

Estudo inicial da degradação “*in vivo*” de poli(L-co-D,L ácido lático), sintetizado em laboratório, aplicado como prótese tibial em coelhos.

MOTTA^I, A.C.; DUEK, E.A.R.^{II}

(1)Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6122, 13081-970, Campinas (SP), Brasil

e-mail: motta@fem.unicamp.br

(2) Laboratório de Biomateriais, CCMB - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo - PUCSP, Praça Dr. José Ermírio de Moraes, 290, 18030-230, Sorocaba, SP, Brasil.

e-mail: eliduek@pucsp.br

RESUMO

O copolímero poli(L-co-D,L ácido lático), PLDLA, tem ganhado destaque no campo das próteses temporárias, em virtude de seu tempo de degradação ser bastante compatível com o requisitado no caso de fraturas ósseas. Neste trabalho estudou-se a degradação *in vivo* de dispositivos do copolímero PLDLA, na forma de um sistema de placas e parafusos, empregado na fixação interna da tíbia de coelhos. Os dispositivos foram implantados em 15 coelhos adultos, albinos, da raça Nova Zelândia. Foram utilizados como controle dispositivos a base de ligas de titânio. (Ti-6Al-4V/Grau V) A aplicação de copolímeros do poli (L-co-D, ácido lático), sintetizado em laboratório, foi testada no reparo de fratura em tíbias de coelhos, sendo avaliado nos seguintes tempos: 2 semanas, 2 meses e 3 meses. A análise morfológica do tecido circunjacente ao sistema placa e parafuso PLDLA, referente a 2 semanas do implante, mostra a presença de osteoblastos, indicando uma pré formação óssea. Após 2 meses verifica-se neoformação óssea na região em contato com o polímero. Esse crescimento ósseo ocorre simultaneamente ao processo de degradação do PLDLA, invadindo a região onde havia o polímero e após 3 meses verifica-se uma intensa degradação do copolímero PLDLA e conseqüentemente uma maior invasão tecidual comparado a 2 meses, sendo caracterizado uma formação óssea na região em que o polímero degradou. O estudo da degradação “*in vivo*” dos dispositivos de PLDLA, por meio das avaliações histológicas durante o período de consolidação da fratura, mostrou a eficiência deste sistema placa e parafuso, sendo possível verificar formação de tecido ósseo no local do implante, sem a presença de reação inflamatória.

Palavras-chaves: Síntese, PLDLA, degradação *in vivo*.

Initial study of *in vivo* degradation of poly(L-lactic acid-co-D,L ácido lático), PLDLA

ABSTRACT

The copolymer poly (L-co-D,L lactic acid), PLDLA, has gained prominence in the field of temporary prostheses due to the fact that their time of degradation is quite compatible with the requirement in the case of osseous fracture. In this work the *in vivo* degradation of devices from copolymer, as a system of plates and screws, used in fixation of the tibia of rabbits was studied. The devices were implanted in 15 adult rabbits, albinos, New Zealand race, and they were used as control devices of alloys of titanium (Ti-6Al-4V/ V grade). The use of copolymers, synthesized in the laboratory, was tested in the repair of fracture in rabbits' tibias, being assessed in the following times: 2 weeks, 2 months and 3 months. Morphological analysis of tissue surrounding the plate and screw system, for 2 weeks of implantation, showed the presence of osteoblasts, indicating a pre bone formation. After 2 months there was new bone formation in the region in contact with the polymer. This bone growth occurred simultaneously with the process of PLDLA degradation, invading the region where there was polymer and after 3 months there was an intense degradation of the copolymer and hence greater tissue invasion compared to 2 months which characterized bone formation in a region where the polymer degraded. The *in vivo* degradation study of the devices for PLDLA by means of histological evaluations during the period of consolidation of the fracture showed the

efficiency of plate and screw system, and it was possible to check formation of bone tissue at the implantation site, without the presence of inflammatory reaction.

