

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BIOCOMPATIBILIDADE DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) (PLA) E
BLENDAS PLA/POLI(ε-CAPROLACTONA) (PCL)
IMPLANTADOS EM EQUINOS**

Júlia Ribeiro Garcia de Carvalho

Médica Veterinária

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BIOCOMPATIBILIDADE DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) (PLA) E
BLENDAS PLA/POLI(ε-CAPROLACTONA) (PCL)
IMPLANTADOS EM EQUINOS**

Discente: Júlia Ribeiro Garcia de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

Dissertação de mestrado 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 de Clínica Médica
Veterinária

2019

C331b Carvalho, Júlia Ribeiro Garcia de
Biocompatibilidade de poli(ácido láctico) (PLA) e blenda
PLA/poli (E-caprolactona) (PCL) implantados em equinos
/ Júlia Ribeiro Garcia de Carvalho. -- Jaboticabal, 2019
97 p. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal

Orientador: Guilherme de Camargo Ferraz

1. Biopolímeros. 2. Materiais biomédicos. 3.
Biocompatibilidade. 4. Biodegradação. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BIOCOMPATIBILIDADE DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) (PLA) E BLENDAS PLA/POLI(-CAPROLACTONA) (PCL) IMPLANTADOS EM EQUINOS

AUTORA: JÚLIA RIBEIRO GARCIA DE CARVALHO
ORIENTADOR: GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra 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. ANDRÉ LUIS DO VALLE DE ZOPPA (Videoconferência)
Departamento de Cirurgia-FMVZ/USP / São Paulo/SP

Profa. Dra. FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Jaboticabal, 25 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Júlia Ribeiro Garcia de Carvalho, 23 de abril de 1990, Olímpia, São Paulo - Filha de Fernando José Garcia de Carvalho e Marília de Camargo Ribeiro Carvalho. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, em fevereiro de 2009. Durante a graduação foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP durante dois anos, desenvolvendo projetos na área de Fisiologia do Exercício em Equinos, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz. De agosto de 2012 a fevereiro de 2013 realizou Graduação Sanduíche pelo “Programa de intercâmbio acadêmico entre o Brasil e a França nos domínios da medicina veterinária, nutrição e produção animal”, BRAFAGRI, na Instituição VetAgro Sup, Campus Veterinário de Lyon, Marcy L’Étoile, França, sendo bolsista da Capes durante todo o período. Em março de 2015 ingressou no Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária e Saúde, na área de Clínica Médica de Grandes Animais, junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto. Em março de 2017 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Medicina Veterinária, área de Clínica Médica de Grandes Animais, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz. Durante o período de mestrado foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

*“ Eu quero acreditar na vida, ver o sol em cada amanhecer, ter no rosto um sorriso
amigo, acreditar que o sonho é pra valer...”*

Zé Martins

A todos os cavalos, que são passado, presente e futuro em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a meus pais. À minha mãe, Marília, por ser minha maior apoiadora, se hoje sinto orgulho de estar onde estou, é graças a você. Ao meu pai, Fernando, por todo suporte e estímulo, e como sempre digo, a quem devo o dom da profissão.

À minha avó, Maria Guiomar, que sempre foi minha maior fonte de incentivo, se orgulhando sempre de tudo que fiz em minha vida.

Ao meu irmão, Conrado, pelo companheirismo e por sempre cuidar de mim.

À minha madrinha, Ariane, pelo apoio e carinho dispensados durante todos esses anos.

A meus avós (*in memoriam*), Luiz Napoleão, Maria Josefina e Procópio, que sempre me protegeram lá do céu.

A meus familiares por todo carinho e torcida.

Ao meu companheiro, Ricardo, pelo apoio, suporte e amor dispensados nos últimos três anos, e, principalmente, por ser quem me aguentou nos momentos de maior estresse. Você é meu melhor amigo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, que além de professor e orientador, ainda foi pai, por me guiar nos meus passos, pelos conselhos e principalmente, por confiar em mim e no meu trabalho. Agradeço pelo incansável incentivo, pelas críticas construtivas, pelos ensinamentos profissionais e sua paciência, você é sempre luz. É uma honra ser sua orientada.

Ao Prof. Dr. Paulo Aléscio Canola, pela oportunidade de convívio e aprendizado, pela ajuda no desenvolvimento do projeto e por todos os conselhos ao longo dos últimos quatro anos.

À banca examinadora da qualificação, Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos e Profa. Paola Castro Moraes, pelo aceite do convite e pelo auxílio na concretização desse trabalho.

À banca examinadora da defesa, Prof. Dr. André Luis do Valle de Zoppa e Profa. Dra. Flávia de Almeida Lucas, pelo aceite do convite para acrescentar ainda mais a esse trabalho.

Ao Prof. Marcelo Aparecido Chinelatto e à Paula do Patrocínio Dias, por disponibilizarem o material e colaborarem de forma ativa no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também à toda a equipe do Departamento de Engenharia de Materiais da EESC/USP, São Carlos,

A Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, por ser sempre tão solícita, por todo o auxílio nas análises histopatológicas e pelos conselhos oferecidos durante o tempo em que trabalhamos juntas. Levarei seus ensinamentos por toda a vida. Gostaria de agradecer também à equipe do Departamento de Patologia Veterinária, por toda ajuda oferecida.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por abrir as portas de seu laboratório e nos auxiliar nas análises; e à toda a equipe do Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises do IBILCE/São José do Rio Preto pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, por fornecer os animais para que o estudo pudesse ser realizado.

Ao Deco, por tratar tão bem de nossos animais, por me auxiliar em muitos momentos de desespero e por estar sempre disposto a me ajudar.

Aos colegas do LAFEQ, Walter, Henriette, Juliana, Malu, Patrícia, Lucas, Manuela, Fernanda, Naila, Weverton e Carolina. Cada um participou de forma importante no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço toda a amizade, esforço e ensinamento que cada um me ofereceu. Um agradecimento especial a Mayara, pelas ajudas nas horas de desespero e dúvidas e pela solicitude em ajudar nas correções necessárias.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, sempre dispostos a ajudar.

Ao amigo e colega de trabalho Gabriel Conde. Sem você esse trabalho não teria acontecido. Não tenho como agradecer por toda ajuda e companheirismo que desenvolvemos nesses dois anos de trabalho.

Aos amigos Marina Lansarini e Caio Bustamante, pelo apoio e suporte em todos os momentos, inclusive por participarem ativamente no desenvolvimento do projeto.

Ao amigo Edmilson Daneze, pela ajuda na execução de parte do projeto, você foi essencial para que algumas coisas se tornassem mais fáceis.

Ao colega Pedro Trindade, por se dispor a ajudar, mesmo que de última hora, sendo parte essencial no desenvolvimento de parte do projeto.

Aos residentes do Hospital Veterinário, por sempre cuidarem dos cavalos com muito amor e carinho. A ajuda de vocês foi essencial para que eu pudesse desenvolver meu trabalho com mais tranquilidade.

À Aline Lourenço, por me ajudar a manter essa amizade, mesmo com toda a distância, sendo sempre paciente nas minhas ausências.

Às minhas meninas, Milka, Tocada, Contcha, Leitera e Xacrete, por todos os momentos divididos desde o primeiro ano de faculdade. Por serem apoio e diversão nos momentos de desespero. É amizade que vai durar para sempre!

À Juliana Lemes, companheira de casa nos últimos três anos, por sempre ser apoio nos momentos de desespero (e fome!).

Às moradoras da República Nutronco, Juju, Juliana, Flávia e Laís, pela amizade e companheirismo dispensados no último ano. Voltar para casa é sempre um momento de paz.

À República As Bardosa, moradoras e ex-moradoras, pela amizade e apoio nos últimos 10 anos. Vocês sempre serão minha segunda casa.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e a todos os professores e funcionários, pelo acolhimento nos últimos 10 anos. Sempre terei orgulho desse lugar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa para a realização e viabilização desse projeto (Processo FAPESP 2017/10959-4).

À todas as pessoas que participaram de alguma forma, apoiaram e torceram pela realização desse projeto.

