

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOCOMPATIBILIDADE DO BIOPOLÍMERO PLA E BLENDAS
PLA/PCL EM RATOS WISTAR**

Gabriel Conde

Médico Veterinário

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOCOMPATIBILIDADE DO BIOPOLÍMERO PLA E BLENDAS
PLA/PCL EM RATOS WISTAR**

Gabriel Conde

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

Coorientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Clínica Médica Veterinária

2019

C745b Conde, Gabriel
Biocompatibilidade do biopolímero PLA e blenda PLA/PCL em
ratos Wistar / Gabriel Conde. -- Jaboticabal, 2019
69 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Guilherme de Camargo Ferraz
Coorientadora: Paola Castro Moraes

1. Biossegurança. 2. Biodegradação. 3. Poli(ácido lático). 4.
Poli(-caprolactona). 5. Compatibilizante. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BIOCOMPATIBILIDADE DO BIOPOLÍMERO PLA E BLENDAS PLA/PCL EM RATOS WISTAR

AUTOR: GABRIEL CONDE


ORIENTADOR: GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

COORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCELO APARECIDO CHINELLATTO
Departamento de Engenharia de Materiais-USP / São Carlos/SP



Prof. Dr. PAULO ALEÁCIO CANOLA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 22 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriel Conde nasceu na cidade de Araraquara, no dia 19 de novembro de 1987, filho de Silvana Conde e Carlos Alberto Melli. Realizou sua graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP, campus Luiz Meneguel, Bandeirantes-PR, concluindo-a em julho de 2013. Foi bolsista pela Fundação Araucária (2012-2013), desenvolvendo projeto intitulado: Tamanho do útero e indução de ciclicidade ovariana em novilhas nelore pré-púberes tratadas com progesterona, sob orientação do Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros. Realizou estágio curricular na empresa In Vitro Brasil S/A. Na mesma empresa foi bolsista TT3 FAPESP no programa PIPE (2013-2014), desenvolvendo projeto intitulado: Desenvolvimento de ferramentas genômicas para a seleção de vacas com alta fertilidade. Em 2014 ingressou como funcionário da mesma empresa desenvolvendo atividades de avaliação ginecológica, protocolo hormonal, diagnóstico gestacional, sexagem fetal e transferência de embriões em tempo fixo. Atuou em grandes projetos no Brasil, projeto Marfrig+ e na Rússia. Em março de 2017 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/Unesp Câmpus de Jaboticabal, na área de Clínica Médica Veterinária como bolsista CNPq, sob orientação do Prof. Guilherme de Camargo Ferraz.

“Depois de algum tempo você aprende que, ou você controla seus atos, ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco, ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem, pelo menos, dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências. Aprende que paciência requer muita prática”.

William Shakespeare

Dedico este trabalho a Stela Basso Montoro por toda compreensão nos momentos de ausência, ensinamentos e ajuda. Não só na dissertação, mas por ser minha companheira nesses 12 anos juntos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos animais.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a pós-graduação da FCAV- Unesp pela concessão de bolsa de mestrado para a execução do projeto (Processo nº 133120/2017-1, CNPq).

Agradeço a minha querida mãe Silvana Conde por nunca ter poupado esforços para me proporcionar tudo o que há de melhor, possibilitando minha formação pessoal e profissional. Ao meu irmão Bruno Conde que sempre me apoiou e sempre esteve ao meu lado em todas as minhas decisões. Amo vocês!

À minha família, que me ensinou que, trabalhar com dedicação e responsabilidade, trazem bons frutos. Compreendeu meus momentos de ausência quando trabalhava na iniciativa privada e participou de todas as etapas da minha vida. Nunca me deixaram desistir diante de inúmeros obstáculos, me aconselharam nos momentos difíceis, e sempre me deram toda a estrutura possível para eu alcançar todos os meus objetivos. Obrigado por acreditarem e apostarem em mim.

Rui Laurini, Eliana Laurini, Alexandre Laurini, Bruna Laurini e Carla Laurini, estamos juntos há mais de 20 anos e sempre estaremos. Ao longo deste tempo vocês me deram todo o suporte para seguir e chegar até aqui. Não existem palavras para agradecer. Vocês são incríveis, amo vocês!

Elvio Castanho, Lucilene Castanharo, Carla Castanho, Eduardo Castanho e Mayara Castanharo, pelos mais de 20 anos de amizade. Nesse tempo sempre me apoiaram em tudo que fiz, o que possibilitou chegar até aqui. Não tenho palavras pra agradecer a tantos momentos incríveis que sempre passamos e passaremos. Amo vocês!

A Rolando Montoro, Rosangela Montoro, Victor Montoro, Milena Montoro, Rafaela Perone, Bruno Perone, Manuela Perone, por terem me acolhido. Hoje somos uma família! Muito obrigado por toda ajuda e ensinamentos, por me fazerem crescer e me apoiarem nas minhas escolhas.

Aos Lafequianos, Maria Luiza (Malú), Mayara Gonçalves Fonseca, Juliana Cerqueira (Jú), Walter Feringer, Inaê Regatieri, Lucas Catananti, Fernanda Pigossi, Naila Osti, Patricia Testa, Patricia Sitta, Manoela Macedo, Marina Lansarini. Vocês

foram importantíssimos nessa etapa. Agradeço toda ajuda no meu experimento, aprendizado profissional e a amizade de vocês. Tenho muito orgulho de ter feito parte dessa equipe!

Aos amigos do grupo ETCO, Pedro Trindade, Karen Camille, Suelen Scheibel, Victor Brusin (Bixete), muito obrigado por tantos momentos bons de conversas, risadas e trabalhos. Vocês foram fundamentais no meu aprendizado.

Aos meus irmãos da Rep. Colina Verde, parte importantíssima do meu crescimento pessoal e profissional. Desde a época de república em Bandeirantes até hoje. Não deixamos de manter contato e sempre que podemos nos reunimos. Vocês são parte fundamental da minha vida.

Aos amigos da Rep. Mata bixera, muito obrigado por dias de conversa jogada fora, jantãs, truço e principalmente pela amizade e acolhimento para comigo.

Agradeço a todos os funcionários da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV Unesp, por se preocuparem em proporcionar o melhor para que possamos realizar nossas atividades de forma mais fácil.

Euclides (Cride), Damaris, Rodrigo, agradeço a amizade de vocês, as conversas, os ensinamentos e toda ajuda para que esse trabalho fosse concluído. Vocês são demais!!!!

Aos Professores da FCAV-Unesp, por se preocuparem não só em nos ensinar, mas se preocuparem em sermos cada vez mais humanos. Admiro a cada um de vocês!

Á Júlia Carvalho (Mojada), agradeço por esses dois anos em que aprendi muito com você. Obrigado por dividir comigo momentos tão importantes para minha vida e formação. Por me ajudar com meu experimento e permitir que ajudasse no seu experimento. Mais que contemporâneos de mestrado, amigos!!

Juliana Ribeiro (Xuxu), Gabriel Montanhim, Nathan Cruz, Fernanda Martinato, agradeço pela amizade. Os conselhos, as conversas, todo ensinamento e ajuda que me proporcionaram.

Agradeço a Paula Dias por toda ajuda com os biomateriais, as dúvidas que surgiam, e principalmente a amizade. Muito obrigado.

A Henriette Moranza (Tre), muito obrigado por me ajudar prontamente. Por sermos mais que amigos, irmãos. Os conselhos, as risadas, a ajuda a escrever meu

primeiro artigo. A todos os momentos bons e ruins que passamos juntos. Obrigado por me trazer até aqui para conversar com o Prof. Guilherme e ajudar a realizar um sonho. Muito obrigado.

Ao Guilherme Seber (Jack), obrigado por todas as boas conversas, risadas e por sempre estar disposto a ajudar e explicar (se preciso até desenhar). Obrigado por sempre se preocupar, pelos conselhos e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Aparecido Chinelatto por abrir as portas do seu laboratório e nos ajudar cedendo os biomateriais utilizados nessa pesquisa, e principalmente com confiar em mim. Muito obrigado!

A minha coorientadora Profa. Dra. Paola Castro Moraes que sempre me ajudou a entender e buscar saídas para os entraves que o trabalho nos proporciona, e principalmente pela amizade e por acreditar em mim. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, meu orientador. Não tenho como agradecer por ter acreditado em mim e aberto as portas da FCAV-Unesp. Por todos os conselhos e ajuda que me deu ao longo destes três anos. Por permitir que eu fizesse parte Lafeq. Serão momentos inesquecíveis na minha vida. Você me ajudou a realizar um sonho. Serei eternamente grato a você por acreditar e confiar no meu potencial. Muito obrigado.

Por último e não menos importante, Stela Basso Montoro, pessoa incrível que divide sua vida comigo há 11 anos. Me ensinou e me ensina todo dia com seu jeito enérgico de ser e sempre incisiva. Me espelho na sua competência e força de vontade. O seu apoio foi fundamental para que hoje eu chegasse aqui. É difícil colocar em poucas palavras tudo o que sinto. A minha admiração por você aumenta a cada dia como pessoa e profissional. Muito obrigado por fazer parte da minha vida, e me fazer melhorar a cada dia. Muito obrigado, te amo!

Se esqueci de alguém me perdoem. Agradeço imensamente a todos vocês por fazerem parte de mais uma importante etapa da minha vida pessoal e profissional.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
BIOCOMPATIBILIDADE DO BIOPOLÍMERO PLA E BLEND PLA/PCL EM RATOS WISTAR	iv
RESUMO	iv
BIOCOMPATIBILITY OF BIOPOLYMERS PLA AND BLEND PLA / PCL IN WISTAR RATS	v
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Polímeros Biodegradáveis	4
2.1.1 Poli (ácido láctico) (PLA).....	5
2.1.2 Poli (ϵ -caprolactona) (PCL)	7
2.1.3 Blendas poliméricas	8
2.3 Avaliações indiretas de inflamação	11
2.3.1 Testes comportamentais	11
2.3.2 Filamentos de Von Frey	11
3. REFERENCIAS	12
Capítulo 2 - Avaliação da biosegurança e comportamento de ratos Wistar submetidos ao implante de poli (ácido láctico) e blenda poli (ácido láctico) / (ϵ-caprolactona)¹	20
1. Introdução	20
2. Material e Métodos	22
3. Resultados	31
4. Discussão	41
5. Conclusão	44
6. Referencias	44

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS




CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de biocompatibilidade de biopolímeros em ratos Wistar", protocolo nº 2924/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 02 de março de 2017.

Vigência do Projeto	06/03/2017 a 01/08/2018
Espécie / Linhagem	Rato heterogênico (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar
Nº de animais	160
Peso / Idade	120 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Unesp de Botucatu.

Jaboticabal, 02 de março de 2017.



Profª Drª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação inflamatória do sítio de aplicação de LPS utilizando termografia infravermelha**", protocolo nº 02823/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 08 de março de 2018.

Vigência do Projeto	18/04/2018 a 18/05/2018
Espécie / Linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> Linhagem Wistar
Nº de animais	12
Peso / Idade	300 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Unesp Botucatu

Jaboticabal, 08 de março de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
 Coordenadora – CEUA

BIOCOMPATIBILIDADE DO BIOPOLÍMERO PLA E BLENDAS PLA/PCL EM RATOS WISTAR

RESUMO- A descoberta de polímeros biodegradáveis influenciou a pesquisa biomédica. O poli (ácido lático) (PLA) e a Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e suas blends se tornaram foco de vários estudos por serem biodegradáveis e biorreabsorvíveis, particularmente em pesquisas envolvendo a implantação *in vivo*. Pelo presente, objetivou-se avaliar se o implante subcutâneo (SC) e intraperitoneal (IP) de PLA ou blendas PLA/ PCL são seguros, biocompatíveis e biodegradáveis em ratos machos Wistar. Os ratos foram distribuídos em cinco grupos avaliados em duas fases; aguda: -1, 1, 2, 7 e 14 dias e crônica: 2, 8 e 24 semanas após a implantação. Assim, estudaram-se os grupos PLA (PLA puro), PLA/PCL (mistura PLA/PCL), instrumentado (GI), controle (C) e grupo controle inflamatório (CI). Para avaliar a biocompatibilidade utilizou-se teste comportamental de campo aberto (CA), filamentos de von Frey (FvF) e análises histopatológicas utilizando coloração de hematoxilina-eosina (HE) e picrossirius-hematoxilina (PSH). A biodegradação *in vivo* e degradação *in vitro* em solução de PBS a 37°C do PLA e PLA/PCL foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As comparações foram realizadas entre os grupos subdivididos conforme a implantação IP e SC. No teste CA, realizado dois dias após a implantação, o grupo CI demonstrou redução nas frequências de locomoção e levantar e aumento na frequência de *grooming* em relação aos grupos implantados PLA, PLA/PCL, GI pela via IP ou SC e grupo C. As avaliações de FvF não diferiram entre os grupos. A avaliação macroscópica revelou não aderência de alguns biomateriais no omento. Observou-se cápsula mais delgada em torno do PLA ou PLA/PCL implantados IP e espessamento da cápsula nas implantações SC no momento 24 semanas. A análise PSH revelou que o PLA ou PLA/PCL, implantados IP, apresentaram maior grau de agregação e compacidade das fibras de colágeno tipo I no momento 24 semanas. As implantações IP apresentaram infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal. As implantações SC infiltrado mononuclear difuso. Ambas apresentaram neovascularização. Nos momentos 8 e 24 semanas observou-se fagocitose do PLA ou PLA/PCL nos polos da cápsula pela via IP e SC. As micrografias de MEV revelaram maior intensidade de degradação da blenda PLA/PCL quando implantados pela via IP e SC. O PLA implantado IP apresenta maior intensidade de biodegradação em relação ao PLA pela via SC. Assim, a blenda PLA/PCL apresentou características de biocompatibilidade e biodegradação promissoras possuindo potencial para ser utilizada nas áreas biomédicas e veterinárias.

Palavras-chave: Biossegurança, Biodegradação, Biomateriais, Compatibilizante, inflamação, Poli(ácido lático), Poli(ϵ -caprolactona)

BIOCOMPATIBILITY OF BIOPOLYMERS PLA AND BLEND PLA / PCL IN WISTAR RATS

ABSTRACT- The discovery of biodegradable polymers influenced biomedical research. Poly (lactic acid) (PLA) and poly (ϵ -caprolactone) (PCL) and their blends have become the focus of several studies because they are biodegradable and bioreabsorbable, particularly in research involving implantation *in vivo*. The aim of this study was to evaluate whether the subcutaneous (SC) and intraperitoneal (IP) implantation of PLA or PLA / PCL blends are safe, biocompatible and biodegradable in male Wistar rats. The rats were distributed in five groups evaluated in two phases; acute: -1, 1, 2, 7 and 14 days and chronic: 2, 8 and 24 weeks after implantation. Thus, we studied whether the groups PLA (pure PLA), PLA / PCL (PLA / PCL mixture), sham (S), control (C) and inflammatory control group (IC). To evaluate the biocompatibility, the open field behavioral test (OF), von Frey filaments (FvF) and histopathological analyzes using hematoxylin-eosin (HE) staining and picrosirius-hematoxylin (PSH) were used. *In vivo* biodegradation and degradation *in vitro* in PBS solution at 37°C of PLA and PLA / PCL were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The comparisons were made between groups subdivided according to the IP and SC implementation. In the OF test, performed two days after implantation, the IC group demonstrated a reduction in the locomotion frequencies and augmentation and increase in the grooming frequency in relation to the PLA, PLA / PCL, sham implanted groups via IP or SC and C groups. FvF scores did not differ between groups. The macroscopic evaluation revealed no adherence of some biomaterials in the omentum. We found a thinner capsule around the PLA or PLA / PCL implanted IP and capsule thickening in the SC deployments at the time 24 weeks. PSH analysis revealed that the PLA or PLA / PCL, implanted IP, had a higher degree of aggregation and compactness of the type I collagen fibers at the moment 24 weeks. The IP implantations presented focal lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate. The SC infiltrates diffuse mononuclear infiltrates. Both had neovascularization. At 8 and 24 weeks, phagocytosis of PLA or PLA / PCL was observed at the capsule poles via IP and SC. SEM micrographs revealed higher degradation intensity of the PLA / PCL blends when implanted via the IP and SC pathway. The IP implanted PLA has a higher biodegradation intensity compared to PLA by the SC pathway. Thus, the PLA / PCL blends presented promising biocompatibility and biodegradation characteristics having the potential to be used in the biomedical and veterinary areas.

Keywords: Biosafety, Biodegradation, Biomaterials, Compatibilizer, inflammation, Poly (lactic acid), Poly (ϵ -caprolactone)

LISTA DE ABREVIATURAS

PLA - Poli (ácido láctico)

PCL - Poli (ϵ -caprolactona)

PLA/ PCL – Blenda compatibilizada

CT- Copolímero

ABA – Copolímero *triblock ϵ -caprolactona-tetra-hidrofurano- ϵ -caprolactona*

L/D - Razão entre comprimento de rosca e diâmetro de rosca

RPM – Rotações por minuto

N.m – Newton metro

IP – Intraperitoneal

SC – Subcutâneo

IN – Implante negativo

CI- Controle inflamatório

LPS – Lipopolissacarídeo

mg.kg⁻¹ – Miligramas por quilo grama

μ g.mL⁻¹ – Microgramas por mililitros

CA – Teste de campo aberto

MEV – Microscopia eletrônica de Varredura

°C – graus Celsius

Kv – Kilovolt

FVF – Filamentos de von Frey

HE – Hematoxilina e Eosina

PSH- Picrossirius Hematoxilina

mL – Mililitros

NaClO – Hipoclorito de sódio

PBS – Tampão fosfato salino

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mediana (min-máx) dos escores de pontuação utilizados para classificação das variáveis cápsula e infiltrado inflamatório analisadas por microscopia óptica dos polímeros PLA e PLA/PCL nos momentos 2, 8 e 24 semanas após implantação intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC).....	34
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 2.

