

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

VERÔNICA HONDA GOMES DE OLIVEIRA

**Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos
com membrana de PCL e membrana de colágeno porcino - Análise
microscópica**

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

VERÔNICA HONDA GOMES DE OLIVEIRA

**Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos
com membrana de PCL e membrana de colágeno porcino - Análise
microscópica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel
em Odontologia.

Orientadora: Prof. Assist. Dra. Ana Paula
Farnezi Bassi

**Araçatuba – SP
2015**

À Eliana Tomie Honda, minha mãe, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Seu cuidado e dedicação me deram, em alguns momentos, a esperança para seguir em frente, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida, e não somente estes anos como graduanda, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. João Eduardo Gomes Filho que me proporcionaram a oportunidade de me graduar em Odontologia.

À todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter no processo de formação profissional. À professora Ana Paula Farnezi Bassi, pela orientação e apoio, confiança e dedicação que em mim foram depositados durante a elaboração desse trabalho.

À minha mãe Eliana Tomie Honda, que me apoiou e incentivou nas horas difíceis, não permitindo que desânimo e cansaço dessem lugar à determinação e a persistência. Todo o seu amor, carinho e zelo desde o dia da minha chegada ao mundo. Muito obrigada!

Meus agradecimentos aos amigos, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação, contribuíram para que eu não esquecesse das coisas que realmente importam e que continuarão presentes em minha vida com certeza. À bateria Surubateria – Unesp Araçatuba, a qual dediquei anos na estruturação dessa entidade acadêmica e aos grandes amigos que me proporcionou.

“O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que é. Se insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa, é possível que acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la. Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la, mesmo que não a tenha no começo.”

Mahatma Gandhi

OLIVEIRA, V.H.G. **Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de PCL e membrana de colágeno porcino: análise microscópica.** 2015. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

O uso de biomateriais que auxiliem no processo de reparo ósseo vem sendo uma das vertentes de pesquisas em reparo ósseo, uma vez que ainda não foi desenvolvido nenhum material que tenha as mesmas características do osso autógeno. Os chamados *scaffolds* têm por objetivo suportar o crescimento celular e desta forma servir como um suporte para o crescimento, proliferação e desenvolvimento de tecidos específicos. Recentemente esta sendo desenvolvida na Faculdade de São Carlos uma membrana a base de nano fibras de ϵ policaprolactona (PCL) que é um polímero biodegradável com um ritmo controlável de degradação, mantendo a estrutura durante um maior período do crescimento celular. Desta forma o objetivo deste projeto será avaliar por meio da análise histológica e histométrica o potencial de auxiliar na neoformação óssea da membrana de PCL com 5% de HA e da membrana Porcina (Bio-Gide) no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos, aos 30 e 60 dias.

Palavras-chaves: processo de reparo. Mantas. Biodegradáveis.

OLIVEIRA, V.H.G. Repair process evaluation in skulls from defects in mice with membrane PCL and porcine collagen membrane: microscopical analysis. 2015.
47 f. Completion of course work (Bachelor) - College of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

The use of biomaterials that help in the bone repair process has been one of the research strands in bone repair, as it still has not been developed any material that has the same characteristics of autogenous bone. The so-called scaffolds are designed to support cell growth and thus serve as a support for the growth, proliferation and development of specific tissues. Recently, this being carried out at the São Carlos University a membrane based nano fibers ϵ -polycaprolactone (PCL) is a biodegradable polymer having a controllable rate of degradation, the holding structure for a longer period of cell growth. Thus the objective of this project is to evaluate through histological analysis and histometric the auxiliary potential bone of PCL membrane neoformation with 5% HA and Porcine membrane (Bio-Gide) in the process of repair of critical bone defects in skulls rats, at 30 and 60 days.

Keywords: Repair process. Membrane. Biodegradable.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Membrana de PCL. B. Membrana de colágeno porcino 18
- FIGURA 2 - A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Trefina de 8mm. C. Remoção da cortical da região de calvária 20
- FIGURA 3 - Grupo Controle (GC). Coto direito. 30 dias. 40X de aumento. Discreta neoformação indicada pela seta. 22
- FIGURA 4 - Grupo Controle (GC). Centro do defeito. 30 dias. 40x de aumento. Ausência de crescimento ósseo. Formação de tecido conjuntivo fibroso (T.C). 22
- FIGURA 5 - Grupo Controle (GC). Coto esquerdo. 30 dias. 40X de aumento. Discreta neoformação indicada 22
- FIGURA 6 - Grupo Controle (GC). Coto esquerdo. 30 dias. 400x de aumento. Observar atividade de neoformação óssea junto ao coto (TON) (seta preta). Nota-se ainda tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela). Observa-se presença de osteócitos (seta azul) e osteoblastos (seta verde). 23
- FIGURA 7 - Grupo Controle (GC). Centro do defeito. 60 dias. 40x de aumento. Ausência de neoformação óssea. Presença de tecido conjuntivo fibroso (seta amarela). 24
- FIGURA 8 - Grupo Controle (GC). Coto esquerdo. 60 dias. 40x de aumento. Discreta neoformação óssea (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela B. Grupo Controle (GC)). 24
- FIGURA 9 - Grupo Controle (GC). Coto direito. 60 dias. 400x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), linha de osteotomia (LO) (seta verde) e osteócitos (seta azul). 25
- FIGURA 10 - Grupo Controle (GC). Centro defeito. 60 dias 400x de aumento. Ausência de tecido ósseo neoformado (TON). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela). Observa-se a presença de neutrófilos (seta vermelha).. 25
- FIGURA 11 A e B - Grupo PCL Coto direito e esquerdo. 30 dias. 40x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), linha de osteotomia (LO) (seta verde) e osteócitos (seta azul) e membrana (seta vermelha). 26
- FIGURA 12 - Grupo PCL. Região central do defeito. 30 dias. 40 x de aumento. A região exhibe tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido

conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), e osteócitos (seta azul) e membrana (seta vermelha). 26

FIGURA 13 A e B - Grupo PCL Coto direito e esquerdo. 60 dias. 40x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), linha de osteotomia (LO) (seta verde) e osteócitos (seta azul). 27

FIGURA 14 - Grupo PCL Região central. 60 dias. 40x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), e osteócitos (seta azul). Fechamento completo do defeito.. 27

FIGURA 15 A e B - Bio-Gide® (BG). Coto direito e esquerdo. 30 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela) 28

FIGURA 16 - Bio-Gide® (BG). Centro do defeito. 30 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), membrana remanescente (seta azul).. 28

FIGURA 17 - Bio-Gide® (BG). Coto esquerdo. 30 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), TON nos espaços da membrana (seta verde), presença de membrana remanescente (seta azul), membrana remanescente integrada ao tecido ósseo neoformado (seta vermelha), tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela). 29

FIGURA 18 - Bio-Gide® (BG). Coto direito. 30 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), TON nos espaços da membrana, presença de membrana remanescente (seta verde), membrana remanescente (seta vermelha), tecido osteóide (seta amarela) e osteócitos (seta azul).. 30

FIGURA 19 - Bio-Gide® (BG). Centro do defeito. 30 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), membrana remanescente (seta azul), tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), membrana remanescente integrada a tecido ósseo neoformado (seta verde) e osteócitos (seta vermelha). 30

FIGURA 20 - (Bio-Gide® BG). Coto direito. 60 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela) e tecido osteóide (seta azul). 31

FIGURA 21 - Bio-Gide® (BG). Coto esquerdo. 60 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), tecido osteóide (seta azul). 31

FIGURA 22 - Bio-Gide® (BG). Centro do defeito. 60 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), tecido osteóide (seta azul). 32

FIGURA 23 - Bio-Gide® (BG). Coto esquerdo. 60 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), tecido osteóide (seta azul) e osteócito (seta verde). 33

FIGURA 24 - Bio-Gide® (BG). Coto esquerdo. 60 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), tecido osteóide (seta azul) e osteócito (seta verde). 33

FIGURA 25 - Bio-Gide® (BG). Centro do defeito. 60 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido osteóide (seta azul) e osteócitos (seta verde).. 34

LISTA DE ABREVIATURAS

BG = Bio-Gide®

GC = grupo controle

HA = hidroxiapatita

HE = hematoxilina e eosina

LO = linha de osteotomia

nHA = nanohidroxiapatita

PCL = poli-caprolactona

PEG = poli-etileno-glicol

PGA = ácido poli-glicólico

PLA = ácido poli-láctico

PVP = poli-N-vinilpirrolidona

PVPI = polivinil pirrolidona iodo

TC = tecido conjuntivo

TON = tecido ósseo neoformado

SUMÁRIO

1 Introdução	11
1.1 Polímeros sintéticos biodegradáveis	12
1.2 Polímeros naturais biodegradáveis	14
1.3 Proposição	16
2 Materiais e métodos	17
2.1 Desenvolvimento da manta de PCL	17
2.2 Amostras	17
2.3 Cirurgia experimental	19
2.4 Etapa laboratorial	20
2.5 Análise histológica	21
3 Resultados	22
4 Discussão	35
5 Conclusão	39
Referências	40

1 INTRODUÇÃO

Grande parte da população mundial sofre por perdas ósseas provenientes de tumores, traumas e patologias ósseas. Uma variedade de manobras clínicas foi desenvolvida para minimizar esses defeitos ósseos, como o enxerto autógeno, homogêneo, heterógeno e aloplástico.¹⁻³ Entre esses, o enxerto ósseo autógeno ainda é considerado o padrão ouro, porém apresenta desvantagens como quantidade de osso disponível e morbidade no período pós-cirúrgico.^{4,5}

Nesse sentido, uma ampla linha de pesquisa tem se desenvolvido para o aprimoramento de biomateriais que auxiliem no reparo do tecido ósseo e até mesmo o substitua; materiais como: polímeros naturais (colágeno, fibrina, ácido hialurônico, quitosano) e sintéticos (ácido poli-glicólico (PGA), ácido poli-láctico (PLA) e policaprolactona (PCL)), cerâmicas (beta-tricálcio fosfato, hidroxiapatita sintética, vidro bioativo) e metais (titânio, tântalo), apresentam propriedades desejáveis para o reparo ósseo.⁵

Segundo Jones⁶, o biomaterial ideal deveria apresentar características como biocompatibilidade, não ser carcinogênico, estabilidade mecânica, peso e densidade adequados, custo baixo, ser reprodutível e de ampla fabricação, estimular reações biológicas favoráveis, apresentar longevidade ou ser absorvível, e, se necessário, liberar íons.