E, por último, mas não menos importante, aos queridos cavalos Pérsico, Loira, David, Alegria, Mara, Ceará e Jaú. Sem vocês, nada disso seria possível. Foram mestres e me possibilitaram aprender ainda mais com vocês. Agradecimentos nunca serão suficientes.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Polímeros biodegradáveis	2
2.1.1 <i>Poli(ácido láctico) (PLA)</i>	<i>4</i>
2.1.2 <i>Poli(ε-caprolactona) (PCL)</i>	<i>5</i>
2.1.3 <i>Blendas poliméricas</i>	<i>6</i>
2.2 Biocompatibilidade.....	7
2.3 Métodos de avaliação da resposta inflamatória e biodegradação	8
2.3.1 <i>Concentração de Fibrinogênio plasmático (FP).....</i>	<i>8</i>
2.3.2 <i>Avaliação termográfica infravermelha</i>	<i>9</i>
2.3.3 <i>Avaliação nociceptiva</i>	<i>10</i>
2.3.4 <i>Avaliação ultrassonográfica.....</i>	<i>11</i>
2.3.5 <i>Análises Histopatológicas.....</i>	<i>12</i>
2.3.5.1 <i>Coloração Hematoxilina-eosina (HE).....</i>	<i>13</i>
2.3.5.2 <i>Coloração Picrosirius-hematoxilina (PSH)</i>	<i>14</i>
2.3.6 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	<i>15</i>
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
4. REFERÊNCIAS.....	16
CAPÍTULO 2 – Poli(ácido láctico) (PLA) e blenda PLA/poli(ε-caprolactona) (PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ε-caprolactona e tetrahydrofurano apresentaram biocompatibilidade e biodegradação em equinos¹.....	25
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 <i>Preparação dos polímeros.....</i>	<i>28</i>
2.2 <i>Animais.....</i>	<i>28</i>
2.3 <i>Grupos experimentais</i>	<i>29</i>
2.4 <i>Procedimento para implantação dos biopolímeros.....</i>	<i>31</i>

2.5 Métodos de avaliação.....	33
2.5.1 <i>Avaliação clínica.....</i>	33
2.5.2 <i>Fibrinogênio plasmático (FP).....</i>	33
2.5.3 <i>Temperatura termográfica (TT)</i>	33
2.5.4 <i>Limiar nociceptivo mecânico (LNM)</i>	35
2.5.5 <i>Avaliação ultrassonográfica.....</i>	35
2.5.6 <i>Colheita do material e análises histopatológicas.....</i>	36
2.5.6.1 <i>Coloração Hematoxilina-eosina (HE)</i>	36
2.5.6.2 <i>Coloração Picrosirius-hematoxilina (PSH)</i>	37
2.5.7 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	38
2.6 Momentos de avaliação.....	38
2.7 Delineamento e análise estatística.....	38
3. RESULTADOS.....	39
3.1 <i>Avaliação clínica.....</i>	39
3.2 <i>Fibrinogênio plasmático</i>	42
3.3 <i>Temperatura termográfica cutânea.....</i>	42
3.4 <i>Limiar nociceptivo mecânico.....</i>	43
3.5 <i>Avaliação ultrassonográfica</i>	43
3.6 <i>Análises histopatológicas.....</i>	48
3.6.1 <i>Coloração Hematoxilina-eosina.....</i>	48
3.6.2 <i>Coloração Picrosirius-hematoxilina (PSH).....</i>	52
3.6 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	54
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÕES	63
APÊNDICES	70
APÊNDICE A - PERFIL CLÍNICO DOS ANIMAIS.....	71
APÊNDICE B. PERFIL HEMATOLÓGICO DOS ANIMAIS.....	72
APÊNDICE C. PERFIL BIOQUÍMICO DOS ANIMAIS	73

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado **"Biocompatibilidade de biopolímeros aplicados em equinos"**, protocolo nº 006548/17, 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 04 de maio de 2017.

Vigência do Projeto	08/05/2017 a 31/05/2018
Espécie / Linhagem	<i>Equus ferus caballus</i>
Nº de animais	06 animais
Peso / Idade	± 400Kg / ± 12 anos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	FCAV Unesp Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de maio de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

BIOCOMPATIBILIDADE DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) (PLA) E BLENDAS PLA/POLI(ε-CAPROLACTONA) (PCL) IMPLANTADOS EM EQUINOS

RESUMO - Os biomateriais são projetados para interagir com sistemas biológicos, podendo ser sintéticos como o metal, ou naturais como biopolímeros. O desenvolvimento de novas tecnologias a partir de fontes renováveis é amplamente empregado nas diferentes áreas do conhecimento devido à grande preocupação com a preservação do meio ambiente. Na Medicina Veterinária, observa-se interesse para o desenvolvimento de formulações medicamentosas de longa duração, sendo os biopolímeros alternativas viáveis para desempenhar o papel de carreador, além da sua utilização como arcabouços para regeneração óssea, fios de sutura, parafusos, pinos e placas para cirurgias ortopédicas. Objetivou-se avaliar a biocompatibilidade do poli(ácido lático) (PLA) e da nova blenda PLA/poli(ε-caprolactona) (PCL) implantados pela via subcutânea em equinos. Utilizaram-se 6 equinos, 3 machos e 3 fêmeas, sem raça definida, com idade entre 10 e 18 anos e peso médio de 405 kg $\pm$ 37. O experimento foi composto por quatro grupos experimentais: grupo controle (C), grupo implante negativo (IN), grupo PLA e grupo PLA/PCL, sendo que os dois últimos foram submetidos à implantação de PLA puro ou da blenda PLA/PCL, respectivamente. Os equinos foram submetidos a procedimento cirúrgico para a implantação dos biomateriais no tecido subcutâneo, na face lateral do pescoço. Os polímeros permaneceram implantados durante 6 meses, sendo realizadas avaliações nos momentos antes, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 16 e 24 semanas após a implantação. O exame físico consistiu na avaliação da frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura corporal (TC), motilidade intestinal (MI), grau de hidratação (GH), coloração de mucosas aparentes (CMA) e tempo de preenchimento capilar (TPC). Determinou-se a concentração plasmática de fibrinogênio (FP). A termografia infravermelha (TIV) foi utilizada para determinação de resposta inflamatória. A resposta nociceptiva foi avaliada por meio dos filamentos de Von Frey (FVF). O exame ultrassonográfico (US) foi realizado para avaliação das respostas locais à presença do material, além da ecogenicidade dos polímeros. Ao final do período de implantação, os biomateriais foram retirados por meio de biópsia cutânea para análise histopatológica, por meio das colorações hematoxilina-eosina (HE) e picrosirius-hematoxilina (PSH). Realizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação da estrutura e biodegradação do material. Aplicou-se análise de variância para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey. Para avaliação das variáveis histopatológicas foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todas as análises foram realizadas com $p < 0,05$. Não houve alteração com importância clínica nas comparações intra e intergrupos para a FC, FR, TC, MI, GH, CMA e TPC e FP. Na TIV evidenciou-se elevação transitória da temperatura termográfica cutânea (TT) dos grupos implantados (PLA e PLA/PCL). Entre 24 e 72 h após a implantação houve aumento de TT dos grupos implantados (PLA e PLA/PCL), quando comparado aos grupos IN e C. Na avaliação nociceptiva evidenciou-se diminuição do limiar nociceptivo mecânico (LNM) dos grupos implantados (PLA e PLA/PCL) e do grupo IN, em relação ao grupo C, entre 6 a 120 h após o procedimento. Observou-se diminuição do LNM dos grupos implantados em relação ao grupo IN 48 h após a implantação. No US foi possível observar maior edema nos grupos

implantados e no grupo IN, em relação ao grupo C, entre 6 e 168 h após o procedimento. Nos momentos 48 a 96 h, os grupos implantados apresentaram maior grau de edema que o grupo IN. Além disso, foi possível evidenciar perda de ecogenicidade dos polímeros, que se iniciou na 5ª semana para o grupo PLA, e na 6ª semana para o grupo PLA/PCL. Na HE foi possível observar formação de reação inflamatória granulomatosa tipo corpo estranho, não havendo diferença entre os dois tipos de polímeros. Na PSH observou-se maior agregação e compacidade das fibras de colágeno da camada que circunda o polímero para o grupo PLA. Na MEV foi possível observar que os biomateriais (PLA e PCL/PLA) estavam em processo de biodegradação. Conclui-se que tanto o PLA puro quanto a blenda PLA/PCL são biocompatíveis e biodegradáveis com potencial para utilização na Medicina Equina.