- Figura 1.** Fluxograma dos momentos de avaliação dos grupos C = controle; GI = grupo instrumentado; PLA = Poli (ácido láctico) puro implantados pela via intraperitoneal (IP) e subcutâneo (SC); PLA/PCL = blenda PLA/PCL contém 71.43% (m/m) de Poli(ácido láctico); 23.81% (m/m) de Poli(ϵ -caprolactona) e 4.76% (m/m) compatibilizante implantados pela via intraperitoneal (IP) e subcutâneo (SC). Teste de filamentos de von Frey foram realizados no dia (-1) antes da implantação; 1, 7 e 14 após a implantação. Teste comportamental de campo aberto (CA) foi realizado 2 dias pós-implantação. Foram realizadas avaliações histológicas em 2, 8 e 24 semanas dos grupos GI, PLA e PLA/PCL. A biodegradação *in vivo* do PLA e PLA/PCL foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em 2, 8 e 24 semanas pós-implantação.....26
- Figura 2.** Implantação de biopolímeros PLA ou blenda PLA/PCL em ratos Wistar. (A) Área anatômica relativa a celiotomia mediana ventral pré-retro umbilical com 2,0 cm de comprimento para implantação intraperitoneal. (B) Área anatômica relativa a incisão com 2,0 cm de comprimento, seguida de divulsão do subcutâneo, entre o quinto e oitavo espaço intercostal para implantação subcutânea.....27
- Figura 3.** Teste comportamental de CA em ratos Wistar 2 dias pós-implantação de biomateriais. Em A: Frequência de locomoção IP. Em B: Frequência de levantar IP. Em C: Frequência de *grooming* IP. Em D: Frequência de locomoção SC. Em E: Frequência de levantar SC. Em F: Frequência de *grooming* SC. Resultados apresentados como Média \pm DP. # revela diferença entre IC vs PLA. *demostram diferença entre grupos no teste de CA ($P < 0,05$). Poli(ácido láctico) puro, ($n = 27$ IP) ($n = 27$ SC); PLA/ PCL = blendas PLA / PCL contém 71.43% (m/m) de Poli(ácido láctico); 23.81% (m/m) de Poli(ϵ -caprolactona) e 4.76% (m/m) compatibilizante, ($n = 27$ IP) ($n = 27$ SC); GI= Grupo instrumentado, ($n = 18$ IP) ($n = 18$ SC); Controle, ($n = 9$ IP) ($n = 9$ SC); CI = Controle inflamatório, ($n = 12$).....31

Figura 4. Testes dos filamentos de von Frey realizados em ratos Wistar pós-implantação de biomaterial. Em A: Grupos implantados por via intraperitoneal. Em B: Grupos implantados por via subcutânea. Resultados apresentados como Média \pm DP da força em (g), dia -1 pré-implantação, 1, 7 e 14 pós-implantação. Poli(ácido láctico) puro, ($n = 27$ IP) ($n = 27$ SC); PLA/PCL = blendas PLA / PCL contém 71.43% (m/m) de Poli(ácido láctico); 23.81% (m/m) de Poli(ϵ -caprolactona) e 4.76% (m/m) compatibilizante, ($n = 27$ IP) ($n = 27$ SC); GI= Grupo instrumentado, ($n = 18$ IP) ($n = 18$ SC); Controle, ($n = 9$ IP) ($n = 9$ SC).....32

Figura 5. Fotomicrografias de omento (A, B, C) e pele (D, E, F) de ratos submetidos a implantação de PLA puro corados com o método da Hematoxilina-eosina analisados sob microscopia óptica. Duas semanas pós-implantação IP(A) e SC(D). Discreto infiltrado inflamatório (setas vermelhas) adjacentes a cápsula fibrótica (ca) e vasos sanguíneos na cápsula (neovascularização) em omento e tecido cutâneo com aumento de diâmetro (setas azuis). (*) região de localização do polímero (barra=50 μ m). Oito semanas pós-implantação IP (B) e SC(E). Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos (seta verde) e projeções citoplasmáticas no polímero (seta preta), células gigantes multinucleadas envolvendo o polímero (seta amarela). (*) região de localização do polímero (barra=20 μ m). 24 semanas pós-implantação IP(C) e SC(F). Cápsula fibrótica (ca) com presença de células gigantes multinucleadas envolvendo o polímero e projeções citoplasmáticas dos macrófagos envolvendo o polímero (seta preta). (*) região de localização do polímero (barra=20 μ m)35

Figura 6. Fotomicrografias de omento (A, B, C) e pele (D, E, F) de ratos submetidos a implantação de blenda PLA/PCL corados com o método da Hematoxilina-eosina analisados sob microscopia óptica. Duas semanas pós-implantação IP(A) e SC(D). Discreto infiltrado inflamatório (setas vermelhas) no omento e adjacentes a cápsula fibrótica (ca) e vasos sanguíneos na cápsula (neovascularização), em omento com aumento de diâmetro (setas azuis). (*) região de localização do polímero (barra=20 μ m). Oito semanas pós-implantação IP (B) e SC(E). Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos (seta verde) e projeções citoplasmáticas no polímero (seta preta), células gigantes multinucleadas envolvendo o polímero (seta amarela). (*) região de localização do polímero (B; barra=50 μ m; E; barra=20 μ m). 24 semanas pós-implantação IP(C) Cápsula fibrótica com presença de células gigantes multinucleadas envolvendo o polímero (seta amarela) e projeções citoplasmáticas dos macrófagos envolvendo o polímero (seta preta). SC(F). Área focal de crescimento celular com células gigantes multinucleadas fagocitando polímero. (*) região de localização do polímero (barra=20 μ m)36

Figura 7. Fotomicrografias dos cortes histológicos de pele (colunas à esquerda) e de omento (colunas à direita) de ratos Wistar submetidos a implantação de PLA e blenda PLA/PCL corados com o método da Picrossírius-Hematoxilina analisados sob luz policromática (PSH) e sob luz polarizada (PSH-pol). As fibras de colágeno são visíveis em vermelho na luz policromática e apresentam birrefringência e dicroísmo sob o plano de luz polarizada. O comportamento de deposição fibrilar em torno dos diferentes biopolímeros são semelhantes, visualizando um padrão de maior compactação e de maior agregação fibrilar do colágeno nos maiores tempos de implantação dos biopolímeros. (*) região de localização do biopolímero; colágeno (co); vaso sanguíneo (vs); fibras musculares (fm) e tecido adiposo (ta).....38

Figura 8. Morfologia de fraturas criogênicas do PLA e blenda PLA/PCL pós-implantação intraperitoneal e subcutâneo em ratos Wistar e degradadas *in vitro*. Observada por meio de microscopia eletrônica de varredura (x500). PLA intraperitoneal (A, B, C). (A) 2 semanas; (B) 8 semanas; (C) 24 semanas. Blenda PLA/PCL intraperitoneal (D, E, F). (D) 2 semanas; (E) 8 semanas; (F) 24 semanas. PLA subcutâneo (G, H, I). (G) 2 semanas; (H) 8 semanas; (I) 24 semanas. Blenda PLA/PCL subcutâneo (J, K, L). (J) 2 semanas; (K) 8 semanas; (L) 24 semanas. PLA *in vitro* (M, N, O). (M) 2 semanas; (N) 8 semanas; (O) 24 semanas. Blenda PLA/PCL *in vitro* (P, Q, R). (P) 2 semanas; (Q) 8 semanas; (R) 24 semanas.....40

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Estudos pré-clínicos sobre dispositivos biológicos e inovadores, obtidos a partir de fontes renováveis e não renováveis, necessitam da conjunção de diferentes áreas do conhecimento (John et al., 2009; Nampoothiri et al., 2010; Sacchetin et al., 2016). Polímeros obtidos por meio de microrganismos fermentadores, a partir de fontes renováveis, como o amido, podem ser classificados como biopolímeros. Esses biopolímeros sofrem degradação e biodegradação, como por exemplo o Poli (ácido láctico) (PLA), apresentando diversas possibilidades de utilização (Shah et al., 2008; Nampoothiri et al., 2010; Castro-Aguirre et al., 2016). Polímeros produzidos a partir de fontes não renováveis (petróleo) como a Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) são suscetíveis a degradação e biodegradação (Labet e Thielemans, 2009).

Os termos degradação e biodegradação equivalem a mecanismos de quebra das estruturas químicas por ação hidrolítica e/ou enzimática. A degradação é feita por meio de testes *in vitro* que pode ser atingida por meio de reações químicas. Em contrapartida, condições experimentais que se assemelham a processos vivos e fisiológicos, semelhantes aos fluidos corporais ou atividade biológica, são comumente conhecidos como biodegradação. Ademais, o termo biodegradável pode ser aplicado à biomateriais que são degradados em dióxido de carbono, metano, água, compostos inorgânicos e biomassa (Vert, 2009; Silva et al., 2018).

A assimilação ou eliminação dos subprodutos da biodegradação *in vivo*, independentemente da via, ou seja, inalatória, renal ou inserção em processos bioquímicos, podem ser classificadas como bioreabsorção. (Labet e Thielemans, 2009; Malikmammadov et al., 2018). Não causar toxicidade no paciente ou reação imunológica exacerbada, sendo capaz interagir com tecido em que é implantado, denomina-se biocompatível (Ramot et al., 2018). Desta forma, polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e bioreabsorvíveis produzidos com o propósito de interagir *in vivo* para tratamento, substituição de tecido, função do corpo em

aplicações específicas, são classificados como biomateriais (Labet e Thielemans, 2009).

A possibilidade de inovação na área biomédica utilizando esses biomateriais, conduziu pesquisas para desenvolvimento de sutura (Cutright e Hunsuck, 1971), materiais de fixação óssea (McGovern et al., 2018), microesferas carreadoras de fármacos (Kastellorizios et al., 2015) e na engenharia de tecidos (Blackstone et al., 2018).

Ao vislumbrar a gama de aplicações que tais materiais possuem, é notório que pesquisas científicas na Medicina Veterinária busquem soluções para certos efeitos adversos provocados pela administração de medicamentos e vacinas. Melo et al. (2015) realizaram levantamento com 490 bovinos, sendo observado prevalência alta de abscesso vacinal na região cervical (81,57%), acarretando desconforto e perdas econômicas. Ademais, tratamentos prolongados com fármacos, como por exemplo, administração de corticosteroides para tratamento de hidrocefalia em cães e gatos, a cada 6 h, durante 2-4 semanas, (Neves et al., 2010) exigem dedicação integral do tutor que, por vezes, pode acarretar redução da eficácia do protocolo terapêutico. Assim, possíveis dispositivos para administração subcutânea e liberação de medicamentos em médio ou longo prazos podem favorecer a obtenção da meta terapêutica.

Os biomateriais possuem potencial para substituir o nylon, na forma de dispositivo auto-travante (“abraçadeiras”) (Höglund et al., 2013), reduzindo complicações causadas pelo uso deste material em castrações (Mesquita et al., 2015). Adicionalmente, biopolímeros apresentam-se como alternativa, pois podem ser implantados após a conjugação com hormônios (Gök et al., 2016), antibióticos (Calliess et al., 2016), antígenos para servirem como veículos vacinais (Kavanagh et al., 2013) e fármacos (Kastellorizios et al., 2015).

O estudo sobre biocompatibilidade e biossegurança utilizando biomateriais envolve áreas do conhecimento distintas como as ciências da vida, de materiais e engenharia. Um dos objetivos da engenharia de tecidos é desenvolver substitutos biotecnológicos que restaurem, conservem ou melhorem as funções teciduais (Chen et al., 2013). Dispositivos produzidos a partir de biomateriais, ao serem implantados, estimulam o influxo de macrófagos, polimorfonucleares e fibroblastos (Anderson et al.,

2008). Essas interações entre células inflamatórias e imunológicas com a superfície do material influenciam o processo de reparo e regeneração tecidual à medida que os biomateriais sofrem degradação contínua em moléculas menores sendo absorvidas pelo organismo (Williams, 2008; Rambo et al., 2008).

Os primeiros biopolímeros terapêuticos comercialmente disponíveis foram suturas cirúrgicas, desenvolvidas a partir de ácido glicólico e ácido lático, conhecidos como "suturas absorvíveis" (Shalaby e Burg, 2003). Nesse contexto, a utilização dos biomateriais se tornou mais evidente, o PLA, o Poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) (Onuma e Serruys, 2011) e polímeros sintéticos como a PCL, foram alvo de pesquisas biotecnológicas, como alternativas aos materiais biocompatíveis (metálicos ou cerâmicos) não biodegradáveis (Lasprilla et al., 2012). Entretanto, propriedades mecânicas indesejadas limitam sua utilização, como por exemplo, o PLA. Com a finalidade de reduzir essas limitações mecânicas, faz-se misturas físicas entre biomateriais conhecida como blenda. É recurso economicamente viável para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos (Orefice et al., 2004; Finotti et al., 2017).

Essas informações reforçam a importância da utilização do PLA e da PCL na pesquisa médica por serem biomateriais versáteis e biodegradáveis, abrindo leque de oportunidades para desenvolvimento de pesquisas científicas e para elaboração de novos dispositivos biológicos que favoreçam aos pacientes melhor condição de vida e facilidade em tratamentos. Sendo assim, pesquisas multidisciplinares, envolvendo as áreas de engenharia de materiais e médica são necessárias, com o intuito de conhecer a segurança, a toxicidade e a biocompatibilidade de biopolímeros e blends constituídos por PLA e PCL. Nesse contexto objetivou-se avaliar a biossegurança, biocompatibilidade e biodegradação aguda e crônica do PLA puro ou da blenda PLA/PCL implantadas no subcutâneo ou pela via intraperitoneal de ratos Wistar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polímeros Biodegradáveis

Grande variedade de polímeros sintéticos à base de petróleo é produzida em todo mundo e aproximadamente 140 milhões de toneladas por ano são introduzidas no ecossistema, e quando descartado inadequadamente causam impacto ambiental. Estabilidade e durabilidade destes polímeros foram melhoradas, modificando esse grupo de materiais a serem resistentes as influências ambientais (Shah et al., 2008) e microrganismos, resultando em longo período de degradação. Como alternativa, os polímeros biodegradáveis tem sido alvo de pesquisas com a finalidade de substituí-los, pois sofrem degradação em curtos períodos de tempo no ambiente e biodegradação por microrganismos (Armentano et al., 2013; Castro-Aguirre et al., 2016).

O PLA e a PCL pertencem a classe alifática dos polímeros, sendo que a biodegradabilidade está relacionada a estrutura química do material e não apenas das matérias-primas utilizadas para a sua produção. Nesse âmbito, os polímeros biodegradáveis são produzidos a partir de substratos naturais ou sintéticos (Nampoothiri et al., 2010). Características tais como biodegradação, biocompatibilidade e bioreabsorção impulsionaram pesquisas em diversas áreas. Em ortopedia, arcabouços produzidos a partir de PLA e PCL foram desenvolvidos para auxiliar a regeneração de ossos longos. Em fraturas onde há perda de massa óssea, os arcabouços são implantados e fixados a mesma placa metálica que dará sustentação ao osso fraturado. Ainda, podem ser utilizados como guia para crescimento ósseo, reduzindo o tempo de recuperação e consolidação da fratura (McGovern et al., 2018).

Nas áreas biomédicas os biomateriais tem sido amplamente pesquisados por possuírem propriedades mecânicas que permitem serem moldados e utilizados em diversos formatos como, suporte para o reparo de neuropatias periféricas (Sun et al., 2006) e da medula espinhal (Patist et al, 2004), parafusos bioabsorvíveis (Felfel et al., 2013), “stents” coronarianos (Buscemi et al., 2017), procedimentos odontológicos (Gentile et al., 2011) e enxerto de pele (Blackstone et al., 2018).

Ao serem aplicados em locais diferentes do corpo, a resposta inflamatória e a taxa de degradação dos biopolímeros biorreabsorvíveis é determinada por alguns fatores. Entre eles, destacam-se o local de implante, a tensão mecânica, a massa molar, a composição química estereoisométrica, a cristalinidade e a morfologia que resulta do tamanho e geometria do suporte desenvolvido, a porosidade e a rugosidade da superfície (Barbanti et al., 2005). Do ponto de vista químico, considera-se que cinco estágios pós-implantação que culminam na bioreabsorção.

De modo geral, os biomateriais são relativamente hidrofóbicos. Devido ao ácido carboxílico, a cadeia polimérica passa a ser hidrofílica. A primeira fase da bioabsorção é a hidratação do polímero, absorvendo água do tecido circundante. Na segunda fase, ocorre a despolimerização por hidrólise, sendo observado primeiro por redução no peso. Ao perder a resistência coesiva, característica da terceira fase, o polímero começa a se fragmentar em frações menores, reduzindo a massa e solúvel em ambiente aquoso. A quarta fase é a assimilação ou dissolução do polímero em monómeros e os fagócitos assimilam pequenas partículas solúveis. Por último, os monómeros são transformados em piruvato, que eventualmente entram no ciclo de Krebs e são convertidos em dióxido de carbono e água, e então excretados por via renal e/ou pulmonar (Onuma e Serruys, 2011).