Além das propriedades anteriormente citadas, um substituto ósseo especificamente deve apresentar também propriedade osteoindutora ou osteocondutora, fácil manipulação, preenchimento eficiente de cavidades, auxílio na recomposição ou regeneração do tecido ósseo e custo acessível. Na osteocondução, o biomaterial deve funcionar como um suporte para as células osteoprogenitoras facilitando dessa maneira o crescimento das células ósseas em sua direção. Na osteoindução há a necessidade de diferenciação celular através de proteínas osteoindutoras após a colocação do biomaterial no local.⁷

Como material de escolha para suporte do crescimento celular, os polímeros vêm se destacando no desenvolvimento de *scaffolds*, por possuir uma estrutura que mimetiza a matriz extracelular e permite crescimento, proliferação, migração e

diferenciação de tecidos específicos para um futuro implante.⁸ A matriz extracelular é composta de uma interligação de fibras proteicas (colágeno, elastina), proteoglicanas e depósitos de minerais no caso do tecido ósseo. Os polímeros desenvolvidos para *scaffolds* podem ser ou não biodegradáveis, possuem propriedades hidrofílicas, químicas, físicas e mecânicas necessárias para permitir o crescimento celular.⁹

As propriedades mecânicas desejáveis dos *scaffolds* incluem estabilidade mecânica, porosidade, química de superfície, interconectividade dos poros e biocompatibilidade. O tamanho adequado dos poros e 100% da interconectividade entre os poros não só fornecem a migração e proliferação de osteoblastos, mas também permitem a difusão de vários fatores de crescimento e a rápida vascularização.¹⁰

1.1 Polímeros sintéticos biodegradáveis

Dentre os polímeros sintéticos incluem a poli-caprolactona (PCL), poli-ácido láctico (PLA), poliuretana, copolímeros de poli-etileno-glicol (PEG) e ácido poliglicólico (PGA) entre outros. Adicionalmente, fibras compostas podem ser criadas, tais como nanofibras de quitosana-poli-vinil-alcool, seda, e com nanopartículas de hidroxiapatita.¹¹ Dois dos polímeros mais estudados são poli-ácido-láctico (PLA) e poli-caprolactona (PCL). Ambos os polímeros são biodegradáveis¹² e biocompatíveis^{12,13}, sendo de uso frequente na área médica como parafusos de fixação óssea, placas, como veículo de drogas ou como estrutura para engenharia de tecidual. Estudos recentes mostram que membranas baseadas em matriz de PCL associadas ou não a diferentes substâncias, podem dar um suporte eficiente para o desenvolvimento celular permitindo a regeneração de cartilagens, tecido vascular, tecido cardíaco, pele, olho, tecido nervoso, entre outros.¹⁴⁻¹⁷ Estes substitutos ósseos vêm em formas variadas, incluindo pós, “massa”, *pellets* ou ainda cobrindo a superfície de implantes.

O PCL é mais hidrofóbico que o PLA¹⁸⁻²¹ e possui uma degradação mais lenta em soluções salinas.²² Um estudo demonstrou que quando associados à hidroxiapatita (HA) o peso molecular do PCL aumentou drasticamente, enquanto o peso molecular do PLA teve uma queda.²³ Um maior peso molecular define um tempo de degradação do polímero mais lento, possibilitando uma regeneração tecidual guiada mais segura.

Concomitantemente ao desenvolvimento de polímeros biodegradáveis, o desenvolvimento de copolímeros têm melhorado as propriedades físico-química-biológica dos próprios polímeros. O PCL, por exemplo, apresenta uma natureza hidrofóbica, o que pode impedir a suspensão aquosa de células para o interior da estrutura, além de afetar a imigração e morfologia celular. Poli-N-vinilpirrolidona (PVP), poli-álcool-vinílico são polímeros com propriedades hidrofílicas misturados à *scaffolds* para aumentar sua hidrofiliidade, e consequentemente a adesão celular.²⁴⁻

27

Também é possível incorporar proteínas aos polímeros que aumentam a compatibilidade através de co-encapsulação de sais tampão e estabilizadores de proteína que podem alterar o pH interno das microesferas. Polissacáridos, tais como o quitosano tem efeito quimiotático. A quitosana, tem inúmeras vantagens tais como biodegradabilidade, não-toxicidade, propriedades antimicrobianas, processabilidade em estrutura porosa, carga positiva e grupos funcionais reactivos, é amplamente utilizado na biomedicina, farmacêutica e engenharia de tecidos.^{28,29} A introdução de ácido hialurônico em membranas poliméricas promovem maior resistência mecânica, não tem efeito citotóxico, são biocompatíveis e auxiliam no mecanismo de liberação de drogas.^{30,31} A associação de alginato demonstrou melhores propriedades hidrofílicas e maior absorção aquosa.³² Já o colágeno, apesar de manter as propriedades físicas e mecânicas quando combinado com o PCL, demonstrou maior indução de proliferação celular e deposição de cálcio.^{33,34} Além disso, para melhorar as propriedades do PCL, pode haver combinação desse material com diversos enxertos, maximizando a neoformação óssea.

Outra aplicação do PCL é na área farmacêutica, por apresentar vantagens únicas, que incluem: manipulação do tamanho e superfície da partícula para alcançar o alvo da droga, o controle na liberação da droga no sítio alvo aumentando

eficácia terapêutica e reduzindo efeitos colaterais, seus vários meios de administração (oral, nasal, parenteral, intra-ocular).³⁵ Drogas, como proteínas, peptídeos, anticorpos e fármacos de moléculas pequenas, podem ser carregadas ao longo ou na superfície das nanofibras de acordo com suas propriedades. Os agentes terapêuticos carregados nas fibras incluem drogas anti-câncerígenas, drogas antibacterianas, anti-inflamatórios, extratos de ervas e genes.³⁶ Quando administrados via parenteral, as partículas devem ter tamanho inferior a 5 µm, para penetração nos menores capilares e evitar embolia.³⁷

A via de degradação primária do PCL é a hidrólise de ligações éster levando à quebra da cadeia, resultando na formação de correntes curtas, oligômeros e ácido capróico.³⁸ Isso dá lugar a uma massa amorfa do material que depende de sua cristalinidade e transporte de água para dentro do material para permitir a hidrólise. No entanto, devido a sua natureza semi-cristalina e hidrofóbica a taxa de hidratação e clivagem hidrolítica é baixa e, portanto, a velocidade de degradação através desta via é relativamente lenta (até 4 anos).³⁹ A degradação enzimática, por outro lado, ocorre na superfície do polímero com lipases esterases e anexando à superfície do polímero ligações éster de superfície em um prazo muito mais curto, formando polímeros e cadeias oligoméricas mais curtas. A degradação, enquanto dependente da enzima utilizada e a composição de polímero e cristalinidade, é geralmente completa após cerca de 12 dias e os rendimentos, entre outros fragmentos, ácido capróico 3-hidroxilo o qual, não claramente, podem alterar o pH do hospedeiro.⁴⁰ O PCL tem uma tendência para gerar meio ácido durante o processo de degradação em comparação para PLA e PGL, um problema que contribui para a geração de reações inflamatórias.⁴¹

1.2 Polímeros naturais biodegradáveis

Recentemente, os compósitos à base de polímeros naturais tem recebido um grande foco em aplicações de engenharia óssea tecidual. Isso é devido ao comportamento biocompatível e biodegradável de polímeros naturais. Os materiais

naturais são biopolímeros que incluem polissacáridos (amido, alginato, quitosano, ácido hialurônico derivados) ou proteínas (soja, colágeno, geles de fibrina, seda), e uma variedade de biofibras.⁴² Os polímeros à base de proteína têm a vantagem de mimetizar muitas características da matriz extracelular e, portanto, têm o potencial para guiar a migração, crescimento e organização das células durante a regeneração tecidual e para a estabilização de células encapsuladas e transplantadas.

Polímeros naturais muitas vezes possuem estruturas altamente organizadas e podem conter uma substância extracelular chamada ligante, que é necessária para se ligar a receptores celulares. Também possuem estruturas que podem orientar as células a crescer em vários estágios de desenvolvimento; Por outro lado elas podem estimular uma resposta imune ao mesmo tempo.⁴³ Vários polímeros naturais têm sido reportados para as suas aplicações em engenharia de tecido ósseo.⁴⁴⁻⁴⁶

A gelatina é um polímero natural que é derivado do colágeno e é comumente usada para aplicações farmacêuticas e médicas, devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade em ambientes fisiológicos como revisto por Tabata e Ikada.⁴⁷ A incorporação de fatores de crescimento, proteínas de adesão celular e peptídeos é também uma estratégia a ser implementada para alcançar uma engenharia de regeneração tecidual bem sucedida.

