

# IMPLANTES BIOREABSORVÍVEIS DE PLGA(50/50) NA ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS

Samuel H. Barbanti<sup>1,2</sup>, Cecília A. C. Zavaglia<sup>1</sup>, Eliana A. R. Duek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Engenharia de Materiais, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), Brasil

<sup>2</sup>Centro de Ciências Médicas e Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Sorocaba (SP), Brasil

E-mail: barbanti@gmail.com

**Abstract: Bioresorbable polymers have been used as medical and odontologic devices to treat osteo diseases. This work evaluated the osteointegration of poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) (50/50) (PLGA50), in pins form, after implant of tibia rats. In specific times of postoperative, the implant place was submitted to preparation for histological analysis. The obtained results showed formation of neobone, indicating those materials can be used in bone tissue engineering applications.**

**Palavras-chave: Implants, poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid), osteointegration.**

## Introdução

A reconstrução de órgãos e tecidos, com o uso de polímeros sintéticos bioreabsorvíveis, tem sido intensivamente investigada nos últimos anos. Conhecida como Engenharia de Tecidos, a técnica é baseada na fusão de trabalhos da área de engenharia e ciência dos materiais e ciências da saúde. A terapia envolve a retirada de material biológico do próprio paciente, expansão *in vitro* das células viáveis sobre suportes de polímeros sintéticos bioreabsorvíveis (*scaffolds*), os quais, através da sua estrutura tridimensional adequada e das propriedades do material, permitem o crescimento, proliferação e formação de um novo tecido biológico que subsequente é reimplantado no paciente [1].

Dentre os materiais poliméricos sintéticos bioreabsorvíveis, os poliésteres alifáticos tais como o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e outros, fazem parte do cotidiano dos centros cirúrgicos no mundo inteiro podendo ser utilizados em diversas aplicações no corpo humano, tais como: suturas cirúrgicas, sistemas para liberação controlada de drogas, stents, e dispositivos ortopédicos.

De uma maneira geral, o processo de biodegradação e bioreabsorção desses materiais é descrito na literatura como sendo uma sucessão de eventos. Exposto aos fluidos aquosos o material sofre hidratação. Pela água o processo de degradação ocorre através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros solúveis e não tóxicos. A bioreabsorção pelo organismo ocorre quando a degradação gera produtos e subprodutos com as características dos metabólitos orgânicos, especificamente os ácidos do Ciclo de Krebs,

resultando em na eliminação CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O através da respiração e da urina [2].

Muitos fatores determinam a taxa de degradação dos polímeros bioreabsorvíveis. Entre eles podemos destacar: local de implante, composição química/esterioisométrica, grau de cristalinidade, tamanho e geometria do suporte desenvolvido, porosidade, rugosidade da superfície, energia livre de superfície, carga da superfície e outros. Atualmente, os estudos de degradação, sejam eles *in vitro* ou *in vivo*, têm sido propostos para estabelecer as relações entre esses fatores. Aplicados aos suportes de polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos, o estudo *in vivo* representa a avaliação das amostras em sistemas complexos e que interagem entre si. Nos protocolos de desenvolvimento de biomateriais é uma etapa obrigatória e fundamental [3].

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação tecido/polímero utilizando-se pinos de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) após implante em tibia de ratos.

## Materiais e Métodos

Suportes de polímeros bioreabsorvíveis foram preparadas utilizando-se poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (50/50) (PLGA50) (Mw 65.000 g/mol), fornecido pela Purac (Groningen, Holanda). Amostras densas foram preparadas por fusão seguida de injeção manual em moldes cilíndricos utilizando-se uma mini injetora Mini Max Molder (LMM-2017). Ambos os materiais foram fundidos a 160 °C e após a fusão injetou-se a massa polimérica no molde, mantido e resfriado a temperatura ambiente. Amostras porosas foram preparadas de forma análoga às densas, adicionando-se, durante a fusão, citrato trissódico (Merck), com uma granulometria do sal previamente estabelecida entre 180 e 250 µm, na concentração de 2:1 (massa de sal:massa de polímero). Para a retirada do sal, e conseqüente formação de poros, as amostras foram imersas, durante 30 h, em água destilada, drenada e reposta em períodos de aproximadamente 6 horas. As amostras foram secas a temperatura ambiente e submetidas a vácuo.