Palavras-chave: biodegradação, biomateriais, cavalos, implantação de polímeros, segurança

BIOCOMPATIBILITY OF POLY(LACTIC ACID) (PLA) AND BLEND PLA/POLI(ε-CAPROLACTONE) (PCL) IMPLANTED IN EQUINE

ABSTRACT - Biomaterials are designed to interact with biological systems, which may be synthetic as metal, or natural as biopolymers. The development of new technologies from renewable sources is widely used in the different areas of knowledge due to the great concern with the preservation of the environment. In veterinary medicine, there is interest in the development of long-lasting drug formulations, with biopolymers being feasible alternatives to play the role of carrier, as well as their use as scaffolds for bone regeneration, sutures, screws, pins and plates for orthopedic surgeries. The objective of this study was to evaluate the biocompatibility of poly(lactic acid) (PLA) and PLA/poly(ε-caprolactone) (PCL) new blends implanted subcutaneously in horses. Six equine, 3 male and 3 female, cross-breed, aged between 10 and 18 years and mean weight of 405 kg ± 37 were used. The experiment was composed of four experimental groups: control group (C), negative implant group (IN), PLA group and PLA/PCL group, being that the last two were submitted to the implantation of pure PLA and the PLA/PCL blends, respectively. The horses were submitted to a surgical procedure for implantation of the biopolymers in the subcutaneous tissue, on the lateral side of the neck. The polymers remained implanted for 6 months, and evaluations were performed before, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 16 and 24 weeks after implantation. The physical examination consisted of evaluation of heart rate (HR), respiratory rate (RR), body temperature (BT), intestinal motility (IM), degree of hydration (DH), apparent mucosal coloration (AMC), and capillary filling time (CFT). The plasma fibrinogen concentration (PF) was determined. Infrared thermography (IRT) was used to determine the inflammatory response. The nociceptive response was evaluated by von Frey filaments (VFF). Ultrasound examination (US) was performed to evaluate the local responses to the presence of the material, in addition to the echogenicity of the polymers. At the end of the implantation period, the biomaterials were removed by means of cutaneous biopsy for histopathological analysis, using hematoxylin-eosin (HE) and picosirius-hematoxylin (PSH) staining. Scanning electron microscopy (SEM) was performed to evaluate the structure and biodegradation of the material. Variance analysis was applied for repeated measurements followed by the Tukey test. The non-parametric Mann-Whitney test was used to evaluate the histopathological variables. All analyzes were performed with $p < 0.05$. There was no change of clinical importance in the intra and intergroup comparisons for HR, RR, BT, IM, DH, AMC, CFT and PF. The IRT showed transient elevation of the cutaneous temperature (CT) of the implanted groups (PLA and PLA/PCL). Between 24 and 72 h after implantation, there was an increase in CT of the implanted groups (PLA and PLA/PCL) when compared to the IN and C groups. Nociceptive evaluation showed a decrease in the mechanical nociceptive threshold (MNT) of the implanted groups (PLA and PLA/PCL) and the IN group, in relation to group C, between 6 and 120 h after the procedure. There was a decrease in the MNT of the implanted groups in relation to the IN group 48 h after implantation. In the US, it was possible to observe greater edema in the implanted groups and in the IN group, in relation to the group C, between 6 and 168 h after the procedure. Between 48 and 96 h, the implanted groups had a higher degree of edema than the IN group. In addition, it was possible to show loss of echogenicity of the polymers, which started in

the 5th week for the PLA group, and in the 6th week for the PLA/PCL group. In HE, it was possible to observe the formation of a granulomatous inflammatory reaction type foreign body, with no difference between the two types of polymers. In PSH, greater aggregation and compactness of the collagen fibers of the layer surrounding the polymer for the PLA group was observed. In the SEM it was possible to observe that the biomaterials (PLA and PCL/PLA) were in the process of biodegradation. It is concluded that both pure PLA and PLA/PCL blends are biocompatible and biodegradable with potential use in equine medicine.

Keywords: biodegradation, biomaterials, horses, polymer implantation, safety

LISTA DE ABREVIATURAS

AMC - Apparent mucosal coloration
BT - Body temperature
C - Grupo controle / Control group
CFT - Capillary filling time
CMA - Coloração de mucosas aparentes
CT - Cutaneous temperature
DH - Degree of hydration
ED - Edema
EG - Ecogenicidade
EPM - Erro padrão da média
FC - Frequência cardíaca
FP - Fibrinogênio plasmático
FR - Frequência respiratória
FVF - Filamentos de Von Frey
GH - Grau de hidratação
HE - Hematoxilina-eosina / Hematoxylin-eosin
HR - Heart rate
IM - Intestinal motility
IN - Implante negativo / Negative implant
IRT - Infrared thermography
LMN - Limiar nociceptivo mecânico
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
MI - Motilidade intestinal
MNT - Mechanical nociceptive threshold
PBAT - Poli(butileno adipato-co-tereftalato)
PBS - Poli(butileno succinato)
PCL - Poli(ϵ -caprolactona) / Poly(ϵ -caprolactone)
PDLA - Poli(D-ácido láctico)
PF - Plasma fibrinogen

PFA - Proteína de fase aguda
PSH - Picrosirius-hematoxilina / Picrosirius-hematoxylin
PHB - Poli(hidroxibutirato)
PLA - Poli(ácido láctico) / Poly(lactic acid)
PLDLA - Poli(L-D-ácido láctico)
PLGA - Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PLLA - Poli(L-ácido láctico)
POE - Poli(óxido etileno)
RR - Respiratory rate
SEM - Scanning electron microscopy
TC - Temperatura corporal
TIV - Termografia infravermelha
TPC - Tempo de preenchimento capilar
TT - Temperatura termográfica
US - Exame ultrassonográfico
VFF - Von Frey filaments

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação intragrupos de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura corporal (TC) de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Resultados expressos em média dos valores $\pm$ EPM41

Tabela 2. Avaliação intragrupos de fibrinogênio plasmático (FP), temperatura termográfica (TT) e limiar nociceptivo mecânico (LNM) de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Resultados expressos em média dos valores $\pm$ EPM45

Tabela 3. Avaliação intragrupos do grau de edema, obtido por meio de avaliação ultrassonográfica, de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Resultados expressos em média dos valores $\pm$ EPM.....46

Tabela 4. Avaliação intragrupos do grau de ecogenicidade, obtido por meio de avaliação ultrassonográfica, de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. Resultados expressos em média dos valores $\pm$ EPM.....46

Tabela 5. Alterações histopatológicas de equinos submetidos a 24 semanas de implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. As características da reação inflamatória do tecido ao implante foram classificadas semi-quantitativamente, por escores, de acordo com os critérios propostos por De Jong et al. (2005) [22]. (+) mínimo; (++) moderado; (+++) marcado; (+++++) severo. Coloração Hematoxilina-Eosina.....49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática dos sítios de avaliação de um dos animais utilizados no experimento. C = grupo controle; IN = implante negativo; PLA = poli(ácido láctico) puro; PCL = poli(ϵ -caprolactona); PLA/PCL = blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano30

Figura 2. Fluxograma dos procedimentos cirúrgicos de um dos animais utilizados durante o experimento. As implantações foram realizadas com intervalos de 14 dias para que não houvesse sobreposição da reposta inflamatória sistêmica, sendo o fibrinogênio plasmático utilizado como biomarcador inflamatório em equinos [28]. IN = implante negativo; PLA = poli(ácido láctico) puro; PCL = poli(ϵ -caprolactona) PLA/PCL = blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano31

Figura 3. Procedimento cirúrgico realizado para implantação de PLA puro e blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano no tecido subcutâneo de equinos. (A) Bloqueio anestésico infiltrativo ao redor do local de incisão com 2,0 mL de cloridrato de lidocaína a 2% (B) Incisão horizontal de 2 cm com lâmina de bisturi nº15 na área determinada na face lateral cervical (C) Obtenção de espaço entre pele e músculo cutâneo por divulsão (D) Implantação do polímero (EF) Dermorrafia em padrão simples separado com fio nylon 0.....32

Figura 4. Termograma infravermelho do local da implantação na região cervical lateral de equino implantado com blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano no tecido subcutâneo de equinos. Observar escala de temperatura à direita. O quadrado delimita a região de implantação do biopolímero.....34

Figura 5. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão da frequência cardíaca (FC) (A), frequência respiratória (FR) (B) e temperatura corporal (TC) (C) de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Médias seguidas de letras diferentes em cada momento diferem entre os grupos por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$). *Indica elevação para todos os grupos experimentais.....40