O quitosano é biologicamente renovável, biodegradável, biocompatível, não antigênico, não tóxico e biofuncional. A atividade biológica do quitosano sobre a regeneração óssea tem sido demonstrada em muitos relatórios.^{48,49} No entanto, o quitosano tem algumas limitações em indução de regeneração óssea rápida nas fases iniciais e aumenta as funções de células inflamatórias tais como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos que promovem granulação.⁵⁰

O alginato é um dos mais estudados e aplicados em engenharia de tecidos e de veiculação de drogas. No entanto, os hidrogéis de alginato utilizados nestas aplicações têm degradação incontrollável e os géis dissolvem de forma incontrollável após a perda de cátions bivalentes promovendo efeitos no peso molecular.^{51,52}

O colágeno é considerado por muitos como um *scaffold* ideal, uma vez que é o principal componente proteico da matriz extracelular, fornecendo suporte para os tecidos conjuntivos tais como pele, tendões, ossos, cartilagem, sangue, e vasos ligamentos.⁵³⁻⁵⁵ O colágeno é definido pela alta resistência mecânica, boa biocompatibilidade, baixa antigenicidade e capacidade de ser reticulado, e sob medida para suas propriedades mecânicas, de degradação e hidrofílicas. É isolado principalmente a partir de tecidos animais, e uma preocupação adicional tem sido levantada sobre a segurança do colágeno derivado de tecidos animais com base no potencial viral. Contudo, as técnicas de purificação que utilizam tratamentos enzimáticos podem ser empregadas para eliminar os peptídeos imunogênicos, a principal causa de resposta a corpo estranho,^{56,57} bem como o desenvolvimento recombinante e não recombinante de colágeno humano como um substituto para colágeno animal. Para estes últimos, vários fatores têm um impacto sobre a degradabilidade do colágeno, por exemplo, a penetração das células na estrutura que provoca contração, bem como o fato de, além de collagenase e gelatinase, várias outras proteinases não-específicas são capazes de digerir o colágeno. Além das dificuldades em processabilidade, a esterilização do colágeno é também um problema, uma vez quase todos os métodos de esterilização promovem em algum grau a alteração do colágeno.⁵⁸

A osteocondutividade de *scaffolds* de colágeno foi comprovada. Membranas colágenas foram capazes de curar defeitos ósseos em ratos.⁵⁹ No entanto, a osteoindutividade ainda não foi reportada.

1.3 Proposição

Avaliar por meio da análise histológica o potencial de auxiliar na neoformação óssea da membrana de PCL com 5% de HA e da membrana porcina Bio-Gide® no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos, aos 30 e 60 dias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da FOA sob o número FOA 2013+01489.

Manta de PCL poli-caprolactona associada a nanohidroxiapatita: (Material desenvolvido pelo Departamento de Engenharia de Materiais, UFSCar, São Carlos, SP, Brasil).

Geistlich Bio-Gide®: Membrana de colágeno reabsorvível

2.1 Desenvolvimento da manta de PCL

Para a preparação da solução de PCL com a nanocarga (0,05 g/mL), primeiramente foi deixada a nHA no clorofórmio e em ultrassom (marca Ultrasonic Cleaner, modelo USC 1450) por noventa minutos, a fim de promover melhor dispersão das nanopartículas. Decorrido esse tempo, foi adicionado o polímero e esperou-se a dissolução completa. Em seguida foi colocado metanol sob agitação constante e aguardou-se a homogeneização completa da solução. O sistema de solventes com 75% de clorofórmio e 25% de metanol v/v. A concentração do polímero nessa suspensão formada de polímero e nanocarga foi de 0,12g/mL. O polímero foi o PCL CAPA 6806 da Solvay com Massa Molar de 80 KDa¹. (Após amostras)

2.2 Amostras

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram utilizados um total de 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em três grupos (n=12 por grupo), e submetidos à eutanásia em dois momentos do experimento, aos 30 e 60

dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba–UNESP. Sendo assim, em cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico na calvária (8 mm), como discriminado a seguir:

- Grupo controle – n= 12: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia);
- Grupo PCL com 5% de HA – n= 12: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de PCL com 5% de HA, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia).
- Grupo Bio-Gide® – n= 12: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia);

Figura 1 - A. Membrana de PCL. B. Membrana de colágeno porcino



Fonte: Do autor.

2.3 Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Foi realizada a tricotomia na região da calvária, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10% Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis. Foi realizada incisão triangular no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 (dois) cm, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha) (Fig 2 A). Em seguida com auxílio de broca trefina de 8 mm de diâmetro (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8 mm de diâmetro, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Fig 2B e C). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino (Grupo Bio-Gide® – n=12), ou com uma membrana de PCL com 5% de HA (Grupo PCL com 5% de HA – n=12), ou sem recobrimento (Grupo controle – n=12).

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo. No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde

Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 30 e 60 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico.

Figura 2 - A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Trefina de 8mm. C. Remoção da cortical da região de calvária



Fonte: Do autor.

2.4 Etapa laboratorial

As calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente, receberam cortes de 6 μ m de espessura e montadas em lâminas. As lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE). Para análise histológica foram avaliadas 3 lâminas por animal onde todo o defeito foi analisado. Previamente a realização da análise histológica, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conheceu a quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconheceu o respectivo grupo da secção.

2.5 Análise histológica

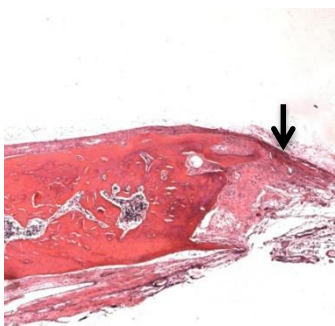
Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.) as lâminas foram analisadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III.

3 RESULTADOS

GRUPO CONTROLE (GC) - Sem membrana

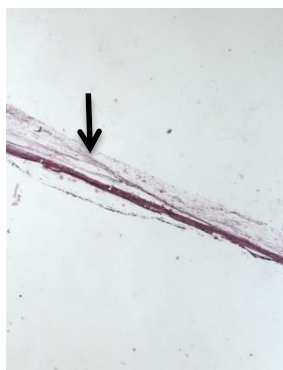
30 dias: No grupo observa-se no aumento de 40x a área de osteotomia com os cotos ósseos esquerdo (Fig. 3) e coto direito (Fig. 5) com discreta neoformação óssea em suas margens. Ao centro do defeito crítico, entre os cotos, é possível notar ausência de neoformação óssea com o defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Fig. 4).

Figura 3 - Grupo Controle (GC). Coto direito. 30 dias. 40X de aumento. Discreta neoformação indicada pela seta.



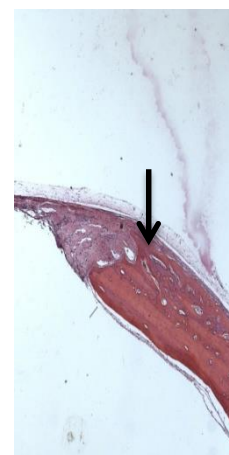
Fonte: Do autor.

Figura 4 - Grupo Controle (GC). Centro do defeito. 30 dias. 40x de aumento. Ausência de crescimento ósseo. Formação de tecido conjuntivo fibroso (T.C)



Fonte: Do autor.

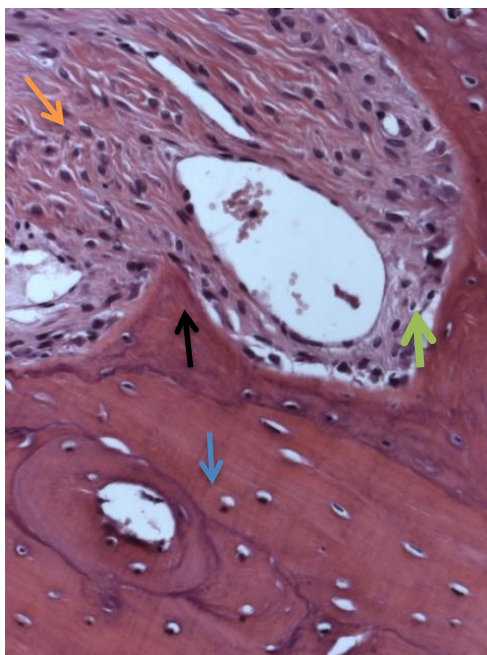
Figura 5 - Grupo Controle (GC). Coto esquerdo. 30 dias. 40X de aumento. Discreta neoformação indicada



Fonte: Do autor.

Com aumento de 400x, observa-se atividade de produção de matriz óssea na superfície do tecido ósseo dos cotos direito. É possível visualizar também presença de osteoblastos e osteócitos (Fig. 6).

