser maior. Esses dados sugerem a necessidade de desenvolver novos métodos, produtos e tecnologias alternativas aos transplantes e que sejam acessíveis à população brasileira (SÃO PAULO, 2003).

O número de indivíduos portadores de próteses coxo-femorais demandando a reconstrução de perdas ósseas nessas regiões é elevado. Dados do Ministério da Saúde, via SUS, indicam a necessidade da utilização de aproximadamente 15.000 próteses por ano. Esses números deverão aumentar significativamente com a longevidade da população e o conseqüente aumento das doenças degenerativas (MINAS GERAIS, 2003).

De acordo como dados da ABRADI (Associação Brasileira de Importação e Distribuição de Implantes), somente durante o mês de maio de 1996, o SUS pagou cerca de 1,1 milhões de dólares para importar materiais metálicos implantáveis. Dentro dessa estatística não se inclui os recursos gastos pela rede particular de saúde, convênios de saúde privada e entidades filantrópicas.

Além da ortopedia, [na odontologia](#), especificamente, [existe a necessidade de](#) aumentos e [reparos ósseos e teciduais](#) em diversas aplicações clínicas como: (1) defeitos periodontais e peri-implantares; (2) defeitos traumáticos, como sinusotomia,

osteotomia, cistectomia e apicetomia; (3) sítios de extração, onde se pretende manter ou aumentar o rebordo alveolar, assim como preparar e fixar implantes osteointegráveis e (4) aumento de rebordo alveolar em geral.

~~Existe, portanto, uma enorme demanda em relação à aplicação de biomateriais em procedimentos reconstrutores e reabilitadores de tecidos danificados e/ou perdidos. Esses dados indicam a necessidade de se enfrentar o desafio de propor materiais alternativos, de qualidade que passam pelo projeto e desenvolvimento de novos biomateriais, que sejam economicamente viáveis para a realidade brasileira.~~

~~Não obstante, a aplicabilidade dos biomateriais no campo de cirurgias ortopédicas, buco-maxilo-faciais e periodontais tem sido cada vez maior.~~

A cada ano, as estatísticas do censo dos Estados Unidos indicam que há um número crescente de pessoas que sofrem de doença ou dano que conduzem à perda ou defeitos ósseos. Dessa forma, há uma necessidade considerável de materiais para substituição de tecido ósseo (CHOI *et al.*, 2004).

Metais, polímeros e cerâmicas têm sido usados como materiais de substituição de tecido ósseo. A maioria dos metais implantáveis provê suporte para o osso, mas sem interagir com o ambiente circunvizinho, sendo considerados ~~Metais tendem a ser~~ biologicamente inertes, ~~Por sua vez, enquanto~~ as cerâmicas e os polímeros podem ser inertes ou bioativos. ~~A maioria dos metais implantáveis provê suporte para o osso, mas sem interagir com o ambiente circunvizinho~~ Atualmente, dentro do campo dos biomateriais para reconstrução óssea, há a necessidade de se ~~criar materiais não somente com~~ melhorar a resistência ~~necessária, mecânica,~~ assim como aprimorar materiais bioativos que possam interagir dentro do corpo sem causar qualquer efeito adverso (KIKUCHI *et al.*, 2000 *apud* CHOI *et al.*, 2004). ~~A bioatividade das biocerâmicas baseadas em fosfato de cálcio e as características biodegradáveis dos polímeros lhes fez o foco da maioria dos estudos empreendidos recentemente no campo da engenharia de tecidos para reconstrução óssea (Ma et al., 1999; Marra et al., 1999; Mikos et al., 1994).~~

Polímeros biodegradáveis como poli (-caprolactona) (PCL), ácido de poli (-lático) (PLA), ácido de poli (-glicólico) (PGA) e seus copolímeros poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA) são conhecidos pela característica de degradação variável. As biocerâmicas, por outro lado, são possuem conhecidas pela habilidade de osteocondução, mas ~~por serem~~ extremamente friáveis (MIKOS et al., 1994 *apud* CHOI et al., 2004; MA et al., 1999; MARRA *et al.*, 1999).

Um compósito contendo biocerâmica e polímero biodegradável pode vir a oferecer os benefícios necessários exigidos em termos de exibir tanto a característica bioativa da cerâmica como a propriedade biodegradável do polímero, melhorando a resposta biológica a esses biomateriais. Nessa direção, estudos de compósitos formados por esses dois tipos de biomateriais têm sido [o foco da maioria dos estudos empreendidos recentemente no campo da engenharia de tecidos para reconstrução óssea](#) (HIGASHI *et al.*, 1986; TORMALA *et al.*, 1993 *apud* IGNJATOVIC & USKOKOVIC, 2004; VERHEYEN *et al.*, 1993 *apud* IGNJATOVIC & USKOKOVIC, 2004; [MIKOS *et al.*, 1994](#) *apud* [CHOI *et al.*, 2004](#); [MA *et al.*, 1999](#); MARRA *et al.*, 1999; IGNJATOVIC *et al.*, 1999; IGNJATOVIC *et al.*, 2001. NAJMAN, *et al.*, 2003; IGNJATOVIC & USKOKOVIC, 2004; KIM *et al.*, 2004; [CHOI *et al.*, 2004](#)).

Adicionalmente, a associação de antibióticos como a tetraciclina poderia otimizar a resposta biológica, uma vez esta exibe, além das propriedades antimicrobianas, propriedades farmacológicas adicionais como atividade anticólicas, inibição de reabsorção de osso, ação antiinflamatória e uma habilidade para promover a adsorção de fibroblastos e tecido conectivo em superfícies radiculares (ESPOSITO, 1997; SEYMOUR, 1995; WIKESJÖ, *et al.*, 1986).

Neste trabalho serão testados compósitos formados a partir da associação dos polímeros biodegradáveis PLA e PLGA, aprovados pela *Food and Drug Administration* - EUA para uso em humanos, com a uma biocerâmica Osteosynt[®], produto preparado, licenciado e comercializado no mercado nacional pela Einc Biomaterial Ltda., com adição ou não de tetraciclina. Foram escolhidos dois tipos diferentes de polímeros visando analisar a resposta biológica dos mesmos, bem como a dos compósitos formados a partir deles, uma vez que possuem diferentes taxas de degradação.

~~Dessa forma, Diante do exposto e visto que a~~ [formulação desses biomateriais está em relação direta com a resposta biológica, a relevância desseeste projeto está propõe centrada na avaliação os efeitos biológicos](#) de um biomaterial formado pela combinação de uma matriz biocerâmica com um polímero biodegradável, associados ou não à tetraciclina, visando a preparação de um andaime com propriedades físico-químicas que permita reparações ósseas em geral. Espera-se que esse material possibilite melhorias (1) nas condições dos tratamentos envolvendo restauração óssea, (2) do seu comportamento bioquímico e metabólico e (3) da restauração do desempenho biomecânico, para a obtenção de uma melhor resposta desejável no menor espaço de tempo possível.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A crescente necessidade de realização de procedimentos restauradores médico-odontológicos, com uso de próteses temporárias ou definitivas, ou de transplantes e implantes de diversas naturezas (autógenos, alógenos, heterólogos e aloplásticos) levou os pesquisadores envolvidos na área de biomateriais a buscarem o desenvolvimento de produtos que pudessem preencher os requisitos imprescindíveis para sua utilização. Dessa forma, a engenharia de tecidos óssea é um novo campo de pesquisa com aplicações clínicas como na reposição óssea em defeitos ortopédicos, neoplasias e tumores ósseos, tratamento de pseudoartroses, estabilização de segmentos espinhais, cirurgias maxilo-faciais, craniofaciais, ortopédicas reconstrutivas, traumáticas e de cabeça e pescoço (LAWSON & CZERNUSZKA, 1998), assim como em cirurgias periodontais (HIGASHI *et al.*, 1986).

A remoção do tecido do sítio doador de um paciente e o transplante do mesmo para um sítio receptor desse mesmo paciente é considerado o padrão ouro. Esse tipo de enxerto, chamado autógeno, fornece células viáveis, concomitantemente evitando reações imunes e transmissão de doenças (FITCH *et al.*, 1997), além de mínimas preocupações éticas (HENCH, 1998b). Entretanto, esse procedimento apresenta diversas limitações, especialmente limitada disponibilidade, necessidade de um segundo sítio cirúrgico, tendência de reabsorção e, ocasionalmente, comprometimento das propriedades biomecânicas (HENCH, 1998b).

Uma solução parcial para algumas dessas limitações é o uso de tecidos transplantados de um doador humano, caracterizando um aloenxerto, também denominado enxerto alógeno ou homólogo, seja de um doador vivo doando, por exemplo, coração, pulmão, fígado, rim e retina, ou de cadáveres, de onde é obtido o osso liofilizado (HENCH, 1998b). Esse tipo de enxerto também apresenta várias limitações como disponibilidade, utilização de drogas imunossupressoras, possibilidade de transmissão de doenças infecto-contagiosas como HIV e hepatite, entre outras, e até mesmo *prions*, além de questões éticas e religiosas (NASR *et al.*, 1999).

Outra alternativa é o emprego dos transplantes chamados xenólogos ou heterólogos, onde, a partir de outra espécie, são utilizados tecidos ou órgãos, como o

emprego de válvulas cardíacas de tecido suíno na cirurgia cardiovascular ou o uso de material de origem bovina na ortopedia (HENCH, 1998b). No entanto, os riscos continuam e aumentam as limitações, principalmente quanto à possibilidade de transmissão de doenças infecto-contagiosas cruzadas como encefalopatia bovina por espongiiformes, rejeição, entre outras (NASR *et al.*, 1999).

A utilização desses diferentes tipos de enxertos apresenta uma alta relação custo-benefício, o que leva à busca de métodos e materiais alternativos para o reparo e/ou regeneração de partes perdidas ou danificadas do organismo.

Dessa forma, a substituição de tecidos e/ou órgãos pode também se originar através da sua obtenção em laboratórios pelo desenvolvimento, modificação ou síntese de materiais a serem interfaceados e/ou incorporados no organismo do hospedeiro, ou seja, implantes a partir de biomateriais associados à atividade celular do próprio indivíduo ou ainda através de engenharia de tecidos, chamados de enxertos aloplásticos (HENCH, 1998b).

As vantagens significativas dos implantes sobre os transplantes são a disponibilidade, a reprodutibilidade e a biocompatibilidade. A probabilidade de falha mecânica dos implantes é minimizada pelas regulamentações governamentais para os testes de qualidade e segurança do biomaterial (HENCH, 1998b).

Contudo, a maioria dos materiais usados para implantes atualmente continua sofrendo problemas de estabilidade superficial na interface com os tecidos do hospedeiro, problemas biomecânicos de elasticidade, produção de rejeitos pelo uso e problemas na manutenção estável do suprimento de sangue em níveis normais. Além do mais, os mesmos perdem duas das mais importantes características dos tecidos vivos: a habilidade de auto-restauração e a modificação de sua estrutura e propriedades em resposta aos fatores ambientais, tais como a carga mecânica ou fluxo de sangue (HENCH, 1998b).

Assim, o tempo de vida limitado para os implantes é uma consequência das limitações supracitadas (RATNER, *et al.*, 1996; HENCH & WILSON, 1996; CAO & HENCH, 1996; BLOMFIELD, *et al.*, 1991; SCHOEN, *et al.*, 1992). Verificam-se ainda, nos últimos 15 anos, avanços marginais no aumento da sobrevida dos implantes ortopédicos, cardiovasculares, dentários, etc. (HENCH, 1998b).

Desta forma, surgem vários desafios nessa área de biomateriais, tendo como filosofia fundamental o aumento da capacidade auto-restauradora do corpo. Nesse caso, sempre se trabalha com a hipótese de que a sobrevida das próteses será aumentada pelo uso de biomateriais que permitam a regeneração de tecidos naturais,

possibilitando a restauração da estrutura, da função, do comportamento bioquímico e metabólico e do desempenho biomecânico (HENCH, 1998b).

Por conseguinte, um estudo multidisciplinar se faz necessário para o desenvolvimento de biomateriais (QUADRO 2), estando envolvidas as áreas básicas como Física e Química, as Engenharias, as Ciências Biológicas e as Ciências da Saúde (TORZILLI, 1976; BLACK, 1988; GEBELEIN, 1991; BLACK, 1992).

Espera-se que, com o desenvolvimento da Ciência, os biomateriais venham a ser substitutos satisfatórios para os tecidos perdidos ou danificados.

QUADRO 2 - Relação das possíveis áreas envolvidas no estudo e desenvolvimento de biomateriais e os aspectos abordados pelas mesmas

ÁREA	ASPECTOS ABORDADOS
Física e Química	-Síntese, caracterização dos materiais e estudo da relação das propriedades e estruturas nos sistemas biológicos
Engenharia	-Desenho das peças e dispositivos -Ensaio e Especificações -Modificação da textura e superfície dos artefatos.
Ciências Biológicas	-Estrutura, propriedade e função da peça relacionada ao sistema vivo
Ciências da Saúde	-Aplicações do implante -Demonstração do desempenho in vivo

2.1 Biocompatibilidade

Por ser um termo amplo, os autores definem a biocompatibilidade sob diversos aspectos, sendo a resposta biológica o mais importante.

PARK & LAKES (1992) definem biocompatibilidade como a aceitação de um implante artificial pelos tecidos circundantes e pelo corpo como um todo, em termos de propriedades mecânicas, químicas, superficiais e farmacológicas.

HORBETT *et al.* (1996) citam WILLIAMS (1987) definindo um material biocompatível como um material que não induza uma resposta inflamatória aguda ou crônica e não previna a diferenciação peculiar dos tecidos ao redor dos implantes. Entretanto, o trabalho de HORBETT *et al.* (1996) reconhece que uma reação tecidual adversa ao redor do biomaterial implantado é inevitável, devido ao trauma cirúrgico durante a inserção. Dessa forma, essa definição indica que a biocompatibilidade depende do propósito do implante.

Segundo RATNER (1996), a “biocompatibilidade” de um dispositivo médico pode ser definida como o sucesso deste dispositivo em efetuar a função pretendida.

De acordo com ESTRELA (2001), a biocompatibilidade pode se definida como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem, contudo causar danos ou prejuízo ao mesmo.

Resumidamente, poderíamos definir biocompatibilidade como sendo a resposta esperada de um biomaterial em exercer a função para a qual o mesmo foi fabricado, sem, contudo, lesar de forma agressiva os tecidos circundantes.

Dessa forma, para um material ser efetivo em qualquer aplicação biológica, o mesmo deve ser biocompatível, ou seja, não deve evocar, uma vez implantado, uma resposta inflamatória ou imune extremamente adversa (BABENSE *et al.*, 1998 *apud* TEMENOFF *et al.*, 1999)

Alguns fatores que determinam a biocompatibilidade, por exemplo, a estrutura química e física ou a morfologia superficial da matriz, podem ser afetados pela síntese ou técnicas de processamento. Resíduos químicos envolvidos nesses processos, como estabilizadores, iniciadores, agentes de união, emulsificadores ou até solventes orgânicos e monômeros podem ser prejudiciais aos tecidos neoformados ou aos tecidos circundantes, uma vez que essas substâncias são citotóxicas (TEMENOFF *et al.*, 1999).

A avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais segue recomendações de diversas organizações e federações há mais de 60 anos. Esses testes consistem de uma seqüência de protocolos de pesquisa, descritos e regulamentados, tendo por objetivo regulamentar a avaliação da segurança dos materiais a serem utilizados em humanos. Os testes foram divididos em iniciais, secundários e de aplicação (QUADRO

3). Vale a pena salientar que a avaliação da biocompatibilidade não exige o seguimento completo dos testes descritos no quadro abaixo. Nesses casos, a recomendação é seguir pelo menos um dos protocolos de pesquisa de cada um dos três níveis de pesquisa (ESTRELA, 2001).

QUADRO 3 - Testes recomendados para avaliação biológica de materiais dentários

Teste Inicial	Teste Secundário	Teste de Aplicação
Citotoxicidade	Irritação da membrana mucosa	Irritação da polpa
Hemólise	Toxicidade dérmica por exposição repetida	Capecamento pulpar/pulpotomia
Teste de Ames	Implantação subcutânea	Aplicação em Endodontia
Teste de Styles	Implantação em tecido ósseo	Implante
Dose letal	Sensibilização	
Toxicidade aguda LD ₅₀ Oral		
Toxicidade aguda IP-LD ₅₀		
Inalação aguda		

Fonte: ESTRELA (2001)

Dessa forma, dentre as várias metodologias utilizadas para os testes iniciais e secundários, os testes de citotoxicidade e de implantação dos materiais em tecido conjuntivo subcutâneo de animais, respectivamente, parecem ser os mais amplamente utilizados (ESTRELA, 2001).

Adicionalmente, segundo RIPAMONTI & DUNEAS (1996), a histologia é freqüentemente utilizada para a avaliação da biocompatibilidade de um material implantado em tecidos moles, sendo que a maioria dos protocolos baseia-se na determinação qualitativa de um relativo número de vários tipos celulares e a quantidade de componentes da matriz extracelular ao redor dos implantes, assim como a espessura da cápsula fibrosa ao redor do implante tem sido comumente utilizada para mensurar a resposta tecidual do biomaterial implantado.

2.2 Andaimos para crescimento ósseo

O tecido ósseo exerce diversas funções no corpo humano para manutenção dos sistemas, como: (1) proteger os órgãos vitais; (2) suportar os músculos e atuar na locomoção; (3) gerar células brancas e vermelhas para a imunoproteção e oxigenação dos tecidos; e (4) estocar reservas de cálcio, fosfato e outros íons importantes (YASZEMSKI *et al.*, 1996). Essa diversidade de funções, combinada com a capacidade de remodelação óssea em resposta aos fatores locais tem dificultado a reposição adequada de tecido ósseo perdido usando materiais sintéticos isoladamente (BOSTROM & MIKOS, 1997).

O osso é um tecido vivo e dinâmico que é remodelado ao decorrer da vida através da reabsorção óssea pelos osteoclastos e formação de nova matriz óssea pelos osteoblastos. Quando o tecido ósseo é danificado ou quando se necessita um preenchimento, procedimentos reparadores ou regenerativos podem ser requeridos. (CAPLAN, 1999).

Reparo e regeneração são processos distintos do ponto de vista cinético e em termos de função celular e resultado morfológico, sendo que o reparo é um processo mais rápido do que a regeneração. O processo de reparo e o de regeneração de tecido ósseo pela engenharia de tecidos segue alguns elementos chave: (1) os limites dos defeitos devem ser completamente preenchidos pelo material implantado para inibir uma fibrose disfuncional; (2) um grande número de células tronco mesenquimais deve migrar ou se instalar nos limites desse defeito; (3) os limites devem ser ocupados por um veículo carregador de células que seja absorvido ou se integre funcionalmente à nova estrutura; (4) deve haver um suprimento vascular suficiente e intensamente comunicante com todo o comprimento e profundidade do defeito, com o propósito nutricional e instrutivo e (5) deve haver a presença de fatores osteogênicos bioativos para atingir e afetar as células tronco mesenquimais e suas linhagens (CAPLAN, 1999).

Um biomaterial ideal para a engenharia de tecido ósseo deve ser não-imunogênico, esculpível e acessível para se conseguir uma adaptação ótima aos contornos e às várias formas dos defeitos ósseos, fornecendo um suporte mecânico quando necessário (RIPAMONTI & DUNEAS, 1996).

Nesse contexto, inserem-se os andaimes biodegradáveis para o reparo ou regeneração óssea, os quais são definidos como estruturas que permitiriam a neoformação óssea concomitantemente com a reabsorção de seu arcabouço, agindo como uma matriz temporária para a ancoragem-dependente de osteoblastos, além da

função intrínseca de preenchimento. Ele também pode agir como carreador para fatores solúveis e insolúveis que modulam a função celular local (TEMENOFF, *et al.*, 1999; CHICUREL *et al.*, 1998).

Andaimes biodegradáveis inorgânicos de fosfato de cálcio e orgânicos têm sido propostos pela engenharia de tecidos para reconstrução óssea, apesar de a maioria desses serem degradados mais por dissolução do que por reabsorção ativa. Entretanto, alguns tipos de fosfatos de cálcio têm sido comprovadamente reabsorvidos por osteoclastos (BAKSH & DAVIES, 1999).

Desse modo, apesar de existirem muitos andaimes para a engenharia de tecidos, uma matriz para o crescimento ósseo deveria ser arquitetada para degradar (1) passivamente por dissolução no meio biológico e (2) ativamente por reabsorção dos osteoclastos durante o remodelamento normal do tecido ósseo (BAKSH & DAVIES, 1999).

Entre os principais requisitos para o desenvolvimento de um andaime/dispositivo de engenharia de tecidos óssea (QUADRO 4) poderíamos citar: (1) fácil disponibilidade para o cirurgião; (2) promoção do crescimento ósseo; (3) não indução de crescimento de tecido mole na interface osso/implante; (4) diâmetro médio dos poros entre 200 e 400 μm ; (5) absorção de uma maneira previsível de acordo com o crescimento ósseo e (6) propriedades mecânicas e físicas apropriadas para aplicação (BURG *et al.*, 2000; DAVIES, 2000).

Adicionalmente, o projeto de cada andaime deveria permitir: (1) fácil manipulação na preparação e implementação do material implantado; (2) alta porosidade para permitir um rápido acesso e manutenção da vasculatura, assim como apresentar espaço para deposição de matrizes e componentes estruturais; (3) capacidade de ser aparado ou esculpido para encaixar-se perfeitamente ao sítio cirúrgico e (4) um rápido e reproduzível processo de dissolução em cada sítio implantado (CAPLAN, 1999).

QUADRO 4 - Características desejáveis para um andaime/dispositivo de engenharia de tecidos para osso

Facilmente disponível para o cirurgião	Promover crescimento ósseo
--	----------------------------

Absorção de uma maneira previsível de acordo com o crescimento ósseo	Não induzir o crescimento de tecido mole na interface osso/implante
Adaptável às irregularidades do sítio cirúrgico, maleável	Diâmetro médio dos poros entre 200 e 400 μm
Máximo crescimento ósseo através de osteoindução e/ou osteocondução	Ausência de efeitos prejudiciais ao tecido circundante
Propriedades mecânicas e físicas apropriadas para aplicação	Esterilizável, sem perda das propriedades
Boa aposição óssea	Absorvível, com componentes biocompatíveis
Direcionamento do crescimento celular e da formação de matriz extracelular em três dimensões	

Fonte: BURG *et al.* (2000), p. 2350

2.2.1 Porosidade

Andaimes porosos com uma grande razão da área pelo volume são necessários para maximizar o espaço para a adesão e crescimento celular, produção de matriz extracelular e vascularização (TEMENOFF *et al.*, 1999).

Para se conseguir uma grande área por volume necessária para a ancoragem de células, poros pequenos são preferíveis, desde que o tamanho dos poros seja maior que o diâmetro de uma célula em suspensão, tipicamente 10 μm . Entretanto, poros maiores podem ser requeridos para a migração celular, crescimento e produção de matriz extracelular (TEMENOFF *et al.*, 1999).

A porosidade é um fator crítico para a migração celular e elaboração de uma matriz óssea. BOYAN *et al.* (1996) reportaram que os osteoblastos preferem poros com tamanhos variando de 200 a 400 μm de diâmetro para facilitar a migração, adesão e proliferação. Esse fato pode ser explicado pela curvatura do poro que provê

ótima compressão e tensão nos mecanorreceptores celulares, permitindo que eles migrem para as aberturas de tamanhos específicos (BAKSH & DAVIES, 1999). Dessa forma, um andaime com poros de diâmetros médios variando de 200 a 400µm estaria suportando a invasão de vasos sanguíneos e poderiam induzir a migração, adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos dentro dos poros (BOYAN *et al.*, 1996).

Andaimes de materiais orgânicos e inorgânicos biodegradáveis para a engenharia de tecidos óssea devem apresentar macroporosidade, que diminui o problema da oclusão dos poros e a não adesão celular em um estágio *in vitro*. Além disso, deve haver uma intercomunicação dessas macroporosidades para permitir o crescimento ósseo de uma forma tri-dimensional por toda a estrutura. Essa propriedade pode ser otimizada em um estágio *in vitro*, através do emprego de condições de cultura dinâmicas (BAKSH & DAVIES, 1999).

A microporosidade influencia no desempenho biológico dos fosfatos de cálcio *in vivo*, uma vez que a taxa e distribuição da osteogênese por volta e ao longo do implante são afetadas pelo número e tamanho dos canais intercomunicantes (BAKSH & DAVIES, 1999).

2.2.2 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de um andaime polimérico são especialmente importantes para a sustentação de tecidos como o osso. O material deve ser resistente o suficiente para suportar o estresse fisiológico, mas se a carga transmitida para o andaime for muito grande (estresse de proteção), uma falta de estimulação mecânica suficiente pode resultar em uma pobre regeneração óssea e/ou reabsorção óssea em torno do implante (BOYAN *et al.*, 1996; BOSTROM & MIKOS, 1997). Em uma escala microscópica, a dureza local do andaime pode afetar a tensão mecânica gerada pelo citoesqueleto da célula, o qual pode controlar a forma da célula e conseqüentemente a sua função, por exemplo, superfícies rígidas podem influenciar o

citoesqueleto a induzir a propagação e divisão celular (WHANG *et al.*, 1995 *apud* TEMONOFF *et al.*, 1999; BOYAN *et al.*, 1996).

LIN *et al.* (1999) desenvolveram um compósito para fixação de fratura óssea usando partículas sinterizadas de tricálcio fosfato com DL-PLA. Os compósitos foram avaliados *in vivo* a partir de um modelo de fixação de fraturas de fêmur de coelhos. Um novo tecido ósseo foi observado 8 semanas, sem a evidência de formação de tecido fibroso.

IGNJATOVIC & USKOKOVIC (2004) avaliaram as características mecânicas de um compósito formado a partir de HA:PLA sob pressão, à temperatura ambiente ou ao calor, alcançando força de compressão maior que 143MPa e módulo de elasticidade superior a 4,8 GPa, estando dentro dos intervalos de compressão e elasticidade do tecido ósseo, respectivamente 1,9-167 MPa e 0,09-18,6 GPa (PARK & LAKES, 1992). Esses autores descreveram pequena resposta inflamatória, boa adesão do tecido circundante após implantação, apresentando altos índices de biocompatibilidade.

2.2.3 Características da degradação

O controle do processo de degradação do andaime é crucial para o desenvolvimento de qualquer matriz para a engenharia de tecidos. A velocidade de degradação do andaime deve equilibrar a necessidade de manutenção de um suporte estrutural para a proliferação celular e secreção de matriz extracelular, assim como a necessidade de desintegração do andaime para deixar espaço para o crescimento de um novo tecido. Como a resistência mecânica do andaime diminui quando este degrada, a taxa de degradação do andaime deve estar pareada com a taxa de regeneração tecidual com o objetivo de manter a integridade estrutural da matriz (QUADRO 5) (TEMENOFF *et al.*, 1999).

Igualmente importante para o sucesso do implante é compreender os efeitos da degradação dos produtos no organismo. A liberação de produtos ácidos do andaime pode causar uma necrose tecidual ou inflamação pelo abaixamento local do pH (TEMENOFF et al., 1999).

Partículas da matriz formadas no processo de degradação ou pela micromovimentação na região do implante também podem provocar uma resposta inflamatória (TEMENOFF et al., 1999).

QUADRO 5 - Fatores que afetam a degradação do andaime/matriz

Fatores químicos	Estrutura do andaime
Composição	Densidade
Estrutura	Forma
Configuração	Tamanho
Morfologia	Massa
Peso molecular	Textura da superfície
Distribuição do peso molecular	Porosidade
Motilidade da cadeia polimérica	Tamanho do poro
Orientação molecular	Estrutura do poro
Razão entre a superfície e o volume	Capacidade de absorção de líquido
Grupos iônicos	Método e condições de processamento
Impurezas ou aditivos	Esterilização
<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Meio de degradação	Sítio de implantação
pH	Acesso à vasculatura
Força iônica	Carga mecânica
Temperatura	Crescimento tecidual
Carga mecânica	Metabolismo dos produtos da degradação
Tipo e densidade das células da cultura	Enzimas

Fonte: TEMENOFF et al., 1999, p. 455

O mecanismo pelo qual o andaime se degrada deve ser considerado. Em se tratando de uma matriz polimérica, durante o processo de degradação por erosão superficial, os produtos degradados são liberados gradualmente, mas na degradação em bloco, os produtos são liberados quando o peso molecular do polímero alcança um valor crítico. Essa liberação rápida pode causar um grande abaixamento local do pH. Adicionalmente, pode ser difícil manter uma alta resistência mecânica a partir desse ponto. Entretanto, a contínua renovação da superfície externa dos polímeros pela erosão torna problemática a adesão celular e cultura desses materiais ([TEMENOFF et al.](#), 1999).

A degradação dos polímeros aqui estudados será tratada no item 2.3.2.

2.2.4 Esterilização de materiais para crescimento ósseo

Os materiais implantados devem ser esterilizados para se evitar infecções. Dessa forma, o método de esterilização não deve interferir na bioatividade do material, ou alterar significativamente sua composição química, o que pode modificar a biocompatibilidade e degradação do mesmo ([TEMENOFF et al.](#), 1999).

A esterilização de implantes contendo polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico tem sido um grande objeto de estudo. A esterilização terminal e a preparação em ambientes assépticos são os métodos mais descritos na literatura (DASH & CUDWORTH, 1998; LEWIS, 1990). Para que não sejam provocadas alterações nas propriedades físicas e mecânicas dos polímeros e, conseqüentemente, no seu desempenho *in vivo* é muito importante a escolha da técnica adequada.

A esterilização por autoclave é um método que não é indicado para os polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico, uma vez que condições de alta pressão e temperatura promovem deformação e hidrólise da matriz polimérica devido

à natureza termoplástica. As temperaturas utilizadas, por serem superiores à temperatura de transição vítrea dos polímeros, promovem alterações físicas e mecânicas dos sistemas (ATHANASIOU *et al.*, 1996).

A radiação através de raios gama tem sido bastante estudada. Ao se submeterem os polímeros a esse tipo de método, ocorre uma quebra da cadeia polimérica, redução da viscosidade intrínseca, aumento da velocidade de erosão *in vitro* e *in vivo*, além do aumento da cinética de liberação da droga. Esses fatores, que limitam a utilização desse método, são dependentes da dose de radiação aplicada (ATHANASIOU *et al.*, 1996).

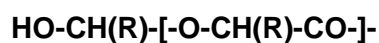
A esterilização química, empregando gases como o óxido de etileno, pode ser utilizada nos casos em que os polímeros são sensíveis à temperatura e umidade. Entretanto, resíduos de gás podem ser encontrados na superfície ou no interior da matriz polimérica, os quais são mutagênicos, carcinogênicos e alergênicos. Nesse processo, é essencial que o sistema seja submetido à degaseificação ou à aeração subsequente, o que torna o método bastante lento (ATHANASIOU *et al.*, 1996).

2.3 Polímeros biodegradáveis

O crescimento explosivo da indústria de polímeros após a segunda guerra mundial levou a descoberta de alguns novos materiais com propriedades variadas. Inicialmente, a pesquisa de biomateriais poliméricos foi restrita a polímeros estáveis, tais como o Dacron® e o Teflon®, que eram considerados “biologicamente inertes” naquela época. Durante a década de 1980 foi reconhecido que a inércia biológica nem sempre é uma propriedade desejada, desde que as interações entre o implante e o tecido ao redor possam ser exploradas para o benefício do paciente. Nesse tempo, grandes avanços foram alcançados com o desenvolvimento de novos polímeros biodegradáveis, combinados com o entendimento da imunologia e biologia celular, que formam as bases do conhecimento racional dos tecidos substitutos (KOHN, 1996a,b).

Posteriormente, surgiram os polímeros biodegradáveis como materiais alternativos para a engenharia de tecidos artificiais. Os poliésteres alifáticos dos poli

(alfa-hidróxi ésteres) são possivelmente os polímeros sintéticos biodegradáveis mais conhecidos. Sua fórmula geral é:



que deriva do correspondente:



onde R=H no caso do ácido glicólico e R=CH₃ no caso do ácido láctico (FIG. 1) (WONG & MOONEY, 1997).



FIGURA 1 - Estrutura química dos polímeros dos ácidos glicólico (PGA) e láctico (PLA)

Durante o final da década de 60 e início da década de 70, foram realizados diversos estudos relacionados com a utilização dos polímeros derivados do ácido láctico e glicólico para a fabricação de fios de sutura. Os resultados mostraram que eles proporcionaram boas propriedades mecânicas, baixa capacidade alergênica e toxicidade, excelente biocompatibilidade e uma cinética previsível de biodegradação, despertando a atenção de vários pesquisadores quanto a suas possíveis aplicações em tecnologia farmacêutica (JAIN *et al.*, 1998).

Aprovados pelo “*Food and Drug Administration*” (FDA) para uso em humanos, atualmente esses polímeros são extensivamente utilizados na reconstrução e osteosíntese de tecidos ósseos e também na liberação de fármacos (KOHN, 1996a,b; WONG & MOONEY, 1997). Eles também têm sido utilizados no tratamento

de trauma renal, cirurgia pulmonar, engenharia de pele, de cartilagem e de tecido nervoso (PUELACHER *et al.*, 1994; WONG & MOONEY, 1997).

Quando devidamente preparados sob condições ideais a partir de monômeros purificados, o PLGA não apresenta evidências de resposta inflamatória ou outros efeitos adversos relacionados à inflamação (GUPTA *et al.*, 1997).

Em estudos relacionados ao implante do polilático, a taxa de reação é normalmente mais baixa que a do poliglicólico. Em muitas séries clínicas, nenhuma resposta tecidual adversa foi informada. O intervalo entre a operação de fixação e os sinais clínicos de uma reação ao implante com polilático é, em regra, consideravelmente mais longo que com o poliglicólico (BÖSTMAN & PIHLAJAMÄKI, 2000).

Dessa forma, as matrizes absorvíveis têm sido usadas em situações onde a absorção é desejada. A absorção da matriz pode expor superfícies ou tecidos ou liberar substâncias como antibióticos ou fatores de crescimento de tecidos (YASKO *et al.*, 1992).

Contudo, as razões mais comuns para o uso dessas matrizes como parte dos compósitos têm sido para se conseguir propriedades mecânicas que sofram variações com o tempo e que permitam a completa dissolução da parte desejável do implante, eliminando-se preocupações de biocompatibilidade a longo prazo (DANIELS *et al.*, 1990).

Esses materiais são facilmente preparados e suas propriedades químicas, físicas, mecânicas e degradativas podem ser precisamente moduladas alterando-se a composição do material. Polímeros biodegradáveis oferecem a possibilidade de completa reposição óssea tecidual, além de superar problemas como infecção e deslocação do dispositivo, os quais estão associados aos implantes permanentes (TEMENOFF *et al.*, 1999).

Geralmente, é aceito que andaimes biodegradáveis são ideais para a engenharia de tecidos porque se espera que a degradação da matriz seja concomitante com a regeneração tecidual, sem deixar materiais artificiais residuais no sítio hospedeiro. Entretanto, deve-se conhecer a taxa de substituição óssea e então a taxa de degradação do andaime. A taxa de substituição óssea esperada é uma função de vários fatores, incluindo a espécie envolvida, localização anatômica e a implantação mecânica (BAKSH & DAVIES, 1999). Experimentos em coelhos indicam a taxa média de crescimento de uma nova formação óssea sendo entre 73 e 85 μm por dia. Esses valores fornecem uma noção da taxa de crescimento ósseo, devendo-se ter cautela ao extrapola-los para humanos (WINET *et al.*, 1988; WINET *et al.*, 1990).