2.1.1 Poli (ácido lático) (PLA)

O interesse na produção fermentativa de ácido lático aumentou, devido ao seu potencial de utilização como recurso renovável e substituto de petroquímicos. A produção biotecnológica a partir da síntese bacteriana (fermentação) do amido em ácido lático oferece vantagens quando comparada à síntese a partir da hidrólise ácida ou da oxidação do propileno glicol (Nampoothiri et al., 2010). O processo de fermentação é relativamente módico, sendo o custo dos substratos reduzido, associado à baixa utilização de energia, com temperatura reduzida, tornando este tipo de produção viável (John et al., 2007). O isómero L(+) pode ser encontrado em mamíferos, enquanto os enantiômeros D (-) e L (+) são produzidos pela fermentação bacteriana do gênero *Lactobacilli sp*, que a partir de carboidratos formam exclusivamente ácido lático (Garlotta, 2001).

A síntese química possui algumas limitações, incluindo a capacidade de produção somente do isômero L-ácido láctico. Durante o processo de polimerização o *meso*-lático é formado juntamente com o L-ácido láctico. Alta concentração na composição do Poli (L-ácido láctico) compromete a estabilidade térmica, prejudica a cristalinidade e biodegradação (John et al., 2007; Castro-Aguirre et al., 2016). Os processos de fermentação bacteriana para produzir ácido láctico, são classificados como homofermentativos ou heterofermentativos, dependendo das bactérias utilizadas. No método heterofermentativo, 1 mol de hexose, um monossacarídeo formado por 6 cadeias de carbono, pode produzir até 1,8 mol de ácido láctico. Porém, são produzidos níveis significativos de outros metabólitos, como ácido acético, etanol, glicerol, manitol e dióxido de carbono. No entanto, o método homofermentativo é mais rentável pois, produz quantidades menores de subprodutos em comparação ao método heterofermentativo (Castro-Aguirre et al., 2016).

O PLA pode ser sintetizado a partir de L-lactato, D-lactato ou L, D-lactato, originando Poli(L-ácido láctico) (PLLA), Poli(D-ácido láctico) (PDLA) ou Poli(L,D-ácido láctico) (PLDLA), respectivamente. A síntese pode ocorrer pelos processos de polimerização por policondensação direta, condensação e desidratação azeotrópica ou polimerização por abertura de anel (Garlotta, 2001). O PLA possui características mecânicas pouco desejáveis como baixa capacidade de absorver energia, baixa deformação até o ponto de ruptura e, portanto, em níveis de exigência mecânica elevada, sua utilização é limitada (Södergård e Stolt, 2002).

Para minimizar as limitações do PLA, muitos pesquisadores investiram no desenvolvimento de blendas poliméricas (misturas físicas) utilizando polímeros que apresentam diferentes propriedades mecânicas, melhorando ou complementando às observadas no PLA. Destacam-se o Poli(óxido etileno) (POE), Poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT), Polihidroxibutirato (PHB), Poli(ϵ - caprolactona) (PCL), entre outros (Castro-Aguirre et al., 2016). Diversas aplicações das blendas poliméricas nas áreas biomédicas incluem material de fixação óssea (McGovern et al., 2018), microesferas carreadoras de fármacos (Haroosh et al., 2014; Sacchetin et al., 2016) e engenharia de tecidos (Blackstone et al., 2018).

Na medicina veterinária preventiva o PLA associado ao Poli (ácido lático-co-glicólico), é utilizado como microesferas para liberação controlada de vacinas (Pavot

et al., 2014). Na área cardiovascular foram desenvolvidos arcabouços para regeneração vascular utilizando blendas a partir de PLA, α , β -poly(N-2-hydroxyethyl)-D,L-aspartamide (PHEA) e PCL (Buscemi et al., 2017).

2.1.2 Poli (ϵ -caprolactona) (PCL)

A Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster sintético produzido a partir da ciclohexanona, subproduto derivado do petróleo. O processo de polimerização da PCL pode ocorrer por policondensação do ácido 6-hidroxicapróico (ácido 6- idroxi-hexanóico) ou por meio da abertura do anel (ROP) de ϵ -caprolactona. O ROP é método mais utilizado para promover a polimerização da ϵ - caprolactona, produzindo monômero de baixo custo e o polímero de massa molar elevada (Labet e Thielemans, 2009).

O PCL possui baixa resistência à tração, demonstra alongamento na ruptura alto com cerca de 700% (Gunatillake et al., 2006). O polímero sofre degradação hidrolítica devido à presença de ligações éster alifáticas hidroliticamente fracas. Apesar disso, sua taxa de degradação é bastante lenta, entre dois e três anos e, o material não apresenta toxicidade (Nair e Laurencin, 2007). Essas características, associadas à alta permeabilidade a alguns fármacos e biocompatibilidade, possibilitaram pesquisas sobre utilização do PCL como veículo de distribuição de fármacos (Mickova et al., 2012; Chang et al., 2018). Ademais, o PCL pode ser utilizado como veículo para liberação de vacina a longo prazo (Choi et al., 2018) e arcabouços (“scaffolds”) em engenharia de tecidos (Nagiah et al., 2013).

A capacidade de formar misturas imiscíveis, com ampla gama de polímeros e suas características estruturais, fizeram com que houvesse interesse de pesquisadores na elaboração de misturas em diferentes proporções na busca de blendas que apresentassem morfologia ideal para cada situação (Nair e Laurencin, 2007). Nesse contexto, este último estudo relatou produtos comerciais elaborados a partir de blendas, como por exemplo a PCL e o Poli (ácido glicólico) que resultou em fibras menos rígidas, comercializadas como sutura monofilamentar (MONACRYL®). Outra blenda composta por PCL, Poli (ácido glicólico), PLA e Poli (etileno glicol) foi desenvolvida como biofilmes para liberação de fármacos (SynBiosyss®).

2.1.3 Blendas poliméricas

Segundo a literatura, PLA e PCL são reportados como sendo imiscíveis (Dell'Erba et al., 2001). Blendas são misturas físicas de dois ou mais polímeros, sem que haja ligações químicas entre eles. A mistura termodinâmica é uma forma de se obter novos materiais poliméricos com propriedades físicas desejadas (Finotti et al., 2017). Trata-se de um processo rápido e de baixo custo quando comparado à produção de novos polímeros ou compostos constituídos de moléculas capazes de se combinarem entre si (Oréfice et al., 2004). Neste contexto, a utilização de compatibilizante torna-se necessária para a produção da blenda imiscível PLA/PCL. O compatibilizante tem a função de interagir com ambos polímeros, promove a adesão interfacial entre eles, e permite maior dispersão entre as fases, aumentando assim a estabilidade do sistema em relação a segregação das fases que resulta em morfologia mais homogênea e melhores propriedades mecânicas (Finotti et al., 2017).

Dias e Chinelatto (2018) utilizaram mistura de polímeros contendo 5% de compatibilizante comercial, o que favoreceu interação interfacial, possivelmente, pela alteração da razão de viscosidade entre PLA e PCL. Os resultados deste estudo indicaram que a blenda apresentou, em análise de microscopia eletrônica, gotículas de maior tamanho, forma ovalada e bordas com algumas descontinuidades. A descontinuidade das bordas da gota, e o menor tamanho são características morfológicas de blendas imiscíveis que possuem boa interação interfacial, o que proporciona melhores propriedades mecânicas.

2.2 Biocompatibilidade

A avaliação da segurança dos biomateriais e suas blendas é de grande importância, uma vez que estes compostos são implantados em contato íntimo com tecidos e, em certas condições, podem permanecer no local de implantação por longos períodos. Polímeros biodegradáveis também são objeto de avaliações de segurança por meio de estudos de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Neste sentido, “biocompatibilidade” significa que um biomaterial ou blenda não cause toxicidade, não seja nocivo e não provoque reação imunológica no local em que é

implantado (Ramot et al., 2016). Os materiais selecionados, ou ocasionalmente desenvolvidos, devem ser não-tóxicos, não-imunogênicos, não-trombogênicos e não-carcinogênicos (Williams, 2008).

A biocompatibilidade depende de fatores relacionados ao material, hospedeiro e local de implantação. Fatores inerentes ao material compreendem algumas variáveis tais como forma, tamanho, composição química, rugosidade da superfície, morfologia, porosidade, esterilidade, duração do contato e tempo estimado de degradação. Os fatores extrínsecos consistem em espécie do hospedeiro, local de implantação e microambiente (Fournier et al., 2003; Ramot et al., 2016).

Pesquisas utilizando ratos Wistar como modelo experimental buscaram entendimento das respostas fisiopatológicas que os biomateriais podem induzir após a implantação. Exames histopatológicos utilizando coloração de hematoxilina e eosina (HE) demonstraram algumas reações do tipo corpo estranho que permitem avaliar se em determinado tempo o material pode causar efeito nocivo (Kastellorizios et al., 2015; Buscemi et al., 2017; Nikoubashman et al 2018; Shahrezaee et al., 2018; Pogorielov et al., 2018).

A hematoxilina um corante básico, liga-se a componentes que se ionizam e reagem com ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas ácidas, corando em azul ou violeta o núcleo de células como os polimorfonucleares, com exceção dos macrófagos que possuem afinidade por eosina. A eosina, por sua vez, cora principalmente os componentes acidófilos dos tecidos, como grânulos de secreção, proteínas plasmáticas e colágeno em rosa (Junqueira et al., 2004). Os polimorfonucleares e o colágeno são importantes na avaliação de biocompatibilidade (Klopfleisch e Jung, 2017). Além da HE, a utilização da coloração de Picrosirius-Hematoxilina também é essencial, pois se liga paralelamente às moléculas de colágeno tipo I, aumentando sua birrefringência normal ao ser observado em microscópio de luz polarizada. Quando os raios de luz passam através do filtro polarizado, vibram em uma direção, desse modo, as fibras de colágeno quando colocados entre dois filtros, a vibração da luz que emerge do primeiro filtro faz com que estas estruturas apareçam luminosas contra o fundo escuro. A capacidade de vibração a luz polarizada após passarem pelo segundo filtro é chamada de birrefringência (Junqueira et al., 1979; Junqueira et al., 2004).

Assim, estudos de biocompatibilidade utilizando PLA, PLA/PCL e membrana de celulose implantados em ratos e camundongos demonstraram que, alguns dias após a implantação foi observado presença de células de defesa em torno do material implantado. Não obstante, aos sete dias, iniciou-se formação das fibras de colágeno circundando o biopolímero. Em 15 dias após a implantação foi possível observar que a angiogênese foi associada à formação da cápsula de colágeno. Desta forma, os estudos concluíram que os implantes estimularam formação gradual da cápsula conjuntiva. A angiogênese foi essencial para o influxo de macrófagos, havendo absorção dos materiais por estas células (Pandra e Colton, 1996; Seyednejad et al., 2012; Ciambelli et al., 2013).

A formação da cápsula representa resolução das respostas inflamatórias agudas ou crônicas após implantação de materiais biocompatíveis. Observação microscópica de infiltração de células inflamatórias tais como monócitos, macrófagos e fibroblastos revelam interação entre tecido e o biomaterial. Ademais, consolidação da cápsula conjuntiva em torno do polímero se desenvolve a partir do tecido de granulação e infiltração de fibroblastos em torno do biomaterial após a implantação (Lehle et al., 2004). Nesse sentido, a hidrofobia, importante característica química do PLA e PLA/PCL está estreitamente relacionada a biodegradabilidade. Essa propriedade da superfície dos biomateriais determina a absorção, adesão e sobrevivência de células como, monócitos, macrófagos e células gigantes de corpo estranho (Wilson et al., 2005; Nair e Laurencin, 2007; Anderson et al., 2008). A característica hidrofóbica é controversa, pois os biomateriais sofrem degradação hidrolítica e enzimática. Em primeiro momento, após a implantação, os biomateriais absorvem água, resultando na despolimerização por hidrólise. Neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, secretam enzimas como, fosfatase ácida e lactato desidrogenase, que aumenta degradação, por fim são fagocitados por macrófagos (Onuma e Serrus, 2011; Silva et al., 2018).

2.3 Avaliações indiretas de inflamação

2.3.1 Testes comportamentais

O teste de campo aberto (CA) foi desenvolvido para estudo da emocionalidade (Hall, 1934) e da atividade exploratória dos animais. É muito utilizado para avaliação de fármacos estimulantes ou depressores do Sistema Nervoso Central (SNC), possibilitando observar respostas comportamentais do animal frente ao ambiente novo e aberto, medindo estado emocional (Barreto et al., 2018). O teste comportamental também pode revelar informações importantes sobre o processo inflamatório. Segundo Neves et al. (2013), em ratos e camundongos, os sinais indicativos de dor envolvem alterações no comportamento normal da espécie, tais como postura arqueada, vocalização ao ser manuseado, piloereção e perda de peso. Recentemente, estudos demonstraram que a administração do decocto da planta *Bauhinia forficata* em ratos Wistar promoveu redução da atividade locomotora geral verificada por meio do teste comportamental de CA (Moranza et al., 2017). Também, administração de lipopolissacarídeo (LPS), que induz a liberação de citocina pró inflamatórias (Rummel et al., 2005), induz redução da atividade locomotora e exploratória (Li et al., 2015; Biesmans et al., 2016).

2.3.2 Filamentos de von Frey

Testes reflexivos podem ser aplicados no local da lesão ou fora do local. Alterações no limite ou resposta a estímulos nocivos produzidos pela lesão tecidual é denominado hiperalgesia primária, sendo classicamente explicada por mudanças na sensibilidade e reflexos nociceptivos. Alterações no limiar de sensibilidade fora do local da lesão, denominado hiperalgesia secundária ou sensibilidade aumentada, é evidenciado pela sensibilização dos neurônios na medula espinal (Gregory et al., 2013). Filamentos de von Frey é um método não invasivo utilizado para avaliar o limiar nociceptivo periférico em pessoas e animais de laboratório. Aplicados a superfície cutânea, exercem uma pressão convertida em unidade de força (g). Os filamentos são

aplicados em ordem crescente (menor espessura ao mais espesso), e determinam parâmetros como limiar de detecção tátil e o limiar de detecção de dor. Os filamentos von Frey medem hiperalgesia cutânea e alodinia, sendo úteis para mimetizar condições clínicas como a sensibilidade cutânea reforçada, dor neuropática, dor pós-operatória, inflamação ou osteoartrite (Rédua et al., 2002; Lomax et al., 2008).

3. REFERENCIAS

Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008) Foreign body reaction to biomaterials. In.: **Seminars in immunology** Academic Press 20: 86-100.

Armentano I, Bitinis N, Fortunati E, Mattioli S, Rescignano N, Verdejo R, Kenny JM (2013) Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, 38: 1720-1747.

Barbanti SH, Zavaglia CA, Duek EA (2005) Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**. 15: 13-21

Barreto TR, Costola-de-Souza C, Margatho RO, Queiroz-Hazarbassanov N, Rodrigues SC, Felício L F, Zager A (2018) Repeated domperidone treatment modulates pulmonary cytokines in LPS-induced acute lung injury in mice. **International immunopharmacology** 56: 43-50.

Biesmans S, Matthews LJ, Bouwknecht JA, De Haes P, Hellings N, Meert TF, Ver Donck L (2016) Systematic analysis of the cytokine and anhedonia response to peripheral lipopolysaccharide administration in rats. **BioMed research international** 2016: 1-14.

Blackstone BN, Hahn JM, McFarland KL, DeBruler DM, Supp DM, Powell HM (2018) Inflammatory response and biomechanical properties of coaxial scaffolds for engineered skin in vitro and post-grafting. **Acta biomaterialia** 80: 247-257.

Buscemi S, Palumbo VD, Maffongelli A, Fazzotta S, Palumbo FS, Licciardi M, Buscemi G (2017) Electrospun PHEA-PLA/PCL Scaffold for Vascular Regeneration: A Preliminary in Vivo Evaluation. In.: **Transplantation proceedings** 49: 716-721.

Calliess T, Bartsch I, Haupt M, Reebmann M, Schwarze M, Stiesch M, Witte F (2016) In vivo comparative study of tissue reaction to bare and antimicrobial polymer coated transcutaneous implants. **Materials Science and Engineering: C** 61: 712-719.

Castro-Aguirre E, Iñiguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R (2016) Poly (lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. **Advanced Drug Delivery Reviews** 107: 333-366.

Chang SH, Lee HJ, Park S, Kim Y, Jeong B (2018) Fast degradable polycaprolactone for drug delivery. **Biomacromolecules** 19: 2302-2307.

Chen Q, Liang S, Thouas GA (2013) Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in polymer science** 38: 584-671.

Choi IJ, Kang A, Ahn MH, Jun H, Baek SK, Park JH, Choi SO (2018) Insertion-responsive microneedles for rapid intradermal delivery of canine influenza vaccine. **Journal of Controlled Release** 286: 460-466.

Ciambelli GS, Perez MO, Siqueira GV, Candella MA, Motta AC, Duarte MAT, Duek EADR (2013) Characterization of poly (L-co-D, L Lactic Acid) and a study of polymer-tissue interaction in subcutaneous implants in wistar rats. **Materials Research** 16: 28-37.

Cutright DE, Hunsuck EE (1971) Tissue reaction to the biodegradable polylactic acid suture. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology** 31: 134-139.

Dell'Erba R, Groeninckx G, Maglio G, Malinconico M, Migliozi A (2001) Immiscible polymer blends of semicrystalline biocompatible components: thermal properties and phase morphology analysis of PLLA/PCL blends. **Polymer** 42: 7831-7840.