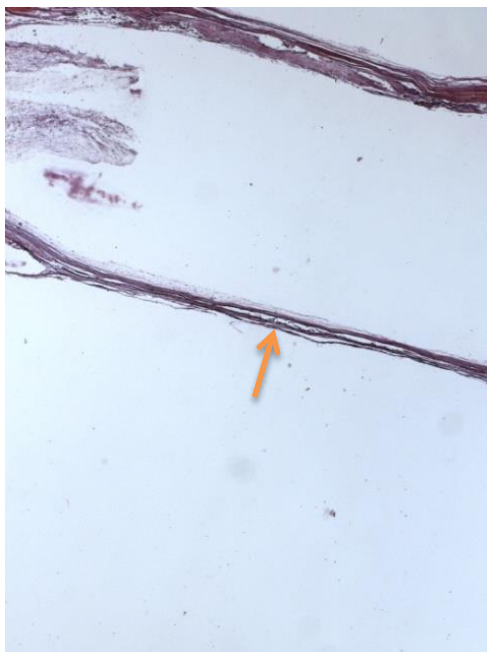
Figura 6 - Grupo Controle (GC). Coto esquerdo. 30 dias. 400x de aumento. Observar atividade de neoformação óssea junto ao coto (TON) (seta preta). Nota-se ainda tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela). Observa-se presença de osteócitos (seta azul) e osteoblastos (seta verde).



Fonte: Do autor.

60 Dias: No mesmo grupo controle, com um aumento de 40x, o defeito ósseo permanece sem reparo e preenchido por tecido conjuntivo (Fig. 7) e com discreta neoformação óssea nos cotos esquerdo e direito (Fig. 8).

Figura 7 - Grupo Controle (GC). Centro do defeito. 60 dias. 40x de aumento. Ausência de neoformação óssea. Presença de tecido conjuntivo fibroso (seta amarela).



Fonte: Do autor.

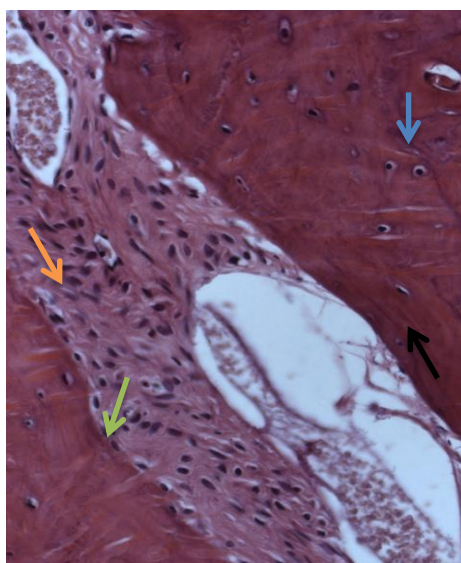
Figura 8 - Grupo Controle (GC). Coto esquerdo. 60 dias. 40x de aumento. Discreta neoformação óssea (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela B. Grupo Controle (GC).



Fonte: Do autor.

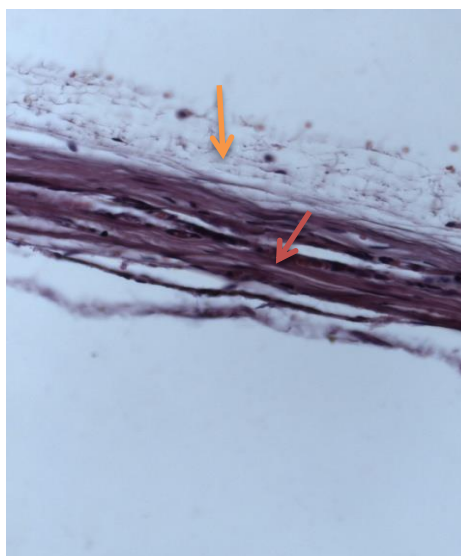
No aumento de 400x do grupo controle, observa-se o tecido ósseo neoformado, presença de tecido conjuntivo, linha de osteotomia (LO) e osteócitos no coto esquerdo e direito (Fig. 9). No centro do defeito ausência de tecido ósseo neoformado. Presença de tecido conjuntivo fibroso e neutrófilos polimorfonucleares (Fig. 10).

Figura 9 - Grupo Controle (GC). Coto direito. 60 dias. 400x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), linha de osteotomia (LO) (seta verde) e osteócitos (seta azul).



Fonte: Do autor.

Figura 10 - Grupo Controle (GC). Centro defeito. 60 dias 400x de aumento. Ausência de tecido ósseo neoformado (TON). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela). Observa-se a presença de neutrófilos (seta vermelha).

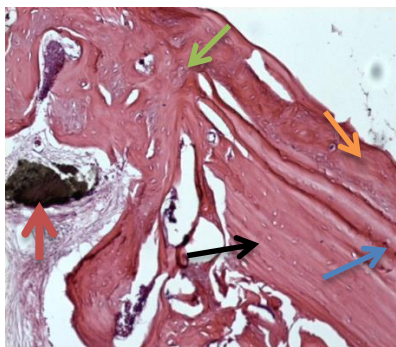


Fonte: Do autor.

GRUPO PCL + HA

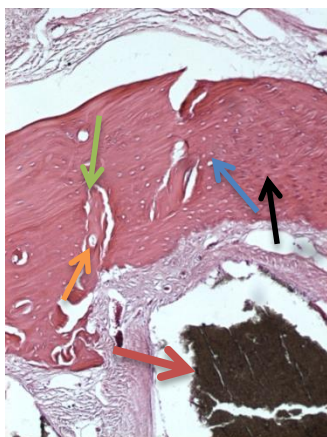
30 Dias: No aumento de 40x apresentaram neoformação óssea no coto esquerdo, no coto direito (Fig 11 A e B) e no centro do defeito (Fig 12) continuamente, apresentando remanescentes da membrana e ao seu redor tecido ósseo neoformado sobre tecido conjuntivo.

Figura 11 A - Grupo PCL
Coto direito. 30 dias. 40x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), linha de osteotomia (LO) (seta verde) e osteócitos (seta azul) e membrana (seta vermelha).



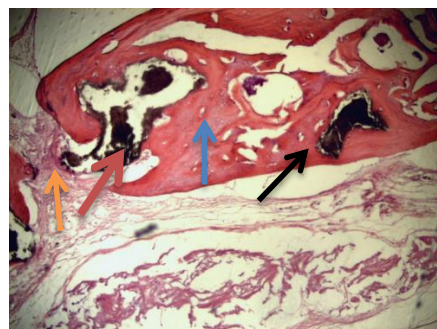
Fonte: Do autor.

Figura 11 B - Grupo PCL
Coto esquerdo. 30 dias. 40x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), linha de osteotomia (LO) (seta verde) e osteócitos (seta azul) e membrana (seta vermelha).



Fonte: Do autor.

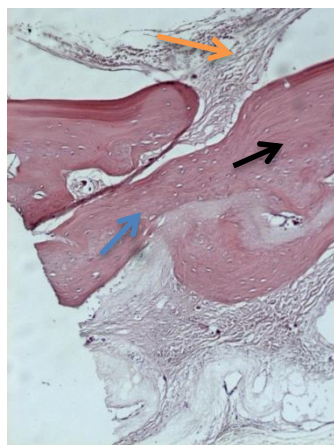
Figura 12 - Grupo PCL.
Região central do defeito. 30 dias. 40 x de aumento. A região exibe tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), e osteócitos (seta azul) e membrana (seta vermelha).



Fonte: Do autor.

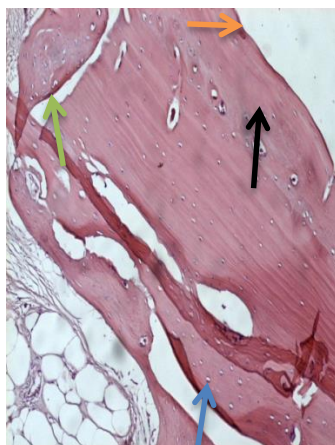
60 Dias: Os animais desse grupo que foram sacrificados com 60 dias, no aumento de 40x apresentaram neoformação óssea no coto esquerdo, no coto direito (Fig 13 A e B) e no centro do defeito (Fig 14), apresentando neoformação óssea contínua. Ou seja, após 60 dias a regeneração tecidual ocorreu totalmente. Nesse período os remanescentes da membrana já foram reabsorvidos.

Figura 13 A - Grupo PCL Coto direito. 60 dias. 40x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), (seta verde) e osteócitos (seta azul).



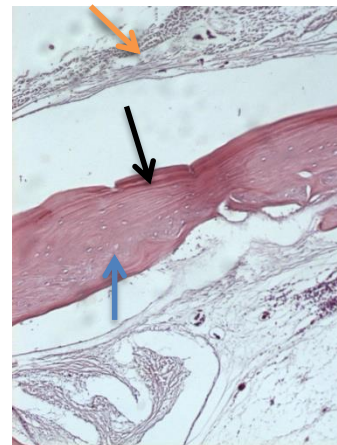
Fonte: Do autor.

Figura 13 B - Grupo PCL Coto esquerdo. 60 dias. 40x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), linha de osteotomia (LO) (seta verde) e osteócitos (seta azul).



Fonte: Do autor.

Figura 14 - Grupo PCL Região central. 60 dias. 40x de aumento. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta). Presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), e osteócitos (seta azul). Fechamento completo do defeito.

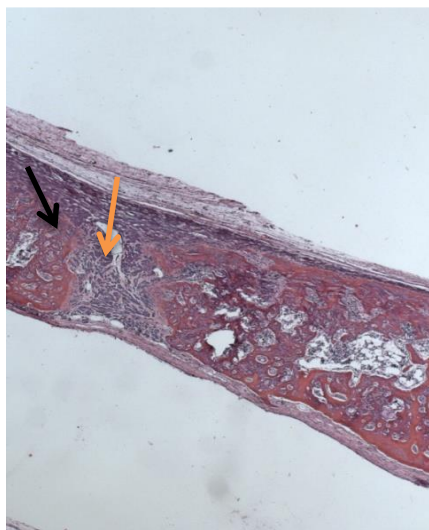


Fonte: Do autor.