Adicionalmente, o sucesso da engenharia de tecidos está na habilidade em dirigir tipos celulares específicos para a multiplicação, migração e expressão de comportamentos fisiológicos normais, para atingir a organização celular que execute as funções do tecido desejado. Por exemplo, a engenharia de tecidos envolvendo o osso vivo para a reparação de defeitos esqueléticos tem estudado o crescimento de osteoblastos, células responsáveis pela formação de tecido ósseo em matrizes de polímeros biodegradáveis *in vitro*. A matriz polimérica biodegradável serve inicialmente como andaime para a proliferação das células ósseas e a maturação. Idealmente, as células formam tecido ósseo que, após a implantação, é completamente integrado ao próprio osso do paciente, reparando dessa forma a ferida ou o defeito ósseo. Após o restabelecimento da função, o andaime polimérico é reabsorvido (KOHN, 1996a,b; RIPAMONTI & DUNEAS, 1996)

2.3.1 Resistência mecânica e morfologia

O PGA foi primeiramente desenvolvido como sutura sintética absorvível, Dexon[®]. O PGA tem alta cristalinidade, um alto ponto de fusão e uma baixa solubilidade em solventes orgânicos (QUADRO 6) (WONG & MOONEY, 1997).

QUADRO 6 - Cristalinidade e propriedades térmicas do PGA, PLA e copolímeros

	Cristalinidade %	Temperatura de fusão (°C)	Transição vítrea (°C)
PGA	46-52	225	36
90:10 PGLA	40	210	37
50:50 PGLA	0	nenhum	55
PLA	37	185	57

DL-PLA	0	nenhum	N/D
--------	---	--------	-----

N/D = não disponível. Fonte: WONG & MOONEY (1997) p.58

O ácido lático possui um carbono beta assimétrico que permite a obtenção das formas levógiras (L-PLA), dextrógiras (D-PLA) ou racêmicas (DL-PLA), sendo que as formas levógiras e dextrógiras são semicristalinas, graças à elevada regularidade da cadeia polimérica, e as formas racêmicas são amorfas por apresentarem irregularidades na estrutura da cadeia do polímero (MERKLI *et al.*, 1998). Logo, prefere-se a utilização de DL-PLA já que essa forma permite uma dispersão mais homogênea de um fármaco na matriz polimérica. Entretanto, o semicristalino PLA é preferido nos casos onde uma alta força mecânica e dureza são requeridas, por exemplo em dispositivos ortopédicos. Vale a pena salientar que a irradiação gama sobre o PLA causa a quebra da cadeia, “*cross-linking*” e diminuição da cristalinidade (WONG & MOONEY, 1997).

Para aumentar a extensão das propriedades exibidas pelo PGA, copolímeros de GA e LA (PLGA) têm sido amplamente empregados. Considerando que o PGA é altamente cristalino, os PLGAs usualmente exibem menor cristalinidade e ponto de fusão. Por exemplo, enquanto o PGA e PLA são parcialmente cristalinos, o PLGA 50:50 é completamente amorfo. Essas mudanças morfológicas resultam em um aumento nas taxas de hidratação e hidrólise. Dessa forma, os copolímeros tendem a degradar mais rapidamente que o PGA e o PLA (WONG & MOONEY, 1997).

A temperatura de transição vítrea (T_g) dos diferentes PLA e PLGA se encontra acima da fisiológica (37°C) e, nessa condição, eles se encontram na forma cristalina. Desse modo, a cadeia se apresenta como uma estrutura relativamente rígida, proporcionando uma força mecânica significativa (DASH & CUDWORTH, 1998). Essa característica é, também, um fator determinante da velocidade de degradação dos polímeros já que está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. Portanto, o polímero que apresenta maior T_g , geralmente se degrada mais lentamente. Adicionalmente, essa temperatura também permite que sejam formulados como sistemas de liberação de drogas a partir desses dois polímeros (DASH & CUDWORTH, 1998). O PGA apresenta temperatura de transição vítrea inferior (ou até mesmo próxima) à corporal, sendo este um outro fator que o torna inadequado com relação à sua utilização em sistemas de liberação de fármacos (WONG & MOONEY, 1997).

Além disso, a massa molecular e o grau de cristalinidade podem influenciar as propriedades mecânicas, a capacidade de hidrólise e a velocidade de degradação

desses polímeros, e conseqüentemente, a resposta biológica. Os principais fatores responsáveis por alterações no período de degradação dos polímeros biodegradáveis são: (1) estrutura química e composição do sistema; (2) distribuição da massa molecular dos polímeros; (3) presença de monômeros e oligômeros; (4) tamanho e forma da superfície do sistema; (5) morfologia dos componentes do sistema (amorfo, semicristalino, cristalino) e (6) local de implantação do sistema e mecanismo de hidrólise (LEWIS, 1990; BLANCO-PRIETO *et al.*, 1998).

2.3.2 Biodegradação dos poliésteres

A biodegradação dos poliésteres PLA e PLGA ocorre por erosão, através de clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando o ácido lático e glicólico. Esses ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo, são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água (ATHANASION *et al.*, 1996). O GRÁF. 1 demonstra o mecanismo de erosão do PGA e dos copolímeros *in vitro*, que pode ser evidenciado por um significativo decréscimo do peso molecular que precede à liberação de monômero das amostras dos polímeros (GOMBOTZ & PETTIT, 1995 *apud* WONG & MOONEY, 1997).

A presença do grupo metil (-CH₃) no polímero derivado do ácido lático (PLA) confere a este uma maior hidrofobicidade quando comparado ao derivado do ácido glicólico (PGA). Dessa forma, filmes de PLA hidratam-se apenas 2%. Adicionalmente, a ligação éster do grupo metil no PLA é menos suscetível à hidrólise. Dessa forma, o PLA degrada mais lentamente que o PGA e tem uma maior solubilidade em solventes orgânicos (WONG & MOONEY, 1997).

O PGA, portanto, por ser bastante sensível à hidrólise, não é adequado para a utilização em sistemas de liberação de fármacos ou com andaimes para a engenharia de tecidos. Com relação ao PLGA, quanto maior a proporção de ácido

lático, maior a hidrofobicidade do copolímero, já que absorve menos água, e conseqüentemente, menor será a velocidade de degradação.

Esse mecanismo de degradação pode ser indesejável para certas aplicações. A relativa rápida liberação de uma grande quantidade de ácido glicólico e/ou lático pode levar a uma acidose local se uma grande quantidade desses polímeros estiver presente de uma forma concentrada, como, por exemplo, um pino sólido (WONG & MOONEY, 1997).

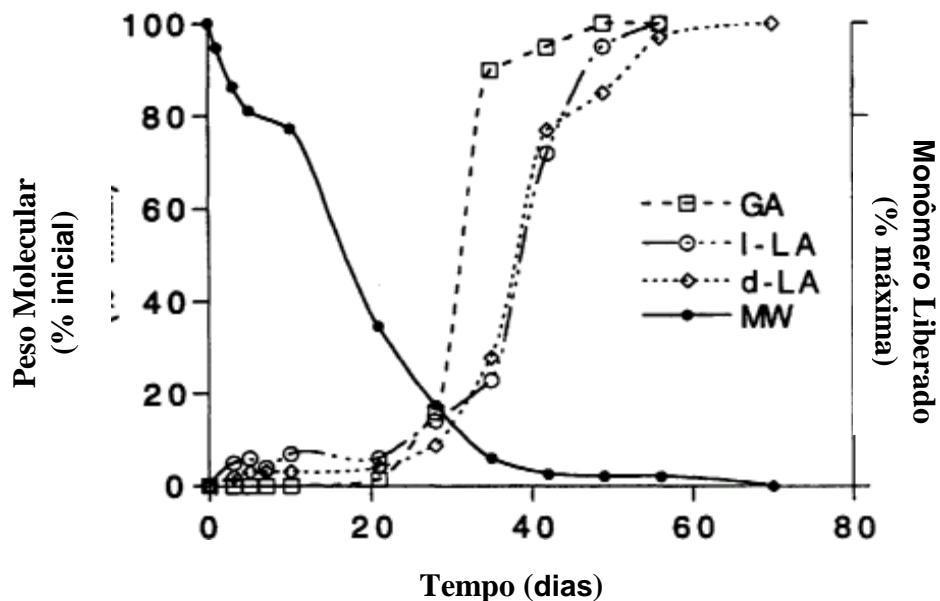


GRÁFICO 1 - Mudança do peso molecular (MW) de dispositivos fabricados a partir de PLGA 50:50 e liberação de ácido glicólico (GA), D-lático (D-LA) e L-lático (L-LA). As amostras foram dispostas em um meio aquoso *in vitro* a 37°C. Fonte: WONG & MOONEY (1997), p.59

Entretanto, andaimes altamente porosos são tipicamente utilizados na engenharia de tecidos, apresentando uma relativa baixa relação de massa por volume de polímero. A estrutura altamente porosa de andaimes permite a penetração celular assim como a degradação do polímero. A velocidade de degradação é afetada pela morfologia do andaime e a maior superfície de contato aumenta a difusão de moléculas de água para dentro do arcabouço polimérico quando são colocados em ambiente aquoso, por exemplo, *in vivo*. Os polímeros sofrem uma cisão randomizada de suas cadeias por uma simples hidrólise da ligação éster e o monômero difunde-se do arcabouço através da água (WONG & MOONEY, 1997).

O papel de atuação das enzimas na biodegradação do PLGA e PLA ainda não se encontra bem definido, embora dados descritos na literatura afirmem que esse processo não implica qualquer atividade enzimática, sendo a hidrólise o único mecanismo envolvido (JAIN, 2000).

A taxa de degradação dos copolímeros de GA e LA é influenciada por fatores que afetam a formação da cadeia polimérica, cristalinidade e hidrofobicidade. Uma vez que a degradação é induzida pela hidrólise, uma estrutura cristalina ou uma composição polimérica hidrofóbica desfavorecem a dissolução e degradação. GOMBOTZ & PETTIT (1995) citados por WONG & MOONEY (1997) resumiram os fatores específicos que afetam a cristalinidade e hidrofobicidade de copolímeros: (1) a proporção de monômeros lácticos e glicólicos nos copolímeros; (2) a estéreo-regularidade das unidades monoméricas nos polímeros afetam a formação da cadeia; (3) a falta de randomização dos monômeros lácticos e glicólicos diminuem a habilidade das cadeias de se cristalinizarem e (4) polímeros de baixo peso molecular degradam-se mais rapidamente que polímeros de alto peso molecular, especialmente quando os grupos finais são ácidos livres ao invés de grupos éster ou outros. Alguns desses efeitos estruturais estão ilustrados no GRÁF. 2, que demonstra que a perda da massa das amostras de polímeros PLA foi insignificante no período do experimento de aproximadamente 50 semanas. Entretanto, aquelas amostras de copolímeros GA e LA ou DL-PLA degradaram mais rapidamente, sendo que um aumento da proporção de GA aumentou a taxa de degradação (WONG & MOONEY, 1997).

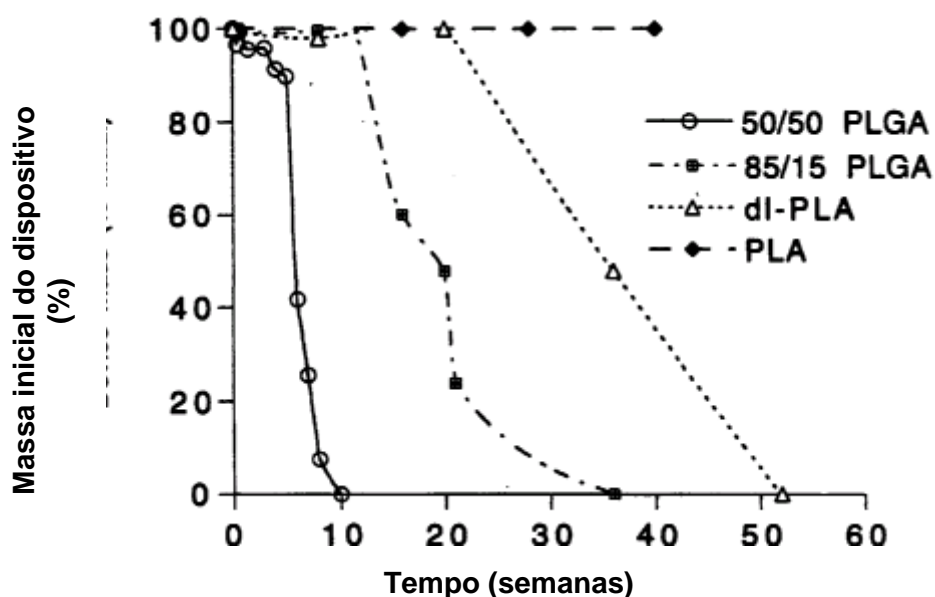


GRÁFICO 2 – Perda da massa dos dispositivos fabricados a partir de diferentes polímeros. Fonte: WONG & MOONEY (1997), p. 61

2.4 Biocerâmicas

A palavra *cerâmica* é de origem grega, sendo derivada de “*Keramos*”, que corresponde a “coisa queimada”. Materiais cerâmicos podem ser definidos como compostos sólidos formados pela aplicação de calor, algumas vezes calor e pressão, constituídos por ao menos um metal (M) e um sólido elementar não-metálico (SENM) ou um não-metal (NM), dois SENM, ou um SENM e um não-metal (NM) (BARSOUM, 1997).

Biocerâmica poderia ser definida, portanto, como uma cerâmica para uso biológico.

O interesse no fosfato de cálcio como implantes de tecido ósseo foram inicialmente envolvidos na hipótese que a liberação dos íons cálcio poderiam estimular a osteogênese (LERICHE & POLICARD, 1928 *apud* GRIFFON, 2002).

A partir da década de 70, as biocerâmicas de fosfato de cálcio vêm sendo largamente pesquisadas em vários países visando a obtenção de materiais que possam servir como um substituto para o osso natural e atender às necessidades reconstrutoras dos tecidos duros.

Uma euforia de expectativas do uso das primeiras biocerâmicas de fosfato de cálcio sintetizadas ao final da década de 70 precedeu uma grande frustração em relação aos resultados obtidos no seu emprego, devido ao relativo desconhecimento do material e de suas possibilidades. As conseqüências desse uso abusivo motivaram a busca de mais conhecimento, não só do material, como também de suas interações com o organismo. Assim, à medida que se amplia o conhecimento da fisiologia dos tecidos duros, as biocerâmicas também vêm sendo modificadas em seus aspectos físicos, químicos, estruturais, a fim de se obter uma melhor interação desses materiais com os processos regenerativos dos tecidos duros.

As biocerâmicas podem ser divididas em três categorias: (1) bioinertes, como alumina e zircônia; (2) com superfície bioativa, como hidroxiapatita sinterizada, Bioglass®; e (3) bioreabsorvíveis, como hidroxiapatita não calcinada e não sinterizada, α - e β - tricálcio fosfato (α -TCP e β -TCP), tetracálcio fosfato, octacálcio fosfato, etc. (SHIKINAMI & OKUNO, 1999).

Diferentes biomateriais vêm sendo pesquisados e colocados no mercado, utilizados, sobretudo, na tentativa de recomposição de tecidos duros, uma vez que suas propriedades físicas, químicas e de biocompatibilidade são muito semelhantes às do tecido ósseo (HENCH *et al.*, 1991; NAGAHARA *et al.*, 1992; RAVAGLIOLI *et al.*, 1992; YUBAO *et al.*, 1994).

O comportamento de uma biocerâmica depende, entre outras características, da sua estrutura físico-química, da relação cálcio/fósforo e da superfície específica, de tal forma que para cada utilização deve se considerar suas características e comportamento em função dos processos regenerativos dos tecidos duros desejáveis. Dessa forma, uma biocerâmica com hidroxiapatita, quando obtida de uma forma densa, policristalina, por sinterização, pode ser empregada, por exemplo, na fabricação de próteses para substituição de ossículos do ouvido, ao passo que a biocerâmica com HA em forma granular muito fina é empregada em revestimentos cerâmicos de próteses metálicas (RECOPE, 2004).

Dos materiais que têm sido estudados para substituição óssea, as biocerâmicas de fosfato de cálcio mostram uma excelente biocompatibilidade, sendo que as biocerâmicas que apresentam uma estrutura micro-macro porosa, bifásica, ou seja, uma fase mais estável (HA) e outra mais solúvel (TCP), são esperados melhores resultados como materiais de preenchimento (LIN *et al.*, 1998).

HASHIMOTO-UOSHIMA *et al.* (1995), em um estudo histológico, reportaram que a associação das características de rápida absorção do β -TCP com o andaime inerte da HA densa propiciou uma ativa reposição óssea a partir dos tecidos ósseos adjacentes, tendo sido ativada por macrófagos.

WYKROTA *et al.* (1998) e WYKROTA *et al.* (1999) relatam em um estudo longitudinal de 14 anos a utilização da biocerâmica Osteosynt[®] em reconstruções de grandes perdas ósseas faciais e ortopédicas, inclusive no tratamento de osteomielites, mostrando condições satisfatórias de resistência mecânica e módulo de elasticidade do novo tecido ósseo neoformado.

Osteosynt[®] é uma biocerâmica de última geração, bifásica micro-macro porosa, composta por 35% de β -Trifosfato de Cálcio (β -TCP), que é a fase mais solúvel das biocerâmicas de 2ª geração de β -TCP, e 65% de Hidroxiapatita (HA), que é a fase mais estável das biocerâmicas de 1ª geração de HA. Apresenta macro-poros intercomunicantes, na faixa de 50 μ 400 μ , que induzem uma resposta orgânica mais efetiva, forte ligação e crescimento tecidual intrínseco e micro-poros intercomunicantes, inclusive com os macro-poros, na faixa de 1 μ e 10 μ que aumentam

o contato tecidual, a solubilidade e a capacidade de trocas com os líquidos orgânicos, além de poros intermediários de 10µ a 50µ (WYKROTA, 1991).

Esta estrutura arquitetônica porosa indica esta biocerâmica como um eficaz e importante veículo condutor e liberador de fármacos e substâncias num período desejável, assim como sua topografia superficial permite atividade metabólica osteoblástica e expressão desejável dos fenótipos adequados para cada etapa dos fenômenos de neoformação tecidual (WYKROTA, 1991).

Em um estudo de incorporação e liberação de tetraciclina suportado pela biocerâmica Osteosynt[®], BERNARDO (2000) concluiu sendo viável a utilização desse sistema.

Dessa forma, a biocerâmica Osteosynt[®] dispõe de características físicas e químicas fundamentais para a engenharia de tecidos óssea, como estrutura arquitetônica, topografia de superfície, composição química, micro-macro porosidades intercomunicantes e capacidade de absorver, conduzir e liberar substâncias. Além disso, apresenta um acompanhamento clínico comprovado de longo tempo e registro no órgão competente desde 1995, sendo normatizado o seu uso pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

A formação de tecido ósseo requer três componentes básicos: 1) um sinal osteoindutor, isto é uma proteína osteoindutora; 2) um andaime que sirva como matriz para a liberação do sinal osteoindutor e como andaime para o novo osso formado e 3) células hospedeiras capazes de sofrer diferenciação em células ósseas (RIPAMONTI & DUNEAS, 1996).

Como dito anteriormente, um biomaterial ideal para a engenharia de tecido ósseo deve ser não-imunogênico, esculpível e acessível para se conseguir uma adaptação ótima aos contornos e às várias formas dos defeitos ósseos, fornecendo um suporte mecânico quando necessário. Além do mais, deve manter viáveis as estruturas orgânicas do hospedeiro. Segundo RIPAMONTI & DUNEAS (1996), o mais importante é o início ótimo da osteocondução com baixas doses de BMPs (*"Bone Morphogenic Proteins"* – proteínas morfogenéticas) e promover rapidamente a vascularização e invasão de células mesenquimais que entrem em contato com as BMPs previamente absorvidas na matriz. Atualmente, os materiais à base de fosfato de cálcio e apatitas têm sido bastante usados na terapia de restauração óssea com esse intuito (RIPAMONTI & DUNEAS, 1996).

Fosfatos de cálcio como a hidroxiapatita são conhecidos por serem osteocondutivos ou bioativos. Isto significa que eles agem como um modelo ao longo

do qual pode ocorrer o crescimento ósseo. Adicionalmente, a formação óssea pode acontecer diretamente à superfície do material, obtendo-se uma forte adesão ao tecido ósseo. Por outro lado, a osteoindução é considerada como uma propriedade dos materiais que induzem a formação de tecido ósseo. No passado, essa propriedade foi descrita apenas para materiais que continham fatores protéicos osteoindutivos, como as proteínas morfogenéticas (BMPs) (DE BRUIJN, 2003). Entretanto, recentemente, estudos indicam uma possível capacidade osteoindutiva de fosfatos de cálcio quando implantados intramuscularmente em modelos animais (YAMASAKI & SAKAI, 1992; RIPAMONTI, 1996; RIPAMONTI & DUNEAS, 1996; YANG *et al.*, 1996; DE BRUIJN, 2003). Geralmente, é assumido que a presença de uma estrutura porosa e uma geometria específica do implante estabelece um papel crucial no caráter osteoindutivo do implante (DE BRUIJN, 2003). Dessa forma, a geometria do biomaterial tem provado ser de importância primária para a geração do osso. A indução de morfogênese tecidual específica tem sido demonstrada pelo implante de matrizes biomiméticas que induzem e canalizam a resposta morfogenética nos tecidos, incluindo a angiogênese, com ou sem a adição de morfogenes osteogênicos, como as BMPs (COTELL *et al.*, 1996).

YAMASAKI & SAKAI (1992) descreveram ter encontrado a formação heterotópica de osso ao redor de grânulos de hidroxiapatita cerâmica porosa, mas não ao redor de grânulos densos. Os grânulos porosos tinham um tamanho entre 200 e 600 μm e uma rede contínua e interconectada, com uma microporosidade variando de 2 a 10 μm diâmetro.

Em princípio, qualquer material cerâmico que é suficientemente biocompatível pode ser usado como um implante em tecido vivo. Preferivelmente, o material cerâmico é capaz de prover uma superfície de fosfato de cálcio, *in vitro* ou *in vivo*, apresentando essa estrutura de superfície específica. É preferido, adicionalmente, que o material cerâmico seja capaz de adsorver os agentes biologicamente ativos, como fatores de crescimento (BMP's etc.), *in vitro* ou *in vivo*. Exemplos satisfatórios de materiais cerâmicos incluem fosfato de cálcio, biovidros e materiais que contêm cálcio fosfato e/ou biovidros (RATNER *et al.*, 1996).

Segundo RIPAMONTI (1999a,b), a hidroxiapatita porosa age como um substrato sólido para absorção, armazenamento e liberação controlada de BMPs/OPs (proteína osteogênica), iniciando localmente a formação de tecido ósseo como uma resposta secundária. O autor cita diversos experimentos em que o tecido ósseo somente foi gerado em hidroxiapatita porosa litomórfica, não se obtendo o mesmo resultado com a mesma hidroxiapatita na forma granular. Contudo, LOBO (2002)

demonstrou osteoindução intrínseca da biocerâmica Osteosynt[®] na forma granular para preenchimento de defeitos ósseos de 5mm de diâmetro em fêmures de coelhos *New Zeland*, sendo a formação de tecido ósseo pela biocerâmica superior aos grupos sem preenchimento, com plasma rico em plaquetas (PRP) ou com biocerâmica associada ao PRP.

Entre as características citadas das biocerâmicas, pode-se acrescentar que estas também poderiam funcionar como sistemas para liberação de fármacos, entre os quais pode-se citar dispositivos para aumentar o crescimento ósseo e a regeneração no tratamento de defeitos ósseos (BERNARDO, 2000). Por causa da pequena circulação sanguínea nos locais do defeito ósseo, fármacos como antibióticos, antimicrobianos e fatores de crescimento poderiam ser providos às regiões afetadas. Para uma maior efetividade de um sistema de liberação de fármacos, o carreador precisa cumprir as exigências de segurança, maior eficácia, resposta terapêutica previsível e períodos de liberação controlados e prolongados. Foram desenvolvidos vários carreadores para encapsular fármacos, como polímeros biodegradáveis sintéticos ou naturais e cerâmicas bioativas, na forma de partículas, membranas e matriz porosa. Dessa forma, aumentou-se o interesse da hidroxiapatita como um dispositivo carreador de liberação do fármaco devido à sua osteocondutividade e biocompatibilidade (KIM *et al.*, 2004).

Entretanto, as hidroxiapatitas apresentam algumas limitações, como: (1) limitada capacidade de suportar carga de torção; (2) a pouca adequada tolerância de corte e (3) uma reabsorção mínima quando as hidroxiapatitas puras, policristalinas são usadas. Por essas razões, o seu uso em regiões esqueléticas submetidas a alto esforço são limitadas, o que já não acontece da mesma forma com as biocerâmicas bifásicas micro-macro porosas. Contudo, tem-se uma grande utilização nos reparos e/ou reconstruções das perdas ósseas em geral em odontologia e medicina (RIPAMONTI & DUNEAS, 1996). Essas limitações colocam o desafio para se preparar materiais com melhor performance na área.

Dessa forma, tratamentos superficiais e/ou a preparação de compósitos entre os diferentes biomateriais (metais, ligas metálicas, cerâmicas e polímeros, por exemplo) são as estratégias hoje usadas para o melhoramento das propriedades e otimização do uso dos mesmos dentro de sua especificidade (RAMOSHEBI *et al.*, 2002).

2.5 Compósitos: associação de biomateriais para a reconstrução óssea

Devido ao fato de nenhum material simples possuir todas as propriedades requeridas para o sucesso de um enxerto aloplástico, uma alternativa lógica seria o desenvolvimento de compósitos de materiais que combinem a força interfacial para minimizar alguma característica indesejável (LAURENCIN & LU, 1999).

Em 1986, HIGASHI *et al.* relataram estudos *in vitro* e *in vivo* de compósitos formados a partir de PLA de diferentes pesos moleculares e hidroxiapatita onde se observou a reabsorção do polímero e neoformação óssea.

De acordo com HENCH (1998a), as propriedades mecânicas de compósitos baseados em hidroxiapatita são as mais similares com as do tecido ósseo natural e, de acordo com IGNJATOVIC & USKOKOVIC (2004), a estrutura do compósito HA:polímero é a que mais se assemelha à estrutura do tecido ósseo natural, sendo que a matriz contínua do polímero com partículas dos cristais de hidroxiapatita finamente distribuídos seria similar ao componente colágeno.

Em geral, compósitos de polímeros e cerâmicas são desenvolvidos por três razões: (1) otimizar as propriedades mecânicas do dispositivo; (2) criar um compósito bioativo para promover a adesão ao osso e (3) eliminar algum efeito detrimental associado à interface (LAURENCIN & LU, 1999).

Uma vez que o enxerto ósseo deve ser biocompatível, osteoindutivo, osteocondutivo, possuir propriedades mecânicas similares às do osso natural e ser capaz de suportar a angiogênese, uma variedade de dispositivos porosos tridimensionais baseados em polímeros biodegradáveis ou cerâmicas têm sido considerados como andaimes para a engenharia de tecidos para o osso (LAURENCIN *et al.*, 1999).

Desse modo, partículas de hidroxiapatita são freqüentemente adicionadas a matrizes de biomateriais para simular o tecido ósseo natural, aumentar a produção de colágeno Tipo I e melhorar a resposta celular à estrutura biomimética (LAURENCIN & LU, 1999). SHIKINAMI & OKUNO (1999) fabricaram compósitos de hidroxiapatita e PLA em várias formas, incluindo parafusos, placas e pinos para serem usados como dispositivos de fixação interna. ELGENDY *et al.* (1993) compararam a adesão e expressão de fenótipo osteoblástico em compósitos de HA:PLGA 50:50 *versus* a HA e o PLGA 50:50 isoladamente. Uma maior adesão celular foi observada no compósito HA:PLGA 50:50 do que no controle HA, e a expressão fenotípica foi mantida tanto no compósito como no polímero PLGA 50:50 (ELGENDY, 1993).

YASUNAGA *et al.* (1999) fabricaram um compósito de partículas de hidroxiapatita não-sinterizada com PLA, apresentando uma força de adesão inicial de 270 MPa. Essa força de adesão e o comportamento *in vivo* foram avaliados em um modelo com coelhos. A força de adesão do implante ao osso foi significativamente maior com compósito do que com o PLA separadamente e nenhum tecido fibroso foi detectado na interface compósito-osso (YASUNAGA *et al.*, 1999).

Diversos pesquisadores vêm estudando a formação de compósitos de polímeros biodegradáveis e hidroxiapatita. TORMALA *et al.* (1993) examinaram a possibilidade de se obter um biomaterial compósito a partir da formação de lâminas baseadas em PLA e HA. VERHEYEN *et al.* (1993) sucederam a produção de um compósito pela mistura de HA com uma solução de PLA antes da polimerização. SHIKINAMI & OKUNO (1999) descreveram um procedimento para obtenção de um compósito aquecendo-se uma mistura de HA:PLA com um componente de HA não-calcinada e não-sinterizada. IGNJATOVIC *et al.* (1999) sintetizaram blocos do compósito HA:PLA através de pulverização do polímero sobre o componente de HA com subsequente prensagem fria e quente.

O presente trabalho pretende avaliar biologicamente os compósitos formados entre a biocerâmica Osteosynt[®] e os polímeros biodegradáveis PLA e PLGA, visando um biomaterial que combine a propriedade osteogênica da biocerâmica e a propriedade plástica e biodegradável dos polímeros.

2.6 Utilização da tetraciclina para a neoformação óssea

O conceito de utilizar meios farmacológicos para redirecionar ou efetuar uma resposta biológica favorável durante o curso da reconstrução tecidual é promissora. Exemplo disso é a incorporação de um sistema de liberação controlada de fármacos em próteses (GRECO, 1994). Dessa forma, agentes antimicrobianos vêm sendo embebidos em cimentos ósseos ou catéteres para prevenir infecções (WONG & MOONEY, 1997).

PARK *et al.* (1997) citam que a administração sistêmica de TCN na concentração de 100 mg/ml demonstrou uma atividade regenerativa óssea e que a administração local de 10µg/ml, através de osso liofilizado, foi efetiva na regeneração óssea.

Dentre os antibióticos mais comumente utilizados para a engenharia de tecidos para osso destacam-se as tetraciclina (FIG. 2), que têm como fonte microbiana o *Streptomyces aureofaciens*, sendo um antibiótico de largo espectro que afeta organismos anaeróbicos e facultativos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e micoplasmas, por sua potente atividade bacteriostática. A tetraciclina é capaz de penetrar nas superfícies de raízes e estender a duração de atividade que segue sua aplicação tópica e então exibir uma alta substantividade (PATARO *et al.*, 2003).

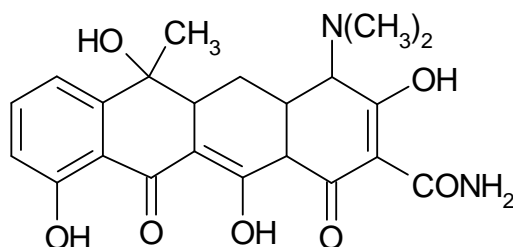


FIGURA 2 - Estrutura química da tetraciclina

A tetraciclina exibe propriedades farmacológicas adicionais como atividade anticolagenásica, inibição de reabsorção de osso, ação antiinflamatória e uma habilidade para promover a adsorção de fibroblastos e tecido conectivo em superfícies radiculares (ESPOSITO, 1997; SEYMOUR, 1995; WIKESJÖ, *et al.*, 1986)

Adicionalmente, a tetraciclina pode servir como marcador para microscopia. KÖSE *et al.* (2003) detectaram a mineralização produzida por osteoblastos através de imagens produzidas por microscopia confocal. As partes mineralizadas da matriz óssea foram fluorescentemente identificadas pela incubação de uma cultura de osteoblastos por 24 horas em uma solução de 3 µg/ml de tetraciclina (KÖSE *et al.*, 2003).

As tetraciclinas apresentam grupos carbonil e amino que agem como grupos quelantes através dos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} . Essa atividade foi relatada no trato gastro-intestinal (ERICSSON *et al.*, 1988), mas poderia ser extrapolada para uma adesão por quelação ao cálcio (Ca^{2+}) da biocerâmica.

O encapsulamento de fármacos em matrizes biodegradáveis são sistemas comuns de liberação controlada. A dissolução da matriz é afetada por hidrólise ou ação enzimática. Se a liberação do fármaco for governada somente pela biodegradação da matriz, uma taxa constante de liberação pode ser obtida, de forma que a área superficial do dispositivo mantenha-se constante. Entretanto, esse fato representa um caso idealizado que dificilmente ocorre. Na realidade, as moléculas do fármaco podem difundir através da matriz. Isso é particularmente verdade se o fármaco for hidrofílico, o que representa uma grande força de difusão (WONG & MOONEY, 1997), o que poderia ocorrer com a tetraciclina.

A possibilidade de utilização do PLGA como material para liberação controlada de agentes bioativos tem sido comprovada, sendo esses polímeros biodegradáveis os mais estudados para liberação de fármacos, tendo apresentado boa biocompatibilidade (DOMB *et al.*, 2001).

Assim como os polímeros biodegradáveis, sistemas de hidroxiapatita têm sido desenvolvidos para a liberação de fármacos no tecido ósseo em concentrações terapêuticas sem causar toxicidade severa no restante do organismo (OTSUKA *et al.*, 1990 citados por DASH & CUDWORTH, 1998). YU *et al.* (1993), citados por DASH & CUDWORTH (1998), demonstraram uma liberação terapêutica constante de antibiótico no sítio infectado e uma diminuição do tempo no processo de reparação óssea. MORRIS & BAJPAI (1989), citados por DASH & CUDWORTH (1998), demonstraram, a partir de uma matriz de tricálcio fosfato, a liberação constante de antibióticos em um período superior a três semanas diretamente no sítio da infecção.

Dessa forma, devido a essas características da TCN, esse estudo propõe a utilização da mesma nos compósitos para reconstrução óssea.

2.7 A resposta tecido/implante

Uma vez que materiais sintéticos têm sido usados extensivamente nos últimos 50 anos, torna-se necessária a compreensão das respostas celular e tecidual a esses materiais. Já é claro que a interação tecido-polímero envolve a liberação de fatores quimiotáticos, entre outros, e essas moléculas induzem e sustentam uma resposta inflamatória na área do implante (LAURENCIN *et al.*, 1994).

A reação inflamatória do hospedeiro é uma resposta normal à injúria e presença de objetos estranhos. A magnitude e duração do processo inflamatório têm um impacto direto na bioestabilidade e biocompatibilidade do biomaterial (KAO & LEE, 2001).

A inflamação serve para conter, neutralizar, diluir ou cercar o agente ou processo causador de uma injúria. Adicionalmente, a inflamação desencadeia uma série de eventos responsáveis pela cura e reconstituição do sítio implantado do hospedeiro através de reposição de tecido lesado pela regeneração de células parenquimais e/ou formação de um tecido fibroso cicatricial (RATNER *et al.*, 1996).

Células sanguíneas, tais como neutrófilos e monócitos têm um papel importante na resposta inflamatória e na incorporação do implante. Linfócitos, plasmócitos, células “*natural killers*”, macrófagos e células gigantes são ativamente envolvidos no complexo antigênico ou reações imunológicas que estão associadas à incorporação de transplantes ou implantes de origem natural. Reações imunológicas são usualmente de menor importância quando se utilizam materiais como polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e carbono ou seus compósitos (RATNER *et al.*, 1996).

Linfócitos e plasmócitos migram mais lentamente que os neutrófilos para o foco inflamatório, tendo ação coadjuvante nas atividades macrofágicas. Reconhecem antígenos e desenvolvem respostas para eliminá-los, principalmente em quadros inflamatórios crônicos e granulomatosos.

Fibroblastos têm um importante papel na incorporação do implante e estão envolvidos no processo de encapsulação do mesmo. Seus produtos, tais como mucopolissacarídeos – constituintes primários da matriz de tecido conectivo – e os

diferentes colágenos estão envolvidos na aderência aos biomateriais. O fibroblasto e a deposição de seus produtos ao longo das células endoteliais estão envolvidos na formação de importante microvasculatura para incorporação do implante (ZIATS *et al.*, 1988).