Dias PP, Chinelatto MA (2018) Effect of Poly(ϵ -caprolactone-b-tetrahydrofuran) triblock copolymer concentration on morphological, thermal and mechanical properties of Immiscible PLA/PCL Blends. **Journal of Renewable Materials** 7: 129-138.

Felfel RM, Ahmed I, Parsons AJ, Rudd CD (2013) Bioresorbable composite screws manufactured via forging process: pull-out, shear, flexural and degradation characteristics. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials** 18: 108-122.

Finotti PF, Costa LC, Capote TS, Scarel-Caminaga RM, Chinelatto MA (2017) Immiscible poly (lactic acid)/poly (ϵ -caprolactone) for temporary implants: Compatibility and cytotoxicity. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials** 68: 155-162.

Fournier E, Passirani C, Montero-Menei CN, Benoit JP (2003) Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. **Biomaterials** 24: 3311-3331.

Garlotta D (2001) A literature review of poly (lactic acid). **Journal of Polymers and the Environment** 9: 63-84.

Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G (2011) Polymeric membranes for guided bone regeneration. **Biotechnology Journal** 6: 1187-1197.

Gök MK, Özgümüş S, Demir K, Cirit Ü, Pabuccuoğlu S, Cevher, Bacinoğlu S (2016) Development of starch based mucoadhesive vaginal drug delivery systems for application in veterinary medicine. **Carbohydrate polymers** 136: 63-70.

Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA (2013) An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **The Journal of Pain** 14: 1255-1269.

Gunatillake P, Mayadunne R, Adhikari R (2006) Recent developments in biodegradable synthetic polymers. **Biotechnology annual review** 12: 301-347.

Hall CS (1934) Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative psychology** 18: 385.

Haroosh HJ, Dong Y, Lau KT (2014) Tetracycline hydrochloride (TCH)-loaded drug carrier based on PLA: PCL nanofibre mats: experimental characterisation and release kinetics modelling. **Journal of materials science** 49: 6270-6281.

Höglund OV, Hagman R, Olsson K, Carlsson C, Södersten F, Lagerstedt A S (2013) Ligation of the ovarian pedicles in dogs with a resorbable self-locking device—a long-term follow-up study. **Journal of biomaterials applications** 27: 961-966.

John RP, Nampoothiri KM, Pandey A (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied microbiology and biotechnology** 74: 524-534.

John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A (2009) Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. **Biotechnology advances** 27: 145-152.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical journal** 11: 447-455.

Junqueira LC, Carneiro J, Abrahamsohn, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Kastellorizios M, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ (2015) Prevention of foreign body reaction in a pre-clinical large animal model. **Journal of Controlled Release** 202: 101-107.

Kavanagh OV, Adair BM, Welsh M, Earley B (2013) Immunogenetic responses in calves to intranasal delivery of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) epitopes encapsulated in poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles. **Research in veterinary science** 95: 786-793.

Klopfleisch R, Jung F (2017) The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research Part A** 105: 927-940.

Labet M, Thielemans W (2009) Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews** 38: 3484-3504.

Lasprilla AJ, Martinez GA, Lunelli BH, Jardini AL, Maciel Filho R (2012) Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review. **Biotechnology advances** 30: 321-328.

Lehle K, Lohn S, Reinerth G, Schubert T, Preuner JG, Birnbaum DE (2004) Cytological evaluation of the tissue–implant reaction associated with subcutaneous implantation of polymers coated with titaniumcarboxonitride in vivo. **Biomaterials** 25: 5457-5466.

Li R, Zhao D, Qu R, Fu Q, Ma S (2015) The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience letters** 594: 17-22.

Lomax S, Sheil M, Windsor PA (2008) Impact of topical anaesthesia on pain alleviation and wound healing in lambs after mulesing. **Australian veterinary journal**, 86: 159-168.

Malikmammadov E, Tanir TE, Kiziltay A, Hasirci V, Hasirci N (2018) PCL and PCL-based materials in biomedical applications. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, 29: 863-893.

McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW (2018). Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. **Disease models & mechanisms** 11: dmm033084.

Melo WO, Santos EA., Abud LJ, Coelho GJ, Santos SC, Almeida, LRR, Monteiro BM (2015) Impacto econômico da ocorrência de lesões em carcaças de bovinos abatidos no sudeste do Pará: Influências da presença de traumas e abscessos e da distância entre a fazenda e o abatedouro. **Acta Veterinaria Brasilica** 9: 243-250.

Mesquita LR, Rahal SC, Matsubara LM, Mamprim MJ, Foschini CR, Faria LG, Kano WT (2015) Bilateral hydronephrosis and hydroureter after ovariohysterectomy using nylon cable tie: a case report. **Vet Med-Czech** 60: 52-6.

Mickova A, Buzgo M, Benada O, Rampichova M, Fisar Z, Filova E, Amler, E (2012) Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. **Biomacromolecules** 13: 952-962.

Moranza HG, Scanavaca JL, Mataqueiro MI, Ferraz G (2017) Chronic administration of *Bauhinia forficata* link reduced exploratory activity without affecting blood glucose in healthy rats. **Plant** 5: 27-32.

Nagiah N, Ramanathan G, Shobana L, Singaravelu S, Uma, TS, Natarajan TS (2013) Preparation and characterization of electrospun poly (3-hydroxybutyric acid)–poly (N-vinylpyrrolidone) and poly (caprolactone)–poly (N-vinylpyrrolidone) fibers as potential scaffolds for skin regeneration. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering** 3: 624-629.

Nair LS, Laurencin CT (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymer science** 32: 762-798.

Nampoothiri KM, Nair NR, John RP (2010) An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource technology** 101: 8493-8501.

Neves SMP, Mancini Filho J, Menezes EW (2013) Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. **São Paulo: FCF-IQ/USP.**

Neves IV, Tudury EA, da Costa RC (2010) Fármacos utilizados no tratamento das afecções neurológicas de cães e gatos. **Semina: Ciências Agrárias**, 31: 745-766.

Nikoubashman O, Heringer S, Feher K, Brockmann MA, Sellhaus B, Dreser A, Kiebling F (2018) Development of a Polymer-Based Biodegradable Neurovascular Stent Prototype: A Preliminary In Vitro and In Vivo Study. **Macromolecular bioscience**, 1700292.

Onuma Y, Serruys PW (2011) Bioresorbable scaffold: the advent of a new era in percutaneous coronary and peripheral revascularization?. **Circulation** 123: 779-797.

Oréface RL, Vasconcelos WL, Moraes MAS (2004) Estabilidade de fases em blendas de policarbonato-poliestireno avaliada por micro-FTIR, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura. **Polímeros: Ciência e tecnologia** 14: 129-133.

Padera RF, Colton CK (1996) Time course of membrane microarchitecture-driven neovascularization. **Biomaterials** 17: 277-284.

Patist CM, Mulder MB, Gautier SE, Maquet V, Jérôme R, Oudega M (2004) Freeze-dried poly (D, L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. **Biomaterials** 25: 1569-1582.

Pavot V, Berthet M, Rességuier J, Legaz S, Handké N, Gilbert SC, Verrier B (2014) Poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. **Nanomedicine** 9: 2703-2718.

Pogorielov M, Hapchenko A, Deineka V, Rogulska L, Oleshko O, Vodsedálková K, Erben J (2018) In vitro degradation and in vivo toxicity of NanoMatrix3D® polycaprolactone and poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A** 106: 2200-2212.

Rambo CR, Recouvreux DOS, Carminatti CA, Pitlovanciv AK, Antônio RV, Porto LM (2008) Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C** 28: 549-554.

Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A (2016) Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. **Advanced drug delivery reviews** 107: 153-162.

Rédua MA, Valadão CA, Duque JC, Balestrero LT (2002) The pre-emptive effect of epidural ketamine on wound sensitivity in horses tested by using von Frey filaments. **Veterinary anaesthesia and analgesia** 29: 200-206.

Rummel C, Barth SW, Voss T, Korte S, Gerstberger R, Hubschle T, Roth J (2005) Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways?. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 289: 340-347.

Sacchetin PSC, Setti RF, Rosa PDT V, Moraes A M (2016) Properties of PLA/PCL particles as vehicles for oral delivery of the androgen hormone 17 α -methyltestosterone. **Materials Science and Engineering: C** 58, 870-881.

Seyednejad H, Gawlitta D, Kuiper R V, de Bruin A, van Nostrum CF, Vermonden, T, Hennink WE (2012) In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly (ϵ -caprolactone). **Biomaterials** 33: 4309-4318.

Silva D, Kaduri M, Poley M, Adir O, Krinsky N, Shainsky-Roitman J, Schroeder A (2018) Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. **Chemical Engineering Journal**, 340: 9-14.

Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2008) Biological degradation of plastics: a comprehensive review. **Biotechnology advances** 26: 246-265.

Shahrezaee M, Salehi M, Keshtkari S, Oryan A, Kamali A, Shekarchi, B (2018) In vitro and in vivo investigation of PLA/PCL scaffold coated with metformin-loaded gelatin nanocarriers in regeneration of critical-sized bone defects. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** 14: 2061-2073.

Shalaby SW, Burg KJ (2003) Absorbable/biodegradable polymers: technology evolution. In.: **Absorbable and Biodegradable Polymers** 17-26: CRC Press.

Södergård A, Stolt M (2002) Properties of lactic acid-based polymers and their correlation with composition. **Progress in polymer science** 27: 1123-1163.

Sun H, Mei L, Song C, Cui X, Wang P (2006) The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials** 27: 1735-1740.

Vert M (2009) Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 20: 437-446.

Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ (2005) Mediation of biomaterial–cell interactions by adsorbed proteins: a review. **Tissue engineering**, 11: 1-18.

Williams DF (2008) On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials** 29: 2941-2953.

Capítulo 2 - Avaliação da biossegurança e comportamento de ratos Wistar submetidos ao implante de poli (ácido láctico) e blenda poli (ácido láctico) / (ϵ -caprolactona)¹

1. Introdução

Gerar conhecimento por meio de pesquisas científicas que promovam o bem-estar animal é necessário para que haja progresso nos protocolos terapêuticos. Sendo assim, estudos pré-clínicos sobre novos biomateriais, com custo baixo, são importantes para evolução das ciências biomédicas (Höglund et al., 2014).

Tratamentos cirúrgicos de determinadas lesões consistem em técnicas invasivas, como, fixação óssea com parafusos, sendo necessário procedimento cirúrgico adicional para a retirada dos parafusos (van Der Eng et al., 2015). Ademais, castração de fêmeas ou machos com utilização de “abraçadeiras” de *nylon* podem causar necrose de órgãos e tecidos adjacentes, por vezes, seguida de fibrose (Macedo et al., 2012). Tais fatos, demonstram a importância de pesquisas integrando as áreas Biomédicas e Engenharia de Materiais, em prol da redução de efeitos indesejáveis em pacientes, notadamente as reações de corpo estranho.

A descoberta dos polímeros biodegradáveis impulsionou pesquisas na área da saúde para desenvolvimento de suturas (Boden et al., 2012), implantes e fixações ósseas (Yao et al., 2017; Mcgovern et al., 2018) e veículos para liberação de fármacos (Lee et al., 2017). Estes biomateriais devem ser absorvidos pelo organismo causando o mínimo de efeitos adversos ao paciente (Nair e Laurencin, 2007). O poli (ácido láctico) (PLA), poliéster derivado do ácido láctico, é o principal polímero biodegradável utilizado em estudos biomédicos nas últimas décadas. Ligações éster contidas no PLA são cliváveis por meio de hidrólise e outros processos enzimáticos, resultando em fragmentos relativamente pequenos e metabolizáveis pelo organismo. Ademais, quando descartado, o PLA possui impacto ambiental reduzido devido a sua biodegradabilidade (Langer et al., 2016).

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico que será submetido à revista Research in Veterinary Science.

Entretanto, aplicação do PLA puro como biomaterial pode ser limitada devido às propriedades mecânicas reduzidas relacionadas à tenacidade e fragilidade do material (Nair e Laurencin, 2007; Lasprilla et al., 2012).

Como alternativa para melhorar as propriedades mecânicas, misturas do PLA com outros polímeros flexíveis como a poli(ϵ -caprolactona) (PCL), um poliéster biodegradável e bioabsorvível, podem ser elaboradas. Mistura de polímeros, também conhecidas como blendas, proporciona meio rápido e econômico para alterar ou melhorar as propriedades de um polímero, eliminando, assim, o custo alto e os esforços envolvidos na pesquisa e no desenvolvimento de novos polímeros (Saini et al., 2016).

A área biomédica tem interesse pelo desenvolvimento e produção de misturas totalmente biodegradáveis. Sendo assim, a blenda PLA/ PCL possui potencial para ser utilizada como biomaterial (Finotti et al., 2017), pois apresenta maior flexibilidade e resistência (Dias e Chinelatto, 2018). Estudo recente avaliou citotoxicidade *in vitro* da composição polimérica PLA/PCL compatibilizada com copolímero tribloco ϵ -caprolactona-tetra-hidrofurano- ϵ -caprolactona (CT) não revelando efeito citotóxico (Finotti et al., 2017), assim estudos *in vivo* ainda devem ser realizados com esta nova formulação polimérica.

Como complemento aos resultados dos testes *in vitro* faz-se necessário realização de estudos sobre a biocompatibilidade *in vivo* dos biopolímeros ou blendas PLA/PCL compatibilizada, tendo em vista que este composto, após a implantação no corpo, pode permanecer por período relativamente longo em contato com os tecidos (Fournier et al., 2003; Nyska et al., 2014; Ramot et al., 2016). Neste sentido, estudos sobre biocompatibilidade e biossegurança, bem como a biodegradabilidade *in vivo* são importantes. Fatores intrínsecos do próprio biomaterial, como forma, tamanho, rugosidade, porosidade, composição, esterilidade, duração do contato, degradação e fatores externos, tais como, local do implante e espécie animal (De Jong et al., 2005, Ramot et al., 2016). Tais fatores apresentam respostas potencialmente inter-relacionadas, chave para compreender a biocompatibilidade determinando mecanismos químicos, físicos, bioquímicos e fisiológicos associados ao contato entre o biomaterial e tecidos do corpo (Williams, 2008).

O rato Wistar é espécie animal frequentemente utilizada para realização de estudos pré-clínicos, sendo testes *in vivo*, etapa fundamental para desenvolvimento das áreas biomédicas. Tais estudos possibilitam investigações sobre possíveis efeitos no organismo, gerando novos conhecimentos sobre dispositivos médicos (Sengupta, 2013).

Testes nociceptivos em ratos podem avaliar sensibilidade dolorosa produzida pelo implante do biopolímero ou blenda, tal como método que utiliza filamentos de von Frey. Este método é utilizado para avaliar limiares de hiperalgesia cutânea (Rédua et al., 2002; Gregory et al., 2013). Adicionalmente, dor inflamatória pode causar alterações emocionais, incluindo depressão e ansiedade, além de alterações na atividade exploratórias em animais de laboratório (Ruan et al., 2013). Em roedores, possíveis mudanças comportamentais podem ser determinadas por meio do teste de campo aberto, classicamente conhecido como “open field” (Barreto et al., 2018). Adicionalmente, estudos realizados em ratos Wistar determinaram por meio de técnicas histopatológicas utilizando coloração de hematoxilina e eosina (HE) graus distintos de reações do tipo corpo estranho permitindo avaliar se em determinado tempo o material poderia causar efeito deletério (Kastellorizios et al., 2015; Buscemi et al., 2017; Nikoubashman et al 2018; Shahrezaee et al., 2018; Pogorielov et al., 2018).

Neste estudo pré-clínico nós avaliamos segurança e biodegradação de biopolímeros compostos somente por PLA puro ou pela blenda PLA/PCL implantados pela via subcutânea ou intraperitoneal em ratos Wistar. Utilizaram-se ferramentas diagnósticas como filamentos de von Frey, teste de campo aberto, análises histológicas e biodegradabilidade dos biopolímeros por meio de microscopia eletrônica de varredura.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos éticos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP),

Jaboticabal/SP - Brasil (n° 2924/17; n° 02823/18) e seguiu as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

2.2 Animais

Utilizaram-se 174 ratos Wistar machos, com peso corpóreo de aproximadamente 200 g, provenientes do Biotério Central da Unesp, em Botucatu/SP. Os ratos foram alojados no biotério do Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino -LAFEQ na FCAV-UNESP. Os ratos foram distribuídos de forma aleatória e mantidos em caixas plásticas coletivas contendo três animais cada, em ciclo de claro-escuro invertido 12:12 h (luz das 19:00 - 7:00 h) e temperatura ambiente em torno de 24° C. Ração (Presence, Neovia®) e água foram fornecidas *ad libitum*.

2.3 Preparação dos biopolímeros

As blendas foram preparadas por Dias e Chinelatto (2018), pesquisadores do Departamento de Engenharia de Materiais - Campus II na Escola de Engenharia de São Carlos - EESC, Universidade de São Paulo – USP. Por meio do processo de mistura no estado fundido contendo, poli(ácido láctico) (PLA) Ingeo®3251D (NatureWorks®), poli(ε-caprolactona) (PCL) Capa™ 6500 (Perstorp®) e compatibilizante CAPA 7201A (Perstorp®), um copolímero tribloco tipo ABA, em que A indica blocos da ε-caprolactona e B representa bloco do tetrahydrofurano. Antes do processamento foi realizada secagem do PLA à 80 °C por 8 h em estufa com circulação de ar. A secagem da PCL foi realizada à 40 °C em estufa à vácuo pelo menos 16 h. Após secagem dos polímeros, foi realizada a pré-mistura mecânica manual dos grânulos de PLA/ PCL secos com o agente compatibilizante nas proporções de cada formulação.