Keywords: synthesis, PLDLA, *in vivo* degradation.

1 INTRODUÇÃO

Polímeros bioreabsorvíveis fazem parte de um campo emergente das pesquisas. Suas vantagens frente aos materiais tradicionais, especialmente na área de fixação de fraturas, tem sido o propulsor deste interesse por parte dos pesquisadores. Entre as principais vantagens destaca-se a ausência de uma 2ª intervenção cirúrgica para retirada do implante, após a consolidação óssea ter se procedido, além da transferência gradual de carga para o osso em recuperação, que ocorre quando implantes bioreabsorvíveis são utilizados. Dentre esses materiais destaca-se a classe dos polímeros poli (hidróxi ácidos), sendo o copolímero Poli (L-co-D,L ácido láctico), PLDLA um destes exemplos. O copolímero PLDLA tem como características aliar as boas propriedades mecânicas que a presença do monômero L-ácido láctico, lhe confere, sem, contudo apresentar o longo tempo de degradação associado a esse polímero, o que é possível pela presença na cadeia polimérica do D,L ácido láctico, que por gerar segmentos da cadeia completamente amorfos contribuí para que o tempo de degradação do copolímero PLDLA seja diminuído, tornando-o mais adequado ao requerido pelas fraturas ósseas e mesmo na liberação controlada de fármacos, portanto preferível em muitas aplicações cirúrgicas.

O copolímero poli(L-co-D,L ácido láctico), na proporção 70: 30 (L/DL, respectivamente), foi sintetizado em laboratório de acordo com o descrito por Motta [1], sendo processado via injeção, e obtidos dispositivos na forma de placas. O processo de degradação do copolímero ocorre via hidrólise, com a grande vantagem de gerar, a partir deste processo, produtos capazes de serem absorvidos pelo organismo, como o ácido láctico. Dessa forma, o PLDLA se apresenta altamente biocompatível e atóxico, além de ser facilmente processado em diferentes dispositivos [2]. O campo de aplicação do PLDLA é vasto, podendo ser empregado em reparos ósseos na região craniomaxilofacial devido a traumas sofrido ou mesmo a presença de alguma síndrome, por meio da estabilização dos ossos da mandíbula [3]; fraturas na região abaixo dos olhos [4]; suturas para reparos em tendões [5] cirurgias que envolvam reparos na região craniofacial em pediatria, entre outras [6].

Neste trabalho foi estudada a resposta *in vivo* destes pinos, sendo válido ressaltar que o estudo *in vitro*, deste mesmo material, já foi realizado num trabalho recentemente publicado [7]. A degradação de polímeros *in vivo* difere da degradação *in vitro*, principalmente porque *in vivo* o implante está submetido aos esforços mecânicos. A taxa de degradação do polímero *in vitro* e *in vivo* depende não somente da composição química, mas também do tamanho, forma e da superfície do implante. Estes são fatores que podem ser sistematicamente variados e avaliados nas situações de testes *in vitro*. As propriedades específicas, tais como, massa molar inicial, distribuição de massa molar, grau de cristalinidade e taticidade podem ser controlados e avaliados antes da implantação [8].

A resposta fisiológica ao implante varia em função de sua forma, do tempo de implante, do material implantado e do local do implante (maior ou menor fluxo de fluidos). Geralmente o corpo tende inicialmente a encapsular, com uma fina camada de tecido fibroso, a região do implante e tem início à degradação do material [9]. O estudo *in vivo* do copolímero PLDLA sintetizado em laboratório, serve como uma ferramenta a mais na caracterização desse material, fornecendo informações importantes acerca da biocompatibilidade do copolímero sintetizado [1].

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo inicial da degradação *in vivo* do copolímero PLDLA na forma de placas e parafusos para fixação interna da tíbia de coelhos, por meio de avaliações histológicas durante o período de consolidação da fratura.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estudo *in vivo* do copolímero poli(L-co-D,L ácido láctico): avaliação da biocompatibilidade, após implante de placas e parafusos do copolímero PLDLA, para fixação interna da tíbia de coelhos.

