

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR Kátia Fernanda...
Silva..... E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 26.1.02.1.2008
.....
ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

**Cultura de Osteoblastos Sobre Arcabouço da
Blenda de PCL/PLGA. Estudo *in vitro* e *in vivo*.**

Autor: Kátia Fernanda Silva
Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

Cultura de Osteoblastos Sobre Arcabouço da Blenda de PCL/PLGA. Estudo *in vitro* e *in vivo*.

Autor: Kátia Fernanda Silva

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

Curso: Engenharia Mecânica

Área de Concentração: Engenharia de Materiais e Processos de Fabricação

Dissertação de mestrado acadêmico apresentado à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2008
S.P. – Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Si38c Silva, Kátia Fernanda
Cultura de osteoblastos sobre arcabouço da blenda de
PCL/PLGA: estudo in vitro e in vivo. / Kátia Fernanda
Silva. --Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Materiais biomédicos. 2. Polímeros. 3. Polímeros
na medicina. 4. Células. 5. Cultura e meios de cultura.
I. Duek, Eliana Aparecida de Rezende. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Mecânica. III. Título.

Título em Inglês: Osteoblasts culture on PCL/PLGA blend scaffold: in vitro and
in vivo study

Palavras-chave em Inglês: Bioreabsorbable polymers, Blends, Poly (ε-
caprolactona), Poly (D,L-lactic acid-co-glycolic acid),
Cell culture

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Arnaldo Rodrigues
Santos Júnior

Data da defesa: 26/02/2008

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

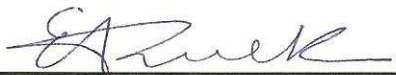
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

**Cultura de Osteoblastos sobre Arcabouço da
Blenda de PCL/PLGA. Estudo *in vitro* e *in vivo*.**

Autor: **Kátia Fernanda Silva**

Orientador: **Eliana Aparecida de Rezende Duek**

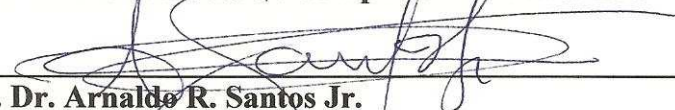
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Prof^a. Dr^a. Eliana Aparecida de Rezende Duek, Presidente
Universidade Estadual de Campinas – DEMA/FEM



Prof^a. Dr^a. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Universidade Estadual de Campinas – DEMA/FEM



Prof. Dr. Arnaldo R. Santos Jr.
Universidade Federal do ABC

Campinas, 26 de Fevereiro de 2008.

Agradecimentos

Em primeiríssimo lugar gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele não nada existiria.

Aos meus pais Fernando e Kátia, pelo amor, carinho e pelo incentivo ao estudo, incondicionalmente, principalmente pelos “mãetrocínios e paitrocínios”.

Gostaria de agradecer a Prof^a. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek minha grande orientadora e amiga, que me ensinou os caminhos da pesquisa, com seu exemplo diário. O meu muito obrigado pela orientação, carinho, atenção, paciência (que foi muita!!!), colaboração, dedicação e oportunidade de realizar este projeto, e outros que ainda virão.

Ao meu namorado e eterno companheiro Ayo, obrigado pelo carinho, incentivo, paciência, força, por você ficar a pé e me dar o seu carro para ir até a Unicamp.

Ao meu querido e mal humorado irmão Allan (só na parte da manhã), pelo incentivo, amor e carinho.

Aos meus avós Lourdes, Jacir e Eulza pelo incentivo e torcida.

Aos meus tios queridos José Carlos e Adriana, e aos meus primos Julia e Murilo por me acolherem sempre muito bem em Campinas.

A minha querida amiga e Co Prof^a Dra. Débora Coraça pela grande ajuda na leitura das lâminas, nas revisões dos textos.

Aos membros da banca: Prof^a Dra. Cecília Zavaglia, e ao Prof.^o Dr. Arnaldo R. Santos Jr, por terem aceito o convite.

A querida amiga Carol pela ajuda no trabalho com as células.

Aos amigos do lab: Marcelo, Grá, Lucas, Márcia, Antô (chefe de scanner), Bru, André, Amém, valeu mesmo pelos momentos de descontração (e olha que não foram poucos), ajuda, leituras, etc,

As minhas eternas amigas barbies (Lili, Lá, Pri, Lé, Rê e Si), pelo incentivo, sempre.

As meninas da CPG o meu muitíssimo obrigado, pela ajuda de sempre.

A Prof^a Dra. Cecília Fraga, do CEL pela disposição, ajuda e dedicação no inglês.

A Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP.

E a todos que de uma forma colaboraram para que este trabalho fosse realizado, o meu muito.....

...Obrigada, Kátia!

*Dedico este trabalho ao meu avô, Jacir da Silva.
“Que sempre diz: o que você dá para o livro, o livro te dará em dobro.”*

“É da natureza do ser humano desejar o saber”

Aristóteles

Resumo

SILVA, Kátia Fernanda, Cultura de Osteoblastos sobre Arcabouço da Blenda PCL/PLGA. Estudo *in vitro* e *in vivo*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2008. 78p. Tese de Mestrado.

A Ciência dos Biomateriais é uma área de conhecimento multidisciplinar e está relacionada a implantes cirúrgicos e dispositivos médicos e odontológicos. Dentre as atuais aplicações dos biomateriais, a utilização de polímeros biorreabsorvíveis como arcabouço (*scaffolds*) para cultura de células tem se destacado como alternativa para tratamento de lesões e perda de tecidos. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar arcabouços da blenda de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) nas diferentes composições (70/30, 50/50 e 30/70), preparados pelo método de fusão com adição e lixiviação de citrato de sódio. Os resultados obtidos através das análises de MEV evidenciaram que as amostras da blenda de PCL/PLGA 30/70 possuem tamanhos e quantidades de poros mais homogêneos quando comparadas às suas análogas de PCL/PLGA nas composições 50/50 e 70/30. Os materiais foram utilizados como arcabouço para cultura de osteoblastos e o estudo *in vivo* foi realizado pelo implante em tíbia de ratos. A cultura de células nas blendas de PCL/PLGA 70/30 e 30/70 mostraram um padrão de adesão e proliferação satisfatório, com intensa atividade celular comparado com a blenda na composição 50/50. No estudo *in vivo* as amostras de PCL/PLGA 30/70 com cultura apresentaram um crescimento celular mais intenso quando comparada com as blendas nas composições 70/30 com cultura, e nas diferentes composições sem cultura de células. Os resultados mostraram que a técnica utilizada no preparo das amostras é útil na confecção de arcabouços altamente porosos. Em função das análises *in vitro* e *in vivo* as blendas de PCL/PLGA 30/70 foram os arcabouços mais indicados para aplicações na engenharia de tecidos ósseos.

Palavras-chave

Polímeros biorreabsorvíveis, blendas, poli(ϵ -caprolactona)/poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico), cultura de células.

Abstract

SILVA, Kátia Fernanda, Osteoblasts culture on PCL/PLGA blend scaffold. *In Vitro and In Vivo study*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2008. 78p. Tese de Mestrado.

The use of bioreabsorbable polymers as scaffolds for the cells culture has received special attention as an alternative for the treatment of lesions and the loss of tissue. The aim of this work was to obtain and to characterize porous scaffolds of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA), blends, in different composition (30/70, 50/50 e 70/30), prepared by melting method with addition and leaching of sodium citrate. The morphology of samples obtained by SEM showed that PCL/PLGA 30/70 blends presented size and size distribution of porous more homogeneous when compared to PCL/PLGA 50/50 and 30/70. The culture of cells in PCL/PLGA 70/30 and 30/70 showed a satisfactory adhesion and proliferation, with intense cellular activity compared to PCL/PLGA 50/50. In the *in vivo* study, the samples of PCL/PLGA 30/70 showed a higher cellular grown compared to the results obtained in *in vivo* study of 70/30 blends with cells, 70/30 and 30/70 without cells. The results showed that the proposed technique allowed the preparation of highly porous scaffolds and the *in vitro* and *in vivo* showed that PCL/PLGA 30/70 blends were the most suitable scaffolds for applications in the bone tissue engineering.

Key-word

Bioreabsorbable polymers, blends, poly(ϵ -caprolactone), poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid), cell culture.

Sumário

Lista de Figuras.....	xii
Nomenclatura.....	xvi
1 Introdução.....	17
2 Revisão Bibliográfica.....	20
2.1 Biomateriais.....	20
2.2 Polímeros Biorreabsorvíveis.....	22
2.3 Polímeros Porosos.....	23
2.4 Blendas de PCL/PLGA.....	25
2.5 Aplicações dos Polímeros biorreabsorvíveis de PCL/PLGA.....	26
2.5.1 Uso ortopédico.....	26
2.5.2 Arcabouço para cultura celular.....	26
2.6 Engenharia de Tecidos aplicada aos polímeros.....	27
2.7 Defeito Ósseo.....	29
2.8 Enxerto Ósseo.....	30
3 Materiais e métodos.....	32
3.1 Preparo dos Arcabouços Porosos.....	32
3.2 Caracterização dos Arcabouços.....	33
3.2.1 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	33
3.3 Cultura de Células.....	33
3.3.1 Obtenção das culturas primárias de osteoblastos de calota craniana de ratos.....	33
3.3.2 Teste de citotoxicidade direta.....	34

3.3.3 Adesão celular nas blendas de PCL/PLGA.....	35
3.4 Estudo <i>in vivo</i> com Cultura Celular.....	35
3.4.1 Animais.....	35
3.4.2 Implante das blendas com cultura de células.....	36
3.4.3 Implante das blendas sem cultura de células.....	39
3.4.4 Estudo macroscópico.....	39
3.4.5 Processamento do material.....	40
3.4.6 Microscopia de Luz, inclusão em parafina e historesina.....	40
4 Resultados e Discussão.....	41
4.1 Caracterização das Blendas através de MEV.....	41
4.2 Estudo <i>in vivo</i> das blendas de PCL/PLGA.....	45
4.3 Cultura de Células.....	52
4.3.1 Citotoxicidade.....	53
4.3.2 Adesão de osteoblastos.....	54
4.4 Implante de Osteoblastos cultivados sobre arcabouços das blendas de PCL/PLGA....	55
4.4.1 Análise Macroscópica.....	56
4.4.2 Análise Histológica.....	56
5 Conclusões.....	65
5.2 Sugestões para próximos trabalhos.....	66
Referências bibliográficas.....	67

Lista de Figuras

Figura 1 – Técnica da engenharia de tecido (adaptado de Freed *et al.*, 1993).

Figura 2 - Esquema de funcionamento do Mini Max Molder.

Figura 3 - Drogas utilizadas para a realização da anestesia.

Figura 4 – (a) Tricotomia da tíbia do rato; (b) assepsia da tíbia do rato; (c) incisão muscular e exposição do periósteo.

Figura 5 – (a) Realização do defeito ósseo; (b) visualização do defeito crítico.

Figura 6 – Reposicionamento da musculatura e sutura.

Figura 7 – (a) Dessecação da tíbia; (b) segmento da tíbia dessecado.

Figura 8 – Lixiviação do sal nos pinos de polímeros biorreabsorvíveis (Barbanti, et al, 05).

Figura 9 – Micrografias eletrônicas de varredura da fratura das Blendas de PCL/PLGA preparadas pelo processo de fusão. (a) blenda de PCL/PLGA 70/30. (b) blenda de PCL/PLGA 50/50. (c) blenda de PCL/PLGA 30/70.

Figura 10 – Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 2 dias pós-cirúrgicos. (a) na composição 70/30, observar malha de fibrina (**mf**) com hemorragia(H), 200x.; (b) na composição 50/50, observar malha de fibrina (**mf**) e hemorragia, e a presença de fragmentos de osso (**fo**) proveniente da fratura, 200x.; (c) na composição 30/70, observar malha de fibrina e hemorragia, e a presença de fragmentos de osso proveniente da fratura, 400x. Azul de toluidina e pararosanilina.

Figura 11 – Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 15 dias pós-cirúrgicos. (a) na composição 70/30, notar a reação endosteal com formação de osso primário (**op**), 200x.; (b) na composição 50/50, notar a reação endosteal com formação de osso primário (**op**) em volta do polímero (**P**) no interior da cavidade medular, e a cartilagem hialina (**ch**), 200x.; (c) na composição 30/70, observar uma intensa reação periosteal com ossificação endocondral, a presença de áreas com cartilagem hialina (**ch**) e osso primário, 200x. Azul de toluidina e pararosanilina.

Figura 12 – Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 30 dias pós-cirúrgicos. (a) na composição 70/30, notar uma reação periosteal com ossificação endocondral (**oe**), 200x.; (b) na composição 50/50, notar a presença de osteoblastos (**seta**) ocupando as lacunas, assim como capilares sanguíneos (**ca**) neoformados, 200x.; (c) na composição 30/70, observar reação periosteal com ossificação endocondral (**oe**), e a cartilagem hialina (**ch**), 200x. Azul de toluidina e pararosanilina.

Figura 13 – Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 60 dias pós-cirúrgicos. (a) na composição 70/30, presença do implante (**P**) em contato com medula óssea (**seta**) e osso jovem neoformado (**oj**). Notar a esquerda, presença de osso maduro (**om**) na região da cortical, 200x.; (b) na composição 50/50, presença de osso jovem invadindo o implante (**seta**), 200x.; (c) na composição 30/70, contato do

osso maduro (**om**) da cortical com osso jovem neoformado (**oj**) junto ao implante. Presença da linha cimentante separando os dois tecidos ósseos (**seta**), 200x Azul de toluidina e pararosanilina.

Figura 14 – Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 90 dias pós-cirúrgicos. (a) na composição 70/30, implante sofrendo invasão por tecido ósseo (**to**) e tecido conjuntivo (**tc**). Notar formação de capilares sanguíneos (**seta**) junto ao tecido ósseo, 200x.; (b) na composição 50/50, formação camada fibrosa na interface osso (**to**) e implante (**P**), 200x.; (c) na composição 30/70, formação de osso jovem (**seta**) entre a cortical e o implante (**P**) 200x. Azul de toluidina e pararosanilina.

Figura 15 – Teste de adesão celular das amostras de PCL/PLGA preparadas pelo método de fusão. Membranas de Teflon® (controle negativo), placa de poliestireno (controle positivo).

Figura16 – Teste de citotoxicidade das amostras de PCL/PLGA preparadas pelo método de fusão. Membranas de Teflon® (controle negativo), placa de poliestireno (controle positivo).

Figura 17 – Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 2 dias pós-cirúrgicos. (a) na composição 70/30 nota-se a presença de uma malha de fibrina (**mf**) junto às células sangüíneas na cavidade do implante (*), reação natural ao estímulo do defeito ósseo, 400x.; (b) na composição 30/70 observa-se tecido de malha de fibrina (**mf**) e áreas hemorrágicas junto ao polímero (**P**) implantado, e a presença de osso preexistente (**op**), 400x; (c) No detalhe, sob luz polarizada observar a área de fibrina próximo ao polímero (**P**), 200x, HE.

Figura 18 – Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 7 dias pós-cirúrgicos. (a) na concentração 70/30 observa-se entre o polímero (**P**) e o osso pré-existente (**op**) a malha de fibrina (**mf**) 200x. Nota-se regiões com osteoblastos rodeada por matriz óssea neoformada (**seta**), 100x.; (b) na concentração 30/70 mostrando malha de fibrina (**seta**) entre o polímero (**P**) e o osso preexistente (**op**), 100x. HE.

Figura 19 – Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 15 dias pós-cirúrgicos. (a) 70/30 formação de malha de fibrina (**mf**) junto ao polímero (**P**). Fragmentos ósseos (**fo**) provenientes do processo cirúrgico, 100x.; (b) observar a malha de fibrina (**mf**) entre o polímero (**P**) e o osso preexistente (**op**). Presença de formação de osso jovem (**oj**), 200x. HE.

Figura 20 – Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 30 dias pós-cirúrgicos. (a) 70/30 nota-se a presença de osso maduro (**om**) supostamente formado por reação endosteal (**seta**) em volta do polímero (**P**). Observa-se a formação de osteóides (**ot**), 100x; (b) 30/70 mostrando osso neoformado (*) junto ao polímero. Observar a camada óssea fina (**seta**), e a medula óssea (**mo**) em contato com o polímero (**P**), 100x. HE.

Figura 21 – Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 60 dias pós-cirúrgicos. (a) em 70/30 observa-se a linha cimentante (**seta**) que está localizada junto ao osso preexistente (*) e próximo ao polímero (**P**), com vários osteoblastos aprisionados possivelmente secretando matriz óssea. Nota-se a formação de trabéculas ósseas (**to**) dentro do polímero, e a neoformação óssea (**no**) sob o polímero, 200x; (b) observa-se os osteoblastos (**ob**) e os osteóides (área de osso neoformado) (**seta**). E medula óssea (**mo**) junto ao polímero (**P**), 100x, HE.

Figura 22 – Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 90 dias pós-cirúrgicos. (a) 70/30 apontando a linha cimentante (**seta**) que está próxima ao polímero (**P**) e junto ao osso preexistente (*). Junto ao polímero nota-se áreas de osteóides (**ot**), 100x; (b) 30/70 nota-se que envolta do polímero (**P**) há a presença de osso misto (osso maduro (**om**) e osso jovem (**oj**)). Observa-se a presença de osteoblastos (**ob**) aprisionado por matriz óssea. 100x, HE.

Nomenclatura

Letras Latinas

E – Módulo de Young	[MPa]
T _c – Temperatura de cristalização	[°C]
T _g – Temperatura de transição vítrea	[°C]
T _m – Temperatura de fusão	[°C]
t – Tempo de degradação	[h] ou [semanas]
m/v – Relação massa/volume	[g/mL]

Siglas

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

DEMA – Departamento de Engenharia de Materiais

FDA – *Food and Drug Administration*

FEM – Faculdade de Engenharia Mecânica

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia Ótica

M_w – Massa molecular ponderal média

PBS – Phosphate Buffer Solution

PCL – Poli(ε-caprolactona)

PDLLA – Poli(D,L-ácido láctico)

PGA – Poli(ácido glicólico)

PLA – Poli(ácido láctico)

PLGA – Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLLA – Poli(L-ácido láctico)

SFB – Soro Fetal Bovino

TEPs – Tissue-Engineered Products

TGA – Análise Termogravimétrica

HE – Hematoxilina de Harris e Eosina

Capítulo 1

Introdução

A Ciência dos Biomateriais está relacionada com implantes cirúrgicos e dispositivos médicos. A busca de novos materiais para serem utilizados como substitutos de tecidos tem unido profissionais das áreas biológicas e de engenharia para alcançar um objetivo comum: desenvolver dispositivos médicos que sejam biocompatíveis, funcionais, duráveis, de forma a melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Uma vez que o objetivo de um biomaterial é restaurar a função de tecidos naturais e órgãos do corpo humano, é importante entender as relações entre propriedades, funções e estrutura dos materiais biológicos, materiais de implante e a interação entre eles no corpo (Hench, 1998).

Os biomateriais foram definidos segundo estabelecimento do “*Consensus of European Society for Biomaterials*” dado por Willians, 1987, como todo material não vivo usado em dispositivo médico (ou biomédico), que interage com um sistema biológico (Oréfice *et al.*, 2006).

Segundo Vert e colaboradores *biodegradável* é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo. Bioabsorvível são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular, como no caso da dissolução lenta de implantes solúveis em fluidos orgânicos. Biorreabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*; i.e. materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo. Biorreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. A palavra "biorreabsorção" é aplicada quando a eliminação é total. Um polímero bioabsorvível pode ser biorreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas (Vert *et al*, 1992; Barbanti *et al*, 2005). Os materiais poliméricos biorreabsorvíveis são os compostos utilizados preferencialmente em dispositivos temporários (Törmälä *et al*, 1998).

A aplicação de polímeros biorreabsorvíveis como biomateriais é de grande interesse devido às suas características de biodegradação e biorreabsorção, eliminando um segundo procedimento cirúrgico no paciente, pois esses materiais se degradam por hidrólise e os produtos da degradação (CO₂ e H₂O) são reabsorvidos pelo organismo.

