



RAFAEL DE CAMPOS FERREIRA BASSO

**USO DE *SCAFFOLDS* DE POLI L LACTIDE E DE
POLI L LACTIDE COM HIDROXIAPATITA EM CALOTA CRANIANA:
modelo experimental em ratos Wistar**

CAMPINAS

2014

i



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

RAFAEL DE CAMPOS FERREIRA BASSO

**USO DE SCAFFOLDS DE POLI L LACTIDE E DE
POLI L LACTIDE COM HIDROXIAPATITA EM CALOTA CRANIANA:
modelo experimental em ratos Wistar**

Orientador: Prof Dr Paulo Kharmandayan

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno **RAFAEL DE CAMPOS FERREIRA BASSO** e orientado pelo **PROF DR PAULO KHARMANDAYAN**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B295u Basso, Rafael de Campos Ferreira, 1974-
Uso de sacaffolds de Poli L Lactide e de Poli L Lactide
com hidroxiapatita em calota craniana modelo experimental
em ratos Wistar / Rafael de Campos Ferreira Basso. --
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Paulo Kharmandayan.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Osso. 3. Anormalidades
craniofaciais. 4. Próteses e implantes. I. Kharmandayan,
Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Use of sacaffolds of Poly L Lactide and Poly L Lactide with
hydroxyapatite in skullcap experimental model in Wistar rats

Palavras-chave em inglês:

Biocompatible materials

Bone

Craniofacial abnormalities

Prostheses and implants

Craniofacial abnormalities

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Paulo Kharmandayan [Orientador]

Marco Antonio de Camargo Bueno

Luiz Gonzaga de Freitas Filho

Data de defesa: 28-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

RAFAEL DE CAMPOS FERREIRA BASSO

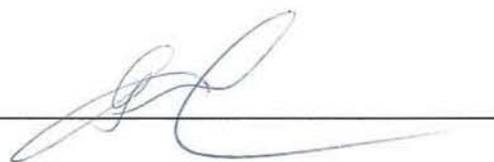
Orientador PROF: DR. PAULO KHARMANDAYAN

MEMBROS:

1. PROF. DR. PAULO KHARMANDAYAN



2. PROF. DR. MARCO ANTONIO DE CAMARGO BUENO



3. PROF. DR. LUIZ GONZAGA DE FREITAS FILHO



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 28 de janeiro de 2014

Dedico este trabalho:

A Deus,
pela condução da minha vida,
do meu lar,
da minha família.

À minha amada esposa Michelly,
por todo o carinho, acolhedor amor,
compreensão e incentivos sem fim.

À minha amada filha Maria Fernanda e
ao meu amado filho Davi
luzes dos meus olhos,
donos do meu interminável amor.

Aos meus pais, Maria Lúcia e Fúlvio,
Aos meus irmãos Fúlvio Filho e Marianne
amor incondicional,
porto sempre seguro,
semeadores dos valores da vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Paulo Kharmandayan, pela amizade, confiança, incentivo, compreensão e disponibilidade constantes. Pelo direcionamento nos momentos em que tudo parecia sem foco. Obrigado por transmitir e dividir tão valioso conhecimento.

À Profa. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo, pela disponibilidade, incentivo constante, pela paciência e por transmitir, de forma clara e elucidativa, conhecimentos tão complexos.

À Profa. Dra. Cecília Zavaglia, exemplo de tranquilidade e objetividade, pela presteza e auxílio em ensinamentos que ultrapassaram as barreiras da medicina.

Ao Prof. Dr. Fernando Fabrício Franco, amigo de todas as horas, incentivador constante deste trabalho, pela parceria, disponibilidade e exemplo de persistência.

Ao Prof. Marcelo de Campos Guidi, pela amizade, pelo exemplo como profissional e por me apresentar os caminhos da vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Camargo Bueno, constante conselheiro, orientador e incentivador deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cássio Raposo Amaral (*in memorian*), ao Prof. Dr. Celso Luis Buzzo e demais Professores que fizeram parte da minha formação como médico e cirurgião plástico.

Ao Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff Silva, apoiador e orientador inicial deste trabalho.

Aos profissionais do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da FCM-Unicamp, os biólogos Ana Cristina e Willian Adalberto e os técnicos Valdemar Benedito e Miguel Luís.

Aos colegas Leonardo Ribeiro Rodrigues e Geraldine Nancy Rodriguez Perea, por quem tenho especial respeito, pela disponibilidade e ajuda precisa, no momento preciso.

À Dra. Renata Triglia, patologista, com a pronta colaboração na leitura das lâminas.

À Maria Helena Araujo, secretária da Cirurgia Plástica da Unicamp.

Aos demais colegas da Área de Cirurgia Plástica da Unicamp e outras pessoas que de alguma forma participaram desse trabalho.

Aos animais utilizados nessa pesquisa.

“O essencial é invisível aos olhos”

(Antoine de Saint-Exupéry)



RESUMO

O tratamento de deformidades no corpo humano, principalmente anormalidades ósseas craniofaciais, sejam elas causadas por trauma, infecções, deformidades congênitas ou pós-exereses tumorais, continua sendo, nos dias atuais, um grande desafio ao cirurgião. Sabe-se que os enxertos de tecidos autólogos são o padrão ouro para essas reparações, porém, é notável a escassez de áreas doadoras.

Nos últimos anos, com o avanço da engenharia de tecidos usando cultura de células semeadas em implantes, tem aumentado vertiginosamente a procura por materiais biocompatíveis que possam ser considerados ideais para fabricação de moldes, conhecidos cientificamente como *scaffolds*, carreadores de células capazes de recompor defeitos causados por perdas teciduais.

O presente experimento objetiva estudar, experimentalmente, o uso de placas de Poli L Lactide (PLLA) e Poli L Lactide associada à Hidroxiapatita (PLLA + HA), obtidas por rotofiação (*rotary jet spinning*), como uma possibilidade de oferecer *scaffolds* de boa qualidade para colaborar com o avanço da engenharia tecidual.

Para isso, utilizou-se 30 ratas da raça Wistar, distribuídas em 3 grupos, nas quais foram realizados defeitos críticos na calota craniana. Em seguida foram implantados *scaffolds* de PLLA e PLLA + HA e comparados com o grupo controle, que não recebeu implante.

Os resultados mostraram que nos casos em que apenas foram realizados os defeitos nas calotas cranianas, não ocorreram a cicatrização do osso.

Nos casos em que os *scaffolds* de PLLA e de PLLA + HA foram usados, notou-se rica neovascularização, acompanhada de reação do tipo corpo estranho e presença de osso reativo ao redor dos implantes.

Palavras chaves: materiais biocompatíveis, osso, anormalidades craniofaciais, implantes.



ABSTRACT

The treatment of deformities in the human body, especially craniofacial bone abnormalities, whether caused by trauma, infection, congenital or due to resection tumors, remains, nowadays, a great challenge to the surgeon. It is known that autologous tissue grafts is the gold standard for these repairs, however, it is remarkable the scarcity of donor areas.

During the last years, with the improvement of tissue engineering using cell culture growth in implants, has increased dramatically the search for an biocompatible material that can be used as a mold, known as scaffolds, for cell attachment and thus enabling the recomposition of defects caused by tissue loss.

The present experiment aims to study experimentally the use of Poly L-Lactide(PLLA) plates and Poly L-Lactide(PLLA) associated with Hydroxyapatite (HA), obtained by Rotary Jet spinning, as a possibility to provide *scaffolds* with good quality and affordable costs to collaborate with the tissue engineering advancement.

For this, were used 30 Wistar rats, distributed into 3 groups, in which critical defects were performed in the skull. Then scaffolds of PLLA and PLLA + HA (groups 2 and 3) were implanted and compared with the control group that didn't receive implant (group 1).

The results have shown that in cases where only the defects in cranial caps were done, bone healing have not occurred.

In cases where the *scaffolds* of PLLA and PLLA + HA were used, rich neovascularization was noted, accompanied by foreign body type reaction and presence of reactive bone around the implants.

Keywords: biocompatible material, bone, craniofacial abnormalities, implants

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BMP	Proteína morfogenética humana
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório- Unicamp
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
cm	Centímetro
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e Eosina
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLA	Poli (ácido láctico)

PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLLA	Poli l lactide
PO	Pós Operatório
POI	Pós Operatório Imediato
Rpm	Rotações por minuto
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas - SP - Brasil

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Análise clínica dos animais do grupo 1.....	48
Tabela 2	Análise clínica dos animais do grupo 2.....	50
Tabela 3	Análise das peças de calvárias doas animais do grupo 2.....	51
Tabela 4	Análise clínica dos animais do grupo 3.....	55
Tabela 5	Análise das peças de calvárias dos animais do grupo 3.....	56

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMA

		Pág.
Figura 1	Micro retífica.....	32
Figura 2	Fresa de 11mm.....	32
Figura 3	<i>Punch</i> de 10.8.....	33
Figura 4	Sistema de rotofiação: a imagem esquematiza o aparelho usado no processo de rotofiação. A seta maior indica o local onde é colocada a solução polimérica e as setas menores mostram os orifícios por onde essa solução esco.....	34
Figura 5	Fotografia por microscopia eletrônica de varredura de fibra de PLLA (aumento de 2.000x).....	35
Figura 6	Fotografia por microscopia eletrônica de varredura de fibra de PLLA com aglomerados de HA (aumento de 2.000x).....	35
Figura 7	<i>Scaffold</i> de PLLA em microscopia estereoscópica (aumento de 0,67x).....	36
Figura 8	<i>Scaffold</i> de PLLA em microscopia estereoscópica (aumento de 4x).....	37
Figura 9	Placa de compensado de PLLA, de 10 x 10cm, com 3mm....	37
Figura 10	<i>Scaffold</i> de PLLA + HA - microscopia estereoscópica (aumento de 0,67x).....	38
Figura 11	<i>Scaffold</i> de PLLA + HA - microscopia estereoscópica (aumento de 4x).....	38

Figura 12	Placa de compensado de PLLA + HA, de 10 x 10cm, com 3mm.....	39
Figura 13	Animal anestesiado, imobilizado com elásticos e com a tricotomia do sitio cirúrgico realizada.....	42
Figura 14	Marcação do defeito a ser realizado com o craniótomo na calota craniana do animal.....	42
Figura 15	Defeito ósseo e porção óssea retirada na calota craniana do animal.....	43
Figura 16	Defeito de 11mm na calvária do animal.....	43
Figura 17	Colocação do implante no defeito ósseo.....	44
Figura 18	Implante colocado no defeito ósseo.....	44
Figura 19	Animal do grupo 1 com defeito realizado na calvária não cicatrizado 6 semanas após a craniotomia.....	49
Figura 20	Cicatriz em área operada em animal do grupo 2, 6 semanas após a craniotomia e colocação do <i>scaffold</i> de PLLA.....	50
Figura 21	Implante de PLLA aderido, preenchendo a área do defeito causado, 6 semanas após a craniotomia, em animal do grupo 2.....	51
Figura 22	Microscopia estereoscópica - implante de PLLA em peça cirúrgica de animal do grupo 2 (aumento de 0,67x).....	52
Figura 23	Microscopia estereoscópica - implante de PLLA em peça cirúrgica de animal do grupo 2 (aumento de 2x).....	52