Tanto as placas como os parafusos de PLDLA utilizados neste estudo, foram obtidos via processo de injeção, sendo que as condições do processamento foram delimitadas pelos dados da caracterização térmica do copolímero [1].

Foram utilizados como controle dispositivos a base de ligas de titânio (Ti-6Al-4V/Grau V) (Bucoplan 2.0, Engimplan® Engenharia de Implantes Indústria e Comércio Ltda., Rio Claro, São Paulo), todos com dimensões padronizadas correspondentes ao sistema de fixação interna 2.0 (com parafusos de 2mm de

diâmetro de corpo por 12mm de comprimento e placas correspondentes ao tamanho dos parafusos). Este estudo foi feito em parceria com a Faculdade de Odontologia da Unicamp, sob orientação do professor Renato Mazzone.

Quinze coelhos adultos, albinos, de linhagem Nova Zelândia, fêmeas, com idade aproximada de 6 meses e peso variando entre 3,8 e 4,5 kg foram selecionados para o estudo. Os animais foram mantidos nas instalações do Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, sob as mesmas condições ambientais durante todo o estudo, em gaiolas padronizadas, individuais.

Os coelhos receberam uma dose de antibiótico antes da injeção anestésica, que foi realizada por meio de injeção intramuscular de uma mistura de drogas (ketamina e xilazina). Foram realizadas incisões lineares até a exposição da porção medial e posterior da tibia. Nesta foram realizadas duas osteotomias parciais de secção transversal, uma em porção proximal e outra em porção distal. Após a osteotomia ter sido provocada foi aplicado o sistema de fixação por meio de uma placa de 2 furos e 2 parafusos do sistema 2.0 de 12mm de comprimento (bicortical), sendo posicionado na porção proximal o sistema em titânio (controle) e na porção distal o sistema baseado no copolímero PLDLA.

As Figuras 1 e 2 representam a fixação da fratura da tibia de coelhos pelos dois sistemas (PLDLA e o controle –titânio) e a disposição dos materiais em tíbias direita e esquerda.

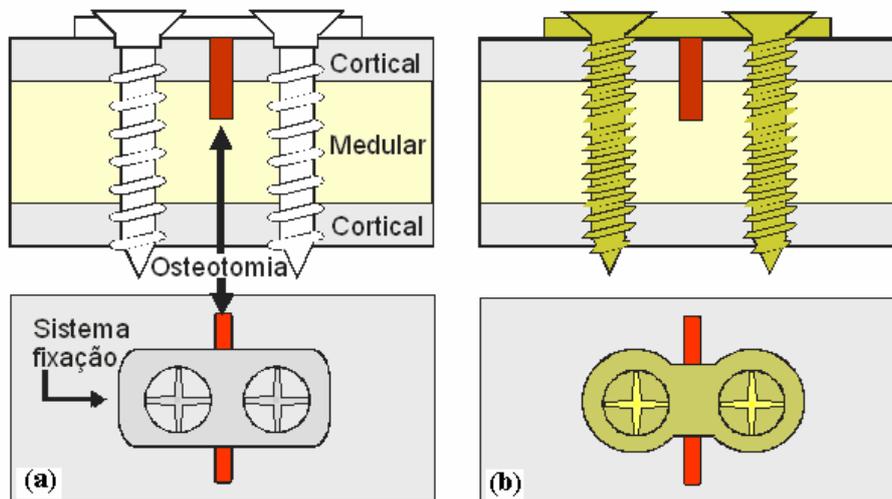


Figura 1: Ilustração esquemática da osteotomia transversal fixada com placa e parafusos (a) PLDLA e (b) controle a base de titânio.