A indicação do polímero adequado para uma determinada aplicação depende de suas propriedades físico-químicas, mecânicas, morfológicas e da resposta tecidual. Essas propriedades interferem diretamente no tempo de degradação do dispositivo.

A engenharia de tecidos tem sido apontada na literatura como sendo uma das áreas mais importantes, utilizando-se das técnicas de cultura de células sobre arcabouços de biomateriais, sendo vista como uma alternativa para o tratamento de lesões e perda de tecidos ou órgãos.

Duas estratégias são estudadas quando se pretende analisar a formação de um novo tecido a partir de células pré-cultivadas. Na primeira, o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, desde a inoculação até o ponto de formação do tecido prematuro e implantação no organismo hospedeiro. Neste caso, o implante ocorre antes da

formação *in vitro* de tecido maduro. Na segunda, o implante após a formação de um tecido ósseo. O dispositivo polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequado para a inoculação das células até a sua inserção num biorreator, onde ocorre a formação completa do tecido maduro. Há controvérsias sobre qual a melhor estratégia, mas discute-se que a escolha de uma delas depende do tecido que se pretende obter e da extensão da lesão.

Vários trabalhos tem sido realizados com implantes pelo grupo de biomateriais – LABIOMAT/PUC-SP (Luciano *et al*, 2003; Rezende *et al*, 2005; Barbanti, 2005;) – entre eles o estudo de dispositivos médico-hospitalares diretamente no tecido. Com o avanço das pesquisas optou-se por estudar a resposta das células pré-cultivadas após o implante no local do defeito.

O poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) na proporção 50:50 é um copolímero amorfo, rígido, com boas propriedades mecânicas, entretanto degrada completamente num intervalo de 30-40 dias, o que não seria viável para implantes para recuperação de fraturas. Em contraposição, a poli(ε-caprolactona) é um polímero semicristalino, flexível, e com longo tempo de degradação. Assim, visando obter um material com propriedades adequadas para a regeneração óssea, a formação de uma blenda seria útil para obter um novo material com propriedades intermediárias, dependentes da composição, entre os dois materiais avaliados de maneira isolada.

Os resultados obtidos através do estudo *in vitro* nos permitiram indicar a melhor composição da blenda para serem utilizadas como arcabouços no crescimento e na diferenciação celular, maior invasão celular na blenda e um menor período de reação inflamatória, com contribuições no que diz respeito ao implante do material já inoculado com a cultura de células.

O estudo dessa nova blenda teve o intuito de avaliar a reação do material *in vitro* e *in vivo*, verificando sua interação e reação tecidual, com o tecido hospedeiro.

Objetivos

Neste trabalho, enfocamos o estudo das técnicas de preparado de arcabouços densos e porosos da blenda biorreabsorvível de poli(ε-caprolactona) (PCL) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) nas diferentes composições (70/30, 50/50 e 30/70), caracterizando-os quanto as suas propriedades morfológicas e mecânicas. A interação biológica das amostras foi avaliada pela cultura de osteoblastos em relação a sua adesão e morfologia celular e o estudo *in vivo* foi realizado pelo implante em tíbias de ratos Wistar.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Biomateriais

De um modo geral, os dispositivos utilizados como implantes são classificados como temporários ou permanentes. Como permanentes podem ser citadas as próteses articulares de joelho, quadril, ombro, etc, são compostos utilizados com o objetivo de substituir um tecido lesado por tempo indeterminado. Dessa forma, são produzidos de modo a reter as suas características mecânicas e físico-químicas por longos períodos. Ao contrário destes, o objetivo dos dispositivos temporários é reparar o defeito até que o processo natural de recuperação do tecido tenha se completado (Törmälä *et al.*, 1998). Hoje, aliado aos avanços tecnológicos, tem se destacado o desenvolvimento de biomateriais com superfícies modificadas, como é o caso das superfícies produzidas farmacologicamente, biomimeticamente ou por engenharia de tecido ou mesmo por meios físico-químicos (Langer *et al.*, 2004).

O uso de polímeros no corpo humano é acompanhado por algum tipo de interação polímero-célula. Os primeiros usos de polímeros *in vivo* foram basicamente em aplicações onde o polímero

deveria permanecer inerte, e os estudos voltavam-se então para o entendimento de como prevenir ou minimizar as interações indesejáveis. Embora tais questões continuem sendo importantes para uma variedade de aplicações, hoje, o “*design*” de novos polímeros que interajam com células provocando resposta fisiológica como crescimento, ou diferenciação, é um outro aspecto em destaque. Na última década, avanços significativos foram conseguidos quanto ao entendimento dos mecanismos de interação das células com seu meio natural, a matriz extracelular, servindo assim como base para o desenvolvimento de materiais que possam exercer um papel ativo na regeneração de tecidos (Ambrose *et al.*, 2004).

Nesse sentido, o estudo de implantes sintéticos de polímeros tem direcionado suas pesquisas para materiais biocompatíveis, biofuncionais e, principalmente, para aqueles que são degradáveis e biorreabsorvíveis pelo corpo humano. Dentre eles encontram-se os poli(α -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, da qual fazem parte os poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e seus copolímeros. Outros materiais, como a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) também são materiais biodegradáveis e biorreabsorvíveis. Esses materiais têm sido investigados para uso em uma variedade de importantes aplicações em tecidos moles e para reparo de ossos nas áreas médica e odontológica devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade *in vivo*, pois elimina-se a necessidade de remover o implante após a cura do tecido (Sung *et al.*, 2004).

A literatura mostra que o processo pela qual os poli(α -hidróxi ácidos) degradam é a cisão por hidrólise das ligações ésteres, originando produtos e subprodutos atóxicos, biocompatíveis, e que são reabsorvidos pelo organismo fazendo parte do metabolismo dos carboidratos. Neste processo de biodegradação e biorreabsorção metabólica, os produtos CO₂ e H₂O são substâncias eliminadas através da urina e da respiração. (Böstman *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004).

Dispositivos para pele, ossos, vasos sanguíneos, fígado, cartilagens, intestino e nervos podem ser obtidos a partir destes materiais absorvíveis e estão em vários estágios de investigação e desenvolvimento como produtos clínicos (Park & Cima, 1996). Dispositivos de poli(ácido láctico) apresentam potenciais aplicações de acordo com a forma dos implantes, como esponjas (DrylacTM) (Barrows, 1991), pinos (Van der Elst *et al.*, 1995), matrizes de dupla camada (Coelho *et al.*, 2000), monocamada (Luciano *et al.*, 2003) ou ainda materiais mistos (Von Recum *et al.*, 1995).

Dentre muitos outros campos de pesquisa explorados, não se pode esquecer a importância de diversos fatores que influenciam a reação do organismo à presença de um implante biorreabsorvível. Essa resposta pode ser relacionada ao tamanho e composição do implante bem como o sítio de implantação. A taxa de degradação do polímero e a capacidade do tecido de eliminar os produtos desta degradação são características-chave na reação tecidual ao implante. Se o tecido adjacente não pode eliminar os subprodutos ácidos de um implante que se degrada rapidamente, possivelmente resultará em uma resposta inflamatória ou tóxica (Suganuma & Alexandar, 1993).

2.2 Polímeros Biorreabsorvíveis

Kim e colaboradores (2004) estudaram polímeros biorreabsorvíveis na forma de compósitos com hidroxiapatita, e observaram a boa biocompatibilidade do material, bem como a resistência mecânica com o tempo de implantação, no qual concluíram que o compósito induz o crescimento primário de culturas de osteoblastos, porém sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados.

Middleton & Tipton (2000) relatam uma lista de polímeros biorreabsorvíveis comerciais, sua utilização (suturas, parafusos e fixadores de fraturas) e fabricantes para uso em dispositivos ortopédicos, mas todos para fraturas em ossos curtos.

Ambrosio *et al.* (2003) realizaram um levantamento dos estudos de polímeros biorreabsorvíveis *in vivo* realizados por vários autores e concluíram que esses materiais estão sendo muito estudados para usos clínicos (recuperação de fraturas, liberação controlada de medicamentos, reparos de ligamentos, etc.) e sugerem o contínuo estudo dos mesmos com o intuito de melhorar cada vez mais suas propriedades para o uso em humanos.

As avaliações dos dispositivos de osteosíntese e osteointegração também são realizadas através da cultura de células. A cultura de osteoblastos fornece dados de adesão, crescimento, diferenciação celular e produção de matriz óssea mineralizada, além de representar a formação do novo tecido (Anselme, 2000).

Osteoblastos cultivados sobre filmes de PGA e PLGA mostraram um padrão de adesão satisfatório quando comparados ao controle positivo, além de apresentarem a capacidade de crescer e proliferar sobre o substrato. As células demonstraram um aumento na atividade da

enzima fosfatase alcalina na síntese de colágeno (Ishaug-Riley *et al.*, 1997b). Resultados similares foram obtidos pela cultura de osteoblastos em dispositivos tridimensionais de PLGA com a mineralização da matriz óssea produzida (Ishaug-Riley *et al.*, 1997a, Ishaug-Riley *et al.*, 1998 e Kim *et al.*, 2004).

Uma vez que o objetivo de um biomaterial é restaurar a função de tecidos naturais e órgãos do corpo humano, é importante entender as relações entre propriedades, funções e estrutura dos materiais biológicos, materiais de implante e a interação entre eles no corpo. A cultura de osteoblastos representa o enfoque das pesquisas em implantes temporários com menor custo e menor tempo de reabilitação, além de viabilizar um único procedimento invasivo para colocação do implante.

2.3 Polímeros Porosos

A porosidade nos substratos poliméricos é considerada como morfologia preferencial em aplicações na Engenharia de Tecidos. Segundo Mikos *et al.* (2000) a taxa de penetração e crescimento celular em arcabouços porosos de polímeros biorreabsorvíveis está diretamente relacionada com o tamanho dos poros no material. Os poros aumentam a área superficial das amostras, promovendo espaço adequado para a invasão celular e facilitando a difusão dos fluidos orgânicos durante a cultura de célula e quando implantado no organismo hospedeiro. A distribuição da uniformidade e interconexão da estrutura porosa é importante, facilitando a formação dos tecidos na forma de uma rede organizada, tendo grande aplicação na reconstrução de tecidos como cartilagem e osso.

Como morfologia preferencial para uso na engenharia de tecidos, arcabouços porosos têm sido preparados por diversas técnicas. As técnicas de preparo de arcabouços porosos foram descritas em culturas de células específicas, podendo-se destacar: *fiber bonding*, evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal (*solvent casting, particulate leaching*), inversão de fases, injeção de gás, deposição por fusão (*fused deposition modeling, FDM*), *freeze-dried* e sinterização por laser (Williams *et al.*, 2005).

A técnica de fusão aliada à extrusão/injeção tem tido destaque nos últimos anos. A técnica permite o prepara de arcabouços com regularidade e estabilidade dimensional. Através de moldes apropriados pode-se construir arcabouços com complexas geometrias. (Jeong *et al.*, 2004; Barbanti *et al.*, 2004a e Boccaccini *et al.*, 2005).

Uma das características desses arcabouços para crescimento celular é a porosidade. Estudos anteriores realizados por Rezende *et al.*, (2005), com membranas e tubos de poli(ácido lático) com adição de um plastificante biocompatível, mostraram que a degradação é influenciada pela concentração desse aditivo e que em polímeros semicristalinos, além da flexibilidade, obtinha-se um dispositivo poroso. Ao contrário dos polímeros semicristalinos, quando amorfos, o plastificante não provocava esse efeito (Luciano *et al.*, 2001; Luciano *et al.*, 2003). Em relação à obtenção de um arcabouço poroso, outros estudos com membranas de poli(L-ácido lático) e poli(D,L-ácido lático-co-ácido glicólico) com a adição de citrato trissódico 2-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), mostraram a possibilidade de se controlar o tamanho dos poros adicionando-se partículas do sal com granulometria controlada. O crescimento de células osteoblásticas sobre esses arcabouços poliméricos mostrou que a adesão celular é melhor em arcabouços de poli(D,L-ácido lático-co-ácido glicólico) comparado ao poli(ácido lático), embora a proliferação ocorra satisfatoriamente nos dois casos (Barbanti, 2001; Barbanti *et al.*, 2002).

Entretanto, o interesse nos arcabouços para cultura de células e regeneração de tecidos é centrado em arcabouços tridimensionais, de forma a obter o tecido formado no formato desejado. Assim, dispositivos na forma de membranas não atendem a essa exigência, sendo necessário à injeção desses polímeros em um molde desejado, o que impossibilita o uso do plastificante. Nesse caso o sal é mais indicado para a obtenção de poros, pois o mesmo se mantém inalterado nas temperaturas de processo.

Tendo em vista a preocupação quanto à avaliação desses polímeros e suas interações celulares, muitos testes tem sido propostos para anteceder a avaliação em pacientes. Tais testes envolvem desde simulações biomecânicas, testes *in vitro* para avaliar toxicidade e testes em animais para avaliar a biocompatibilidade e a biofuncionalidade. O estudo da adesão, crescimento e diferenciação celular são, atualmente, essenciais no desenvolvimento e na avaliação desses materiais (Hou *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006).

Hoje, várias áreas envolvidas com pesquisas biomédicas empregam técnicas de cultura de células para estudar aspectos da biologia celular, diagnosticar doenças e avaliar a toxicidade, mutagenicidade e transformabilidade de vários meios, materiais e dispositivos sintéticos, propagar vírus para uso na confecção de vacinas, sintetizar produtos específicos como hormônios e anticorpos, etc (Auger *et al.*, 2004).

Tendo em vista que testes *in vivo* são normalmente de elevado custo, os testes *in vitro* são bastante úteis, principalmente quando se tem um número elevado de amostras, permitindo que se faça uma pré-seleção que serão posteriormente submetidas ao teste *in vivo*. Cultura de células dependentes de ancoragem constitui-se uma ferramenta útil para avaliação de biomateriais (El-Amin *et al.*, 2006).

Além dos testes *in vitro*, a cultura de células representa a formação do novo tecido. Em tecidos ósseos as aplicações terapêuticas envolvem principalmente os dispositivos ortopédicos (como os pinos, parafusos e placas de fixação), e os que promovem a regeneração do osso guiado (Liu *et al.*, 2004).

2.4 Blendas de PCL/PLGA

O poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) é um polímero amorfo, com temperatura de transição vítrea (T_g) por volta de 50°C, e por isso é rígido à temperatura ambiente. A poli(ϵ -caprolactona) (PCL), por outro lado, é semicristalina e flexível à temperatura ambiente, com T_g à -60°C (Williamson *et al.*, 2004). Isoladamente os materiais possuem, também, diferentes propriedades mecânicas. O módulo de flexão nas amostras de poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) é aproximadamente 5 GPa, enquanto nas amostras de poli(ϵ -caprolactona) 350-500 MPa. Os estudos de degradação dos homopolímeros desses materiais mostraram que a taxa de biorreabsorção do poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) é significativamente menor que a da poli(ϵ -caprolactona) (Barbanti, 2005).

Muitos fatores determinam a taxa de degradação dos polímeros biorreabsorvíveis, entre eles: local de implante, solicitação mecânica, massa molar, distribuição da massa molar, composição química/esterioisométrica, cristalinidade, sua morfologia (Middleton & Tipton, 2000). Por isso, nem sempre um homopolímero atende todas as necessidades para serem utilizados como arcabouços. Blendas poliméricas contendo componentes biorreabsorvíveis, ou hidroliticamente instáveis, tem recebido muito interesse devido à facilidade com que suas propriedades físicas e características de degradação podem ser alteradas. As propriedades das blendas dependem principalmente da miscibilidade termodinâmica. Se os polímeros são imiscíveis, as propriedades dependerão não somente das propriedades de cada componente, mas

também da morfologia e da adesão entre as fases. Para blendas miscíveis, busca-se um sinergismo entre as propriedades de cada polímero.

O estudo de blendas de poli(ϵ -caprolactona) tem sido descrito na literatura como uma forma de melhorar as propriedades mecânicas e ter um controle das características de degradação desses materiais (Coelho *et al.*, 2000). Avaliar as blendas poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) e poli(ϵ -caprolactona) como arcabouço para cultura de células na engenharia de tecidos representa um avanço no desenvolvimento de materiais biorreabsorvíveis.

2.5 Aplicações dos Polímeros Biorreabsorvíveis de PCL/PLGA.

2.5.1 Uso ortopédico.

Na ortopedia é comum o uso de implantes temporários de metais, que não correspondem aos biomateriais ideais para esse tipo de aplicação. O tempo no qual a prótese metálica funciona como um desvio à tensão aplicada ao osso tem como consequência o desenvolvimento de uma estrutura óssea mecanicamente inferior devido à atrofia, pois o osso para de ser submetido aos esforços. Acima de tudo, a necessidade de remoção das próteses metálicas representa uma grande desvantagem, pois demanda uma segunda cirurgia, acarretando em um maior tempo de recuperação para o paciente, com consequente aumento dos custos e dos riscos de complicações cirúrgicas (Beumer *et al.*, 1994; Middleton & Tipton, 2000).

A geração de tecido ósseo e cartilaginoso através do transplante autólogo de células/tecido corresponde a uma das mais promissoras técnicas da cirurgia ortopédica e engenharia biomédica, resultando na eliminação de problemas como lesão do tecido doador, rejeição imunológica e contaminação (Naughton, 1995; Patrick Jr. & Mikos, 1998).

2.5.2 Arcabouço para cultura celular.

Com o advento e pesquisas de implantes temporários aliados aos avanços em cultura de células *in vitro*, surgiu uma nova linha de pesquisa dentro da área de Biomateriais, a Engenharia de Tecidos, uma alternativa para o tratamento de lesões e perda de tecidos ou órgãos. Baseada na regeneração de tecidos do próprio paciente, estes são produzidos fora do organismo através do

recrutamento de células sadias e cultivadas sobre arcabouços¹ de polímeros biorreabsorvíveis (Langer 2004).

Células isoladas não podem formar tecidos, pois requerem um ambiente específico, o qual normalmente inclui a presença de um material arcabouço agindo como uma matriz para o crescimento, servindo como arcabouço físico e substrato adesivo para o crescimento de células isoladas durante a cultura *in vitro* e subsequente implantação (Atala, 2004).

As vantagens do transplantes de células sobre o transplante de órgãos estão no fato de populações de células isoladas expandirem *in vitro* com a utilização de técnicas de cultura celular, necessitando somente um pequeno número de células doadoras para preparar o subsequente implante. O tecido é removido de um doador, dissociado em células, ou grupo delas, fixadas ou encapsuladas em um arcabouço polimérico e transplantadas ao paciente, sendo desnecessário a parte doadora sacrificar um órgão todo. O uso de células isoladas também permite a remoção daquelas indesejáveis, as quais podem ser alvo de resposta imune, influenciando no processo de rejeição. Em adição, cirurgias entre doadores e receptores, e seus riscos inerentes, podem ser evitados e os custos dos procedimentos significativamente reduzidos (Cancedda *et al.*, 2003).

A utilização de polímeros biorreabsorvíveis é bastante promissora, com a desvantagem de ainda se encontrar em estudo, com poucas aplicações práticas. Novos compostos são desenvolvidos e avaliados a cada ano e suas perspectivas de utilização são imensas. A demanda por "materiais ideais" a cada tecido e abordagem clínica ainda é um desafio.

2.6 Engenharia de Tecidos aplicada aos polímeros.

Considerado de forma integrada, sob o aspecto da ciência dos materiais e do tipo de tecido e reparo necessário, a seleção do polímero segue, segundo Hutmacher (2000), basicamente duas estratégias: na primeira, o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, desde a inoculação até o ponto de formação do tecido prematuro e

¹ A palavra *scaffold* é traduzida literalmente como “andaime, palanque, armação, arcabouço”. Na língua portuguesa pode-se atribuir diversos significados, como p. ex.: arcabouços, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc. Neste projeto, o termo adotado como sinônimo de *scaffold* será arcabouço.

implantação no organismo hospedeiro. Neste caso, o implante ocorre antes da formação *in vitro* de tecido maturado. No organismo, o polímero é degradado numa razão proporcional ao crescimento celular e à solicitação mecânica. Sua função é proporcionar arcabouço para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original, até a formação do novo tecido e sua biorreabsorção completa. A **Fig.1** a seguir, adaptada de Freed *et al.* (1993), ilustra a técnica da Engenharia de Tecidos aplicada em estudo *in vivo*.