Figura 24	Microscopia estereoscópica - implante de PLLA em peça cirúrgica de animal do grupo 2 (aumento de 4x).....	53
Figura 25	Fotomicrografia de corte histológico com implante de PLLA, evidenciando ausência de células ósseas no interior do implante, com reação do tipo corpo estranho próximo ao implante (círculo) e osso reativo ao redor (seta) (aumento de 100x).....	53
Figura 26	Implante de PLLA + HA aderido, preenchendo a área do defeito causado, 6 semanas após a craniotomia, em animal do grupo 3.....	55
Figura 27	Microscopia estereoscópica - implante de PLLA + HA em peça cirúrgica de animal do grupo 3 (aumento de 0,67x).....	56
Figura 28	Microscopia estereoscópica - implante de PLLA + HA em peça cirúrgica de animal do grupo 3 (aumento de 2x).....	57
Figura 29	Microscopia estereoscópica - implante de PLLA + HA em peça cirúrgica de animal do grupo 3 (aumento de 4x).....	57
Figura 30	Fotomicrografia de corte histológico com implante de PLLA + HA, evidenciando ausência de células ósseas no interior do implante, com reação do tipo corpo estranho próximo ao implante (círculo) e osso reativo ao redor (seta) (aumento de 100x).....	58
Esquema 1	Distribuição dos grupos segundo o tipo de tratamento realizado.....	40

	Pág.
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1- INTRODUÇÃO	22
1.1- Antecedentes na literatura	23
2- OBJETIVO	28
3- MÉTODO	30
3.1- Aprovação pelo comitê de ética	31
3.2- Materiais e amostra utilizados	31
3.3- Método para obtenção dos <i>scaffolds</i> de PLLA e PLLA + HA	33
3.3.1- Processo de Rotofiação e preparo dos <i>Scaffolds</i>	33
3.4- Procedimento cirúrgico	39
3.5- Critérios de inclusão e exclusão	45
3.6- Análise clínica dos animais	45
3.7- Análise das peças de calvárias	46
4- RESULTADOS	47
4.1- Grupo 1- Ratos que sofreram a craniotomia para realização do defeito ósseo	48

4.2- Grupo 2- Ratos que sofreram a craniotomia para realização do defeito ósseo que foi preenchido com <i>scaffold</i> de PLLA.....	49
4.3- Grupo 3- Ratos que sofreram a craniotomia para realização do defeito ósseo que foi preenchido com o <i>scaffold</i> de PLLA + HA.....	54
5- DISCUSSÃO.....	59
6- CONCLUSÃO.....	63
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8- ANEXO.....	71



1- INTRODUÇÃO

1.1- Antecedentes na literatura

Em cirurgias craniofaciais e cirurgias que envolvem tecido ósseo, o tratamento das sequelas de deformidades congênitas, traumas, infecções ou pós exérese de tumores continua sendo um desafio para o cirurgião e o uso de enxertos ósseos ou substitutos ósseos frequentemente são necessários^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10}.

Há séculos diversos pesquisadores vêm se dedicando a encontrar materiais com características adequadas para restauração e substituição dos tecidos ósseos no corpo humano. Materiais orgânicos e inorgânicos vêm sendo utilizados desde a antiguidade. Ligas de ouro e prata, foram empregadas para reparações de ossos do crânio pelos Incas em 3000 a.C^{11,12,13,14}. Desde então a procura e a evolução desses materiais se intensificaram, tendo sido usados e testados vários deles, entre os quais dentes, pedras, conchas, madeiras, ossos de animais e outras ligas metálicas^{6,11,13,14}.

O primeiro relato descrito da utilização de enxertos ósseos data de 1668, no qual o cirurgião holandês Job van Meekeren fez uso de uma porção do crânio de um cão, para a reparação de um defeito por trauma no crânio de um soldado. Porém, por ser considerado um método anticristão, o paciente foi excomungado pela igreja e então, após estar curado, para poder retornar às graças de Deus e da igreja, solicitou que o cirurgião retirasse o enxerto usado, que já havia sido reabsorvido naquele momento¹⁵.

O primeiro auto enxerto foi descrito por Philips Von Walter, na Alemanha, em 1820, quando ele recolocou partes de um crânio retiradas em uma trepanação¹⁵. Von Hacker em 1903, Kappis em 1915 e Petit em 1952 descreveram várias zonas doadoras de tecido ósseo à distância, como as costelas, crista íliaca, calota craniana, tíbia e outros^{16,17}.

Leriche e Policard, em 1922, enfatizaram a importância da revascularização através de neovasos para a incorporação e sobrevivência do enxerto ósseo. Urist e McLean, em 1952 demonstraram a capacidade de vários

tecidos, como o perióstio, em produzirem osso e, em 1970, Urist descreveu uma proteína morfogenética humana (BMP), presente no osso, como a responsável pela indução de células mesenquimais indiferenciadas transformarem-se em células com potencial osteogênico¹⁶.

Santoni Rugiu em 1969, Psillakis e cols em 1979 e Tessier em 1982 descreveram as aplicações de enxertos de tábua externa de calota craniana no crânio e na face^{12,17}.

Os enxertos ósseos autólogos, mesmo sendo considerado padrão ouro, isto é, a melhor opção na reparação de defeitos ósseos, apresentam algumas desvantagens. A principal delas é a dificuldade de se encontrar grandes áreas doadoras, que resultem em baixa morbidade às áreas doadoras^{1,2,3,4,5,6}. Em virtude disso, e apoiados no desenvolvimento científico e tecnológico, muitos trabalhos foram realizados com o objetivo de dispor de materiais de origem sintética com características adequadas que permitissem diminuir ou eliminar o uso de materiais de origem biológica^{4,5}.

Entretanto, somente no século XX, mais precisamente a partir da década de 40 é que o uso dos biomateriais tornou-se mais comum, com o desenvolvimento da ciência dos bioimplantes, desenvolvimento de antibióticos de amplo espectro e melhores métodos de esterilização^{18,19}, permitindo que várias técnicas e materiais fossem desenvolvidos para a possível correção dessas deformidades, outra opção aos enxertos ósseos autólogos^{2,5,18}.

Biomaterial é qualquer material, natural ou artificial, que compreende o todo ou uma parte de uma estrutura viva ou um dispositivo biomédico que executa, acrescenta ou substitui uma função natural^{19,20,21}. Os principais biomateriais são os polímeros biorreabsorvíveis e as biocerâmicas.

Para a fabricação de implantes, substitutos ósseos, de alta qualidade, os biomateriais devem apresentar certos requisitos essenciais, como biocompatibilidade, bioadesão, propriedades mecânicas semelhantes às do

tecido a ser substituído (resistência e elasticidade), processabilidade e resistência à corrosão^{8,10,22,23}.

Biocompatibilidade não significa que o material deve ser absolutamente inerte ou inócuo, mas sim apresentar respostas teciduais adequadas ao sistema hospedeiro, permitindo assim uma integração entre os sistemas. Desta forma, não necessariamente o biomaterial usado como carreador de células deva ser biodegradável, bioabsorvível ou biorreabsorvível, embora esses tipos de características sejam uma busca constante para o material a ser usado na engenharia de tecidos^{10,20,21}.

Segundo Michel Vert (1992), químico e diretor do Centro de Pesquisas em Biopolímeros Artificiais da Universidade de Montpellier, na França, biodegradável é o termo usado para polímeros e dispositivos sólidos que, devido a degradação molecular, sofrem dispersão in vivo, sem a eliminação pelo organismo. Bioabsorvível, por sua vez, é o termo usado para os materiais que se dissolvem em fluidos corpóreos. Por fim, os materiais biorreabsorvíveis são aqueles que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são eliminados por rotas metabólicas do organismo^{10,20}.

Dentre os polímeros sintéticos biorreabsorvíveis encontra-se os poli(α -hidroxi ácidos), como por exemplo o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), o poli(-caprolactona) (PCL) e o material estudado nesse trabalho, o poli(ácido L Lático) (PLLA), além de seus copolímeros, entre outros. Alguns desses poli(α -hidroxi ácidos) são amplamente conhecidos, utilizados comercialmente e aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), originalmente usados como fios de sutura (Dexon[®], Vicryl[®], Maxon[®], PDS[®] por exemplo) e atualmente em materiais de fixação óssea (Biofix[®], Fixsorb[®], neofix[®] entre outros)^{10,20,24,25,26}.

Biocerâmicas são materiais que apresentam boa integração com tecido ósseo vivo, usadas para reparar, reconstruir ou substituir partes do corpo. A mais utilizada atualmente é a Hidroxiapatita (HA), um fosfato cerâmico formado

por cálcio, fósforo, oxigênio e hidrogênio, empregada em larga escala na medicina e na odontologia como um substituto, por apresentar estruturas similares à fase mineral de ossos e dentes. A HA pode ser utilizada em forma pura, apresentando mínima reabsorção, ou ligada a outros fosfatos, mais solúvel, permitindo a reabsorção do implante no corpo^{9,27,28}.

Com o avanço da engenharia de tecidos, um novo e promissor caminho começou a ser percorrido^{1,2,7,10,20,29,30} e passou-se então a buscar uma forma de desenvolver tecidos, ósseo por exemplo, a partir de células pluripotentes, também conhecidas como células tronco.

Para isso, tornou-se necessário o desenvolvimento de matrizes artificiais tridimensionais poliméricas, os *scaffolds*, compostas de materiais biocompatíveis, os biomateriais, que pudessem carrear essas células e mantê-las estruturadas até o desenvolvimento e integração do novo tecido no leito desejado^{10,19,20,25,30}.

As matrizes artificiais tridimensionais poliméricas podem ser classificadas em dois tipos: matrizes artificiais baseadas em polímeros naturais e baseadas em polímeros sintéticos.

As primeiras, baseadas em polímeros naturais, formadas por proteoglicanas, glicoproteínas e glicosaminoglicanas são mais vantajosas, uma vez que possuem excelentes propriedades biológicas, como por exemplo, a atração por moléculas de água ligadas ao sódio hidratando a matriz extracelular, além de adesão celular, biocompatibilidade e biodegradabilidade^{10,19,20,24,30,31}. Entre elas, pode-se citar, por exemplo, o colágeno, o ácido hialurônico, a quitosana e a gelatina^{10,19,20,24,30,31}.

As segundas, baseadas em polímeros sintéticos, são atualmente fabricadas com o uso de polímeros também biocompatíveis, o que evita reações crônicas ou rejeições comuns aos polímeros não biocompatíveis. A grande vantagem destas em relação às primeiras é que, além de permitirem a fabricação em larga escala, suas propriedades mecânicas e tempo de degradação podem ser

controlados. Atualmente, os polímeros artificiais mais usados na fabricação dos biomateriais são poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido L Lático) (PLLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL)^{10,19,20,31,32}

Através de processos como eletrofiação (ou *electrospinning*) e a rotofiação (ou *Rotary Jet spinning*), vários polímeros como o colágeno, o Poli ϵ -caprolactone, o PCL-Poli Etileno Glicol, o Poli L Lactide (PLLA) entre outros, são trabalhados em fibras nano estruturadas de maneira a construir essas matrizes de suporte tridimensional^{10,20,30,32,33,34,35}.