A formulação PLA continha 100% poli(ácido láctico) e a blenda PLA/PCL possuía 71,43% em massa de poli(ácido láctico); 23,81% em massa de poli(ε-caprolactona) e 4,76% em massa compatibilizante. O processamento ocorreu em extrusora simples, modelo LAB-16 da AX-Plásticos com rosca de 40 cm comprimento e 16 mm de

diâmetro com elemento de mistura distributivo ($L/D = 25$). O perfil de temperatura adotado foi crescente 170-190°C com rotação da rosca de 60 rpm e torque de 30 N.m. Os implantes dos polímeros (PLA e blenda PLA/PCL) no formato de filmes foram confeccionados via prensagem a quente a 180°C com dimensões de 1 cm² e 1 mm de espessura, sendo esterilizados por óxido de etileno por Acecil® (Central de esterilização Comércio e Indústria Ltda).

2.4 Grupos experimentais

Para avaliação cega, no momento do procedimento de implantação, os ratos foram escolhidos de forma aleatória, sendo distribuídos em cinco grupos experimentais e subdivididos de acordo com a via de implantação, intraperitoneal (IP) ou subcutânea (SC). Assim, os grupos experimentais foram: grupo PLA puro (IP, $n = 27$; SC, $n = 27$); grupo PLA/PCL, blenda PLA/PCL (IP, $n = 27$; SC, $n = 27$); grupo instrumentado (GI): submetidos aos procedimentos de implantação, sendo que não receberam nenhum tipo de biomaterial (IP, $n = 18$; SC, $n = 18$); grupo controle (C) (IP, $n = 9$; SC, $n = 9$): não foram submetidos a quaisquer procedimentos; grupo controle inflamatório (CI) submetido a aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) (derivado de *Escherichia coli*, 0127:B8, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) por via SC.

Importante ressaltar que este último grupo foi concebido para indução de modelo de resposta inflamação sistêmica em roedores, classicamente conhecido na literatura (Cartmell et al., 2000). Para avaliação comportamental do grupo CI os animais foram avaliados conjuntamente sendo o $n = 12$. A metodologia de avaliação comportamental de campo aberto (CA) será explicada detalhadamente a seguir.

2.5 Momentos de Avaliação

Os momentos de avaliação estão representados no fluxograma (Fig. 1). Os ratos foram avaliados em duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda foram realizados teste de campo aberto dois dias após implantação dos biomateriais ou inoculação de LPS dos grupos PLA, PLA/PCL, GI, C e CI. Os filamentos de von Frey foram aplicados em quatro momentos: antes (-1), 1, 7 e 14 dias após implantação dos

grupos PLA, PLA/PCL, GI, C. As avaliações histológicas dos grupos PLA, blenda PLC/PCL e GI, degradação *in vivo* e *in vitro* dos biomateriais analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram realizadas em 2, 8 e 24 semanas, após implantação.

2.6 Procedimentos para implantação e inoculação de LPS

Na Figura 2 pode ser observada a visão geral dos sítios de implantação. Os ratos foram anestesiados pela via IP com cloridrato de cetamina (75mg.kg^{-1}) e cloridrato de xilazina (10mg.kg^{-1}), diluídos na mesma seringa. Para implantação pela via SC, foi realizada tricotomia na região toracolateral esquerda caudal à escapula de aproximadamente 4,0 cm, antissepsia com iodo povidona e álcool 70%. Por meio de incisão na pele com 2,0 cm de comprimento entre o quinto e o oitavo espaço intercostal, por meio de divulsão do subcutâneo, obteve-se espaço entre pele e músculo cutâneo, onde os biomateriais foram implantados. Para dermorrafia utilizou-se fio de nylon 4-0, com padrão de pontos simples interrompido.

Para implantação IP, realizou-se tricotomia de aproximadamente 4 cm na região abdominal ventral caudal à cartilagem xifoide, antissepsia com iodo povidona e álcool 70%. Os ratos foram submetidos à celiotomia mediana ventral pré umbilical com 2,0 cm de comprimento. O material foi inserido no abdômen sobre as alças intestinais. Para celiorrafia foi utilizado fio de nylon 4-0 em padrão sultan na linha alba, e para a dermorrafia utilizou-se padrão de pontos simples interrompidos com mesmo fio.

Para aplicação de LPS no grupo CI utilizou-se seringa e agulha hipodérmica 0,8 x 25 mm, 5,0 mL de ar filtrado foi injetado entre a pele e o músculo cutâneo na mesma região de implantação SC para obtenção de espaço. Ato contínuo, $0,1\text{ mL}^{-1}$ ($100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) de solução de LPS bacteriano foi injetada no local (adaptado de Cartmell et al., 2001).

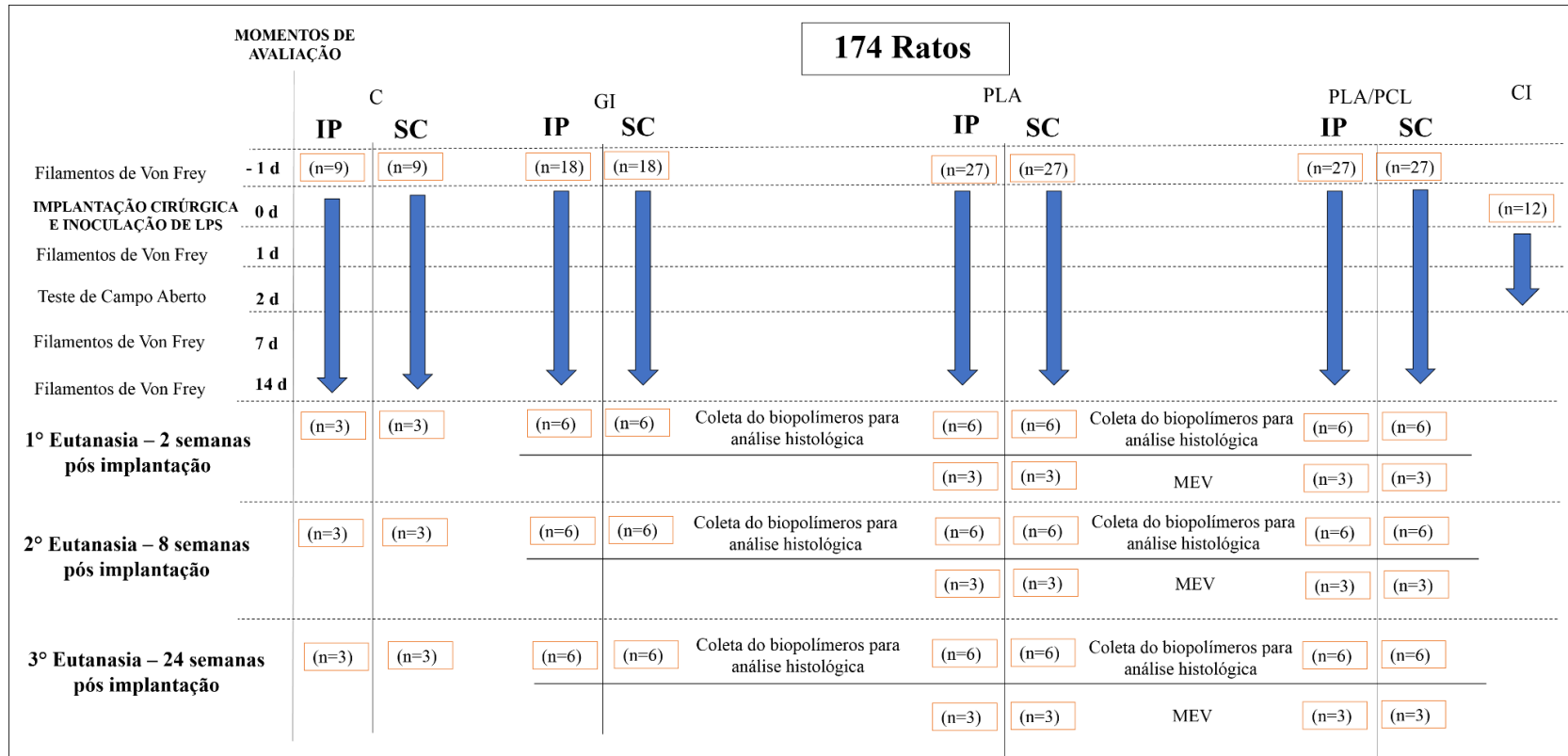


Fig.1. Fluxograma dos momentos de avaliação dos grupos C = controle; GI = grupo instrumentado; PLA = Poli (ácido láctico) puro implantados pela via intraperitoneal (IP) e subcutâneo (SC); PLA/PCL = blenda PLA/PCL contém 71.43% (m/m) de Poli(ácido láctico); 23.81% (m/m) de Poli(ε-caprolactona) e 4.76% (m/m) compatibilizante implantados pela via intraperitoneal (IP) e subcutâneo (SC). Teste de filamentos de von Frey foram realizados no dia (-1) antes da implantação; 1, 7 e 14 após a implantação. Teste comportamental de campo aberto (CA) foi realizado 2 dias pós-implantação. Foram realizadas avaliações histológicas em 2, 8 e 24 semanas dos grupos GI, PLA e PLA/PCL. A biodegradação *in vivo* do PLA e PLA/PCL foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em 2, 8 e 24 semanas pós-implantação.

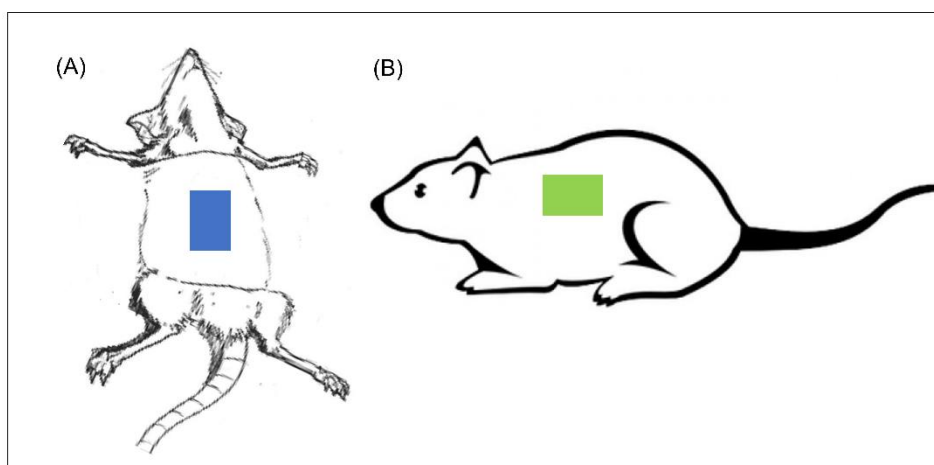


Fig.2. Implantação de biopolímeros PLA ou blenda PLA/PCL em ratos Wistar. (A) Área anatômica relativa à celiotomia mediana ventral pré umbilical com 2,0 cm de comprimento para implantação intraperitoneal. (B) Área anatômica relativa à incisão com 2,0 cm de comprimento, seguida de divulsão do subcutâneo, entre o quinto e oitavo espaço intercostal para implantação subcutânea.

2.7 Métodos de avaliação

2.7.1 Teste comportamental de campo aberto (CA)

Para o teste CA foram determinadas variáveis comportamentais tais como, frequências de locomoção, levantar e *grooming* (Moranza et al., 2017). Os ratos foram submetidos ao CA dois dias após a implantação, sendo cada animal avaliado individualmente, por período de 5 min. Entre um teste e outro, a arena foi limpa com solução hidroalcoólica 5% (v/v) para eliminação dos possíveis resquícios odoríferos deixados pelo antecessor.

2.7.2 Filamentos de von Frey

Os filamentos (Semmes Weinstein von Frey Aesthesiometers, model 58011, Stoelting, IL- USA) exercem pressão na superfície cutânea, sendo usados em ordem crescente. São aplicados três vezes seguidas, com intervalos de 3 segundos entre

elas, a 0,5 cm do sítio de implante, em quatro pontos diferentes em torno do implante (dorsal, lateral, medial, ventral). Na ausência de resposta, após avaliação com um filamento levou à utilização do próximo e, assim sucessivamente, até a obtenção de resposta aversiva. Nessa sequência, se não houvesse resposta à força exercida pelo filamento de maior diâmetro 6,45 (281,83 g de força) o teste foi interrompido.

2.7.3 Análise histológica

Para retirada dos implantes, os ratos foram eutanasiados com dose letal de anestésico volátil isoflurano. Utilizando as cicatrizes da implantação como guia, os implantes foram retirados juntamente com o tecido circundante ou omento nos momentos 2, 8 e 24 semanas. Os fragmentos foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfato durante 24 horas. Em seguida, colocado em álcool 70% até o processamento. Para preparação das lâminas, os implantes foram desidratados em séries crescentes de álcool em seis etapas com duração de 1 hora por etapa. Clarificadas em xilol e incluídas em parafina (Qeel-São Paulo - Brasil). Cortes histológicos de 5,0 µm de espessura foram obtidos utilizando micrótomo Leica RM 2245.

As análises dos cortes histológicos foram realizadas no Departamento de Patologia Veterinária na FCAV- Unesp e no Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Humanidades e Ciências Exatas na Unesp -São José do Rio Preto. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, visualizadas em microscópio óptico de luz Olympus BX50 (Olympus Corporation, Center Valley, PA, USA) e as imagens capturadas utilizando software Olympus cellSens Standard 1.18 (Olympus Corporation, Center Valley, PA, USA). As reações teciduais aos implantes foram classificadas quantitativamente de acordo com os critérios propostos por De Jung et al. (2005) utilizando escore de pontuação numérico: 1-reação leve, 2-reação moderada, 3-reação intensa e 4-reação severa.

Caracterização da cápsula:

1- Cápsula mínima, poucas camadas de células fibrosas e/ou macrófagos adjacentes ao implante. 2- Cápsula moderada, várias camadas de tecido fibroso e/ou macrófagos adjacentes ao implante. 3- Cápsula composta por três ou mais camadas;

macrófagos adjacentes ao implante e/ou tecido fibroso e macrófagos fagocitando fora do tecido fibroso.

Infiltrado inflamatório: Presença de polimorfonucleares.

1- Resposta inflamatória mínima, pequenos conglomerados de células presentes ou poucas células isoladas presentes. 2- Resposta inflamatória moderada, vários conglomerados pequenos de células presentes ou células regularmente presentes. 3- Resposta inflamatória acentuada, vários conglomerados grandes de células presentes. 4- Resposta inflamatória severa, grandes áreas confluentes com células inflamatórias presentes.

Os cortes corados por Picrosirius-Hematoxilina (PSH) foram analisados com auxílio de microscópio óptico Olympus BX 60, por meio de sistema analisador de imagens pelo software Image-Pro-Plus (Media Cybernetics, USA), sob luz polarizada para observação das características anisotrópicas (birrefringência e dicroísmo) do colágeno. Fotomicrografias das mesmas áreas foram obtidas antes e depois da rotação de 90°.

2.8 Biodegradação *in vivo*

Para avaliação da biodegradação dos biomateriais foram utilizados 36 ratos, sendo PLA (IP, $n = 3$; SC, $n = 3$) e blenda PLA/PCL (IP, $n = 3$; SC, $n = 3$) por período de avaliação (2, 8 e 24 semanas). Os implantes foram retirados juntamente com o tecido circundante ou omento, dissecados e mergulhados em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 5,25% durante 20 minutos, para remoção de material orgânico. O material foi imerso em água miliQ durante 10 minutos por duas vezes para retirada total do NaClO (adaptado de Lam et al., 2009). Para posterior avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.9 Degradação *in vitro*

Para avaliação da degradação *in vitro*, os biomateriais PLA ($n = 9$) e blenda PLA/PCL ($n = 9$) foram imersos em tubos individuais com 10 mL de tampão fosfato salino (PBS) 0,2 M (pH 7,2) com tampas de rosca apertadas e envoltas por filme de

parafina plástica com papel. Os tubos foram mantidos a 37°C em estufa, sendo realizadas três avaliações (2, 8 e 24 semanas). Os biomateriais foram enxaguados com água MiliQ para posterior avaliação da morfologia por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos biomateriais foi analisada utilizando a MEV. As amostras degradadas *in vitro* ou *in vivo* foram criofraturadas manualmente após imersão em nitrogênio líquido durante 6 segundos, secas em estufa a 35 °C durante 12 horas. Os fragmentos obtidos após criofratura foram montados em suportes e pulverizados em ouro. A análise das superfícies criofraturadas foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO MA 10 (Zeiss, Oberkochen, GER), com detectores de elétrons secundários e retroespalhados usados para criar imagens e tensão de aceleração de 15 Kv.

2.11 Análise Estatística

O esquema experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC). A análise estatística foi realizada no programa Sigma-Plot 12.0. As comparações foram realizadas entre os grupos subdivididos conforme a implantação IP e SC. Para comparação entre os grupos, as variáveis do teste de campo aberto foram submetidas a ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para as variáveis do teste de filamentos von Frey, aplicaram-se ANOVA para medidas repetidas no tempo nos dias -1, 1, 7 e 14, seguida de teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para avaliação das variáveis histológicas foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para variável cápsula comparou-se os grupos PLA e blenda PLA/PCL subdivididos conforme local de implantação IP ou SC. Para a variável infiltrado comparou-se o grupo PLA, grupo blenda PLA/PCL e GI subdivididos conforme local de implantação. Estabeleceu-se 5% como nível de significância ($P \leq 0,05$).