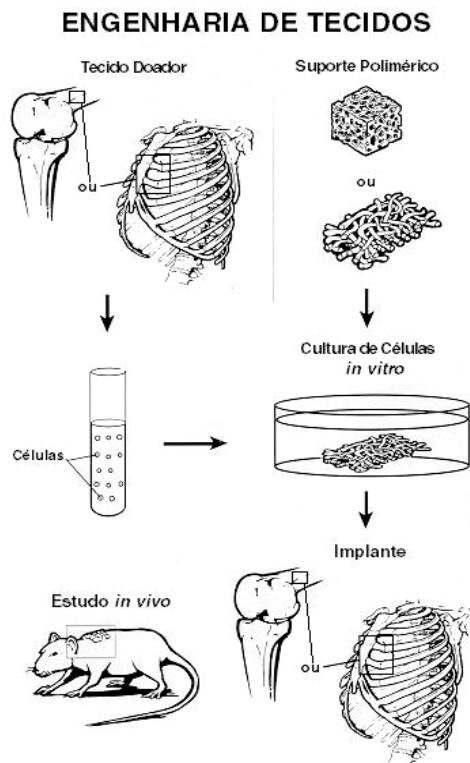


Figura 1 – Técnica da engenharia de tecidos (adaptado de Freed *et al.*, 1993).

Na segunda estratégia, o implante ocorre com tecido maduro formado. O dispositivo polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequado para a inoculação das células até a sua inserção num biorreator, onde ocorre a formação completa do tecido maduro. Nesta etapa, as células semeadas proliferam-se e secretam matriz extracelular durante a cultura estática e/ou dinâmica, enquanto o polímero é degradado e absorvido gradualmente, permitindo espaço para a proliferação celular e formação do tecido no reator biológico. Somente após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo.

Ambas as estratégias podem ser utilizadas para reparos em tecidos ósseos e cartilaginosos. Entretanto, o sucesso da técnica e da estratégia varia em função do tipo, local e extensão do

tecido lesado, aliado ao conhecimento de propriedades específicas de biodegradação e biorreabsorção dos polímeros utilizados (Hutmacher *et al.*, 2000; Kellomäki *et al.*, 2004).

Definido e baseado nas estratégias anteriores, o primeiro estágio na Engenharia de Tecidos inicia-se com o desenvolvimento, seleção e preparação dos arcabouços de polímeros biorreabsorvíveis. Em aplicações na reconstrução de tecidos, o objetivo dos dispositivos temporários como arcabouço para a cultura de células é reparar o defeito até que o processo natural de recuperação tenha se completado. Nesse sentido, o estudo de implantes sintéticos de polímeros tem direcionado suas pesquisas para materiais biocompatíveis, biofuncionais e, principalmente, para aqueles que são degradáveis e biorreabsorvíveis pelo corpo humano (Rai *et al.*, 2005).

As aplicações de polímeros biorreabsorvíveis são diversas e incluem o reparo de nervos, tecido periodontal, cartilagem e osso. Os arcabouços podem ser obtidos a partir de polímeros sintéticos que se assemelhem a matriz extracelular, isto é, que apresentem semelhanças quanto às propriedades mecânicas e químicas para interagir com células de maneira biologicamente adequada (Tsang *et al.*, 2004).

2.7 Defeito Ósseo

Os defeitos ósseos podem ser provenientes do resultado de uma anormalidade congênita, trauma ou doença. O tecido ósseo é continuamente repostado e remodelado de acordo com a tensão aplicada pelos osteoblastos e osteoclastos, sendo capaz de se auto-reparar após ferimentos. Porém, quando esses ferimentos causam grandes defeitos, o osso é incapaz de repará-los, formando um tecido fibroso, perdendo a sua função mecânica (Schenk *et al.*, 1994). Se essas lesões são limitadas na substância do próprio tecido da cartilagem articular (espessura parcial ou defeitos superficiais) elas não cicatrizam espontaneamente. Se, porém, elas penetrarem na camada subjacente do osso subcondral (defeitos em toda a espessura), ocorre então, como resultado, uma reação espontânea de reparo limitada, com células, dessa resposta, originadas da medula óssea e espaços vasculares (Coombes *et al.*, 2004; Coppini *et al.*, 2006).

A regeneração óssea requer quatro componentes: um sinal morfogenético; células hospedeiras que respondem ao sinal; um carreador apropriado deste sinal que o possa entregar

aos locais específicos e sirva assim como um arcabouço para o crescimento das células responsivas do hospedeiro e um leito viável e bem vascularizado (Sakar *et al.*, 2006).

O processo de regeneração óssea envolve o crescimento de células do tipo cartilaginosas (condroblastos), que são formadas na superfície externa do ferimento, geralmente durante os primeiros dias após o ferimento ter ocorrido. Entre a terceira e quarta semana, a lacuna entre os condroblastos do novo osso é invadida por tecido embrionário, o qual forma uma ponte de tecido conjuntivo. Entre a sexta e oitava semana, ocorre a calcificação, onde o sistema vascular penetra na fibrocartilagem, absorvendo-a, enquanto a área é reposta por fibras ósseas. Finalmente, entre dois meses e dois anos, a nova fibra óssea é formada, esse processo evolui de modo a aparecer um calo ósseo, constituído por tecido ósseo imaturo que se forma de modo desordenado, mas que une provisoriamente as extremidades do osso fraturado. Com a volta gradual do osso às suas atividades, as trações normais a que está sujeito vão determinar a remodelação do calo. Pouco a pouco, o tecido ósseo primário do calo vai sendo absorvido e substituído por osso lamelar, até que a estrutura que o osso apresentava antes da fratura seja refeita.

2.8 Enxerto Ósseo

Em casos de fraturas graves ou patologias com perda de massa óssea, os enxertos naturais podem ser utilizados como auxílio para imobilização, fonte de células osteogênicas e/ou moldes que permitirão o reparo. Os enxertos ósseos são classificados de acordo com a sua origem, seu local de doação e sua arquitetura histológica (Brown *et al.*, 2004).

Quanto a sua origem os enxertos podem ser *heterógenos*, quando o organismo doador é de espécie diferente do organismo receptor; enxertos *alógenos*, quando o organismo doador e o receptor são diferentes, porém da mesma espécie; e enxertos *autógenos*, quando o osso provém do mesmo organismo, apenas de local diferente. Os locais para a obtenção dos enxertos ósseos geralmente são o crânio, a crista ilíaca e as costelas. Estruturalmente, os enxertos podem ser compostos de osso compacto, osso esponjoso ou da combinação destes. Os enxertos ósseos podem ser aplicados em reconstituições de defeitos congênitos, ou no reparo de fraturas e falhas criadas após a retirada de tumores (Macedo *et al.*, 2000).

Mesmo sendo um importante recurso para a reconstrução de falhas ósseas, a utilização de enxertos ósseos se tornou restrita devido a complicações relacionadas à rejeição pelo organismo

receptor quando o enxerto não é autógeno, e no caso de uma falha óssea com grandes proporções, há dificuldade para obtenção dos enxertos autógenos com volume suficiente de osso. (Sakar *et al*, 2006).

Com o intuito de reforçar os enxertos naturais ou até mesmo substituí-los, podem ser utilizados materiais sintéticos. A *Food and Drug Administration* (FDA) estima a existência de 2.700 tipos de materiais médicos, a maioria destes contendo biomateriais sintéticos como seu principal componente. Os biomateriais devem estar mecanicamente adaptados para exercerem uma determinada função. Para isso, antes de sua aplicação são submetidos a testes, como por exemplo, os de força de tensão e resistência. Além disso, os biomateriais devem ser compatíveis e inertes aos tecidos e ao organismo como um todo, comportando-se de maneira não tóxica e não destrutiva para com as células e os fluídos corporais. (Hedberg *et al.*, 2005).

Capítulo 3

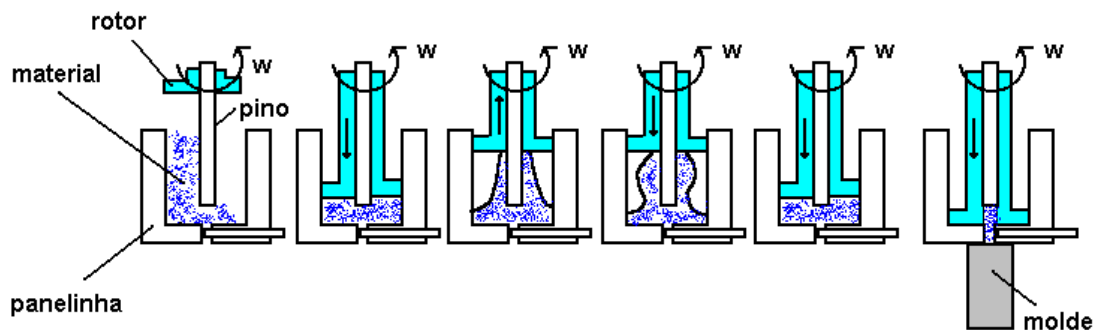
Materiais e Métodos

3.1 Preparo dos Arcabouços Porosos.

Arcabouços porosos de blendas de polímeros biorreabsorvíveis foram preparados utilizando-se poli(D,L-ácido lático-co-ácido glicólico) (50:50) (PLGA), fornecido pela PURAC (Holanda) e poli(ϵ -caprolactona) (Mw 65,000) (PCL), fornecidos pela SIGMA (EUA), na proporção PCL/PLGA: 70/30, 50/50 e 30/70.

As amostras das blendas foram obtidas por fusão e a mistura dos materiais foi feita utilizando-se uma mini injetora (Fig.2) Mini Max Molder (modelo LMM – 2017). A preparação consistiu na fusão do material durante aproximadamente 2 min, com temperatura constante de 140°C, com injeção em molde cilíndrico com dimensões internas de 3,0mm de diâmetro e 7,0cm de comprimento. Durante o aquecimento foram adicionados porções de citrato trissódico ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (MERCK), com uma granulometria do sal previamente estabelecida na faixa de 180 a 250 μm , na concentração (massa/massa) 1 polímero : 2 sal. Após a injeção, o molde foi

resfriado a temperatura ambiente e os pinos formados foram cortados em amostras de dimensões 3mm x 7mm.



3.2 Caracterização dos Arcabouços

As amostras foram fraturadas utilizando-se N₂ líquido para observação da superfície da fratura. As amostras foram coladas em um arca-bouço metálico e recobertas com ouro, utilizando-se um metalizador de amostras Sputer Coater BAL-TEC SCD 050. Em seguida, as membranas foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JXA 840A, utilizando tensão de 10 a 20kV (**Figura 9**).

Para este procedimento, foram utilizados ratos *Wistar* machos com idade aproximada de 20 dias sacrificados por deslocamento cervical seguido de decapitação. As calotas cranianas foram retiradas através de uma abertura na região cranial expondo-se a calota craniana, sendo

estas imediatamente retiradas e mantidas em meio de cultura DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco - Nutricell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell) e 0,2M de L-glutamina (Sigma), adicionado de gentamicina (40mg/ml - Sigma). Em ambiente estéril, os tecidos moles adjacentes às calotas foram cuidadosamente retirados, sendo posteriormente fragmentadas e submetidas à digestão enzimática para extração celular em meio DMEM e 1mg/mL de collagenase tipo IA (Gibco) durante 2 horas a 37°C. Após este procedimento, prosseguiu-se à filtração da suspensão celular de osteoblastos em tela de “nylon”. Em seguida foi realizada a centrifugação em três etapas de 10 minutos a 1200rpm, com subsequente ressuspensão em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e gentamicina. Após a centrifugação, foi realizada a quantificação da viabilidade celular com emprego do corante vital azul de Tripán em câmara hemocitométrica (Neubauer).

Os osteoblastos foram semeados em uma densidade de aproximadamente 10^5 células/mL em frascos de cultura contendo o meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino e gentamicina, sendo utilizada placa de 96 poços para cultivo de osteoblastos nos dispositivos previamente esterilizados durante 30 minutos sob luz ultravioleta. Após as células atingirem a confluência, estas foram desprendidas do frasco através da atividade enzimática da tripsina/EDTA por 5 minutos a 37°C e colocadas em novos frascos de cultura de 75cm², numa densidade aproximada de 10^2 células/cm². Os frascos foram incubados a 37°C em atmosfera saturada de vapor d'água e 5% de CO₂. As trocas de meio de cultura foram realizadas a cada 48 horas com monitoramento diário dos cultivos celulares em microscópio invertido Eclipse TS 100 (Nikon).

3.3.2 Teste de citotoxicidade direta.

Para a análise da citotoxicidade direta, as blendas de PCL/PLGA 70/30, 50/50 e 30/70, foram colocadas no fundo de placas de cultura com 96 poços (Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA), assim como, 10μL de solução de fenol 1%, sendo todos previamente esterilizados em radiação ultravioleta (UV) por 30 min. A própria placa de poliestireno foi utilizada como controle negativo e o fenol como controle positivo para determinar citotoxicidade de arcabouços. Os poços receberam 100μL de meio DMEM sem soro fetal bovino, sendo pré-incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas, conforme as normas da ISO 10993-5. Após a pré-

incubação, o meio foi retirado e os poços receberam 10^5 células/mL em meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas durante 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Após a incubação o meio foi retirado e os poços foram lavados rapidamente com o mesmo meio de incubação. Após a lavagem, adicionou-se a cada poço 100µL de meio fresco sem SFB e 50µL de meio contendo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium (MTT) (5mg/mL), seguindo-se um período de incubação de 4 horas à 37° C no escuro. Após esse tempo, os 150µL contendo MTT foram substituídos por uma solução de 200µL de DMSO e 25µL de tampão Glicina/Sorensen. Em seguida, 180µL das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa, e a absorbância do MTT foi lida em leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA) com emprego de filtro com comprimento de onda de 570nm.

3.3.3 Adesão celular nas blendas de PCL/PLGA.

O teste de adesão celular consistiu no mesmo procedimento da análise de citotoxicidade, onde o substrato de poliestireno é designado agora como controle positivo e os discos de teflon são usados como controle negativo. A mesma concentração celular foi semeada sobre os poços da placa, a qual foi mantida incubada, desta vez, por 2 horas. Após esse cultivo o meio foi retirado e os poços repetidamente lavados, retirando as células que não sofreram adesão. Dessa maneira, assegura-se que o MTT metabolizado é referente somente às células aderidas. Em seguida, adicionou-se 100µL de DMEM e 10µL de MTT (5mg/mL) incubando-se nas mesmas condições de cultivo durante 4 horas. Após este tempo, substituiu-se a solução por 200µL de DMSO e 25µL de tampão Glicina/Sorensen. Em seguida, alíquotas de 100µL das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa. A absorbância das alíquotas foi medida em um leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA), utilizando-se filtro no comprimento de onda de 570nm.

3.4 Estudo *in vivo* com Cultura Celular.

3.4.1 Animais.

Este trabalho foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Neste trabalho foram utilizados ratos *Wistar* de ambos os sexos, com idade aproximadamente de três meses e pesando aproximadamente 300 gramas. Esses animais foram provenientes do Biotério do CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório, da UNICAMP. Eles permaneceram no Biotério da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, no Centro de Ciências Médicas e Biológicas de Sorocaba (CCMB/PUC-SP), alojados em gaiolas com três animais cada, recebendo ração comercial e água “ad libitum”. Os animais foram mantidos em regime de claro-escuro correspondente a 12 horas e temperatura controlada de cerca de 23°+/- 2°C.

3.4.2 Implante das blendas com cultura de células.

Após realizada a cultura de células sobre os arcabouços poliméricos, o conjunto arcabouço/células foi implantado em tíbias de ratos *Wistar*.

Nos implantes com cultura de células foi utilizado um total de 60 animais, divididos em dois grupos: 30 animais implantados com pinos na composição 70/30 de PCL/PLGA e 30 animais implantados com pinos na composição 30/70 de PCL/PLGA.

Depois de pesados, os animais foram submetidos à anestesia geral com uma solução 1:1 de cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) + Ketamina (Francotar), administrada por via intramuscular na dose de 1,5mL/kg de peso corporal (fig. 3).



Figura 3 - Drogas utilizadas para a realização da anestesia.

Depois de anestesiados os animais foram colocados em placa de contenção na posição decúbito dorsal. Tendo a região de uma das patas traseiras tricotomizadas (Fig. 4.a), foi realizada a assepsia local (Fig. 4.b). Uma incisão longitudinal na pele de aproximadamente 1cm foi

realizada ao longo da borda anterior da tíbia. Com o auxílio do bisturi, o tecido muscular foi seccionado e afastado até a exposição do periósteo. Exposto o periósteo, este foi rebatido até a exposição do tecido ósseo (Fig. 4.c).

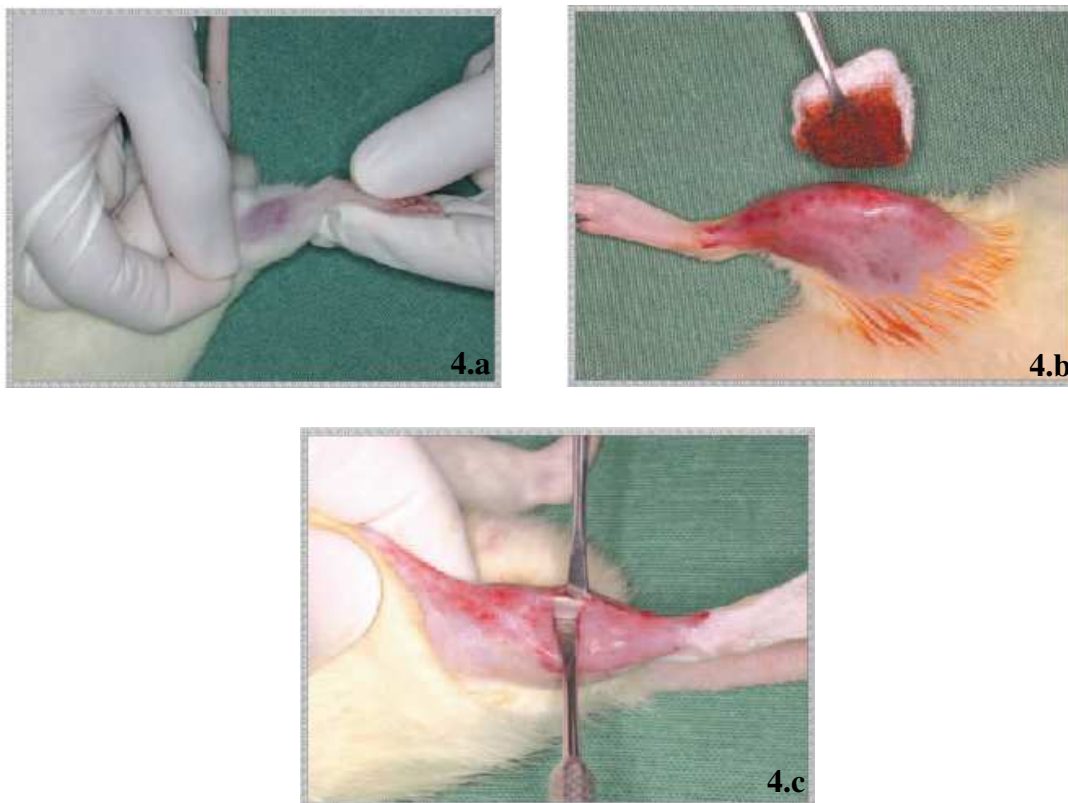


Figura 4 – (a) Tricotomia da tíbia do rato; (b) assepsia da tíbia do rato; (c) incisão muscular e exposição do periósteo.