Neutrófilos e macrófagos estão relacionados à reparação de ferimentos e processo de cura, assim como à eliminação de bactérias que podem causar infecção na área do implante e ameaçar o processo de implantação. Neutrófilos estão principalmente envolvidos na fase aguda da inflamação e têm relativamente curta vida quando comparados aos macrófagos (e seus derivados) que estão envolvidos na inflamação crônica e fase de cura (ZIATS *et al.*, 1988).

O macrófago parece ter um papel significativo na regulação da reparação de feridas. Macrófagos ativados estimulam a neovascularização, síntese e deposição de colágeno. Também produzem fatores quimiotáticos para fibroblastos e secretam collagenases envolvidas na quebra do tecido conjuntivo (LAURENCIN *et al.*, 1994).

Muitos fatores contribuem para a resposta biológica a um material no meio implantado, tais como formulação química, tamanho, formato, sítio de implantação e duração do material implantado com o tecido. Características superficiais de biomateriais e eventos decorrentes das interfaces dos biomateriais têm sido críticas para aceitação, integração e durabilidade de um implante. Um implante de um biomaterial deve ter características de superfície que promovam a adesão de células eucariotas adequadas e crescimento de tecido fibrovascular (LAURENCIN *et al.*, 1994).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram avaliar a influência da associação de polímeros biodegradáveis em uma matriz biocerâmica com adição de tetraciclina, mediante:

- Graus de citotoxicidade *in vitro*;
- Padrões de resposta inflamatória *in vivo*;
- Características da superfície dos biomateriais;
- Padrões de degradação.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias, reagentes, células e animais utilizados

Substâncias para estudo *in vitro* e *in vivo*:

- Osteosynt[®] (Biocerâmica de Trifosfato de cálcio e Hidroxiapatita) (BC)
Granulometria: 80x60 Mesh
Fabricante: Einco Biomaterial Ltda., Belo Horizonte, Brasil.
- D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50, PLGA
Viscosidade: 0,39 dL/g em HFIP a 30°C
Lote: D01079
Fabricante: Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, USA
- D,L Poli (Ácido Lático), PLA
Viscosidade: 0,36 dL/g em CHCl₃ a 30°C
Lote: D020015
Fabricante: Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, USA
- Diclorometano
Teor: 99.5%
Densidade: 1.320 -1.328 g/mL a 20°C
Lote: 24684
Fabricante: Quimex, Brasil.
- Cloridrato de tetraciclina (TCN)
Teor: 99%
Lote: 17098689, USA.
Fabricante: Merck

Células para testes *in vitro*:

- Linhagem celular: L-929 (fibroblastos tumorigênicos de camundongo) cedida pelo Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin do Instituto de Química, USP, para a Prof^a. Dr^a. Miriam Tereza Paz Lopes do Laboratório de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

Animais para testes *in vivo*:

- Camundongos machos *Swiss, outbreed*,
Idade aproximada: 8 semanas
Peso aproximado: 30g
Origem: Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO)

4.2 Testes de citotoxicidade

Os testes foram realizados em parceria com o Laboratório de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, sob coordenação das Prof^{as}. Dr^{as}. Miriam Tereza Paz Lopes e Regina Maria De Marco Turchetti Maia.

4.2.1 Preparação dos compostos

A preparação dos compósitos foi realizada no Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG, sob coordenação do Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra.

Os compósitos foram preparados utilizando-se os polímeros biodegradáveis PLGA 50:50 e de PLA dispersos em uma matriz da biocerâmica Osteosynt® de granulometria 80x60 Mesh, adicionando-se ou não tetraciclina. A unidade Mesh pode ser convertida para micrômetros de acordo com o QUADRO 7.

QUADRO 7 - Conversão da unidade Mesh para unidade micrômetro

Mesh	Tamanho da partícula (μm)
20	850
40	425
60	250
80	180
100	150
200	75

Fonte: Norma ASTM STP 447 E US Standard

Objetivando-se um compósito com a menor proporção possível polímero:biocerâmica, entretanto sem perder as características mecânicas e a plasticidade, decidiu-se padronizar os compósitos na proporção de 25:75, ou seja, 1 parte de polímero para 3 partes de cerâmica. A escolha foi feita de acordo com HOLLINGER & BATTISTONE (1986) e LIN *et al.* (1998), os quais descrevem que a composição de tecido ósseo (orgânico/inorgânico) no tecido ósseo está na mesma proporção anterior.

A biocerâmica e o PLGA pulverizado foram pesados em balança analítica. Esses sólidos foram transferidos quantitativamente para um almofariz, sendo adicionados, posteriormente, 0,20 mL de diclorometano para cada grama de compósito. A mistura foi homogeneizada até parcial evaporação do solvente. Paralelamente, realizou-se o mesmo procedimento para obtenção de compósito utilizando PLA.

4.2.1.1 Incorporação de tetraciclina aos compósitos

De acordo com GOODSON (1987), a concentração mínima inibitória de TCN necessária para inibição do crescimento *in vitro* de 90% (MIC₉₀) é de 32 µg/ml para bactérias Gram-positivas e 0,5µg/ml para bactérias Gram-negativas. Dessa forma, decidiu-se utilizar a concentração de 0,01% p/p de TCN nos compósitos, que corresponde a 10% da concentração utilizada nos estudos *in vivo* (0,1% p/p).

4.2.1.2 Preparação de pastilhas dos compósitos

Baseados em testes prévios foram preparadas pastilhas de ~~aproximadamente~~ 7mm de diâmetro sob uma pressão constante de 250 kg/m² por 5 minutos (prensa marca CARVER hidraulic model # 3912, CARVER, INC.) e esterilizados por óxido de etileno (Curar – Centro de Esterilização Especializada Ltda., Belo Horizonte – MG). A massa das pastilhas foi de 150 mg para os testes *in vitro*.

4.2.2 Avaliação da citotoxicidade

Os testes para determinação biológica da citotoxicidade *in vitro* de biomateriais avaliam os efeitos produzidos pelo contato dos mesmos com células de tecido conjuntivo de rato (fibroblastos de linhagem celular L-929). Dessa forma, realizou-se o teste de contato direto (ASTM F-813 - ASTM, 1995a; ISO, 1992) e o teste de eluição (USP - XXIII) de acordo com as normas ISO 10.993-5.

4.2.3 Cultivo de linhagens celulares

As células da linhagem L929 foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 5% de soro fetal bovino (FBS) em frascos de cultura em estufa umidificada mantida à temperatura constante de 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂. Antes de atingirem a confluência, as células foram tripsinizadas para serem subcultivadas para utilização imediata.

4.2.3.1 Método por contato direto - norma ASTM F-813

Suspensão celular da linhagem L929 foi distribuída em placas de Petri de 35 mm de diâmetro e incubadas por um período de aproximadamente 48 horas. Após a obtenção da confluência adequada (80 - 90%), o meio de cultura foi aspirado e substituído por um meio de cultura fresco (RPMI 1640 + 5% FBS). Conforme requisito das normas ASTM F-813, utiliza-se para esse teste polietileno de alta densidade como controle negativo e látex como controle positivo. Para tal, amostras desses materiais, assim como pastilhas dos materiais teste foram previamente esterilizadas por óxido de etileno (Curar – Centro de Esterilização Especializada Ltda., Belo Horizonte – MG) sendo posteriormente colocadas em contato direto com a monocamada celular. As culturas celulares foram incubadas por 24 horas na presença das amostras para se avaliar as propriedades citotóxicas das mesmas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após a delimitação da área de contato das amostras na superfície externa das placas, removeram-se as pastilhas e a monocamada celular foi corada com solução de cristal violeta. O índice de zona (IZ) corresponde à área ou zona clara onde as células não foram coradas pelo cristal violeta (QUADRO 8) e o índice de lise (IL) indica a porcentagem de células degeneradas ou afetadas dentro da zona de toxicidade (QUADRO 9) que foram estabelecidos para cada placa de cultura após análise microscópica. O índice de zona (IZ) e os índices de lise (IL) são relacionados para fornecer o índice de resposta (IR) através da expressão:

$$IR = IZ / IL$$

QUADRO 8 - Descrição da zona afetada e respectivos índices de zona (IZ)

IZ	Descrição	Classificação
0	Nenhuma zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Zona limitada sob a amostra	Leve
2	Zona inferior a 0,5cm ao redor da amostra	Suave
3	Zona limitada entre 0,5 e 1,0cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona superior a 1,0cm ao redor da amostra, porém sem envolver toda a placa	Severa
5	Zona que envolve toda a placa	Severa

QUADRO 9 - Descrição da lise provocada e respectivos índices de lise (IL)

IL	Descrição	Classificação
0	Nenhuma lise	Nenhuma
1	Menos do que 20% da zona afetada	Leve
2	Entre 20 e 39% da zona afetada	Suave
3	Entre 40 e 59% da zona afetada	Moderada
4	Entre 60 e 80% da zona afetada	Severa
5	Mais do que 80% da zona afetada	Severa

4.2.3.2 Método por Eluição - USP XXIII

Este teste é utilizado para determinar a reatividade biológica de extratos dos materiais, principalmente dos polímeros de alta densidade. Os extratos foram preparados a partir das pastilhas dos materiais, polietileno de alta densidade como controle negativo e látex como controle positivo. Os meios extratores de cultura (RPMI 1640 + 5% de FBS) com as respectivas amostras dos materiais foram incubados por 24 horas a 37°C, na presença de 5% de CO₂.

Semelhantemente ao teste de contato direto, suspensão celular da linhagem L929 foi distribuída em placas de Petri de 35 mm de diâmetro e incubadas por um período de aproximadamente 48 horas. Após a obtenção da confluência adequada, o meio de cultura foi aspirado e substituído pelos extratos das amostras e dos controles negativos e positivos. As placas foram incubadas por 48 horas à temperatura constante de 37°C em estufa umidificada contendo uma atmosfera de 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, as placas foram examinadas microscopicamente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A reatividade biológica no teste está descrita numa escala de 0 a 4 (QUADRO 10). As respostas observadas no teste serão consideradas adequadas se corresponderem aos graus de reatividade estabelecidos pelos padrões utilizados: negativo (GRAU 0) e positivo (GRAU 4), sendo que para se preencher as exigências do teste nenhuma das culturas celulares expostas aos seus eluatos deve apresentar reação superior ao GRAU 2 (reação leve ou benigna).

QUADRO 10 - Graus de reatividade para o teste de eluição

Grau	Classificação	Condições da cultura
0	Nenhuma	Discretos grânulos intracitoplasmáticos; nenhuma lise celular
1	Leve	Não mais que 20% das células são arredondadas, frouxamente ligadas e sem grânulos intracito-plasmáticos; lise celular rara
2	Suave	50% das células são arredondadas e desprovidas de grânulos intracitoplasmáticos; lise celular extensa e áreas vazias entre células
3	Moderada	70% da camada celular contém células arredondadas e/ou que sofreram lise
4	Severa	Completa destruição da camada celular

Fonte: USP XXIII

4.3 Testes de avaliação biológica *in vivo*

Os testes de biocompatibilidade foram realizados em parceria com o Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, sob coordenação da Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria.

4.3.1 Preparação dos compostos

A preparação dos compósitos foi realizada no Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG, sob coordenação da Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra.

De forma semelhante aos testes de citotoxicidade, foram preparados compósitos a partir dos polímeros biodegradáveis PLGA 50:50 e de PLA dispersos em matriz de biocerâmica Osteosynt[®] 80x60 Mesh, assemelhando-se à proporção de parte inorgânica e orgânica da constituição óssea, estabelecendo-se uma proporção de 25% p/p de polímero para 75% p/p de biocerâmica, adicionando-se ou não 0,1% p/p de TCN.

Dessa forma, estabeleceram-se os seguintes grupos teste: PLGA:BC, PLGA:BC + 0,1% de TCN, PLA:BC e PLA:BC + 0,1% de TCN e controle: PLGA, PLA e BC.

4.3.2 Preparação de pastilhas dos compósitos

Os materiais testados foram conformados em pastilhas de aproximadamente 7mm de diâmetro sob pressão de 250 kg/m² por 5 minutos (prensa marca CARVER hidraulic model # 3912, CARVER, INC.) e esterilizados por óxido de etileno (Curar – Centro de Esterilização Especializada Ltda., Belo Horizonte – MG). A massa das pastilhas foi de 50 mg para os testes *in vivo*.

4.3.3 Avaliação da resposta biológica *in vivo*

Os efeitos locais de um dispositivo implantável ou um material em um tecido são avaliados por procedimentos que introduzem o material ou o dispositivo, ou uma porção representativa, dentro do tecido. Espera-se cicatrizar a região implantada, a qual é posteriormente removida para exames macro e microscópicos da resposta tecidual de acordo com vários parâmetros, como fibrose, degeneração, presença de células fagocitárias, necrose, infiltração de células adiposas e debris externos (ANAND, 2000).

Nesse trabalho foram adaptadas as normas ISO 10993-6 (“Tests for Local Effects after Transplantation”) e o Guia do Ministério de Saúde e Bem-Estar do Japão (Ministry of Health and Welfare – MHW). O QUADRO 11 compara as normas ISO 10993-6 e as do MHW 1995.

QUADRO 11 - Normas para avaliação da biocompatibilidade dos materiais propostas por ANAND (2000)

	ISO 10993-6	MHW 1995
Tempos para avaliação	O suficiente para alcançar o estado de cicatrização normal dos tecidos (2, 4, 6 e 12 semanas)	7 dias e 4 semanas
Número de animais	Pelo menos 3 animais para cada tempo de avaliação (coelhos)	Pelo menos 4 animais para cada tempo de avaliação (coelhos)
Número de amostras por avaliação	No mínimo 8 amostras por período para o material teste e controle	Não especificado
Critério de avaliação	Avaliação comparativa das respostas do grupo teste e do controle	Teste positivo se mais que 2 dos 4 sítios de implantação de cada animal exibirem uma resposta significativa comparadas aos sítios controle

Fonte: ANAND (2000) p.206

Dessa forma, foram utilizados 3 animais para cada grupo teste (PLA:BC, PLA:BC + TCN, PLGA:BC, PLGA:BC + TCN) e seus respectivos controles (BC, PLA, PLGA), sendo implantadas 2 pastilhas diferentes em cada animal. O período de avaliação foi de 1, 7, 13, 21, 28 e 56 dias. Também foram usados como controle tecidos subcutâneos de animais incisionados e de animais hígidos.

O evento histológico preponderantemente avaliado foi a inflamação, a partir de uma análise semiquantitativa do número de células inflamatórias dos cortes sobre toda a área que estava em contato com as pastilhas. Essa contagem foi realizada por meio de um retículo acoplado à lente do microscópio.

Por fim, a interpretação dos resultados foi feita de acordo com o quadro reacional dos tecidos em contato com os materiais em teste, sendo a biocompatibilidade classificada com aceitável ou não aceitável (ISO 10993-5, 1994; STANLEY, 1985).

Sendo aceitável para:

- a) Discreta ou nenhuma reação tecidual em todos os períodos avaliados;
- b) Moderada ou intensa reação tecidual aos 7 dias, a qual se reduz de intensidade com o decorrer dos períodos, atingindo o escore de reação tecidual não significativa aos 60 dias.

E não aceitável para

- a) Não significativa ou discreta reação tecidual aos 7 dias, sendo que a intensidade desta reação atinge o escore de moderado ou intenso aos 60 dias;
- b) Moderada ou intensa reação tecidual em todos os períodos avaliados.

4.3.4 Animais

Foram utilizados 45 camundongos machos *Swiss, outbreed*, com aproximadamente 8 semanas de idade e 30g. Os camundongos foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO) e foram mantidos *ad libitum* no Biotério dos Laboratórios de Imunobiologia e de Imunofisiologia – ICB – UFMG, com ração padrão para camundongos e água filtrada.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, parecer 014/04.

4.3.5 Implantes

Para realização dos implantes (FIG. 3) os animais foram devidamente anestesiados. Para tal, foi preparada uma solução anestésica contendo 10ml de solução salina fisiológica, 1ml de solução a 10% do anestésico ketamina (Agener, São Paulo, SP) e 1ml do sedativo, analgésico e relaxante muscular Calmiun[®] (Agener, São Paulo, SP). A dose aplicada por via intraperitoneal em cada camundongo foi de 0,01ml dessa solução para cada grama de peso dos mesmos.

Os animais anestesiados foram submetidos a tricotomia na região dorsal. Após anti-sepsia local com etanol 70%, foi realizada uma incisão mediana dorsal entre as espinhas ilíacas com divulsão do tecido subcutâneo em direção cranial e caudal. Em seguida, as pastilhas foram introduzidas na região interescapular e em direção caudal, sendo implantadas 2 pastilhas de grupos diferentes em cada animal.

A incisão foi suturada (fio de sutura, Catgut simples 5-0, agulha curva ½ CR 2,0cm, Brasuture, S.S. Grama, SP) por meio de ponto duplo, seguindo-se de aplicação local de anti-séptico. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

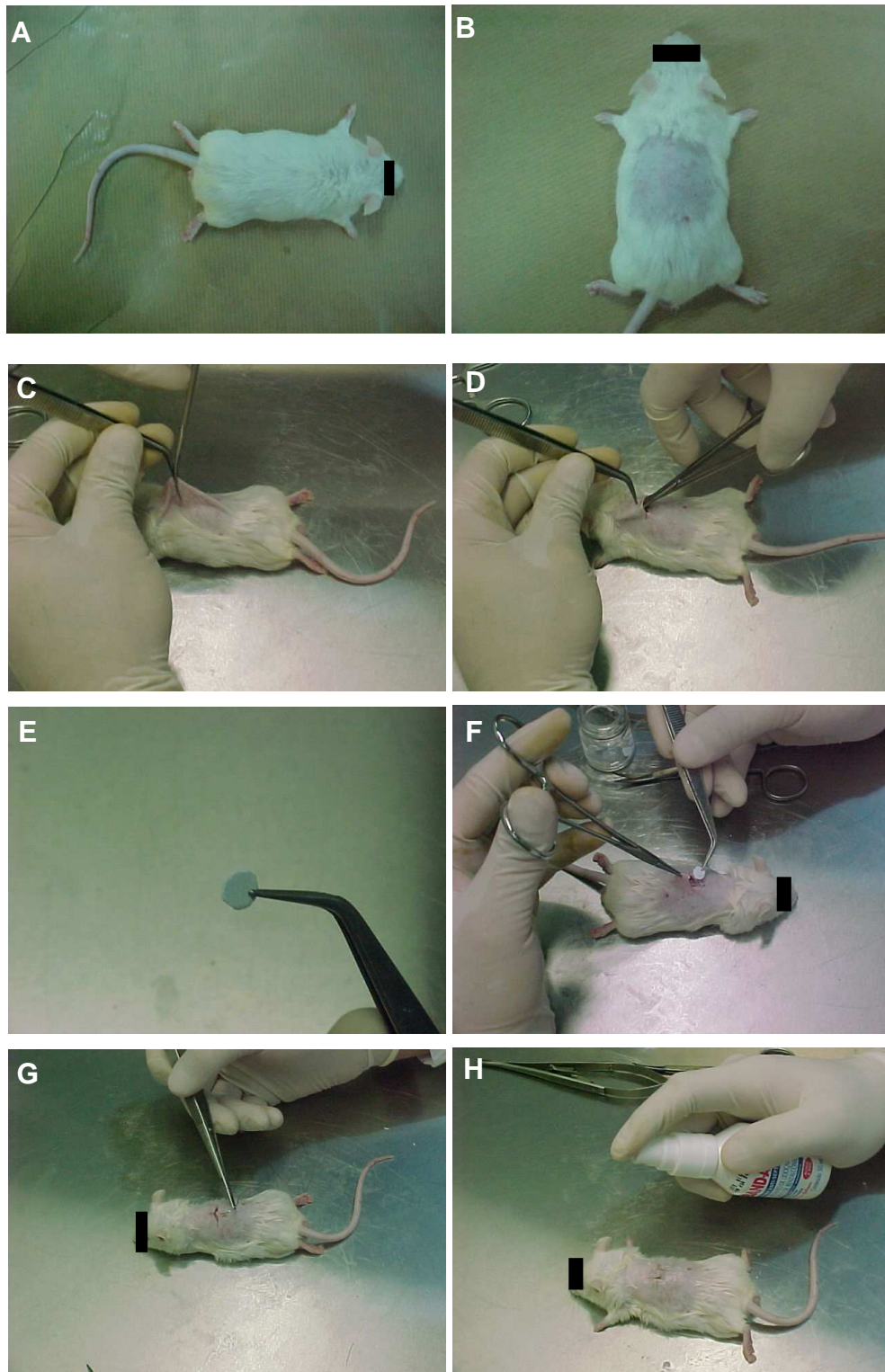


FIGURA 3 - Implantação dos compósitos. A) animal anestesiado; B) tricotomia; C) incisão; D) divulsão do tecido; E) pastilha; F) Implantação da pastilha; G) sutura; H) aplicação de analgésico e anti-séptico tópicos

4.3.6 Remoção dos implantes

Após 1, 7, 13, 21, 28 e 56 dias, os camundongos foram sacrificados por superdosagem de anestésico objetivando-se a ausência de qualquer tipo de sofrimento, além de manter a integridade dos tecidos adjacentes e dos implantes, assim como a ausência de sangramento na área, permitindo a identificação e recuperação dos mesmos.

A seguir, os animais foram submetidos a uma incisão mediana na região dorsal para remoção dos compósitos e análise histológica.

4.3.7 Histologia

O processamento histológico foi realizado em parceria com o Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia – UFMG, sob coordenação da Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar.

Imediatamente após a remoção das pastilhas, os tecidos sob os implantes foram removidos e fixados em uma solução de formol a 10% por 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram desidratados através de séries gradativas de soluções de etanol a 80%, 95% e 99,9%, sendo 1 hora para cada concentração. Em seguida, o material foi imerso em xilol para retirada do excesso de álcool e para torná-lo translúcido. Após esse tratamento, o material recebeu dois “banhos de parafina”.

O material incrustado foi cortado em micrótomo e os cortes, com espessura de 5 μ m, foram usados para coloração com hematoxilina-eosina para posterior análise por microscopia ótica.

A análise das lâminas foi conduzida neste mesmo laboratório e no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG.

4.3.8 Análise estatística

Num primeiro momento foram feitas análises descritivas dos dados a fim de se ter uma visão geral e clara dos dados apresentados. Estas análises iniciais incluíram ainda a construção de gráficos tipo Box-plot para cada dia e para cada material. O Box-plot é um gráfico que possibilita a visualização da variabilidade e dos valores médios das observações.

Em seguida, foi utilizada a técnica estatística de Análise de Variância (ANOVA) para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os materiais e entre os dias do experimento.

Ao constatar diferença estatisticamente significativa em qualquer um dos casos, foi aplicado o teste estatístico de Duncan para avaliar as diferenças, ou seja, para se definir quais os grupos se distinguem uns dos outros.

O nível de significância adotado para os testes (ANOVA e Duncan) foi de 5%, o mesmo utilizado para a obtenção dos intervalos de confiança.

4.4 Avaliação microscópica da superfície das pastilhas

As pastilhas dos materiais implantados nos camundongos foram retiradas nos seus devidos tempos e acondicionadas por 6 horas em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de sódio, pH 7,4, e subseqüentemente submetidas a uma desidratação alcoólica e mantidas a 37°C por 24 horas.

As imagens eletromicroscópicas foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a 20,0 KV, usando um equipamento JEOL-JSM-840A, do Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Instituto de Geociências da UFMG e o Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN)

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos compósitos entre polímeros e biocerâmica

Os compósitos obtidos a partir dos polímeros biodegradáveis PLGA e PLA em uma matriz de biocerâmica, adicionando-se ou não TCN, sob pressão constante de 250 Kg/m² durante 5 minutos mostraram-se modeláveis, flexíveis e prontamente hábeis a atender necessidades cirúrgicas para reconstrução óssea em geral.

A formação dos compósitos proporcionou uma melhora da propriedade de friabilidade da biocerâmica, conseqüentemente melhorando as propriedades de manuseio e modelagem do material a frio e a quente.

Torna-se importante mencionar que o compósito endurece depois decorridas algumas horas. Porém, acrescentando-se gotas de diclorometano ao mesmo e macerando-se em gral de ágata, assim como se aquecendo a uma temperatura de aproximadamente 75°C, obtêm-se novamente a consistência citada anteriormente.

5.2 Testes de citotoxicidade

5.2.1 Teste de contato direto - norma ASTM F- 813

A TAB. 1 apresenta os índices de zona afetada (IZ), de lise (IL) e de resposta (IR) produzidos pelo contato dos compósitos com adição de TCN 0,01% e seus controles com as monocamadas celulares, de acordo com a classificação da ASTM (“American Society for Testing and Materials”) (QUADROS 8 e 9, item 4.2.3.1) para o teste de contato direto. Embora os materiais analisados tenham apresentado baixa citotoxicidade, os compósitos contendo o polímero PLGA expressaram um maior grau de toxicidade (IR=1/4) do que os com PLA (IR=1/1).

A BC apresentou-se bastante quebradiça, dissolvendo-se parcialmente, ao entrar em contato com o meio-soro, apresentando um IR=1/3. O PLA também, apresentou um IR=1/3, contudo, o compósito PLA:BC, 25:75, apresentou um IR=1/1, com ou sem a adição de TCN, ou seja, menor que essas substâncias separadamente.

Em relação aos compósitos formados a partir do PLGA, pode-se observar que os mesmos apresentaram um IR=1/4, sendo maior que o da BC (IR=1/3) e igual ao PLGA (IR=1/4) separadamente, com ou sem a adição de TCN. Desse modo, a formação do compósito PLGA:BC não resultou na diminuição da toxicidade do PLGA ou BC, mantendo-se o IR constante.

Em relação à TCN adicionada aos compósitos, pode-se dizer que a mesma, na concentração de 0,01%, não afetou o IR das amostras em teste.

~~A taxa de degradação dos copolímeros de GA e LA é influenciada por fatores que afetam a formação da cadeia polimérica, cristalinidade e hidrofobicidade. Uma vez que a degradação é induzida pela hidrólise, uma estrutura cristalina ou uma composição polimérica hidrofóbica desfavorecem a dissolução e degradação (MOONEY et al., 1995a).~~

~~a presença de um grupo metil extra faz com que o PLA ou d-PLA seja mais hidrofóbico que o PGA. Adicionalmente, a ligação éster do grupo metil no PLA é menos suscetível à hidrólise. Dessa forma, o PLA degrada mais lentamente que o PGA (REED and~~

~~GILDING, 1981 apud (MOONEY et al., 1995a) e tem uma maior solubilidade em solventes orgânicos.~~

~~Enquanto o PGA e PLA são parcialmente cristalinos, o PLGA 50:50 é completamente amorfo. Essas mudanças morfológicas resultam em um aumento nas taxas de hidratação e hidrólise. Dessa forma, os copolímeros tendem a degradar mais rapidamente que o PGA e o PLA (MOONEY et al., 1995a).~~

Em suma, os resultados obtidos a partir desse experimento demonstram que o compósito da biocerâmica associada ao PLA apresentou o menor grau de citotoxicidade (IR=1/1) que quando associada ao PLGA (IR=1/4).

TABELA 1 - Citotoxicidade *in vitro* de compósitos formados pela associação de biocerâmica com diferentes polímeros biodegradáveis; teste de contato direto (ASTM F-813)*

Materiais	IZ	IL	IR	n
Branco	0	0	0/0	3
Polietileno de alta densidade (controle negativo)	0	0	0/0	3
Látex (controle positivo)	2	5	2/5	3
PLA	1	3	1/3	3
PLGA	1	4	1/4	3
BC	1	3	1/3	4
PLA:BC	1	1	1/1	3
PLGA:BC	1	4	1/4	3
PLA:BC + TCN 0,01 %	1	1	1/1	3
PLGA:BC + TCN 0,01 %	1	4	1/4	3

*cultura de fibroblastos linhagem celular de L-929. IZ: índice de zona, IL: índice de lise, IR: índice de resposta, n: tamanho da amostra, PLA: D,L Poli (Ácido Lático), PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50, BC: biocerâmica, TCN: tetraciclina

5.2.2 Teste por eluição - USP XXIII

A TAB. 2 apresenta a avaliação da citotoxicidade dos eluatos dos materiais junto às monocamadas celulares de acordo com a classificação da USP-XXIII (QUADRO 10, item 4.2.3.2). Os eluatos dos compósitos PLA:BC e PLGA:BC, com ou sem TCN 0,01%, e dos polímeros PLA e PLGA, separadamente, apresentaram níveis leves de reatividade (grau 1), uma vez que não mais que 20% das células apresentaram-se arredondadas, frouxamente ligadas e sem grânulos intracitoplasmáticos, com rara lise celular. Entretanto, a BC apresentou uma reatividade moderada ao teste, com 70% da camada celular contendo células arredondadas e/ou que sofreram lise.

TABELA 2 – Citotoxicidade *in vitro* de compósitos formados pela associação de biocerâmica com diferentes polímeros biodegradáveis; teste de eluição (USP- XXIII)*

Material	Grau de reatividade	n
Polietileno de alta densidade (controle negativo)	0	3
Látex (controle positivo)	3	3
PLA	1	3
PLGA	1	3
BC	3	3
PLA :BC	1	3
PLGA:BC	1	3
PLA :BC + TCN 0,01 %	1	3
PLGA:BC + TCN 0,01 %	1	3

*cultura de fibroblastos linhagem celular de L-929. n: tamanho da amostra, PLA: D,L Poli (Ácido Lático), PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50, BC: biocerâmica; TCN: tetraciclina

5.3 Testes de biocompatibilidade *in vivo*

5.3.1 Análise descritiva semiquantitativa e análise estatística

Para os testes de biocompatibilidade, foram analisados os cortes histológicos de pele de camundongos.

Para realização das análises estatísticas, foi realizada uma contagem semiquantitativa do número de células inflamatórias presentes nos tecidos retirados dos camundongos sobre toda a área que estava em contato com as pastilhas. Essa contagem foi realizada por meio de um retículo acoplado à lente do microscópio. Dessa forma, foram aplicados os testes ANOVA e Duncan (item 4.3.6).

Para facilitar a análise dos dados, atribuíram-se siglas aos grupos, sendo:

N1	= PLGA:BC
N2	= PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p
N3	= PLA:BC
N4	= PLA:BC + TCN 0,1 % p/p
C1	= PLGA
C2	= PLA
BC	= Biocerâmica
A	= Animal apenas incisionado
X	= Animal hígido

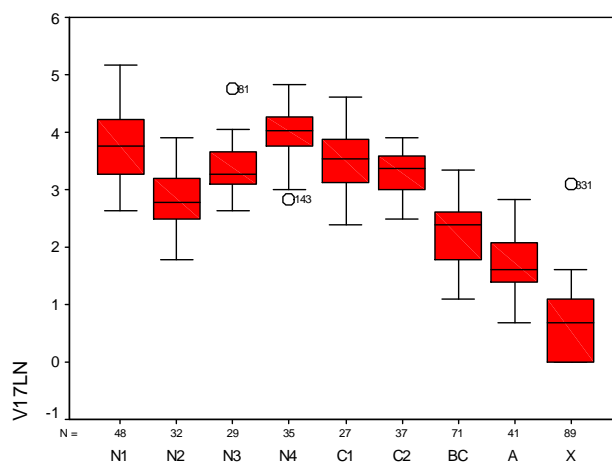
TABELA 3 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 1 dia após a implantação dos materiais

DIA 1							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
N1	48	50,0208	32,6728	40,5336	59,508	13	177
N2	32	17,875	10,1846	14,2031	21,5469	5	48
N3	29	31,8621	19,0876	24,6015	39,1226	13	114
N4	35	56,5143	24,8008	47,9949	65,0337	16	123
C1	27	37,4815	21,4339	29,0025	45,9605	10	100
C2	37	26,8919	10,7025	23,3235	30,4603	11	48
BC	71	9,5211	5,1765	8,2959	10,7464	2	27
A	41	5	3,6606	3,8446	6,1554	1	16
X	89	1,1798	2,304	0,6944	1,6651	0	21
Total	409	21,6822	24,9998	19,2521	24,1122	0	177

ANOVA: p-valor = 0,0000
Duncan:

N1	= PLGA:BC
N2	= PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p
N3	= PLA:BC
N4	= PLA:BC + TCN 0,1 % p/p
C1	= PLGA
C2	= PLA
BC	= Biocerâmica
A	= Animal apenas incisionado
X	= Animal hígido

X	A	BC	N2	C2	N3	C1	N1	N4
■								
	■							
		■						
			■					
				■	■			
					■	■		
							■	■



DIA 1_MATERIAL

GRÁFICO 3 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 1 dia após a implantação dos materiais

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os materiais no dia 1.

O teste de Duncan indica os seguintes grupos estatisticamente semelhantes e em ordem crescente de número de células inflamatórias:

- **X**
- **A**
- **BC**
- **N2**
- **C2 e N3**
- **N3 C1**
- **N1 e N4**

Os grupos **N1** e **N4** são os que apresentam maior média e maior variabilidade. O grupo **BC** é o que apresenta média e variabilidade mais próxima aos controles **X** e **A**, que além das menores médias, são os grupos que apresentam menor variabilidade.

TABELA 4– Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 7 dias após a implantação dos materiais

DIA 7							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
N1	25	12,44	4,2139	10,7006	14,1794	5	20
N2	36	8,25	5,739	6,3082	10,1918	1	27
N3	25	4,76	1,7861	4,0228	5,4972	2	8
N4	38	5,9737	3,7596	4,7379	7,2094	2	20
C1	39	5,5897	2,633	4,7362	6,4433	1	13
C2	22	7,3636	3,9587	5,6085	9,1188	4	16
BC	31	4,4194	3,2329	3,2335	5,6052	0	14
A	26	4,2692	2,8222	3,1293	5,4091	0	14
X	89	1,1798	2,304	0,6944	1,6651	0	21
Total	331	5,0967	4,6086	4,5984	5,595	0	27

N1	= PLGA:BC
N2	= PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p
N3	= PLA:BC
N4	= PLA:BC + TCN 0,1 % p/p
C1	= PLGA
C2	= PLA
BC	= Biocerâmica
A	= Animal apenas incisionado
X	= Animal hígido

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

X	A	BC	N3	C1	N4	C2	N2	N1

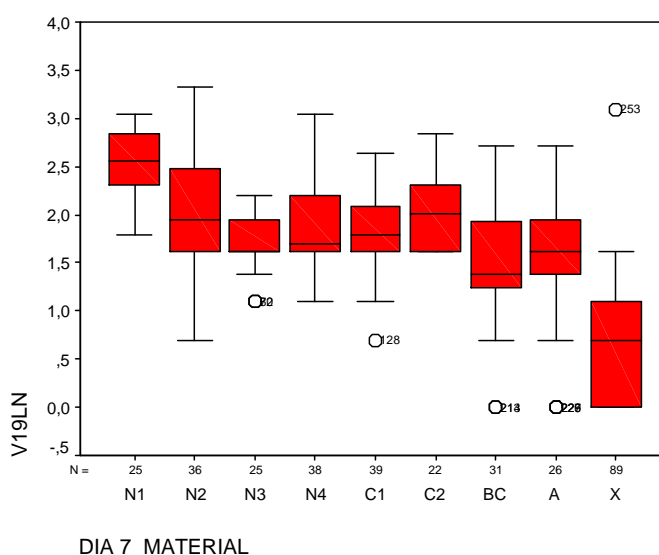


GRÁFICO 4 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 7 dias após a implantação dos materiais

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os materiais no dia 7.