3. Resultados

3.1 Teste comportamental de campo aberto (CA)

A figura 3 ilustra os resultados das avaliações do teste de CA realizado 2 dias após implantação dos biomateriais. As Figuras 3A e 3B revelam que na via IP houve redução ($F = 4.54$; $P = 0.002$ e $F = 18.28$; $P < 0.001$) nas frequências de locomoção e levantar no grupo CI em relação aos demais grupos (PLA, PLA/PCL, GI e controle). O grupo CI apresentou maior frequência de *grooming* em relação aos demais grupos (Fig. 3C; $F = 17.15$; $P < 0.001$). Já para implantação SC, o grupo CI demonstrou redução na frequência de locomoção diferindo apenas do PLA (Fig. 3D, $F = 2.96$; $P = 0.009$). Na frequência de levantar (Fig. 3E) houve redução do CI em relação aos demais grupos ($F = 19.70$; $P < 0.001$). Para a variável frequência de *grooming* (Fig. 3F), o grupo CI apresentou maior frequência em relação aos outros grupos ($F = 28.93$; $P < 0.001$).

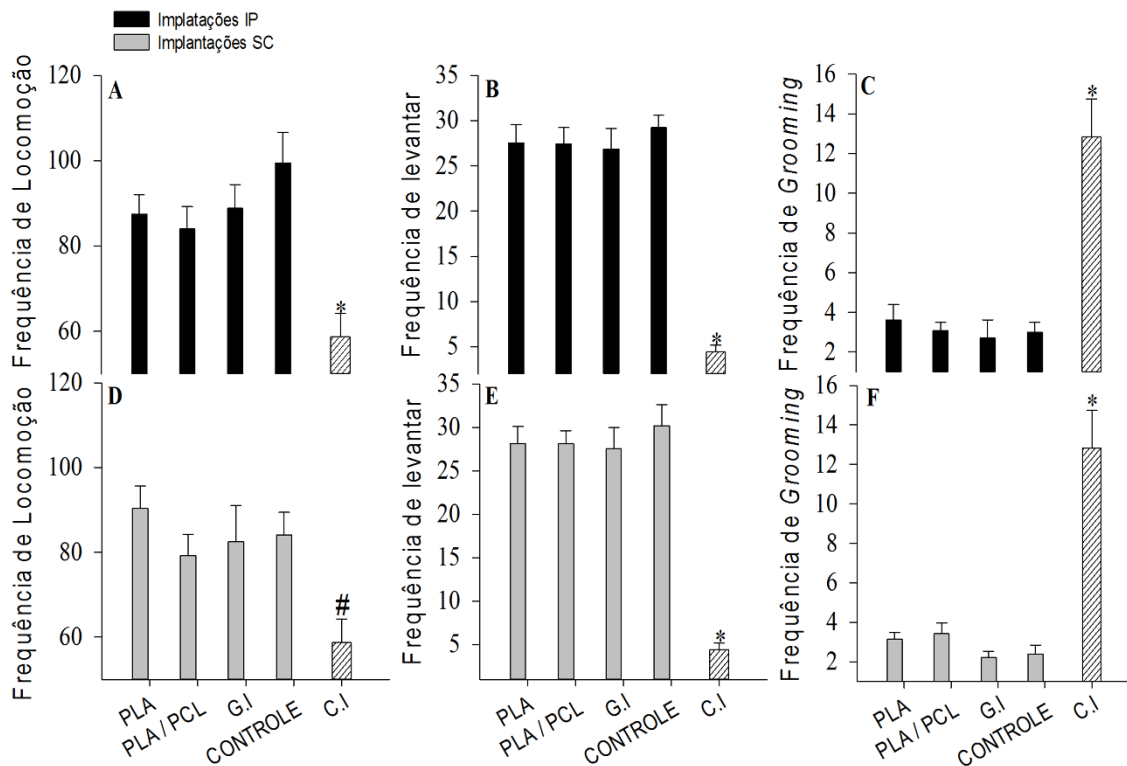


Fig 3. Teste comportamental de CA em ratos Wistar 2 dias pós-implantação de biomateriais. Em A: Frequência de locomoção IP. Em B: Frequência de levantar IP.

Em C: Frequência de *grooming* IP. Em D: Frequência de locomoção SC. Em E: Frequência de levantar SC. Em F: Frequência de *grooming* SC. Resultados apresentados como Média \pm DP. # revela diferença entre IC vs PLA. *demostram diferença entre grupos no teste de CA ($P < 0,05$). Poli(ácido lático) puro, ($n = 27$ IP) ($n = 27$ SC); PLA/ PCL = blendas PLA / PCL contém 71.43% (m/m) de Poli(ácido lático); 23.81% (m/m) de Poli(ϵ -caprolactona) e 4.76% (m/m) compatibilizante, ($n = 27$ IP) ($n = 27$ SC); GI= Grupo instrumentado, ($n = 18$ IP) ($n = 18$ SC); Controle, ($n = 9$ IP) ($n = 9$ SC); CI = Controle inflamatório, ($n = 12$).

3.2 Filamentos de von Frey

Não houve diferença significativa no teste FvF entre grupos nos momentos -1, 1, 7 e 14 dias avaliados, quando realizada pós-implantação de biomateriais implantação IP ($P = 0,490$; $P = 0,112$; $P = 0,174$; $P = 1,000$) respectivamente (Fig.4A). De mesmo modo nas implantações SC não houve diferença significativa nos momentos avaliados ($P = 0,403$; $P = 0,241$; $P = 0,203$; $P = 1,000$) respectivamente (Fig. 4B).

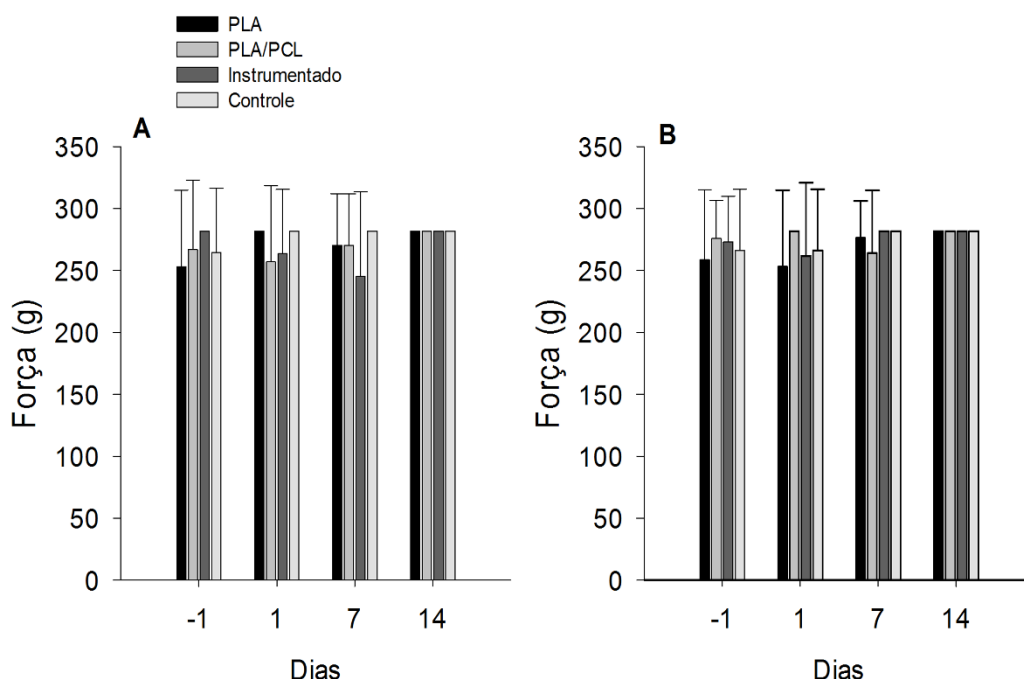


Fig 4. Testes dos filamentos de von Frey realizados em ratos Wistar pós-implantação de biomaterial. Em A: Grupos implantados por via intraperitoneal. Em B: Grupos implantados por via subcutânea. Resultados apresentados como Média \pm DP da força em (g), dia -1 pré-implantação, 1, 7 e 14 pós-implantação. Poli(ácido lático) puro, ($n = 27$ IP) ($n = 27$ SC); PLA/ PCL = blendas PLA / PCL contém 71.43% (m/m) de Poli(ácido lático); 23.81% (m/m) de Poli(ϵ -caprolactona) e 4.76% (m/m) compatibilizante, ($n = 27$ IP) ($n = 27$ SC); GI= Grupo instrumentado, ($n = 18$ IP) ($n = 18$ SC); Controle, ($n = 9$ IP) ($n = 9$ SC).

3.3 Análise histológicas

As alterações microscópicas observadas nos grupos PLA e PLA/PCL implantados por via intraperitoneal ou subcutânea estão apresentadas na Tabela 1. O grupo GI foi avaliado e utilizado como controle. Em torno dos biomateriais PLA ou PLA/PCL implantado IP pode-se observar formação de cápsula moderada presente nos momentos 2 e 8 semanas (Fig. 5A, B; 6A, B). No momento 24 semanas, os grupos PLA e PLA/PCL apresentaram cápsula mais delgada (Fig. 5C; 6C). Verificou-se infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal e neovascularização momentos 2 e 8 semanas. Verificou-se pavimentação dos macrófagos entre o biomaterial e a cápsula nos momentos 8 e 24 semanas. Nos mesmos momentos, observou-se fagocitose do biomaterial pelos macrófagos, que emitiram projeções citoplasmáticas que envolviam partes dos biopolímeros principalmente nos polos da cápsula (Fig. 5B, C; 6B, C). Porém, pode ser observada a presença dos biomateriais adjacentes à cápsula. Importante informar que, a avaliação macroscópica, revelou não ativação do omento em alguns biomateriais. Somente 33% dos implantes dos biomateriais não demonstraram aderência sobre o omento. Também, oito semanas pós-implantação 33% e 83% e, nas 24 semanas, 16% e 33% dos implantes de PLA e da blenda PLA/PCL encontravam-se não aderidos ao omento, respectivamente.

O PLA e a blenda PLA/PCL implantados por via subcutânea, apresentam característica de cápsula moderada observada nos momentos 2 e 8 semanas (Fig. 5D, E; 6D, E). Notou-se espessamento intenso da cápsula nos biomateriais no momento 24 semanas (Tabela 1). Observou-se infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear difuso (linfócitos e macrófagos). Nos momentos 8 e 24 semanas verificou-se pavimentação dos macrófagos adjacentes à cápsula e fagocitose do PLA e PLA/PCL pelos macrófagos, que emitiram projeções citoplasmáticas que envolviam partes dos biopolímeros principalmente nos polos da cápsula (Fig. 5E, F; 6E, F). Pode-se observar presença dos polímeros PLA e PLA/PCL no conjunto da cápsula. Na comparação entre os grupos implantados com os biopolímeros IP ou SC, não houve diferença nas reações estudadas ($P > 0,05$). Na implantação SC, o grupo GI apresentou redução no infiltrado inflamatório nos

momentos 8 e 24 semanas em relação aos grupos PLA ($P = 0,032$; $P = 0,002$) e blenda PLA/PCL ($P = 0,032$; $P = 0,065$) respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Mediana (min-máx) dos escores de pontuação utilizados para classificação das variáveis cápsula e infiltrado inflamatório analisadas por microscopia óptica dos polímeros PLA e PLA/PCL nos momentos 2, 8 e 24 semanas após implantação intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC).

IP	Semanas	PLA	PLA / PCL	GI
Cápsula	2	2,0 (2-3)	2,0 (1-3)	-
	8	2,0 (2-3)	2,0 (2-2)	-
	24	1,0 (1-2)	1,0 (1-3)	-
Infiltrado	2	1,0 ^a (1-2)	1,0 ^a (0-2)	0,5 ^a (0-1)
	8	1,0 ^a (1-1)	1,0 ^a (1-1)	0,0 ^a (0-1)
	24	0,0 ^a (0-1)	0,0 ^a (0-0)	0,0 ^a (0-0)
SC	Semanas	PLA	PLA / PCL	GI
Cápsula	2	2,0 (1-3)	2,5 (1-3)	-
	8	2,0 (1-3)	1,0 (1-3)	-
	24	3,0 (2-3)	3,0 (1-3)	-
Infiltrado	2	1,0 ^a (0-3)	2,0 ^a (0-3)	1,5 ^a (1-3)
	8	1,0 ^a (1-1)	1,0 ^a (1-2)	0,0 ^b (0-1)
	24	1,0 ^a (1-1)	1,0 ^a (0-2)	0,0 ^b (0-0)

Escores de pontuação utilizados: 1-reação leve, 2-reação moderada, 3-reação intensa, 4-reação severa. Análises foram realizadas por meio da técnica de da Hematoxilina-Eosina. Os grupos foram comparados em cada momento pelo teste de Mann-Whitney. Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença estatística ($p \leq 0,05$).

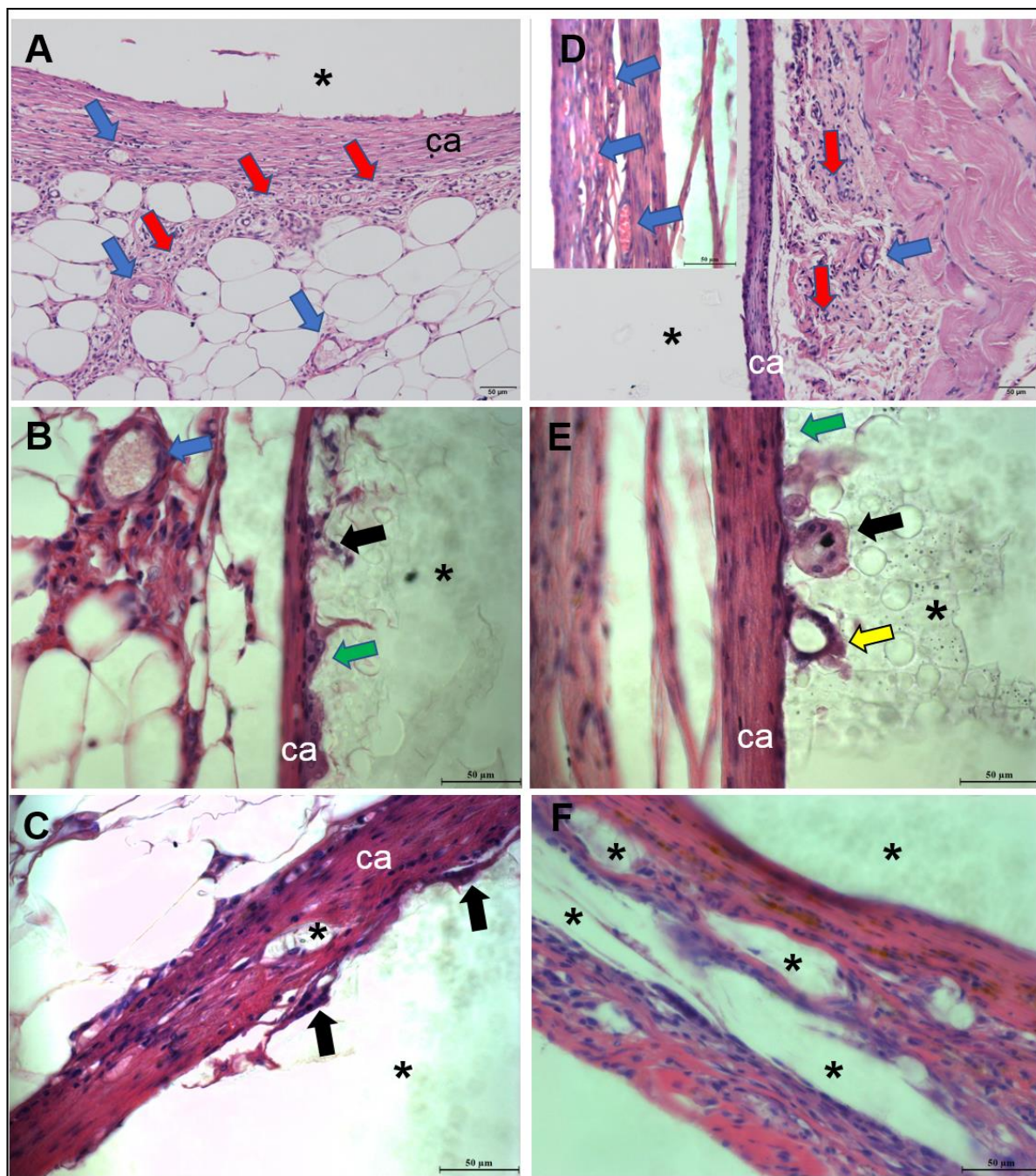


Fig. 5. Fotomicrografias de omento (A, B, C) e pele (D, E, F) de ratos submetidos a implantação de PLA puro corados com o método da Hematoxilina-eosina analisados sob microscopia óptica. Duas semanas pós-implantação IP(A) e SC(D). Discreto infiltrado inflamatório (setas vermelhas) adjacentes a cápsula fibrótica (ca) e vasos sanguíneos na cápsula (neovascularização) em omento e tecido cutâneo com aumento de diâmetro (setas azuis). (*) região de localização do polímero (barra=50μm). Oito semanas pós-implantação IP (B) e SC(E). Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos (seta verde) e projeções citoplasmáticas no polímero (seta preta), células gigantes multinucleadas envolvendo o polímero (seta amarela). (*) região de localização do polímero (barra=20μm). 24 semanas pós-implantação IP(C) e SC(F). Cápsula fibrótica (ca) com presença de células gigantes multinucleadas envolvendo o polímero e projeções citoplasmáticas dos macrófagos envolvendo o polímero (seta preta). (*) região de localização do polímero (barra=20μm).