Com o uso de um mini motor de baixa rotação Bethil e uma broca Carbide de 3mm de diâmetro, foi produzido um defeito ósseo crítico de 3mm (Almeida, 2006) (Fig. 5.a; Fig. 5.b) no terço superior da tíbia. A falha foi produzida na camada cortical atingindo o canal medular, de modo a permitir a introdução do arcabouço polimérico com a cultura celular nas dimensões 3x3mm. Este procedimento foi realizado em uma das patas dos os animais, para evitar maiores traumas.

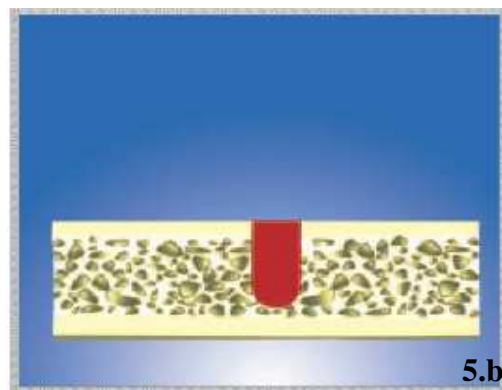


Figura 5 – (a) Realização do defeito ósseo; (b) visualização do defeito crítico.

Imediatamente após a preparação das cavidades e colocação dos corpos de prova, o periósteo foi reposicionado e o tecido muscular suturado com agulha e fio 4-0 Ethicon. Em seguida a pele foi suturada (Fig. 6) e aplicado em sua superfície solução anti-séptica. Durante o período de 24h pós-cirúrgicas os animais receberam dipirona diluído em água na dose de 2,5mL/L.

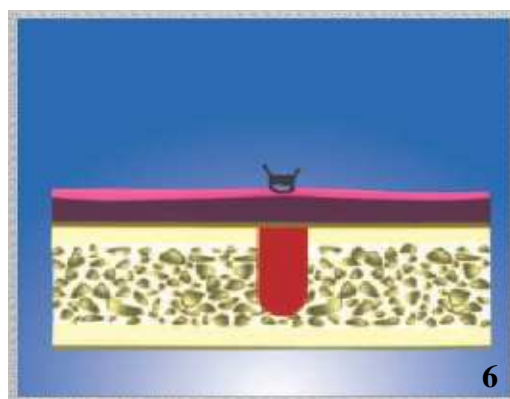


Figura 6 – reposicionamento da musculatura e sutura.

Cada grupo de 30 ratos foi subdividido em diferentes tempos de implantes: 2, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, sendo sacrificados 5 ratos para cada tempo.

Finalizado os períodos de 2, 7, 15, 30, 60 e 90 dias pós-cirúrgicos, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia com solução de Hidrato de Cloral 10% na dose de 400mg/kg. Em seguida as tíbias foram dissecadas e o segmento de cada uma delas contendo o material implantado foi removido com o auxílio de um disco caburundum (Fig. 7.a e 7.b)

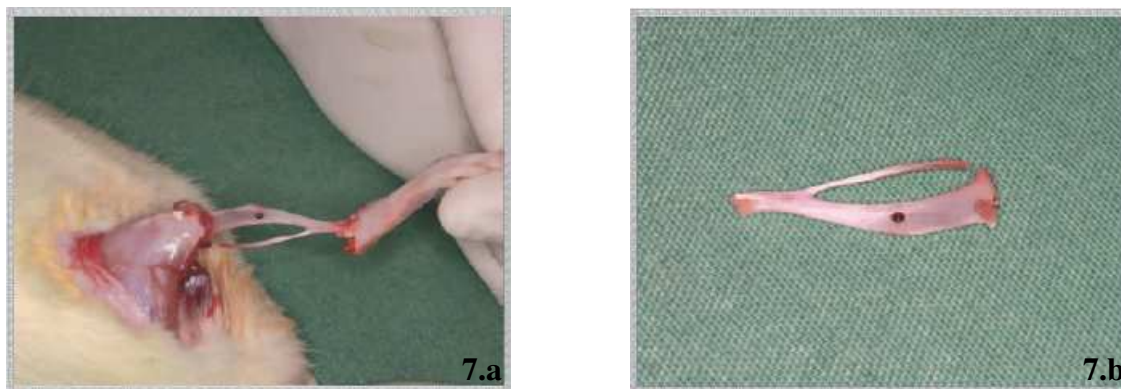


Figura 7 – (a) Dissecação da tíbia; (b) segmento da tíbia dissecado.

3.4.3 Implante das blendas sem cultura de células.

Realizaram-se os implantes das blendas sem cultura de células conforme o procedimento descrito no item 3.4.1, diferindo apenas nos diferentes tempos de implantes em 2, 15, 30, 60 e 90 dias.

Para esses implantes foram utilizado um total de 60 animais, divididos em três grupos: 20 animais implantados com pinos na composição 70/30 de PCL/PLGA, 20 animais implantados com pinos na composição 50/50 de PCL/PLGA e 20 animais implantados com pinos na composição 30/70 de PCL/PLGA.

3.4.4 Estudo macroscópico.

Imediatamente ao sacrifício, as tíbias foram retiradas e observadas para verificar a presença de sinais de rejeição ao implante e também o comportamento da blenda quanto a sua integração com o tecido ósseo.

3.4.5 Processamento do material.

Após a remoção, as amostras contendo os implantes foram imediatamente fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) por 24 horas, e logo em seguida imersas em solução de tartarato de sódio e potássio para descalcificação.

3.4.6 Microscopia de Luz, inclusão em parafina e historesina.

Após a descalcificação, o material foi lavado em solução de tampão fosfato 0,01M (pH 7,4) durante 30 minutos (3 trocas de 10 min.). Posteriormente, o material foi desidratado em gradientes crescentes de etanol, diafanizados e embebidos em parafina ou em historesina.

Os preparados foram seccionados com navalhas descartáveis em micrótomo Leica RM 2145 a uma espessura de 5µm. Prosseguindo-se com a coloração por Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) para a inclusão com parafina, e para inclusão em historesina utilizou-se Azul de Toluidina e Pararosanilina, e examinados em um microscópio ótico NIKON Eclipse E800.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Caracterização das Blendas através de MEV.

A análise morfológica dos materiais utilizados como arcabouços para o crescimento celular é fundamental para se verificar alguns parâmetros exigidos para essa aplicação, tais como, porosidade, interconexão entre os poros, tamanho e distribuição de tamanho entre os poros (Fig.8).

A figura 9 mostra a morfologia das blendas de PCL/PLGA nas composições 70/30, 50/50 e 30/70 preparadas com adição de sal, e posterior lixiviação. Verifica-se que as blendas apresentam morfologia porosa, com superfície irregular e concavidades geradas pelas partículas de sal durante o processo de evaporação do solvente e posterior saída após o processo de lixiviação. Não foram observadas partículas de sal na análise da fratura das amostras, porém, não se pode afirmar que ocorreu interconexão dos poros em toda a espessura do material. Morfologicamente, verifica-se diferença entre as blendas de PCL/PLGA. Apesar de todas as blendas apresentarem poros, as blendas 70/30 (Fig. 9.a) e 30/70 (Fig. 9.c), com maior composição de um dos dois polímeros, são mais porosas se comparadas com a blenda 50/50 (Fig. 9.b). Porém, a blenda 30/70

apresenta poros com diâmetros menores e a distribuição de tamanho dos poros é mais homogênea. Esse fato se deve aos parâmetros de miscibilidade que envolvem a mistura dos dois polímeros, aspecto não abordado nesse estudo.



Figura 8 – Lixiviação do sal nos pinos de polímeros biorreabsorvíveis (Barbanti *et al*, 05).

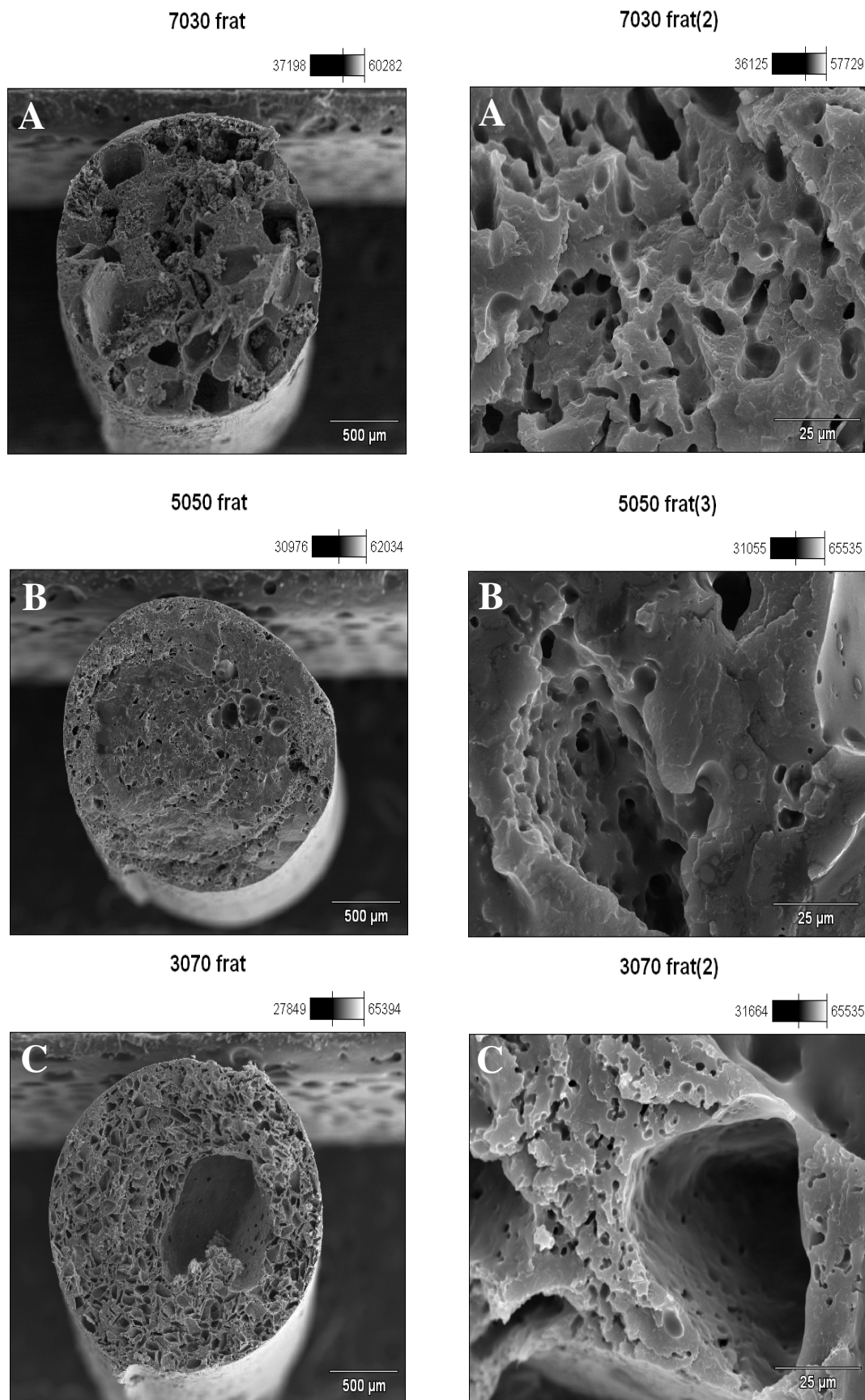


Figura 9 – Micrografias eletrônicas de varredura da fratura das Blendas de PCL/PLGA preparadas pelo processo de fusão. (A) blenda de PCL/PLGA 70/30. (B) blenda de PCL/PLGA 50/50. (C) blenda de PCL/PLGA 30/70.

Membranas com morfologias similares foram obtidas por Tang *et al.*, (2006) pelo processo de evaporação do solvente. Segundo os autores, a morfologia final das membranas depende da polaridade do solvente, das condições de evaporação do solvente, do grau de cristalinidade do material e da solubilidade do polímero no solvente utilizado.

A quantidade de sal utilizada no preparo dos arcabouços é descrita como um fator determinante na porosidade desses materiais, pois o aumento permite maior contato entre as partículas salinas, permitindo a dissolução contínua da substância. Murphy *et al.*, (2002) propuseram a fusão do sal como um novo método para garantir a interconexão dos poros.

Como comentado anteriormente, a interconexão dos poros é fundamental nas aplicações da engenharia de tecidos, pois, além de permitir uma adequada difusão do meio no arcabouço, ela facilita a formação dos tecidos na forma de uma rede organizada (Guan *et al.*, 2005).

Segundo Mikos *et al.*, (2000), se tratando de aplicações como arcabouços para cultura de células e crescimento tecidual, a porosidade é fundamental, a taxa de penetração e o crescimento celular são diretamente proporcionais à porosidade do material.

Os arcabouços descritos pela literatura apresentam porosidades variadas e são dependentes da técnica de processamento. Amostras preparadas pelo processo de evaporação do solvente com inclusão de sal permitem produzir porosidade superior a 87%, semelhantes às obtidas em nosso experimento (Mikos *et al.*, 2000). Num estudo com PLGA50 e tamanho de partículas de NaCl entre 250 e 350µm, Agrawal *et al.* (2000) estabelecem uma relação proporcional entre a quantidade de sal adicionada (concentração) e a porosidade: usando razões de 3,5/1 (sal/polímero) (m/m), 7/1 e 14/1, a porosidade aumenta em aproximadamente 5% na faixa entre 80 e 95%.

Outros métodos para a determinação da porosidade têm sido propostos, como a análise por porosímetro de mercúrio, entretanto os erros decorrentes da flexibilidade das amostras são freqüentes (Hedberg *et al.*, 2005).

Na regeneração de tecidos, o tamanho do poro está relacionado com o tipo de célula que forma o tecido. Avaliados em estudos *in vitro* e *in vivo*, determinar a faixa “ótima” do tamanho do poro representa um importante enfoque das pesquisas em arcabouços sintéticos (Sarazin *et al.*, 2004). O crescimento de fibroblasto tem sido relacionado em arcabouços com tamanho de poros entre 5 e 15µm (Wang *et al.*, 2001), o de hepatócitos em aproximadamente 20µm (Maquet *et al.*, 1997), regeneração de pele entre 20 e 150µm e neovascularização em 5µm (Atala, 2004).

Na reconstrução de tecidos ósseos o tamanho dos poros varia de acordo com o estudo e o material, entretanto a faixa preferencial varia entre 100 e 400µm (Wang *et al.*, 2007 e Sarazin *et al.*, 2004).

Estudos em implantes em osso de coelho mostraram crescimento satisfatório em arcabouços porosos de titânio com poros de 100µm de tamanho (Itälä *et al.*, 2001). A técnica de adição de sal e posterior lixiviação mostrou-se eficiente no preparo de arcabouços porosos de PLLA e PLGA (50/50) com poros menores que 45µm, entre 180 e 250µm e entre 250 e 350µm (Barbanti *et al.*, 2002).

Em relação à morfologia do poro, a geometria pode ser alterada variando-se o tipo de sal adicionado. Apesar do citrato de sódio apresentar sistema cristalino romboédrico, não foram observadas diferenças morfológicas significativas na geometria do poro quando comparadas às amostras preparadas por técnicas similares com NaCl (sistema cristalino cúbico) (Barbanti *et al.*, 2004b).

4.2 Estudo *in vivo* das blendas de PCL/PLGA

Realizou-se um estudo *in vivo* implantando-se as diferentes composições das blendas de PCL/PLGA sem cultura de células em tíbias de ratos *Wistar* para verificar possíveis processos inflamatórios do tecido ósseo em resposta à presença do material. Análises histológicas foram realizadas após 2, 15, 30, 60 e 90 dias de implante.

2 dias:

Nas análises histológicas das tíbias implantadas com as blendas na forma de pinos de PCL/PLGA nas composições 70/30 (Fig. 10.a), 50/50 (Fig. 10.b), 30/70 (Fig. 10.c) foi possível observar em todos os cortes área hemorrágica com malha de fibrina contendo hemácias, e presença de fragmentos de osso previamente fraturados. Essas foram as primeiras respostas do organismo para uma possível reestruturação da fratura óssea.

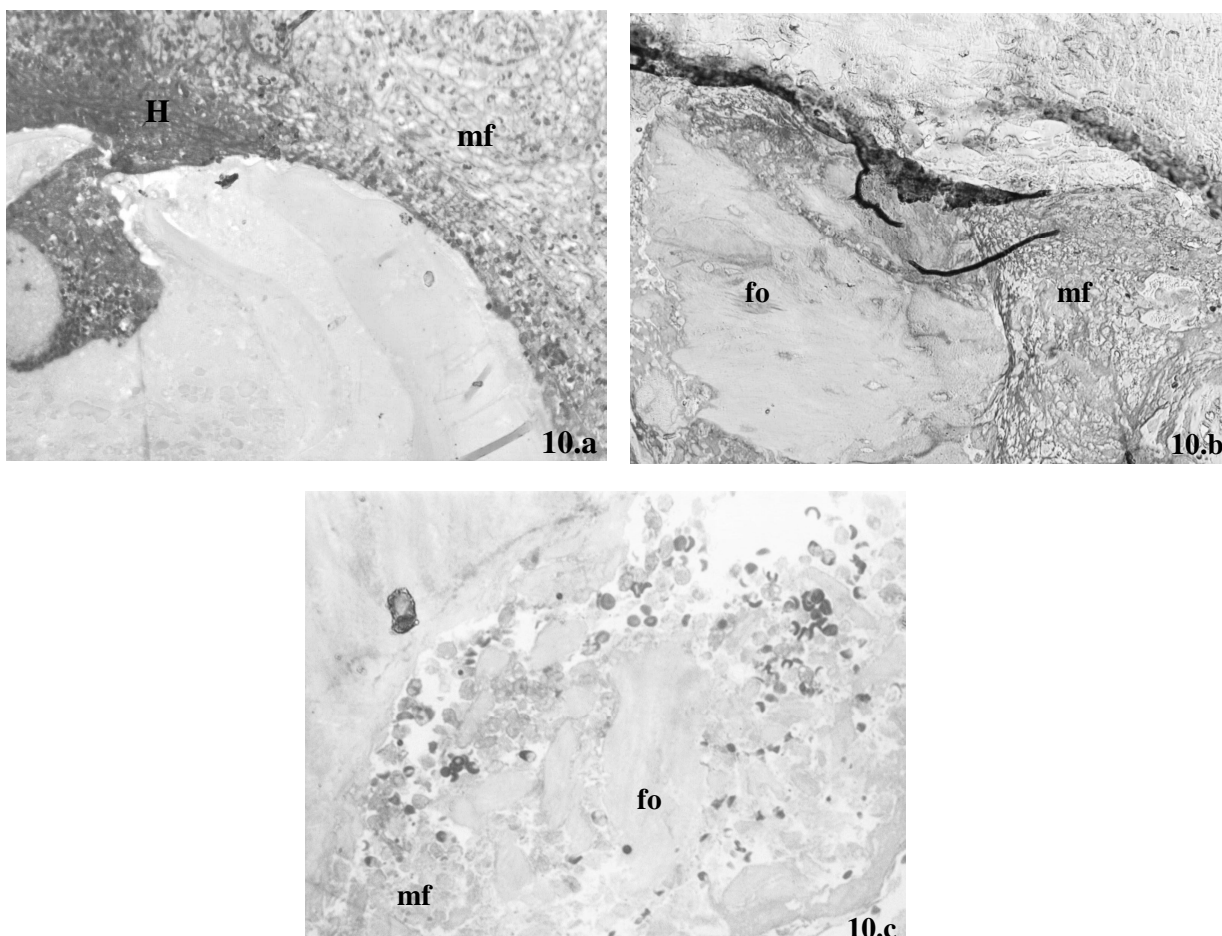


Figura 10 - Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 2 dias pós-cirúrgicos. **(a)** na composição 70/30, observar malha de fibrina (**mf**) com hemorragia (**H**), 200x; **(b)** na composição 50/50, observar malha de fibrina (**mf**) e hemorragia, e a presença de fragmentos de osso (**fo**) proveniente da fratura, 200x; **(c)** na composição 30/70, observar malha de fibrina e hemorragia, e a presença de fragmentos de osso (**fo**) proveniente da fratura, 400x. Azul de toluidina e pararosanilina.