O teste de Duncan indica os seguintes grupos estatisticamente semelhantes e em ordem crescente de número de células inflamatórias:

- **A, BC e N3**
- **N3, C1 e N4**
- **C1, N4, C2 e N2**
- **N1**

As médias dos grupos observados se encontram próximas, o que justifica o pequeno número de grupos indicados pelo teste de Duncan, assim como vários materiais considerados estatisticamente semelhantes. A variabilidade dos grupos também é semelhante. Entretanto, ao se comparar os compósitos entre si, os formados a partir do PLA (**N3** e **N4**) apresentaram menor média e menor variabilidade do que os formados com PLGA (**N1** e **N2**). Ao se avaliar a influência da tetraciclina, verifica-se que o grupo PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p (**N2**) apresentou menor média que o mesmo compósito sem TCN (**N1**). A recíproca é verdadeira para os compósito PLA:BC (**N3**) e PLA:BC + TCN 0,1 % p/p (**N4**).

TABELA 5 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 13 dias após a implantação dos materiais

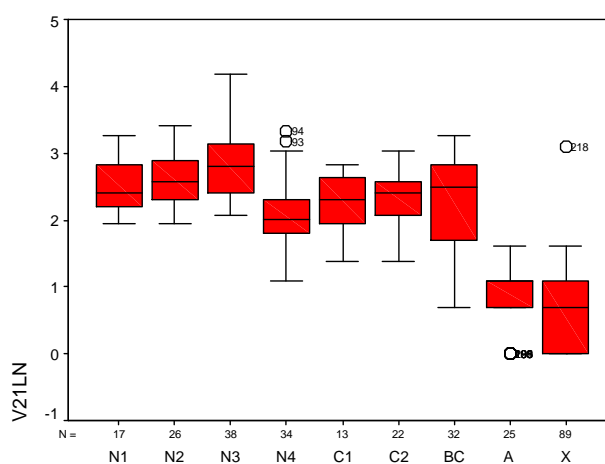
DIA 13							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
N1	17	12,5294	5,9804	9,4546	15,6042	6	25
N2	26	13,7308	5,9435	11,3302	16,1314	6	29
N3	38	19,2368	13,3182	14,8593	23,6144	7	65
N4	34	8,3824	5,5923	6,4311	10,3336	2	27
C1	13	9,8462	4,2982	7,2488	12,4435	3	16
C2	22	10	4,2088	8,1339	11,8661	3	20
BC	32	10,5938	6,5838	8,2201	12,9674	1	25
A	25	1,64	1,186	1,1504	2,1296	0	4
X	89	1,1798	2,304	0,6944	1,6651	0	21
Total	296	8,1723	8,8268	7,1626	9,182	0	65

N1	= PLGA:BC
N2	= PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p
N3	= PLA:BC
N4	= PLA:BC + TCN 0,1 % p/p
C1	= PLGA
C2	= PLA
BC	= Biocerâmica
A	= Animal apenas incisionado
X	= Animal hígido

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

X	A	N4	BC	C1	C2	N1	N2	N3



DIA 13_MATERIAL

GRÁFICO 5 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 13 dias após a implantação dos materiais

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os materiais no dia 13.

O teste de Duncan indica os seguintes grupos estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **A**
- **N4, BC, C1 e C2**
- **BC, C1, C2 e N1**
- **C1, C2 , N1 e N2**
- **N2 e N3**

Com exceção dos grupos controle **A e X**, que apresentam menor média e variabilidade, as médias dos grupos são semelhantes o que é mostrado pelo grande número de materiais estatisticamente semelhantes no que diz respeito ao número de células inflamatórias observadas. Entretanto, o grupo do compósito formado por PLA e TCN (**N4** - PLA:BC + TCN 0,1 % p/p) apresentou menor média e variabilidade que os demais compósitos.

TABELA 6 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 21 dias após a implantação dos materiais

DIA 21							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
N1	36	4,25	1,8264	3,632	4,868	0	8
N2	27	2,963	1,0554	2,5454	3,3805	1	6
N3	39	4	1,556	3,4956	4,5044	2	8
N4	31	3,2903	1,1013	2,8864	3,6943	1	5
C1	55	9,6	8,6935	7,2498	11,9502	2	45
C2	25	8,96	5,5112	6,6851	11,2349	2	23
BC	21	1,3333	1,1972	0,7884	1,8783	0	4
X	89	1,1798	2,304	0,6944	1,6651	0	21
Total	323	4,2601	5,2284	3,6877	4,8324	0	45

N1	= PLGA:BC
N2	= PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p
N3	= PLA:BC
N4	= PLA:BC + TCN 0,1 % p/p
C1	= PLGA
C2	= PLA
BC	= Biocerâmica
A	= Animal apenas incisionado
X	= Animal hígido

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

X	BC	N2	N4	N3	N1	C1	C2

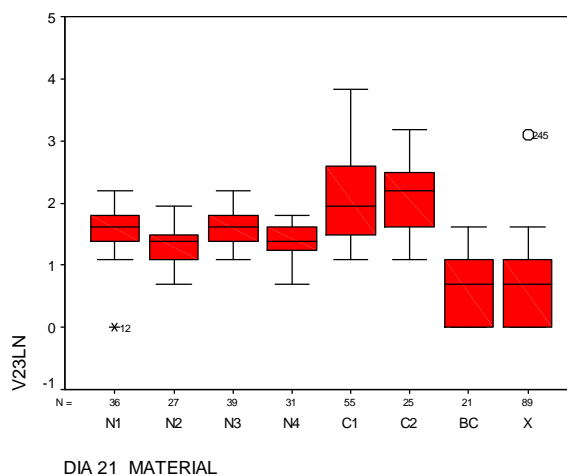


GRÁFICO 6 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 21 dias após a implantação dos materiais

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os materiais no dia 21.

O teste de Duncan indica os seguintes grupos estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **BC**
- **N2, N4, N3 e N1**
- **C1 e C2**

Nesse tempo, verifica-se a regularização da resposta inflamatória causada pelos compósitos representados pelos grupos **N1, N2, N3 e N4**, denotando não haver influência do tipo de polímero utilizado e tampouco da adição de TCN. As baixas médias e variabilidades dos grupos **N1, N2, N3 e N4** estão próximas aos controles **BC** e **X**.

TABELA 7– Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 28 dias após a implantação dos materiais

DIA 28							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
N1	41	4,1463	1,7257	3,6016	4,691	1	9
N2	40	6,225	4,87	4,6675	7,7825	0	22
N3	39	5,0769	4,0353	3,7688	6,385	1	23
N4	40	2,625	1,2545	2,2238	3,0262	0	7
C1	29	5,2069	4,2542	3,5887	6,8251	2	19
C2	48	5,4375	4,8109	4,0406	6,8344	1	25
BC	40	1,25	1,1929	0,8685	1,6315	0	4
X	89	1,1798	2,304	0,6944	1,6651	0	21
Total	366	3,5219	3,7851	3,1328	3,9109	0	25

N1	= PLGA:BC
N2	= PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p
N3	= PLA:BC
N4	= PLA:BC + TCN 0,1 % p/p
C1	= PLGA
C2	= PLA
BC	= Biocerâmica
A	= Animal apenas incisionado
X	= Animal hígido

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

X	BC	N4	N1	C1	C2	N3	N2

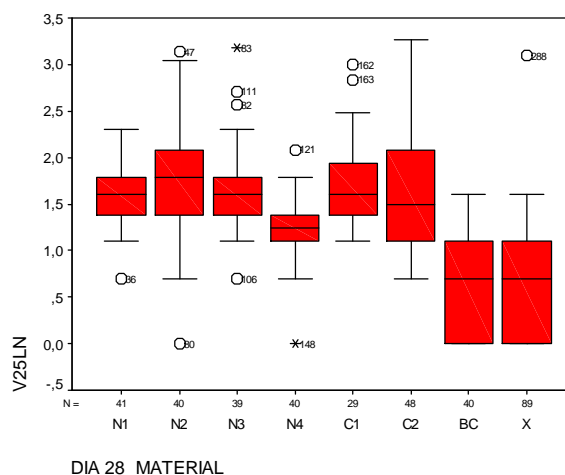


GRÁFICO 7 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 28 dias após a implantação dos materiais

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os materiais no dia 28.

O teste de Duncan indica os seguintes grupos estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **BC**
- **N4**
- **N1, C1, C2, N3, N2**

Neste tempo, observa-se a nítida influência do polímero PLA, assim como a adição de TCN, o que fez com que o grupo **N4** apresentasse menor média e variabilidade que os demais compósitos. O grupo do controle **BC** apresentou média e variabilidade semelhante ao também controle **X**.

TABELA 8 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos 56 dias após a implantação dos materiais

DIA 56							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
N1	41	1,1463	1,2361	0,7562	1,5365	0	4
N2	48	2,5625	2,3055	1,8931	3,2319	0	10
N3	43	3,0698	1,7237	2,5393	3,6002	0	8
N4	55	4,5091	4,0317	3,4192	5,599	0	20
C2	30	2,3333	1,5162	1,7672	2,8995	0	6
X	89	1,1798	2,304	0,6944	1,6651	0	21
Total	306	2,3693	2,7516	2,0598	2,6788	0	21

N1	= PLGA:BC
N2	= PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p
N3	= PLA:BC
N4	= PLA:BC + TCN 0,1 % p/p
C1	= PLGA
C2	= PLA
BC	= Biocerâmica
A	= Animal apenas incisionado
X	= Animal hígido

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

X	N1	N2	C2	N3	N4

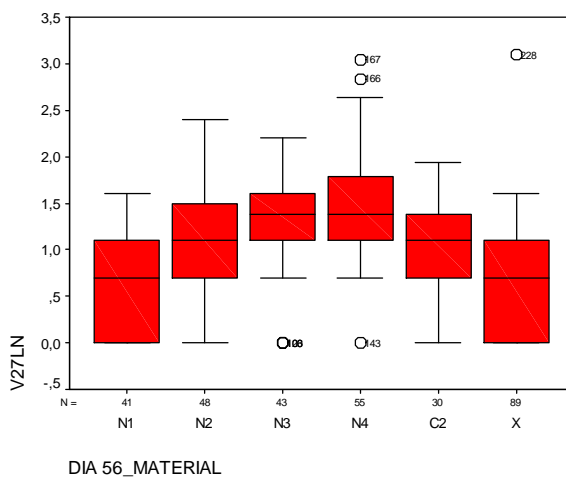


GRÁFICO 8 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos 56 dias após a implantação dos materiais

Neste tempo, apesar de o **p-valor = 0,000** indicar que existe diferença estatisticamente significativa entre os materiais, as médias e variabilidades dos materiais são muito baixas para serem associadas a uma resposta inflamatória. Portanto, não se aplicou, nesse caso, as diferenças estatísticas do rígido teste de Duncan.

Devido às reconhecidas propriedades biológicas do controle biocerâmica, decidiu-se não haver necessidade de incluí-lo neste grupo.

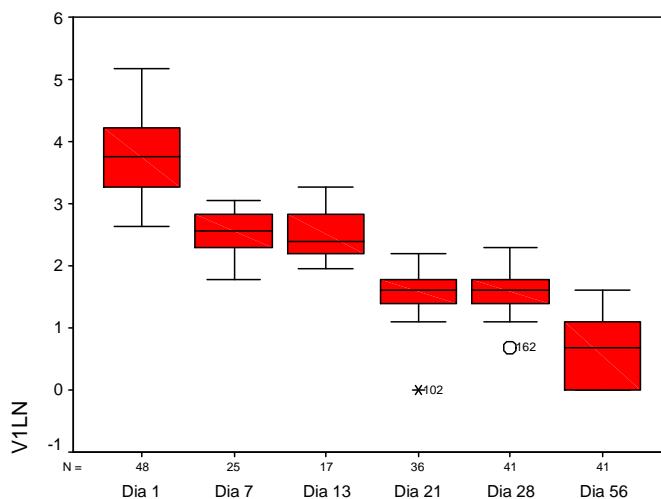
TABELA 9 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLGA:BC em diferentes tempos

N1							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Dia 1	48	50,0208	32,6728	40,5336	59,508	13	177
Dia 7	25	12,44	4,2139	10,7006	14,1794	5	20
Dia 13	17	12,5294	5,9804	9,4546	15,6042	6	25
Dia 21	36	4,25	1,8264	3,632	4,868	0	8
Dia 28	41	4,1463	1,7257	3,6016	4,691	1	9
Dia 56	41	1,1463	1,2361	0,7562	1,5365	0	4
Total	208	15,8413	24,8004	12,4512	19,2315	0	177

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

Dia 56	Dia 28	Dia 21	Dia 13	Dia 7	Dia 1



N1_DIA

GRÁFICO 9 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLGA:BC em diferentes tempos

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os dias para os animais que receberam **N1**.

O teste de Duncan indica os seguintes dias estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **Dia 56**
- **Dias 28 e 21**
- **Dias 13 e 7**
- **Dia 1**

O Dia 1 apresenta número médio de células inflamatórias consideravelmente superior aos demais. Como era de se esperar, este número vai diminuindo com o tempo. A variabilidade também diminui com o passar dos dias.

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os dias 7 e 13, não havendo diminuição do número de células inflamatórias. O 13º dia corresponde ao o tempo necessário para o aparecimento de linfócitos e desenvolvimento de reatividade imunológica adaptativa, que depois se regula a partir do Dia 21.

TABELA 10 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p em diferentes tempos

N2							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Dia 1	32	17,875	10,1846	14,2031	21,5469	5	48
Dia 7	36	8,25	5,739	6,3082	10,1918	1	27
Dia 13	26	13,7308	5,9435	11,3302	16,1314	6	29
Dia 21	27	2,963	1,0554	2,5454	3,3805	1	6
Dia 28	40	6,225	4,87	4,6675	7,7825	0	22
Dia 56	48	2,5625	2,3055	1,8931	3,2319	0	10
Total	209	8,0287	7,8022	6,9647	9,0927	0	48

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

Dia 56	Dia 21	Dia 28	Dia 7	Dia 13	Dia 1

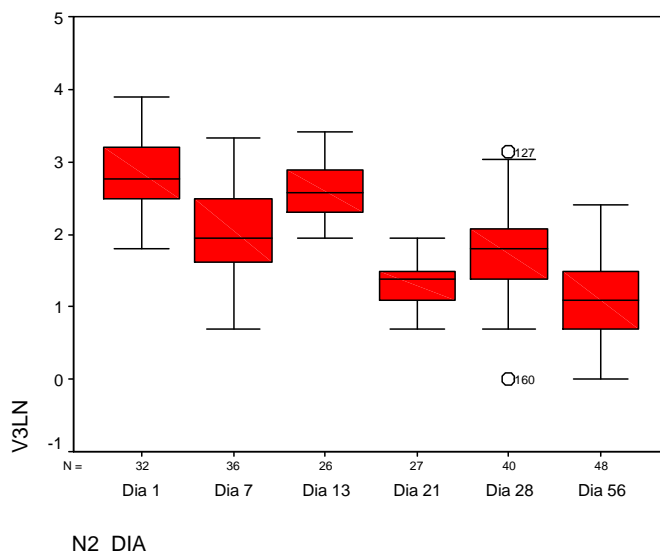


GRÁFICO 10 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLGA:BC + TCN 0,1 % p/p em diferentes tempos

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os dias para os animais que receberam **N2**.

O teste de Duncan indica os seguintes dias estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **Dia 56**
- **Dia 21**
- **Dias 28 e 7**
- **Dias 13 e 1**

Os Dias 1 e 13 apresentaram os maiores números médios de células inflamatórias e o Dia 56 apresentou a menor média. A variabilidade é grande no Dia 1, diminuindo para os demais dias.

Ao Dia 13, observa-se um pico de celularidade. Esse também é o tempo necessário para o aparecimento de linfócitos e desenvolvimento de reatividade imunológica adaptativa, que depois se regula a partir do Dia 21.

TABELA 11 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLA:BC em diferentes tempos

N3							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Dia 1	29	31,8621	19,0876	24,6015	39,1226	13	114
Dia 7	25	4,76	1,7861	4,0228	5,4972	2	8
Dia 13	38	19,2368	13,3182	14,8593	23,6144	7	65
Dia 21	39	4	1,556	3,4956	4,5044	2	8
Dia 28	39	5,0769	4,0353	3,7688	6,385	1	23
Dia 56	43	3,0698	1,7237	2,5393	3,6002	0	8
Total	213	10,6103	13,7018	8,7597	12,461	0	114

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

Dia 56	Dia 21	Dia 28	Dia 7	Dia 13	Dia 1

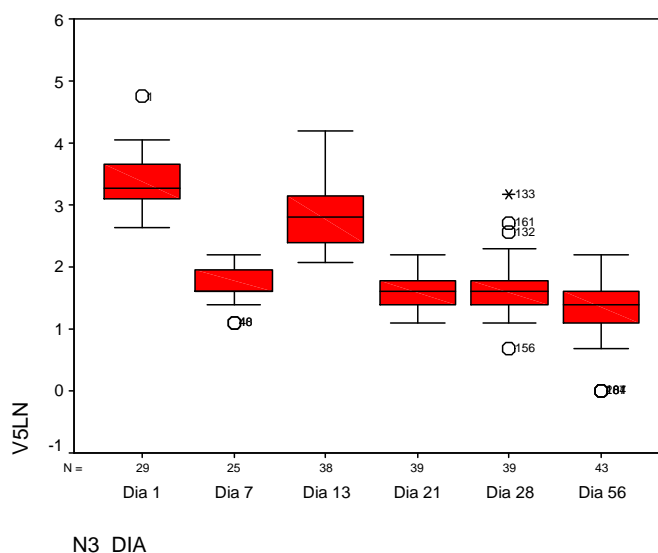


GRÁFICO 11 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLA:BC em diferentes tempos

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os dias para os animais que receberam **N3**.

O teste de Duncan indica os seguintes dias estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **Dia 56**
- **Dias 21, 28 e 7**
- **Dia 13**
- **Dia 1**

Os Dias 1 e 13 apresentaram os maiores números médios de células inflamatórias e o Dia 56 apresentou a menor média. A variabilidade é maior nos Dias 1 e 13, diminuindo para os demais dias.

Ao Dia 13, observa-se um pico de celularidade. Esse também é o tempo necessário para o aparecimento de linfócitos e desenvolvimento de reatividade imunológica adaptativa, que depois se regula a partir do Dia 21.

TABELA 12 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLA:BC + TCN 0,1 % p/p em diferentes tempos

N4							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Dia 1	35	56,5143	24,8008	47,9949	65,0337	16	123
Dia 7	38	5,9737	3,7596	4,7379	7,2094	2	20
Dia 13	34	8,3824	5,5923	6,4311	10,3336	2	27
Dia 21	31	3,2903	1,1013	2,8864	3,6943	1	5
Dia 28	40	2,625	1,2545	2,2238	3,0262	0	7
Dia 56	55	4,5091	4,0317	3,4192	5,599	0	20
Total	233	12,6395	21,1195	9,9135	15,3655	0	123

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

Dia 28	Dia 21	Dia 56	Dia 7	Dia 13	Dia 1

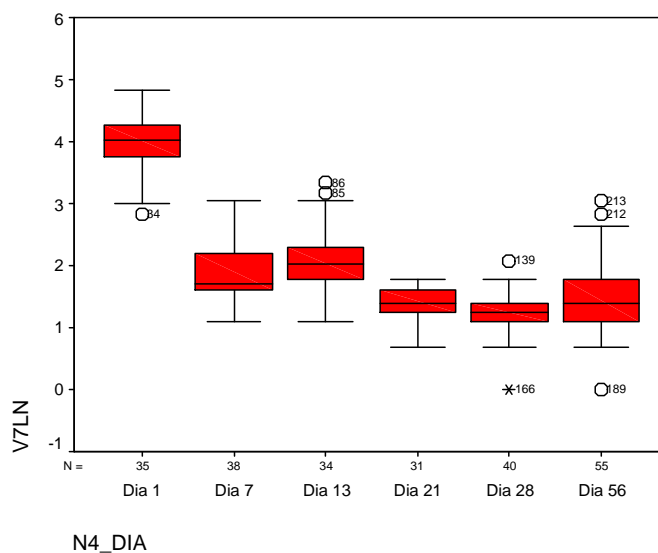


GRÁFICO 12 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao compósito PLA:BC + TCN 0,1 % p/p em diferentes tempos

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os dias para os animais que receberam **N4**.

O teste de Duncan indica os seguintes dias estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **Dias 28 e 21**
- **Dias 21 e 56**
- **Dia 7**
- **Dia 13**
- **Dia 1**

O Dia 1 apresenta número médio de células inflamatórias consideravelmente superior aos demais, além de uma variância também elevada. Apesar de a menor média de células inflamatórias ser no dia 28, as médias dos dias 21, 28 e 56 são bastante próximas, não se aplicando, nesse caso, as diferenças estatísticas do rígido teste de Duncan.

Ao Dia 13, observa-se um pico de celularidade. Esse também é o tempo necessário para o aparecimento de linfócitos e desenvolvimento de reatividade imunológica adaptativa, que depois se regula a partir do Dia 21.

TABELA 13 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao polímero PLGA em diferentes tempos

C1							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Dia 1	27	37,4815	21,4339	29,0025	45,9605	10	100
Dia 7	39	5,5897	2,633	4,7362	6,4433	1	13
Dia 13	13	9,8462	4,2982	7,2488	12,4435	3	16
Dia 21	55	9,6	8,6935	7,2498	11,9502	2	45
Dia 28	29	5,2069	4,2542	3,5887	6,8251	2	19
Total	163	12,4969	15,2807	10,1334	14,8604	1	100

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

Dia 28	Dia 7	Dia 21	Dia 13	Dia 1

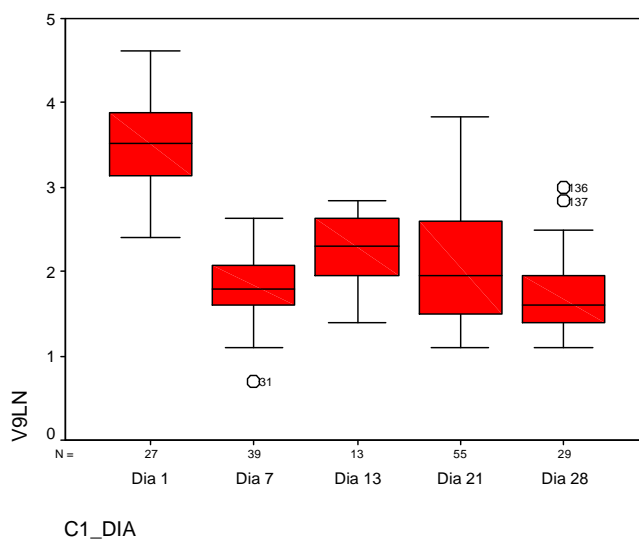


GRÁFICO 13 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao polímero PLGA em diferentes tempos

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os dias para os animais que receberam **C1**.

O teste de Duncan indica os seguintes dias estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **Dias 28 e 7**
- **Dias 7 e 21**
- **Dias 21 e 13**
- **Dia 1**

O Dia 1 apresenta número médio de células inflamatórias consideravelmente superior aos demais, além de uma variância também elevada.

Ao Dia 13, observa-se um aumento da celularidade quando comparado ao Dia 7. Esse também é o tempo necessário para o aparecimento de linfócitos e desenvolvimento de reatividade imunológica adaptativa, que depois se regula.

Ao Dia 56, as pastilhas desse grupo já haviam sido hidrolisadas, não sendo possível realizar análise estatística. Desse forma, o Dia 28 apresentou a menor média.

TABELA 14 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos ao polímero PLA em diferentes tempos

C 2							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Dia 1	37	26,8919	10,7025	23,3235	30,4603	11	48
Dia 7	22	7,3636	3,9587	5,6085	9,1188	4	16
Dia 13	22	10	4,2088	8,1339	11,8661	3	20
Dia 21	25	8,96	5,5112	6,6851	11,2349	2	23
Dia 28	48	5,4375	4,8109	4,0406	6,8344	1	25
Dia 56	30	2,3333	1,5162	1,7672	2,8995	0	6
Total	184	10,5	10,4964	8,9733	12,0267	0	48

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

Dia 56	Dia 28	Dia 7	Dia 21	Dia 13	Dia 1

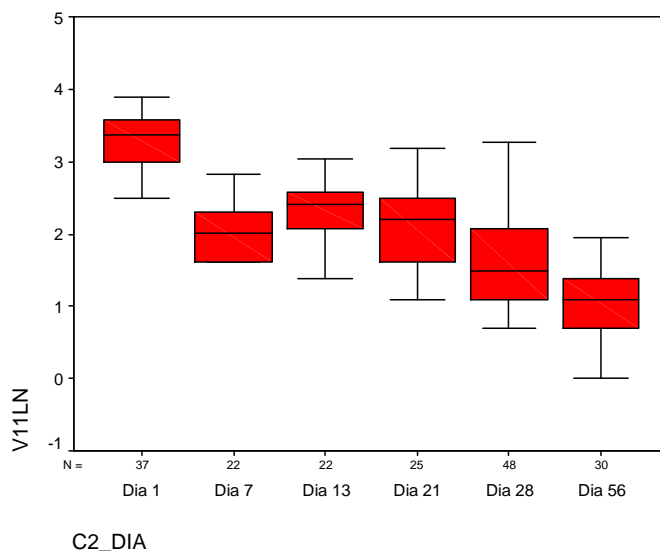


GRÁFICO 14 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos ao polímero PLA em diferentes tempos

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os dias para os animais que receberam **C2**.

O teste de Duncan indica os seguintes dias estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **Dia 56**
- **Dia 28**
- **Dias 7 e 21**
- **Dias 21 e 13**
- **Dia 1**

O Dia 1 apresenta número médio de células inflamatórias consideravelmente superior aos demais, além de uma variância também elevada, contrapondo-se ao Dia 56, que apresentou menor média e menor variabilidade que os demais tempos.

Ao Dia 13, observa-se um aumento da celularidade quando comparado ao Dia 7. Esse também é o tempo necessário para o aparecimento de linfócitos e desenvolvimento de reatividade imunológica adaptativa, que depois se regula.

TABELA 15 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos à biocerâmica em diferentes tempos

BC							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Dia 1	71	9,5211	5,1765	8,2959	10,7464	2	27
Dia 7	31	4,4194	3,2329	3,2335	5,6052	0	14
Dia 13	32	10,5938	6,5838	8,2201	12,9674	1	25
Dia 21	21	1,3333	1,1972	0,7884	1,8783	0	4
Dia 28	40	1,25	1,1929	0,8685	1,6315	0	4
Total	195	6,3077	5,829	5,4844	7,131	0	27

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

Dia 28	Dia 21	Dia 7	Dia 1	Dia 13

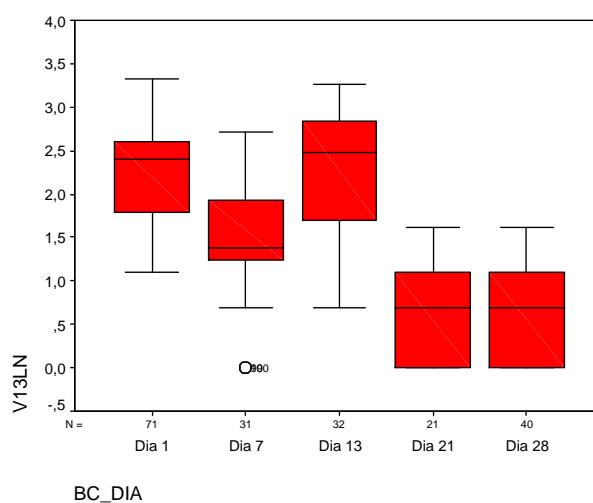


GRÁFICO 15 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos à biocerâmica em diferentes tempos

O **p-valor = 0,000** indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os dias para os animais que receberam **BC**.

O teste de Duncan indica os seguintes dias estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **Dias 28 e 21**
- **Dia 7**
- **Dias 1 e 13**

Os Dias 1 e 13 apresenta número médio de células inflamatórias superior aos demais, além de uma variância também elevada.

Ao Dia 13, observa-se um pico de celularidade. Esse também é o tempo necessário para o aparecimento de linfócitos e desenvolvimento de reatividade imunológica adaptativa, que depois se regula a partir do Dia 21.

TABELA 16 – Análise descritiva da resposta inflamatória dos camundongos em diferentes tempos submetidos somente à incisão inicial

A							
	N	Média	Desvio Padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Dia 1	41	5	3,6606	3,8446	6,1554	1	16
Dia 7	26	4,2692	2,8222	3,1293	5,4091	0	14
Dia 13	25	1,64	1,186	1,1504	2,1296	0	4
Total	92	3,8804	3,2305	3,2114	4,5495	0	16

ANOVA: p-valor = 0,00000

Duncan:

Dia 13	Dia 7	Dia 1

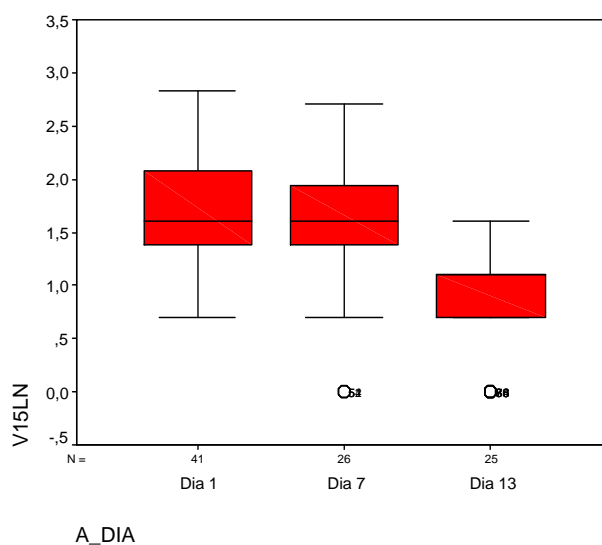


GRÁFICO 16 - Variabilidade e valores médios da resposta inflamatória dos camundongos em diferentes tempos submetidos somente à incisão inicial

O p-valor = 0,000 indica que existe diferença estatisticamente significativa entre os dias para os animais que não receberam nenhum tipo de material.

O teste de Duncan indica os seguintes dias estatisticamente semelhantes e em ordem decrescente de número de células inflamatórias:

- **Dia 13**
- **Dias 7 e 1**

O Dia 13 apresenta o menor número médio de células inflamatórias e menor variabilidade.

5.3.2 Análise histológica por imagens de microscopia ótica

Como controle, foram confeccionadas lâminas de cortes histológicos de tecido subcutâneo de camundongos hígidos e apenas incisionados nos dias 1, 7 e 14 (FIG. 4).

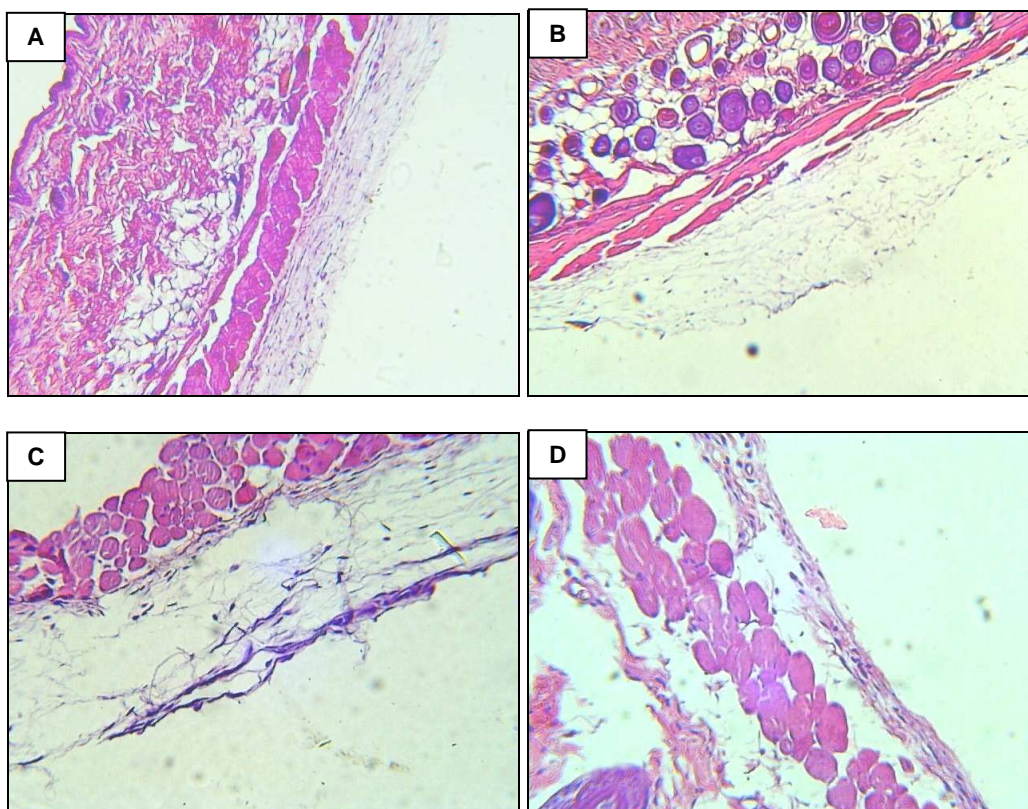


FIGURA 4 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo: A) hígido, 40x, B) 1 dia após cirurgia, 40x, C) 7 dias após cirurgia, 100x e D) 14 dias dia após cirurgia 100x. Hematoxilina-eosina

Com relação à resposta inflamatória, as imagens dos cortes histológicos do 1º dia após implantação sugerem respostas inflamatórias variadas: inflamação aguda (FIG. 5), inflamação aguda localizada (FIG. 6 e 7), inflamação moderada (FIG. 8) e inflamação leve (FIG. 7 e 9), com predomínio de neutrófilos polimorfonucleares. A FIG. 7 ilustra um neutrófilo em processo de diapedese. Observou-se congestão vascular na maioria dos cortes (FIG. 6).

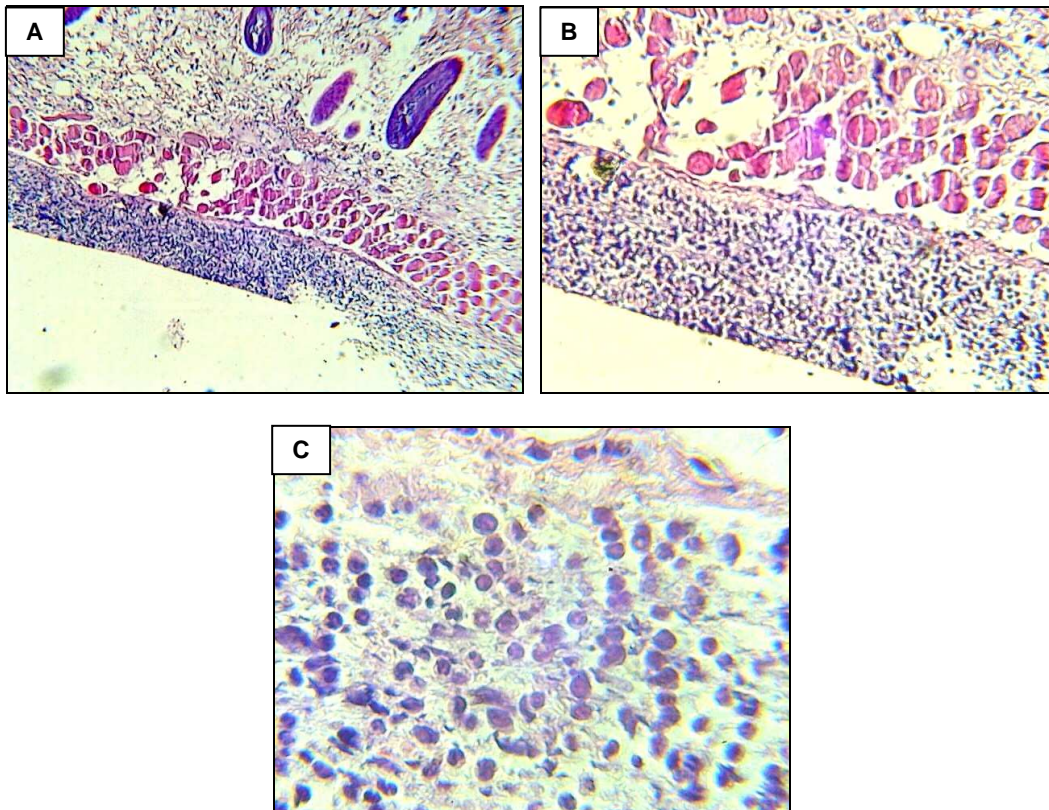


FIGURA 5 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação da pastilha de PLA:BC + TCN 0,1%. Infiltrado inflamatório intenso localizado. A) 40x. B)100x. C) Predomínio de neutrófilos polimorfonucleares. 400x. Hematoxilina-eosina.