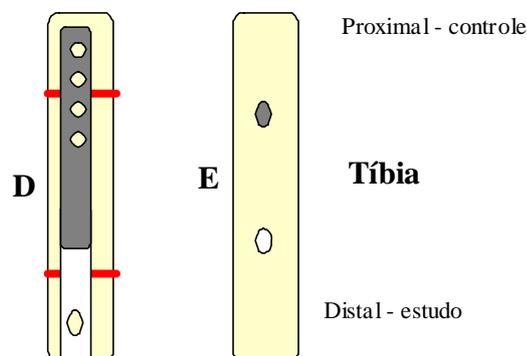


Figura 2: Ilustração esquemática da disposição dos materiais em tíbias direita e esquerda.

Após a instalação dos sistemas de fixação o campo foi irrigado com solução salina estéril e a síntese

se deu por meio de sutura por planos com fio mononylon 4 -0.

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos segundo o período de sacrifício para avaliação histológica: Grupo 1 (5 coelhos): sacrifício no 21º dia pós-operatório, Grupo 2 (5 coelhos): sacrifício no 56º dia pós-operatório e Grupo 3 (5 coelhos): sacrifício no 84º dia pós-operatório. Os sistemas teste e controle foram instalados no mesmo animal, diminuindo a influência da variabilidade individual sobre o estudo. O processamento do material para análise histológica, se deu após as amostras terem sido descalcificadas, e submetidas a seguinte sequência: Inclusão em parafina, corte histológico, coloração das laminas seguida de análise ao microscópio ótico.

3 RESULTADOS

A avaliação do copolímero sintetizado, por meio do seu estudo *in vivo* na forma de placas e parafusos, é fundamental na consolidação da qualidade do material. E seu estudo comparativo com os dispositivos metálicos, cuja utilização já é tão difundida na área de fraturas, se faz importante no sentido de acompanhar a evolução da recuperação óssea, nas duas situações: implante bioreabsorvível e implante metálico. Apesar das fixações metálicas utilizadas nos tratamentos de fraturas ósseas serem um procedimento bem sucedido, o osso cortical e o metal possuem propriedades mecânicas muito distintas, por exemplo, a força de tensão do osso é 10 vezes menor do que a notada no implante metálico, tornando o local do implante susceptível ao processo de osteoporose, devido a ausência funcional normal de carga [10]. As Figuras 3, 4 e 5 mostram a resposta apresentada pelo copolímero PLDLA e pelo controle (sistema placa e parafuso metálico) nos três tempos analisados: 2 semanas, 2 meses e 3 meses.

A análise morfológica do tecido circunjacente ao sistema placa e parafuso PLDLA, referente a 2 semanas do implante, mostra a presença de osteoblastos, indicando uma pré formação óssea, Figura 3 (A).

Após 2 meses verifica-se neoformação óssea na região em contato com o polímero. Esse crescimento ósseo ocorre simultaneamente ao processo de degradação do PLDLA, invadindo a região onde havia o polímero, Figura 4 (A).

Após 3 meses verifica-se uma intensa degradação do copolímero PLDLA e conseqüentemente uma maior invasão tecidual comparado a 2 meses, sendo caracterizado uma formação óssea na região em que o polímero degradou, Figura 5 (A).

A análise do sistema controle (placa -parafuso metálico), mostra que em 2 semanas não há indícios de reação inflamatória na região em contato com o titânio, Figura 3 (B). Após 2 meses percebe-se a presença de células gigantes de corpo estranho na região próxima ao metal, caracterizando certa reação infamatória, sem ser verificado neoformação óssea, Figura 4 (B). Com 3 meses, observa-se a presença de muitas células gigantes e de neoformação óssea, Figura 5 (B).