Figura 6. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão da concentração de fibrinogênio plasmático (mg/dL) de equinos submetidos à implantação de polímero (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano ou à realização de incisão cirúrgica (IN).....42

Figura 7. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão da temperatura termográfica (TT) (A) e do limiar nociceptivo mecânico (LNM) (B) de equinos submetidos a implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano. IN,

implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Médias seguidas de letras diferentes em cada momento diferem entre os grupos por meio do Teste de Tukey ($p < 0,05$)44

Figura 8. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão do grau de edema, obtido por meio de avaliação ultrassonográfica, de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Exame ultrassonográfico foi realizado com transdutor linear ajustado para 12 MHz. Médias seguidas de letras diferentes em cada momento diferem entre os grupos por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$)47

Figura 9. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão do grau de ecogenicidade, obtido por meio de avaliação ultrassonográfica, de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. Exame ultrassonográfico foi realizado com transdutor linear ajustado para 12 MHz47

Figura 10. Fotomicrografias de pele de cavalos submetidos à implantação de PLA puro. (A) Cápsula fibrosa (c) delimitada por única camada de macrófagos (seta) em contato com o polímero (*; barra=20 μ m). (B) Cápsula fibrosa (c) adjacente ao polímero (*) com infiltrado inflamatório mononuclear (barra=20 μ m). (C) Área de proliferação de tecido conjuntivo fibroso (crescimento celular) bem diferenciado ao redor do polímero (*; barra=100 μ m). (D) Infiltrado histiocitário intracapsular com fagocitose do polímero (*; barra=20 μ m). (E) Cápsula fibrosa (c) adjacente ao polímero (*), com neovascularização (seta; barra=20 μ m). Hematoxilina-eosina.....50

Figura 11. Fotomicrografias de pele de cavalos submetidos à implantação da blenda PLA/PCL. (A) Cápsula fibrosa com células gigantes multinucleadas (seta) fagocitando polímero (*; barra=50 μ m). (B) Infiltrado inflamatório mononuclear intracapsular ao redor de macrófagos com polímero intracitoplasmático (*; barra=20 μ m). (C) Área de proliferação de tecido conjuntivo fibroso bem diferenciado ao redor do polímero (*; barra=100 μ m). (D) Infiltrado histiocitário intracapsular acentuado fagocitando o polímero (*; barra=50 μ m). (E) Cápsula fibrosa adjacente ao polímero (*) com neovascularização (seta; barra=20 μ m). Hematoxilina-eosina.....51

Figura 12. Fotomicrografias de pele de cavalos nas diferentes condições experimentais, coradas pelo método da Picrosirius-Hematoxilina e analisados sob luz policromática (PSH) e sob luz polarizada (PSH-pol). (A) O Colágeno dérmico (co) está evidenciado fortemente corado em vermelho sob luz policromática (barra=500 μ m) e (E) com intensa birrefringência na luz polarizada (barra=500 μ m). (B) e (F) Observa-se modificações no padrão de distribuição da fibra no CP devido ao procedimento cirúrgico (seta; barra=500 μ m). (C), (D), (G) e (H) A implantação dos polímeros PLA e PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano promoveu uma reação fibrótica com depósito de colágeno, altamente orientado e birrefringente na periferia do material. O comportamento do colágeno é

dicroico quando as fibras são dispostas em planos paralelos (II) ou perpendiculares (I) (barra=200 μ m). (*) localização do polímero no corte.....53

Figura 13. Micrografias eletrônicas da superfície de polímeros implantados pela via subcutânea em equinos. (A) PLA antes da implantação, (B) Blenda PLA/PCL antes da implantação, (C) PLA submetido à degradação por 24 semanas e (D) Blenda PLA/PCL submetida à degradação por 24 semanas. (Barra=20 μ m). Blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano.....54

Figura 14. Micrografias eletrônicas da superfície de fratura de polímeros implantados pela via subcutânea em equinos. (A) PLA antes da implantação, (B) Blenda PLA/PCL antes da implantação, (C) PLA submetido à degradação por 24 semanas e (D) Blenda PLA/PCL submetida à degradação por 24 semanas. (Barra=20 μ m). PLA/PCL Blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano. *Indica gotículas de PCL dispersas na matriz de PLA.....55

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Segundo a literatura, biomateriais são materiais empregados em dispositivos projetados para interagir com sistemas biológicos com intuito de substituir, aumentar ou tratar tecidos, órgãos ou funções do organismo, devendo manter suas propriedades e características estruturais (Ratner et al., 2012). Abrangem os materiais sintéticos, como metais, cerâmicas, polímeros sintéticos e materiais compósitos; e os biomateriais naturais, que incluem os biopolímeros como colágeno, seda, queratina, polissacarídeos, entre outros (Vulcani et al., 2008).

A aplicabilidade dos biomateriais baseia-se em dois fatores: biocompatibilidade e biofuncionalidade. A biocompatibilidade está relacionada ao estado de mútua existência entre o biomaterial e o organismo e ao fato de o biomaterial não apresentar citotoxicidade. A biofuncionalidade refere-se à capacidade de suportar interações célula-biomaterial no meio tecidual onde o material foi aplicado. Trata-se, então, da habilidade do material em desempenhar a função para a qual foi designado no organismo (Morais et al., 2010).

Pesquisas para o desenvolvimento pré-clínico de medicamentos inovadores a partir de fontes renováveis estão sendo amplamente desenvolvidas, a partir da conjunção de diferentes áreas do conhecimento. Na biomedicina, esta inovação possui foco para produção de materiais de sutura e osteossíntese, e na engenharia de tecidos, especialmente para a criação de tecidos funcionais, por meio de bioimpressão 3D. Esta última é feita pela montagem controlada de biomateriais compatíveis com matrizes extracelulares, células e componentes biológicos (Murphy et al., 2018).

Existem relativamente poucos estudos com a utilização de biopolímeros em equinos, sendo que grande parte deles envolve emprego de materiais para reparação de fraturas ósseas (Pyles et al., 2007; Moreira et al., 2016; Nóbrega et al., 2017; Selim et al., 2018). Nesse contexto, a utilização de materiais poliméricos tem se mostrado alternativa ao uso de enxertos autólogos e heterólogos, os quais têm apresentado limitações na medicina equina. Isso porque a correção de fraturas é parte desafiadora

da clínica cirúrgica de equinos, devido a grande massa corpórea destes animais. Os ossos de cavalos adultos apresentam elevada resistência, sendo necessária a aplicação de grande quantidade de energia para que ocorra fratura, o que geralmente resulta em fraturas cominutivas que formam lacunas ósseas, dificultando sua fixação (Moreira et al., 2016).

Além disso, existem trabalhos que envolvem o tratamento de lesões articulares (Rumbaugh et al., 2004; Barnewitz et al., 2006; Albert et al., 2012; Petit et al., 2015), ou a liberação de fármacos ou cultura de células para o tratamento de diversas afecções (Barnewitz et al., 2006; Petit et al., 2015; Nóbrega et al., 2017). Em outro estudo, os equinos são utilizados apenas como modelos experimentais para humanos, devido às semelhanças proporcionais de tamanho, carga e tipos de lesões articulares entre as duas espécies (Favi et al., 2013)

A partir dos pontos supramencionados é evidente a necessidade de realizações de pesquisas multidisciplinares, envolvendo as áreas de Engenharia de Materiais e Medicina Veterinária, com o intuito de conhecer a segurança e a toxicidade de biopolímeros, assim como sua viabilidade econômica.

Dentro desse contexto, objetivou-se:

- a) Avaliar a segurança do material puro e da blenda poli(ácido láctico) (PLA)/poli(ε-caprolactona) (PCL) implantados no subcutâneo de equinos.
- b) Avaliar as alterações histopatológicas decorrentes da implantação de material puro e blenda PLA/PCL no subcutâneo de equinos
- c) Avaliar as alterações sistêmicas de equinos implantados com material puro e blenda PLA/PCL.
- d) Observar resposta nociceptiva, termográfica e ultrassonográfica de equinos implantados com material puro e blenda PLA/PCL.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polímeros biodegradáveis

Polímeros biodegradáveis são materiais sensíveis à degradação biológica, que é realizada pela ação de microrganismos como bactérias, fungos e algas. Podem ser

degradados em semanas ou meses sob situações favoráveis de biodegradação. Esses podem ser classificados de acordo com a sua composição química, origem, método de processamento, etc. De acordo com sua origem, polímeros biodegradáveis podem ser caracterizados como provenientes de fontes naturais renováveis, sintetizados por bactérias, derivados de fonte animal ou, ainda, obtidos de fontes fósseis, como o petróleo (Avérous e Pollet, 2012).