GRUPO DE COLÁGENO PORCINO (Bio-Gide®) - (BG)

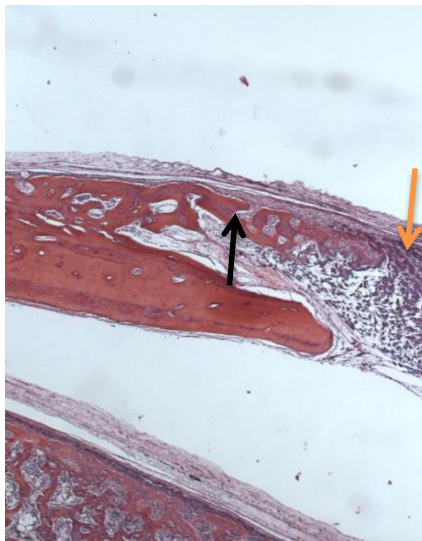
30 Dias: No aumento de 40x apresentaram neoformação óssea no coto esquerdo, no coto direito e no centro do defeito, com a imagem mostrando remanescente da membrana entre a área de tecido ósseo neoformado e o tecido conjuntivo organizado sobre a membrana remanescente. (Figs. 15 A e B e 16).

Figura 15A - Bio-Gide® (BG). Coto direito. 30 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (seta amarela)



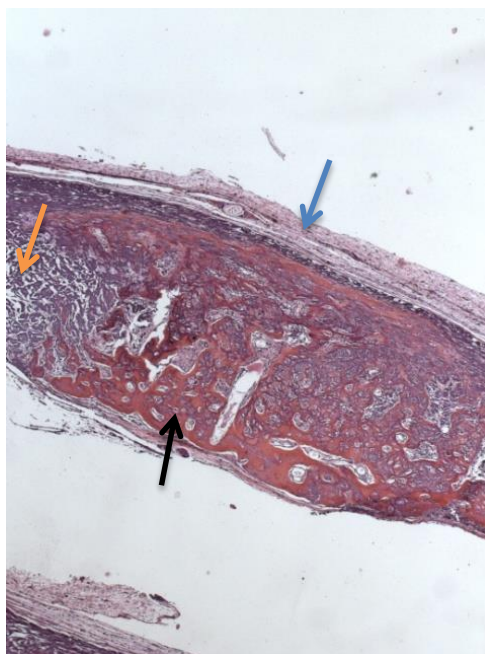
Fonte: Do autor.

Figura 15B - Bio-Gide® (BG). Coto esquerdo. 30 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela)



Fonte: Do autor.

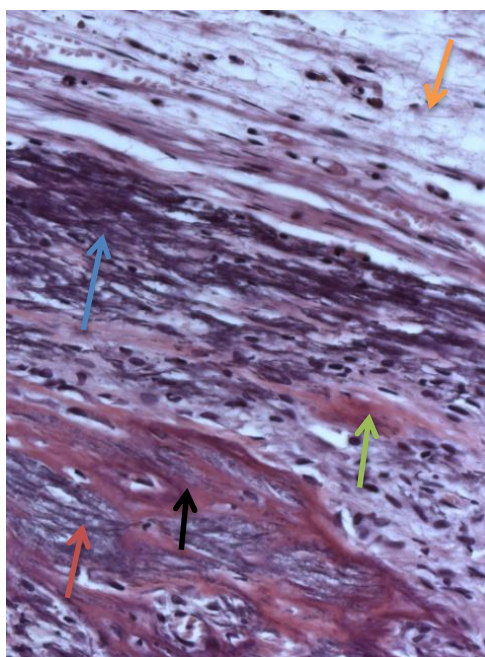
Figura 16 - Bio-Gide® (BG). Centro do defeito. 30 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) do coto (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), membrana remanescente (seta azul).



Fonte: Do autor.

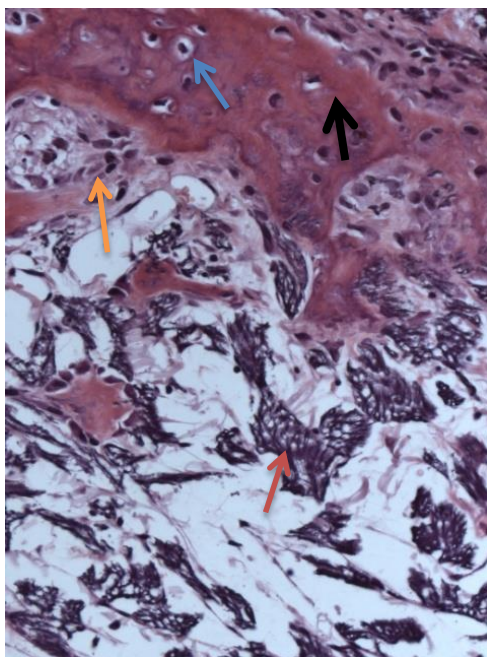
No aumento de 400x observou-se no coto esquerdo tecido ósseo neoformado, tecido ósseo neoformado nos espaços da membrana, membrana remanescente e tecido conjuntivo fibroso (Fig. 17). No coto direito observou-se tecido ósseo neoformado, tecido ósseo neoformado nos espaços da membrana, membrana remanescente, tecido osteóide e osteócitos (Fig. 18). No centro do defeito, observou-se tecido ósseo neoformado, membrana remanescente, tecido conjuntivo fibroso, membrana remanescente integrada a tecido ósseo neoformado e osteócitos (Fig. 19).

Figura 17 - Bio-Gide® (BG). Coto esquerdo. 30 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), TON nos espaços da membrana (seta verde), presença de membrana remanescente (seta azul), membrana remanescente integrada ao tecido ósseo neoformado (seta vermelha), tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela)



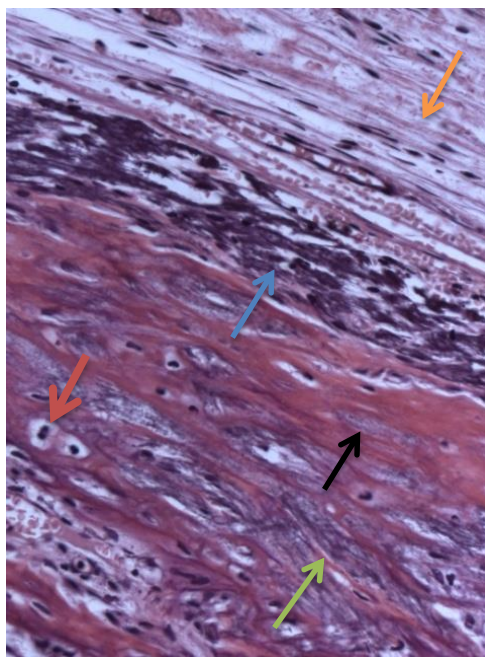
Fonte: Do autor.

Figura 18 - Bio-Gide® (BG). Coto direito. 30 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), TON nos espaços da membrana, membrana remanescente (seta vermelha), tecido osteóide (seta amarela) e osteócitos (seta azul).



Fonte: Do autor.

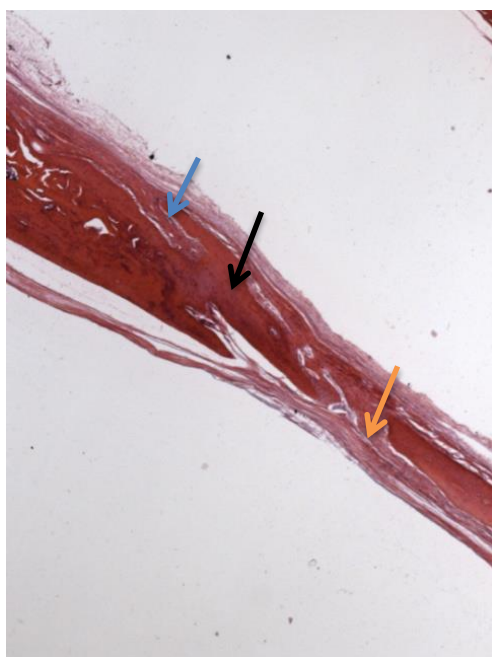
Figura 19 - Bio-Gide® (BG). Centro do defeito. 30 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), membrana remanescente (seta azul), tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), membrana remanescente integrada a tecido ósseo neoformado (seta verde) e osteócitos (seta vermelha).



Fonte: Do autor.

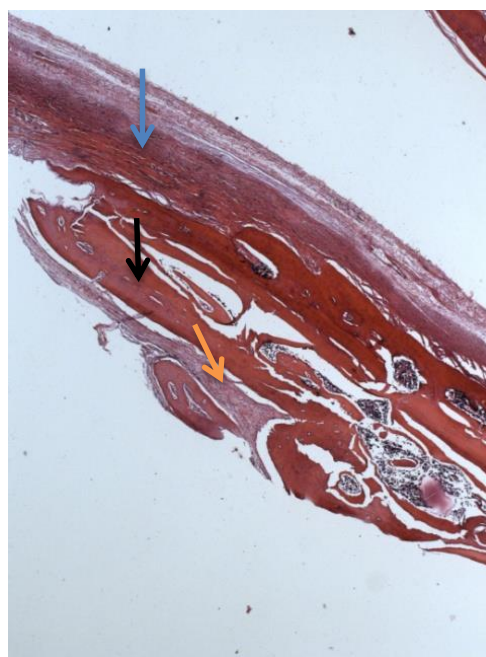
60 Dias: No grupo com os animais sacrificados com 60 dias, as imagens da neoformação óssea no coto esquerdo, coto direito e centro do defeito eram semelhantes às dos animais sacrificados com 30 dias, mas com imagem mais nítida de tecido ósseo neoformado, membrana remanescente, tecido conjuntivo fibroso bem organizado, membrana remanescente integrada ao tecido ósseo neoformado no aumento de 40x (Figs. 20, 21 e 22)

Figura 20 - (Bio-Gide® BG). Coto direito. 60 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela) e tecido osteóide (seta azul).