O Poli L Lactide (PLLA) é um material obtido pela polimerização de monômeros levógiros do poli ácido lático (PLA), que, por sua vez, foi descrito inicialmente por Carothers em 1932. Entretanto, somente em 1954, quando patenteadado pela DuPont, como um produto melhor e com maior massa molar é que passou a ganhar visibilidade, até ter seu primeiro uso comercial descrito em 1972, na fabricação de fios cirúrgicos absorvíveis. Atualmente, têm sido amplamente utilizado na fabricação de biomateriais por apresentar boas propriedades mecânicas, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, características essenciais para a confecção dos *scaffolds*. Sua degradação ocorre por quebra de suas cadeias moleculares por hidrólise das ligações ésteres, com tempo de degradação maior que 24 meses^{10,25,26,30,33,35,36}.

A Hidroxiapatita (HA), também usada nesse experimento, é o maior componente inorgânico dos ossos e dentes, responsável por aproximadamente 50% do volume e 70% do peso dessas estruturas. A primeira classe de hidroxiapatita macroporosa foi desenvolvida na década de 1970 e, desde então, vem sendo utilizada na fabricação de biomateriais de maneira importante até os dias atuais. É um fosfato cerâmico formado por cálcio, fósforo, oxigênio e hidrogênio, que, em associação com o PLLA oferece características estruturais semelhantes aos *scaffolds* de PLLA apenas, porém com maior resistência mecânica e biodegradabilidade diferentes^{9,27,37}. O uso do PLLA e da HA são aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)^{10,20,24,25,26}.



2- OBJETIVO

O objetivo desse experimento é avaliar o uso de *scaffolds* de Poli L Lactide (PLLA) e Poli L Lactide com Hidroxiapatita (PLLA + HA), em defeitos críticos em calota craniana de ratos Wistar.



3- MÉTODO

3.1- Aprovação pelo comitê de ética

O estudo foi aplicado sob os princípios éticos da experimentação animal de acordo com o Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988) e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA/Unicamp, protocolo nº 1873-1 (Anexo1), tendo seu nome alterado de “Uso de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo no tratamento de defeitos críticos em calvárias de ratos” para “Uso de *scaffolds* de Poli L Lactide (PLLA) e de Poli L Lactide com Hidroxiapatita (PLLA + HA) em calota craniana. Modelo experimental em ratos Wistar” (Anexo 1: Certificado de aprovação pelo CEEA).

3.2- Materiais e amostra utilizados

- Micro Retífica (Figura 1);
- Fresa de 11mm para craniotomia (Figura 2);
- Placa de compensado de PLLA, de 10 x 10cm, com 3mm de espessura;
- Placa de compensado de PLLA + HA, de 10 x 10cm, com 3mm de espessura;
- Punch com diâmetro interno de 10.8mm (Figura 3);
- 30 ratas, com pesos entre 250 e 300g, da linhagem Wistar e com idade de 10 semanas;
- Materiais cirúrgicos;
- Materiais para anestesia, imobilização do animal, tricotomia, incisão e suturas.



Figura 1- Micro retífica



Figura 2- Fresa de 11mm



Figura 3- *Punch* de 10.8

3.3- Método para obtenção dos *scaffolds* e PLLA e PLLA + HA

3.3.1- Processo de Rotofiação e preparo dos *Scaffolds*

O sistema de rotofiação é composto basicamente por uma base circular acoplada a um motor elétrico, um coletor onde são depositadas as fibras produzidas e um reservatório que aloca a solução (Figura 4). O reservatório possui orifícios de vazão por onde escoa a solução empregada e o seu diâmetro definirá o diâmetro das fibras produzidas podendo variar de 0,1mm a 2,0mm. A rotação do dispositivo pode chegar até 10.000 rpm^{10,35}.

Os fios de PLLA (Figura 5) ou PLLA + HA (Figura 6) são formados pela expulsão da solução polimérica pelos orifícios de vazão. O conjunto gira em seu próprio eixo e, devido à aceleração centrípeta e ao processo de centrifugação, a solução é lançada para fora do reservatório formando os fios. A solução é continuamente injetada no reservatório para manter o fluxo constante, por tempo indeterminado, originando a quantidade de fibra desejada^{10,35}. Após isso, as fibras são compactadas em uma prensa, em placas e cortadas circularmente.

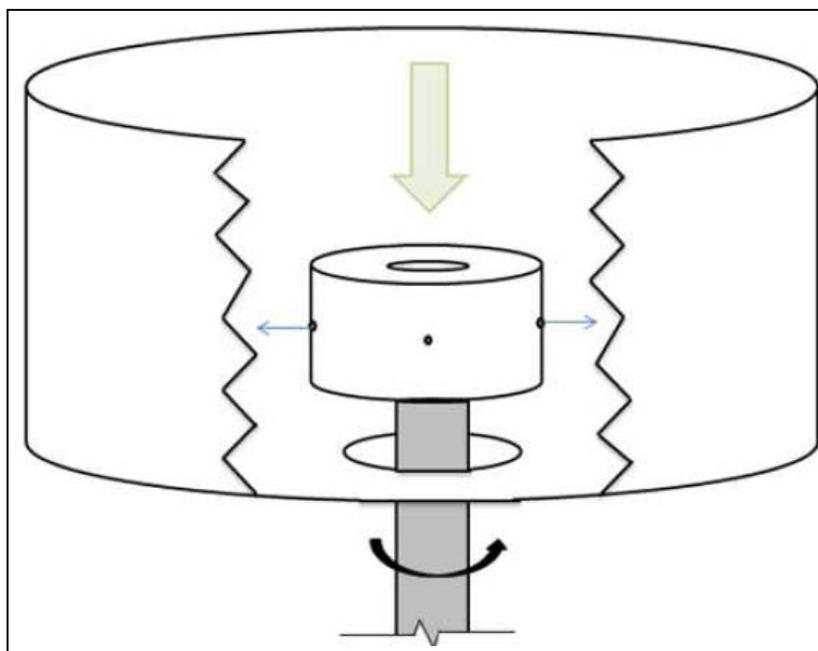


Figura 4- Sistema de rotofiação: a imagem esquematiza o aparelho usado no processo de rotofiação. A seta maior indica o local onde é colocada a solução polimérica e as setas menores mostram os orifícios por onde essa solução escoaria^{10,35}.

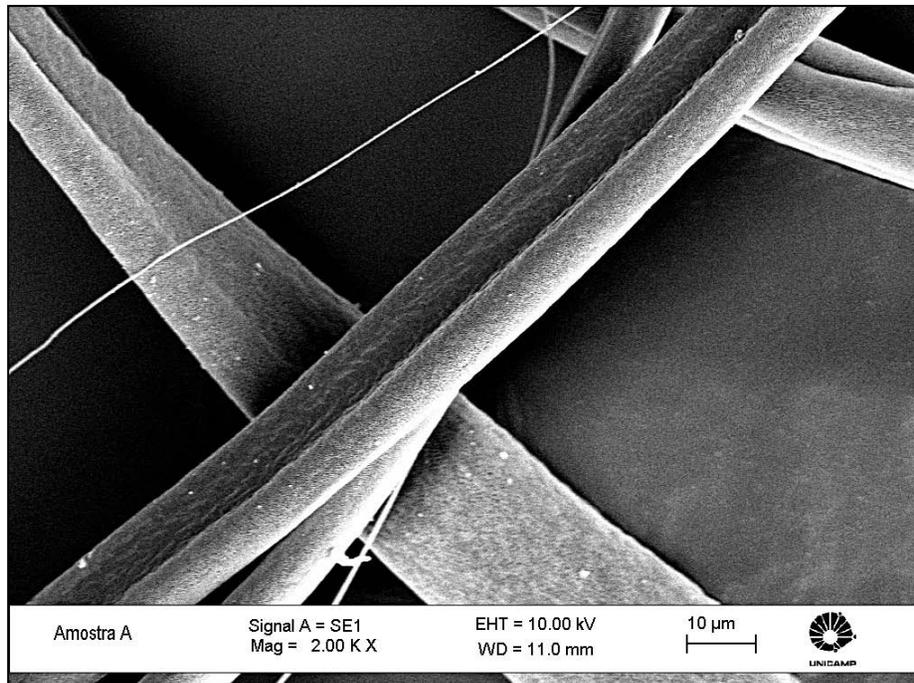


Figura 5- Fotografia por microscopia eletrônica de varredura de fibra de PLLA (aumento de 2.000x).

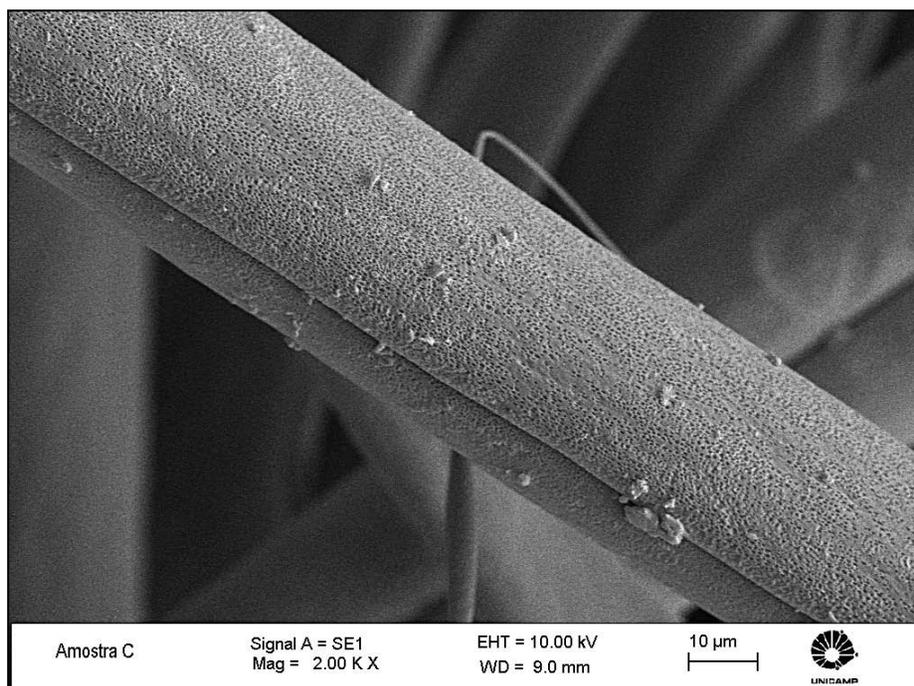


Figura 6- Fotografia por microscopia eletrônica de varredura de fibra de PLLA com aglomerados de HA (aumento de 2.000x).