15 dias:

Nos implantes de PCL/PLGA 70/30 (Fig. 11.a) e 50/50 (Fig. 11.b) pode-se observar uma reação endosteal com formação de osso primário no interior da cavidade medular.

Nos implantes de PCL/PLGA na composição 30/70 notou-se a presença do tecido cicatricial resultante da organização da malha de fibrina. Pode-se observar uma intensa reação periosteal com ossificação endocondral, a presença de áreas com cartilagem hialina e osso primário sobre a região cortical na região da cavidade produzida para colocação do implante (Fig. 11.c).

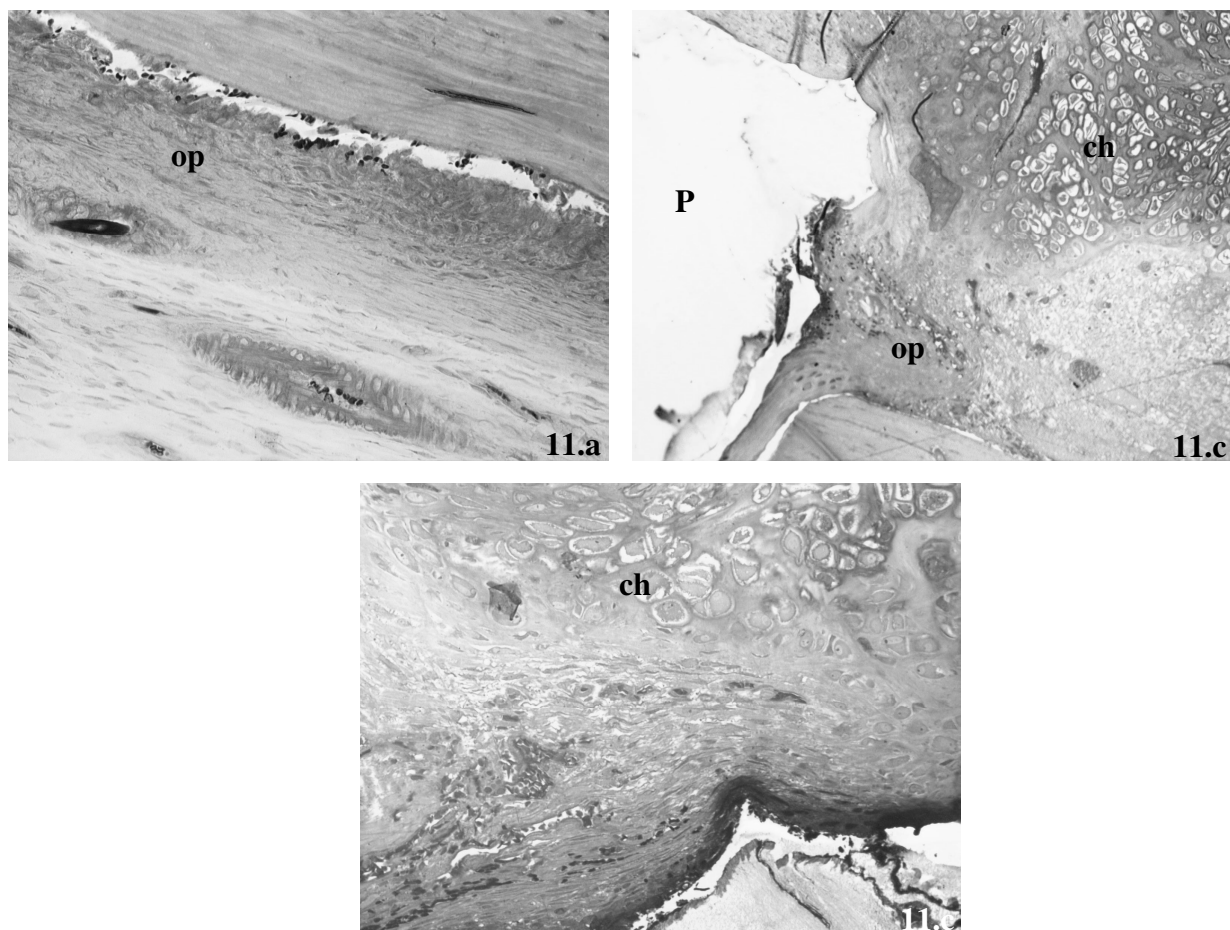


Figura 11 - Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 15 dias pós-cirúrgicos. (a) na composição 70/30, notar a reação endosteal com formação de osso primário (op), 200x; (b) na composição 50/50, notar a reação endosteal com formação de osso primário (op) em volta do polímero (P) no interior da cavidade medular, e a cartilagem hialina (ch), 200x; (c) na composição 30/70, observar uma intensa reação periosteal com ossificação endocondral, a presença de áreas com cartilagem hialina (ch) e osso primário, 200x. Azul de toluidina e pararosanilina.

30 dias:

Foi verificado nos implantes de PCL/PLGA 70/30 (Figura 12.a), e 30/70 (Figura 12.c) uma reação periosteal com ossificação endocondral.

Houve formação de osso primário, presença de tecido cicatricial, assim como osteoblastos e capilares sanguíneos neoformados ocupando as lacunas na matriz óssea. Estes achados puderam ser observados também nos implantes de 30 dias com PCL/PLGA 50/50 (Figura 12.b).

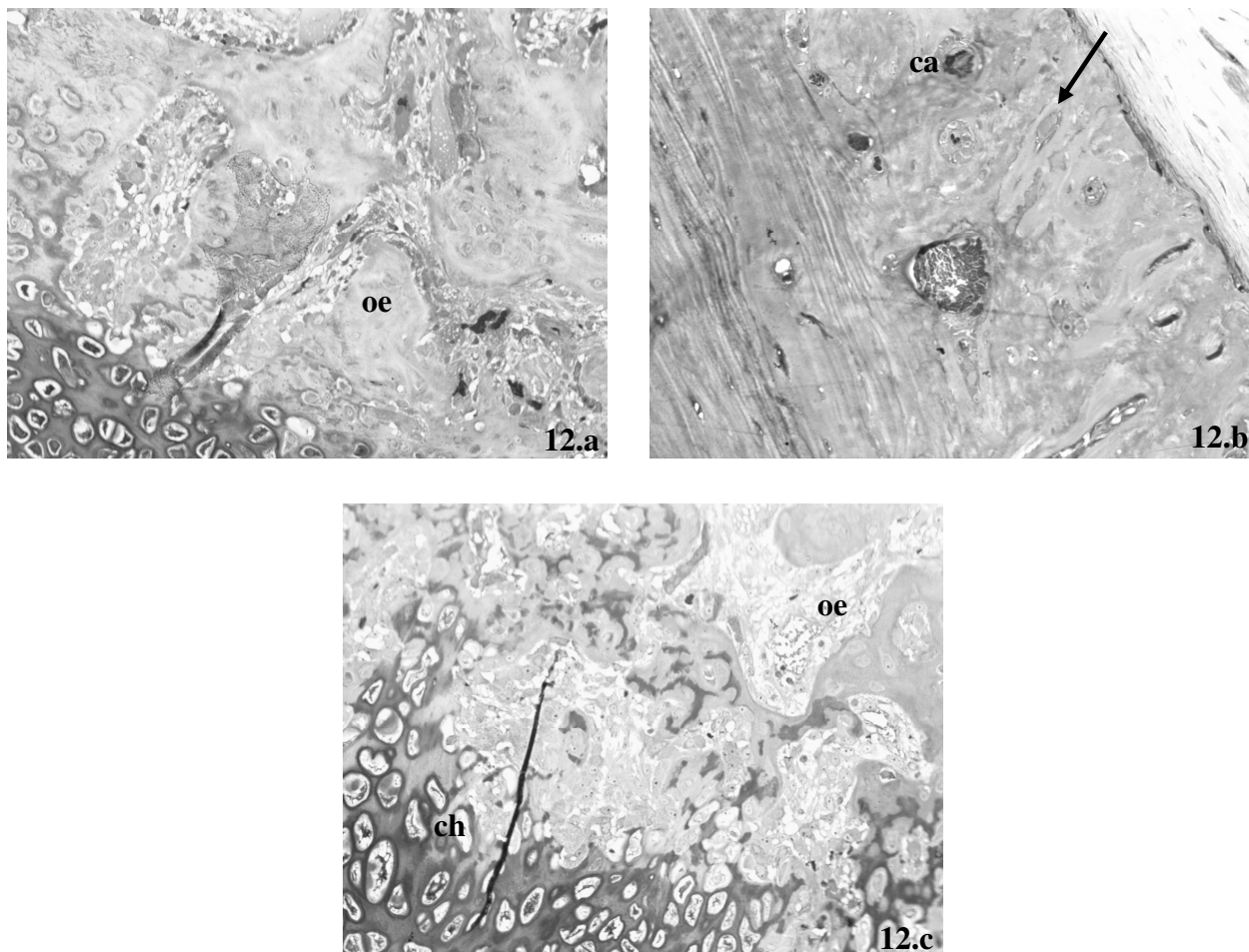


Figura 12 - Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 30 dias pós-cirúrgicos. **(a)** na composição 70/30, notar uma reação periosteal com ossificação endocondral (**oe**), 200x; **(b)** na composição 50/50, notar a presença de osteoblastos (**seta**) ocupando as lacunas, assim como capilares sangüíneos (**ca**) neoformados, 200x; **(c)** na composição 30/70, observar reação periosteal com ossificação endocondral (**oe**), e a cartilagem hialina (**ch**), 200x. Azul de toluidina e pararosanilina.

60 dias:

Nos resultados dos implantes de PCL/PLGA 70/30 (Fig. 13.a) foi observado neoformação óssea, entre a cortical e o implante, essa neoformação apresentou características de osso jovem. Houve presença de células da medula óssea junto ao osso neoformado, em contato com o implante.

Na figura 13.b mostrando os resultados de PCL/PLGA 50/50, obtivemos a presença de invasão de tecido ósseo para o interior do implante. O osso que cresceu junto ao implante é proveniente das trabéculas ósseas presentes no interior do canal medular.

Em alguns casos, como na figura 13.c, a presença da linha cimentante foi essencial para diferenciar osso maduro de osso neoformado.

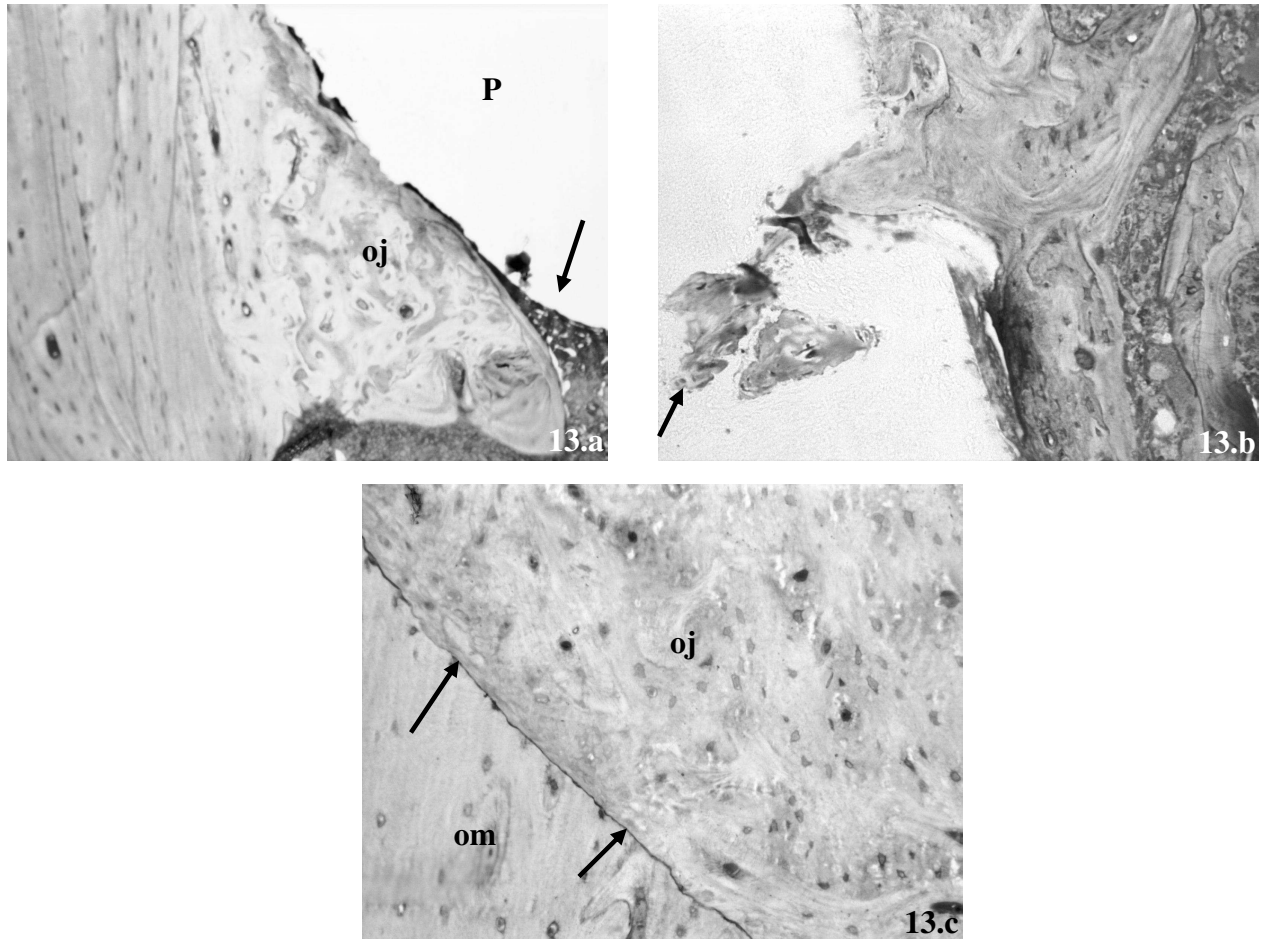


Figura 13 - Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 60 dias pós-cirúrgicos. **(a)** na composição 70/30, presença do implante (**P**) em contato com medula óssea (**seta**) e osso jovem neoformado (**oj**). Notar a esquerda, presença de osso maduro (**om**) na região da cortical, 200x; **(b)** na composição 50/50, presença de osso jovem invadindo o implante (**seta**), 200x; **(c)** na composição 30/70, contato do osso maduro (**om**) da cortical com osso jovem neoformado (**oj**) junto ao implante. Presença da linha cimentante separando os dois tecidos ósseos (**seta**), 200x. Azul de toluidina e pararosanilina.

90 dias:

Pode-se observar nos resultados com implantes de PCL/PLGA 70/30 (Figura 14.a) e de PCL/PLGA 30/70 (Fig. 14.c), que a degradação da blenda permitiu a invasão de tecido ósseo contendo vasos sanguíneos, e por tecido conjuntivo contendo células osteoprogenitoras, que provavelmente se diferenciarão em osteoblastos para a produção de medula óssea.

Entretanto, nos implantes com PCL/PLGA 50/50 (Figura 14.b), pudemos observar em um dos animais a presença de uma cápsula fibrosa proveniente da reação rápida da degradação do implante.

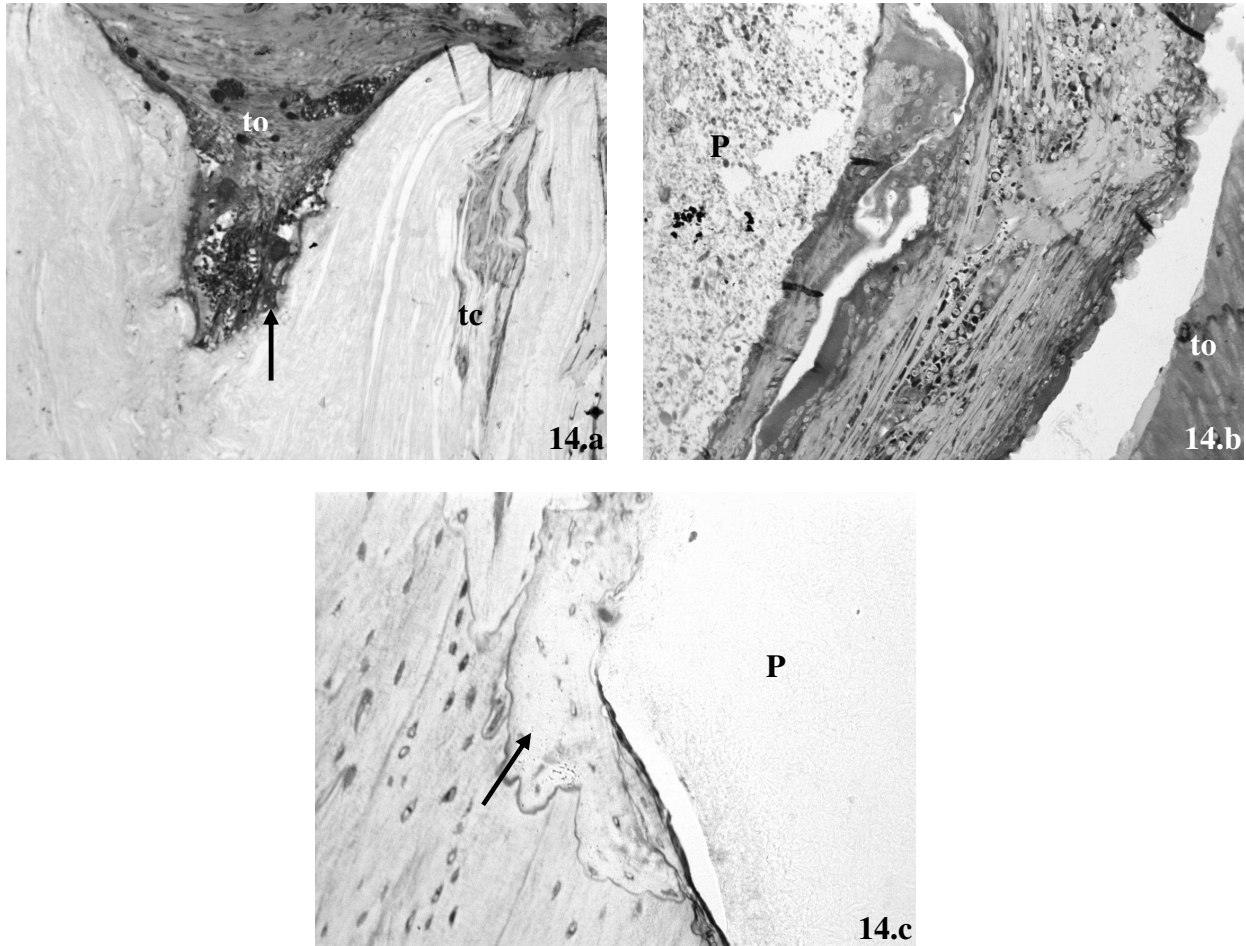


Figura 14 - Micrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com a blenda de PCL/PLGA na forma de pino, 90 dias pós-cirúrgicos. (a) na composição 70/30, implante sofrendo invasão por tecido ósseo (to) e tecido conjuntivo (tc). Notar formação de capilares sanguíneos (seta) junto ao tecido ósseo, 200x; (b) na composição 50/50, formação camada fibrosa na interface osso (to) e implante (P), 200x.; (c) na composição 30/70, formação de osso jovem (seta) entre a cortical e o implante (P) 200x. Azul de toluidina e pararosanilina.

A presença de edema na região do implante, observado em alguns animais com 2 dias pós-operatório, tem sido relatadas como um processo fisiológico de reparo do tecido ósseo (Hasirci *et al.*, 2003).