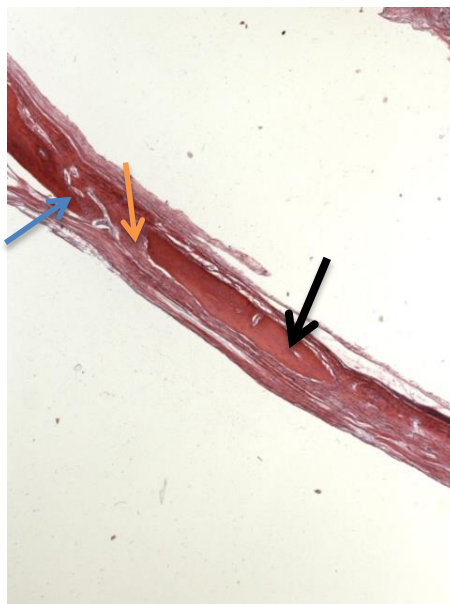
Fonte: Do autor.

Figura 21 - Bio-Gide® (BG). Coto esquerdo. 60 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), tecido osteóide (seta azul).



Fonte: Do autor.

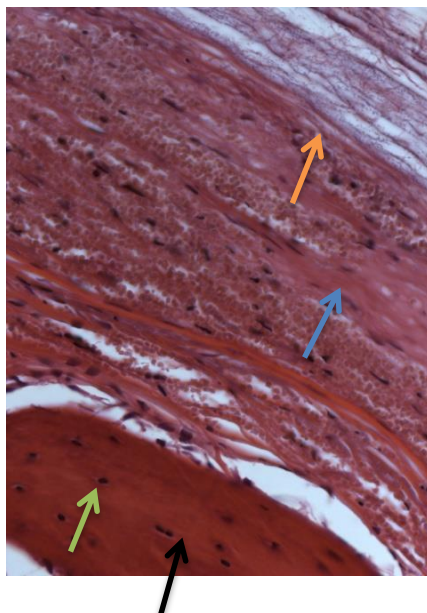
Figura 22 - Bio-Gide® (BG). Centro do defeito. 60 dias. 40x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), tecido osteóide (seta azul).



Fonte: Do autor.

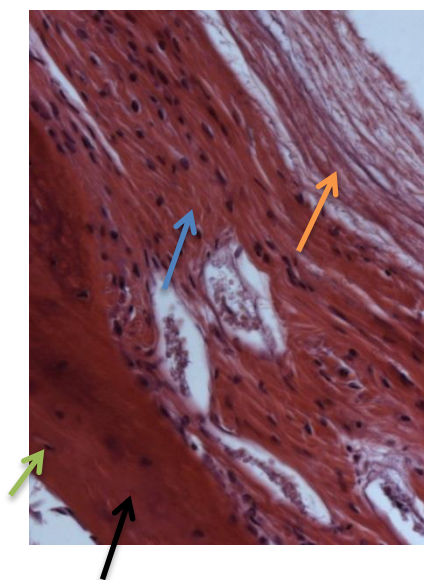
No aumento de 400x observou-se no coto esquerdo e no coto direito, tecido ósseo neoformado, presença de tecido osteóide, osteócitos e tecido conjuntivo fibroso (Figs. 23 e 24). No centro do defeito observou-se tecido ósseo neoformado, tecido osteóide e osteócitos (Fig. 25)

Figura 23 - Bio-Gide® (BG). Coto esquerdo. 60 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), tecido osteóide (seta azul) e osteócito (seta verde).



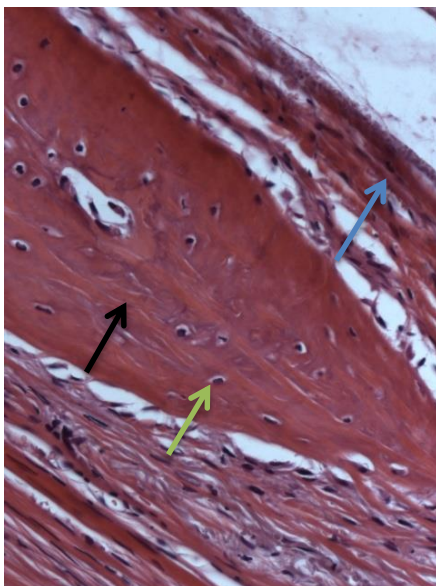
Fonte: Do autor.

Figura 24 - Bio-Gide® (BG). Coto esquerdo. 60 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido conjuntivo fibroso (T.C) (seta amarela), tecido osteóide (seta azul) e osteócito (seta verde).



Fonte: Do autor.

Figura 25 - Bio-Gide® (BG). Centro do defeito. 60 dias. 400x de aumento. Observou-se tecido ósseo neoformado (TON) (seta preta), presença de tecido osteóide (seta azul) e osteócitos (seta verde).



Fonte: Do autor.

4 DISCUSSÃO

No período de 30 dias, o resultado menos favorável foi o encontrado no grupo controle, onde os animais receberam apenas o coágulo. Esse grupo apresentou uma formação óssea pequena nos cotos e nenhuma neoformação óssea no centro do defeito. Já os animais do grupo PCL da membrana Bio-gide® apresentaram neoformação óssea nos cotos e na região central do defeito como “ilhas” fusionadas de tecido ósseo e remanescentes da membrana. Os animais do grupo PCL também apresentam remanescentes da membrana, porém apresentaram melhores resultados pois além da neoformação óssea desde os cotos, apresentaram um tecido ósseo neoformado mais contínuo.

A análise período de 60 dias, permitiu verificar que menos favorável no grupo controle, em que não houve neoformação óssea, apenas o preenchimento do defeito com tecido conjuntivo fibroso. Os animais do grupo Bio-gide® apresentaram neoformação óssea melhor aos 60 dias, com quase o fechamento completo do defeito, havendo somente no tecido conjuntivo fibroso e remanescente e remanescentes da membrana. O grupo PCL apresentou neoformação óssea contínua em todo o defeito, mais uniforme em relação ao Bio-gide® e tecido conjuntivo organizado, a membrana nesse período já foi absorvida pelo organismo. Foi possível observar que em alguns espécimes houve o fechamento completo do defeito ósseo, evento esse que não foi verificado nos outros grupos.

O defeito ósseo crítico é definido como o menor tamanho de defeito que não permite a completa cicatrização óssea durante um período determinado, usualmente suficiente para a cicatrização natural. Um dos maiores objetivos da pesquisa com biomateriais é permitir a engenharia tecidual de osso pela cultura de células osteogênicas e de vascularização em armações/arcabouços de compósitos biocompatíveis. O PCL e a membrana colágena não são tóxicos para as células e tem várias propriedades desejáveis, tais como biodegradabilidade. Essa característica de pouca toxicidade foi comprovada no presente estudo, uma vez que não houve nos períodos avaliados nenhuma característica histológica que pudesse indicar rejeição do material inserido e com processo inflamatório de pouca intensidade.

No presente estudo a membrana de PCL+HA notavelmente apresentou melhores resultados em relação aos animais que tiveram defeito ósseo crítico tratados com coágulo e em relação à membrana de colágeno porcino (BioGide)®, que obteve resultados bons, apresentou uma melhor quantidade de neoformação óssea do ponto de vista histológico pela adição de hidroxiapatita devido ao seu papel osteogênico e osteoindutor.^{5,60} Em outros estudos a HA adicionada às nanofibras de PCL melhorou significativamente a cicatrização óssea em defeitos provocados na calvária. Chen e Chang⁶¹, por exemplo, utilizando nanofibras muito similares às utilizadas no presente estudo (PCL+HA e PCL), observaram que estas não afetavam negativamente a diferenciação osteogênica, permitindo o crescimento e diferenciação de células mesenquimais. Além disso, observaram que a produção mineral pelas células foi proporcional à concentração de HA na nanofibra. Contrariamente, Ródenas-Rochina et al.⁶² observaram que a HA não melhorou a proliferação celular e a diferenciação de osteoblastos quando adicionada a suportes à base de PCL, sendo que o PCL sozinho apresentou melhores resultados.

O PCL apresenta algumas desvantagens. Tal como outros polímeros sintéticos, é de natureza hidrofóbica, impedindo a penetração de células aquosas para o interior da estrutura e tem pobres sítios de reconhecimento celular, levando a baixa afinidade e adesão celular.⁶³ Além disso, podem produzir subprodutos de ácidos durante a degradação, causando uma resposta inflamatória.⁶⁴ Contudo, este evento não foi observado nos períodos estudados.