Dentre os polímeros biodegradáveis, os que têm atraído mais atenção são os obtidos a partir de fontes renováveis, como milho, celulose, batata e cana-de-açúcar, devido ao menor impacto ambiental gerado pela sua produção. As fontes renováveis são assim conhecidas pois possuem ciclo de vida relativamente curto quando comparado com fontes fósseis, como o petróleo. Quando os polímeros renováveis são integralmente biossintetizados passam a ser conhecidos como biopolímeros (Pires et al., 2015).

Assim, biopolímeros podem ser alternativas sustentáveis aos polímeros provenientes do petróleo, atualmente dominantes no mercado e que geram descarte inadequado de toneladas desse produto no meio ambiente. Diferentemente dos biopolímeros, os polímeros derivados do petróleo, ou grande parte deles, apresentam resistência ao ataque de microrganismos e decomposição lenta, poluindo o meio ambiente. Diante do cenário atual, de preocupação com a preservação ambiental, mostra-se necessário a produção de materiais que sejam biodegradáveis ao término de sua vida útil (Shah et al., 2008; Saini et al., 2016).

Durante as últimas décadas, os materiais biodegradáveis têm sido amplamente estudados para aplicações médicas, devido a inúmeros benefícios que esses possuem em relação aos materiais não biodegradáveis. Uma das principais vantagens é a eliminação da necessidade de remoção dos implantes, pois esses materiais desaparecem após a degradação. Além disso, implantes preparados de polímeros biodegradáveis são capazes de prevenir recidivas em casos de fraturas, pois podem ser produzidos para degradarem em taxa que irá transferir lentamente a carga para os ossos, permitindo cicatrização adequada (Middleton e Tipton, 2000; Lasprilla et al., 2012).

Os primeiros polímeros terapêuticos comercialmente disponíveis foram suturas cirúrgicas, referidas como "suturas absorvíveis", que foram feitas a partir de ácido

glicólico e ácido láctico (Shalaby; Burg 2003). Desde então, houve desenvolvimento de materiais poliméricos biodegradáveis e biocompatíveis como PLA, PCL, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), entre outros (Onuma e Serruys, 2011). O PLA e o PCL pertencem a uma classe promissora de biopolímeros. Entretanto, seu potencial para transformação em produto de alto valor biotecnológico ainda não foi completamente explorado (Kang et al., 2010; Nampoothiri et al., 2010).

Apesar de todas vantagens, biopolímeros possuem algumas restrições técnicas que dificultam sua processabilidade e seu uso como produto final. A complexidade dos meios dos quais estes são extraídos e a variabilidade intrínseca da matéria-prima são pontos limitantes para sua produção. Sendo assim, muitos estudos são realizados para modificação de biopolímeros, para que esses possam ser utilizados em diversas aplicações (Brito et al., 2011).

2.1.1 Poli(ácido láctico) (PLA)

O interesse na produção fermentativa de ácido láctico aumentou devido a sua potencial utilização como recurso renovável e substituto dos petroquímicos (Nampoothiri et al., 2010). O ácido láctico é obtido a partir da fermentação do amido de plantas como milho, cana-de-açúcar, batata e beterraba (Saini et al., 2016). O processo de produção biotecnológica, a partir da síntese bacteriana (fermentação), é relativamente módico, sendo o custo dos substratos reduzido, que, associado à baixa utilização de energia, com temperatura reduzida, torna este tipo de produção viável (John et al., 2009).

O ácido láctico é o mais simples ácido hidroxilado com carbono assimétrico e apresenta duas formas assimetricamente ativas. O isômero L é produzido em humanos e outros mamíferos, enquanto que os enantiômeros D e L são produzidos pela fermentação bacteriana do gênero *Lactobacillus sp*, que, a partir de carboidratos, formam exclusivamente ácido láctico. O PLA pode ser sintetizado a partir de L-lactato, D-lactato ou L-D-lactato, originando poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(D-ácido láctico) (PDLA) ou poli(L-D-ácido láctico) (PLDLA), respectivamente (Garlotta, 2001).

O PLA é um dos polímeros em desenvolvimento como alternativa para os materiais biocompatíveis não biodegradáveis e de alto custo, devido ao seu baixo impacto ambiental quando descartado, já que esse é completamente biodegradável.

Oferece características únicas de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioreabsorbilidade, além de possuir baixo custo, possuindo potencial para aplicações em diversas áreas, como embalagens, produtos agrícolas, materiais descartáveis, indústria têxtil médica, entre outras. Na área biomédica, tem sido utilizado como fio de sutura, material de fixação óssea, material para implantes cirúrgicos, preenchimento temporário em cirurgias reconstrutivas de face, sistemas de liberação de fármacos e arcabouços para cultivo de diferentes tipos de células para a engenharia de tecidos. Entretanto, esse biopolímero apresenta baixa flexibilidade e resistência, propriedades limitantes para o uso em medicina humana e veterinária (Lasprilla et al., 2012; Finotti et al., 2017).

2.1.2 *Poli(ε-caprolactona) (PCL)*

O PCL é um polímero sintético originado de um subproduto do petróleo, chamado ciclohexanona, um líquido incolor que, em temperatura ambiente, possui odor acetonado e é usado comumente como solvente de tintas. Os polímeros sintéticos apresentam propriedades físicas, químicas e de degradação previsíveis e reprodutíveis, tornando-os mais flexíveis com relação ao seu processamento (Puppi et al., 2010).

Esse polímero possui baixa temperatura de transição vítrea, o que acarreta elevada mobilidade da sua fase amorfa à temperatura corporal. Além disso, possui alta estabilidade térmica, o que facilita a processabilidade do material. Tais características, associadas à sua boa solubilidade, excelente compatibilidade para formação de blendas, citocompatibilidade, alta flexibilidade e tenacidade, o tornaram um polímero muito versátil quanto ao processamento, o que é vantajoso para aplicação na área biomédica (Dash e Konkimalla, 2012).

Entretanto, sua produção é complexa e de alto custo, o que limita sua produção e comercialização (Mohamed e Yusoh, 2015). Essa limitação pode ser superada por meio do uso de compostos de PCL com polímeros naturais, os quais são baratos e estão disponíveis de forma abundante. Entretanto, outras propriedades desses materiais podem limitar o seu processamento (Azwa et al., 2013).

O PCL tem uma ampla variedade de aplicações em diferentes campos, como embalagens degradáveis, implantes cirúrgicos, sistemas de administração controlada

de fármacos de longa duração (Mohamed e Yusoh, 2015), arcabouços em engenharia de tecidos (Nagiah et al., 2013), suturas e como dispositivos que precisam ser reabsorvidos (Kai et al., 2008).

2.1.3 Blendas poliméricas

Várias abordagens têm sido empregadas para superar as limitações ou ajustar as propriedades físicas do PLA existente. Algumas dessas técnicas são mais comumente utilizadas, como copolimerização, reticulação polimérica, uso de plastificantes e produção de blendas poliméricas. Entre essas estratégias, a produção de blendas é um dos métodos mais baratos (Xiao et al., 2012; Zhang et al., 2015).

As blendas são misturas físicas de dois ou mais polímeros, sem que haja ligações químicas primárias entre eles. Constituem uma forma de obter novos materiais poliméricos, seja pela mistura das propriedades dos diferente polímeros ou pela geração de novas propriedades. Assim, é possível combinar as propriedades de polímeros distintos, processo que possui custo reduzido, eliminando a necessidade de desenvolvimento de novos polímeros ou copolímeros (Saini et al., 2016).

Embora o PLA possua características desejáveis como boa performance mecânica, processabilidade e estabilidade térmica, ele é considerado um polímero frágil, que apresenta baixa tenacidade e ductilidade, tornando sua utilização limitada para usos que necessitem de deformação elevada e boa resistência a impactos. Sendo assim, a produção de blendas poliméricas de PLA com outros polímeros que apresentam diferentes propriedades mecânicas complementares às observadas no PLA tem sido estudada. Dentre eles, destacam-se o poli(óxido etileno) (POE), poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT), poli(hidroxibutirato) (PHB), PCL, entre outros (Zhang et al., 2015; Finotti et al., 2017).