O estudo *in vivo* dos materiais foi realizado através do implante em tibia de ratos de amostras densas e porosas de PLGA50 preparadas pelo processo de fusão,

com molde de 2 mm de diâmetro. Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, com idade e massa de aproximadamente 3 meses e 400 g, respectivamente. Os animais são provenientes do biotério do Centro de Ciências Médicas e Biológicas de Sorocaba, pertencente à Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (CCMB/PUCSP). Os animais permaneceram no biotério recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Os ratos foram submetidos à anestesia geral com uma solução de ketamina 5 % e cloridrato de xylazina 2 %, por via intramuscular. Após a tricotomia e a antiseptia da região medial da pata traseira, os implantes foram realizados por uma cavidade de 2 mm no terço proximal da diáfise tibial. A cavidade foi produzida na camada cortical atingindo o canal medular permitindo a introdução do material. O procedimento foi realizado em apenas uma pata para cada rato. O tecido muscular e a pele foram suturados de forma asséptica. Após períodos de 2 dias, 2, 4, 8 e 12 semanas pós-cirúrgico, os animais foram sacrificados por exposição à ambiente saturado de clorofórmio. O processamento das amostras consistiu na fixação do material em formol 10 %, por um período de 24 h à temperatura ambiente. A descalcificação foi realizada numa segunda etapa com uma solução de ácido nítrico e formol (ambos a 10 %). Após a descalcificação as amostras foram desidratadas por série de etanol e imersas em solução de etanol e xilol por 30 min, e em seguida, xilol puro por 40 min. O material foi embebido com xilol e incluído em Histosec® (parafina acrescida de plastificante DMSO – dimetil sulfóxido) por 30 min e em parafina pura por 3 h. Foram realizados cortes histológicos em micrótomo para preparação das lâminas. A observação foi feita em microscópio óptico Nikon (E800).

## Resultados

A análise histológica dos implantes densos de PLGA50, no período de 2 dias, mostra a região clara correspondente ao espaço ocupado pelo material sintético, sendo possível observar uma invasão celular. Ao redor do local do implante, observam-se células de medula óssea com vasos sanguíneos e células gordurosas (Figura 1A). O implante de mesmo período de suportes porosos mostra a cavidade produzida pela inserção do material. Há invasão celular da medula óssea, entretanto não se observa a formação de neotecido (Figura 1B).

No período de 2 semanas, a análise das lâminas com implantes de suportes densos mostra a presença de células fusiformes provenientes do endóstio no limite da região lesada (camada cortical) (Figura 1C). Da amostra de 4 animais implantados com suportes densos de PLGA50, dois apresentaram inchaço na região do implante. A Figura 1D mostra a fotomicrografia do implante de suportes porosos de PLGA50 com 2 semanas de pós-operatório. A cavidade produzida para o implante do polímero está ocupada por células da medula óssea e verifica-se a presença de células

fusiformes provenientes do endóstio, com morfologia semelhante aos implantes de suporte denso.

Após 4 semanas pós-operatórias, as fotomicrografias de implantes densos de PLGA50 mostram a área de falha da camada cortical preenchida por neotecido. O implante do suporte polimérico não é mais observado, sugerindo sua bioreabsorção. Dentre os tecidos formados, verifica-se a presença de tecido rico em elementos de medula óssea e depósito de fibrina. Nota-se áreas com centro de ossificação primária no local do implante, com a presença de vasos sanguíneos e celularidade intensa (Figura 1E). Em relação ao implante de PLGA50 poroso (Figura 1F) é possível verificar a formação de tecido ósseo primário, contínuo com a cortical, na região da falha, ocupando toda a região de implante do suporte. O tecido ósseo primário está separado do tecido ósseo secundário da cortical pela linha cimentante. Observam-se osteoblastos recém aprisionados pela matriz óssea, característica de tecido ósseo primário.