A HA cerâmica e porosa demonstrou capacidade de integrar-se ao leito receptor, sendo osteocondutora e apresentando êxito na reconstrução de falhas ósseas nas áreas médica e odontológica. Um compósito, como a HA, adicionado ao *scaffold* melhoraria a biocompatibilidade e integração do tecido duro devido ao fato de que as partículas de cerâmica, que são incorporadas na matriz do polímero, permitem rápido o aumento da propagação inicial do soro proteínas, em comparação com a superfície de polímero mais hidrofóbico.⁶⁵

Os polímeros sintéticos e naturais passam por diferentes vias de degradação. Os polímeros sintéticos são geralmente degradados por hidrólise simples, enquanto que os polímeros naturais são principalmente degradados enzimaticamente.⁴⁷

As tensões locais são necessárias para estimular a neoformação óssea. Reciprocamente, a rigidez em excesso dos *scaffolds* pode provocar concentrações de tensão no tecido saudável circundante resultando em reabsorção óssea.⁶⁶

Du et al.⁶⁷ utilizaram membranas de colágeno como *scaffolds*. As membranas de colágeno obtidas comercialmente envolviam HA em sua superfície, em seguida eram colocadas sobre o fragmento de osso ao longo da sua superfície. O tamanho dos poros deste material variaram de dezenas a centenas de micrometros, e o material se mostrou flexível e absorvível. Os autores observaram também que as células migravam a partir dos fragmentos ósseos na matriz, o que sugeriu que o material é bioativo. Em um de seus estudos, Wagner-Ecker⁶⁸ constatou que o colágeno tem capacidade de neoformação óssea. Porém essa propriedade é favorecida quando adicionamos à matriz compósitos como beta-tricalcio-fosfato e hidroxiapatita.

O colágeno apresenta muitas vantagens como biomaterial. Ele pode ser preparado em diferentes formas como membranas, filmes e esferas. As suas vantagens se devem às características como não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, facilmente absorvido pelo corpo^{69,70} e baixa antigenicidade. No entanto, seu custo de purificação é extremamente alto e, quando isolado, apresenta alguma variabilidade quanto ao tamanho das fibras, impurezas e densidade de ligações cruzadas que estabilizam a estrutura de suas fibrilas.⁶⁹

Além disso, o colágeno causa alternância no comportamento celular, sofre contração e suas propriedades mecânicas são inadequadas, por isso devem ser manuseados com cuidado.^{70,71} Outro fator é a variabilidade do colágeno dependendo da fonte, impurezas, variabilidade na degradabilidade enzimática e propriedades de manipulação complexas.⁷²

Não há conhecimento de relatos de trabalhos científicos semelhantes ao trabalho apresentado. Uma limitação dos estudos nessa área se refere à fabricação da membrana de PCL, sua confecção requer equipamentos e materiais específicos e um alto investimento financeiro, além do conhecimento e empirismo dos pesquisadores. Por outro lado, as pesquisas na área de biomateriais vêm recebendo cada vez mais investimentos através dos anos e grandes expectativas são

depositadas no aprimoramento desses enxertos na busca de minimizar a incidência de defeitos ósseos de qualquer natureza.

5 CONCLUSÃO

A membrana de colágeno porcino e a membrana PCL são materiais biocompatíveis e auxiliaram a regeneração óssea guiada de defeitos críticos em calvária de ratos.

REFERÊNCIAS

- 1 – RODEN JR, R.D. Principles of Bone Grafting. **Oral Maxillof. Surg. Clin. North Amer.**, v. 22, n. 3, p. 295–300, 2010.
- 2 – DYM, H.; PIERSE, J. Advanced Techniques in Bone Grafting Procedures. **Dent. Clin. North Amer.**, v. 55, n. 3, p. 453–460, 2011.
- 3 – HELMS, J.A. Bone voyage: an expedition into the molecular and cellular parameters affecting bone graft fate. **Bone**, v. 41, n. 4, p. 479–485, 2007.
- 4 – BHATT, R.A.; ROZENTAL, T.D. Bone Graft Substitutes. **Hand. Clin.**, v. 28, p. 457–468, 2012.
- 5 – GARCÍA-GARETA, E.; COATHUP, M.J.; BLUNN, G.W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, v. 81, p. 112–121, 2015.
- 6 – JONES, F.H. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. **Surf. Sci. Reports**, v.41, p. 75-205, 2001.
- 7 – FARDIN, A.C. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innov. Implant J. Biomater. Esthet.**, v. 5, n.3, p 48-52, 2010
- 8 – GÓES, A.M.; ORÉFICE, R.L.; BRETAS, R.S.B.; RIBEIRO-NETO, W.A.; PEREIRA, I.H.L.; AYRES, E.; PAULA, A.C.C.; AVEROUS, L. Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth. Electrospinning, characterization and cell viability. **Polymer Degradation Stability**, v. 97 p. 2037-2051, 2012.
- 9 – SHOICHET, M.S. Polymer scaffolds for biomaterials applications. **Macromol**, v. 91, p. 543-581, 2010.
- 10 – MURPHY, C.M; HAUGH, M.G.; O'BRIEN, F.J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, p. 461–466, 2010.

- 11 – DAHLIN, R.L.; KASPER, F.K.; MIKOS, A.G. Polymeric nanofibers in tissue engineering. **Tissue Eng Part B Rev.**, v. 17, n.5, p. 349, 2011.
- 12 – NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, v. 32, p. 762-798, 2007.
- 13 – BELGACEM, M.N.; GANDINI, A. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, 2008.
- 14 – LEE, P.; TRAN, K.; CHANG, W.; SHELKE, N.B.; KUMBAR, S.G.; YU, X. Influence of chondroitin sulfate and hyaluronic acid presence in nanofibers and its alignment on the bone marrow stromal cells: cartilage regeneration. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v.10, n. 8, p. 1469-1479, 2014.
- 15 – FU, W.; LIU, Z.; FENG, B.; HU, R.; HE, X.; WANG, H.; YIN, M.; HUANG, H.; ZHANG, H.; WANG, W. Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering. **Int. J. Nanomedicine.**, v. 44, n. 9 , p. 2335-2344, 2014.
- 16 – GISHTO, A.; FARREL, K.; KOTHAPALLI, C.R. Tuning composition, and architecture of biomimetic scaffolds for enhanced matrix synthesis by murine cardiomyocytes. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 103, n. 2, p. 693–708, 2014.
- 17 – LOU, T.; LEUNG, M.; WANG, X.; CHANG, J.Y.; TSAO, C.T.; SHAM, J.G.; EDMONSON, D.; ZHANG, M. Bi-layer scaffold of chitosan/PCL-nanofibrous mat and PLLA-microporous disc for skin tissue engineering. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 10, n. 6, p. 1105-1113, 2014.
- 18 – SHARMA, S.; GUPTA, D.; MOANTY, S.; JASSAL, M.; AGRAWAL, A.K.; TANDON, R. Surfacemodified electrospun poly(epsilon-caprolactone) scaffold with improved optical transparency and bioactivity for damaged ocular surface reconstruction. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 55, n. 2, p. 899-907, 2014.
- 19 – LI, Y.; CEYLAN, M.; SHRESTHA, B.; WANG, H.; LU, Q.R.; ASMATULU, R., YAO, L. Nanofibers support oligodendrocyte precursor cell growth and function as a neuron-free model for myelination study. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 1, p. 319-326, 2014.

- 20 - AURAS, R., LIM, L.; SELKE, S.E.M.; TSUJI, H. **Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing and application**. Hoboken: Wiley and Sons, 2010.
- 21 - KIM, J.H.; CHOUNG, P.; KIM, I.Y.; LIM, K.T.; SON, H.M.; CHOUNG, Y. Electrospun nanofibers composed of poly(ϵ -caprolactone) and polyethylenimine for tissue engineering applications. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 29, p.1725-1731, 2009.
- 22 – BAE, G.Y.; JANG, J.; JEONG, Y.G.; LYOO, W.S.; MIN, B.G. Superhydrophobic PLA fabrics prepared by UV photo-grafting of hydrophobic silica particles possessing vinyl groups. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 344, n. 2, p. 584-587, 2010.
- 23 – LI, D.; FREY, M.W.; BAEUMNER, A.J. Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies. **J. Memb. Sci.**, v. 279, p. 354-363, 2006.
- 24 – YOSHIOKA, T.; KAMADA, F.; KAWAZOE, N.; TATEISHI, T.; CHEN, G. Structural changes and biodegradation of PLLA, PCL and PLGA sponges during in vitro incubation. **Polym. Eng. Sci.**, v. 50, n. 10, p. 1895-1903, 2010.
- 25 – RODENAS-ROCHINA, J.; VIDAURRE, A.; CORTÁZAR, A.C.; LEBOURG, M. Effects of hydroxyapatite filler on long-term hydrolytic degradation of PLLA/PCL porous scaffolds. **Polymr Degrad Staby.**, v.119, p. 121–131, 2015.
- 26 – KIM, G.M.; LE, K.H.; GIANELLI, GIANELLI, S.M.; LEE, Y.J.; RAINER, A.; TROMBETTA, M. Electrospinning of PCL/PVP blends for tissue engineering scaffolds. **Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 24, p. 1425-1442, 2013.
- 27 – KIM, C.H.; KHIL, M.S.; KIM, H.Y.; LEE, H.U.; JAHNG, K.Y. An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation. **J. Biomed. Mater. Res. B**, v. 78, p. 283-290, 2006.
- 28 – CHO, S.J.; SANG-MYUNG-JUNG, S.M.; KANG, M.; SHIN, H.S.; YOUK, J.H. Preparation of hydrophilic PCL nanofiber scaffolds via electrospinning of PCL/PVP-b-PCL block copolymers for enhanced cell biocompatibility. **Polymer**, v. 69, p. 95-102, 2015.