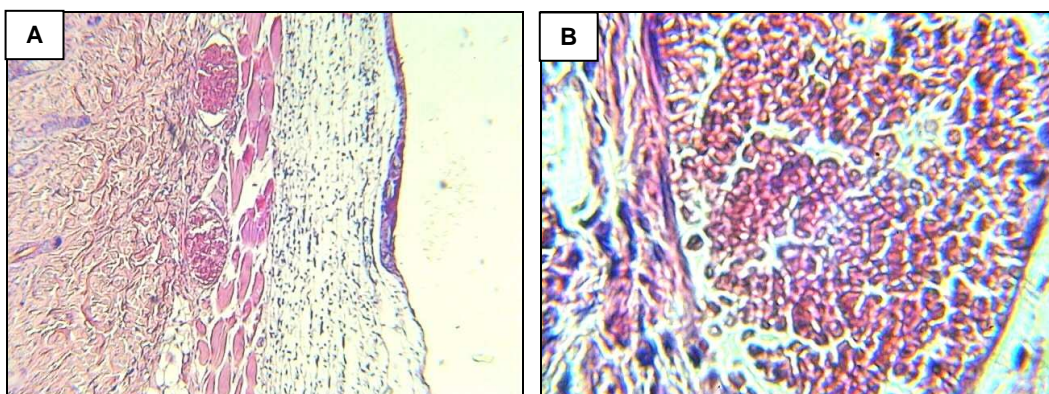


FIGURA 6 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação da pastilha de PLA. A) Infiltrado inflamatório intenso localizado, vasos hiperemiados e deposição de tecido fibroso. B) Vaso hiperemiado. A) 40x e B)100x. Hematoxilina-eosina.

B

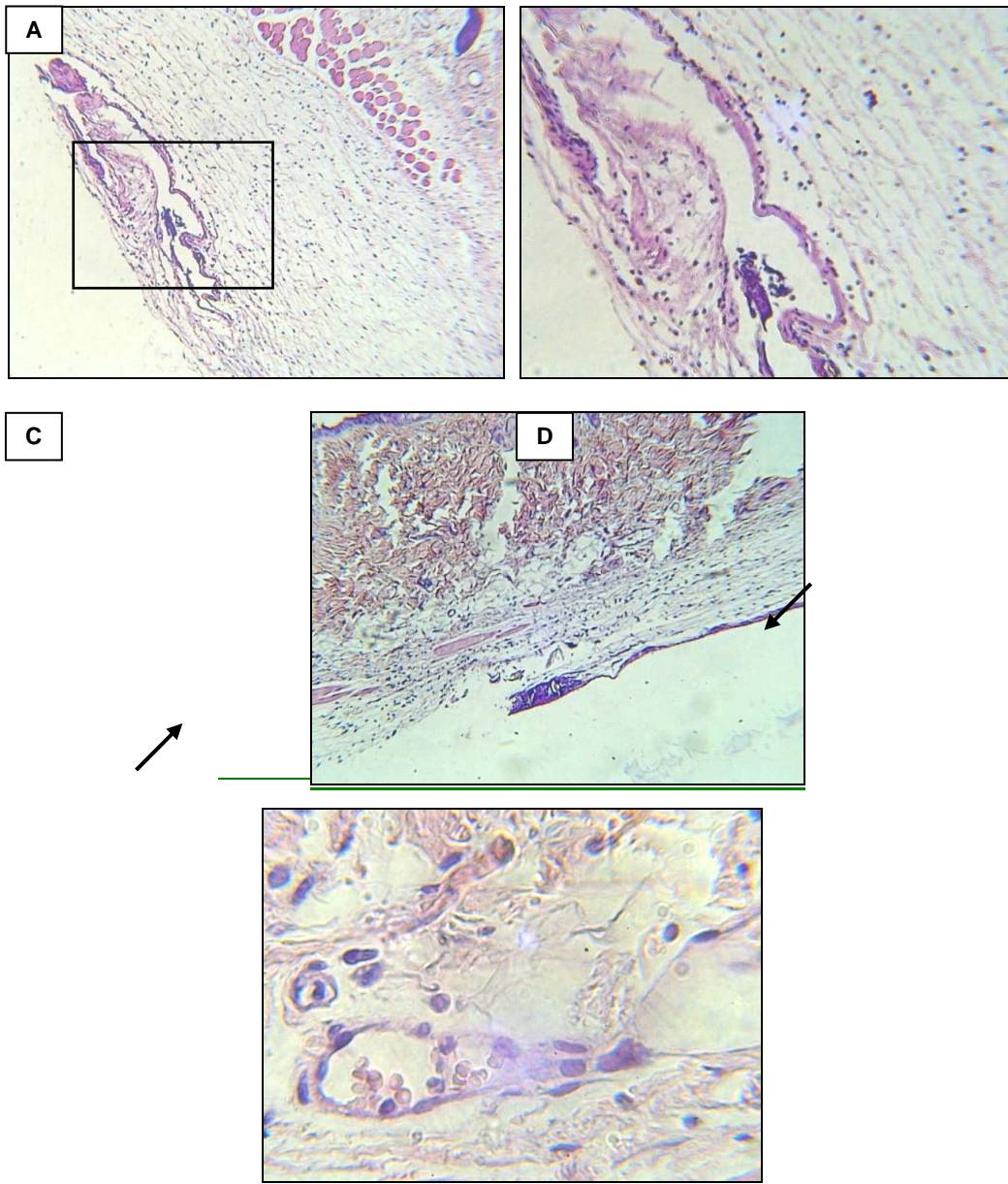


FIGURA 7 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação de pastilhas do compósito PLGA:BC. A) e B) Infiltrado inflamatório leve e deposição de tecido fibroso. C) Infiltrado inflamatório intenso localizado, vasos hiperemiados e deposição de tecido fibroso. Região onde a pastilha foi removida (seta). D) Neutrófilo em processo de diapedese (seta). A) 40x, B) 100x, C) 40x e D) 400x. Hematoxilina-eosina

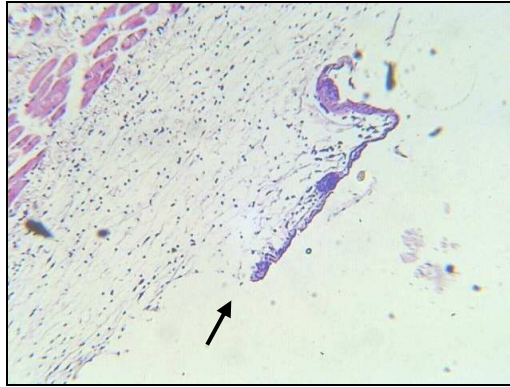


FIGURA 8 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação da pastilha do compósito PLA:BC. A) Infiltrado inflamatório moderado e deposição de tecido fibroso. Região onde a pastilha foi removida (seta), 40x. Hematoxilina-eosina

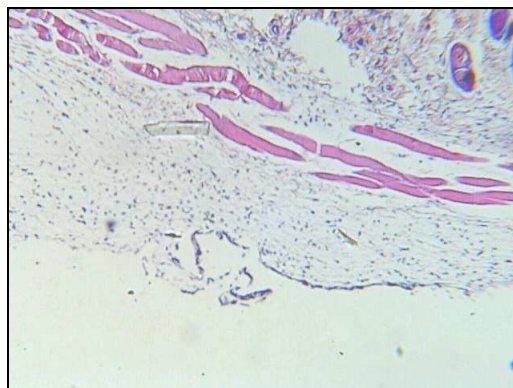


FIGURA 9 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 1 dia após implantação de pastilha de biocerâmica. Infiltrado inflamatório leve e pequena deposição de tecido fibroso. 40x. Hematoxilina-eosina

A partir do 7^o dia (FIG. 10), observou-se um predomínio de leucócitos monucleares e macrófagos, já com diminuição da média de células inflamatórias

mensuradas por campo (item 5.3.1). A hiperemia continuou presente nos tecidos analisados. Também a partir do 7º dia, foi possível observar na maioria dos cortes um aumento no número de fibroblastos e deposição de tecido fibroso ao redor das pastilhas implantadas (FIG. 11, 12, 13 e 14).

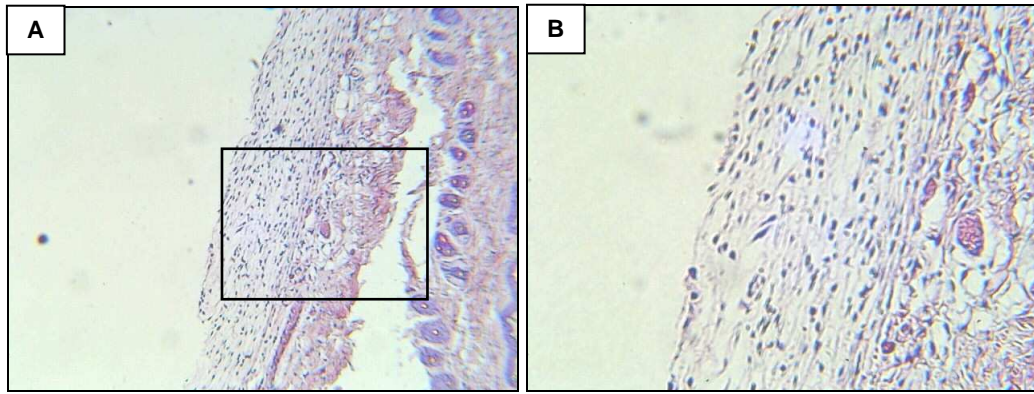


FIGURA 10 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 7 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC. Infiltrado inflamatório leve e vasos hiperemiados. A) 40x e B)100x. Hematoxilina-eosina

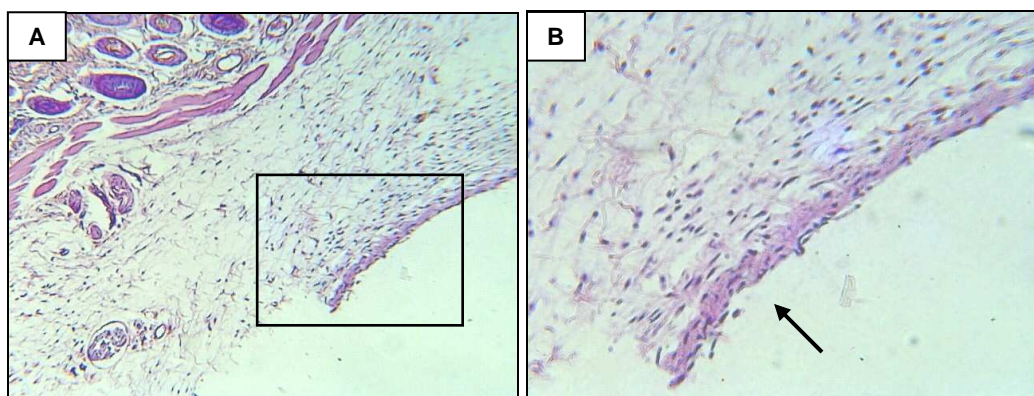


FIGURA 11 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 7 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC + TCN 0,1%. Infiltrado inflamatório leve e vasos hiperemiados. Aumento no número de fibroblastos e deposição de tecido fibroso (seta). A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina

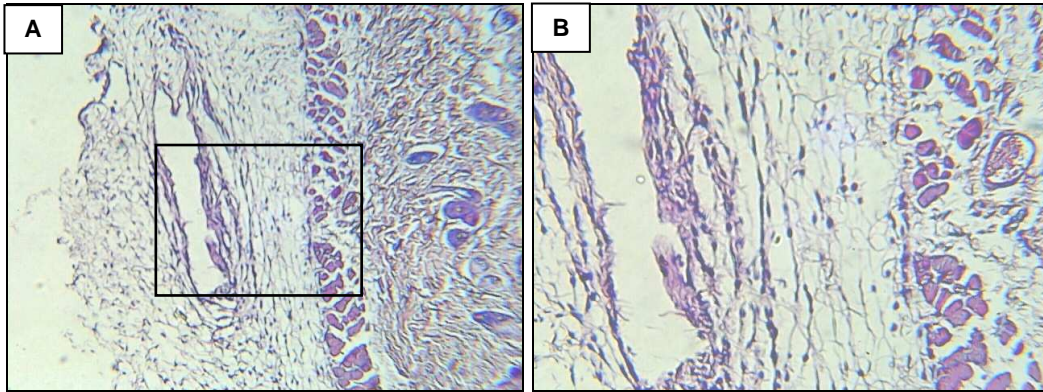


FIGURA 12 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 13 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC. Poucas células inflamatórias e deposição de tecido fibroso. A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina



FIGURA 13 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 13 dias após implantação da pastilha de PLA:BC. Poucas células inflamatórias e grande número de fibroblastos. 40x. Hematoxilina-eosina

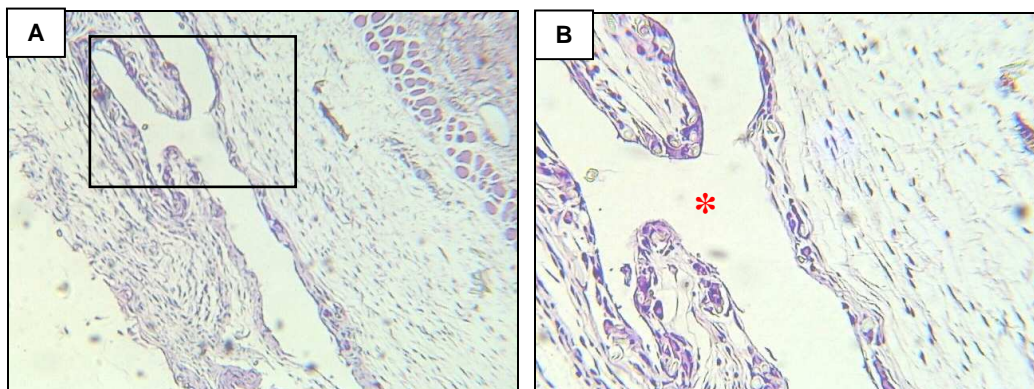


FIGURA 14 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 13 dias após implantação da pastilha de PLA:BC + TCN 0,1%. Poucas células inflamatórias e grande número de fibroblastos. * Imagem negativa da pastilha. A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina

Aos 21 dias, observou-se o acúmulo de poucas células inflamatórias (FIG. 15), apesar de sinais de hemorragia (FIG. 16). A partir deste tempo, os tecidos analisados apresentaram um padrão de organização tecidual próximo da normalidade (FIG. 15, 16, 17, 18 e 19).

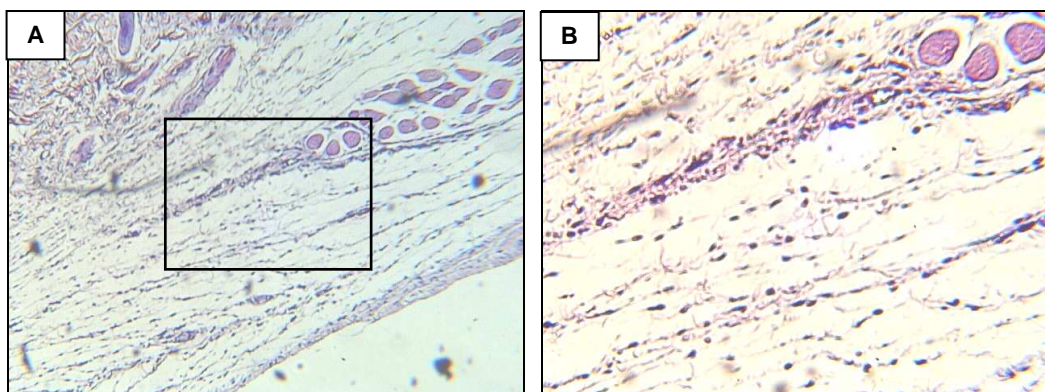


FIGURA 15 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 21 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC. Poucas células inflamatórias e deposição de tecido fibroso. A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina

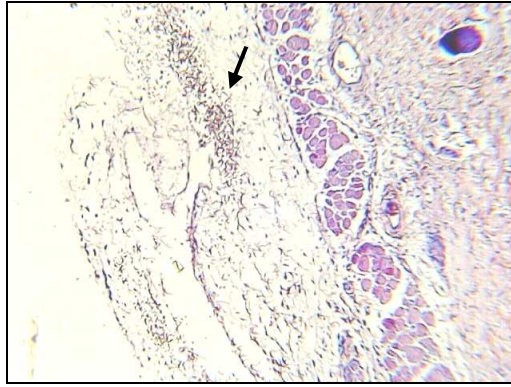


FIGURA 16 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 21 dias após implantação da pastilha de PLGA. Poucas células inflamatórias, deposição de tecido fibroso e sinais de hemorragia (seta). 40x. Hematoxilina-eosina

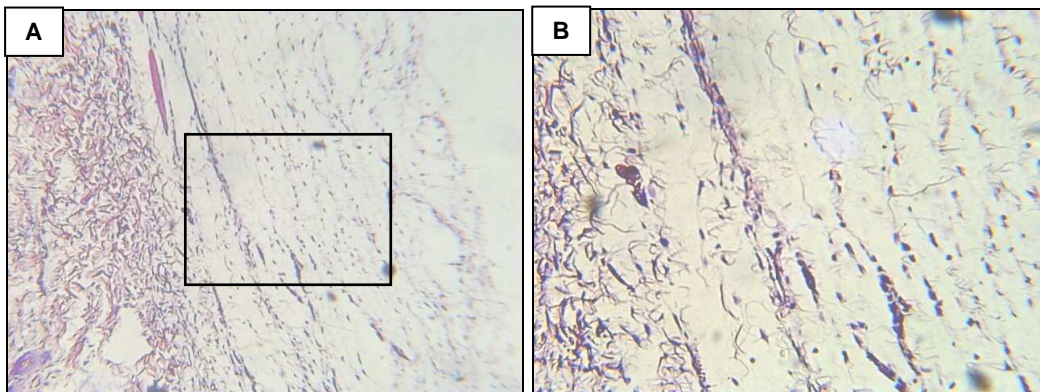


FIGURA 17 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 28 dias após implantação da pastilha de PLA:BC. Poucas células inflamatórias. A) 40x, B)100x. Hematoxilina-eosina

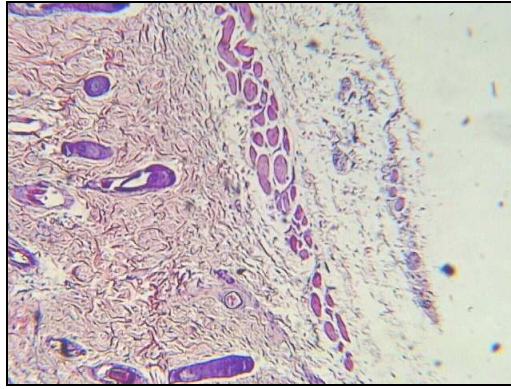


FIGURA 18 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 28 dias após implantação da pastilha de PLA. Poucas células inflamatórias. 40x. Hematoxilina-eosina.

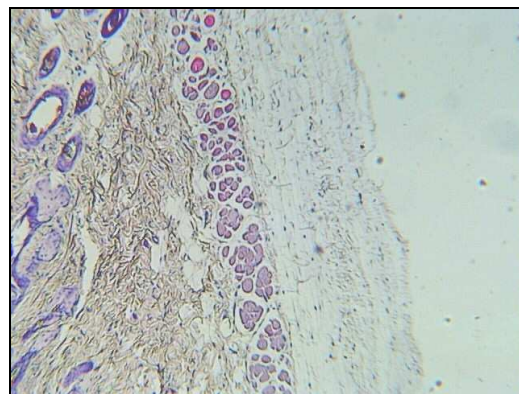


FIGURA 19 - Microscopia ótica de corte histológico de tecido subcutâneo de camundongo 56 dias após implantação da pastilha de PLGA:BC + TCN 0,1%. Poucas células inflamatórias. 40x. Hematoxilina-eosina

A resposta tecidual ao compósito PLGA:BC exibiu um acúmulo moderado de células inflamatórias mononucleares por mais tempo.

As pastilhas controle de PLGA apresentaram-se bastante reabsorvidas ao 28º dia do experimento e totalmente hidrolisadas ao final dos 56 dias.

O grupo controle de biocerâmica apresentou a melhor resposta biológica, com infiltrado de poucas células inflamatórias por um curto período de tempo.

Nenhum dos grupos apresentou sinais de necrose.

Foi detectada a presença de macrófagos e células gigantes na maioria dos cortes, predominantemente de forma discreta (ANEXO 2).

Observou-se, em todos os grupos, a deposição de uma fina camada de tecido fibroso ao redor da região das pastilhas. Por meio de uma análise qualitativa observacional, verificou-se grande concentração de fibroblastos principalmente nos tecidos ao redor das pastilhas dos compósitos formados a partir de PLA, assim como ao redor do controle PLA e BC.

As imagens dos cortes histológicos permitiram observar sinais sugestivos de angiogênese na maioria das lâminas.

Foi constatada uma forte adesão das pastilhas aos tecidos dos camundongos, contudo sem a presença de cápsula fibrosa. As pastilhas dos compósitos contendo PLGA apresentaram uma maior adesão e, portanto, uma maior resistência para remoção desse tecido. Tal fato pode ser explicado pela maior velocidade de degradação do polímero PLGA, possibilitando uma maior exposição dos grânulos da biocerâmica, e conseqüentemente, aumentando a adesão celular.

Os resultados *in vivo* corroboram os *in vitro*. Para todos os biomateriais testados, pode-se afirmar que a biocompatibilidade foi aceitável, sendo que os compósitos formados a partir do PLA mostraram-se mais biocompatíveis dos que os com o PLGA, havendo influência favorável da adição de TCN.

A reação inflamatória do hospedeiro é uma resposta normal à injúria e presença de objetos estranhos. A magnitude e duração do processo inflamatório têm um impacto direto na bioestabilidade e biocompatibilidade de biomaterial (KAO & LEE, 2001).

Muitos fatores contribuem para a resposta biológica de um material no meio implantado, tais como formulação química, tamanho, formato, sítio de implantação e duração do material implantado com o tecido.

Células sanguíneas, neutrófilos, macrófagos e células gigantes têm um papel importante na incorporação do implante. Linfócitos, células plasmáticas, células *natural killers* e macrófagos são ativamente envolvidos no complexo antigênico ou reações imunológicas que estão associadas à incorporação de transplantes ou implantes de origem natural. Reações imunológicas são usualmente de menor importância quando se utilizam materiais como polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e carbono ou seus compósitos.

Neutrófilos e macrófagos estão relacionados à reparação de ferimentos e processo de cura, assim como na eliminação de bactérias que podem causar infecção na área de implante e ameaçar o processo de implantação. Neutrófilos são principalmente envolvidos na fase aguda da inflamação e têm relativamente curta vida quando comparados aos macrófagos (e seus derivados) que estão envolvidos na inflamação crônica e fase de cura (ZIATS et al., 1988).

De acordo com HENCH (1998), uma gama limitada de biovidres contendo SiO_2 , Na_2O , CaO , P_2O_5 , apresentando menos de 55% de SiO_2 , exibem um alto índice de bioatividade, aderindo-se tanto ao tecido ósseo quanto a tecidos moles. Segundo o mesmo autor, a hidroxiapatita cerâmica pode aderir-se ao osso, mas não em tecidos moles. Entretanto, foi observado em nossos experimentos que as pastilhas com o compósito de biocerâmica com os polímeros biodegradáveis (PLA e PLGA) apresentaram uma forte força de união a tecidos moles, o que foi constatado na remoção das pastilhas para microscópica.

5.4 Avaliação microscópica da superfície das pastilhas implantadas através de MEV

A FIG. 20 apresenta micrografia de uma pastilha de biocerâmica demonstrando a morfologia irregular e grande porosidade.

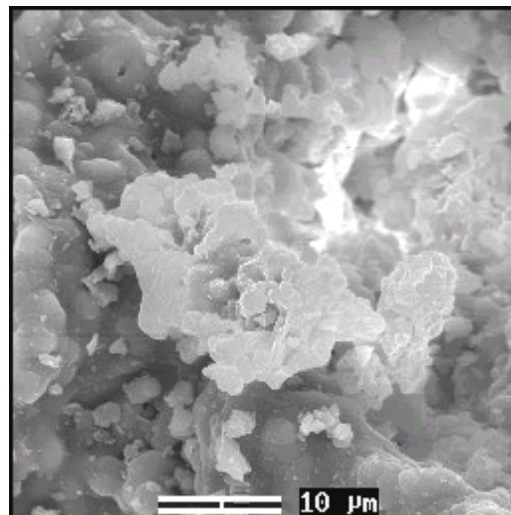


FIGURA 20 - MEV da pastilha BC antes de ser implantada

A FIG. 21 apresenta a micrografia dos controles PLGA e PLA não implantados. Observa-se a forma amorfa e aspecto plástico, apresentando poucos poros.

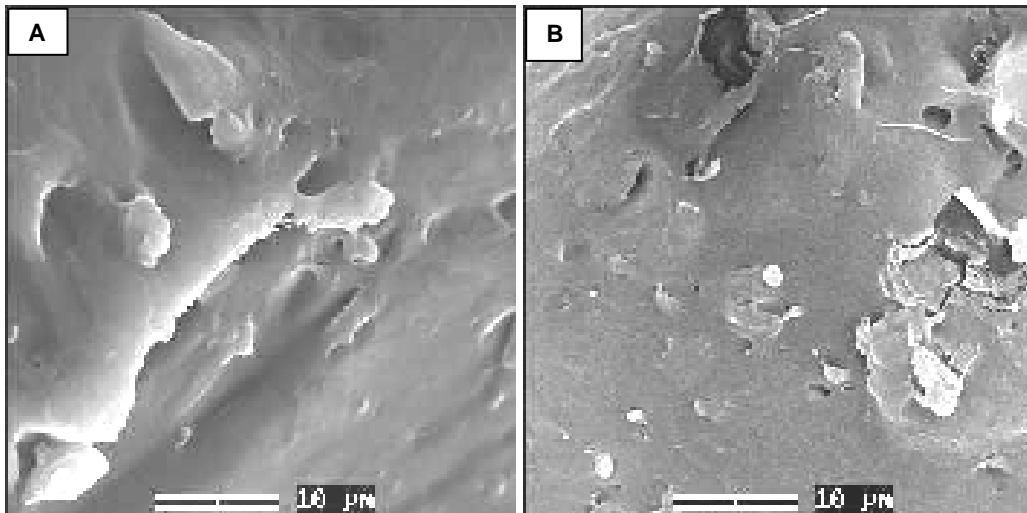


FIGURA 21 - MEV das pastilhas dos controles A) PLGA e B) PLA não implantadas

A FIG. 22 apresenta a micrografia de uma pastilha do compósito PLA:BC não implantada, servindo como controle. A análise dessa figura mostra a microestrutura semicristalina dos grânulos de BC recobertos por uma fase contínua e plástica de polímero em íntimo contato com os mesmos, assim como uma distribuição homogênea entre o polímero PLA e a biocerâmica. Nota-se a presença de micro e macro-porosidades, sendo a extensão das últimas menor que 400µm.

Os compósitos, a princípio, apresentam uma menor porosidade que o controle BC, uma vez que a adição dos polímeros PLGA ou PLA à BC recobre os poros.

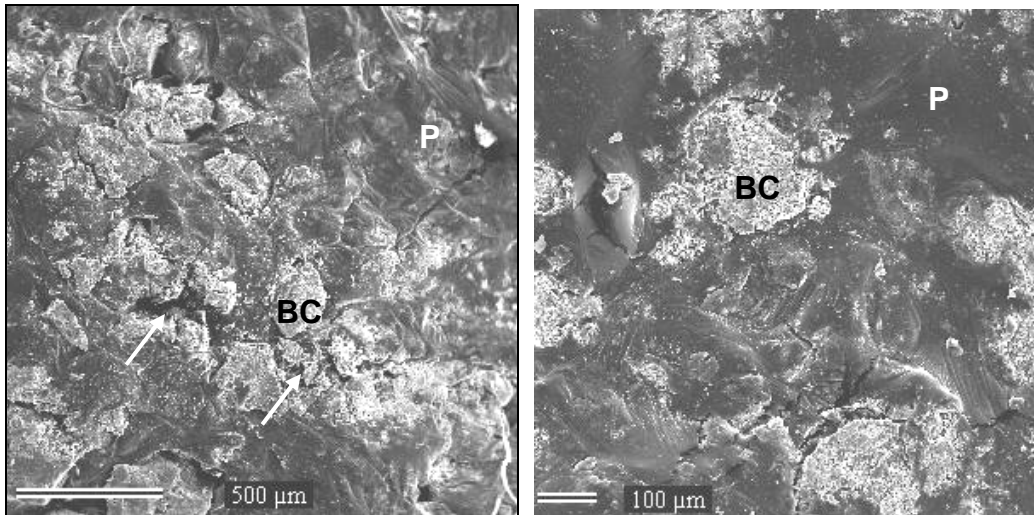


FIGURA 22 - MEV da pastilha do composto PLA:BC não implantada. Micro-porosidades (seta superior) e macroporosidades (seta inferior). BC - biocerâmica; P - PLA

A adição de TCN aos compostos (FIG. 23) não alterou a conformação dos mesmos, apresentando semelhantes perfis de macro e micro-porosidade, plasticidade e cristalinidade.

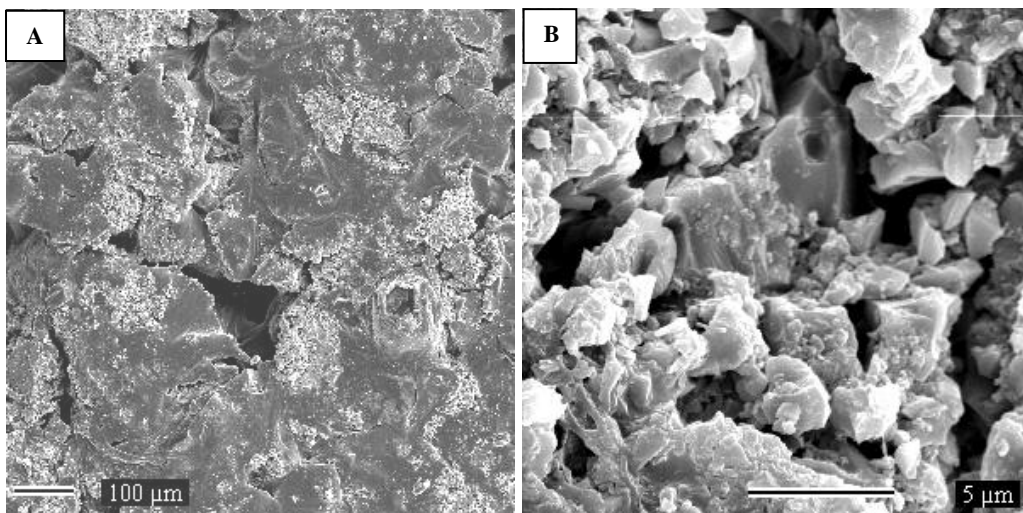


FIGURA 23 - MEV da pastilha do composto PLA:BC + 0,01% TCN não implantada. A) Macro-porosidades. B) Micro-porosidades

Depois de implantadas, as pastilhas foram sendo bioerodidas (FIG. 24) diminuindo a porção superficial de polímero (FIG. 25) e conseqüentemente

aumentando a exposição das partículas de biocerâmica, as quais apresentaram-se com formato mais arredondado. Por conseguinte, houve um aumento na porosidade das pastilhas (FIG. 26).

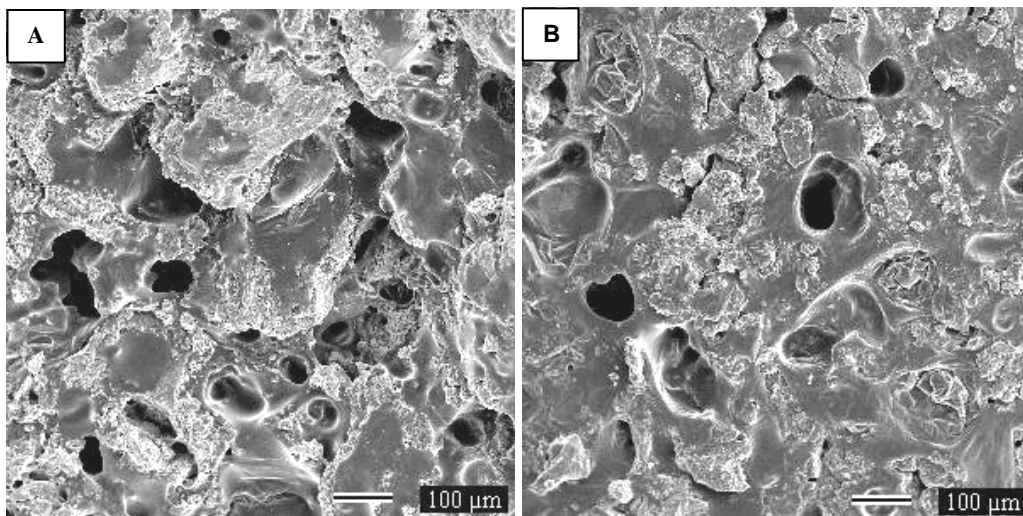


FIGURA 24 - MEV das pastilhas de A) composto PLGA:BC 13 dias após implantação e B) composto PLGA:BC + 0,01% TCN 21 dias após implantação. Aumento da porosidade

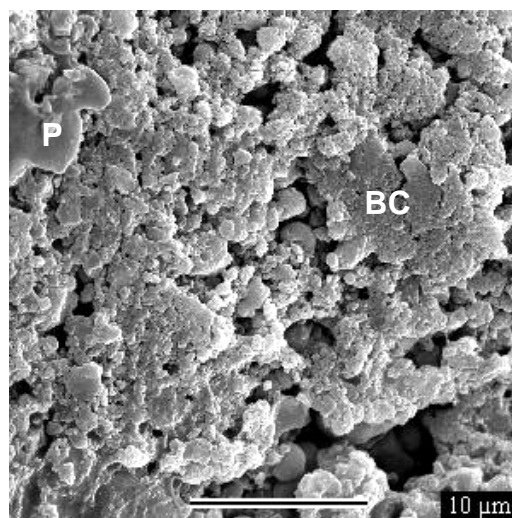


FIGURA 25 - MEV da pastilha do compósito PLA:BC + 0,01% TCN 21 dias após implantação. Aumento da porosidade, maior arredondamento e reabsorção das partículas de biocerâmica. P - PLA; BC - biocerâmica

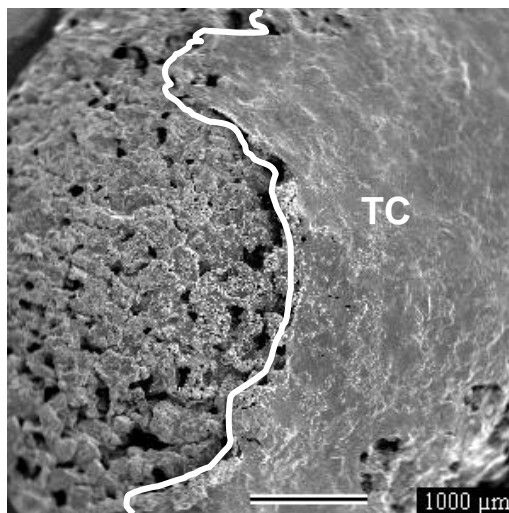


FIGURA 26 - MEV da pastilha do compósito PGLA:BC + TCN 0,1%, retirada 28 dias após a implantação. Perfil de degradação do compósito à esquerda e presença de tecido conjuntivo (TC)

Foi observada, em várias micrografias (FIG. 27, 28, 29 e 30), a presença de células provavelmente adsorvidas aos biomateriais. Esse fenômeno ocorreu a partir do 1º dia e estendeu-se até o final de experimento. Sinais indicativos de duplicação ou confluência celular puderam ser vistos em uma pastilha do compósito PLA:BC retirada 28 dias após a implantação (FIG. 30).