Nesse experimento utilizaram-se *scaffolds* formados por blocos porosos de fibras de PLLA (Figuras 7 e 8) e de PLLA com HA (Figuras 10 e 11), prensados a 5 toneladas/10cm², desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Mecânica da Unicamp, com 90% do volume de porosidade, poros de aproximadamente 300µm a 500µm de diâmetro^{7,33,37}. Foram fornecidas uma placa de compensado de PLLA, de 10 x 10cm, com 3mm de espessura (Figura 9) e uma placa de compensado de PLLA + HA, de 10 x 10cm, com 3mm de espessura (Figura 12) das quais foram retirados os *scaffolds*.

Esses *scaffolds* foram recortados das placas com ferramenta cirúrgica tipo “*punch*” com diâmetro interno de 10,8mm, tamanho pouco menor do que a lesão, de 11mm, para acoplar ao defeito, e foram esterilizados em óxido de etileno^{7,37,38}.



Figura 7- *Scaffold* de PLLA em microscopia estereoscópica (aumento de 0,67x).

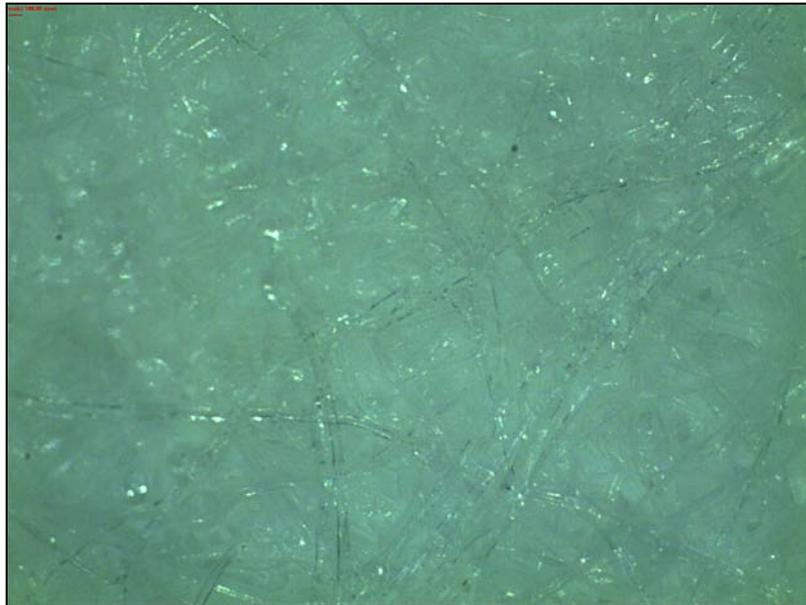


Figura 8- Scaffold de PLLA em microscopia estereoscópica (aumento de 4x).

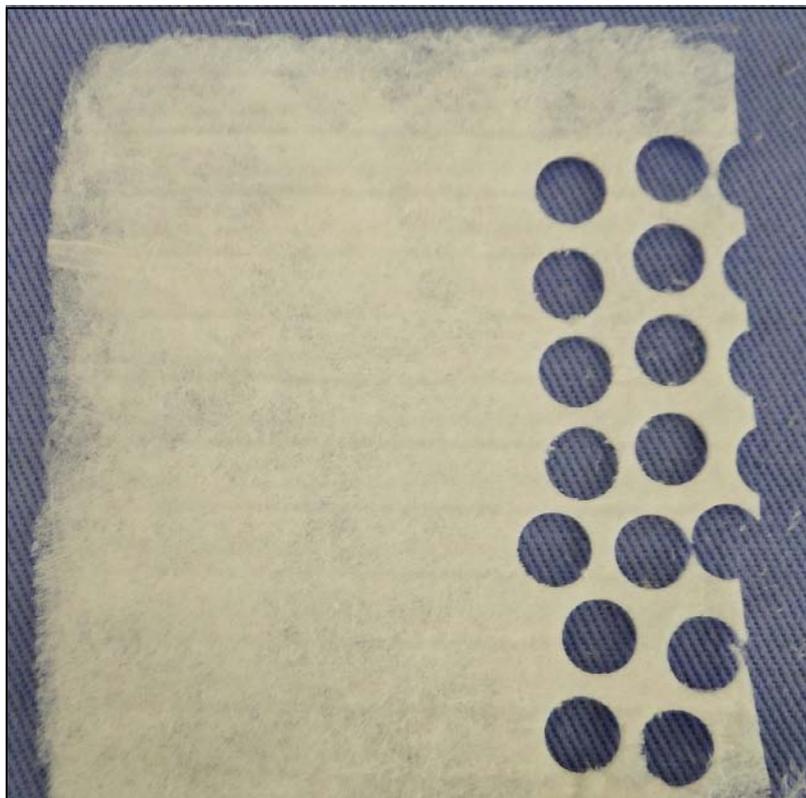


Figura 9- Placa de compensado de PLLA, de 10 x 10cm, com 3mm.



Figura 10- *Scaffold* de PLLA + HA - microscopia estereoscópica (aumento de 0,67x).



Figura 11- *Scaffold* de PLLA + HA - microscopia estereoscópica (aumento de 4x).

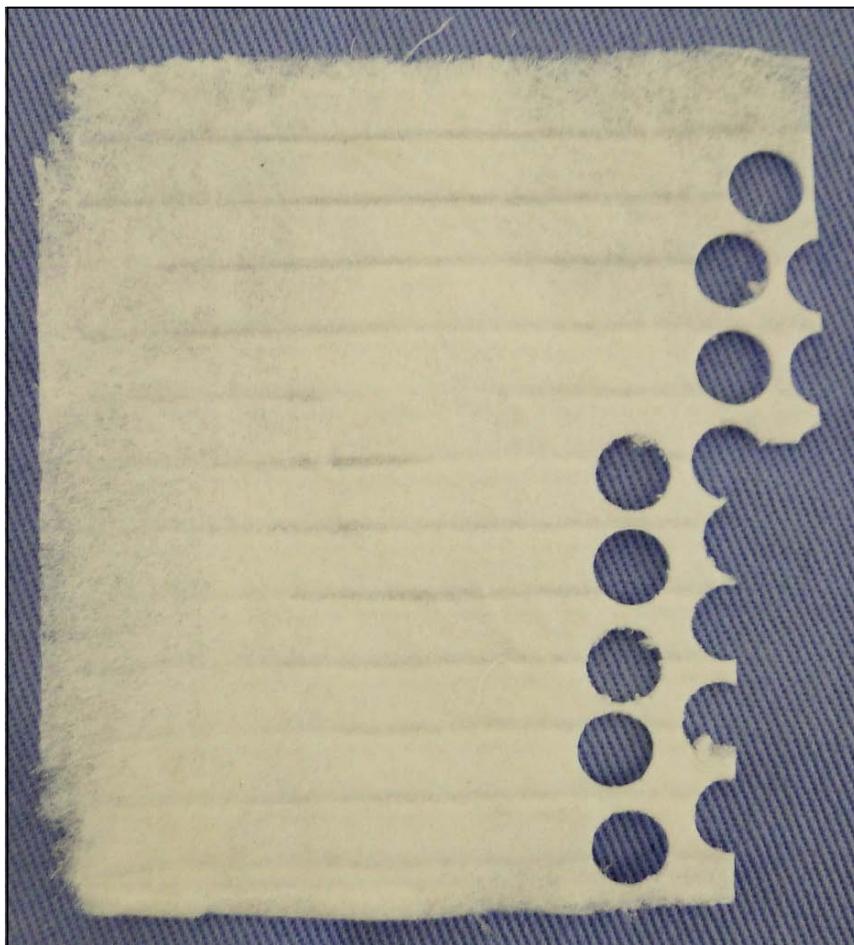


Figura 12- Placa de compensado de PLLA + HA, de 10 x 10cm, com 3mm.

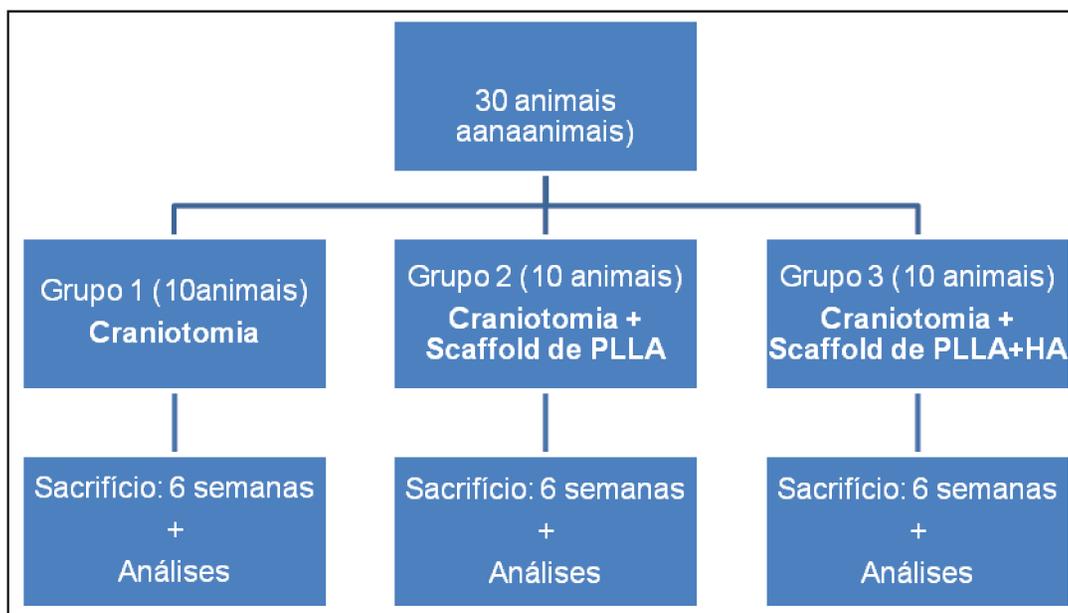
3.4- Procedimento cirúrgico

Foram utilizados 30 ratas, com pesos entre 250 e 300g, da linhagem Wistar e com idade de 10 semanas⁷.

Os animais foram distribuídos em três grupos de dez (10) animais de acordo com o tipo de tratamento proposto (Esquema 1).

- Grupo 1- Apenas a craniotomia para realização do defeito ósseo, sem colocação de *scaffolds*;
- Grupo 2- Craniotomia para realização do defeito ósseo, preenchido com o *scaffold* de PLLA, no tamanho de 10,8mm;

- Grupo 3- Craniotomia para realização do defeito ósseo, preenchido com o *scaffold* de PLLA + HA, no tamanho de 10,8mm.



Esquema 1- Distribuição dos grupos segundo o tipo de tratamento realizado.

Todos os animais sofreram craniotomia subperiosteal sob anestesia, com Xilasina a 1%, na dose de 5mg/Kg em subcutâneo e Sulfato de Ketamina 40mg/Kg, intravenosa em acesso obtido na cauda do animal^{7,39,40,41}.