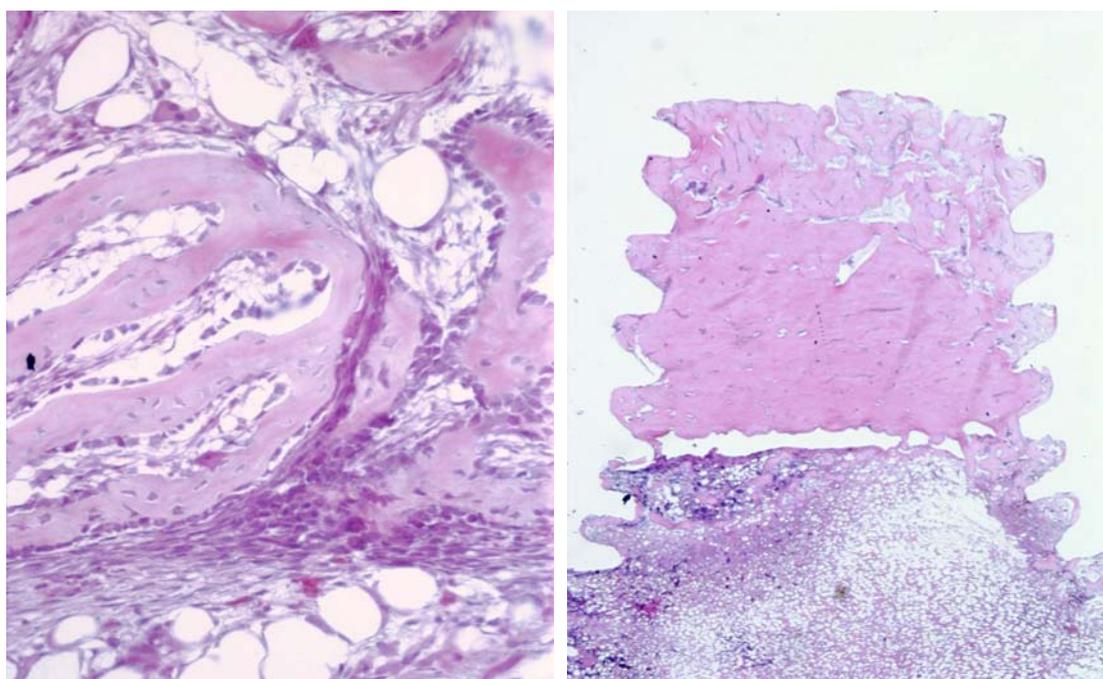


Figura 3: 2 semanas – A) Polímero – Região em contato com o polímero, presença de grande quantidade de osteoblastos ; B) Região em contato com o titânio. Não se observa reação inflamatória em nenhum dos casos.