Sinais sugestivos da presença de TCN puderam ser observados em algumas pastilhas (FIG. 29).

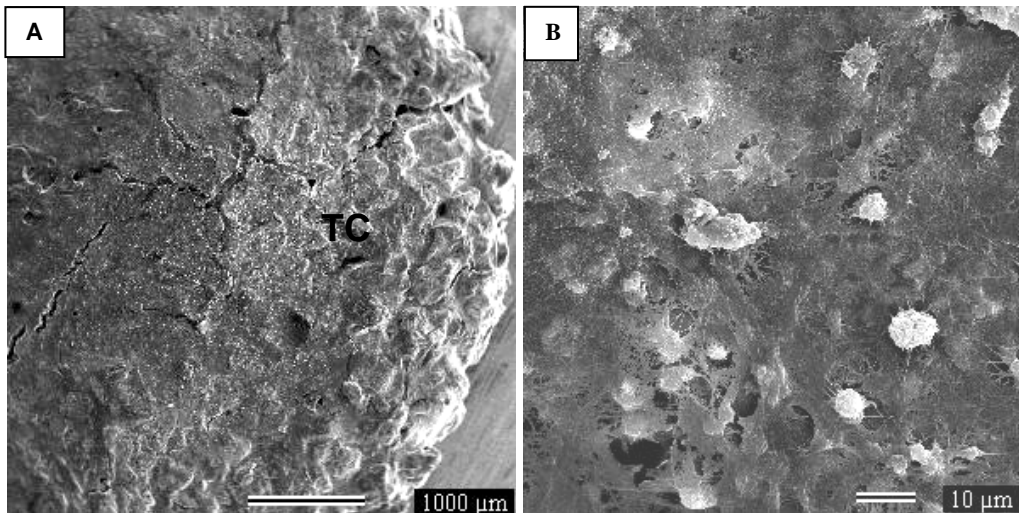


FIGURA 27 - MEV da pastilha do composto PLGA:BC, retirada 1 dia após a implantação. A) Tecido conjuntivo (TC) recobrendo a pastilha parcialmente; 20x. B) Presença de algumas células

O primeiro evento quase que imediato que ocorre após a implantação de biomateriais é a adsorção de proteínas. Essas proteínas vêm primeiro do sangue e dos fluidos tissulares do sítio cirúrgico e posteriormente da atividade celular da região periférica ao implante. Uma vez na superfície, as proteínas podem descolar ou permanecer para mediar as interações entre o tecido e o implante. Dessa forma, acredita-se que a natureza desse filme condicionante depositado na superfícies dos biomateriais é responsável pela resposta do hospedeiro (ANDRADE, 1985; HORBETT & BRASH, 1987; PULEO & NANCIB, 1999).

A performance dos biomateriais envolve dois componentes: (1) a resposta do hospedeiro ao implante e (2) o comportamento do material no hospedeiro (BLACK, 1992).

A taxa média de degradação do PLGA é de 6 a 12 meses. Entretanto, o tempo de degradação depende do tamanho, densidade, peso molecular, forma e local de implantação. A rápida degradação das pastilhas pode ser atribuída à sua pequena densidade, uma vez que foi utilizada a pressão de 250 kg/m².

Entretanto, quando se retirava o tecido conjuntivo das pastilhas, eventualmente também se retiravam os fatores de união entre o tecido e o implante, que nesse caso inclui células e fragmentos das pastilhas. Como forma de possibilitar a visualização da maior quantidade de caracteres possível, procuramos remover apenas parte do tecido sobre as pastilhas, mesmo incorrendo em erro por remover possíveis células de adesão, e manter outra parte do tecido para visualizar a interface tecido-implante. Entretanto, essa remoção parcial não foi possível em todas as pastilhas ou a

manutenção do tecido remanescente foi prejudicada pelo processo de fixação e/ou desidratação para análise microscópica.

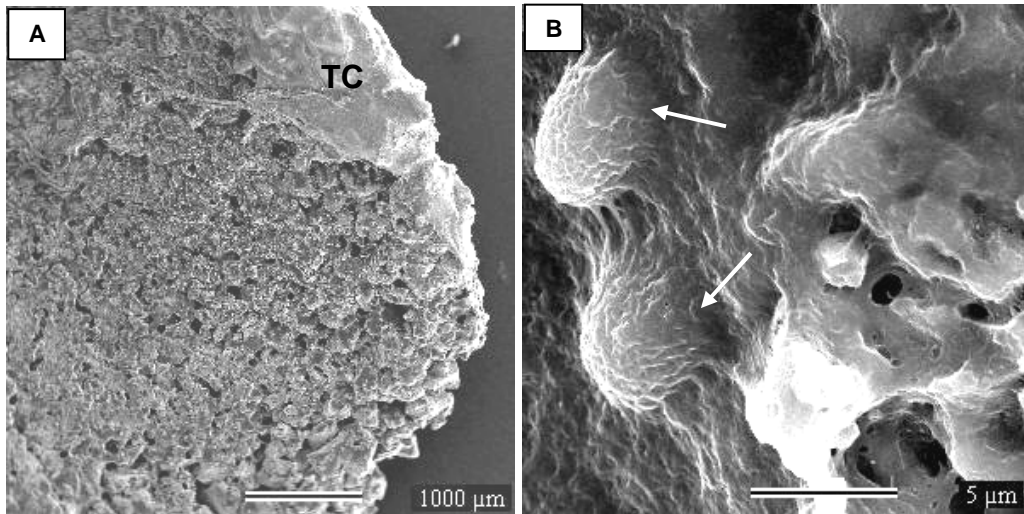


FIGURA 28 - MEV da pastilha do composto PLGA:BC, retirada 13 dias após a implantação. A) Perfil de degradação do composto e presença de tecido conjuntivo do camundongo, B) Células (setas)

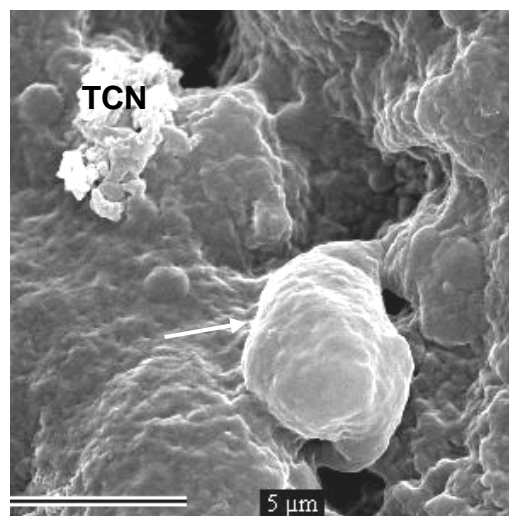


FIGURA 29 - MEV da pastilha do composto PLA:BC + TCN 0,1% retirada 28 dias após a implantação. Possíveis cristais de tetraciclina (TCN) e células (seta)

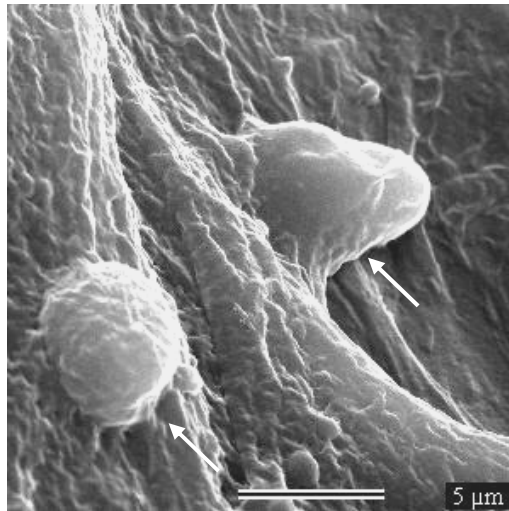


FIGURA 30 - MEV da pastilha do compósito PLA:BC retirada 28 dias após a implantação. Células (setas)

Uma vez que houve uma forte união dos tecidos às pastilhas, em alguns casos não foi possível retirar todo o tecido que recobria as mesmas (FIG. 31). Esse fenômeno ocorreu durante todo o experimento.

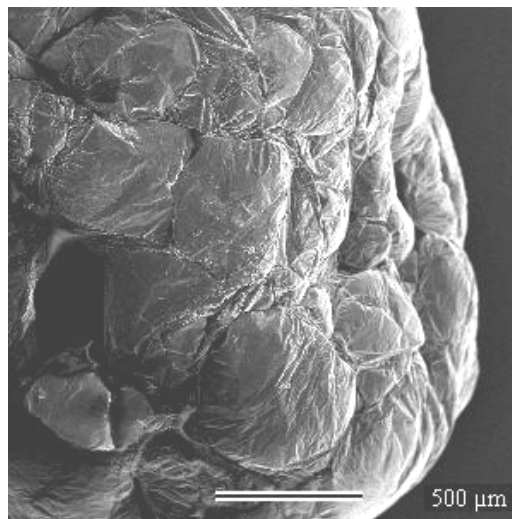


FIGURA 31 - MEV da pastilha do polímero PLGA, retirada 1 dia após a implantação. Tecido conjuntivo recobrendo toda a pastilha

A deposição de colágeno foi sugerida por algumas micrografias, como a FIG. 32 de uma pastilha do composto PLGA:BC retirada as 21 dias após implantação.

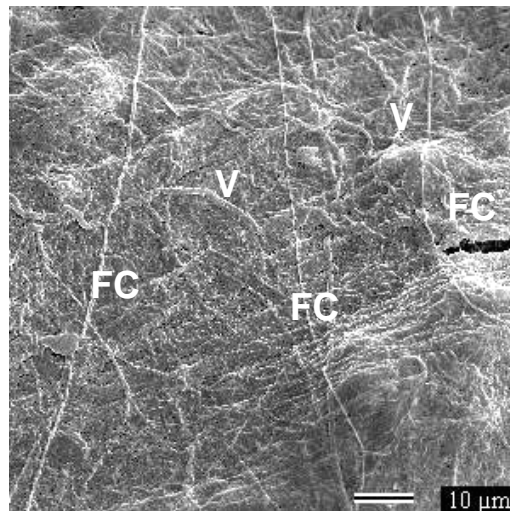


FIGURA 32 - MEV da pastilha do composto PLGA:BC, retirada 21 dias após implantação. Formação sugerindo a presença de fibras colágenas (FC) e vasos sanguíneos (V)

Durante o processo de neoformação óssea a partir de um biomaterial, um andaime é necessário, pois age como uma matriz temporária para a ancoragem dependente de osteoblastos, além da função intrínseca de preenchimento. Ele também pode agir como carreador para fatores solúveis e insolúveis que modulam a função celular local. A forma pela qual as células aderem-se à matriz pode afetar o comportamento das mesmas: uma forte adesão e propagação celular estão associadas com a proliferação, enquanto células de formato arredondado (cubóide ou poligonal, no caso dos osteoblastos) estão geralmente associadas à funções celulares específicas (CHICUREL et al., 1998).

Além da morfologia celular, a relação espacial das células com a matriz extracelular pode ser importante na manutenção da diferenciação. Dessa forma, o uso de andaimes tridimensionais podem encorajar a migração e proliferação celular. Em um estudo semelhante, FURUKAWA et al. (2000) avaliaram a degradação de pastilhas de PLLA: HA na proporção 70:30 quando implantadas em coelhos, utilizando-se HA calcinada ou HA na sua forma pura para a formação dos compostos. Eles observaram que a redução do peso molecular do composto com a HA na forma pura foi maior que com a HA calcinada da seguinte forma: após a remoção das pastilhas 8, 16, 25 e 52 semanas após os implantes, o composto com HA pura apresentava respectivamente

55, 30, 20 e 9% do valor inicial de seu peso molecular, enquanto o compósito com a HA calcinada apresentou, respectivamente, 65, 40, 20 e 15% do valor inicial.

O mecanismo de degradação do PGA e dos copolímeros *in-vitro* é usualmente considerado como erosão completa (COMBOTZ and PETTIT, 1995).

Ao final dos 56 dias do experimento, observou-se que as pastilhas de PLGA:BC, com ou sem TCN, estavam sob a forma de grânulos, envolvidos por uma bolsa de tecido conjuntivo. Entretanto, os grânulos de BC que estavam em contato com os tecidos dos animais mantiveram-se ainda aderidos aos mesmos (FIG. 33). Ao término do experimento, as pastilhas de PLA:BC mantiveram rígidas, com forma e tamanho originais.

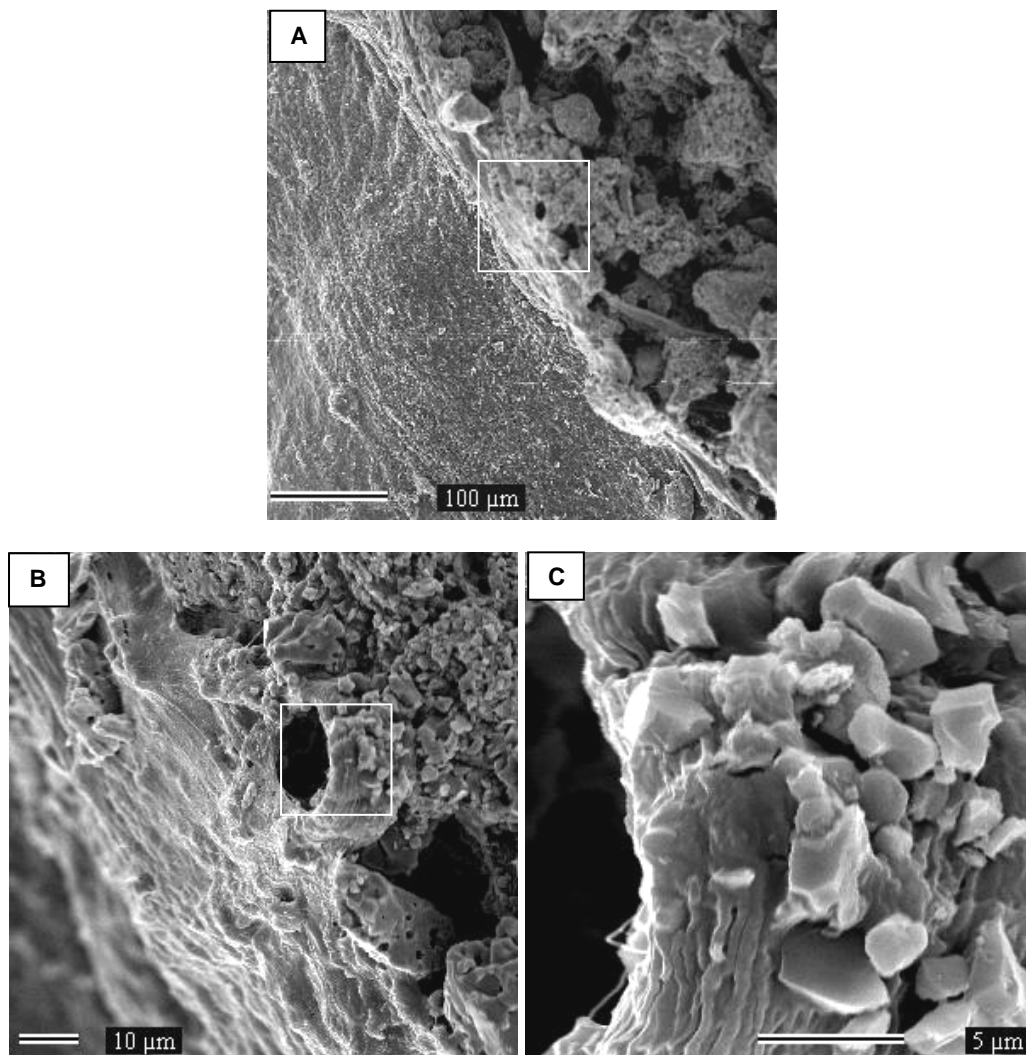


FIGURA 33 - MEV da pastilha do compósito PLGA:BC + TCN 0,1% retirada 56 dias após a implantação. Micro e macroporosidades e a união do tecido conjuntivo à pastilha

A perda da massa das amostras de polímeros PLA foi insignificante no período do experimento (aproximadamente 50 semanas – MOONEY et al., 1995a). Entretanto, aquelas amostras de copolímeros GA e LA ou dl-PLA degradaram mais rapidamente, sendo que um aumento da proporção de GA aumentou a taxa de degradação (MOONEY et al., 1995a).

Entretanto, andaimes altamente porosos são tipicamente utilizados na engenharia de tecidos e contêm uma massa relativamente baixa de polímero por volume. A estrutura altamente porosa de andaimes permite a penetração celular assim como a degradação do polímero (MOONEY et al., 1995a). A velocidade de degradação é afetada pela morfologia do andaime e a maior superfície de contato aumenta a difusão de moléculas de água para dentro do arcabouço polimérico quando são colocados em ambiente aquoso (por exemplo, in vivo). Os polímeros sofrem uma cisão randomizada de suas cadeias por uma simples hidrólise da ligação éster e o monômero difunde-se do arcabouço através da água (REED and GILDING, 1981).

As pastilhas controle, compostas unicamente pelo polímero PLA aumentaram de tamanho, alcançando em média 10mm de diâmetro a partir do 28º dia, sendo o diâmetro inicial igual a 7mm.

A angiogênese foi observada macroscopicamente em uma pastilha composta unicamente por PLA retirada de um camundongo ao 56º dia, assim como sugerida por imagens de MEV (FIG. 34) em uma pastilha do controle biocerâmica, retirada 27 dias após implantação e sobre o compósito PLA:BC + TCN 0,1%, retirada 56 dias após a implantação.

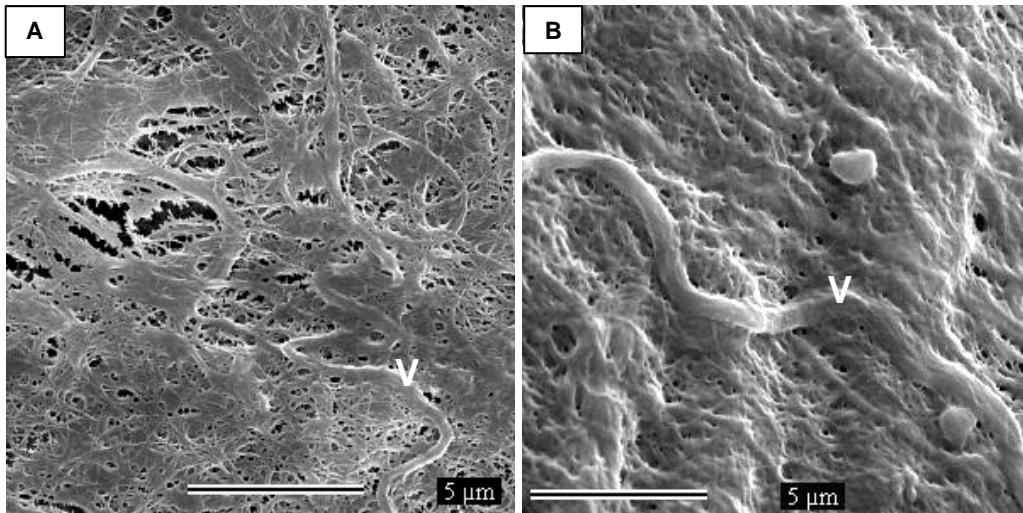


FIGURA 34 - MEV da pastilha de A) controle BC, retirada 27 dias após implantação e B) composto PLA:BC + TCN 0,1%, retirada 56 dias após a implantação. Vasos sanguíneos (V) na superfície das pastilhas

De forma geral, os achados microscópicos corroboram os resultados da análise macroscópica dos estudos *in vivo*, denotando uma resposta biológica aceitável dos materiais testados – PLGA, PLGA:BC, PLGA:BC + TCN, PLA, PLA:BC, PLA:BC + TCN – , de acordo com os testes realizados.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho formaram-se compósitos utilizando-se os polímeros biodegradáveis D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 (PLGA) e D,L Poli (Ácido Lático) (PLA), aprovados pela *Food and Drug Administration* - EUA para uso em humanos, e a biocerâmica Osteosynt® (BC), produto preparado, licenciado e comercializado no mercado nacional, com adição de tetraciclina.

A preparação dos compósitos a partir dos polímeros biodegradáveis amorfos PLGA e PLA com a biocerâmica semicristalina na proporção 25:75% p/p com adição de tetraciclina possibilitou a formação de um biomaterial semicristalino com propriedades plásticas. A massa de polímero e biocerâmica dos compósitos corresponde à proporção de material orgânico/inorgânico no tecido ósseo, que de acordo com HOLLINGER & BATTISTONE (1986) e LIN *et al.* (1998), é de 1:3, respectivamente.

A semelhança macroscópica das pastilhas dos materiais confeccionados sob pressão constante de 250 kg/m² por cinco minutos e sob compressão manual alcançou o propósito de padronização dos compósitos e controles, simulando a preparação dos mesmos previamente a um ato cirúrgico.

A menor porosidade inicial dos compósitos pode ser explicada pelo recobrimento dos mesmos pelos polímeros. De forma sinérgica, os poros e as reentrâncias da matriz biocerâmica servem como andaime para o remodelamento dos polímeros PLGA e PLA (RECOPE, 2004). A conformação geométrica dos compósitos não foi alterada pela adição de tetraciclina nas concentrações estudadas.

Adicionalmente, estudos de caracterização em nosso laboratório (RECOPE, 2004) através de difratogramas de Raios-X (ANEXO 3) demonstraram diferenças cristológicas entre os grupos controle e os compósitos. Observou-se que o controle biocerâmica possui comportamento semicristalino, enquanto os controles PLGA e PLA apresentaram um padrão cristológico amorfo com halo de amorficidade entre 15 a 30° 2θ para o PLGA e entre 15 a 25° 2θ para o PLA. Com relação aos compósitos, pôde-se observar que o aumento da porcentagem de PLGA acarretou em uma maior desorganização da rede cristalina da cerâmica. Esses

resultados sugerem um possível aumento do caráter hidrofílico do compósito quando comparado à biocerâmica e aos polímeros separadamente (RECOPE, 2004).

Ainda ressaltando estudos preliminares em nosso laboratório, foram realizadas análises de termodecomposição dos compósitos e dos controles (ANEXO 4). Verificou-se que a biocerâmica apresenta estabilidade térmica na faixa de temperatura entre 25-750°C, enquanto o PLGA demonstra sua termodecomposição na faixa de temperatura entre 340-375°C, verificando-se um resíduo final de cerca de 1%. Em relação aos compósitos, observou-se menor estabilidade térmica dos mesmos quando comparados ao controle PLGA, uma vez que suas termodecomposições ocorrem na faixa de 250-350°C. Observou-se ainda que o aumento gradativo de PLGA na composição do compósito acarreta aumento de perdas de massa de 15, 20 e 25% para compósitos 15:85, 20:80 e 25:75 % p/p PLGA/BC, respectivamente (RECOPE, 2004)

Os compósitos formados a partir do PLA comportaram-se de forma semelhante aos compósitos contendo PLGA, porém suas termodecomposições ocorrem entre 250-275°C, sendo que a termodecomposição do controle PLA ocorreu na de temperatura entre 275-310°C (RECOPE, 2004).

Os compósitos por nós estudados apresentaram plasticidade intrínseca, podendo ser facilmente modelados para também se adaptar à geometria óssea e atender às necessidades cirúrgicas para reconstrução óssea em geral. Estudos similares corroboram esses resultados, onde diversas proporções entre partículas de hidroxiapatita (HA) e PLA em proporções de PLA:HA 80:20, 70:30, 60:40, 50:50% p/p formaram dispositivos bioreabsorvíveis, os quais foram aquecidos a 103°C sob compressão (valores não fornecidos) e posteriormente modelados em um torno em diferentes formas e tamanhos (SHIKINAMI & OKUNO, 1999). Esses autores observaram, em testes *in vitro*, a formação de uma espessa camada de cristais de apatita nos compósitos sete dias após contato com *Simulated Body Fluids* (SBF) a 37°C. Os autores relatam bioatividade, além de efetiva plasticidade desses compostos quando aquecidos a uma temperatura superior à corporal (37°C) e inferior ao ponto de fusão do polímero PLA (65°C), o que seria uma significativa vantagem para a adaptação desse material à geometria óssea.

O comportamento biológico dos biomateriais envolve basicamente dois componentes: (1) a resposta do hospedeiro ao implante, de acordo com os graus de inflamação e o desenvolvimento ou não de cápsula fibrosa e (2) o comportamento do material no hospedeiro (BLACK, 1992), de acordo com a formulação química,

tamanho, formato, sítio de implantação e duração do contato do material implantado com o tecido (LAURENCIN *et al.*, 1994)

Segundo a ISO 10993-5, os testes de biocompatibilidade devem ser interpretados de acordo com a Farmacopéia Americana, USP XXIII, v.87, p.1697-1699, "*Biological Reactivity Tests, In Vitro*". Desta forma, consideram-se amostras viáveis para continuidade de seus estudos de biocompatibilidade, as que no teste de contato direto promoverem até uma reatividade suave nas culturas, com uma zona afetada limitada à área sob a amostra, de acordo com os QUADROS 8 e 9, item 4.2.3.1. Com relação ao teste de eluição, nenhuma das culturas celulares expostas aos seus eluatos deve apresentar reação superior ao GRAU 2 (reação leve ou benigna), de acordo com o QUADRO 10, item 4.2.3.2.

Apesar de se ter notado alguma inviabilidade celular, a baixa citotoxicidade promovida pelos compósitos sobre cultura celular de fibroblastos de camundongos está de acordo com o relatado na literatura. A partir de análises *in vitro*, ATHANASIOU *et al.* (1996) determinaram biocompatibilidade aceitável em estudos de proliferação celular em polímeros do ácido lático de vários pesos moleculares em cultura de células epiteliais de ratos, fibroblastos humanos e células de osteossarcoma. Em relação às cerâmicas de fosfato de cálcio, BURG *et al.* (2000) as classifica como altamente biocompatíveis, uma vez que são livres de proteínas, tendo sido reportado mínimas reações imunológicas, de corpo estranho ou sistêmicas a partir de seu uso, apesar de ser um estudo *in vivo*.

O melhor índice resposta apresentado pela associação PLA:BC em relação ao compósito PLGA:BC e aos controles poderia ser explicado basicamente pela taxa de degradação do PLA ser menor do que a do PLGA; dessa forma, espera-se uma menor diminuição do pH no meio e, conseqüentemente, redução de alterações celulares.

As pastilhas dos compósitos PLA:BC e PLGA:BC, com 25% p/p de polímero, liberam menor quantidade de ácido glicólico e/ou lático que as pastilhas dos controles PLA e PLGA com mesma massa, conseqüentemente causando menor decréscimo da acidez do meio, propiciando menores danos celulares.

A plasticidade alcançada pela formação dos compósitos permitiu a consolidação de um arcabouço para os grânulos de biocerâmica, formando um dispositivo rígido e ao mesmo tempo modelável, evitando ou diminuindo a micromovimentação desses grânulos, fator capaz de aumentar a resposta inflamatória a um implante.

O fato de a biocerâmica apresentar um índice resposta mais elevado do que o esperado está relacionado pela apresentação quebradiça da mesma, provavelmente sofrendo dissolução no meio-soro, aumentando a concentração de cálcio (Ca^{2+}) no eluato colocado sobre a monocamada celular, gerando um efeito citotóxico. Entretanto, essa reatividade não poderia ser atribuída à biocerâmica intrinsecamente, mas ao processo de dissolução ocorrido, uma vez que utilizou-se a forma granular, que foi prensada a 250 kg/m^2 por 5 min. Essa questão poderia ser minimizada através de testes com pastilhas de biocerâmica fabricadas com dimensões iguais às das pastilhas por nós confeccionadas.

Em relação aos compósitos formados a partir do PLGA, os índices resposta mais altos podem estar associados à rápida degradação da porção polimérica desses compósitos, provavelmente causando uma diminuição do pH do meio. Não obstante, apesar de se formar um compósito inicialmente rígido e modelável, a concentração de 25% de PLGA parece não ter sido suficiente para garantir a diminuição do ligeiro efeito citotóxico caracterizado pela liberação dos ácidos láctico e glicólico, quando comparados ao compósito PLA:BC.

Sabe-se que a reação inflamatória inicial do hospedeiro é uma resposta normal à injúria e presença de objetos estranhos. A magnitude e duração do processo inflamatório têm um impacto direto na bioestabilidade e biocompatibilidade do biomaterial (KAO & LEE, 2001). Portanto, espera-se que, após duas semanas, a interferência do trauma cirúrgico seja excluída.

Analisando os resultados dos testes *in vivo*, pode-se inferir que o processo inflamatório gerado pela implantação das pastilhas do 1º ao 13º dia pode estar associado à resposta do organismo principalmente ao trauma cirúrgico, seguido por uma possível maior liberação de ácido láctico e glicólico na fase inicial.

Ao se formar um compósito a partir de polímeros biodegradáveis, quando o mesmo entra em contato com o meio fisiológico ocorre primeiro a degradação da porção superficial da fase polimérica para posterior degradação em direção ao centro do andaime. Essa liberação inicial superficial é geralmente maior, a não ser que posteriormente ocorra uma erosão completa do dispositivo. Adicionalmente, uma grande proporção entre área superficial e volume, observada no formato de pastilhas, aumenta a susceptibilidade de hidrólise dos polímeros PLA e PLGA, conseqüentemente ocasionando uma maior diminuição inicial do pH. De modo semelhante, espera-se uma liberação maior da tetraciclina presente na superfície das

pastilhas com posterior liberação da mesma contida no interior do material. Essa liberação inicial também poderia causar um decréscimo do pH.

O aumento do número médio de células inflamatórias observado ao 13^o dia em todos os grupos contrapõem-se à diminuição da média de células do grupo dos animais apenas incisionados. Este fato sugere modificação protéica com subsequente recrutamento de linfócitos. Dessa forma, o 13^o dia corresponde ao tempo necessário para o aparecimento de linfócitos e desenvolvimento de reatividade imunológica adaptativa, que depois se regula a partir do 21^o dia. Sendo assim, não há uma majoração da inflamação, mas um aumento da celularidade, objetivando-se a resolução do processo inflamatório, com possível liberação de mediadores químicos, tais como TGF- β e IL-10, sinalizando a cicatrização e recrutamento de fibroblastos.

De forma geral, a partir do 21^o dia, o padrão de organização tecidual observado nesse estudo estava próximo da normalidade, não havendo diferenças estatísticas entre as médias de células inflamatórias dos grupos dos compósitos testados.

Adicionalmente, sabe-se que a via subcutânea é bastante imunogênica, em contraposição ao sítio ortotrópico para o material em questão, que será recoberto por mucosa, correspondendo ao local menos imunogênico. Desta forma, espera-se que os compósitos apresentem melhor desempenho quando implantados em sítios ósseos.

O tipo de polímero influenciou a resposta inflamatória, sendo que os compósitos formados por PLGA apresentaram maior média de células inflamatórias na maioria dos tempos analisados. Sabe-se que a maior velocidade de degradação do polímero está associada ao grau de inflamação tecidual.

Apesar de as pastilhas do controle PLGA apresentarem-se bastante reabsorvidas ao 28^o dia do experimento, e de terem sido totalmente degradadas ao final dos 56 dias, não causaram resposta inflamatória severa.

A adição de tetraciclina influenciou favoravelmente a resposta biológica dos materiais, sendo esta relação evidente nos dias 7, 13 e 28. Esses resultados estão de acordo com a literatura, de forma que as diversas atividades biológicas da tetraciclina estariam otimizando o desempenho dos compósitos (ESPOSITO, 1997; SEYMOUR, 1995; WIKESJÖ, *et al.*, 1986).

Um efeito secundário de cirurgias é a possibilidade de infecção. O uso de antibióticos em sítios cirúrgicos foi sugerido por NASR *et al.* (1999). Ao se realizar

enxertos em sítios periodontais dever-se-ia fazer uso das tetraciclinas, para supressão imediata de biofilme bacteriano após a cirurgia, sendo essa administração recomendada em um período de 20 dias ou até que o paciente seja capaz de efetuar o controle de placa ideal na região operada. A tetraciclina mostra-se como o antibiótico de escolha para reconstruções ósseas, uma vez que exibe propriedades farmacológicas favoráveis como atividade anticolagenásica, inibição de reabsorção de osso, ação antiinflamatória e uma habilidade para promover a adsorção de fibroblastos e tecido conectivo em superfícies radiculares (ESPOSITO, 1997; SEYMOUR, 1995; WIKESJÖ, *et al.*, 1986).

As tetraciclinas exibem diversas propriedades antiinflamatórias, incluindo inibição de: metaloproteinases, fator de necrose tumoral (TNF) e produção de óxido nítrico (iNOS) (POPOVIC *et al.*, 2002), assim como inibem a atividade enzimática da fosfolipase A2 (PRUZANSKI *et al.*, 1992). Também foi demonstrada a inibição do processamento de antígenos para apresentação a células T humanas (KALISH & KOUJAK, 2004). Adicionalmente, tem sido relatada proteção cardiovascular e neurológica pelo uso das tetraciclinas (SCARABELLI *et al.*, 2004; CHTARTO *et al.*, 2003)

A baixa concentração de tetraciclina é importante para manter a integridade de estruturas ósseas, as quais podem ser muito queladas pela ação de TCN. Para superar esta desvantagem, os autores têm posposto um sistema de liberação de tetraciclina incluída em β -ciclodextrina (β -CD). Esses autores sugerem que um sistema de liberação local de tetraciclina favorece maior substantividade do antibiótico e adesão homogênea à dentina, entretanto proporcionando menor desmineralização e pigmentação de superfícies dentinárias bovinas que a TCN isoladamente (PATARO *et al.*, 2003).

Em um outro estudo, DOMINGUES *et al.* (2004) carregaram TCN em biovidros e encontraram que os espectros FITR dos biovidros quando comparados aos mesmos carregados com TCN ou TCN: β -CD foram semelhantes. Os autores constaram que a presença da TCN ou do composto de inclusão TCN: β -CD nos biovidros não afetou a bioatividade dos mesmos. Adicionalmente, verificou-se atividade bacteriostática superior dos biovidros carregados com TCN ou TCN: β -CD.

Em nosso estudo, apesar de a proporção de polímero/biocerâmica ser de 1:3, e de a concentração de TCN para os teste *in vivo* ser de 0,1%, era de se esperar nenhuma ou pouca alteração da morfologia dos compósitos, como comprovada pela MEV. Em contrapartida, estudos preliminares de espectroscopia em nosso laboratório,

utilizando a concentração de TCN a 1% nos compósitos, indicam a liberação da mesma de forma lenta, sem o efeito explosão. Esse fato pode ser parcialmente explicado pela possível interação química entre os grupos aniônicos fosfato e a porção ácida da tetraciclina, assim como a possibilidade de quelação da TCN com o cálcio, o que tornaria lenta a sua liberação. Adicionalmente, poderia ser benéfica a formação de composto de inclusão entre a antibióticos e ciclodextrinas, criando um novo sistema de liberação lenta em compósitos de polímeros biodegradáveis e biocerâmicas.