Segundo Coraça *et al.*, (2002) em seus estudos na quarta semana pós-implante foi possível observar no osso neoformado, área com osso secundário. Esta maturação tornou-se mais evidente na oitava décima sexta semana pós-implante. Este processo de maturação foi observado

também em pinos colocados em tíbias de ovelhas. Os autores observaram que o osso presente ao redor do implante estava diferenciado em osso lamelar após doze semanas de implantação. A presença de osso jovem e maduro na camada óssea neoformada ao redor do implante se deve ao processo de remodelagem do osso. A remodelagem óssea é um fenômeno que ocorre em todos os ossos, sendo contínua durante toda a vida em resposta a estímulos aos quais são submetidos normalmente (Rohanizadek *et al*, 2007).

Conforme observado por Barbanti *et al* (2005) o grau de restauração final da arquitetura original do tecido dentro do espaço ocupado pelo implante varia por razões ainda não inteiramente conhecidas. A degradação destes polímeros ocorre principalmente por hidrólise e, em pouca extensão, com a ação enzimática não específica. Os produtos da degradação do poli (ácido glicólico) e da polidioxanona são excretados pelos rins. Através da hidrólise as moléculas de poli (ácido láctico) são degradadas, *in vivo*, em ácido láctico e as de poli (ácido glicólico) em glicinas; estes produtos entram no ciclo do ácido tricarboxílico da respiração e são excretados na forma de água e dióxido de carbono.

A neoformação óssea ao redor de implantes tem sido alvo de interesse de pesquisadores que realizam testes de biocompatibilidade de materiais. Em vários trabalhos, os autores avaliaram esta camada levando em consideração aspectos relacionados à sua origem, maturação, contato com o implante e existência de tecido mole em sua interface com o implante. Segundo os autores, esta formação é uma resposta do tecido após a implantação, resultado da ativação de células osteogênicas desencadeada pela lesão na cortical e nas trabéculas ósseas (Service, 2000).

De acordo com Guarniero *et al.*, (2003), o osso formado ao redor de implantes colocados no interior do osso, tem sua origem a partir das células osteogênicas presentes no perióstio e endóstio, estimuladas pela agressão óssea sofrida durante a colocação do implante. Durante a produção das cavidades na tíbia dos ratos 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 no perióstio. Este mecanismo é semelhante ao que ocorre na formação de calos ósseos externos e internos, freqüentes durante o reparo de fraturas ósseas.

Tipicamente, o uso de implantes em tecidos biológicos vem acompanhado de uma reação inflamatória aguda, que normalmente evolui para um granuloma de corpo estranho. Quando o material inerte é grande o suficiente para impedir a fagocitose por um único macrófago, e que não

suscitem uma resposta inflamatória ou imune, as células epitelióides e células gigantes se justapõem à superfície e capsulam o material (Gosain *et al.*, 2000).

Böstman *et al.*, (2000), faz 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 indicam 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.

Arcabouços de PCL têm sido descritos com biocompatibilidade semelhantes aos de PLA e PGA, entretanto, devido ao longo tempo de degradação *in vitro*, os estudos que utilizam dispositivos puros de PCL são raros na literatura atual (Chen *et al.*, 2004).

A literatura relata que arcabouços de blendas na forma de pinos de PCL/PLGA são capazes de promover crescimento de osteoblasto e fazer a sua própria manutenção, conforme apresentado neste trabalho. Recentemente, blendas com PCL/PLGA vêm sendo utilizadas como uma alternativa para a melhoria das suas propriedades mecânicas (Barbanti *et al.*, 2005).

Nos implantes realizados, os polímeros biorreabsorvíveis conseguiram satisfazer vários requisitos biológicos e técnicas para serem aceitos. Assim como as definições feitas por Ciapetti *et al.*, (2003), os polímeros não induziram reação inflamatória de corpo estranho, não foram carcinogênicos, mutagênicos ou teratogênicos, não causaram alergias, hipersensibilidade ou toxicidade, nem ativaram o sistema de complemento, tendo uma importância clínica relevante.

Não foram detectadas reações inflamatórias que pudessem comprometer os implantes e suas degradações. De acordo com os resultados de Ciapetti *et al.*, (2003), a reação óssea aos poliláticos é em geral boa se os implantes são devidamente confeccionados e quando a técnica cirúrgica é adequada.

4.3 Cultura de Células

O desenvolvimento de biomateriais capazes de direcionar o comportamento celular é, atualmente, uma área de pesquisa que avança rapidamente. A aplicação de polímeros biorreabsorvíveis como materiais de arcabouço para cultura de células tem tido destaque em diversas áreas de aplicação médica, sobretudo na área ortopédica, na qual vários materiais vem

sendo desenvolvidos e testados com células osteoblásticas (Agrawal *et al.*, 2001 e Nakagawa *et al.*, 2004). Neste capítulo são apresentados os dados de cultura de osteoblastos de ratos *Wistar* sobre amostras de arcabouços porosos de PCL/PLGA preparados pelo método de fusão com adição e lixiviação do sal.

4.3.1 Citotoxicidade

Os dados obtidos pelo teste de citotoxicidade estão apresentados na **Figura 15**. Os resultados indicaram que as amostras analisadas apresentaram diferenças estatísticas significantes. A amostra PCL/PLGA 70/30 foi estatisticamente menor que o controle negativo, houve diferença estatística entre as amostras PCL/PLGA 70/30 e PCL/PLGA 30/70, apresentando a amostra 30/70, o maior índice de absorbância. A blenda 50/50 apresentou um comportamento intermediário entre as duas outras blendas.

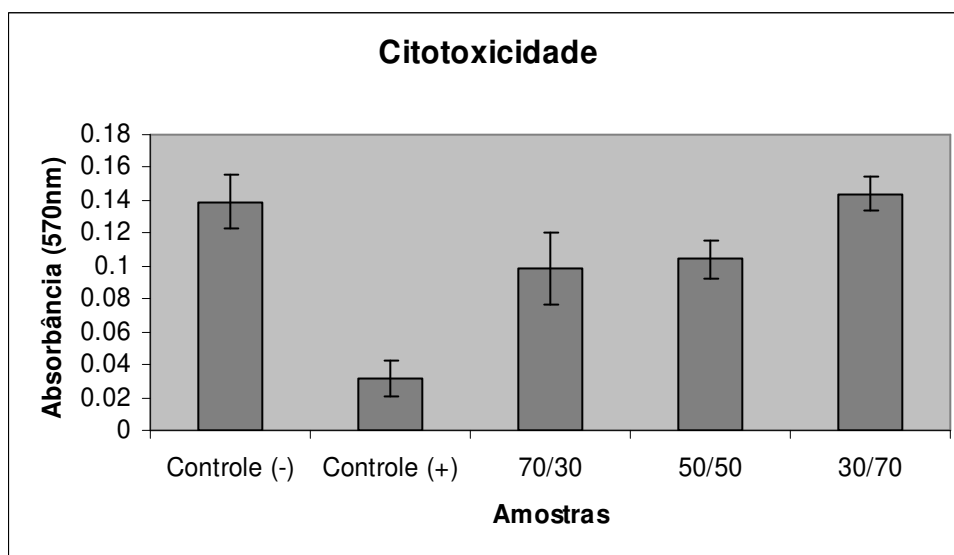


Figura15 – Teste de citotoxicidade das amostras de PCL/PLGA preparadas pelo método de fusão. Membranas de Teflon® (controle negativo), placa de poliestireno (controle positivo).

Os dados aqui apresentados estão de acordo com a literatura. Rezende *et al.*, (2005) utilizaram membranas de PLGA como curativo em pele de ratos *Wistar*, não observando efeito citotóxico sobre o tecido. Entretanto, deve ser avaliado o índice de degradação do PLGA a curto e longo prazo, uma vez que este copolímero possui como característica alto índice de degradação, dependendo da composição do copolímero (Rezende & Duek, 2003). Segundo Rezwan *et al.*,

2006, o material degrada-se durante a cultura de células, servindo como arcabouço para proliferação e secreção da matriz extracelular.

Os ensaios de citotoxicidade aqui demonstrados indicam boa tolerância das células osteoblásticas e ainda ausência de toxicidade dos biopolímeros. Entretanto afirmar que um material não é tóxico para as células não representa que ele será um bom substrato. Também é necessário que o biomaterial interaja com as células através de uma adesão celular.

4.3.2 Adesão de osteoblastos

Os resultados obtidos pelo teste de adesão celular de osteoblastos indicaram que as amostras analisadas apresentaram adesão semelhantes entre as blendas estudadas, (**Fig. 16**). O resultado do teste ANOVA, mostrou que não há diferença significativa entre as blendas amostras e o controle positivo. Analisando apenas esse parâmetro, a blenda de PCL/PLGA poderia ser indicada para servir como arcabouço para o crescimento de osteoblastos, independente das composições estudadas.

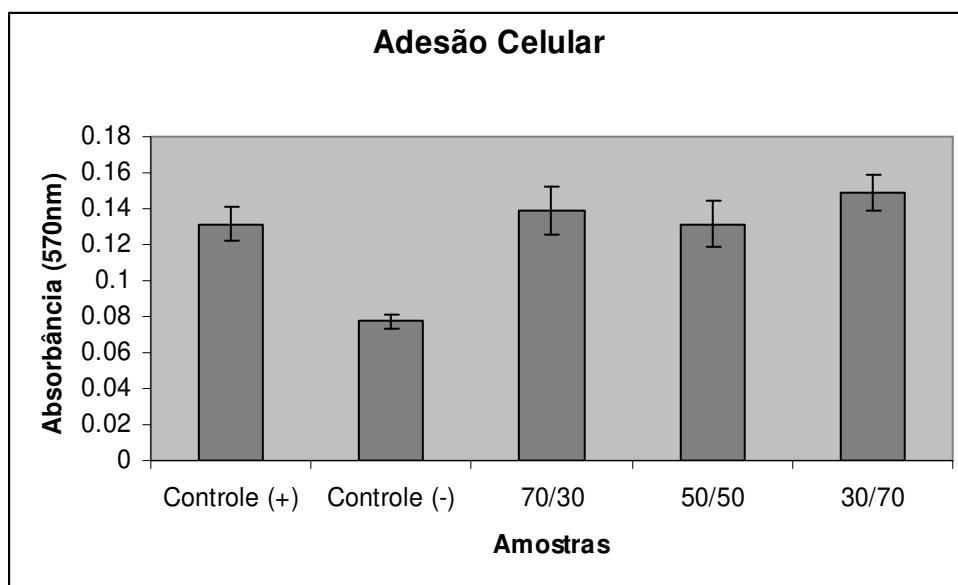


Figura 16 – Teste de adesão celular das amostras de PCL/PLGA preparadas pelo método de fusão. Membranas de Teflon® (controle negativo), placa de poliestireno (controle positivo).

A primeira interação entre a célula e o substrato sintético é a adesão celular. O termo *adesão* envolve etapas subsequentes, sendo a primeira relacionada com a aproximação e atração

entre as células e o biomaterial. A etapa é breve, e as forças envolvidas são consideradas secundárias, como as forças de dipolo induzido e permanente. A etapa seguinte é mais longa e estável, proteínas da matriz, ou da própria membrana plasmática, são depositadas e adsorvidas pelo material. Neste contexto, a interação entre as células e o material sintético depende, fundamentalmente, das características da superfície do material. A topografia, as propriedades químicas e a energia de superfície, determinam como as moléculas biológicas serão adsorvidas, influenciando nas etapas subsequentes de espalhamento, proliferação e diferenciação celular (Anselme, 2000).

A influência das características de superfície do arcabouço de cultura tem sido avaliada de forma inter-relacionada. Superfície de amostras lisas e rugosas mostra ter influência na adesão e proliferação das células (Ambrosio *et al*, 2003). No experimento realizado com arcabouços de PCL/PLGA não houve diferenças estatísticas significantes, a semelhança estatística entre elas nos permite inferir a respeito do processamento do material, sugerindo não ter influência, neste caso, na cultura de células. Superfícies lisas, geralmente facilitam a adesão quando comparadas às rugosas, entretanto a invasão celular é maior nos substratos porosos (Böstman *et al.*, 2000).

4.4 Implante de Osteoblastos cultivados sobre arcabouços das blendas de PCL/PLGA.

Aplicados aos arcabouços de polímeros biorreabsorvíveis 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.

Inúmeras pesquisas buscam aperfeiçoar e intensificar o uso de arcabouços de biomateriais para expansão de osteoblastos a fim de permitir a recomposição do tecido ósseo após intervenção médica. A interação célula-arcabouço deve ser avaliada para se firmar condições ótimas de adesão, crescimento e diferenciação celular, requisitos essenciais para a formação de um neotecido *in vivo*. Este tecido de preenchimento deve apresentar propriedades biomecânicas equivalentes ao tecido original, tornando-se capaz de devolver a função primária à região lesada, através da morfologia diferenciada de suas células e no arranjo organizado das moléculas que compõem sua matriz extracelular (Pineda *et al*, 2005).

Os resultados apresentados a seguir referem-se às análises histológicas dos implantes das blendas de PCL/PLGA acrescidas de células osteoblásticas.

4.4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Nas blendas de PCL/PLGA 70/30 e PCL/PLGA 30/70 nos períodos de 2, 7 e 15 dias não se observou a formação de calo ósseo, e foi notado a cavidade do implante com a blenda, sem evidências de alterações patológicas locais.

Já no período de 30 dias nas blendas de PCL/PLGA 70/30 e PCL/PLGA 30/70 nota-se uma semelhança nas análises com o início da formação de um calo ósseo delgado, embora ainda seja visível a cavidade do implante, sem sinais de processos inflamatório.

Após 60 dias de implante com PCL/PLGA 70/30 verificou-se um aumento do calo ósseo, entretanto nos implantes com a blenda PCL/PLGA 30/70 a formação do calo ósseo apresentou-se mais espessa comparando com a blenda 70/30. A visualização da cavidade do implante nas duas composições não era nítida e não houve sinais de alterações patológicas.

Na análise macroscópica após 90 dias de implante com a blenda 70/30 ficou evidente a formação do calo ósseo volumoso, e não foi possível observar a cavidade do implante. Já nas blendas 30/70 o calo ósseo apresentou-se menos volumoso, o aspecto da neoformação óssea era de completa integração, a cavidade realizada para o implante foi totalmente preenchida. Em ambos tratamentos não houve sinais de rejeição imunológica ao implante.

Sendo assim, pelos aspectos macroscópicos, as blendas de PCL/PLGA 70/30 e PCL/PLGA 30/70 demonstram apresentar uma boa interatividade com o tecido ósseo, não apresentando sinais de inflamação e rejeição.

4.4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica dos implantes da blenda de PCL/PLGA nas concentrações 70/30 e 30/70, no período de 2 dias, não mostraram diferenças nas reações teciduais frente ao processo cirúrgico. Nos implantes com as blendas na concentração 70/30 (**Fig. 17.a**) foi possível observar área hemorrágica com malha de fibrina junto ao polímero implantado e osso preexistente, reação

natural ao estímulo causado pelo defeito ósseo. Para os implantes com as blendas na concentração 30/70 nota-se também área de fibrina e áreas hemorrágicas em volta do polímero implantado, e a presença de fragmentos ósseos necróticos preexistentes (Fig. 17.b) provenientes do processo cirúrgico. Em detalhe sob luz polarizada observar a malha de fibrina (Fig. 17.c) próxima ao polímero, resposta inicial pós lesão tecidual relacionada ao processo de reparo. Nos dois implantes houve presença de células da medula óssea, entretanto não observou-se a formação de neotecido osseo.

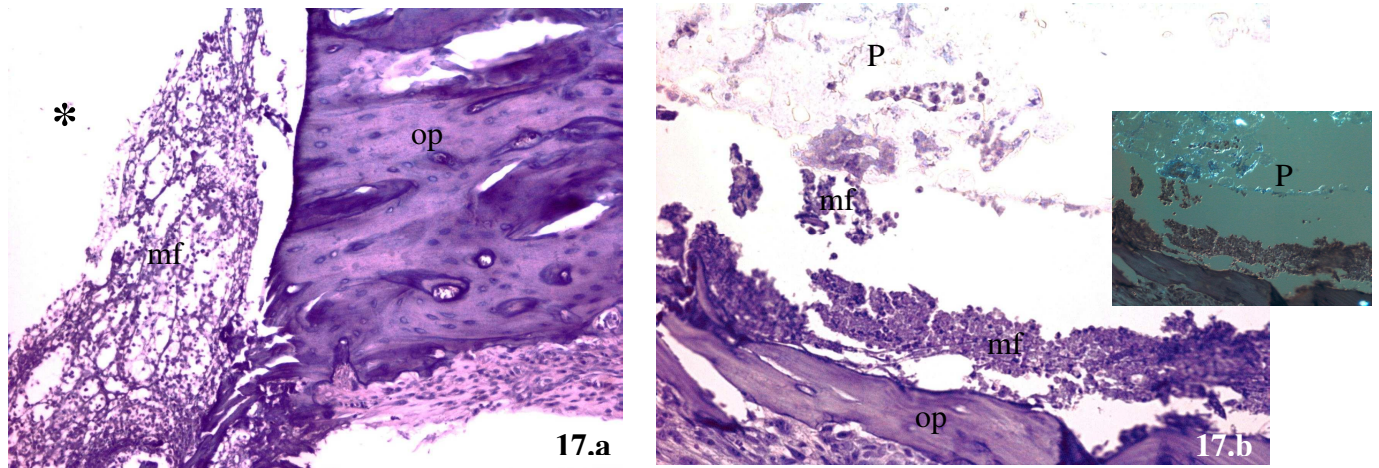


Figura 17. Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 2 dias pós-cirúrgicos. **(a)** na composição 70/30 nota-se a presença de uma malha de fibrina (**mf**) junto às células sangüíneas na cavidade do implante (*), reação natural ao estímulo do defeito ósseo, 400x; **(b)** na composição 30/70 observa-se tecido de malha de fibrina (**mf**) e áreas hemorrágicas junto ao polímero (**P**) implantado, e a presença de osso preexistente (**op**), 400x; **(c)** No detalhe, sob luz polarizada observar a área de fibrina próximo ao polímero (**P**), 200x. HE.

No período de 7 dias as análises das lâminas com implante da blenda de PCL/PLGA na concentração 70/30 observa-se que entre o polímero (**P**) e o osso pré-existente (**op**) há formação de malha de fibrina (**mf**) (Fig. 18.a). Sobre o polímero implantado nota-se regiões com grande quantidade de osteoblastos aprisionados com matriz óssea ao redor. Já nas lâminas com implante na concentração 30/70 mostra a atividade intensa na formação de tecido de granulação entre o polímero e o osso preexistente (Fig. 18.b), entretanto não foram observados osteoblastos com matriz óssea ao redor como encontrado na concentração 70/30.

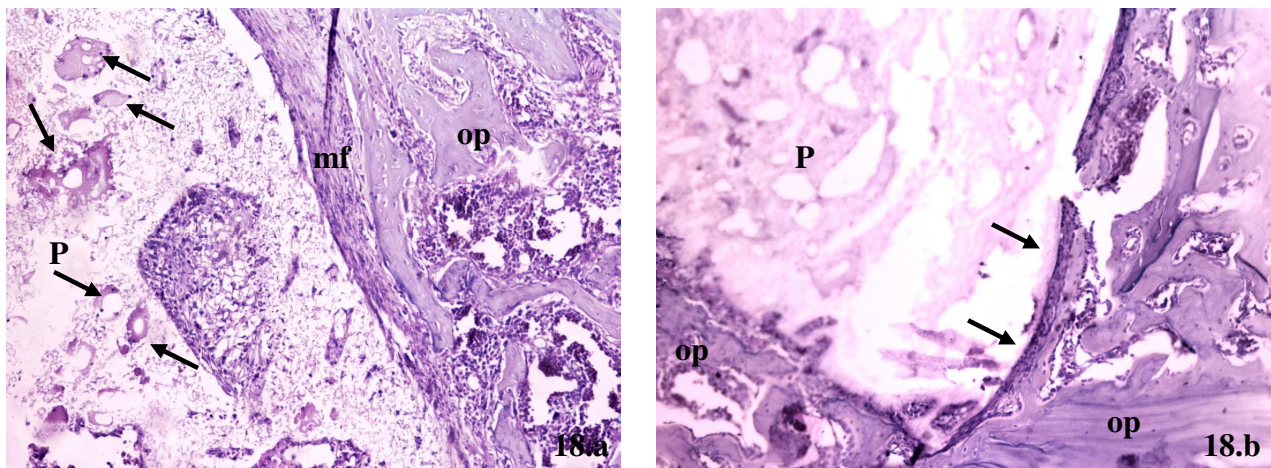


Figura 18 - Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 7 dias pós-cirúrgicos. (a) na concentração 70/30 observa-se entre o polímero (P) e o osso pré-existente (op) observar a formação de malha de fibrina (mf). Nota-se regiões com osteoblastos rodeada por matriz óssea neoformada (seta), 100x.; (b) na concentração 30/70 mostrando o início da formação de malha de fibrina (seta) entre o polímero (P) e o osso preexistente (op), 100x. HE.