- 29 – DONG, C.M.; GUO, Y.Z.; QIU, K.Y.; GU, Z.W.; FENG, X.D. In vitro degradation and controlled release behavior of d,l-PLGA50 and PCL-b-d,l-PLGA50 copolymer microspheres. **J. Control. Rel.**, v. 107, p. 53–64, 2005.
- 30 – ZAMANI, S; KHOEE, S. Preparation of core-shell chitosan/PCL-PEG triblock copolymer nanoparticles with ABA and BAB morphologies: Effect of intraparticle interactions on physicochemical properties. **Polymer**, v. 53, p. 5723-5736, 2012.
- 31 – LAM, J.; TRUONG, N.F.; SEGURA, T. Design of cell-matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. **Acta. Biomater.**, v. 10, p. 1571–1580, 2014.
- 32 – LVA, Z.; CHANGA, L.; LONGA, X.; LIUA, J.; XIANGA, Y.; LIUB, J.; DENGGA, H.; DENGGA, L.; DONGA, A. Thermosensitive in situ hydrogel based on the hybrid of hyaluronic acid and modified PCL/PEG triblock copolymer. **Carb. Polym.**, v. 108, p. 26–33, 2014.
- 33 – KIM, M.S.; KIM, G.H. Three-dimensional electrospun polycaprolactone (PCL)/alginate hybrid composite scaffolds. **Carb. Polym.**, v. 114, p. 213–221, 2014.
- 34 – KIM, M.S.; KIM, G.H. Electrohydrodynamic direct printing of PCL/collagen fibrous scaffolds with a core/shell structure for tissue engineering applications. **Chem. Eng. J.**, v. 279, p. 317–326, 2015.
- 35 – YANG, G.H.; KIM, M.S.; KIM, G.S. A hybrid PCL/collagen scaffold consisting of solid freeform-fabricated struts and EHD-direct-jet-processed fibrous threads for tissue regeneration. **J. Col. Interf. Sci.**, v. 450, p. 159–167, 2015.
- 36 – WOODRUFF, M.A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer: polycaprolactone in the 21st century. **Prog. Polym. Sci.**, v. 35, p. 1217–1256, 2010.
- 37 – SON, Y.J.; KIM, W.J.; YOO, H.S. Nanofibrous microposts and microwells of controlled shapes and their hybridization with hydrogels for cell encapsulation. **Arch. Pharm. Res.**, v.37, p. 69–78, 2014.
- 38 – WONG, J.; BRUGGER, A.; KHARE, A.; CHAUBAL, M.; PAPADOPOULOS, P.; RABINOW, B.; NING, J. Suspensions for intravenous (IV) injection: a review of

development: preclinical and clinical aspects. **Adv. Drug Deliv.**, v. 60, p. 939–954, 2008.

39 – BOSWORTH, L.A.; DOWNES, S. Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 95, p. 2269-2276, 2010.

40 - CHEN, D.R.; BEI, J.Z.; WANG, S.G. Study on biodegradation behavior of polycaprolactone microparticles. **Acta Polym. Sin.**, p. 620- 622, 1999.

41 – COOK, W.J., CAMERON, J.A.; BELL, J.P.; HUANG, S.J. Scanning electron-microscopic visualization of biodegradation of polycaprolactones by fungi. **J. Polym. Sci. Part. C.Polymer. Lett.**, v. 19, p. 159-165, 1981.

42 - REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCINI, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, p. 3413–3431, 2006.

43 – CHEUNG, H.Y.; LAU, K.T.; LU, T.P. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites**, Part B, v. 38, p. 291–300, 2007.

44 - MADHUMATHI, K.; SHALUMON, K.T.; RANI, V.V.D.; TAMURA, H.; FURUIKE, T.; SELVAMIRIGAN, N.; NAIR, S.V.; JAYAKUMAR, R. Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 45, p. 12–15, 2009.

45 – MADHUMATHI, K.; BINULAL, N.S.; NAGAHAMA, H.; TAMURA, H.; SHALUMON, K.T.; SHALUMON, N.; SELVAURUGAN, N.; NAIR, S.V.; JAYAKUMAR, R. Preparation and characterization of novel beta-chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 44, p. 1–5, 2009.

46 - MATHEW, P.; NITYA, G.; NITYA, N.; SELVAURUGAN, S.V., NAIR, S.V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation and characterization of

chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydr. Polym.**, v. 80, n.3, p. 687-694, 2010.

47 - TABATA, Y.; IKADA, Y. Protein release from gelatin matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 31, p. 287–301, 1998.

48 – CHEN, S.C.; WU, Y.C.; MI, F.L.; LIN, Y.H.; YU, L.C.; SUNG, H.W. A novel pH sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. **J. Control. Rel.**, v. 96, p. 285–300, 2004.

49 – DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M.V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 5983–5990, 2005.

50 – OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; TOMOHIRO, Y.; SHIGEMASA, S.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydr. Polym.**, v. 53, p. 337–342, 2003.

51 –POUTANEN, K.; FORSELL, P. Modification of starch properties with plasticizers. **Trends. Polym. Sci.**, v. 4, p. 128–132, 1996.

52 – DELL, P.A.; KOHLMAN, W.G. -Effects of water-content on the properties of starch poly(ethylene vinyl alcohol) blends. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 52, p. 353–363, 1994.

53 – CHEVALLAY, B.; HERBAGE, D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffolds for cell cultures: application for tissue engineering and gene therapy. **Med. Biol. Eng. Comput.**, v. 38, p. 211–218, 2000.

54 - EYRE, D.R. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. **Science**, v. 207, p. 1315–1322, 1980.

55 – KEMP, P.D. Tissue engineering and cell-populated collagen matrices. **Methods Mol. Biol.**, v. 139, p. 287–293, 2000.

- 56 – DAVIDSON, P.F.; LEVINE, L.; DRAKE, M.P.; RUBIN, A.; BUMP, S. The serologic specificity of tropocollagen telopeptides. **J. Exp. Med.**, v. 126, p. 331–346, 1967.
- 57 – LYNN, A.K.; YANAS, I.V.; BONFIELD, W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. **J. Biomed. Mater. Res., B. Appl. Biomater.**, v. 71B, p.343–354, 2004.
- 58 – FRIESS, W. Collagen: biomaterial for drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 45, p. 113–136, 1998.
- 59 – ROCHA, L.B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M.A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 449-456, 2002.
- 60 – KULANTHAIVEL, S.; MISHRA, U.; AGARWAL T.; GIRI, S.; PAL, K.; PRAMANIK, K.; BANERJEE, I. Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion. **Ceram. Inter.**, v. 41, n. 9, p. 11323-11333, 2015.
- 61 – CHEN, J.P.; CHANG, Y.S. Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Col. Surf B. Biointerf.**, v. 86, n. 1, p. 169-175, 2011.
- 62 – RÓDENAS-ROCHINA, J.; RIBELLES, J.L.; LEBOURG, M. Comparative study of PCL-Hap and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 24, n. 5, p. 1293-308, 2013.
- 63 - MELCHELS, F. P. W.; BARRADAS, A. M. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE BOER, J.; FEIJEN, J.; GRIJPA, D. W. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. **Acta Biomater.**, v. 6, p. 4208–4217, 2010.
- 64 - WU, H.; WAN,Y.; DALAI, S.; ZHANG, R. Response of rat osteoblasts to polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds. **J. Biomed. Mat. Res. Part A**, v. 92, p. 238–245, 2010.
- 65 – HUTMACHER, D.; KIRSCH, A.; ACKERMANN, K.; HUERZELER, M. Processing and fabrication of bioresorbable implants and devices e state of the art

and future perspectives. In: STARK, G.B; HORCH R., TANCOS, E., editors. **Processing and fabrication of advanced materials**. Singapore: World Scientific, 1998. p. 1645-1660.

66 – HUIESKES, R.; WEINANS, H.; VAN RIETBERGEN, B. The relationship between stress-shielding and bone resorption around total hip stems and the effect of flexible materials. **Clin. Orthop. Pract.**, v. 10, p. 836-844, 2010.

67 – DU, E.J.; CUI, F.Z.; ZHU, X.D.; DE GROOT, K. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. **Biomed. Mater. Res.**, v. 42, p. 540-548, 1999.

68 – WAGNER-ECKER, M.; VOLTZ, P.; EGERMANN, M.; RICHTER, W. The collagen component of biological bone graft substitutes promotes ectopic bone formation by human mesenchymal stem cells. **Acta Biomater.**, v. 9, p. 7298–7307, 2013.

69 – WERKMEISTER, J.A.; RAMSHAW, J.A. Collagen-based biomaterials. **Clin. Mater.**, v. 9, n. 3-4, p.137-138, 1992.

70 – PATI, F.; DATTA, P.; ADHIKARI, B.; DHARA, S.; GHOSH, K.; MOHAPATRA, PK.D. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. **J. Biomed. Mat. Res.**, Part A, v. 100, n. 4, p. 1068-1079, 2012.

71 – VAISSIERE, G.; CHEVALLAY, B.; HERBAGE, D.; DAMOUR, O. Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. **Med. Biol. Eng. Comput.**, v. 38, n. 2, p. 205-210, 2000.

72 – KUCHARZ, E.J. **The Collagens: biochemistry and pathophysiology: biosynthesis of Collagen**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.