

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/08/2019.

**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	<p>Conde, Gabriel</p> <p>Biocompatibilidade do biopolímero PLA e blenda PLA/PCL em ratos Wistar / Gabriel Conde. -- Jaboticabal, 2019</p> <p>69 p. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Guilherme de Camargo Ferraz</p> <p>Coorientadora: Paola Castro Moraes</p> <p>1. Biossegurança. 2. Biodegradação. 3. Poli(ácido lático). 4. Poli(-caprolactona). 5. Compatibilizante. I. Título.</p>
-------	--

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, truco 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 A 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.



Prof.ª Dr.ª 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 picosirius-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 lático) puro implantados pela via intraperitoneal (IP) e subcutâneo (SC); PLA/PCL = blenda 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 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 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, ($n = 12$).....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.

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., Bami, 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.