Com 8 semanas de implante, a análise histológica das amostras de suportes densos (Figura 1G) e porosos (Figura 1H) não mostrou diferenças significativas entre a morfologia do material. Em ambos observa-se que a falha produzida foi preenchida por tecido ósseo primário com fibras dispostas em várias direções sem organização definida, com muitos osteócitos aprisionados, e com continuidade com a cortical na região da falha. O tecido primário formado com 4 semanas de implante sugere ser, gradativamente, substituído por tecido ósseo secundário, caracterizado por fibras organizadas em lamelas. As lamelas observadas estão dispostas em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, sugerindo a formação dos sistemas de Havers.

Nos implantes de suportes densos e porosos de PLGA50 após 12 semanas pós-operatórias, não foi localizado o limite da falha na região cortical para colocação dos suportes, sugerindo que o osso encontrasse em seu estado íntegro, regenerado (fotomicrografia não apresentada).

## Discussão

O processo de neoformação óssea ao redor de implantes bioreabsorvíveis tem sido alvo de interesse de pesquisadores que realizam testes de biocompatibilidade de materiais [3]. Tipicamente, o uso de implantes em tecidos biológicos vem acompanhado de uma reação inflamatória, que normalmente evolui para um granuloma de corpo estranho. Athanasiou *et al.* [4] fazem uma revisão histórica da biocompatibilidade e toxicidade de aplicações clínicas de materiais baseados em PLA e PGA. No reparo de defeitos ósseos, quase a totalidade dos resultados indica ausência de reações inflamatórias crônicas ou reações de corpo estranho. Efeitos adversos como a osteólise, observada em alguns estudos, têm sido atribuídas às técnicas de esterilização e ao uso de materiais com altas taxas de cristalinidade, hidrofobicidade e tempo de degradação.

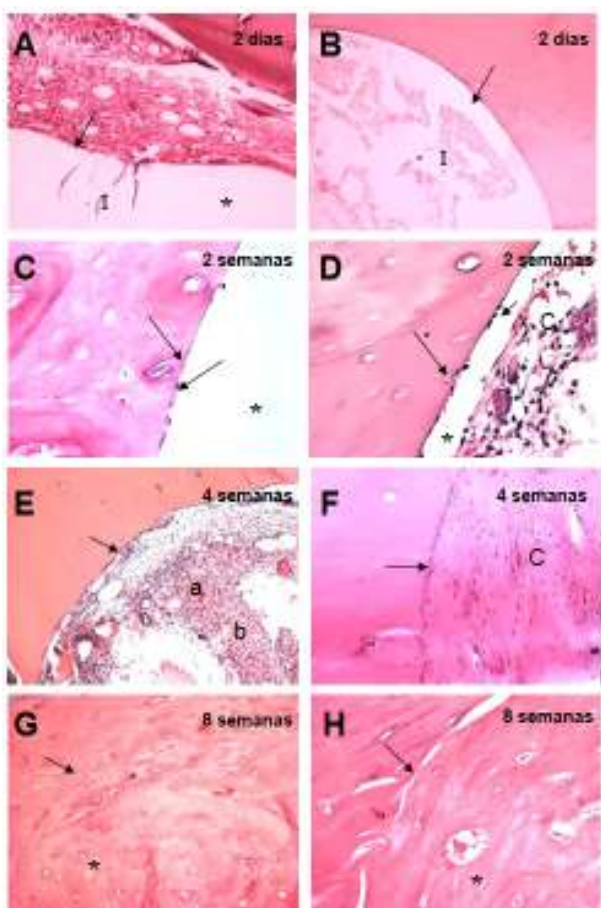


Figura 1 - Corte longitudinal do implante de suportes PLGA50 em tíbia de ratos Wistar. (A, C, E, G) denso. (B, D, F, H) poroso. Aumento (A, F) 200x; (B, E, G, H) 100x; (C, D) 400x. Observa-se: (\*) a falha para implante; (setas) células fusiformes provenientes do endóstio e linha cimentante; (C) capilares sanguíneos; (I) invasão celular; (a) elementos de medula óssea; (b) depósito de fibrina. HE.