Depois de anestesiados, as ratas foram devidamente imobilizadas por meio de elásticos e foi realizada tricotomia da área a ser operada (Figura 13). Em seguida, foi feita incisão na pele com bisturi de lâmina fria e dissecção por planos de pele, subcutâneo e gordura, levantamento do perióstio e dissecção da calota craniana para marcação e ressecção de porção óssea, com fresa, de 11mm, sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9%, defeito este considerado crítico para o tamanho do animal, isto é, que não se fecha espontaneamente em nenhum período de tempo^{7,39,40} (Figuras 14 e 15).

Cada grupo então foi tratado conforme proposto (Figuras 16, 17 e 18):

- Grupo 1- Apenas a craniotomia;
- Grupo 2- Craniotomia com o *scaffold* de PLLA;
- Grupo 3- Craniotomia com o *scaffold* de PLLA + HA;

Por fim, os planos incisados foram fechados com pontos de nylon 5.0.

A analgesia no pós-operatório foi feita com paracetamol (Tylenol[®]), na dose máxima de 110mg/kg, diluído em água no bebedouro a 1mg/ml^{7,39,40,41}.

As ratas de cada grupo foram eutanasiadas após seis semanas, usando-se para essa finalidade aprofundamento anestésico com tiopental sódico endovenoso e observação por 20 minutos. Após a eutanásia, as feridas operatórias foram exploradas e as calvárias retiradas para exame clínico, sob microscopia estereoscópica e óptica. Todas as cirurgias foram realizadas pelo pesquisador.

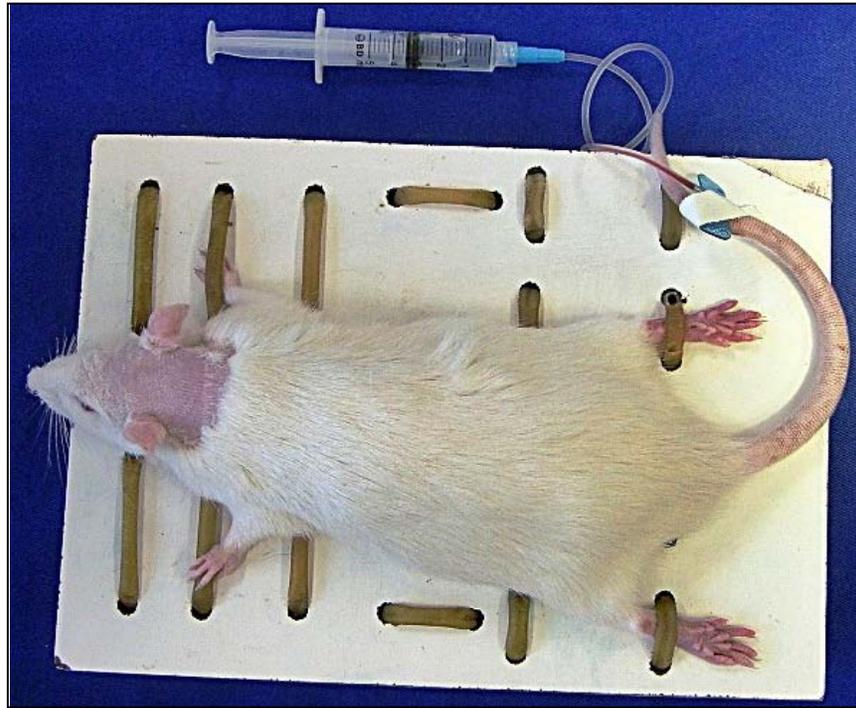


Figura 13- Animal anestesiado, imobilizado com elásticos e com a tricotomia do sitio cirúrgico realizada.



Figura 14- Marcação do defeito a ser realizado com o craniótomo na calota craniana do animal.

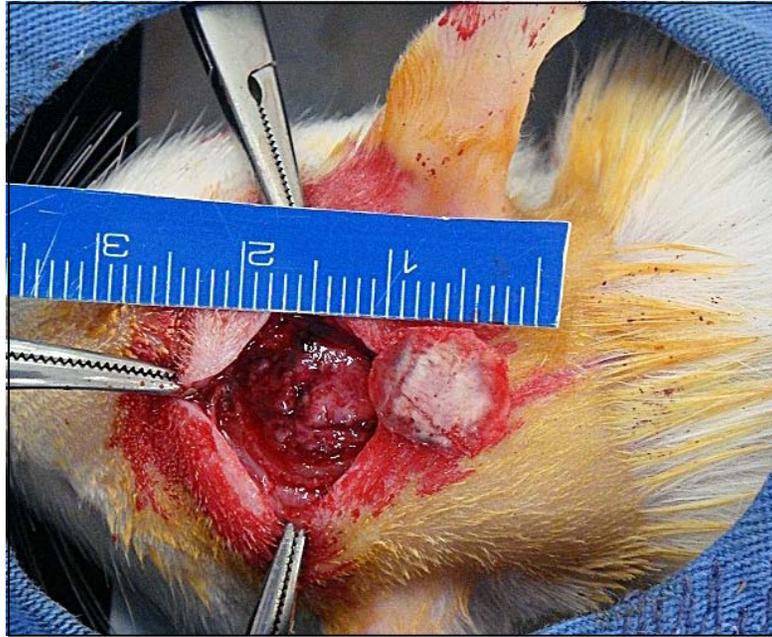


Figura 15- Defeito ósseo e porção óssea retirada na calota craniana do animal.

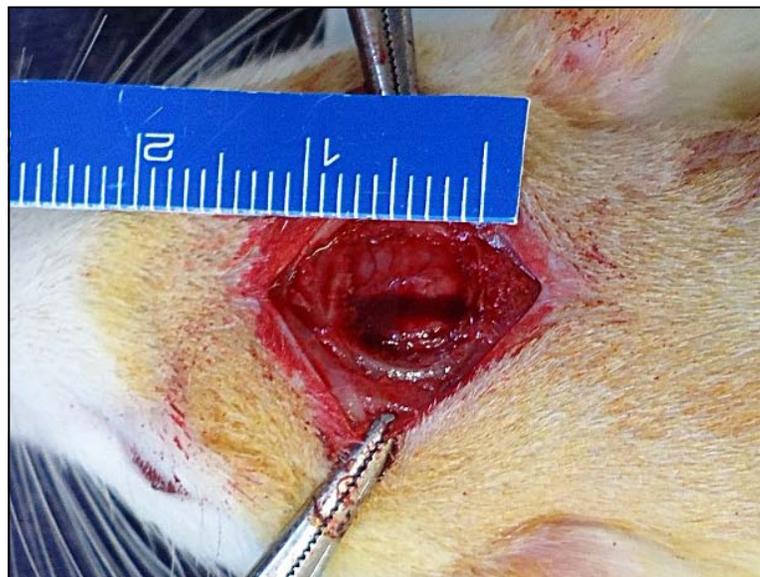


Figura 16- Defeito de 11mm na calvária do animal.

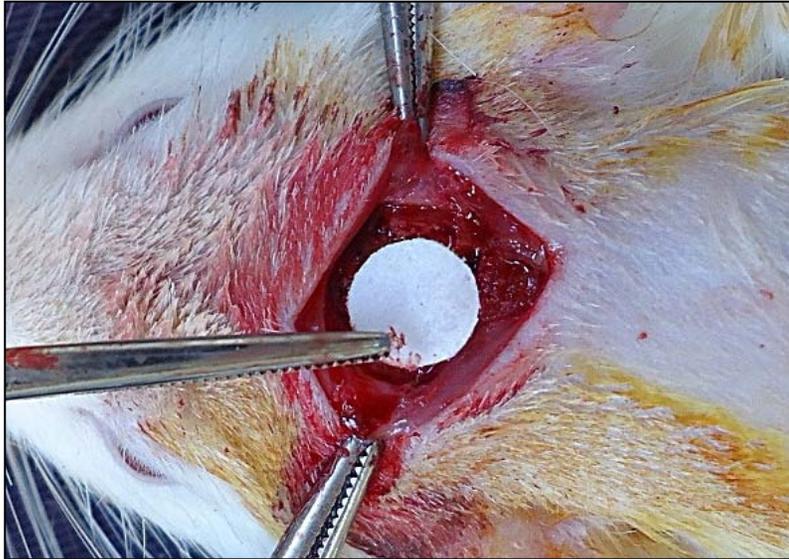


Figura17- Colocação do implante no defeito ósseo.



Figura 18- Implante colocado no defeito ósseo.

3.5- Critérios de inclusão e exclusão

O critério de inclusão foi:

- Uso de ratas com pesos entre 250 e 300g, da linhagem Wistar e com idade de 10 semanas

O critério de exclusão foi:

- Ratas que apresentaram complicação anestésica no preparo cirúrgico ou danos neurológicos em virtude da craniotomia.

3.6- Análise clínica dos animais

Após seis semanas os animais foram eutanasiados e os sítios cirúrgicos explorados, sendo observados clinicamente os seguintes itens, apresentados nos resultados em formato de tabelas:

- Presença de sinais flogísticos: hiperemia e/ou edema no sítio cirúrgico.
- Deiscência da sutura na ferida cirúrgica.
- Presença de sinais de coleção líquida sob a pele: hematoma ou seroma.
- Fechamento ósseo do defeito.
- Sinais de extrusão do implante (nos grupos 2 e 3).
- Integração dos implantes com os tecidos adjacentes, caracterizado pela fixação dos mesmos ao toque e pela cobertura visível por tecidos fibrosos. Foram marcados, nas tabelas, com o sinal de positivo (+) quando apresentavam tais sinais de integração (nos Grupos 2 e 3).

3.7- Análise das peças de calvárias

- Análise por meio de microscópio estereoscópico das peças de calvárias.

Análise histológica dos cortes histológicos das peças, corados com HE, por meio de microscópio óptico.



4- RESULTADOS

Os dados obtidos são apresentados nas tabelas a seguir.

Um animal do grupo 1 apresentou alteração motora em um dos membros inferiores e um animal do grupo 1 e um do grupo 3 evoluíram a óbito na indução anestésica, totalizando 3 animais excluídos e substituídos na pesquisa.

4.1- Grupo 1- Animais que sofreram a craniotomia para realização do defeito ósseo e não receberam *scaffolds*

Os animais do grupo 1 não apresentaram sinais flogísticos, deiscência de sutura, coleção líquida sob a pele e fechamento ósseo do defeito após 6 semanas (Figura 19), conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1- Análise clínica dos animais do grupo 1.

	Sinais flogísticos	Deiscência da sutura	Coleção líquida sob a pele	Fechamento ósseo do defeito
Animal 1	-	-	-	-
Animal 2	-	-	-	-
Animal 3	-	-	-	-
Animal 4	-	-	-	-
Animal 5	-	-	-	-
Animal 6	-	-	-	-
Animal 7	-	-	-	-
Animal 8	-	-	-	-
Animal 9	-	-	-	-
Animal 10	-	-	-	-



Figura 19- Animal do grupo 1 com defeito realizado na calvária não cicatrizado 6 semanas após a craniotomia.