A associação de polímeros com antimicrobianos para Regeneração Tecidual Guiada (RTG) tem sido descrita na literatura. Membranas para RTG a partir da dissolução de PLA através de metileno clorídrico, com a adição de etilacetato, assim como tetraciclina ou flurbiprofeno a 5, 10 e 20% para liberação controlada foram fabricadas e caracterizadas por PARK *et al.* (1997). Essa solução foi associada a fibras de PGA. Esses pesquisadores sugeriram que a porosidade das membranas poderia ser controlada pela composição do solvente na solução de PLA. Esses mesmos autores demonstraram que as soluções contendo TCN a 5 e 10% apresentaram-se homogêneas; entretanto, ao associar a solução às fibras de PGA, a solubilidade da TCN na solução de PLA diminuiu e ocorreu a recristalinização da TCN, fazendo com que as partículas de TCN migrassem para a superfície da membrana após a completa evaporação do solvente, fato que não modificou a morfologia do dispositivo, mas propiciou uma liberação em explosão (*burst effect*) da TCN. Posteriormente a essa grande liberação inicial, observaram a liberação constante de TCN, a qual está associada à difusão dos cristais do fármaco embutidos na matriz hidrofóbica de PLA.

Ainda em relação à adição de TCN aos compósitos, é possível afirmar que esse fármaco auxilia na estabilização térmica dos compósitos. Testes em nosso laboratório constataram que o aumento da concentração de TCN (ANEXO 5) acarreta uma maior estabilidade térmica dos compósitos, quando comparados ao compósito isento deste fármaco (RECOPE, 2004).

NAJMAN *et al.* (2003) desenvolveram um estudo semelhante ao aqui apresentado, onde foram avaliadas mudanças nos compósitos de HA:PLA, 80:20% p/p, assim como reação tecidual três meses após implantação subcutânea em camundongos. Os autores relataram boa biocompatibilidade dos compósitos.

Segundo ATHANASIOU *et al.* (1996), apesar de os biomateriais PLA e PLGA geralmente apresentaram-se biocompatíveis e não-tóxicos, têm sido reportadas reações inflamatórias a implantes com esses polímeros, usualmente ocorrendo de 7 a

20 semanas após a sua instalação no organismo, estando atribuídas aos produtos de degradação drenados do sítio de implantação à medida que se inicia a hidrólise do polímero.

Segundo SHIKINAMI & OKUNO (1999), fragmentos particulados de implantes deteriorados de biocerâmicas e polímeros orgânicos podem criar um efeito adverso nos tecidos circundantes culminando, ocasionalmente, em uma resposta inflamatória. Esses autores citam algumas características dos materiais associadas ao desenvolvimento de uma reação de corpo-estranho, como: (1) tamanho da partícula; (2) quantidade de material por unidade de volume do tecido; (3) formato; (4) topografia da superfície e (5) a relação hidrofobicidade/hidrofilicidade das superfícies das partículas. Assim sendo, a composição química das partículas dos materiais, bioinertes ou bioativos, não deveria ser considerada como agente etiológico para a inflamação tecidual, sendo que o tamanho dessas partículas deveria ser inferior a 100 µm. Comparando aos nossos resultados, apesar de ter sido utilizado partículas de biocerâmica 80x60 Mesh, ou seja, com diâmetros entre 250 e 180µm, e histologicamente ter sido observado a presença de células gigantes em alguns cortes, não foi constatado reação de corpo-estranho em nenhum dos materiais testados.

—Adicionalmente, NASR *et al.* (1999) sugerem que partículas muito grandes reabsorvem mais lentamente, apresentando uma menor superfície de contato; enquanto partículas muito pequenas poderiam induzir uma resp~~Outra dificuldade é a correta identificação entre osteoblastos e fibroblastos. Entretanto, pelo tempo de implante, poderíamos sugerir que tais células seriam fibroblastos.~~

~~De uma forma geral, os achados microscópicos corroboram os resultados da análise macroscópica dos estudos *in vivo*. Dessa forma, podemos afirmar que todos os materiais testados — PLGA, PLGA:BC, PLGA:BC + TCN, PLA, PLA:BC, PLA:BC + TCN — apresentaram-se biocompatíveis, inclusive com sinais de neovascularização como foi encontrada em uma pastilha de PLA no dia 56^o. Esta inflamatória, sendo rapidamente reabsorvidas ou fagocitadas, além de apresentar um espaço inter-partículas de dimensões reduzidas, não conduzindo ou dificultado a migração e invaginação celular.~~

As pastilhas de todos os compósitos testados, assim como dos controles PLA e BC apresentaram uma maior estabilidade estrutural. Segundo WONG & MOONEY (1997), a taxa de degradação dos copolímeros de GA e LA é influenciada por fatores que afetam a formação da cadeia polimérica, cristalinidade e hidrofobicidade. Uma vez que a degradação é induzida pela hidrólise, uma estrutura

crystalina ou uma composição polimérica hidrofóbica desfavorecem a dissolução e degradação. Adicionalmente, a presença de um grupo metil extra faz com que o PLA seja mais hidrofóbico e menos suscetível à hidrólise que o PGA. Dessa forma, o PLA degrada mais lentamente que o PGA (WONG & MOONEY,1997).

Os compósitos testados nesse estudo foram obtidos através da associação dos polímeros biodegradáveis PLGA ou PLA aos grânulos da matriz biocerâmica, formando-se um artefato sólido e modelável, sendo que o compósito PLA:BC, de acordo com os resultados dos testes *in vivo*, manteve-se rígido por mais tempo. Dessa forma, sugere-se que os polímeros biodegradáveis protejam os grânulos de BC formando um material rígido e ao mesmo tempo modelável. A diferença nos graus de degradação dos compósitos sugere diversas aplicações.

Esses biomateriais poderiam ser programados para serem reabsorvidos de acordo com a necessidade requerida, alterando-se as proporções polímero:BC e principalmente escolhendo-se o polímero adequado para cada aplicação, o que formaria um dispositivo progressivamente degradável, possivelmente possibilitando o crescimento de tecido ósseo dentro das porosidades, que segundo ALEXANDER *et al.* (1996) seria uma solução ótima para a aplicação de biomateriais.

Entretanto, segundo HIGASHI *et al.* (1986) a degradação dos polímeros PLA e PGA aumenta a solubilidade da hidroxiapatita e, portanto, da biocerâmica, uma vez que diminui o pH local. Com a degradação da biocerâmica, há liberação de íons cálcio e fosfato, os quais poderiam ser reaproveitados para a neoformação óssea.

A penetração de células mesenquimais nos espaços porosos de hidroxiapatita sinterizada têm o potencial de expressar pelo menos dois programas morfogenéticos distintos: (1) a formação de um tecido fibroso ou (2) a diferenciação de tecido ósseo, sendo que essa escolha é determinada pelos sinais locais controlados pela geometria do substrato (RIPAMONTI, 1999a,b). Dessa forma, a iniciação da formação óssea pode estar associada a concavidades na superfície do substrato, ao invés de convexidades ou mesmo superfícies planas. RIPAMONTI (1999a,b) desenvolveu estudos a partir de HA litomórfica. LOBO (2002) demonstrou o potencial da biocerâmica Osteosynt[®] em induzir o crescimento ósseo em sítios ortotrópicos em coelhos. No entanto, a formação de compósitos a partir de biocerâmica na forma granular e polímeros biodegradáveis possibilitou a formação de um andaime com micro e macroporosidades, possibilitando a invaginação e possivelmente a diferenciação celular.

A adição de osso autógeno a compósitos de HA:PLA 80:20% p/p não interfere no aparecimento de tecido conectivo de colágeno quando implantados intraperitonealmente em camundongos e avaliados através de espectroscopia (FT-IR) e MEV (IGNJATOVIC *et al.*, 2001).

A sugestão de angiogênese observada nos cortes histológicos, tanto nos compósitos como nos controles, assim como macroscopicamente e por MEV, é um fator determinante para a biocompatibilidade, uma vez que possibilita o material enxertado ter acesso a uma maior quantidade células indiferenciadas e fatores de crescimento, necessários para o sucesso do implante.

Neste estudo, em relação ao tamanho dos poros dos compósitos verificados por MEV, pode-se afirmar que foram favoráveis para a possível adsorção celular e condução de vasos sanguíneos. O tecido vascular não aparece em poros menores que 100 μm (HENCH, 1996). O tamanho das trabéculas do tecido ósseo varia de 20 a 100 μm , sendo que essa última medida permite que a trabécula conduza o seu próprio vaso sanguíneo, da mesma forma que ocorre com o osso compacto, o qual possui um sistema Harvesiano ou osteons de 50 a 250 μm . Sendo assim, para suportar o crescimento e invaginação de tecido ósseo trabecular, os poros devem ter o tamanho, no mínimo, entre 40 e 100 μm (NASR *et al.*, 1999),

Adicionalmente, a geometria do andaime implantado deve ser capaz não somente de seqüestrar BMPs/OPs, mas também estimular a angiogênese, a qual é um pré-requisito para a osteogênese. A angiogênese pode prover temporariamente um fluxo regulado de populações celulares capazes de expressar o fenótipo osteogênico (RIPAMONTI *et al.*, 1999a,b; RIPAMONTI *et al.*, 1993).

O sítio de implantação interfere nos resultados biológicos do material. Esses biomateriais foram implantados na camada subcutânea de camundongos, local onde a movimentação dos implantes não pode ser controlada. Dispositivos implantados estando em contínuo movimento ou micromovimentos em relação ao tecido vizinho podem provocar inflamação e estimulação da liberação de enzimas, fato este que poderia afetar a taxa de degradação do implante, o grau de inflamação e o conseqüentemente o sucesso do mesmo (COURY, 1996; TEMENOFF *et al.*, 1999).

O primeiro evento quase que imediato que ocorre após a implantação de biomateriais é a adsorção de proteínas. Essas proteínas vêm primeiro do sangue e dos fluidos tissulares do sítio cirúrgico e posteriormente da atividade celular da região periférica ao implante. Uma vez na superfície, as proteínas podem descolar ou permanecer para mediar as interações entre o tecido e o implante. Dessa forma,

acredita-se que a natureza desse filme condicionante depositado na superfícies dos biomateriais é responsável pela resposta do hospedeiro (ANDRADE, 1985; HORBETT & BRASH, 1987; PULEO & NANCIB, 1999).

A forte adesão de tecido aos compósitos sugere uma alta bioatividade desses biomateriais, fato este que permitiu o crescimento desses tecidos dentro das porosidades das pastilhas, aderindo-se às partículas de biocerâmica. De acordo com HENCH (1998a), uma gama limitada de biovidros contendo $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$, apresentando menos de 55% de SiO_2 exibem um alto índice de bioatividade, ocorrendo a adesão tanto ao tecido ósseo quanto a tecidos moles. Segundo o mesmo autor, a hidroxiapatita cerâmica pode aderir-se ao osso, mas não em tecidos moles.

Todavia, à medida que se retirava o tecido conjuntivo das pastilhas, eventualmente também se retiravam os fatores de união entre o tecido e o implante, que nesse caso inclui células e fragmentos das pastilhas. Como forma de possibilitar a visualização da maior quantidade de caracteres possíveis, foram determinadas duas áreas zonas para análise, com e sem recobrimento de tecido animal. Segundo KOEMPEL *et al.* (1998), a continuidade da interface entre o tecido do hospedeiro e o biomaterial é essencial para a osteointegração.

Adicionalmente, com a degradação do polímero, a superfície apresenta uma grande quantidade de íons OH^- que podem atrair íons Ca^{2+} e iniciar a formação de uma camada de CaP (LAURENCIN & LU, 1999). Contudo, a degradação da biocerâmica libera no meio íons Ca^{2+} . Segundo HORBETT *et al.* (1996), a adesão celular que ocorre entre algumas integrinas das células e a seqüência RGD de aminoácidos (arginina, glicina e ácido aspártico) da fibronectina e outras proteínas adesivas que se ligam substrato somente ocorre na presença de Ca^{2+} . Dessa forma, é de se esperar uma forte união dos compósitos aos tecidos implantados. Segundo IGNJATOVIC & USKOKOVIC (2004), uma adesão consistente entre os tecidos circundantes e a superfície do implante, assim como sua integração, são indicativos de altos graus de biocompatibilidade. Entretanto, a liberação de um grande número de íons de cálcio, como ocorre com os materiais muito solúveis, termina por inibir atividade osteoclástica. Dessa forma, a biocerâmica deve apresentar um a solubilidade apropriada tanto para a atividade osteoclástica quanto para o osteoblástica (YAMADA *et al.*, 1997).

A osteoindução intrínseca em biomateriais porosos implantados heterotopicamente em primatas indicam que o modelo animal utilizado é um parâmetro crítico para a ocorrência de diferenciação óssea, sendo que a osteoindução é

altamente reprodutível em primatas, mínima em cães e ausente em coelhos e roedores, ao menos que a hidroxiapatita seja pré-tratada com BMPs/OPs (RIPAMONTI, 1999a,b). Apesar da grande significância deste estudo, pode-se concluir que os primatas, como citado pelo autor, são o modelo ideal para os materiais por ele testados, não se devendo extrapolar para todos os materiais existentes com finalidade de preenchimento ósseo. Entretanto, os compósitos testados em nosso estudo deveriam ser aplicados hetero ou ortrotopicamente em outros modelos animais para se avaliar a indução ou a não-indução de tecido ósseo.

A formação de compósitos de HA:PLA com propriedades mecânicas aumentadas não diminuiu a resposta biológica dos mesmos, apresentando pequena resposta inflamatória, boa adesão do tecido circundante após implantação e apresentando altos índices de biocompatibilidade ([LIN *et al.*, 1999](#); [IGNJATOVIC & USKOKOVIC, 2004](#)).

Cabe ressaltar que o entendimento e a mensuração da biocompatibilidade é uma exclusividade da ciência dos biomateriais. Entretanto, não existem definições precisas ou medidas exatas para a biocompatibilidade, devendo essa ser especificamente definida para aplicações em tecido mole, em tecido duro, etc. Dessa forma, a biocompatibilidade de um dispositivo médico poderia ser definida como o sucesso desse dispositivo de alcançar a função pretendida (RATNER *et al.*, 1996).

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir de exposto, conclui-se que:

1. Os compósitos apresentaram maior plasticidade quando comparados com a biocerâmica, melhorando as propriedades de manuseio e modelagem do material a frio e a quente.
2. As propriedades de modelagem do compósito sugerem o seu possível uso como material para reposição óssea, embora análises complementares sejam necessárias para a comprovação desses usos.
3. Os compósitos formados a partir de polímeros biodegradáveis PLA e PLGA em uma matriz biocerâmica apresentaram baixos graus de citotoxicidade *in vitro*;
4. Os grupos contendo o polímero PLGA expressaram um maior grau de toxicidade do que os com PLA;
5. O tipo de polímero PLA ou PLGA influenciou mais a citotoxicidade do que a presença ou ausência de tetraciclina;
6. Os materiais testados apresentaram biocompatibilidade aceitável para os testes realizados neste estudo;
7. A biocerâmica pura apresentou a melhor resposta biológica, com infiltrado de poucas células inflamatórias por um curto período de tempo;
8. Os compósitos formados a partir do PLA mostraram-se mais biocompatíveis dos que os formados com o PLGA;
9. A adição de tetraciclina influenciou favoravelmente a resposta biológica dos materiais;
10. Os compósitos apresentaram uma microestrutura semicristalina, com os de grânulos de biocerâmica recobertos por uma fase contínua e plástica de polímero em íntimo contato com os mesmos;

11. Os compósitos mostraram aumento gradual da porosidade em relação ao tempo e sofreram erosão, possivelmente pela perda do polímero, expondo as partículas de biocerâmica.
12. O tipo de polímero influenciou o tempo de degradação, sendo a do PLGA mais rápida do que a do PLA;
13. Foi verificada a adesão de células e sugestão de vasos sanguíneos;
14. A forte adesão e uma camada celular nos compósitos sugere uma alta bioatividade desses biomateriais;
15. Os resultados *in vivo* corroboram os *in vitro*, de forma que possibilitam a continuação da avaliação da biocompatibilidade, como em sítios ortotrópicos de outros modelos animais e humanos.

SUMMARY

Calcium phosphate bioceramics have been demonstrated a good alternative for bone replacing, due its intrinsic bioativity, despite some manipulation difficulties. A significant amount of scaffolds for tissue engineering are made from biodegradable polymers such as PLGA and PLA, known by its plasticity and degradability. Thus, this two kinds of biomaterias could have its proprieties optimized by forming composites. Additionally, tetracycline (TCN) is well known for its large spectrum antibiotic, anti-inflammatory and other non-antimicrobial activities. The objective of the present work was to evaluate the biological response of composites of biodegradable polymers (PLA, PLGA) dispersed in a bioceramic matrix (Osteosynt[®] - BC) with tetracycline addition. It were performed direct contact test (ASTM F-813), eluation test (USP XXIII) and biocompatility test by macroscopic and microscopic analyses on outbread swiss mice 1, 7, 13, 21, 28 and 56 days after subcutaneus implantation. It was verified low citotoxicity *in vitro* of the composites PLA:BC and PLGA:BC when compared to the controls. It was observed a low to moderate inflammatory response for most of the groups. The tissue showed normal pattern after 21 days for all the groups. It could be noted angiogeseis and celular adsortion. TCN addition favorably interfered in the *in vitro* biological response. Macroscopic observations showed that the composites with PLGA degradated much faster than those with PLA, as same as the controls PLGA and PLA. In conclusion, the composites were biocompatible, promising possible application for bone tissue engineering.

REFERÊNCIAS

1. Referência:

1. GOODSON, J.M. Drug Delivery p 65, In: Perspectives on Oral Antimicrobial Therapeutics.. The American Academy of Periodontology. United States of America, 1987.ALEXANDER et al. Classes of materials used in medicine. In: RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, 1st ed. San Diego: Academic Press, 1996, cap. 2, p. 37-132.
2. ANAND, V. (ISO 10993) Biocompatibility Safety Assessment of Medical Devices: FDA/ISO and Japanese Guidelines, *Medical Device & Deagnostic Industry*, p.206, Jan. 2000.
3. ANDRADE, J.D. Principles of protein adsorption. In: J.D. Andrade Editor, *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers* Plenum Press, New York, 1985, p. 1-80 *apud* RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, 1996, 1st ed. San Diego: Academic Press, 484p.
4. ASTM. Practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices. Annual Book of *ASTM Standards*, 13.01 F813: 233-236, 1995a.
5. ASTM, American Society for Testing and Materials, STP 447.
6. ATHANASIOU, K.A.; NIEDERAUER, G.G.; AGRAWAL, G.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, v. 17, n. 2, p. 93-102.
7. BABENSE, J.E.; ANDERSON, J.M.; MCINTIRE, L.V., et al. Host response to tissue engineered devlces. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 33, p, 111-139, 1998 *apud* TEMENOFF, J.S.; LU, L.; MIKOS, A.G. Bone-tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds. In: DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd., 1999, cap. 42, p. 454-461.
8. BAKSH, D.; DAVIES, J.E. Design strategies for 3-dimensional in vitro bone growth in tissue-engineering scaffolds. In: DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd., 1999, cap. 445, p. 489-495.

9. BARSOUM, M.W. *Fundamentals of ceramics*. New York, McGraw-Hill, 1997.
10. BERNARDO, E.C. Estudo de biocerâmicas de HAP- β TCP como depósito para liberação de fármacos. 2000. 48f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
11. BLACK, J. Biological Performance of Material – Fundamentals of Biocompatibility, Ed. Marcel Decker, Inc. New York, 1992, 388p.
12. BLACK, J. Orthopedic Biomaterials in Research and Practice. Ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1988, 394p.
13. BLANCO-PRIETO, M.J.; FATTAL, E.; PUISIEUX, F.; COUVREUR, P. The multiple emulsion as a common step for the desing of polymeric microparticles. In: GROSSIORD, J.L.; SEILLER, M. Multiple emulsions: struture, properties and applications. França. Editions de Santé; 1998. P.397-435.
14. BLOMFIELD, P.; WHEATLY, D.J.; PRECOTT, R.J.; MILLER, H.C. Twelve-year comparison of a Bjorl-Shiley mechanical heart valve with a porcine bioprosthesis. *New England J Med*; v.324, p.573, 1991.
15. BORETOS, J. W.; ÉDEN, M. Contemporary Biomaterials, 1984. In: <http://ocw.mit.edu>.
16. BÖSTMAN, O.; PIHLAJAMÄKI, H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*, v.21, n.24, p.2615-2621, 2000.
17. BOSTROM, R.D.; MIKOS, A.G. Tissue engineering of bone. In: ATALA, A; MOONEY, D.; VACANTI, J.V.; LANGER, R. *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*. 1ª ed. Boston: Birkhäuser, 1997, cap. 4, p. 199-234.
18. BOYAN, B.D. et al. Role of material surfaces in regulating bone and cartilafe cell response. *Biomaterials*, v. 17, p. 137-146, 1996.
19. BURG, K.J.L., PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 21, n. 23, p. 2347-2359, Dec. 2000.
20. CAO, W., HENCH, L.L. Bioactive materials. *Ceramics Int.*, v.22, p.493, 1996.

21. CAPLAN, A.I. New logic for tissue engineering: multifunctional and biosmart delivery vehicles. In: DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd., 1999, cap. 40, p. 441-446.
22. CHTARTO, A.; TENENBAUM, L.; VELU, T.; BROTCCHI, J.; LEVIVIER, M.; BLUM, D. Minocycline-induced activation of tetracycline-responsive promoter. *Neuroscience Letters*, v. 352, n. 3, p. 155-158, Dec. 2003.
23. CHICUREL, M.E.; CHEM, C.S.; INGBER, D.E. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v. 10, p. 232-239, 1998.
24. CHOI, D.; MARRA, K. G.; KUMTA, P. N. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composites. *Materials Research Bulletin*, v. 39, n. 3, p. 417-432, Mar. 2004.
25. COTELL, C., GORBATKIN, S. M., GROBE, G., MEYER, A. E. Thin Films and Surfaces for Bioactivity and Biomedical Applications. *Mat Res Soc Symp, Proc.* 414, p.165-70, 1996.
26. COURY, A.J. *et al.* Degradation of materials in the biological environment. In: RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine, 1st ed. San Diego: Academic Press, 1996, cap. 6, p. 243-282.
27. DANIELS, A.U., MELISSA, K.O., ANDRIANO, K.P. *J Appl Biomater*, v.1, n.1, p.57, 1990.
28. DASH, A.K.; CUDWORTH II, G.C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. Review. *Journal of Pharmacological and Toxicologic Methods*, v. 40, p.1-12, 1998.
29. DE BRUIJN, J.D.; DE GROOT, K.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; HUIPIN, Y. Osteoinductive ceramic materials. United States Patent, n. 6 511 510, Jan. 28, 2003.
30. DOMB, A.J.; AMSELEM, S.; MANIAR, M. Biodegradable polymers as drug carrier systems. *Drug carrier systems*. p. 399-431, 2001.
31. DOMINGUES, Z.R.; CORTES, M.E.; GOMES, T.A.; DINIZ, H.F.; FREITAS, C.S.; GOMES, J.B.; FARIA, A.F.C.; SINISTERRA, R.D. Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associate with β -ciclodextrin. *Biomaterials*, v. 25, p. 327-333, 2004.
32. ELGENDY, H.M.; NORMAN, M.E.; KEATON, A.R.; LAURENCIN, C.T. Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: an

- approach towards the development of a bone-bioerodible polymer composite material. *Biomaterials*, v. 14, p. 263-269, 1993.
33. ERICSSON, T.M.A., et al. Influence of sub-salicylate bismuth on absorption of doxycycline. *JAMA*, 23:285-286, 1988.
34. ESPOSITO, E.; CERVELLATI, C.F.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Biodegradable microparticles for sustained delivery of tetracycline to the periodontal pocket: formulatory and drug release studies. *J. Microencapsulation*, v. 14, n. 2, p. 175-187, 1997.
35. ESTRELA, C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo, SP: Artes Médicas, 2001. 483p.
36. FITCH, R.; KERWIN, S.; NEWMAN-GAGE, H.; SINIBALDI, K.R. Bone autografts and allografts in dogs. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, v. 19, n. 5, p. 558-578, 1997.
37. GEBELEIN, C. G. Biomedical Application of Polymers. *Rapra Review Reports*, v.5, n.3, 1991.
38. GOMBOTZ, W.R.; PETTIT, D.K. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjugate Chem*, v. 6, p. 332-351, 1995 *apud* WONG, W.H.; MOONEY, D.J. Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. In: ATALA, A; MOONEY, D.; VACANTI, J.V.; LANGER, R. *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*. 1^a ed. Boston: Birkhäuser, 1997, cap. 4, p. 51-82.
39. GOODSON, J.M. Drug Delivery p 65. In: Perspectives on Oral Antimicrobial Therapeutics. The American Academy of Periodontology. United States of America, 1987.
40. GRIFFON, D.J. Evaluation of osteoprodutive biomaterials: allograft, bone inducing agent, bioactive glass, and ceramics. 2002. 105p. Academic Dissertation – Department of Clinical Veterinary Sciences, Division of Surgery Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland.
41. GRECO, R.S. Implantation biology: The host response and biomedical devices. Boca Raton, CRC Press, 1994 *apud* ATALA, A; MOONEY, D.; VACANTI, J.V.; LANGER, R. In: Tissue Engineering: Synthetic biodegradable polymer scaffolds. Ed. Birkhäuser, Boston, 1997.
42. GUPTA, R.K.; ALROU, J.; ALONSO, A.J.; LANGER, R.; SIBER, G.R. Chronic local tissue reactions, term immunogenicity and immunologic priming of mice and guinea pigs to tetanus toxoid encapsulated in biodegradable polymer microspheres composed of poly lactide-co-glycolide polymers. *Vaccine*, v.15, n.16, p.1716-1723, 1997.

43. HASHIMOTO-UOSHIMA, M.; ISHIKAWA, I.; KINOSHITA, A.; WENG, H.T.; ODO, S. Clinical and histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, v. 15, p. 204-213, 1995 apud NASR, H.F.; AICHELMANN-REIDY, M.E.; YUKNA, R.A. Bone and bone substitutes. *Periodontology 2000*, v. 19, p.74-86, 1999.
44. HENCH, L. L. Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 81, p. 1705-1728, 1998a.
45. HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v.19, p.1419, 1998b
46. HENCH, L.L., WILSON, J. Clinical Performance of skeletal prostheses. London: Chapman & Hall, 1996.
47. HENCH, L.L. The Bone-Biomaterial Interface. Edited by J.E. DAVIES. University of Toronto, p.33-48, 1991.
48. HIGASHI, S.; YAMAMURO, T.; NAKAMURA, T. et al. Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers. *Biomaterials*, v. 7, p. 183-187, May 1986.
49. HOLLINGER, J.O.; BATTISTONE, G.C. Biodegradable bone repair materials. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, v. 207, p. 290-305, 1986.
50. HORBETT, T.A.; BRASH, J.L. Proteins at interfaces: current issues and future prospects. In: J.L. Brash and T.A. Horbett Editors, Proteins at interfaces: physicochemical and biochemical studies, American Chemical Society, Washington, DC, 1987, p. 1-33.
51. HORBETT, T.A.; RATNER, B.D.; SCHAKENRAAD, J.M.; SCHOEN, F. Some background concepts. In: RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine, 1st ed. San Diego: Academic Press, 1996, cap. 3, p. 133-164.
52. IGNJATOVIC, N.; TOMIC, S.; DAKIC, M.; MILJKOVIC, M.; PLAVSIC, M.; USKOKOVIC, D. synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials*, v. 20, p. 809-816, 1999.
53. IGNJATOVIC, N.; SAVIC, B.; NAJMAN, S.; PLAVSIC, M.; USKOKOVIC, D. A study of HAp/PLLA, composite as a substitute for bone powder, using FT-IR spectroscopy. *Biomaterials*, v. 22, p. 571-575, 2001.

54. IGNJATOVIC, N.; USKOKOVIC, D. Synthesis and application of hydroxyapatite/poly(lactide) composite biomaterial. *Biomaterials*, In Press, 2004.
55. ISO. Biological evaluation for medical devices tests for cytotoxicity in vitro methods. International Standards Organization, ISO/10993-5. Geneve, Switzerland, 1992.
56. ISO. Biological evaluation for medical devices. Part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. International Standards Organization, ISO/10993-5. London, 1994.
57. JAIN, R.; SHAH, N.H.; MALICK, A.W.; RHODES, C.T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 24, p. 703-27, 1998.
58. JAIN, R.A The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) devices. *Biomaterials*, v. 21, p. 2475-90, 2000.
59. KALISH, R.S.; KOUJAK, S. Minocycline inhibits antigen processing for presentation to human T cells: additive inhibition with chloroquine at therapeutic concentrations. *Clinical Immunology*, v. 113, n. 3, p. 270-277, Dec. 2004
60. KAO, W.J.; LEE, D. In vivo modulation of host response and macrophage behavior by polymer networks grafted with fibronectin-derived biomimetic oligopeptides: the role of RGD and PHSRN domains. *Biomaterials*, v. 22, n. 21, p. 2901-2909, 2001.
61. KOHN, J. Biomaterials science at a crossroads: Are current product liability laws in the United States hampering innovation and the development of safer medical implants. *Pharm. Res*, v.13, n. 6, p. 815-819, 1996a.
62. KOHN, J. Tissue Engineering: An Overview, *MRS Bulletin*, v. 18, Nov. 1996b.
63. KIKUCHI, M.; TANAKA, J.; ITOH, S. et al. Mater. Res. Soc. Symp., Proc. 599, p. 51, 2000 apud CHOI, D.; MARRA, K. G.; KUMTA, P. N. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composites. *Materials Research Bulletin*, v. 39, n. 3, p. 417-432, Mar. 2004.
64. KIM, H.; KNOWLES, J.C.; KIM, H. Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery, *Biomaterials*, v. 25, n. 7-8, p. 1279-1287, Mar./Apr. 2004.
65. KOEMPEL, J.A.; PATT, B.S.; O'GRADY, K.; WOZNEY, J.; TORIUMI, D.M. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the integration of

porous hydroxyapatite implants with bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 41, p. 359-363, 1998.

66. KÖSE, G.T.; KORKUSUZ, F.; KORKUSUZ, P.; PURALI, N.; ÖZKUL, A.; HAS, V. Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study. *Biomaterials*, v. 24, n. 27, p. 4999-5007, Dec. 2003.
67. LAURENCIN, C.T.; ELGENDY, H. The biocompatibility and toxicity of degradable polymeric materials: implications for drug delivery polymeric. Site-specific Pharmacotherapy. John Wiley & Sons Ltda, 1994.
68. LAURENCIN, C.T.; AMBROSIO, A.M.A.; BORDEN, M.D., et al. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v.1, p. 19-46, 1999 apud LAURENCIN, C.T.; LU, H.H. Polymer-ceramic composites for bone-tissue engineering. In: DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd., 1999, cap. 43, p. 462-472.
69. LAURENCIN, C.T.; LU, H.H. Polymer-ceramic composites for bone-tissue engineering. In: DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd., 1999, cap. 43, p. 462-472.
70. LAWSON, A.C.; CZERNUSZKA, J.T. Collagen-calcium phosphate composites. *Proc. Instr. Mech. Eng.*, v. 212, n. 11, p. 413- 425, 1998 apud RODRIGUES, C.V.M.; SERRICELLA, P.; LINHARES, A.B.R. et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 24, p. 4987-4997, 2003.
71. LERICHE R, POLICARD A: The normal and pathological physiology of bone and its problems. Leriche R, Policard A, eds. London, Henry Kimpton, 1928 apud GRIFFON, D.J. Evaluation of osteoproduktive biomaterials: allograft, bone inducing agent, bioactive glass, and ceramics. 2002. 105p. Academic Dissertation – Department of Clinical Veterinary Sciences, Division of Surgery Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland.
72. LEWIS, DH. Controlled release of bioactive agents from lactic/glycolide polymers. In: CHAIN M, LANGER R. Biodegradable polymers as drug delivery systems. New York: Marcel Dekker; 1990. p. 01-41.
73. LIN, F.H.; CHEN, T.M.; LIN, C.P.; LEE, C.J. The merit of sintered PDLLA/TCP composites in management of bone fracture internal fixation. *Artif. Organs*, v. 23, p. 186-194, 1999.
74. LIN, F.H.; YAO, C.-H.; SUN, J.-S.; LIU, H.-C.; HUANG, C.-W. Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin. *Biomaterials*, v. 19, p. 905-917, 1998.

75. LOBO, S.H. Avaliação histomorfométrica da regeneração do tecido ósseo utilizando-se biocerâmica de hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato associada ou não ao concentrado de plaquetas: estudo em coelhos *New Zealand*. 2002. 172f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
76. MA, P.X; LANGER, R. *Methods Molecul. Med.*, v. 18, p. 47, 1999 *apud* CHOI, D.; MARRA, K. G.; KUMTA, P. N. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composites. *Materials Research Bulletin*, v. 39, n. 3, p. 417-432, Mar. 2004.
77. MARRA, K.; CAMPBELL, P.; DIMILLA, P.; *et al.* *Mater. Res. Soc. Symp., Proc.* 550, p. 155, 1999 *apud* CHOI, D.; MARRA, K. G.; KUMTA, P. N. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composites. *Materials Research Bulletin*, v. 39, n. 3, p. 417-432, Mar. 2004.
78. MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Prog. Polym. Sci.*, v. 23, p. 563-80, 1998.
79. MIKOS, A.G.; THORSEN, A.J.; CZERWONKA, L.A.; *et al.* *Polymer*, v. 35, n.5, p.1068, 1994 *apud* CHOI, D.; MARRA, K. G.; KUMTA, P. N. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composites. *Materials Research Bulletin*, v. 39, n. 3, p. 417-432, Mar. 2004.
80. MINAS GERAIS, Secretaria de Estado de Saúde. <http://www.saude.mg.gov.br/2003>.
81. MORRIS, L.; BAJPAI, P.K. Development of a resorbable tricalcium phosphate (TCP) amine antibiotic composit. In: *Biomedical Materials and Devices*. Eds. J.S. Janker and B.L.Hiammara. Pittsburgh, PA: Materials Research Society, p. 293-300 *apud* DASH, A.K.; CUDWORTH II, G.C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. Review. *Journal of Pharmacological and Toxicologic Methods*, v. 40, p.1-12, 1998.
82. MULLIKEN, J.B.; KABAN, L.B.; GLOWACKI, J. Current research review – Induced osteogenesis – The biological concept and clinical applications. *J. Surg. Res.*, v.37, p.487-496, 1984 *apud* GRIFFON, D.J. Evaluation of osteoproduative biomaterials: allograft, bone inducing agent, bioactive glass, and ceramics. 2002. 105p. Academic Dissertation – Department of Clinical Veterinary Sciences, Division of Surgery Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland.
83. NAGAHARA, K., ISOGAI, M., SINIBATA, K., *et al.* Investigation of Bone Formation using Non-Crystalline Calcium Phosphate Glass in Beagle Dogs. *Int. J. Oral Maxillofac.*, v.7, n.1, p.72, 1992.