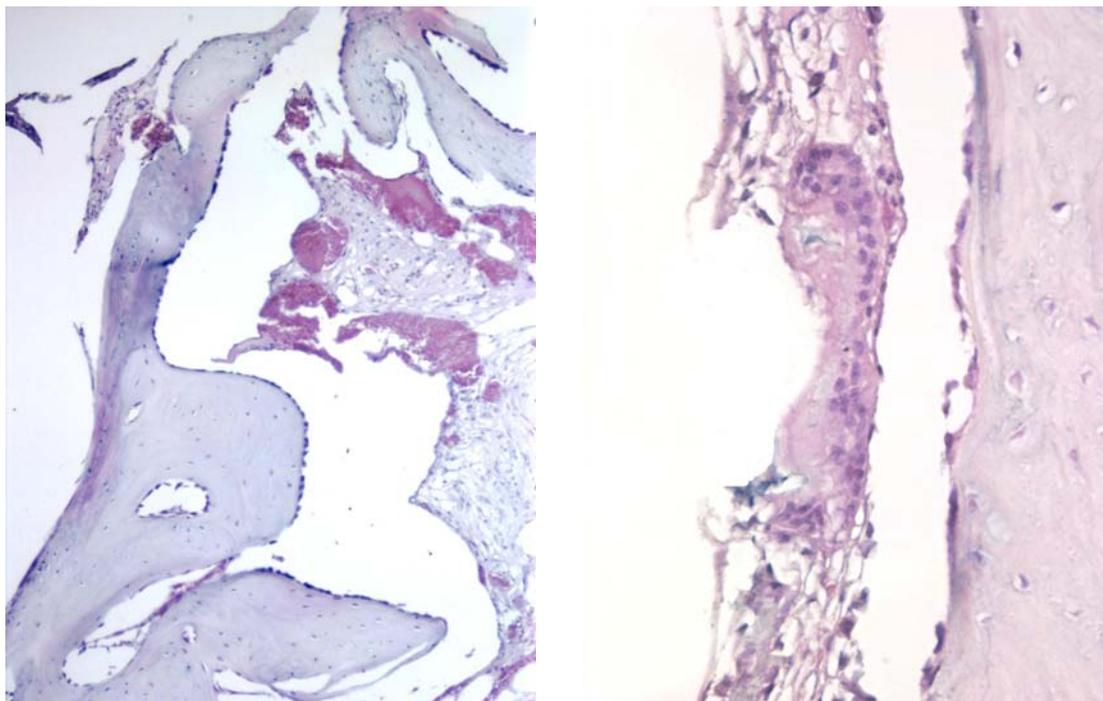
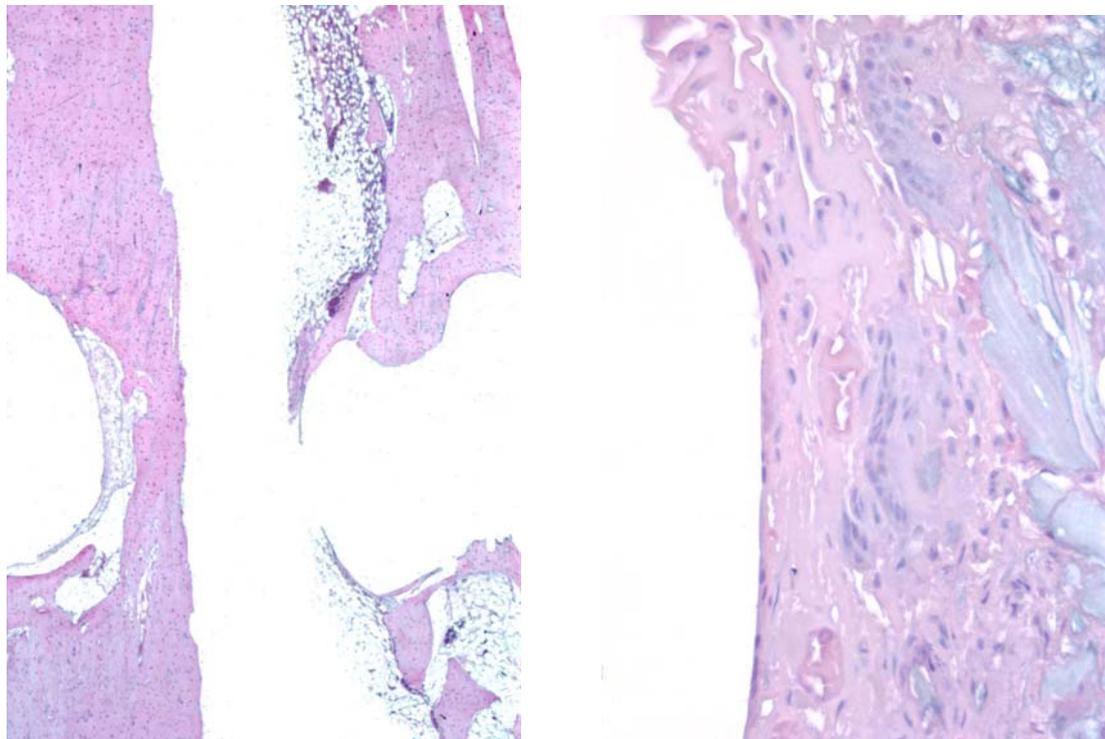


Figura 4: 2 meses – A) Polímero – Região em contato com o polímero, presença de grande quantidade de osteoblastos e neoformação óssea ; B) Região em contato com o titânio, apresentando célula gigante de corpo estranho, caracterizando certa reação inflamatória.