4.2- Grupo 2- Animais que sofreram a craniotomia para realização do defeito ósseo que foi preenchido com o *scaffold* de PLLA

Os animais do grupo 2 não apresentaram sinais flogísticos, deiscência de sutura (Figura 20), coleção líquida sob a pele, extrusão do implante e fechamento ósseo do defeito após 6 semanas. Por outro lado, apresentaram boa integração do implante de PLLA, segundo os critérios clínicos avaliados (Figura 21), conforme apresentado na tabela 2.

O exame das peças de calvárias pelo microscópio estereoscópico mostrou a presença de neovasos, confirmando a integração do implante (Figuras 22, 23 e 24). O exame das lâminas, pelo microscópio óptico, mostrou ausência de células ósseas no interior do implante, com reação do tipo corpo estranho e osso reativo ao redor (Figura 25), apresentado na tabela 3.

Tabela 2- Análise clínica dos animais do grupo 2.

	Sinais flogísticos	Deiscência da sutura	Coleção líquida sob a pele	Extrusão do implante	Integração do implante	Fechamento ósseo do defeito
Animal 1	-	-	-	-	+	-
Animal 2	-	-	-	-	+	-
Animal 3	-	-	-	-	+	-
Animal 4	-	-	-	-	+	-
Animal 5	-	-	-	-	+	-
Animal 6	-	-	-	-	+	-
Animal 7	-	-	-	-	+	-
Animal 8	-	-	-	-	+	-
Animal 9	-	-	-	-	+	-
Animal 10	-	-	-	-	+	-

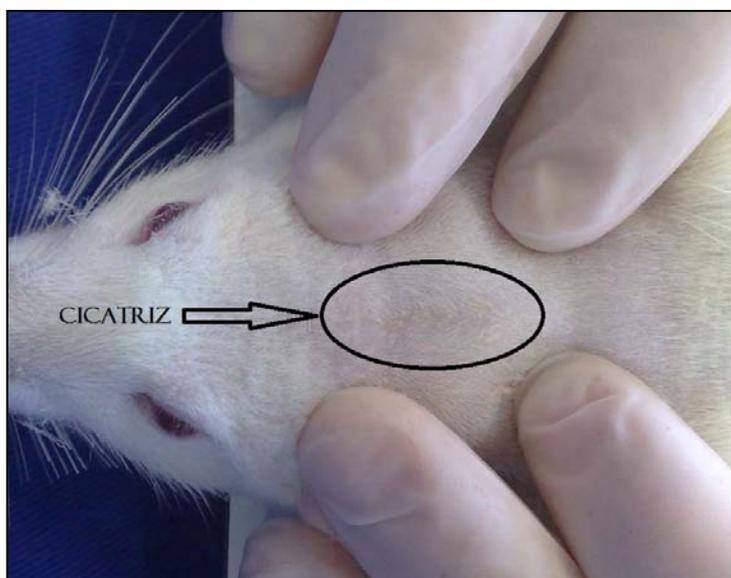


Figura 20- Cicatriz em área operada em animal do grupo 2, 6 semanas após a craniotomia e colocação do *scaffold* de PLLA.



Figura 21- Implante de PLLA aderido, preenchendo a área do defeito causado, 6 semanas após a craniotomia, em animal do grupo 2.

Tabela 3- Análise das peças de calvárias doas animais do grupo 2.

	Microscópio estereoscópico		Microscópio óptico		
	Presença de neovasos	Integração do implante	Presença de células ósseas dentro do <i>Scaffold</i>	Reação do tipo corpo estranho	Osso reativo ao redor do implante
Animal 1	+	+	-	+	+
Animal 2	+	+	-	+	+
Animal 3	+	+	-	+	+
Animal 4	+	+	-	+	+
Animal 5	+	+	-	+	+
Animal 6	+	+	-	+	+
Animal 7	+	+	-	+	+
Animal 8	+	+	-	+	+
Animal 9	+	+	-	+	+
Animal 10	+	+	-	+	+

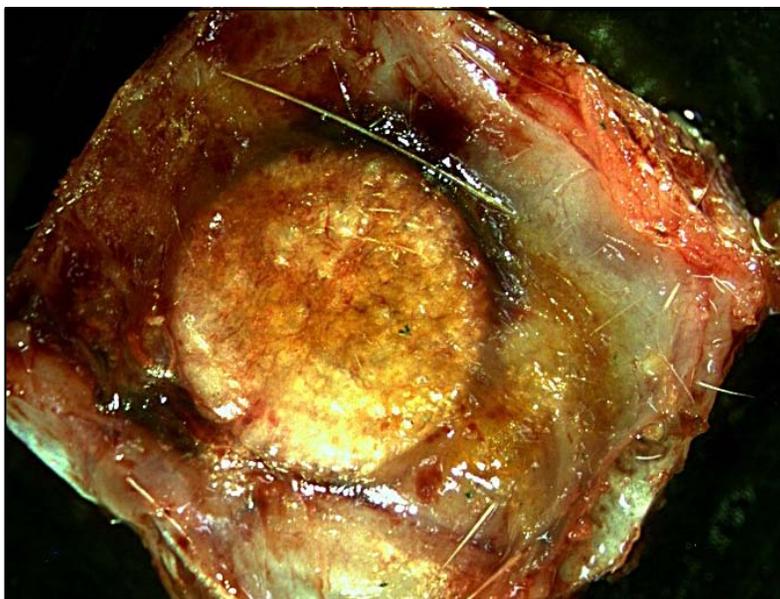


Figura 22- Microscopia estereoscópica - implante de PLLA em peça cirúrgica de animal do grupo 2 (aumento de 0,67x).

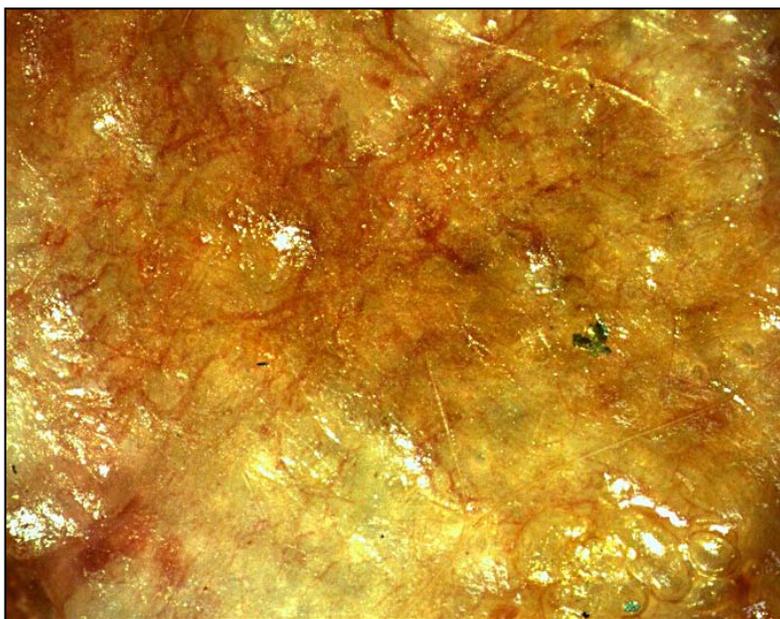


Figura 23- Microscopia estereoscópica - implante de PLLA em peça cirúrgica de animal do grupo 2 (aumento de 2x).

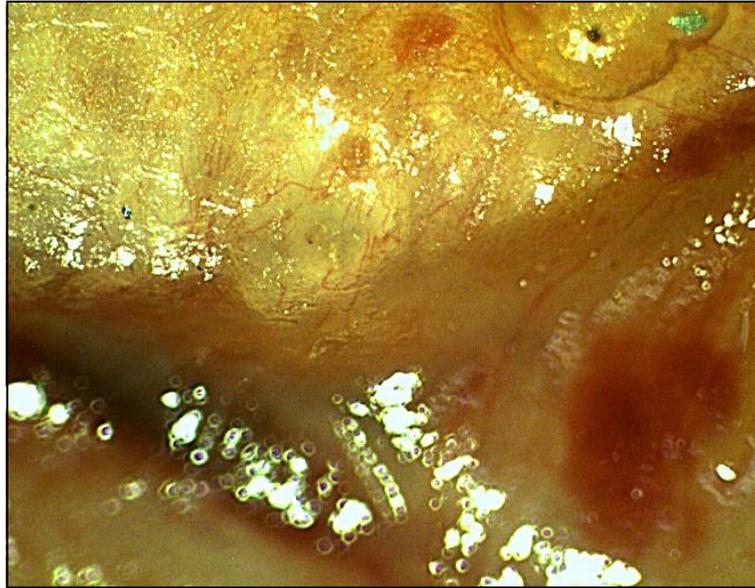


Figura 24- Microscopia estereoscópica - implante de PLLA em peça cirúrgica de animal do grupo 2 (aumento de 4x).

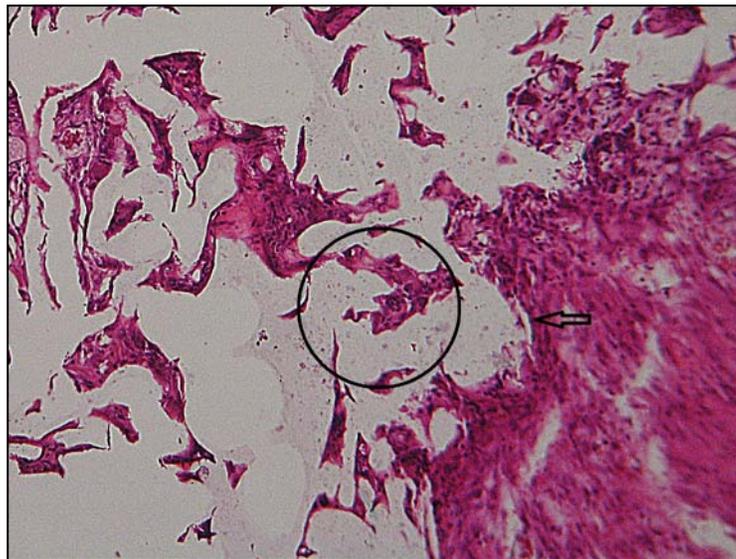


Figura 25- Fotomicrografia de corte histológico com implante de PLLA, evidenciando ausência de células ósseas no interior do implante, com reação do tipo corpo estranho próximo ao implante (círculo) e osso reativo ao redor (seta) (aumento de 100x).

4.3- Grupo 3- Animais que sofreram a craniotomia para realização do defeito ósseo que foi preenchido com o *scaffold* de PLLA + HA

Assim como no grupo 2, os animais do grupo 3 também não apresentaram sinais flogísticos, deiscência de sutura, coleção líquida sob a pele, extrusão do implante e fechamento ósseo do defeito após 6 semanas, dados apresentados na tabela 4. Apresentaram boa integração do implante de PLLA + HA, segundo os critérios clínicos avaliados (Figura 26).