Dados histológicos do período 15 dias dos animais implantados com blendas de PCL/PLGA 70/30 mostram a malha de fibrina ao redor do polímero (**Fig. 19.a**), e fragmentos ósseos pré-existent provenientes do processo cirúrgico. Nos implantes com as blendas na concentração 30/70 verifica-se a presença de malha de fibrina entre o polímero e o osso pré-existente (**Fig. 19.b**), e a presença de tecido ósseo primário que está separado do tecido ósseo secundário da cortical pela linha cimentante. Observam-se osteoblastos recém aprisionados pela matriz óssea, característica de tecido ósseo primário.

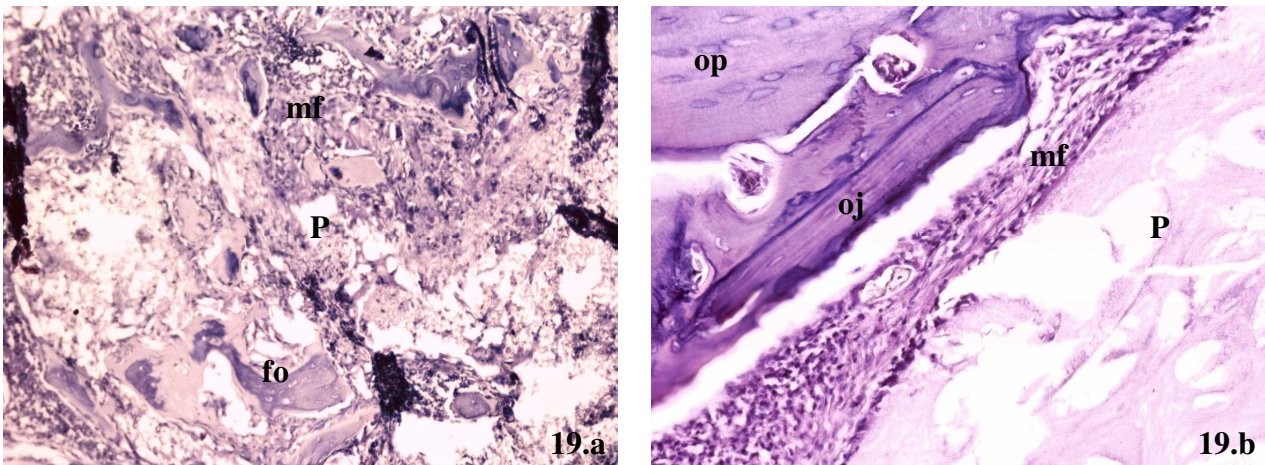


Figura 19 - Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 15 dias pós-cirúrgicos. (a) 70/30 formação de malha de fibrina (mf) junto ao polímero (P). Fragmentos ósseos (fo) provenientes do processo cirúrgico, 100x.; (b) formação de malha de fibrina (mf) entre o polímero (P) e o osso preexistente (op). Presença de formação de osso jovem (oj), 200x. HE.

Após 30 dias pós-operatórios, as fotomicrografias de implantes das blendas de PCL/PLGA 70/30 mostram a área em volta do polímero com a presença de osso maduro que foi neoformado supostamente por reação endosteal (**Fig. 20.a**), e também pode-se observar a formação de osteóide formando matriz óssea não está calcificada. Nas análises histológicas das blendas com concentração 30/70 observa-se neoformação óssea junto ao polímero, camada óssea fina e a medula óssea em contato com o implante (**Fig. 20.b**). Observam-se osteoblastos recém aprisionados pela matriz óssea, característica de tecido ósseo primário.

O tecido primário formado com 30 dias de implante passa a apresentar características de 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.

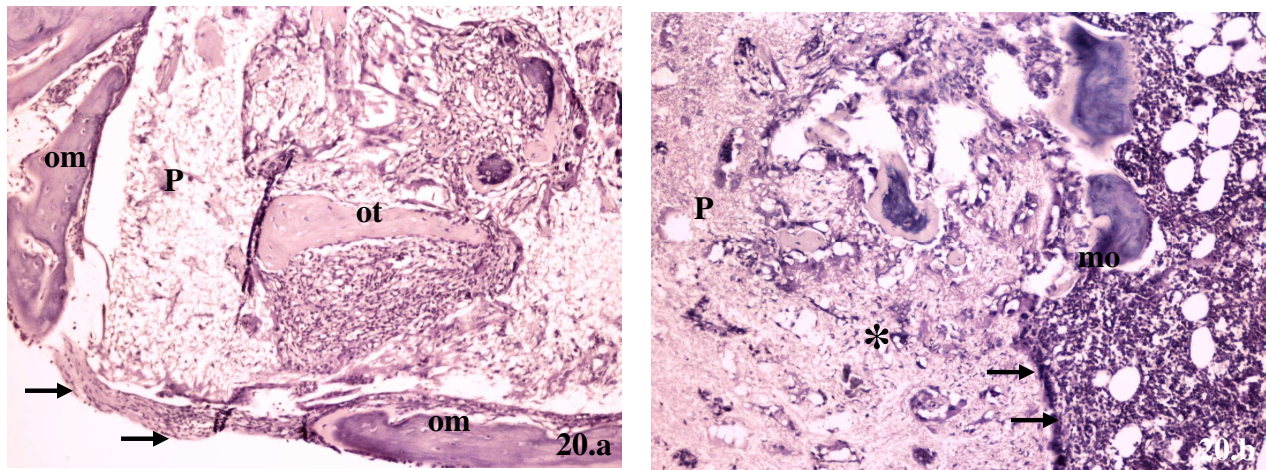


Figura 20 -. Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 30 dias pós-cirúrgicos. (a) 70/30 nota-se a presença de osso maduro (**om**) supostamente formado por reação endosteal (**seta**) em volta do polímero (**P**). Observa-se a formação de osteóides (**ot**), 100x; (b) 30/70 mostrando osso neoformado (*) junto ao polímero. Observar a camada óssea fina (**seta**), e a medula óssea (**mo**) em contato com o polímero (**P**), 100x. HE.

Com 60 dias de implante, **Figura 21.a** a análise histológica das amostras das blendas de PCL/PLGA 70/30 apresentaram trabéculas ósseas dentro do polímero, uma linha cimentante que está localizada junto ao osso preexistente e próximo ao polímero que é característico da separação de osso jovem e osso maduro, com vários osteoblastos aprisionados por matriz óssea neoformada. Além disso, ocorre a neoformação óssea sobre e ao redor do implante indicando o preenchimento da falha por tecido ósseo primário com fibras dispostas de forma desorganizada.

Os implantes com blendas 30/70 (**Fig. 21.b**) apresentaram-se de forma semelhante a composição 70/30, com osteoblastos, osteóide (área de osso neoformado) e medula óssea junto ao polímero.

Nota-se que em ambas composições das blendas implantadas apartir de 60 dias o neotecido ocupou uma região maior dificultando a observação do polímero, o qual provavelmente iniciou seu processo de degradação.

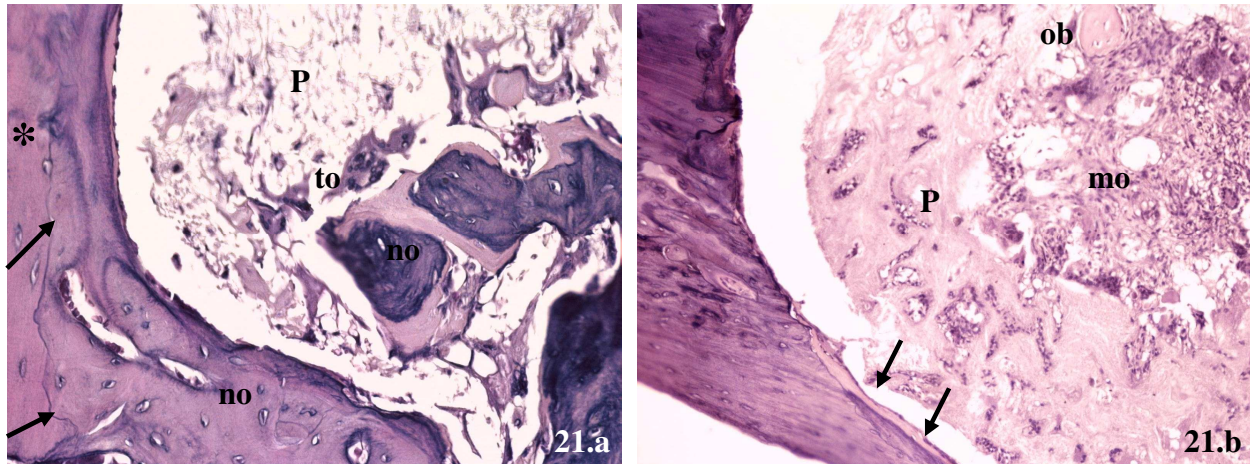


Figura 21 - Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 60 dias pós-cirúrgicos. 70/30 (a) observa-se a linha cimentante (**seta**) que está localizada junto ao osso preexistente (*) e próximo ao polímero (**P**), com vários osteoblastos aprisionados possivelmente secretando matriz óssea. Nota-se a formação de trabéculas ósseas (**to**) dentro do polímero, e a neoformação óssea (**no**) sob o polímero, 200x; (b) observa-se os osteoblastos (**ob**) e os osteóides (área de osso neoformado) (**seta**). E medula óssea (**mo**) junto ao polímero (**P**), 100x. HE.

Após 90 dias pós-operatórios, as fotomicrografias de implantes das blendas de PCL/PLGA 70/30 observa-se uma linha cimentante próxima ao polímero e junto ao osso preexistente. Sobre o polímero nota-se áreas de osteóides (**Fig. 22.a**). Entretanto nas blendas com composição 30/70, pode-se observar que o osso neoformado (**Fig. 22.b**) ocupou uma parte da região do polímero implantado. Nota-se também a presença de osteoblastos aprisionado por matriz óssea.

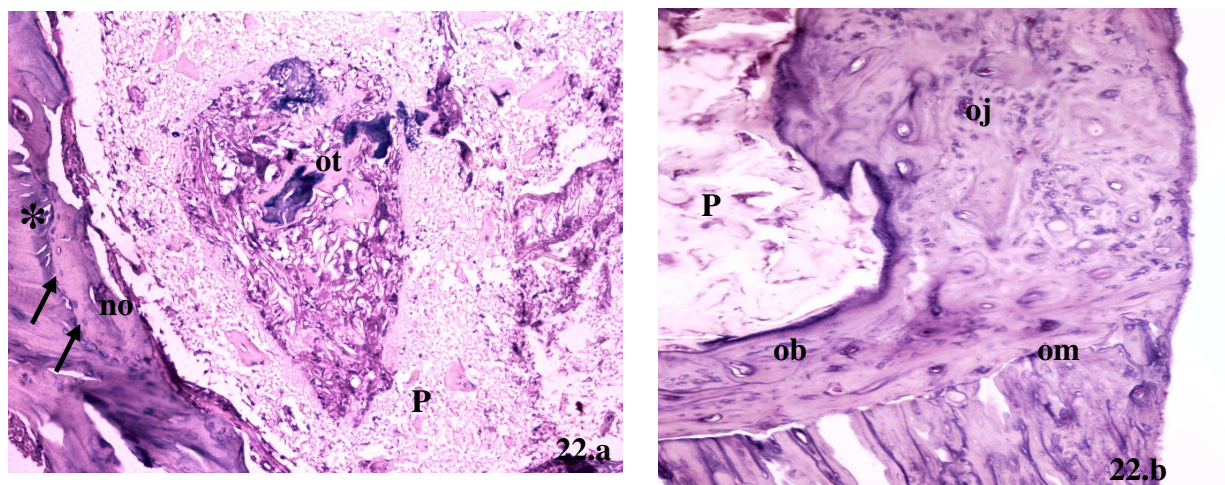


Figura 22 - . Fotomicrografia de um corte transversal de tíbia de rato implantado com blenda de PCL/PLGA, 90 dias pós-cirúrgicos. (a) 70/30 apontando a linha cimentante (**seta**) que está próxima ao polímero (**P**) e junto ao osso preexistente (*). Junto ao polímero nota-se áreas de osteóides (**ot**), 100x; (b) 30/70 nota-se que envolta do polímero (**P**) há a presença de osso misto (osso maduro (**om**) e osso jovem (**oj**)). Observa-se a presença de osteoblastos (**ob**) aprisionado por matriz óssea. 100x. HE.

Segundo Sakar *et al* (2006), um defeito ósseo experimental deve ser tão grande que não ocorra reparo espontâneo, pois só nesta situação o potencial osteogênico do implante, enxerto ou medicamento pode ser considerado real. Instituiu-se o conceito de defeito ósseo de tamanho crítico para minimizar diferenças relacionadas à idade, espécie e sítio anatômico em animais experimentais, padronizando-se os defeitos para possibilitar a comparação dos resultados dos vários estudos.

Segundo Temenoff & Mikos (2000), o processo de remodelação óssea envolve uma sequência de eventos celulares que evoluem desde a agressão propriamente dita, formação do hematoma, iniciação do calo plástico, organização do calo e remodelação.

Nos locais de implante, ou fratura óssea, ocorre hemorragia local, tanto pela lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas. Durante o processo de cicatrização, o coágulo sanguíneo, restos celulares e da matriz são progressivamente removidos pelos macrófagos, e o periósteo e endósteo próximos ao local de implante respondem com uma intensa proliferação celular (Wang *et al.*, 2005). Tal fato que é relatado em nossos experimentos nos períodos de 2, 7 e 15 dias.

Diversos fatores são importantes para obter sucesso na reparação das fraturas, entre eles existem os fatores biomecânicos (excesso de movimentos no foco da fratura), anatômicos (idade, vascularização deficiente, diástase, infecção e outros) e metabólicos (nutrição) (Wang *et al.*, 2006).

É evidente que para haver consolidação se faz fundamental continuidade óssea local; o uso de enxerto ósseo, introduzido no início do século vinte na prática cirúrgica, veio trazer subsídio a consolidação de fratura com grandes defeitos, promovendo a formação de calo precoce através de um processo chamado de substituição invasiva associado ao processo de osteoindução (Cunha, *et al.*, 2005).

Guarniero *et al.*, (2003) observou que o tecido ósseo possui grande potencial regenerativo com capacidade para restaurar completamente sua estrutura e funções originais. Há situações em que os defeitos ósseos não conseguem por si só obter o reparo, aqueles casos em que se fazem necessários o uso de enxertos, para um correto tratamento e bom prognóstico.

Dentre muitos outros campos de pesquisa explorados, não se pode esquecer a importância de diversos fatores que influenciam a reação do organismo à presença de um implante biorreabsorvível. Essa resposta pode ser relacionada ao tamanho e composição do implante bem como o sítio de implantação. A taxa de degradação do polímero e a capacidade do tecido de eliminar os produtos desta degradação são características-chave na reação tecidual ao implante. Se o tecido adjacente não pode eliminar os subprodutos ácidos de um implante que se degrada rapidamente, possivelmente resultará em uma resposta inflamatória ou tóxica (Hutmacher *et al.*, 2004).

A velocidade de degradação de amostras de polímeros biorreabsorvíveis mostra-se variável nos estudos *in vivo* e *in vitro* em função do local e resposta fisiológica ao implante (Lu *et al.*, 2000). Em estudo realizado sobre o efeito da taxa de degradação *in vivo* em arcabouços de PLGA (50/50) e PCL pelo crescimento celular e angiogênese. Sung *et al.*, (2004) 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.

Nas amostras de PCL, apesar do tempo de degradação *in vivo* ser maior comparado às amostras de PLGA, ele é significativamente menor (52 semanas *in vitro* versus 12 semanas *in vivo*) nos ensaios de implante. A degradação das policaprolactonas tem influência significativa da ação enzimática e dos sinais inflamatórios (Nava *et al.*, 2003). De maneira geral, a resposta inflamatória aos implantes é mediada por mudanças na vascularização (vasoconstrição imediata

seguida de vasodilatação) e formação de exsudato rico em mediadores como as prostaglandinas e proteínas C5a, do sistema complemento, que ativam e atraem para o local neutrófilos e macrófagos.

Pineda *et al.*, (2005), implantaram membranas de PLA com poros de vários tamanhos em 15 coelhos para cobrir um largo defeito ósseo de 10mm criado propositadamente. Radiografias pós-implante revelaram um hematoma na região do defeito que foi desaparecendo à medida que a formação de um novo tecido ósseo foi ocorrendo, independentemente do tipo de membrana utilizada. O autor concluiu que a função primária das membranas usadas para cobrir defeitos ósseos é a de preservar componentes osteogênicos presentes no espaço sob a membrana e garantir o crescimento das células na cavidade medular.

As propriedades osteogênicas são características exclusivas referentes a materiais orgânicos ou aos enxertos autógenos nos quais são capazes de estimular o crescimento ósseo, oriundo de células transferidas do interior do enxerto. A neoformação óssea é processada diretamente a partir dos osteoblastos. Nos primeiros três dias após a instalação do enxerto, inicia-se uma intensa atividade celular, quando os capilares podem ser vistos penetrando no enxerto, devido ao processo de angiogênese. O mesmo encontrado nos resultados de 30 dias após implantes das blendas de PCL/PLGA nos dois tratamentos. O estímulo do crescimento ósseo junto ao polímero possivelmente poderá restaurar as estruturas e funções do osso (Wu *et al.*, 2006).

Os resultados de estudos em humanos são muito favoráveis com alguns relatos negativos. Complicações envolvendo implantes ortopédicos biorreabsorvíveis ocorrem normalmente a uma taxa de menos de 10% (El-Amin *et al.*, 2006). Embora inicialmente significantes estes problemas poderão ser solucionados no futuro, graças à intensiva pesquisa na área de implantes biorreabsorvíveis (Middleton & Tipton, 2000).

Na ortopedia, o uso de biomaterial para estimular a osteoindução e/ou osteocondução, no tratamento de fraturas ósseas com perda de substância, é uma prática que ainda está à procura de uma solução adequada. Os diferentes materiais utilizados possuem limitações na sua aplicação, na sua integração com os tecidos vizinhos e na sua resistência e/ou durabilidade (Santos *et al.*, 2004).

A geração de tecido ósseo através do transplante autógeno de células/tecido cultivadas sobre arcabouços tridimensionais de materiais biorreabsorvíveis, os quais são posteriormente

reimplantadas ao tecido lesado correspondem a uma das mais promissoras técnicas da cirurgia ortopédica e engenharia biomédica, esta metodologia, utiliza apenas um número pequeno de células iniciais, as quais serão expandidas *in vitro* com maior benefício ao paciente resultando na eliminação de problemas como grandes extensões de lesão do tecido doador, rejeição imunológica e contaminação (Santos *et al.*, 2001; Ohashi *et al.* 2000; Patrick Jr. & Mikos, 1998).

A cultura de células sobre biomateriais oferece um entendimento bastante simples para o estudo da interação entre células e biomateriais e tem sido usada como importante passo de seleção anterior à experimentação *in vivo* (Wu *et al.*, 2006; Wiedmann-Al-Ahmad *et al.*, 2007). Os osteoblastos e células osteoblásticas são largamente usadas em estudos *in vitro* de biomateriais para o emprego como implantes permanentes em osso e para a engenharia de tecido ósseo (Service, 2000). E, a semeadura de células osteogênicas sobre arcabouços poliméricos pode acelerar exageradamente a regeneração óssea se comparado s com arcabouços sem células, principalmente em implantes em curto prazo (Wang *et al.*, 2007).