84. NAJMAN, S.; DORDEVIC, L.; SAVIC, V.; IGNJATOVIC, N.; PLAVSIC, M.; USKOKOVIC, D. Changes of Hap/PLLA biocomposites and tissue reaction after subcutaneous implantation. *Medicine and Biology*, v. 10, n. 3, p. 131-134, 2003.
85. NASR, H.F.; AICHELMANN-REIDY, M.E.; YUKNA, R.A. Bone and bone substitutes. *Periodontology 2000*, v. 19, p.74-86, 1999.
86. OTSUKA, M.; MATSUDA, Y.; YU, D.; WONG, J.; FOX, J.L.; HIGUSHI, W.L. A novel skeletal drug delivery system for anti-bacterial drugs using self setting hydroxyapatite cement. *Chem. Pharm Bull.*, v. 38, p. 3500-3503 *apud* DASH, A.K.; CUDWORTH II, G.C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. Review. *Journal of Pharmacological and Toxicologic Methods*, v. 40, p.1-12, 1998.
87. PARK, J.B.; LAKES, R.S. Biomaterials: An Introduction. Plenum Press, New York, N.Y., 1992. 394p.
88. PARK, Y.J.; KYUNG, H.N.; SOO, J.H. *et al.* Porous poly(L-lactide) membranes for guided tissue regeneration controlled drug delivery: membrane fabrication and characterization. *Journal of Controlled Release*, v. 43, p. 151-160, 1997.
89. PATARO, A.L.; FRANCO, C.F.; SANTOS, V.R.; CORTÉS, M.E., SINISTERRA, R.D. Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine. *Biomaterials*, v. 24, n. 6, p. 1075-1080, Mar. 2003.
90. POPOVIC, N.; SCHUBART, A.; GOETZ, B.D.; ZHANG, S-C.; LININGTON, C.; DUNCAN, I.D. Inhibition of Autoimmune Encephalomyelitis by a Tetracycline. *Ann. Neurol.*, v. 51, p. 215–223, 2002.
91. PRUZANSKI, W.; GREENWALD, R.A.; STREET, L.P.; LAUBERTE, F.; STEFANSKI, E.; VADAS, P. Inhibition of enzymatic activity of phospholipases A₂ by minocycline and doxycycline. *Biochemical Pharmacology*, v. 44, n. 6, p. 1165-1170, Sep. 1992.
92. PUELACHER, W.C.; MOONEY, D.; LANGER, R.; UPTON, J.; VANCANTI, J.P.; VACANTI, C.A. Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials*, v. 15, p. 774-778, 1994.
93. PULEO, D.A.; NANCIB, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, v. 20, n. 23-24, p. 2311-2321, Dec. 1999.
94. RAMOSHEBI, L.N. *et al.* Tissue engineering: TGF- β superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Exp. Rev. Mol. Med.*, Sep. 2002.

95. RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine, 1996, 1st ed. San Diego: Academic Press, 484P.
96. RAVAGLIOLI, A., KRAJEWSKI, A., BIASINI, V., et al. Interface Between Hydroxyapatite and Mandibular Human Bone Tissue. *Biomaterials*, v.13, n.3, p.162, 1992.
97. RECOPE, Relatório da Rede de Cooperativas de Pesquisa. SINISTERRA, R.D.; CORTÉS, M.E.; PATARO, A.L. Material implantável: Compósitos de polímeros biodegradáveis em matriz de biocerâmica bifásica de acordo com complexo morfogenético ósseo associado a fatores potencializadores na indução e fixação óssea - Testes biológicos. 2004. 100f. Projeto associado de pesquisa entre o Instituto de Ciências Exatas-UFMG e o Instituto de Ciências Biológicas-UFMG com a Indústria EINCO Biomateriais Ltda.
98. RIPAMONTI, U.; VAN DEN HEEVER, B.; VAN WYK, J. Expression of the osteogenic phenotype in porous hydroxyapatite implanted extraskeletally in baboons. *Matrix*, v. 13, p. 491-502, 1993.
99. RIPAMONTI, U.; DUNEAS, N. Tissue Engineering of Bone by Osteoinductive Biomaterials. *MRS Bulletin*, v. 21, n. 11, Nov. 1996.
100. RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, v.17,n. 1, p. 31-35, Jan. 1996.
101. RIPAMONTI, U.; REDDI, A.H. Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 101, p. 227-239, 1998.
102. RIPAMONTI, U. Smart biomaterials with intrinsic osteoinductivity: geometric control of bone differentiation. In: DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Graphic and Printing Ltd., 1999a, cap. 19, p. 215-222.
103. RIPAMONTI, U.; CROOKS, J.; KIKBRIDE, A.N. Sintered porous hydroxyapatites with intrinsic osteoinductive activity: geometric induction of bone formation. *S. Afric. J. Sci.*, v. 95, p. 335-343, 1999b.
104. SÃO PAULO, Secretaria de Estado de Saúde. <http://www.saude.sp.gov.br/>, 2003.
105. SCARABELLI, T.M.; STEPHANOU, A.; PASINI, E.; GITTI, G.; TOWNSEND, P.; LAWRENCE, K.; CHEN-SCARABELLI, C.; SARAVOLATZ, L.; LATCHMAN, D.; KNIGHT, R.; GARDIN, J. Preclinical investigation: Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 43, n. 5, p. 865-874, Mar. 2004.

106. SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J.; PIEHLER, H.R. Pathological considerations in replacement cardiac valves. *J. Soc. Cardio. Path.*, v.1, n.1, p.29, 1992.
107. SEYMOUR, R.A.; HEASMAN; P.A. Tetracyclines in the management of periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.*, v. 22, p. 22-35, 1995.
108. SHIKINAMI, Y.; OKUNO, M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials*, v. 20 p. 859-877, 1999.
109. STANLEY, H.R. Toxicity testin of dental materials. Boca Raton, FL, CRC Press: 1985 *apud* ESTRELA, C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. Ed. Artes Médicas, São Paulo, SP. 2001. 483p.
110. STEVENSON, S. Biology of bone grafts. *Orthop. Clin. N. Am.*, v.30, n. 4, p. 543-551, 1999 *apud* GRIFFON, D.J. Evaluation of osteoprodutive biomaterials: allograft, bone inducing agent, bioactive glass, and ceramics. 2002. 105p. Academic Dissertation – Department of Clinical Veterinary Sciences, Division of Surgery Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland.
111. TEMENOFF, J.S.; LU, L.; MIKOS, A.G. Bone-tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds. In: DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd., 1999, cap. 42, p. 454-461.
112. TORMALA, P.; VAINIONPAA, S.; ROKKANEN, P.; HELEVIRTA, P.; PELLINEN, M. Surgical biocomposite material and a meted for producing the material. EP 0290562 B1, 1993 *apud* IGNJATOVIC, N.; USKOKOVIC, D. Synthesis and application of hydroxyapatite/poly lactide composite biomaterial. *Biomaterials*, In Press, 2004.
113. TORZILLI, P.A. Biomedical Engineering - Handbook of Engineering in Medicine and Biology - Section A- General Data, p.225-251, Ed. Chemical Rubber, Cleveland, 1976.
114. URIST, M.R. Emerging concepts of Bone Morphogenetic Protein. In: Dixon AD, Sarnat BG, Hoyte DAN eds. Fundamentals of bone growth: methodology and applications. Boston: CRC Press, 1990, p.189-198 *apud* GRIFFON, D.J. Evaluation of osteoprodutive biomaterials: allograft, bone inducing agent, bioactive glass, and ceramics. 2002. 105p. Academic Dissertation – Department of Clinical Veterinary Sciences, Division of Surgery Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland.
115. URIST, M.R. Bone transplants and implants. In: Urist MR, ed. Fundamental and clinical bone physiology. Philadelphia: Lippincott, 1980;331-368 *apud* GRIFFON, D.J. Evaluation of osteoprodutive biomaterials: allograft, bone inducing agent,

bioactive glass, and ceramics. 2002. 105p. Academic Dissertation – Department of Clinical Veterinary Sciences, Division of Surgery Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland.

116. US PHARMACOPEIA. Biological reactivity tests, in vitro. In: United States Pharmacopeia, USP- XXIII . United States Pharmacopeial Convention Inc. Rockville, MD, p.1697-1699, 1995.
117. VERHEYEN, C. KLEIN, C. DE BLIECKHOGERVORST, J. WOLKE, J.; VAN BLITTERSWIJN, C. DE GROOT, K. Evaluation of hydroxyapatite/poly(L-lactide) composites: physico chemical properties. *J. Mater. Sci.: Mater. M.*, v. 4, p. 58-65, 1993 *apud* IGNJATOVIC, N.; USKOKOVIC, D. Synthesis and application of hydroxyapatite/poly(lactide) composite biomaterial. *Biomaterials*, In Press, 2004.
118. VOGELSON, C.T. Advances in drug delivery systems: innovative pharmaceutical treatments require innovative methods of administration. *Modern Drug Discovery*, p.49-52, April 2001.
119. WHANG, K.; THOMAS, C.H.; HEALY, K.E.; et al. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer*, v. 36, p. 837-842, 1995 *apud* TEMENOFF, J.S.; LU, L.; MIKOS, A.G. Bone-tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds. In: DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd., 1999, cap. 42, p. 454-461.
120. WILLIAMS, D.F. Definitions in Biomaterials. Progress in Biomedical Engineering. Amsterdam, Elsevier, 1987 *apud* HORBETT, T.A.; RATNER, B.D.; SCHAKENRAAD, J.M.; SCHOEN, F. Some background concepts. In: RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. 1st ed. San Diego: Academic Press, 1996, cap. 3, p. 133-164.
121. WIKESJÖ, M.E.U.; BAKER, J.P.; CHRISTERSSON, L.A. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentine surfaces. *J. Periodont. Res.*, v. 21, n. 4, p. 322–329, 1986.
122. WYKROTA, L.L.; et al. Clinical evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic use in orthopaedic lesions. *Bioceramics*, v. 11, p. 641-644, 1998.
123. WYKROTA, L.L.; WYKROTA, F.H.L.; GARRIDO, C.A. Long-term bone regeneration in large human defects using calcium-phosphate particulate. In: DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd., 1999, cap. 48, p. 516-525.
124. WYKROTA, L.L. Processo de obtenção de material biocerâmico e implante de complexo morfogenético ósseo. PI 9104220-8, 1991.

125. WINET, H.; ALBREKTSSON, T. Wound healing in the bone chamber 1: neoosteogenesis during transition from the repair to the regenerative phase in the rabbit tibial cortex. *Orthop. Res.*, v. 6, p. 245-256, 1988.
126. WINET, H.; BAO, J.Y., MOFFAT, R. Neo-osteogenesis of haversian trabecule through a bone chamber implanted in a rabbit tibial cortex: a control mode. *Calcif. Tissue Int.*, v. 47, p. 24-34, 1990.
127. WONG, W.H.; MOONEY, D.J. Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. In: ATALA, A.; MOONEY, D.; VACANTI, J.V.; LANGER, R. *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*. 1^a ed. Boston: *Birkhäuser*, 1997, cap. 4, p. 51-82.
128. YAMADA, S.; *et al.* Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials*, v. 18, n. 15, p. 1037-1041, 1997.
129. YAMASAKI, H.; SAKAI, H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials*, v. 13, n. 5, p. 308-312, 1992.
130. YANG, Z.; YUAN, H.; TONG, W.; ZOU, P.; CHEN, W.; ZHANG, X. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials*, v.17,n.22, p. 2131-2137, Nov. 1996.
131. YASKO, A., FELLINGER, E., WALLER, S. TOMIN, A., PETERSON, M., WANGE, E, LANE, J. *Trans. Orth. Res. Soc.*, v.17, p.71, 1992.
132. YASUNAGA, T.; MATSUSUE, Y.; FURUKAWA, T.; SHIKINAMI, Y.; OKUNO, M.; NAKAMURA, T. Nonding behavior of ultrahigh strength unsintered hydroxyapatite particles/poly L-lactide) composites to surface of tibial cortex in rabbits, *J. Biomed. Mater.Res.*, v. 47, p. 412-419, 1999.
133. YASZEMSKI, M.J.; PAYNE, R.G. HAYES, W.C.; et al. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*, v. 17, p. 175-185, 1996.
134. YU, D.; WONG, J.; MATSUDA, Y.; FOX, J. HIGUCHI, W.I.; OTSUKA, M. Self setting hydroxyapatite cement: a novel skeletal drug delivery system for antibiotics. *J. Pharm Sci*, v. 1, p. 529-531 *apud* DASH, A.K.; CUDWORTH II, G.C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. Review. *Journal of Pharmacological and Toxicologic Methods*, v. 40, p.1-12, 1998.
135. YUBAO, L., KLEIN, C. P. A. T., ZHANG XINGDONG, DE GROOT, K. et al. Formation of a Bone Apatite-Like Layer on the Surface of Porous Hydroxyapatite Ceramics. *Biomaterials*, v.15, n.10, p.835, 1994.

136. ZIATS, N.P., MILLER, K.M, ANDERSON, J.M. *In vitro* and *in vivo* interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials*, v. 9, p. 5-13, 1988.

ANEXO 1

ANEXO 2 – Análise qualitativa do número e tipo de células inflamatórias de tecido subcutâneo dos camundongos após os dias 1, 7, 13, 21, 28 e 56

Dia	Grupo	Infiltrado	Tipo	Macrófagos	Cel. Gigantes
1	N1	+++	PMN	++	++
		+++	PMN	+	++
	N2	++	PMN	++	++
		+	PMN	+	+
	N3	++	PMN	++	++
		+++	PMN	+	+
	N4	+++	PMN	+	+
		+++	PMN	+	+
	C1	+++	PMN	++	+
	C2	+++	PMN	++	+
BC	+	PMN, LP	+	-	
	-	-	-	-	
A	-	-	-	-	
H	-	-	-	-	
7	N1	++	PMN, LP	++	++
		+++	PMN, LP	++	++
		+++	PMN, LP	+	++
	N2	+++	PMN, LP	+	+
		++	PMN, LP	+	+
		++	LP, PMN	+	+
	N3	++	LP, PMN	+	+
		++	LP, PMN	+	+
		+++	LP, PMN	+	+
	N4	+++	LP, PMN	+	+
		+++	LP, PMN	++	+
		++	LP, PMN	+	+
	C1	++	LP, PMN	+	+
	C2	++	LP, PMN	+	+
BC	+	PMN, LP	-	-	
	+	PMN, LP	-	-	
A	-	-	-	-	
H	-	-	-	-	
13	N1	++	LP, PMN	+	+
		+	LP, PMN	-	-
	N2	+	LP, PMN	-	+
		+	LP, PMN	-	-
		+	LP, PMN	-	-
	N3	+	LP	-	-
		+	LP	-	-
		+	LP	-	-
	N4	+	LP, PMN	+	+
		-	LP, PMN	-	-
		+	LP, PMN	-	-
	C1	-	-	-	-
	C2	-	-	-	-
BC	+	PMN	-	-	
	-	-	-	-	
A	-	-	-	-	
H	-	-	-	-	

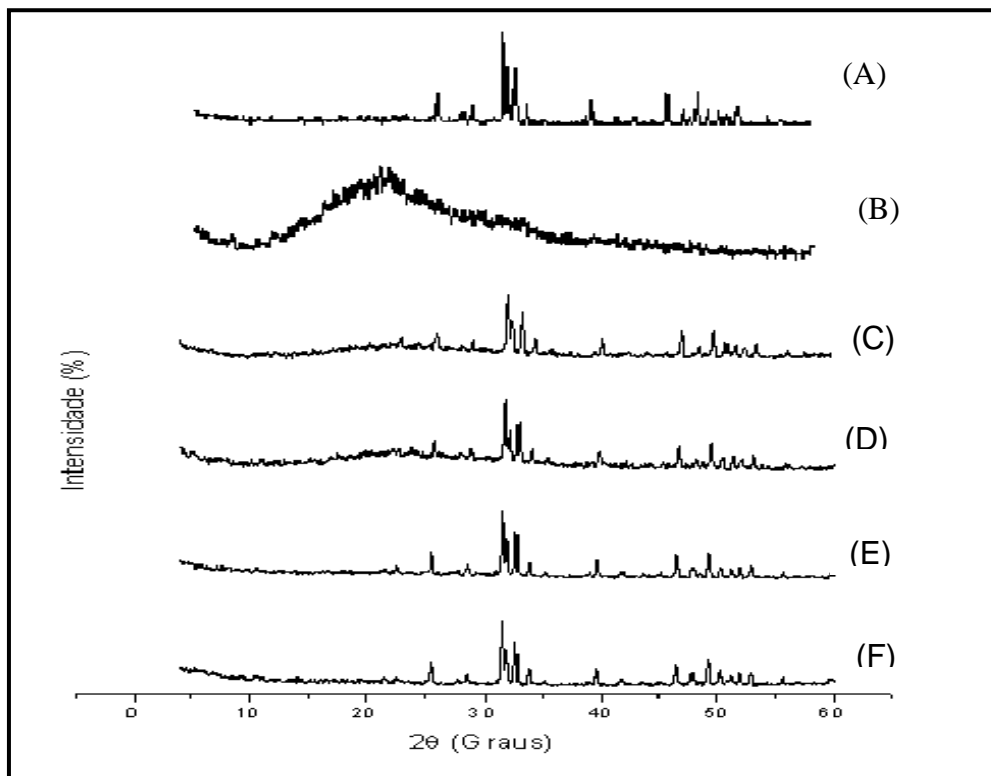
N1- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica; N2- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; N3- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica; N4- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; C1- PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50; C2- D,L Poli (Ácido Lático) ; BC: biocerâmica; A – animal apenas incisionado; H – animal hígido; PMN – polimorfonuclear; LP - linfoplasmocitário

Dia	Grupo	Infiltrado	Tipo	Macrófagos	Cel. Gigantes
21	N1	+	LP	+	+
		-	-	-	-
	N2	-	-	-	-
		-	-	-	-
	N3	+	LP	+	+
		+	LP	+	+
		+	LP	+	+
	N4	+	LP	+	+
		+	LP	+	+
C1	+	LP	+	+	
C2	-	-	-	-	
BC	-	-	-	-	
AI	-	-	-	-	
H	-	-	-	-	
28	N1	-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
	N2	+	LP	+	+
		-	-	-	-
		-	-	-	-
	N3	+	LP	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
	N4	-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
	C1	-	-	-	-
-		-	-	-	
-		-	-	-	
C2	-	-	+	+	
	-	-	-	-	
	+	LP	-	-	
BC	-	-	-	-	
A	-	-	-	-	
H	-	-	-	-	
56	N1	-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
	N2	-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
	N3	+	LP	-	-
		-	-	-	-
	N4	+	LP	-	-
		-	-	-	-
	C1	-	-	-	-
	C2	-	-	-	-
		-	-	-	-
BC	-	-	-	-	
	-	-	-	-	
AI	-	-	-	-	
H	-	-	-	-	

N1- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica; N2- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; N3- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica; N4- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; C1- PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50; C2- D,L Poli (Ácido Lático) ; BC: biocerâmica; A – animal apenas incisionado; H – animal hígido; PMN – polimorfonuclear; LP - linfoplasmocitário

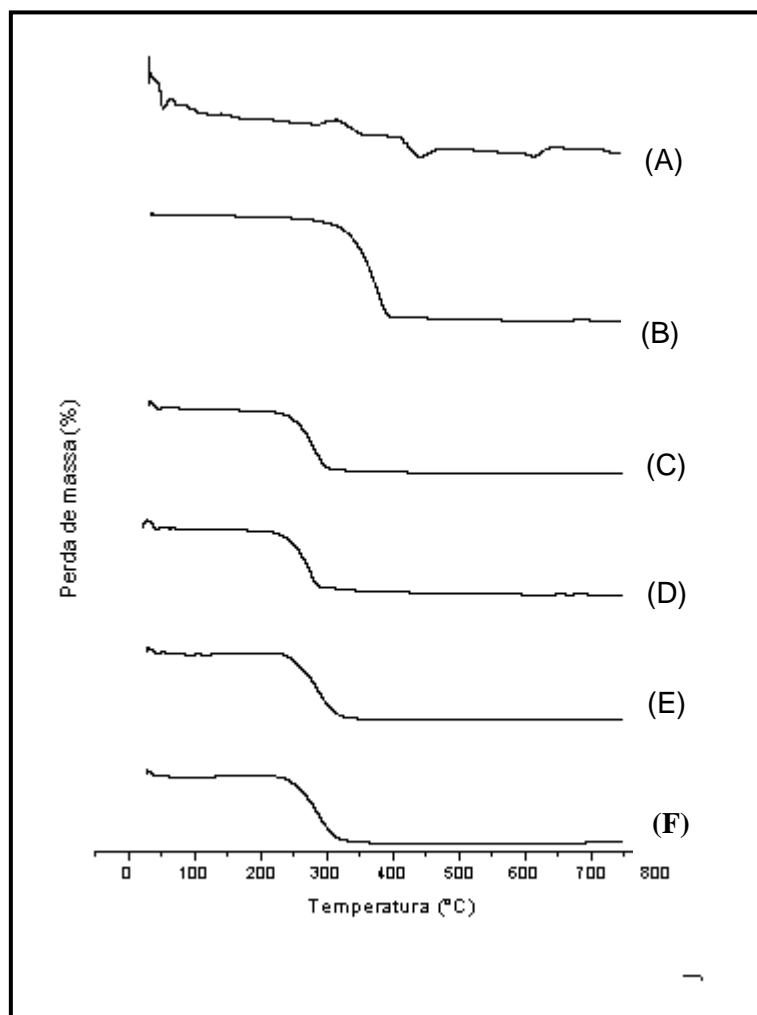
ANEXO 3 – Difratogramas de Raios-X para: A) BC; B) PLGA; e compósitos PLGA:BC
C) 15:85; D) 20:80, E) 25:75 e F) 25:75 % p/p após aquecimento de 75°C. Fonte:
RECOPE (2004), p. 62

Comportamento semicristalino da biocerâmica contrapondo-se ao padrão cristalográfico amorfo dos polímeros PLGA e PLA, assim como uma maior desorganização da rede cristalina dos compósitos influenciada pelo aumento da porcentagem de PLGA. Sugestão de aumento do caráter hidrofóbico dos compósitos quando comparados aos polímeros separadamente (RECOPE, 2004).



ANEXO 4 – Curvas TG para: A) BC, B) PLGA e compósitos C) 15:85, D) 20:80, E) 25:75 e F) 25:75 PLGA:BC % p/p após aquecimento a 75°C. Fonte: RECOPE (2004), p. 59.

Menor estabilidade térmica dos compósitos quando comparados ao controle PLGA (RECOPE. 2004).



ANEXO 5 – Curvas TG para: A) BC, B) PLGA, C) TCN e compósitos contendo D)TCN 1%, E)TCN 0.1%, F) TCN 0.01% e G) sem TCN. Fonte: RECOPE (2004), p. 72

Maior estabilidade térmica dos compósitos proporcionada pelo aumento da concentração de tetraciclina (RECOPE. 2004).

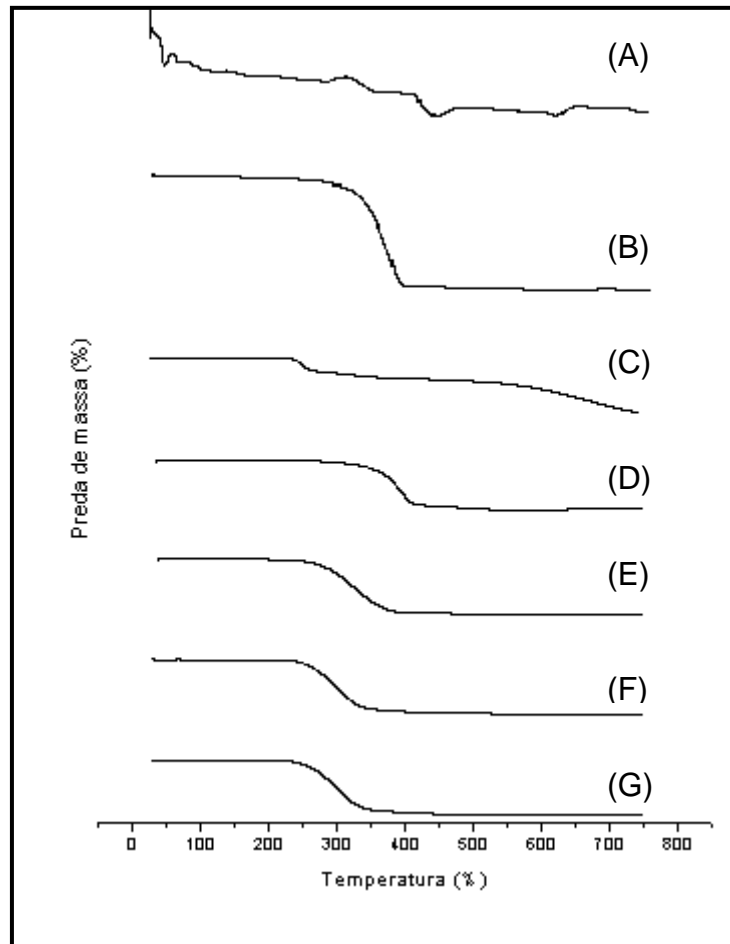


TABELA 1 – Número de células inflamatórias por campo* dos camundongos híidos

Grupo	Células por Campo															
H1	2	1	0	0	1	1	2	2	0	1	2	3	0	0		
	1	1	0	0	0	1	1	3	2	2	1	2	2	0	0	
H2	0	2	1	1	1	1	0	1	2	0	0	1	1	1	2	
	2	2	3	0	4	1	0	2	0	1	0	0	0	2	1	
	1	0	0	0	1	2	0	1	2	1	0	2	1	1	1	
	1	2	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	

* retículo acoplado à objetiva de microscópio ótico; 40 x

H1 – animal híido 1

H2 – animal híido 2

Dia	Grupo	Células por Campo																				
		37	49	90	26	19	23	16	23	32	50	43	84	67	28	13	24	24	24	24	24	
1	N1	37	49	90	26	19	23	16	23	32	50	43	84	67	28	13	24	24	24	24	24	
		99	177	76	46	39	57	26	21													
		56	41	30	83	76	67	70	42	47	32											
		59	132	110	75	18	43	26	40	57	36											
	N2	48	44	28	14	26	23	24	13	20	29											
		24	22	30	21	17																
		8	7	17	15	13	14	13	17	11	7	15	13	9	5	7	11	7				
	N3	114	41	38	19	19	25	21	48	42	44	27										
		21	38	33	25	31	57	40	32	29	21											
		13	17	25	24	18	23	17	22													
	N4	83	123	92	85	84	92	64	58	78	61	51	72	42	50	51	55	44				
		19	70	89	37	41	65	64	44	38	69	44	55									
		50	22	30	20	16	20															
	C1	41	17	48																		
		57	47	83	38	18	33	32	33	20												
		35	17	14																		
		68	52	100	26	46	52	24	31	27	27	16	10									
	C2	30	13	11																		
		39	39	42	38	34	36	30	28	20	20	23	30	23	22	19	48					
		16	14	14	13	12	13															
		40	28	46	35	29	28	45	32	28	20	19	18									
	BC	2	3	5	2	2	3	2	2	3	14	10	3	3	2	3	3	7	9	14		
		12	12	17	27	13	8	11	15	11	17	15	15	9	12	4	11	5				
		22	15	9	10	15	13	6	8	13	11	18	15	11	10	10	4	9	16	6		
		7	10	11	10	16	8	11	10	8	11	11	10	9	5	3	9					
	A	2	3	4	1	6	3	3	3	3	1	16	12	7	7	7	16	5	4			
		6	3	3	2	7	6	3	12	8	5	1	2	2								
3		7	3	3	1	5	5	5	2	8												

TABELA 2 – Número de células inflamatórias por campo* de tecido subcutâneo dos camundongos após 1 dia

* retículo acoplado à objetiva de microscópio ótico; 40 x

N1- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica; N2- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; N3- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica; N4- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; C1- PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50; C2- D,L Poli (Ácido Lático) ; BC: biocerâmica; A – animal apenas incisionado

TABELA 3 – Número de células inflamatórias por campo* de tecido subcutâneo dos camundongos após 7 dias

Dia	Grupo	Células por Campo																		
		12	15	8	12	16	9	5	16											
7	N1	11	17	7	16	18	8	9	7	9										
		19	16	20	16	13	10	12	10											
		10	9	12	6	12	3													
	N2	27	20	14	8	9	9	4	5	13	20	11								
		3	6	11	4	4	5	4	5	3										
		4	2	3	11	9	15	6	1	5	4									
	N3	4	8	7	6	7	5	4	4											
		5	5	2	4	8	8	5	3	3	6									
		2	5	3	3	4	4	4												
	N4	7	4	4	15	8	3	4	3	3	3									
		9	4	3	4	4	3	6												
		8	6	4	4	6	6	8	2	4	5									
		20	14	9	5	8	6	3	5	4	10	3								
	C1	8	8	6	1	11	4	7	6	6	5	13	6	4	6	3	5	3		
		5	3	5	5	2	4	3	5	3	5									
		4	3	4	4	7	10	9	9	10	7	6	3							
	C2	5	7	11	15	4	8	6	10	4	16	16	9	4	7	4				
		4	4	7	7	4	5	5												
	BC	14	9	9	5	5	3	7	7	3	3	7	3	4	2					
		11	5	4	3	4	8	3	3	4										
		2	2	3	1	0	0	1	2											
		3	10	9	6	2	3	2	0	0	0									
	A	3	5	14	7	4	3	4	5	3	0	0	1	0	5	3				
		6	6	4	3	6	5	6	7	3	4	4								

* retículo acoplado à objetiva de microscópio ótico; 40 x

N1- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica; N2- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; N3- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica; N4- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; C1- PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50; C2- D,L Poli (Ácido Lático) ; BC: biocerâmica; A – animal apenas incisionado

TABELA 4 – Número de células inflamatórias por campo* de tecido subcutâneo dos camundongos após 13 dias

Dia	Grupo	Células por Campo																			
		24	25	16	14	14	7	15													
13	N1	24	25	16	14	14	7	15													
		18	17	8	8	10	6														
		7	8	8	8																
	N2	11	17	27	21	11	9														
		21	9	14	12	12	18	7	7	6	20	8	14	11	8						
		15	12	29	14	12	12														
	N3	54	34	19	24	29	18	10	14	9	8	19	20	12	15	17	10	10			
		17	22	17	16	14	11	11	13	13	10	7	48	7	30						
		23	11	16	65	8	40	10													
	N4	5	5	5	15	6	5	6	5	6											
		6	4	23	27	20	7	10	10	8	4										
		9	15	8	6	3	5	8	7	6	2	5	7	8	12	7					
	C1	3	9	16	6	11	6	7													
		12	13	15	16	8	6														
	C2	18	14	15	11	12	12	10	10	7	7	8	6	6							
		4	10	11	9	7	12	3	20	8											
	BC	19	25	20	9	12	7	7	14	12	20	12	4								
		8	5	3	3	4	2	5	1	1	1										
		18	17	16	15	13	16	14	16	10	10										
	A	3	3	3	3	2	0	1	2	2	1	0	1	0	1	2					
2		0	0	0	4	2	3	2	2	2											

* retículo acoplado à objetiva de microscópio ótico; 40 x

N1- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica; N2- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; N3- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica; N4- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; C1- PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50; C2- D,L Poli (Ácido Lático) ; BC: biocerâmica; A – animal apenas incisionado

TABELA 5 – Número de células inflamatórias por campo* de tecido subcutâneo dos camundongos após 21 dias

Dia	Grupo	Células por Campo																			
21	N1	3	4	5	4	7	4	5													
		3	5	4	2	0	3														
		7	8	2	5	5	6	7	8	7	4	5	4	4	2						
		5	3	3	4	3	3	4	3	2											
	N2	3	2	4	3	3	2	1	3	3	2										
		3	4	4	2	2	6	1	3	3	4	2									
		3	3	4	3	3	4														
	N3	3	5	4	3	3	2	3	3	2	7	3									
		8	4	4	5	6	6	5	5	4	5	4	2	3	2	6	4	3			
		3	2	3	3	6	3	6	5	6	3	2									
	N4	3	4	3	4	5	2	4	3	3	3	4									
		4	2	2	3	4	4	5	5	3	3	2									
		3	2	1	2	5	4	5	3	2											
	C1	2	3	2	5	6	4	5	3	10	5	9	5	11	6	3	5	3			
		2	11	27	45	18	14	7	2	14	10	3	10	5	6	4	2	3	2	6	
		18	24	25	31	21	22	4	7	12	6	15	5	4	12	16	13	10	3	2	
	C2	11	6	9	4	4	8	22	4	13	11	6	7	8							
		6	2	13	14	10	23	16	10	4	4	4	5								
	BC	2	0	0	3	0	1	2	1	2	2										
		1	0	0	0	4	0	2	3	2	1	2									

* retículo acoplado à objetiva de microscópio ótico; 40 x

N1- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica; N2- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; N3- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica; N4- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; C1- PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50; C2- D,L Poli (Ácido Lático) ; BC: biocerâmica; A – animal apenas incisionado

TABELA 6 – Número de células inflamatórias por campo* de tecido subcutâneo dos camundongos após 28 dias

Dia	Grupo	Células por Campo																	
28	N1	3	4	3	3	5	4	4	2	4	4	3							
		4	3	3	8	4	3	5	7	3	3	4	9	7	4	3	6		
		6	7	5	3	3	4	6	5	1	2	3	3	5	2				
	N2	6	20	6	4	5	22	4	3	5	5	7	10	7	3	3			
		4	6	7	9	2	3	15	2	3	13	6	11	15	7	6			
		6	4	4	4	3	2	1	2	0	4								
	N3	12	23	8	4	3	3	7	4	4	3	6	4	8	4	4			
		3	2	4	5	3	5	5	3	2	1	2	3	3					
		9	14	9	3	3	5	5	2	2	4	4							
	N4	7	3	3	2	3	1	4	4	3	5	2	1	2	2	2			
		3	3	3	2	2	3	5	2	2	2	3	1	0	2				
		3	3	2	3	4	3	2	3	1	2	2							
	C1	4	19	16	11	9	2	6	2										
		6	5	4	3	5	2	3	2	3	3	3							
		3	3	4	2	4	4	9	10	2	2								
	C2	1	2	2	2	2	2	3	4	3	3								
		10	4	7	6	3	4	10	5	2	1								
		3	3	5	8	7	3	1	2	6	2	3	6	9	8	5	3	2	
		3	19	8	2	25	16	13	10	6	3	4							
	BC	1	2	1	0	0	0	1	0	2	0								
		4	3	2	0	1	0	3	2	4	1	2	0	1	0	2	0	3	
1		2	2	2	0	0	1	0	1	1	3	0	2						

* retículo acoplado à objetiva de microscópio ótico; 40 x

N1- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica; N2- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; N3- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica; N4- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; C1- PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50; C2- D,L Poli (Ácido Lático) ; BC: biocerâmica; A – animal apenas incisionado

Dia	Grupo	Células por Campo																		
		1	2	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1					
56	N1	1	2	3	0	0	0	0	2	4	2	0	0	1	2	1	0			
		4	2	2	3	1	0	0	2	2	0	0	2							
		4	4	6	10	1	2	0	2	0	1	1	0	6	7	1				
	N2	8	5	3	3	0	3	2	1	2	2	1	1							
		3	7	4	3	4	2	1	0	1	0	0								
		3	4	3	2	2	3	3	0	2	0									
	N3	2	3	2	3	3	2	3	2	3	1	0	2	3	0	2	3	3		
		4	3	6	5	5	3	2	4	4	2	2	4	2	2					
		4	5	8	5	6	0	5	2	3	6	1	2							
	N4	1	2	3	1	2	1	3	1	4	2	0	2	1	2	2				
		4	5	4	3	2	4	5	8	1	2	1								
		5	5	4	1	5	13	5	16	20	3	1	5	8	6	7	6	4	2	3
		4	3	11	4	3	2	8	12	13	3									
	C2	2	6	2	2	2	2	1	3	1	2	1	0	0	1	1				
		3	3	2	2	3	6	4	3	4	4	4	1	3	1	1				

TABELA 7 – Número de células inflamatórias por campo* de tecido subcutâneo dos camundongos após 56 dias

* retículo acoplado à objetiva de microscópio ótico; 40 x.

N1- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica; N2- Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50 : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; N3- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica; N4- D,L Poli (Ácido Lático) : biocerâmica + 0,1% p/p tetraciclina; C1- PLGA: D,L Poli (Ácido Lático-Glicólico) 50:50; C2- D,L Poli (Ácido Lático) ; BC: biocerâmica; A – animal apenas incisionado