O exame das peças de calvárias pelo microscópio estereoscópico mostrou também a presença de neovasos, confirmando a integração do implante (Figuras 27, 28 e 29). O exame das lâminas pelo microscópio óptico, como no grupo 2, mostrou ausência de células ósseas no interior do implante, com reação do tipo corpo estranho e osso reativo ao redor (Figura 30), apresentados na tabela 5.

Tabela 4- Análise clínica dos animais do grupo 3.

	Sinais flogísticos	Deiscência da sutura	Coleção líquida sob a pele	Extrusão do implante	Integração do implante	Fechamento ósseo do defeito
Animal 1	-	-	-	-	+	-
Animal 2	-	-	-	-	+	-
Animal 3	-	-	-	-	+	-
Animal 4	-	-	-	-	+	-
Animal 5	-	-	-	-	+	-
Animal 6	-	-	-	-	+	-
Animal 7	-	-	-	-	+	-
Animal 8	-	-	-	-	+	-
Animal 9	-	-	-	-	+	-
Animal 10	-	-	-	-	+	-



Figura 26- Implante de PLLA+ HA aderido, preenchendo a área do defeito causado, 6 semanas após a craniotomia, em animal do grupo 3.

Tabela 5- Análise das peças de calvárias dos animais do grupo 3.

	Microscópio estereoscópico		Microscópio óptico		
	Presença de neovasos	Integração do implante	Presença de células ósseas dentro do <i>Scaffold</i>	Reação do tipo corpo estranho	Osso reativo ao redor do implante
Animal 1	+	+	-	+	+
Animal 2	+	+	-	+	+
Animal 3	+	+	-	+	+
Animal 4	+	+	-	+	+
Animal 5	+	+	-	+	+
Animal 6	+	+	-	+	+
Animal 7	+	+	-	+	+
Animal 8	+	+	-	+	+
Animal 9	+	+	-	+	+
Animal 10	+	+	-	+	+



Figura 27- Microscopia estereoscópica - implante de PLLA + HA em peça cirúrgica de animal do grupo 3 (aumento de 0,67x).

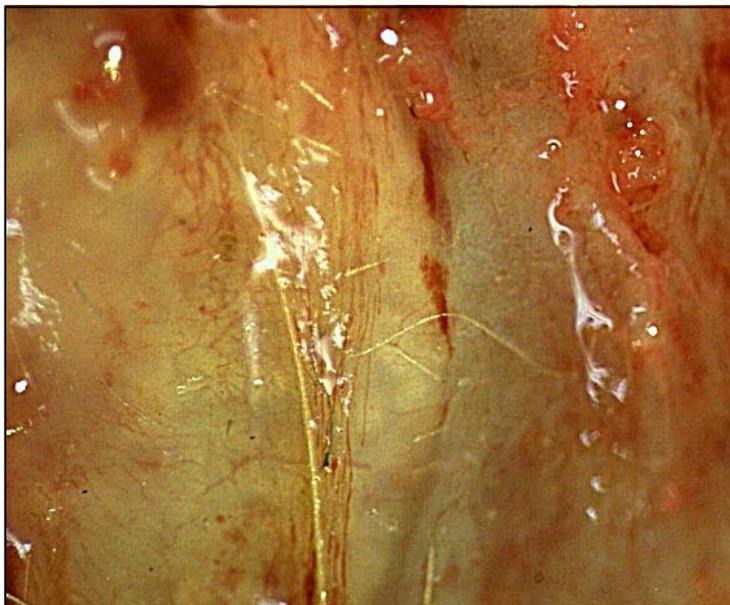


Figura 28- Microscopia estereoscópica - implante de PLLA+HA em peça cirúrgica de animal do grupo 3 (aumento de 2x).

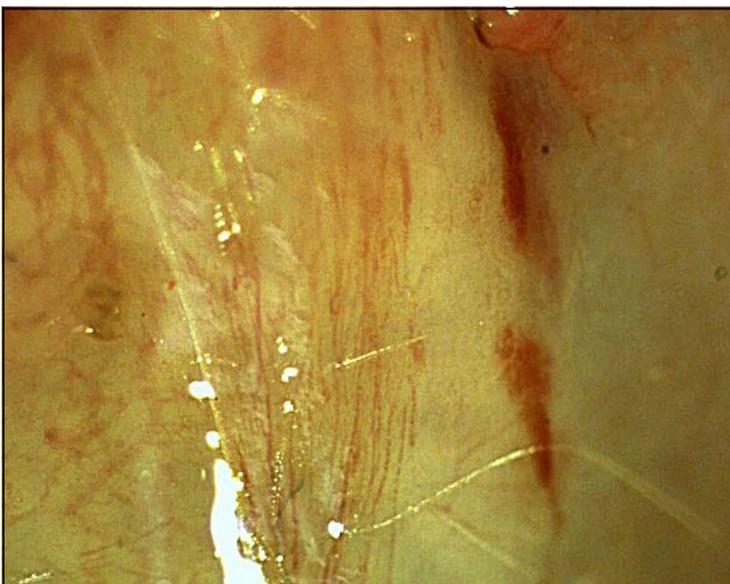


Figura 29- Microscopia estereoscópica - implante de PLLA+HA em peça cirúrgica de animal do grupo 3 (aumento de 4x).



Figura 30- Fotomicrografia de corte histológico com implante de PLLA + HA, evidenciando ausência de células ósseas no interior do implante, com reação do tipo corpo estranho próximo ao implante (círculo) e osso reativo ao redor (seta) (aumento de 100x)



5-DISSCUSSÃO

A reconstrução de grandes defeitos ósseos, sejam causados por traumas, tumores ou pós-ressecções cirúrgicas, com tecido ósseo autólogo, o que é considerado ainda hoje padrão ouro para esse tipo de reparo, encontra muitos obstáculos, considerando a escassez de áreas doadoras e limitação de tecidos disponíveis^{1,2,3,4,5,6,7,8}.

Na busca incessante por outras possibilidades, os materiais sintéticos se mostraram como importante e interessante opção, superando as desvantagens limitadoras do osso autólogo e se aproximando muito da estrutura de sua matriz extracelular^{2,5,8,18}. Entre os mais conhecidos, e utilizados nesse estudo, o Poli L Lactide (PLLA) e o Poli L Lactide associado à Hidroxiapatita (PLLA + HA) se destacam por apresentar características desejadas para um biomaterial, como a facilidade de processamento, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, além de terem seus usos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)^{10,19,20,24,25,26}.

O sistema de rotofiação, processo usado para o preparo das fibras componentes dos *scaffolds*, segundo Guacira dos Reis Rigon, em sua tese de mestrado apresentada na Unicamp em 2012, é composto por um dispositivo simples, de baixo custo, formado basicamente por uma base circular acoplada a um motor elétrico, um coletor e um reservatório para a solução a ser despejada. Essa facilidade de processamento vem aumentando o interesse pela rotofiação, fazendo com que outros processos, como a eletrofiação, que depende do uso de campo elétrico, sejam preteridos no preparo dessas matrizes^{8,10,35}.

O modelo animal adotado foi o mesmo utilizado em outros estudos^{7,27,39,40,41}, alguns dos quais também foram usados biomateriais implantados em ratos. Da mesma forma, seguiram dados da literatura o tempo de 6 semanas para o sacrifício, as técnicas cirúrgicas utilizadas e a confecção do defeito ósseo^{1,7,8,27,29,39,40,41}.

Os resultados apresentados no grupo 1 são semelhantes aos encontrados em outros trabalhos sobre esse assunto, demonstrando a efetividade alcançada ao se criar um defeito de 11mm na calvária dos ratos, defeito esse que não cicatrizou espontaneamente, portanto, podendo ser considerado um defeito crítico^{1,7,8,27,29,39,40,41,42,43}.

As ausências de deiscência de sutura e de sinais flogísticos em todos os animais estão de acordo com a literatura. Não foram observadas também coleções líquidas, sangue ou serosidade, sob a pele, porém esses dados não foram pesquisados nos artigos literários levantados.

Os grupos 2 e 3 apresentaram resultados idênticos entre si, mostrando que a associação da HA ao PLLA não alterou de forma significativa a biocompatibilidade do implante segundo os quesitos pesquisados.

Assim como no grupo 1, não houve deiscências de suturas e presença de sinais flogísticos. A não extrusão e a adesão do implante, caracterizada pela fixação do mesmo à palpação e pela sua cobertura por tecido conjuntivo fibroso também foram semelhantes à literatura^{1,7,8}.

A investigação com auxílio de microscopia, estereoscópica e óptica, apresentou resultados semelhantes entre os grupos 2 e 3. Por meio da microscopia estereoscópica observou-se que ambos os grupos apresentaram rica rede de capilares neoformados cobrindo e circundando os *scaffolds*, o que corrobora a ideia de integração dos implantes ao hospedeiro, não havendo sinais de rejeição.

A microscopia óptica demonstrou a reação do tipo corpo estranho em todas as lâminas examinadas, com presença de osso reativo ao redor dos implantes.

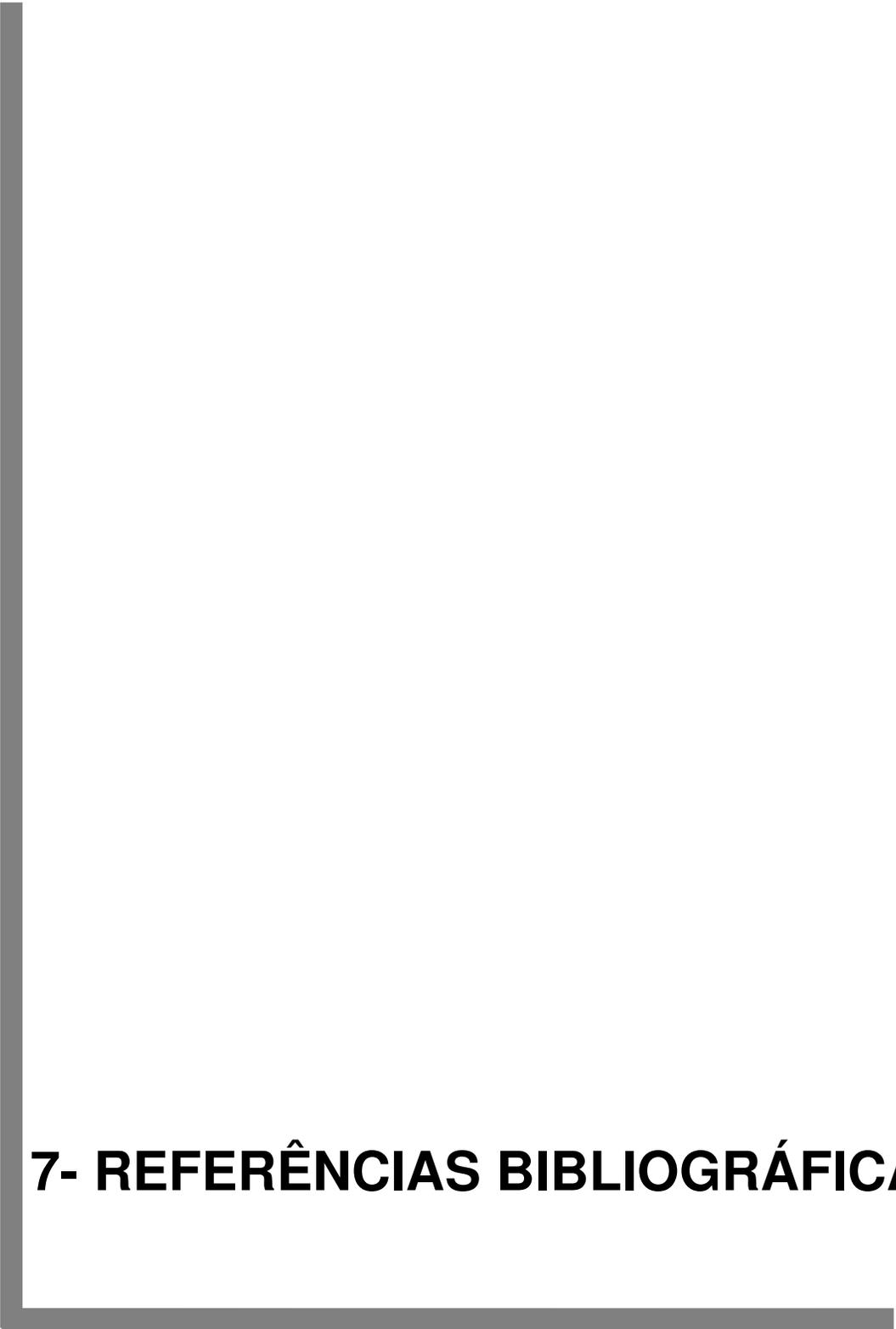
Em nenhum caso notou-se a presença de células ósseas dentro dos *scaffolds*, mas apenas nas bordas dos implantes. Assim como no grupo 1, os ratos dos grupos 2 e 3 não apresentaram fechamento ósseo dos defeitos.