Capítulo 5

5.1 Conclusões

- ✓ As análises de microscopia eletrônica dos materiais mostraram que as blendas de PCL/PLGA na composição 30/70 com cultura de osteoblastos possuem a quantidade de poros mais homogênea quando comparados aos seus análogos PCL/PLGA na composição 70/30.
- ✓ A blenda de PCL/PLGA 30/70 com cultura apresentou propriedades mecânicas intermediárias (não tão curtos, e também não muito longos). Materiais com essas especificações são preferenciais para aplicação de enxertos ósseos.
- ✓ Houve uma satisfatória integração do implante com o tecido, o que proporcionou o crescimento de tecido ósseo junto aos implantes. As blendas não apresentaram nenhuma alteração patológica, nem tão pouco rejeição frente ao material implantado.
- ✓ A partir das análises histológicas observou-se que houve diferenças entre as composições da blenda. A blenda de PCL/PLGA 30/70 com cultura de células apresentou um crescimento celular mais intenso quando comparada com as blendas nas composições 70/30 com cultura, 70/30 e 30/ 70 sem cultura de células.

- ✓ Com os resultados apresentados pode-se notar que a blenda de PCL/PLGA 30/70 é a mais indicada para se aplicada como arcabouço tridimensional com cultura de células osteoblásticas para enxerto ósseo, caracterizando assim um método alternativo e promissor na engenharia de tecidos.

5.2 Sugestões para próximos trabalhos

- Análises complementares do estudo *in vitro* da blenda.
- Análise histomorfométrica das lâminas.
- Modificações da superfície das blendas através de tratamentos com plasma e avaliação na cultura de células.
- Cultura de osteoblastos sobre as blendas com marcadores específicos para identificar se o crescimento do neotecido foi proveniente das células implantadas, ou das células osteoprogenitoras.
- Estudo *in vivo* de arcabouços biorreabsorvíveis inoculados com cultura de células de osteoblastos em longo prazo.

Referências Bibliográficas

Agrawal, C. M., McKinney, J. S., Lancot, D., Athanasiou, K. A. Effects of fluid flow on the *in vitro* degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v.21, pp. 2443-2453, 2000.

Agrawal, C.M.; Ray, R.B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 55, n. 2, p. 141-150, 2001.

Almeida P. F., Anbinder A. L, Jaime A. P. G., Lima A. P., Balducci I., Rocha R. F.. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*; 18(1) 7-13 2006.

Ali, S. A. M., Zhong, S. -P., Doherty, P. J., Williams, D. F. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices I. Poly(caprolactone). *Biomaterials*, v.14 (9), pp. 648-656, 1993b.

Ambrose, C. G., Clanton, T. O. Bioabsorbable implants: review of clinical experience in orthopedic surgery. *Annals of Biomedical Engineering*, v.32, pp. 171-177, 2004.

Ambrosio, L.; Savarino, L.; Granchi, D.; Cenni, E.; Baldini, N.; Pagani, S.; Guizzard, S.; Causa, F. and Giunti, A. Osteoblast growth and functions in porous poli ϵ -caprolactone matrices for bone repair : a preliminar study. *Biomaterials*, 23, 3815-3824, 2003.

Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, v.21, p.667-81, 2002.

Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials: Review. *Biomaterials*, v.21, pp. 667-681, 2000.

Arrotéia, K.F.; Pereira, L.A.V. Osteoblastos. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. (Org.) *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Barueri: Manole, p. 40, 2005.

Atala A, Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Research*, v. 7, pp. 15-31, 2004.

Auger, F. A., Berthod, F., Moulin, V., Pouliot, R., Germain, L. Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v.39, pp. 263-275, 2004.

Barbanti, S. H.; Zavaglia, C. A. C. & Duek, E. A. R. - *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15, p.13, 2005.

Barbanti, S. H., Polímeros Bioreabsorvíveis como Arcabouços na Engenharia de Tecidos, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 138 p. *Tese de Doutorado*, 2005.

Barbanti, S. H., Santos Jr., A. R., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. 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, pp. 1315-1321, 2004a.

Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. Efeito da lixiviação do sal em membranas e pinos porosos de polímeros bioreabsorvíveis. In: *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Engenharia de Materiais*, Porto Alegre, CD-ROM, 2004b.

Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. Porous and dense poly(L-lactic acid) membranes: in vitro degradation. *Acta Microscopica*, v.11, (1), pp. 85-89, 2002.

Barbanti, S.H. “Estruturas tridimensionais de poli(ácido láctico) para cultura de células”. *Tese de mestrado* apresentada à faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, 2001.

Beumer, G.J.; Van Blittreswijk, C.A.; Ponec, M. Biocompatibility of a biodegradable matrix used as a skin substitute: An *in vivo* evaluation. *J. Biomed. Mat. Res.* 28: 545-552, 1994.

Boccaccini, A. R., Blaker, J. J., Maquet, V., Day, R. M., Jérôme, R. Preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) and PLGA/Bioglass® composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering*, v.25, pp. 23-31, 2005.

Böstman, O. M., Pihlajamähi, H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*, v.21, pp. 2615-2621, 2000.

Brown, K. M. et al. Effect of COX-2 specific inhibition on fracture-healing in the rat femur. *J. Bone Joint Am.*, 86-A(1), p. 116- 23, 2004.

Cancedda, R.; Mastrogiacomo, M.; Bianchi, G.; Derubeis, A.; Muraglia, A.; Quarto, R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp.* 249:133-43, 2003.

Chen, G., Zhou, P., Mei, N., Chen, X., Shao, Z., Pan, L., Wu, C. Silk fibroin modified porous poly(ϵ -caprolactone) scaffold for human fibroblast culture in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 15, pp. 671-677, 2004.

Ciapetti, G.; Ambrosio, L.; Savarino, L.; Granchi, D.; Cenni, E.; Baldini, N.; Pagani, S.; Guizzardi, S.; Causa, F.; Giunti, A. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials*, v. 24, n. 21, p. 3815-3824, 2003.

Coelho, M. J., Trigo Cabral, A., Fernandes, M. H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in a-MEM and in DMEM. *Biomaterials*, v.21 (11), pp. 1087-1094, 2000.

Coraça, D. C. “Osteointegração de implantes de Poli (L-ácido láctico) PLLA e da blenda Poli (L-ácido láctico) PLLA/Poli (óxido de etileno) PEO na tíbia de ratos” *Dissertação de Mestrado*-UNICAMP-Campinas, 2002.

Coombes, A. G. A., Rizzi, S. C., Williamson, M., Barralet, J. E., Downes, S., Wallace, W.A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*, v.25, pp. 315-325, 2004.

Coppini, L. P.; Duarte, M. A.T.; Lucchesi, C.; Duek, E.A.R. CULTURA DE OSTEOLASTOS SOBRE BLENDA DE PLDLA / PCL TRIOL. *Anais do 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

Cunha, Marcelo R.; Santos Jr., Arnaldo R.; Genari, Selma C. Culture of osteoblasts on polyanionic collagen membranes: a preliminary evaluation of the potential for induction of bone tissue formation aiming for tissue repair. *Bol. Med. Vet. – UNIPINHAL – Espírito Santo do Pinhal - SP*, v. 01, n. 01, jan./dez. 2005.

El-Amin, S.F. et al. Human osteoblast cells: isolation, characterization, and growth on polymers for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.76, n.3, p.439-49, 2006.

Freed, L. E., Marquis, J. C., Nohria, A., Emmanual, J., Mikos, A. G., Langer, R. Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultures on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, pp. 11-23, 1993.

Guan, J., Fujimoto, K. L., Sacks, M. S., Wagner, W. R. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials*, v.26, pp. 3961-3971, 2005.

Guarniero R., Cinagava M. Y., Santana P. J., Batista M. A., Oliveira L. A.A., Rodrigues C. J., Cinagava F. T. Influence of the protein component upon fracture healing: an experimental study in rats. *Acta Ortop Bras* 11(4), 206-210, 2003.

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker, MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-(beta) isoforms. *Plastic Reconstr Surg*, 2000.

Hasirci, V. *et al.* Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. *J Appl Polym Sci* (87):1285, 2003.

Hench L.L., Bioceramics, *J. Amer Ceram Soc*, 81, 1705-28, 1998

Hedberg, E. L., Shih, C. K., Lemoine, J. J., Timmer, M. D., Liebschner, M. A., Jansen, J. A., Mikos, A. G. In Vitro Degradation of Porous Poly(propylene fumarate)/Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) Composite Scaffolds, *Biomaterials*, v.26, pp. 3215-3225, 2005.

Hou, Q., Grijpma, D.W., Feijen, J. Preparation of porous poly(ϵ -caprolactone) structures. *Macromolecules Rapid Communication*, v. 23, pp. 247-252, 2002.

Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, pp. 2529-2543, 2000.

Hutmacher, D. W., Sitter, M., Risbud, M. V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnology*, v.22, pp. 354-362, 2004.

Itälä A. I., Ylänen, H. O., Ekholm, C., Karlsson, K. H., Aro, H. T. Pore diameter of more than 100µm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, v. 58, pp. 679-683, 2001.

Ishaug, S. L., Crane, G. M., Miller, M. J., Yasko, A. W., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.36, p.17-28, 1997a.

Ishaug-Riley, S. L., Crane, G. M., Gurlek, A., Miller, M. J., Yasko, A. W., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.36, pp. 1-8, 1997b.

Ishaug-Riley, S. L., Crane, G. M., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, v.19, pp. 1405-1412, 1998.

Jeong, S. I., Kim, S. H., Kim, Y. H., Jung, Y., Kwon, J. H., Kim, B. S., Lee, Y. M. Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, v.15, pp. 645-660, 2004.

Kellomäki, M., Tormala, P. Processing of resorbable poly-alpha-hydroxy acids for use as tissue-engineering scaffolds. *Methods in Molecular Biology*, v.238, pp. 1-10, 2004.

Kim, H-W., Knowles, J. C., Kim, H-E. Hydroxyapatite/poly(ε-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*, v.25, pp. 1279–1287, 2004.

Langer, R., Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, v.428, pp. 487-492, 2004.

Lewandrowski, K. U. et al. Effect of a poly (propylene fumarate) foaming cement on the healing of bone defects. *Tissue Eng.*, v.5, n. 4, p.305-16, 1999.

Liu, T. V., Bhatia, S. N. Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced Drug Delivery Review*, v.56, p. 1635-1647, 2004.

Lombello CB, Malmonge, SM, Wada, MLF. PolyHEMA and polyHEMApoly(MMA-co-AA) as substrates for culturing Vero cells. *J Mater Sci: Mater Med*, 11:541-6. 2000.

Lu, L., Peter, S. J., Lyden, M. D., Lai, H., Leite, S. M., Tamada, J. A., Vacanti, J. P., Langer, R., Mikos, A. G. *In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*, v.21, pp. 1837-1845, 2000.

Luciano, R. M., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R., Alberto-Rincon, M. C. Synthesis and characterization of poly(L-lactic acid) membranes: studies in vivo and in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.14, pp. 87-94, 2003.

Luciano, R.M. "Efeitos da concentração de plastificante em membranas de poli (ácido láctico) para implantes". *Tese de Doutorado* apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, 2001.

Macedo L.G.S, Macedo N.L., Carvalho Y.R., Gonzalez M.B., Ouchi S.M., Matuda F.S. Regeneração de defeitos ósseos após implantação de duas cerâmicas bioativas. *Pesqui Odontol Bras* 14(supl):21, 2000.

Maquet, V., Jerome, R. Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. *Materials Science Forum*, v.250, pp.15-42, 1997.

Middleton, J. C., Tipton, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, v.21, pp. 2335-2346, 2000.

Mikos, A. G., Temenoff, J. S. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biotechnology*, v.3, (2), pp. 114-119, 2000.

Mikos, A. G. In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds. *Biomaterials*, v. 26, pp.3215-3225, 2005.

Murphy, W. L., Dennis, R. G., Kileny, J. L., Mooney, D. J. Salt fusion: an approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering*, v.8, pp. 43-52, 2002.

Nakagawa, K., Abukawa, H., Shin, M. Y., Terai, H., Troulis, M. J., Vacanti, J. P. Osteoclastogenesis on Tissue-Engineered Bone. *Tissue Engineering*, v.10, pp. 93-100, 2004.

Nava, D., Salom, C., Prolongo, M. G., Masegosa, R. M. Thermal properties and interactions in blends of poly(ϵ -caprolactone) with unsaturated polyester resins. *Journal of Materials Processing Technology*, v. 143, pp. 171–174, 2003.

Ohashi, H., Kobayashi, A., Kadoya, Y., Yamano, Y., Oonishi, H., Iwaki, H. Effect of particles and interfaces conditions on fibrous tissue interposition between bone and implant. A particle challenge model in rabbit. *J. Mater. Science: Mater. In Medicine*, v. 11, p. 255-259, 2000.

Oréface R.L. *et al.* Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: *Cultura Médica*, 2006.

Park, A & Cima, L.G. In vitro cell response to differences in poli-L-lactide crystallinity. *J. Biomed Mater Res.* 31: 117-130, 1996.

Patrick Jr., C.W. & Mikos, A.G. McIntire. Prospectus of tissue engineering. In: Patrick Jr. C. W., Mikos, A. G. McIntire L. V., editors. *Frontiers in tissue engineering*. New York, USA: *Elsevier Science*, p. 3-14, 1998.

Pineda, L.M.; Büsing, M.; Meinig, R.P.; Gogolewski, S.; Bone regeneration with resorbable polymeric membrane. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.31, p. 385-394, 1996. Disponível em: www.sciencedirect.com acesso em novembro 2005.

Rai, B., Teoh, S. H., Hutmacher, D. W., Cao, T., Ho, K. H. Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. *Biomaterials*, v.26, pp. 3739-3748, 2005.

Rezende, C. A.; Luchesi, C.; Barbo, M. L. P.; Duek, E. A. R. Poly(lactide-co-glycolide) membranes as skin repair: in vitro and in vivo degradation. *Polímeros*, vol.15, n. 3, 2005.

Rezende, C. A.; Duek, E. A. R. Poly (lactide-co-glycolide) acid/poly (lactic acid) blends: in vitro degradation. *Polímeros*, vol.13, n. 1, 2003.

Rezwani, K.; Chen, Q.Z.; Blaker; Boccaccini, A. R.; Biodegradable and Bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, v. 27, p. 3413-3431, 2006. Disponível em: www.sciencedirect.com - acesso em abril 2006.

Rhee, S. H. Bone-Like Apatite-Forming Ability and Mechanical Properties of Poly(ϵ -caprolactone)/ silical hybrid as a function of Poly(ϵ -caprolactone) Content. *Biomaterials* v.25 p.1167-1175, 2004.

Rohanizadeh, R.; Swain, M.V.; Mason, R.S. Gelatin sponges (Geofoam[®]) as scaffolds for osteoblast. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, out. 2007.

Santos Jr., A.R.; Ferreira, B.M.P.; Duek, E.A.R.; Dolder, H.; Wada, R.S.; Wada, M.L.F. Differentiation Pattern of Vero Cells Cultured on Poly(L-lactic acid)/ Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Blends. *Artif. Organs*, v. 28, n. 4, p. 381-389, 2004.

Santos Jr., A.R.; Barbanti, S.H.; Duek, E.A.R.; Dolder, H.; Wada, R.S.; Wada, M.L.F. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. *Artif. Organs*, v. 25, n. 1, p. 7-13, 2001.

Sarazin, P., Roy, X., Favis, B.D. Controlled preparation and properties of porous poly(L-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. *Biomaterials*, v.25, pp. 5965-5978, 2004.

Sarkar M.R., Augat P., Shefelbine S.J., Schorlemmer S., Huber-Lang M., Claes L., Kinzl L., Ignatius A. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*, 27 (9), pp. 1817-1823, 2006.

Service, R.F. Tissue engineers build new bone. *Science*, v. 289, 1498-1500, 2000.

Schenk, R.K. Bone regeneration: biologic basis. In: Buser, D; Dahlin, C.; Schenk, R.K. Guided bone regeneration in implant dentistry. *Chicago: Quintessence Books*, p. 49-100, 1994.

Suganuma, J. & Alexandar, H. Biological response of intramedullary bone to poly(L-lactic acid). *J. Appl. Biomater* 4: 13-27, 1993.

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

Tsang, Z. G., Black, R. A., Curran, J. M., Hunt, J. A., Rhodes, N. P., Williams, D. F. Surface properties and biocompatibility os solvet-cast poly[e-caprolactone] films. *Biomaterials*, v.25, pp. 4741-4748, 2004.

Tang, Z.G.; Hunt, J.A. The effect of PLGA doping of poly caprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro. *Biomaterials*, v. 27, n. 25, p. 4409-4418, 2006.

Temenoff, J.S.; Mikos, A.G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, v.21, p.431-440, 2000.

Törmälä, P.; Pohjonen, T.; Rokkanen, P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc. Instn. Mech. Engrs (Part H)* 212: 101-111, 1998.

Van der Elst, M.; Dijkema, A.R.A.; Klein, C.P.A.T.; Patka, P.; Haarman, H.J.Th.M. Tissue reaction on PLLA versus stainless steel interlocking nails for fracture fixation: an animal study. *Biomaterials*, 16: 103-106, 1995.

Vert, M.; Li, M. S.; Spenlehauer, G. & Guerin, P. - *J. Mater. Sci.*, **3**, p.432, 1992.

Von Recum, H.A.; Cleek, R.L.; Eskin, S.G.; Mikos, A.G. Degradation of polydispersed poly(L-lactic acid) to modulate lactic acid release. *Biomaterials* 16: 441-447, 1995.

Yu-Chun, W.; Shyh-Yu, S.; Hong-Ru, L.; Tzer-Min, L.; Chyun-Yu, Y. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials*, v.27, p. 896-904, 2006.

Yuehuei. H. A.; Shane, K. W.; Friedman, R. J. Pre-clinical in vivo evaluations of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*, v. **21**, p. 2635-2652, 2000.

Wang, H.; Yubao, L.; Zuo, Y.; Li, J.; Ma, S.; Cheng, L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 28, n. 22, p. 3338-3348, 2007.

Wang, Z.; Hu, H.; Wang, Y.; Wang, Y.; Wu, Q.; Liu, L.; Chen, G. Fabrication of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) microstructures using soft lithography for scaffold applications. *Biomaterials*, v. 27, n. 12, p. 2550-2557, 2006.

Wang, H.; Gerbaudo, V.H.; Hobbs, L.W.; Spector, M. Quantitation of osteoblast-like cell mineralization on tissue culture polystyrene and Ti-6Al-4V alloy disks by Tc-99m-MDP labeling and imaging in vitro. *Bone*, v. 36, n. 1, p. 84-92, 2005.

Wang, M., Chen, L. J., Weng, J., Yue, C. Y. Manufacture and evaluation of bioactive and biodegradable materials and scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.12, pp. 855-860, 2001.

Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Gellrich Nc, Hubner U, Schmelzeisen R. Growth of human osteoblast-like cells on beta-tricalciumphosphate (TCP) membranes with different structures. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 18, n. 4, p. 551-563, 2007.

Williams, J. M. *et al* Bone tissue engineering using Polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, v.26, p. 4817-4827, 2005.

Willians, D.F. (ed), Definitions in Biomaterials - Progress in Biomedical Engineering, *Elsevier*, v.4, Cap.1, 1987.

Williamson, M. R., Coombes, A. G. A. Gravity spinning of polycaprolactone fibres for applications in tissue engineering. *Biomaterials*, v.25, pp. 459-465, 2004.

Wu, Y-C.; Shaw, S-Y.; Lin, H-R.; Lee, T-M.; Yang, C-Y. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials*, v. 27, n. 6, p. 896-904, 2006.