A

B

Figura 5: 3 meses – A) Polímero – Região em contato com o polímero, apresentando neoformação óssea no local onde o polímero se degradou; B) Região em contato com o titânio, apresentando célula.

Macroscopicamente foi verificado que, no momento do implante, o copolímero PLDLA se mostrou bastante resistente ao stress cirúrgico, já que não houve nenhum relato de quebra ou perda do passo da rosca

5 CONCLUSÕES

Por intermédio das avaliações histológicas durante o período de consolidação da fratura pôde-se verificar que o sistema placa e parafuso do PLDLA se mostrou muito eficiente, sendo possível verificar formação de tecido ósseo no local do implante, transcorridos 2 meses do início do estudo, sem a presença de reação inflamatória, como ocorreu no caso do metálico. Esses dados preliminares do estudo *in vivo*, sinalizam de maneira positiva sobre a qualidade do copolímero empregado, servindo como mais uma ferramenta para sua avaliação.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] MENEZES, A.C.M., *Síntese e caracterização de dispositivos de poli (L-co-D,L ácido láctico). Estudo da degradação in vitro e in vivo*, Tese de D.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 2007.
- [2] ALEXANDER, J.T, BRANCH, C.L Jr, SUBACH, B.R., “Applications of a resorbable interbody spacer via a posterior lumbar interbody fusion technique”, *Orthopedics* 25 (Suppl 10), pp. S1185 – S1189, 2002.
- [3] LANDES, C.A., KRIENER, S., MENZER, M., KOVACS, A.F., “Resorbable plate osteosynthesis of dislocated or pathological mandibular fractures: a prospective clinical trial of two amorphous L-/DL-lactide copolymer 2mm miniplate system”, *Plastic Reconstructive Surgery*, v. 111(2), pp. 601-10, 2003.
- [4] PUNJA, K.D., MORRISON, V., G.K., “Reconstruction of complex orbitocranial deformities using bioresorbable mesh , Sterelized Orbiatl Models and In situ Contouring”, *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 22(1), pp. 20-24, 2006.
- [5] VIINIKAINEN, A.K, GRANSSON H., HUOVINEN, K., KELLOMA M., TORMALA, P., ROKKANEN, P., “Bioabsorbable poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 triple-stranded bound suture in the modified Kessler repair: an ex vivo static and cyclic tensile testing study in a porcine extensor tendon model”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, 1963–1969, 2009.
- [6] COHEN, S.R, HOLMES, R.E, AMIS, P., FITCHNER, H., SHUSTERMAN, E.M., “Technical strategies tacks: a new technique for craniofacial fixation”, *J Craniofac Surg*, v. 12, pp. 596-602, 2001.
- [7] MOTTA, A.C., DUEK, E.A.R., “Estudo inicial da degradação “in vitro” de poli(L-co-DL ácido láctico) sintetizado em laboratório”, *Revista Matéria*, v. 13, n. 3, pp. 429 - 438, 2008.
- [8] ELST, M. Van der, KUIPER, I., KLEIN, C.P.A.T., PATKA, P., “The burst phenomenon, an animal model simulating the long-term tissue response on PLLA interlocking nails”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 30, pp. 139-143, 1996.
- [9] PENNING, A.J., ROZEMA, F.R., BOS R.R.M, SCHMITZ, J.P., “Cytotoxicity of poly(96L/4D lactide): the influence of degradation and sterilization”, *Biomaterials*, v. 21, pp. 2433-2442, 2000.
- [10] CHANDRA, R., RUSTGNI, R., “Biodegradable Polymers”, *Progress. Polymer Science*, New York, v. 23, 1998.