A produção de blendas de PLA com outros polímeros flexíveis é um método capaz de aumentar a ductilidade e diminuir a fragilidade desse polímero. Uma opção é o uso do PCL, pois esse aumenta a flexibilidade e a dureza do PLA, além de ser, também, biocompatível e bioreabsorvível. Desse modo, as blendas PLA/PCL são fortes candidatas para serem utilizadas, principalmente, em aplicações que requerem suporte mecânico apenas por determinado período de tempo (Finotti et al., 2017).

Ademais, estas misturas podem estimular a proliferação celular e a formação de cápsula conjuntiva, com potencial para serem combinadas com fármacos para ação sistêmica ou em tecido alvo, além de promoverem a estabilidade mecânica dos polímeros. Estas características desejáveis podem tornar esta mistura de polímeros interessante alternativa para o uso em vasta gama de áreas biomédicas (Ciambelli et al., 2013).

Ainda, podemos destacar que a blenda PLA/PCL pode formar um gel após o seu implante, auxiliando, *in situ*, a terapia de fármacos injetáveis, pois estes sistemas permanecem na forma de solução gelatinosa a baixas temperaturas. Isso permite a incorporação de outras moléculas biologicamente ativas que, posteriormente, tornam-se sólidas à temperatura corpórea (Kang et al., 2010).

O PLA e PCL são reportados na literatura como sendo imiscíveis, o que leva a melhorias insignificantes nas propriedades mecânicas do material. Para a produção da blenda imiscível PLA/PCL há necessidade da utilização de um compatibilizante, o qual tem a função de interagir com ambos os polímeros da blenda, melhorando a adesão interfacial e aumentando a estabilidade do sistema em relação à segregação das fases, obtendo-se, assim, morfologia mais homogênea (Finotti et al., 2017).

Dias e Chinelatto (2018) utilizaram 5% de compatibilizante comercial de copolímero tribloco derivado de ϵ -caprolactona e tetrametileno éter glicol em blendas imiscíveis de PLA com PCL, favorecendo a aderência, possivelmente, pela alteração da razão de viscosidade entre os polímeros. Tal estudo mostrou que o compatibilizante é eficiente, especialmente nas blendas contendo 75% de PLA.

2.2 Biocompatibilidade

Biocompatibilidade é a capacidade de determinado material em interagir adequadamente após sua aplicação, com o intuito de não manifestar nenhum tipo de reação, seja ela inflamatória, irritante, alérgica, tóxica ou de caráter mutagênico ou carcinogênico, quando em contato com o organismo (Menezes et al., 2009).

Sendo assim, o biomaterial deve ser biodegradado de forma controlada, ser metabolizado depois de completar seu objetivo, ser facilmente esterilizado, entre outras características. Além disso, o biomaterial ideal não deve causar reação

inflamatória, entretanto, a implantação de biomateriais sempre promove algum tipo de reação tecidual, devido ao seu íntimo contato com o tecido receptor por um longo período de tempo. A avaliação da biocompatibilidade é importante, pois permite estimar a segurança do material e sua função no organismo (Nyska et al., 2014).

Muitos fatores determinam a resposta inflamatória e a taxa de degradação dos biopolímeros, os quais podem ser avaliados histopatologicamente. Entre eles, destacam-se o local de implante e as características do material, como estrutura, peso molecular, distribuição da massa molar, composição química, tamanho e geometria do suporte desenvolvido, porosidade, rugosidade da superfície, pH e toxicidade dos subprodutos provenientes da degradação (Barbanti et al., 2005).

A biocompatibilidade de polímeros compreende, geralmente, quatro fenômenos: alterações físico-químicas ocorridas no sítio de implantação no primeiro contato com o material (adsorção); respostas dos tecidos e do meio à presença do biomaterial (imunológicas e inflamatórias); alterações sofridas pelo material, resultantes da ação do meio (degradação) e reações sistêmicas ou de alguma parte específica que não entrou em contato direto com o implante (tumores, alergias) (Hench et al., 2012).

2.3 Métodos de avaliação da resposta inflamatória e biodegradação

2.3.1 Concentração de Fibrinogênio plasmático (FP)

Traumas cirúrgicos levam à liberação de citocinas pró-inflamatórias, que causam efeito tanto nas células adjacentes à lesão, quanto de forma sistêmica. O processo inflamatório resultante leva a inúmeras alterações fisiopatológicas, como leucocitose, pirexia, depleção da proteína muscular, além de alterações hormonais. Essas mudanças sistêmicas são acompanhadas de uma elevação na concentração plasmática das proteínas de fase aguda positivas (PFA), as quais são liberadas pelo fígado. A resposta de fase aguda protege o organismo contra doenças e lesões, minimizando os danos teciduais e aumentando a taxa de reparação (Bundgaard et al., 2018).

A concentração plasmática das PFA é diretamente proporcional ao grau de lesão tecidual e/ou inflamação (Fagliari et al., 2008). Entre as principais PFA em

equinos, podemos citar a amiloide sérica A, proteína C reativa, haptoglobina e o FP. Embora o fibrinogênio seja apenas uma PFA moderada em equinos, ele é amplamente utilizado devido a disponibilidade e baixo custo do método calorimétrico (Belgrave et al., 2013; Hooijberg et al., 2014), sendo usado para diagnosticar e monitorar respostas inflamatórias em cavalos, apresentando aumento modesto (de até 4 vezes o valor normal) em resposta à inflamação (Jacobsen et al., 2009).

O estímulo à síntese de fibrinogênio ocorre seis a oito horas após a injúria, sendo que sua concentração plasmática aumenta de 2 a 10 vezes dentro de 24 a 72 horas após o início do processo inflamatório (Taylor et al., 2010).

Em um estudo com cavalos submetidos à realização de feridas cirúrgicas e posterior biópsia para acompanhamento da cicatrização não foi possível observar aumentos no FP após a realização dos procedimentos de biópsia. Tais resultados demonstram que pequenos procedimentos não são capazes de elevar as concentrações de FP no sangue (Bundgaard et al., 2018).

2.3.2 Avaliação termográfica infravermelha

A termografia infravermelha (TIV) é uma ferramenta não invasiva de detecção de mudanças na transferência de calor e do fluxo sanguíneo por meio da detecção de mudanças na temperatura corporal (TC) superficial. O termo “imagem térmica” se refere à representação gráfica da radiação eletromagnética emitida por uma superfície. Esse dispositivo tem inúmeras aplicações, não apenas na indústria, mas também na medicina humana e veterinária, como meio auxiliar de diagnóstico de diversas afecções (Nääs et al., 2014; Pavelski et al., 2015).

A avaliação da temperatura da superfície do animal pode ser utilizada como um traço indicador para estimar com precisão seu estado fisiológico. As alterações na temperatura superficial são causadas por mudanças na perfusão local, sendo que a vascularização e o suprimento sanguíneo dos tecidos são as bases da representação termográfica. No processo inflamatório, o calor é um dos sinais cardiais, pois o aumento do suprimento sanguíneo causado pela inflamação leva a aumento na temperatura local (Redaelli et al., 2014).

Trauma ou lesões teciduais sempre causam alteração na circulação, sendo que o incremento de temperatura ocorre devido à vasodilatação promovida pela liberação

de citocinas. Ademais, lesões causadas por trombose venosa, edema, desvios de fluxo sanguíneo, infarto ou má funcionamento tecidual levam à diminuição da temperatura, devido à redução da perfusão tecidual (Ring e Ammer, 2012; Carstens et al., 2016).

A termografia é um método não invasivo, prático, rápido e de baixo custo em relação à monitorização complementar, além de não apresentar limitações práticas e teóricas. Apesar disso, requer alguns cuidados para sua realização, além de possuir algumas limitações. O animal não deve estar sob a luz do sol, em condições de alta umidade ou sujeitos ao vento. Além disso, sujeiras na superfície a ser avaliada podem interferir na imagem obtida, criando artefatos (McManus et al., 2016).

Na prática equina, a termografia pode ser utilizada como ferramenta para avaliação fisiológica do cavalo, acompanhamento de procedimentos e tratamentos, e na avaliação de bem-estar animal, pois alterações na TC podem ocorrer dependendo do estado fisiológico e emocional do animal. Um dos principais usos tem sido como um meio auxiliar de diagnóstico, entretanto, a termografia não é suficiente para detectar as causas das alterações nos padrões térmicos (Redaelli et al., 2014).