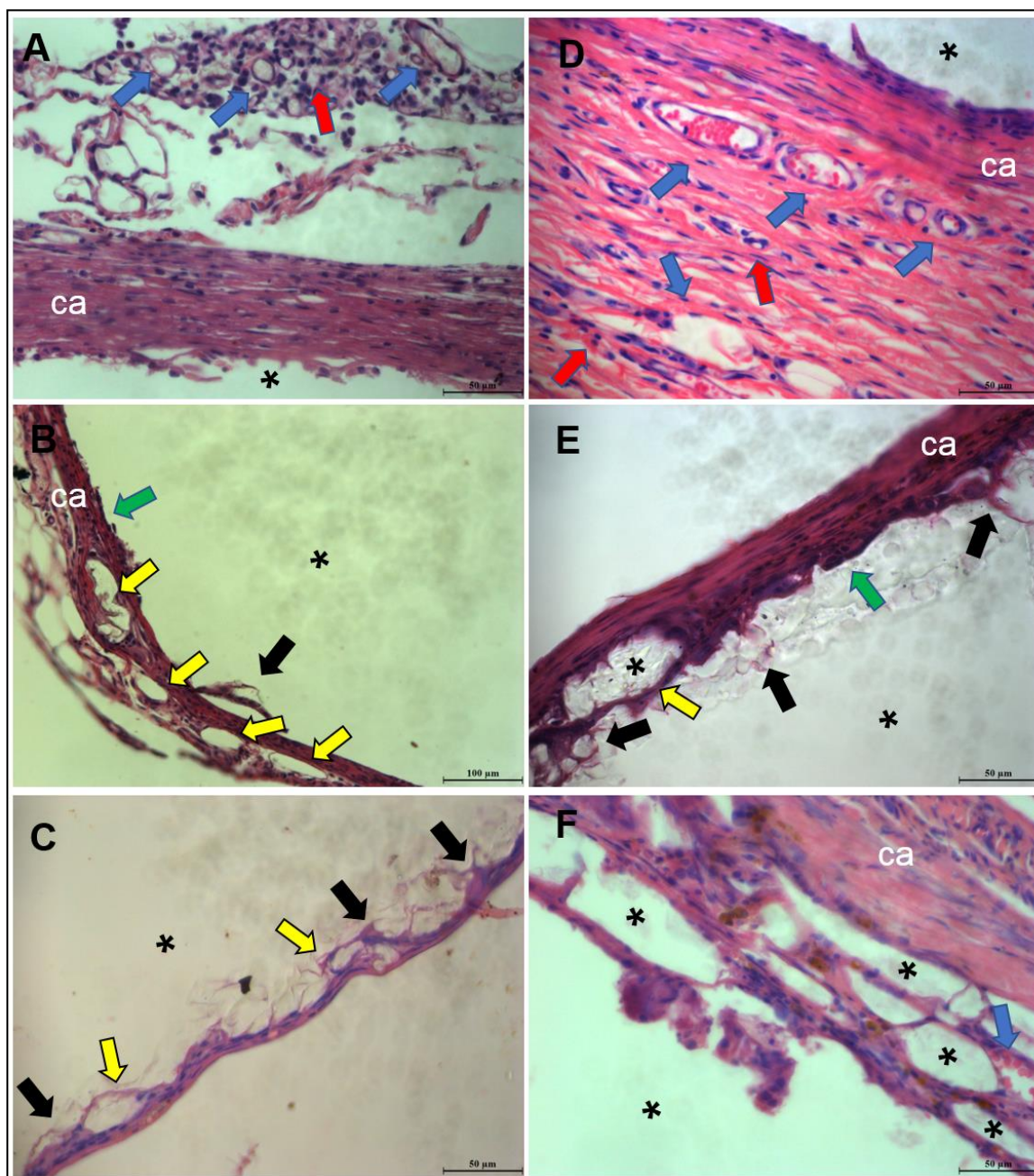


Fig. 6. Fotomicrografias de omento (A, B, C) e pele (D, E, F) de ratos submetidos a implantação de blenda PLA/PCL corados com o método da Hematoxilina-eosina analisados sob microscopia óptica. Duas semanas pós-implantação IP(A) e SC(D). Discreto infiltrado inflamatório (setas vermelhas) no omento e adjacentes a cápsula fibrótica (ca) e vasos sanguíneos na cápsula (neovascularização), em omento com aumento de diâmetro (setas azuis). (*) região de localização do polímero (barra=20µm). Oito semanas pós-implantação IP (B) e SC(E). Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos (seta verde) e projeções citoplasmáticas no polímero (seta preta), células gigantes multinucleadas envolvendo o polímero (seta amarela). (*) região de localização do polímero (B; barra=50µm; E; barra=20µm). 24 semanas pós-implantação IP(C) Cápsula fibrótica com presença de células gigantes multinucleadas envolvendo o polímero (seta amarela) e projeções citoplasmáticas dos macrófagos envolvendo o polímero (seta preta). SC(F). Área focal de crescimento celular com células gigantes multinucleadas fagocitando polímero. (*) região de localização do polímero (barra=20µm).

3.3.1 Coloração Picrosirius-hematoxilina (PSH)

A implantação dos polímeros PLA ou PLA/PCL provocou reação fibrótica com deposição de colágeno ao redor dos biomateriais implantados pela via IP e SC. Levando em consideração o dicroísmo, tanto o PLA como o PLA/PCL, implantados IP, apresentaram maior grau de agregação e compacidade das fibras de colágeno no momento 24 semanas (Fig. 7). Por meio da birrefringência foi observado maior intensidade de fibras colágenas, representadas pela presença de fibras vermelho alaranjadas nos momentos 2, 8 e 24 semanas dos polímeros implantados IP e SC.

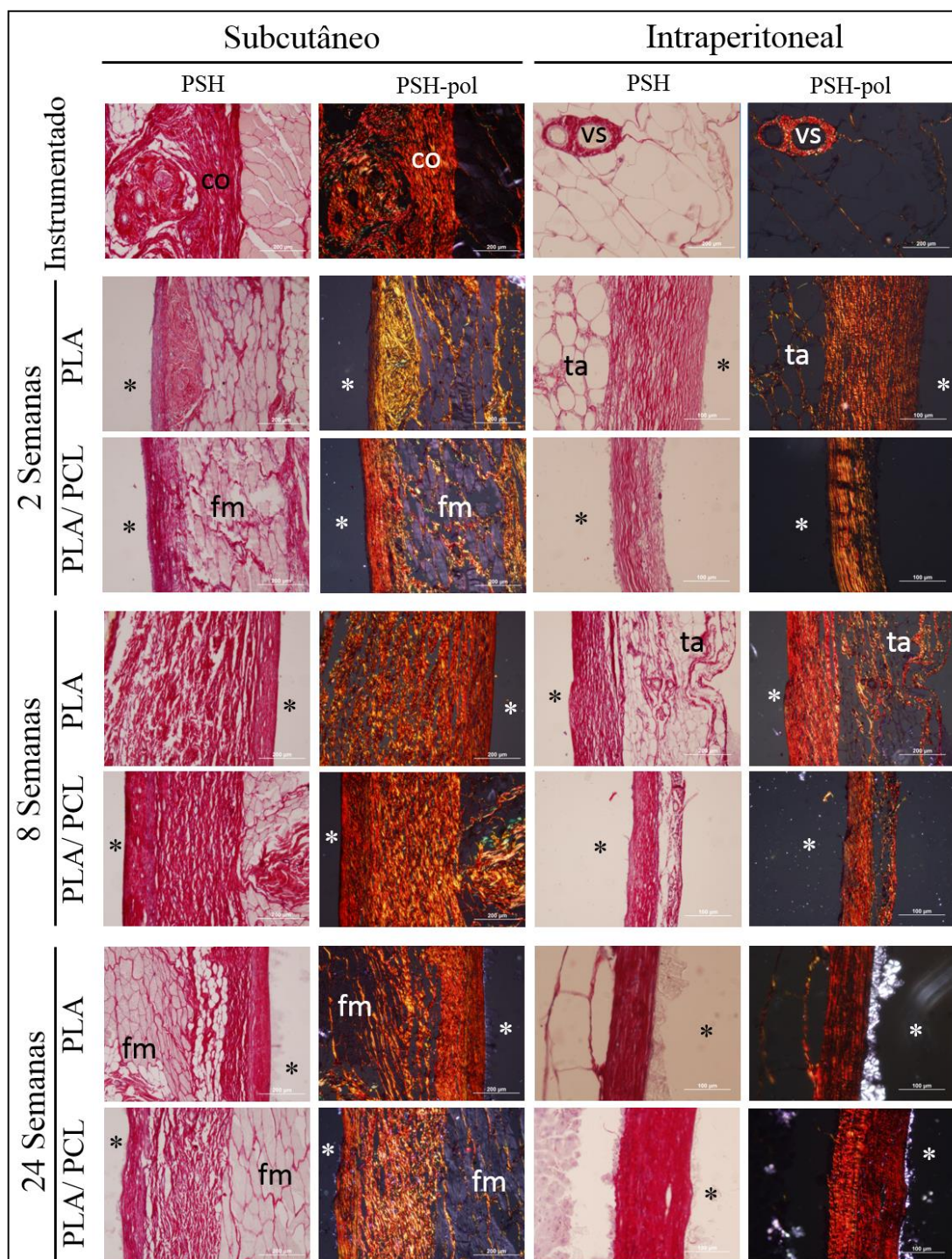


Fig. 7. Fotomicrografias dos cortes histológicos de pele (colunas à esquerda) e de omento (colunas à direita) de ratos Wistar submetidos a implantação de PLA e blenda PLA/PCL corados com o método da Picrossírius-Hematoxilina analisados sob luz policromática (PSH) e sob luz polarizada (PSH-pol). As fibras de colágeno são visíveis em vermelho na luz policromática e apresentam birrefringência e dicroísmo sob o plano de luz polarizada. O comportamento de deposição fibrilar em torno dos diferentes biopolímeros são semelhantes, visualizando um padrão de maior compactação e de maior agregação fibrilar do colágeno nos maiores tempos de implantação dos biopolímeros. (*) região de localização do biopolímero; colágeno (co); vaso sanguíneo (vs); fibras musculares (fm) e tecido adiposo (ta).

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A figura 8 revela micrografias eletrônicas das superfícies criogênicas dos polímeros PLA ou PLA/PCL implantados pela via IP e SC expostos à biodegradação (*in vivo*) e degradação (*in vitro*) por 2,8 e 24 semanas. Na avaliação *in vivo*, após 24 semanas de implantação IP ou SC, a superfície criogênica do PLA e PLA/PCL demonstrou maiores irregularidades em comparação com o início do experimento (Fig. 8). Ainda na avaliação *in vivo*, nos momentos 2 e 8 semanas, notou-se presença de irregularidades no PLA e blenda PLA/PCL quando implantado pela via IP (Fig.8 A, B, D, E).

Observa-se que o PLA puro e a blenda PLA/PCL implantados pela via SC nos momentos 2 e 8 semanas, apresentam alterações semelhantes as observadas na implantação IP (Fig. 8G, H, J, K). Após 24 semanas de biodegradação a blenda PLA/PCL apresentaram maior intensidade de degradação em relação ao PLA quando implantados pela via SC (Fig. 8I, L). A blenda PLA/PCL pela via IP, no mesmo período (24 semanas), apresenta intensidade de degradação semelhante a implantação SC (Fig. 8F, L). O PLA implantado IP apresenta maior intensidade de biodegradação em relação ao PLA pela via SC (Fig. 8C, I). Porém, tanto o PLA implantado SC como IP demonstraram menor grau de biodegradação em relação a blenda PLA/PCL implantados IP e SC. Finalmente, na degradação *in vitro*, o PLA apresentou maior degradação após 8 semanas em relação aos momentos 2 e 24 semanas (Fig. 8 M, N, O). A blenda PLA/PCL apresentou maiores irregularidades nos mesmos momentos (Fig. 8 P, Q, R).

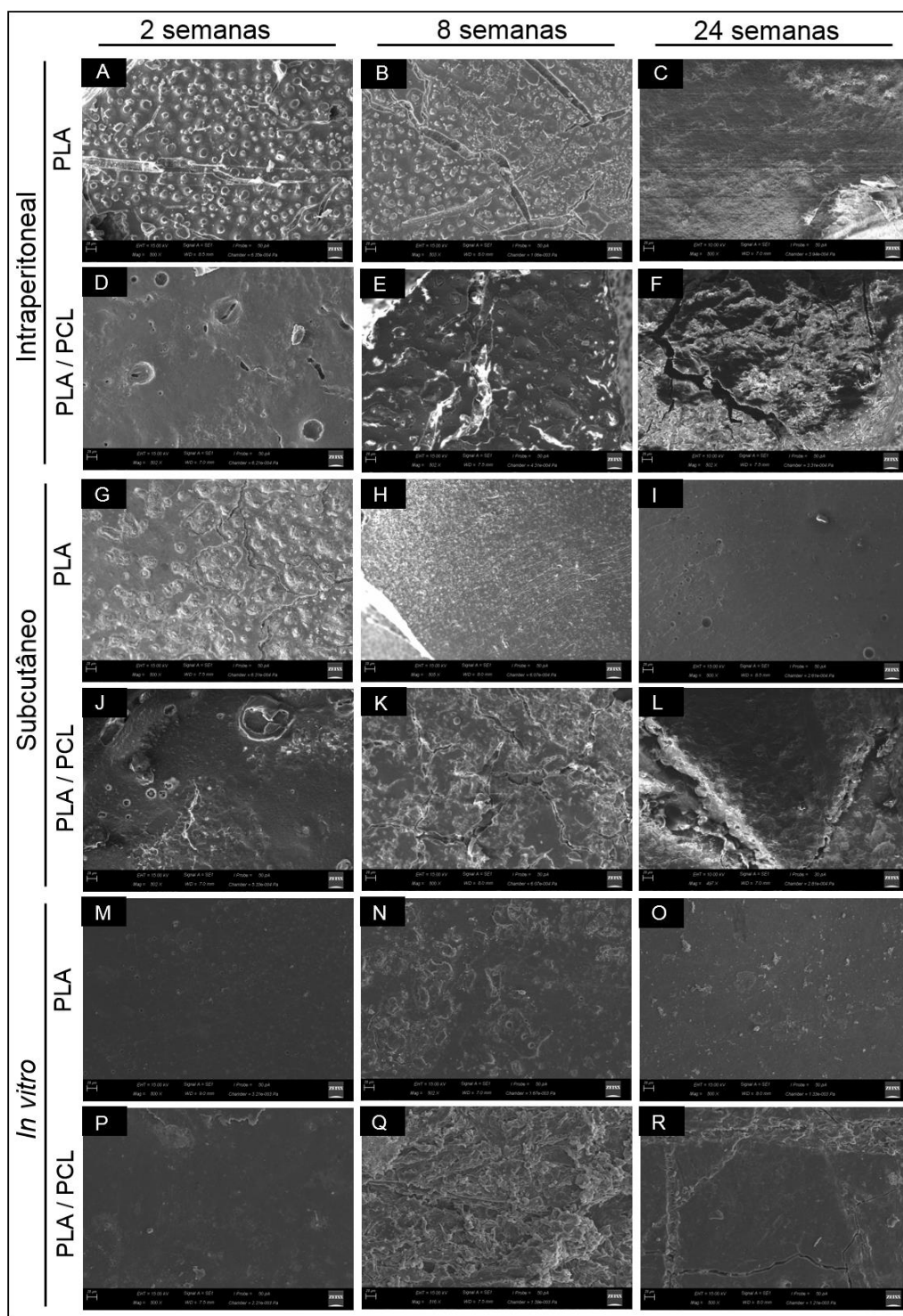


Fig. 8. Morfologia de fraturas criogênicas do PLA e blenda PLA/PCL pós-implantação intraperitoneal e subcutâneo em ratos Wistar e degradadas *in vitro*. Observada por meio de microscopia eletrônica de varredura (x500). PLA intraperitoneal (A, B, C). (A) 2 semanas; (B) 8 semanas; (C) 24 semanas. Blenda PLA/PCL intraperitoneal (D, E, F). (D) 2 semanas; (E) 8 semanas; (F) 24 semanas. PLA subcutâneo (G, H, I). (G) 2 semanas; (H) 8 semanas; (I) 24 semanas. Blenda PLA/PCL subcutâneo (J, K, L). (J) 2 semanas; (K) 8 semanas; (L) 24 semanas. PLA *in vitro* (M, N, O). (M) 2 semanas; (N) 8 semanas; (O) 24 semanas. Blenda PLA/PCL *in vitro* (P, Q, R). (P) 2 semanas; (Q) 8 semanas; (R) 24 semanas.