## Resultados

Aplicados à engenharia de tecidos ósseos, suportes de PLGA têm um efeito de osteocondução. De acordo com Ohashi *et al.* [5], o osso formado ao redor dos implantes tem sua origem a partir das células osteogênicas presentes no perióstio e endóstio, estimuladas durante a produção da falha óssea para a colocação do implante. Durante a produção das cavidades na tíbia de nossos animais, o perióstio foi rebatido e, após a colocação dos implantes, reposicionado em seu local original, o que contribuiu para a ativação das células osteogênicas presentes. O mecanismo é semelhante ao que ocorre na formação de calos ósseos externos e internos, frequentes no reparo de fraturas ósseas.

A velocidade de degradação de amostras de polímeros bioreabsorvíveis mostra-se variável em estudos *in vivo* e *in vitro* em função do local e resposta fisiológica ao implante. Em estudo realizado sobre o efeito da taxa de degradação *in vivo* em suportes de

PLGA (50/50) pelo crescimento celular e angiogênese, [6] discutem a diferença de velocidade de degradação em função do meio local produzido pelo crescimento celular e vascularização. Segundo os autores, os maiores tempos de degradação *in vivo* nas amostras de PLGA, justificam-se pela condição estática do fluido de degradação *in vitro*, no qual diminui a taxa de difusão dos produtos ácidos gerados pela hidrólise, atuando no efeito autocatalítico dos poliésteres.

Em relação à morfologia do suporte, a porosa é desejável em muitas aplicações na engenharia de tecidos. Em nosso experimento, as amostras porosas avaliadas demonstraram intensa invasão celular. Os resultados observados são consistentes com aqueles publicados anteriormente, e mostram, em avaliações histológicas, tecido fibrovascular em crescimento dentro dos poros depois de uma semana de implante em amostras de PLGA (50/50). O suporte polimérico deve apresentar uma estrutura de poros uniforme e interconectada de modo a permitir um crescimento celular homogêneo distribuído no dispositivo, de tal forma a promover a formação de uma rede organizada [7].

## Conclusão

A metodologia utilizada neste trabalho se mostrou adequada para o estudo da reação tecidual frente a implantes na forma de pinos. Houve uma satisfatória integração do implante com o tecido, o que proporcionou o crescimento de tecido ósseo junto aos implantes, e em alguns casos o implante permitiu o crescimento de tecido conjuntivo e tecido ósseo para seu interior. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os implantes de PCL e PLGA são biocompatíveis com potencial de uso na terapêutica de lesões ósseas de uma forma geral.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra. Débora Coraça pelo auxílio na análise das lâminas e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] Seal, B. L., Otero, T. C., Panitch, A. (2001), "Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration" *Materials Science and Engineering*, v.34, 147-230.
- [2] Barbanti, S.H., Santos Jr., A.R., Zavaglia, C.A.C., Duek, E.A.R. (2004), "Porous and dense poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: *in vitro* degradation in culture medium and osteoblasts culture" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 15, 1315-1321.
- [3] Böstman, O.M., Pihlajamähi, H. (2000), "Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants

for internal fixation: a review” *Biomaterials*, v. 21, 2615-2621.

[4] Athanasiou, K.A., Niederauer, G.G. (1996), “Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/poly glycolic acid copolymers” *Biomaterials*, v.17, 93-102.

[5] Ohashi, H., Kobayashi, A., Kadoya, Y., Yamano, Y., Oonishi, H., Iwaki, H. (2000), “Effect of particles and interfaces conditions on fibrous tissue interposition between bone and implant. A particle challenge model in rabbit” *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, v. 11, 255-259.

[6] Sung, H-J., Meredith, C., Johnson, C., Galis, Z.S. (2004), “The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis” *Biomaterials*, v. 25, 5735-5742.

[7] Barbanti, S.H., Zavaglia, C.A.C., Duek, E.A.R. (2005), “Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos” *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.15, 13-21.