Os estudos que utilizam a TIV em equinos incluem avaliação de feridas cirúrgicas (Celeste et al., 2013), monitoramento dos efeitos do treinamento em cavalos de corrida (Soroko et al., 2014), detecção de venopunção jugular para controle de administração de drogas em eventos equestres (Daglish et al., 2017), entre outros.

2.3.3 Avaliação nociceptiva

Os testes de dor reflexiva, ou limiar nociceptivo, envolvem a aplicação de um estímulo, seja ele termal, mecânico ou elétrico, a uma parte do organismo até que uma resposta comportamental ou fisiológica seja observada, ponto em que se termina a aplicação do estímulo. Esses testes ativam nociceptores no local da avaliação e desencadeiam respostas motoras localizadas e estereotipadas. O estímulo deve ser repetível, confiável e fácil de aplicar, com um ponto final claro (Love et al., 2011; Gregory et al., 2013).

Os filamentos de Von Frey (FVF) são amplamente utilizados para induzir estímulos mecânicos e avaliar o limiar de dor periférico e o limiar nociceptivo mecânico (LNM) em humanos, animais de laboratório, cães e equinos, sendo um método não

invasivo. O dispositivo é composto por vinte e um filamentos de nylon de espessuras diferentes, fixados em uma barra de acrílico. A ponta do filamento deve ser colocada em contato com a pele e uma pressão deve ser aplicada até que o filamento dobre. Quando aplicado ao redor ou sobre a área lesada, determinada força é administrada para produzir os estímulos nociceptivos (Love et al., 2011; Söbbeler e Kästner, 2017).

Os FVF medem hiperalgesia cutânea e alodinia, sendo úteis para mimetizar condições clínicas com aumento de sensibilidade cutânea, como a dor neuropática, dor pós-operatória, inflamação ou osteoartrite (Gregory et al, 2013; Piel et al., 2014).

O método já foi utilizado em equinos para testar a sensibilidade de feridas em incisões de pele com sutura (Rédua et al., 2002), mensurar a resposta de fármacos antinociceptivos em modelos incisionais de dor inflamatória (Guirro et al., 2009), avaliar o grau de sensibilidade da pele após a aplicação de microchip ou marcação a ferro quente (Lindegard et al., 2009), medir o efeito da aplicação intravenosa de tramadol (Franco et al., 2014) e determinar o efeito de diferentes anestésicos locais transdérmicos (Söbbeler e Kästner, 2017).

2.3.4 Avaliação ultrassonográfica

Nas últimas décadas, o exame ultrassonográfico tornou-se uma ferramenta de rotina na medicina veterinária. A implantação da ultrassonografia como meio de diagnóstico complementar viabilizou a obtenção de informações mais precisas, sendo possível observar com mais acurácia características como tamanho, forma, arquitetura interna, ecotextura e contorno dos objetos de estudo (Augusto e Pachaly, 2000).

A superfície da pele é representada sonograficamente por uma linha ecogênica brilhante. Quando se utiliza um transdutor de 7.5Mhz, as camadas da pele e os tecidos subcutâneos não estão bem delineados, mas são representados por um espaço hipoeecóico que normalmente varia de 7 a 10 mm de espessura (Schmitz, 1998).

Em humanos, o exame ultrassonográfico permite a determinação exata da espessura da pele, sem nenhuma restrição com relação ao local do exame e sem qualquer desvantagem para o paciente. O uso da ultrassonografia modo B permite a obtenção de dados sobre espessura das camadas da pele, além de informações sobre

mudanças na estrutura do colágeno, processos degenerativos do tecido elástico, entre outras características estruturais da pele, devido aos diferentes graus de ecogenicidade das imagens ultrassonográficas (Waller e Maibach, 2005).

O exame ultrassonográfico já foi utilizado para avaliar biocompatibilidade, degradação e viabilidade de dispositivos a base de polímeros reabsorvíveis, tanto para ligação do cordão espermático (Höglund et al., 2014), quanto para ligação de pedículos ovarianos em cães (Höglund et al., 2013). O material apresenta-se hiperecótico nas imagens ultrassonográficas, além de causar sombra acústica, sendo facilmente identificado (Höglund et al., 2011; Höglund et al., 2013; Höglund et al., 2014)

2.3.5 Análises Histopatológicas

A análise histopatológica tem como função determinar os efeitos locais no tecido ou nos fluidos corporais frente a implantação do material (Schuh, 2008). Implantes de biomateriais são reconhecidos pelo mecanismo de defesa do organismo como estranhos, o que leva a cascata de eventos conhecida como reação de corpo estranho. O tamanho, forma, propriedades mecânicas, tipo de material e tempo de implantação influenciam na resposta tecidual (Morais et al., 2010; Kastellorizios et al., 2015a).

Embora os biopolímeros minimizem a reação de corpo estranho a longo prazo quando comparados com outros tipos de implantes, há efeitos adversos relacionados ao processo de degradação. Tais reações podem estar relacionadas a remanescentes cristalinos ou à diminuição do pH do local, que dependem do tipo de material implantado (Nyska et al., 2014).

Nenhum material implantado em tecidos vivos pode ser classificado como inerte, pois sempre haverá algum tipo de reação tecidual no local de implantação, devido a seu estreito contato com o tecido por longo período de tempo (Ratner et al., 2012). Além disso, outros fatores devem ser considerados durante a avaliação histopatológica, como o procedimento de implantação, que muitas vezes envolve trauma tecidual e realização de suturas, e infecções secundárias resultantes do procedimento ou da contaminação do material (Nyska et al., 2014).

O processo inflamatório originado da implantação tem o objetivo de prevenir danos ao tecido, isolar e destruir o material estranho e iniciar o processo de reparação. Essa reação pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela dilatação de vasos sanguíneos, formação de uma camada proteica ao redor do material, além da infiltração de leucócitos, especialmente neutrófilos. A fase crônica é definida pela proliferação de fibroblastos e macrófagos, os quais podem se fundir formando células gigantes multinucleadas que se acumulam ao redor do material. Adicionalmente, o colágeno é produzido pelos fibroblastos, formando uma cápsula ao redor do implante, a qual, não necessariamente, indica estado de não-biocompatibilidade (Moraes et al., 2010).

Pode ocorrer a formação de granuloma se o implante se mantiver no tecido por longo período de tempo. Esse processo é identificado pelo acúmulo de macrófagos ativados e linfócitos, grande número de células gigantes multinucleadas, e alterações clínicas como edema e dor (Nyska et al., 2014). Dessa forma, é importante notar que a resposta aos biomateriais é mais dependente do tempo de implantação do que da dose do material (Schuh, 2008).

2.3.5.1 Coloração Hematoxilina-eosina (HE)

O processamento histológico dos tecidos consiste em: fixação, desidratação, diafanização, impregnação, inclusão, microtomia, montagem e coloração das lâminas. Inúmeros corantes podem ser utilizados na avaliação de materiais, sendo a combinação de HE a mais comumente utilizada (Costa et al., 2016).

Essa combinação está agrupada na classe de corantes que diferenciam os componentes ácidos e básicos das células. Nas células coradas com HE, os ácidos nucléicos presentes no núcleo e outras estruturas ácidas são corados pela hematoxilina, que é um corante básico, dando ao núcleo um tom azulado ou violeta. A eosina é um corante ácido, sendo atraída pelos elementos básicos como o citoplasma da célula e o colágeno, corando-os em cor-de-rosa. Portanto, núcleos basofílicos, bactérias, cálcio e outros são corados pela hematoxilina e o citoplasma eosinofílico e outros tecidos são corados de vermelho pela eosina (Gartner e Hiatt, 2012, Junqueira e Carneiro, 2017).

A avaliação de implantes de biomateriais já foi realizada com o uso da coloração de HE, seja para analisar a formação de reações de corpo estranho em porcos (Kastellorizios et al., 2015a), avaliar modificadores de resposta inflamatória para prevenção de reações de corpo estranho (Kastellorizios et al., 2015b), verificar toxicidade de arcabouços de PLA e PCL em ratos (Pogorielov et al., 2018), investigar a biocompatibilidade de polímero a base de poliuretano com carbonato de cálcio em tecido ósseo de equinos (Nóbrega et al., 2017), entre outros.

2.3.5.2 Coloração Picrosirius-hematoxilina (PSH)

A coloração com Picrosirius é uma técnica muito útil devido ao baixo custo, a simplicidade para realização e aos resultados consistentes que são obtidos. Aliada à análise morfométrica das imagens obtidas, permite caracterizar de forma qualitativa e quantitativa as anormalidades na rede de colágeno que ocorrem em tecidos conjuntivos. O uso do Picrosirius associado a luz polarizada é específico para coloração de colágeno, sendo adequado para apresentar a organização e heterogeneidade da orientação das fibras de colágeno, além de ser capaz de medir a quantidade de conteúdo de colágeno nos tecidos (Coleman, 2011; Gowda et al., 2017).