4. Discussão

Esse estudo pré-clínico foi pioneiro ao avaliar o efeito da blenda PLA/PCL com 71,43% em massa de Poli(ácido lático); 23,81% em massa de Poli(ϵ -caprolactona) e 4,76% em massa de compatibilizante sobre ratos Wistar. O principal resultado desta pesquisa foi que, nas avaliações agudas ou crônicas, o PLA puro e a blenda PLA/PCL implantados pela via intraperitoneal ou subcutânea foram seguros em ratos Wistar. Os resultados do teste de campo aberto (CA) e filamentos de von Frey (FvF) sugeriram que os biomateriais aqui utilizados não causaram alterações inflamatórias capazes de modificar o comportamento, bem como não produziram resposta álgica nos ratos. Análises histopatológicas e microscopia eletrônica indicaram biocompatibilidade e biodegradação parcial do PLA e da blenda PLA/PCL.

As variáveis comportamentais avaliadas indicaram que os biomateriais implantados por via IP e SC não foram capazes de produzir alterações nos ratos. Exceto para o grupo CI, que apresentou reduções na frequência de locomoção, frequência de levantar, com aumento na frequência de *grooming*. Estes resultados foram indicativos de comportamento anormal (Moranza et al., 2017). Como descrito na literatura, a administração parenteral de LPS estimula liberação de interleucina (IL)-1, IL-6 e prostaglandina E₂ (PGE₂), mediadores pró-inflamatórios associados à resposta inflamatória sistêmica que, inclusive pode ocasionar febre. Respostas comportamentais associadas à inflamação e depressão diminuem a atividade locomotora e exploratória de ratos (Cartmell et al., 2000; Cartmell et al., 2001; Rummel et al., 2005; Swiergiel e Dunn, 2007; Li et al., 2015; Biesmans et al., 2016).

Anderson et al. (2008) e Ramot et al. (2016) reportaram que a implantação de biomateriais podem liberar citocinas pró-inflamatórias como, IL-1, IL-4, IL-6 e IL-13. Porém, os ratos que receberam os biopolímeros PLA ou a blenda PLA/PCL pela via IP e SC não apresentaram as mesmas características em relação aos ratos que receberam aplicação de LPS, indicando segurança relativa à possíveis respostas sistêmicas indesejáveis.

Os filamentos de von Frey medem hiperalgesia cutânea e alodinia. O teste de limiar nociceptivo envolve aplicação de estímulo mecânico na superfície cutânea até que resposta comportamental seja observada. Condições clínicas que apresentam

aumento de sensibilidade cutânea, tais como a dor neuropática, dor pós-operatória, inflamação ou osteoartrite podem ser quantificadas por meio da aplicação dos filamentos de von Frey (Gregory et al, 2013). A pressão cutânea suportada nos dias posteriores à implantação sugeriu que o processo inflamatório causado pelo procedimento cirúrgico e a implantação do PLA ou blenda PLA/PCL não foram capazes de promover hipersensibilidade local. A avaliação da sensibilidade cutânea e variáveis comportamentais podem ser analisadas conjuntamente, fornecendo informações importantes ligadas à inflamação e a dor. Assim, a supressão do comportamento como, atividade exploratória dos roedores está ligada a falta de bem-estar, causada, notadamente, pelo processo doloroso (Cortright et al., 2008; Gregory et al., 2013).

Os resultados comportamentais supramencionados, em conjunção com as análises histopatológicas aqui obtidas permitem afirmar que os biomateriais PLA ou PLA/PCL possuem algumas características que podem favorecer a utilização biomédica, tais como, não tóxico, não trombogênico e não carcinogênico. Ademais, a interação da superfície do biomaterial ao tecido culmina com início da resposta inflamatória que é finalizada pelo reparo tecidual (Williams, 2008). Desta maneira, infiltrado inflamatório mononuclear discreto, observado nas análises histopatológicas, duas semanas após implantação intraperitoneal ou subcutânea, está intimamente ligada ao fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) (Klopfleisch e Jung, 2017). Os macrófagos são os principais mediadores que coordenam uma complexa reação celular junto a plaquetas e fibroblastos, que atraem células endoteliais para formar novos capilares, cápsula fibrótica, permitindo regeneração tecidual (Lehle et al., 2004; Litbarg et al., 2007; Ciambelli et al., 2013; Ramot et al., 2016). Ainda, a presença de cápsula fibrótica e macrófagos observada nas lâminas de histologia duas semanas pós-implantação intraperitoneal e subcutânea, e a formação de células gigantes representativas da reação de corpo estranho, encontrados nos momentos 8 e 24 semanas estão associados a degradação e absorção do biomaterial (De Jong et al., 2005; Ciambelli et al, 2013; Pogorielov et al., 2018).

Neste contexto, a formação da capsula fibrótica circundante ao biomaterial, observada no presente estudo, pode ser influenciada por fatores de crescimento pró-fibróticos e angiogênicos. Esses fatores atraem fibroblastos e células endoteliais à

superfície do biomaterial formando tecido de granulação (Klopfleisch e Jung, 2017). Esse tecido de granulação é substituído por fibras colágenas que se apresentam organizadas ao entorno do biomaterial aos sete dias pós-implantação (Ciambelli et al. (2013). A coloração com picrossírius-hematoxilina em microscopia de luz polarizada indicou presença de colágeno tipo I, revelada pela birrefringência e coloração vermelha alaranjada nas análises de duas semanas pós-implantação (Ribeiro et al., 2015). A presença de colágeno tipo I, duas semanas após a implantação intraperitoneal ou subcutânea, reforçaram a afirmação feita por Anderson et al. (2008) que, a resolução das respostas inflamatórias agudas ou crônicas, geralmente duram duas semanas, quando utilizados biomateriais biocompatíveis. A coloração mais intensa observada no momento 24 semanas pós-implantação demonstraram maior organização e compacidade das fibras de colágeno podendo-se considerar que o biomaterial não causou reação adversa (Zhang et al., 2005).

Ramot et al. (2016) descreveram que a biocompatibilidade e biodegradação dos biomateriais estão relacionadas a fatores intrínsecos ao próprio material. Interessante que, nas implantações pela via intraperitoneal, alguns implantes não aderiram ao omento. Esses resultados podem apontar para características intrínsecas da blenda PLA/PCL como menos reativa, podendo permanecer na cavidade abdominal por tempo indeterminado. Estes achados sugeriram que mais estudos são necessários para que os biopolímeros aqui estudados possam se tornar viáveis como alternativa às abraçadeiras auto-travantes de *nylon*. Estas últimas são reportadas na literatura como causadores de complicações após ovariectomia (Mesquita et al., 2015).

A análise de MEV auxiliou na compreensão da interação tecido/ biomateriais e biodegradação. Observamos degradação mais evidente na blenda PLA/PCL no momento 24 semanas, quando implantados pela via IP e SC. O PLA implantado IP demonstrou maior biodegradação em relação ao PLA via SC. Nesse sentido, Ciambelli et al. (2013) observaram biodegradação semelhante pós-implantação subcutânea em ratos. Da mesma forma, Pogorielov et al. (2018) relataram que implantação intraperitoneal pode provocar biodegradação mais acentuada devido ao contato com o fluido peritoneal.

Finalmente, algumas lacunas do presente estudo podem ser assinaladas como avaliação da liberação de mediadores inflamatórios como interleucinas, pois esta revelaria potencial inflamatório real da implantação dos biomateriais. Esta análise, em associação aos resultados comportamentais e reflexivos aqui apresentados, elucidariam por completo as respostas fisiológicas à implantação. Adicionalmente, testes de imuno-histoquímica para macrófagos reativos demonstrariam o potencial para biodegradação dos biomateriais implantados.

5. Conclusão

Os achados desta pesquisa forneceram informações importantes acerca da biocompatibilidade, bem como da biodegradação da blenda PLA/PCL e do PLA puro. Foi possível compreender o comportamento destes biomateriais frente a implantação pela via intraperitoneal ou subcutânea nos ratos. Assim, a blenda PLA/PCL apresentou características de biocompatibilidade e biodegradação promissoras possuindo potencial para ser utilizada nas áreas biomédicas e veterinárias.

6. Referencias

- Anderson, J.M., Rodriguez, A., Chang, D.T., 2008. Foreign body reaction to biomaterials. In *Seminars in immunology* 20(2), 86-100
- Barreto, T.R., Costola-de-Souza, C., Margatho, R.O., Queiroz-Hazarbassanov, N., Rodrigues, SC, Felício, L.F., Zager, A., 2018. Repeated domperidone treatment modulates pulmonary cytokines in LPS-induced acute lung injury in mice. *International immunopharmacology*, 56, 43-50.
- Biesmans, S., Matthews, L. J., Bouwknecht, J. A., De Haes, P., Hellings, N., Meert, T. F., Ver Donck, L., 2016. Systematic analysis of the cytokine and anhedonia response to peripheral lipopolysaccharide administration in rats. *BioMed research international*, 1-14.

- Boden, R., Burgess, E., Enion, D., Srinivasan, M., 2012. Use of bioabsorbable knotless suture anchors and associated accelerated shoulder arthropathy. In *Orthopaedic Proceedings. The British Editorial Society of Bone & Joint Surgery*. 94, 138-138.
- Buscemi, S., Palumbo, V.D., Maffongelli, A., Fazzotta, S., Palumbo, F.S., Licciardi, M., Buscemi, G., 2017. Electrospun PHEA-PLA/PCL Scaffold for Vascular Regeneration: A Preliminary in Vivo Evaluation. In *Transplantation proceedings*, 49(4), 716-721.
- Cartmell, T., Poole, S., Turnbull, A.V., Rothwell, N.J., Luheshi, G.N., 2000. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *The Journal of physiology*, 526(3), 653-661.
- Cartmell, T., Luheshi, G.N., Hopkins, S.J., Rothwell, N.J., Poole, S., 2001. Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat. *The Journal of physiology*, 531(1), 171-180.
- Ciambelli, G.S., Perez, M.O., Siqueira, G.V., Candella, M.A., Motta, A.C., Duarte, M. A.T., Duek, E.A.D.R., 2013. Characterization of poly (L-co-D, L Lactic Acid) and a study of polymer-tissue interaction in subcutaneous implants in wistar rats. *Materials Research*, 16(1), 28-37.
- Cortright, D.N., Matson, D.J., Broom, D.C., 2008. New frontiers in assessing pain and analgesia in laboratory animals. *Expert opinion on drug discovery*, 3(9), 1099-1108.
- De Jong, W.H., Bergsma, J.E., Robinson, J.E., Bos, R.R., 2005. Tissue response to partially in vitro predegraded poly-L-lactide implants. *Biomaterials*, 26(14), 1781-1791.
- Dias, P.P., Chinelatto M.A., 2018. Effect of poly(ϵ -caprolactone-b-tetrahydrofuran) triblock copolymer concentration on morphological, thermal and mechanical properties of immiscible PLA/PCL blends, *Journal of Renewable Materials*, 7(2), 129-138.
- Finotti, P.F., Costa, L.C., Capote, T.S., Scarel-Caminaga, R.M., Chinelatto, M.A., 2017. Immiscible poly (lactic acid)/poly (ϵ -caprolactone) for temporary implants: compatibility and cytotoxicity. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 68, 155-162.

- Fournier, E., Passirani, C., Montero-Menei, C.N., Benoit, J.P., 2003. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials*, 24(19), 3311-3331.
- Gregory, N.S., Harris, A.L., Robinson, C.R., Dougherty, P.M., Fuchs, P.N., Sluka, K.A., 2013. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *The Journal of Pain*, 14(11), 1255-1269.
- Höglund, O.V., Ingman, J., Södersten, F., Hansson, K., Borg, N., Lagerstedt, A.S., 2014. Ligation of the spermatic cord in dogs with a self-locking device of a resorbable polyglycolic based co-polymer—feasibility and long-term follow-up study. *BMC research notes*, 7(1), 825.
- Kastellorizios, M., Papadimitrakopoulos, F., Burgess, D.J., 2015. Prevention of foreign body reaction in a pre-clinical large animal model. *Journal of Controlled Release*, 202, 101-107.
- Klopfleisch, R., Jung, F., 2017. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(3), 927-940.
- Lam, C.X., Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Woodruff, M.A., & Teoh, S.H., 2009. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 90(3), 906-919.
- Langer, R., Basu, A., Domb, A.J., 2016. Special issue: Polylactide (PLA) Based Biopolymers. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 1.
- Lasprilla, A.J., Martinez, G.A., Lunelli, B.H., Jardini, A.L., Maciel Filho, R., 2012. Polylactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review. *Biotechnology advances*, 30(1), 321-328.
- Lee, E.J., Huh, B.K., Kim, S.N., Lee, J.Y., Park, C.G., Mikos, A.G., Choy, Y.B., 2017. Application of materials as medical devices with localized drug delivery capabilities for enhanced wound repair. *Progress in materials science*, 89, 392-410.

- Lehle, K., Lohn, S., Reinerth, G., Schubert, T., Preuner, J.G., Birnbaum, D.E., 2004. Cytological evaluation of the tissue–implant reaction associated with subcutaneous implantation of polymers coated with titaniumcarboxonitride in vivo. *Biomaterials*, 25(24), 5457-5466.
- Li, R., Zhao, D., Qu, R., Fu, Q., Ma, S., 2015. The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Neuroscience letters*, 594, 17-22.
- Litbarg, N.O., Gudehithlu, K.P., Sethupathi, P., Arruda, J. A., Dunea, G., Singh, A. K., 2007. Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. *Cell and tissue research*, 328(3), 487-497.
- Macedo, A.S., Dal-Bó, Í.D.S., de Quadros, A.M., Brambatti, G., dos Reis, K.D.H.L., Brun, M.V., Beck, C.D.C., 2012. Complications associated with ovariectomy using nylon tie-rap as an hemostatic method. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(4).
- McGovern, J.A., Griffin, M., Hutmacher, D.W., 2018. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease models & mechanisms*, 11(4), dmm033084.
- Mesquita, L.R., Rahal, SC, Matsubara, L.M., Mamprim, M.J., Foschini, C.R., Faria, L. G., Kano, W.T., 2015. Bilateral hydronephrosis and hydroureter after ovariectomy using nylon cable tie: a case report. *Vet Med-Czech*, 60(1), 52-6.
- Moranza, H.G., Scanavaca J.L., Mataqueiro M.I., Ferraz G.C., 2017. Chronic administration of *Bauhinia forficata* link reduced exploratory activity without affecting blood glucose in healthy rats. *Plant*, 5, 27-32.
- Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 32(8-9), 762-798.
- Nikoubashman, O., Heringer, S., Feher, K., Brockmann, M.A., Sellhaus, B., Dreser, A., Kiebling, F., 2018. Development of a Polymer-Based Biodegradable Neurovascular Stent Prototype: A Preliminary In Vitro and In Vivo Study. *Macromolecular bioscience*, 1700292.

- Nyska, A., Schiffenbauer, Y.S., Brami, C.T., Maronpot, R.R., Ramot, Y., 2014. Histopathology of biodegradable polymers: Challenges in interpretation and the use of a novel compact MRI for biocompatibility evaluation. *Polymers for Advanced Technologies*, 25(5), 461-467.
- Pogorielov, M., Hapchenko, A., Deineka, V., Rogulska, L., Oleshko, O., Vodseďálková, K., Erben, J., 2018. In vitro degradation and in vivo toxicity of NanoMatrix3D® polycaprolactone and poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 106A,2200–2212
- Ramot, Y., Haim-Zada, M., Domb, A.J., Nyska, A., 2016. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 153-162.
- Rédua, M.A., Valadão, C.A., Duque, J.C., Balestrero, L.T., 2002. The pre-emptive effect of epidural ketamine on wound sensitivity in horses tested by using von Frey filaments. *Veterinary anaesthesia and analgesia*, 29(4), 200-206.
- Ribeiro, F.D.A.Q., de Carvalho, M.D.F.P., Pereira, C.S.B., Tateno, D. A., 2015. Analysis of the concentration of collagen type I and III in the wound of rat´s skin treated with Mitomycin C. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, 60(1), 22-26.
- Ruan, M.Z., Patel, R.M., Dawson, B.C., Jiang, M.M., Lee, B.H.L., 2013. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. *Osteoarthritis and cartilage*, 21(9), 1355-1364.
- Rummel, C., Barth, S. W., Voss, T., Korte, S., Gerstberger, R., Hubschle, T., Roth, J. 2005. Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways?. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(2), 340-347.
- Saini, P., Arora, M., Kumar, M.R., 2016. Poly (lactic acid) blends in biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 107, 47-59.
- Sengupta, P., 2013. The laboratory rat: relating its age with human's. *International journal of preventive medicine*, 4(6), 624.
- Shahrezaee, M., Salehi, M., Keshtkari, S., Oryan, A., Kamali, A., Shekarchi, B., 2018. In vitro and in vivo investigation of PLA/PCL scaffold coated with metformin-loaded gelatin nanocarriers in regeneration of critical-sized bone

defects. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(7), 2061-2073.

Swiergiel, A. H., Dunn, A. J., 2007. Effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 86(4), 651-659.

Van Der Eng, D.M., Schep, N.W., Schepers, T., 2015. Bioabsorbable versus metallic screw fixation for tibiofibular syndesmotic ruptures: a meta-analysis. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 54(4), 657-662.

Williams, D.F., 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.

Yao, Q., Cosme, J. G., Xu, T., Miszuk, J.M., Picciani, P.H., Fong, H., Sun, H., 2017. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials*, 115, 115-127.

Zhang, H. A., Sun, L., Wang, W., & Ma, X. (2006). Quantitative analysis of fibrosis formation on the microcapsule surface with the use of picro-sirius red staining, polarized light microscopy, and digital image analysis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 76(1), 120-125.