Esse resultado assemelha-se ao observado em estudos semelhantes para animais eutanasiados com tempo próximo a 6 semanas e sem o uso de indutores de crescimento ósseo^{5,8}.



6- CONCLUSÃO

A avaliação do uso de *scaffolds* de Poli L Lactide e Poli L Lactide associado à Hidroxiapatita em defeitos críticos de calotas cranianas de ratos, segundo os critérios pesquisados, foi favorável, demonstrando-nos que tais implantes são materiais adequados e seguros a serem usados como substitutos de tecido ósseo na calvária desses animais.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, et al. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects; *Ann Plast Surg*; 56(5):543-8, 2006 May.
2. Orsi VV, Colares MVM, Nardi NB, Pinto RA, Meirelles LS, Meurer L, et al. Bovine non-demineralized lyophilized bone with mesenchymal stem cells for tissue engineering: experimental study in heterotopic site; *Brazilian Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 10(4): 133-9, 2007; Oct/Dec.
3. Delacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27(5):859-74.
4. Kline RM, Wolfe SA. Complications associated with harvesting of cranial bone grafts; *Plast Reconstr Surg.* 1995;95(1):5-20.
5. Peres JA, Lamano T. Strategies for Stimulation of New Bone Formation A Critical Review; *Braz Dent J* (2011);22(6):443-448.
6. Habal MB. Bone tissue engineering applications in craniofacial reconstructive surgery; *Clin Plastic Surg* 31(2004):387-392.
7. Yoon E, Dhar S, Chun D, Gharibjanian NA, Evans GRD. *In vivo* osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration, in a rat critical-sized calvarial defect model; *Tissue Engineering*, vol 13, number 3, 2007.
8. Schofer MD, Veltum A, Theisen C, Chen F, Agarwal S, Fuchs-Winkelmann S, et al. Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on colonization and bone formation in vivo; *J Mater Sci: Mater Med* (2012)23:2227-2233.
9. Lihong LL, Wang Y, Zhu Y, Zhang Y, Gao C. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering; *J Mater Sci: Mater Med* (2011) 22:1873-1884.

10. Rigon GR. Matrizes de compósitos de PLDLA com hidroxiapatita obtidas por rotofiação para utilização em engenharia tecidual; Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas; Out 2012.
11. Fernandes AY, Laronga PR, Coelho RA, Ducati LG, Silva MV. Prototipagem como forma alternative para realização de cranioplastia com metilmetacrilato; Arq Neuropsiquiatr 2004;62(3-B):865-868.
12. Santoni-Rugiu P. Repair of skull defects by other table osteoperiosteal free grafts; Plastic and Reconstructive Surgery, February, 1969.
13. Carod-Artal FJ, Vázquez-Cabrera CB. Paleopatología neurológica en las culturas precolombinas de la costa y el altiplano andino (II). Historia de las trepanaciones craneales ; Rev Neurol 2004;38(9):886-894.
14. Castro FS, Landeira-Fernandez J. Alma, Mente e Cérebro na Pré-história e nas Primeiras Civilizações Humanas; Psicologia: Reflexão e Crítica, 23(1):37-48.
15. De Boer HH. The history of boné grafts; Clinical Orthopaedics and related Research, n.226, January, 1988.
16. Mayer MH. Clinical perspectives on bone grafting. Avoiding the complications of developmental malformations; Clin Plast Surg_ 1994, Jul;21(3):365-76.
17. Psillakis JM, Nocchi VLB, Zanini AS. Repair of large defect of frontal bone with free graft of outer table of parietal bones; Plastic and Reconstructive Surgery, December, 1979.
18. Kim JJ, Evans GRD. Applications of Biomaterials in Plastic Surgery; Clin Plastic Surg 39(2012):359-376.
19. Chim H, Gosain AK. Biomaterials in craniofacial surgery: experimental studies and clinical application. J Craniofac Surg. 2009;20(1):29-33).

20. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos Polímeros; Ciência e Tecnologia, vol.15, nº1, p.13-21, 2005.
21. Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar; Química Nova, 23(4) (2000).
22. Eriskin C, Kalyon DM, Wang H. Functionally graded electrospun polycaprolactone and b-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications; Biomaterials 29(2008):4065-4073.
23. Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Ramakrishna S. Electrospun poly(3-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering; Biomaterials 29(2008):4532-4539.
24. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function; Acta Biomater. 2009;Jan;5(1):1-13.
25. Jiashen L, Chen Y, Mak AFT, Tuan RS, Li L, Li Y. A one-step method to fabricate PLLA scaffolds with deposition of bioactive hydroxyapatite and collagen using ice-based microporogens; Acta Biomater. 2010 June;6(6):2013-2019.
26. Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition 17(3):247-289(2006).
27. Rupprecht S, Merten HA, Kessler P, Wiltfang J. Hydroxyapatite cement (BoneSource™) for repair of critical sized calvarian defects - an experimental study; Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery (2003)31:149-153.
28. Ono I, Tateshita T, Satou M, Sasaki T, Matsumoto M, Kodama N. Treatment of large complex cranial bone defects by using hydroxyapatite ceramic implants; Plastic and Reconstructive Surgery, August, 1999.
29. Sakata Y, Ueno T, Kagawa T, Kanou M, Fujii T, Yamachica E, et al. Osteogenic potential of cultured human periosteum-derived-cells - A pilot study of human cell transplantation into a rat calvarial defect model; Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery (2006)3:461-465.

30. Shim IK, Jung MR, Kim KH, Seol YJ, Park YJ, Park WH, et al. Novel three-dimensional scaffolds of poly(L-lactic acid) microfibers using electrospinning and mechanical expansion: fabrication and bone regeneration; *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*; Oct 2010, Vol 95B, Issue 1.
31. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering; *Journal of Cellular Physiology* 199:174-180(2004); Review Article.
32. Kim BS, Park IK, Hoshiba T, Jiang HL, Choi YJ, Akaike T, et al. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering; *Progress in Polymer Science*, Volume 36, Issue 2, Pages 238-268.
33. Xu F, Cui FZ, Jiao YP, Meng QY, Wang XP, Cui XY. Improvement of cytocompatibility of electrospinning PLLA microfibers by blending PVP; *J Mater Sci: Mater Med* (2009)20:1331-1338.
34. Leong MF, Rasheed MZ, Lim TC, Chian KS. *In vitro* cell infiltration and *in vivo* cell infiltration and vascularization in a fibrous, highly porous poly(D,L-lactide) scaffold fabricated by cryogenic electrospinning technique; *Journal of Biomedical Materials Research Part A*; Published online 23 September 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
35. Zavaglia CAC, Rodrigues LR, Dias CGBT, Rodriguez GNP, Lombello CB, D'Ávila MA. Dispositivo de Rotofiação, método de operação e uso, 2012; pedido de patente (BR1020120084040). http://www.inova.unicamp.br/sici/visoes/ajax/ax_pdf_divulgacao.php?token=rBnt37Yt.
36. Zhao X, Li X, Kang Y, Yuan Q. Improved biocompatibility of novel poly(L-lactic acid)/ β -tricalcium phosphate scaffolds prepared by an organic solvent-free method; *International Journal of Nanomedicine*;2011(6):1385-1390.

37. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering; *Biomaterials* 21(2000):2347-2359.
38. Weir NA, Buchanan FJ, Orr JF, Farrar DF, Boyd A. Processing, annealing and sterilisation of poly-L-lactide; *Biomaterials* 25(2004):3939-3949.
39. Franco FF, Tincani AJ, Meirelles LR, Kharmandayan P, Guidi MC. Occurrence of Fat Embolism after Liposuction Surgery with or without Lipografting, an Experimental Study; *Annals of Plastic Surgery* 67, Number 2, August 2011.
40. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect; *J Pharmacol Sci* 104,384-386(2007).
41. Bueno DF, Martins T, Alonso N, Passos-Bueno MR. Reconstruction of Large Cranial Defects in Nonimmunosuppressed Experimental Design With Human Dental Pulp Stem Cells; *The Journal of Craniofacial Surgery*/Volume 19, Number 1 January 2008.
42. Schofer MD, Roessler PP, Schaefer J, Theisen C, Schlimme S, Heverhagen JT, et al. Electrospun PLLA Nanofiber Scaffolds and Their Use in Combination with BMP-2 for Reconstruction of Bone Defects; *PLoS One*. 2011;6(9):e25462. Published online 2011 September 28. doi: 0.1371/journal.pone.0025462.
43. Henkel KO, Gerber T, Dörfling P, Gundlach KKH, Bienengraber V. Repair of bone defects by applying biomatrices with and without autologous osteoblasts; *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* (2005)33:45-49.

8- ANEXO

Certificado de aprovação pelo CEEA



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1873-1**, sobre "Uso de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo no tratamento de defeitos críticos de calvárias de ratos", sob a responsabilidade de Dr. Joaquim Murray Bustorff Silva / Dr. Rafael de Campos Ferreira Basso, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **1º. de junho de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1873-1**, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **June 1, 2009**.

Campinas, 1º. de junho de 2009.

Prof. Dr. Stephen Hyslop
Presidente em exercício

Fátima Alonso
Secretária Executiva