O microscópio de polarização envolve o uso de um filtro polarizador no caminho óptico entre a fonte de luz e o condensador, e um filtro analisador entre a objetiva e a ocular do microscópio. Os filtros são responsáveis por selecionar apenas um plano de direção de vibração das ondas luminosas, conhecido como plano da luz polarizada. O dicroísmo ocorre quando apenas um filtro polarizador é utilizado, sendo expresso pela diferença de absorção do objeto em duas direções perpendiculares de deslocamento do feixe de luz no objeto. Já a birrefringência ocorre quando os dois filtros se cruzam perpendicularmente (Taboga e Vilamaior, 2013).

Muitos estudos se baseavam na coloração com Picrosirius sob luz polarizada para diferenciar os tipos de colágeno de acordo com suas cores sob a luz polarizada, sendo que a birrefringência amarelo-vermelho era conferida ao colágeno tipo I, enquanto que a birrefringência esverdeada estava associada ao colágeno tipo III. Em contrapartida, outros autores descreveram que as cores obtidas sob luz polarizada

estavam relacionadas com a espessura das fibras e sua densidade e disposição, e não ao tipo específico de colágeno (Coleman, 2011).

Tal característica pode ser comprovada em um estudo que avaliou a derme de humanos, pois a rotação em 90° da platina do microscópio foi capaz de mudar a coloração das fibras de colágeno, sendo que as que inicialmente apareciam como vermelhas ou amarelas, tornaram-se verdes, mostrando que a quantidade de luz polarizada absorvida depende exclusivamente da orientação dos feixes de colágeno (Lattouf et al., 2014). A determinação de tipos específicos de colágeno só pode ser realizada usando técnicas imunohistoquímicas com anticorpos (Coleman, 2011).

Um estudo realizado para avaliar a resposta obtida após o preenchimento de falhas articulares em equinos com um polímero biodegradável utilizou-se da coloração com PSH para explorar a orientação espacial do colágeno nos túneis preenchidos ou não com o polímero (Albert et al., 2012).

2.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica se baseia na interação entre elétrons e os componentes dos tecidos, sendo que a resolução é cerca de mil vezes maior do que a de um microscópio óptico, podendo ampliar a imagem em até 150.000 vezes. Diferentemente da microscopia óptica, que a imagem é formada pela luz, na MEV a imagem é formada pelos elétrons (Jardim et al., 2013).

A MEV fornece imagens tridimensionais de superfícies sólidas com grande nitidez de detalhes. O feixe de elétrons é focalizado sobre toda a superfície da amostra, não a atravessando. O material é geralmente revestido em forma de pulverização por uma substância condutora como carbono, ouro ou irídio. Os elétrons varrem essa delgada camada de metal, sendo que alguns são refletidos pelos átomos do metal. Esses são então capturados por detectores e transmitidos a amplificadores e outros componentes eletrônicos que geram um sinal, o qual resulta em uma imagem topográfica em preto e branco (Schweitzer et al., 2008; Junqueira e Carneiro, 2017).

Alguns microscópios de varredura têm a capacidade de avaliar amostras relativamente grandes, exigindo menos preparação da amostra e, conseqüentemente, havendo menos risco de indução de artefatos (Schweitzer et al., 2008).

Essa técnica é muito utilizada para avaliar a morfologia de polímeros e blendas (Thomas et al., 2006). Em estudos com biomateriais em equinos, a MEV já foi utilizada para analisar biomembranas de colágeno para utilização em cirurgias abdominais (Vulcani et al., 2008) e para avaliar implantes a base de óleo de mamona utilizados em falhas ósseas nos membros de cavalos (Selim et al., 2018).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Finalmente é oportuno ressaltar que nosso laboratório possui experiência com a espécie equina, sobretudo em estudos sobre a farmacodinâmica de medicamentos que podem alterar o desempenho atlético (Carregaro et al., 2004; Ferraz et al., 2008). Neste trabalho avaliou-se a biocompatibilidade, em equinos, de um novo biopolímero formado pela mistura de PLA/PCL, desenvolvido no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP).

Para avaliação da biocompatibilidade e biodegradação desse material foram empregadas técnicas convencionalmente utilizadas em outros estudos sobre biocompatibilidade de polímeros, como termografia infravermelha (Bouet et al., 1990; Nóbrega et al., 2014), análise histopatológica pela coloração hematoxilina-eosina (Petit et al., 2015; Lehle et al., 2004, De Jong et al., 2005; Pogorielov et al., 2018) e picrosírius-hematoxilina (Albert et al., 2012; Bhrany et al., 2013) e microscopia eletrônica de varredura (Selim et al., 2018; Ishii et al., 2009; Niu et al., 2014). Entretanto, nós também fizemos uso de outras técnicas, as quais podem ser utilizadas em estudos futuros, como o limiar nociceptivo e a avaliação ultrassonográfica. Os principais achados são descritos no próximo capítulo desta dissertação.

4. REFERÊNCIAS

Albert R, Vásárhelyi G, Bodó G, Kenyeres A, Wolf E, Papp T, Terdik T, Módis L, Felszeghy S (2012) A computer-assisted microscopic analysis of bone tissue developed inside a polyactive polymer implanted into an equine articular surface. **Histology and Histopathology** 27:1203-1209.

Augusto AQ, Pachaly, JR (2000) Princípios físicos da ultra-sonografia – Revisão bibliográfica. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** 3:61-65.

Azwa ZN, Yousif BF, Manalo AC, Karunasena W (2013) A review on the degradability of polymeric composites based on natural fibres. **Materials & Design** 47:424–442.

Avérus L, Pollet E (2012) Biodegradable polymers. In: _____ (Eds.) **Environmental silicate nano-biocomposites**. London: Springer, p. 13-39.

Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR (2005) Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 15:13-21.

Barnewitz D, Endres M, Krüger I, Becker A, Zimmermann J, Wilke I, Ringe J, Sittlinger M, Kaps C (2006) Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. **Biomaterials** 27:2882-2889.

Belgrave RL, Dickey MM, Arheart KL, Cray C (2013) Assessment of sérum amyloid A testing of horses and its clinical application in a specialized equine practice. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 243:113-119.

Bhrany AD, Irvin CA, Fujitani K, Liu Z, Ratner BD (2013) Evaluation of a sphere-templated polymeric scaffold as a subcutaneous implant. **JAMA Facial Plastic Surgery** 15:29-33.

Bouet T, Schmitt M, Desuzinges C, Eloy R (1990) Quantitative *in vivo* studies of hyperemia in the course of the tissue response to biomaterial implantation. **Journal of Biomedical Materials Research** 24:1439-1461.

Brito GF, Agrawal P, Araújo EM, Mélo TJA (2011) Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista eletrônica de materiais e processos** 6.2:127-139.

Bundgaard L, Sørensen MA, Nilsson T, Salling E, Jacobsen S (2018) Evaluation of systemic and local inflammatory parameters and manifestations of pain in an equine experimental wound model. **Journal of Equine Veterinary Science** 68:81-87.

Carregaro AB, Mataqueiro MI, Soares OAB, Queiroz-Neto A (2004) Study of caffeine in urine and saliva of horses subjected to urinary acidification. **Journal of Applied Toxicology** 24:513-518.

Carstens AMG, Tambara EM, Colman D, Carstens MG, Matias JEF (2016) Monitorização por imagem infravermelha da intoxicação por anestésico local em ratos. **Brazilian Journal of Anesthesiology** 66:603-612.

Celeste CJ, Deschesne K, Riley CB, Theoret CL (2013) Skin temperature during cutaneous wound healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder: kinetics and anatomic-site differences. **Veterinary Surgery** 42:147-153.

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

Coleman R (2011) Picrosirius red staining revisited. **Acta Histochemica** 3:231-233.

Costa CAS, Borges AA, Santos MVO, Queiroz-Neta LB, Pereira AF (2016) Ferramentas para a avaliação de células e tecidos somáticos após a criopreservação em mamíferos. Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** 10:820-829.

Daglish J, le Jeune SS, Pypendop BH, Ramirez EM, Turner TA (2017) Use of infrared thermography to detect jugular venipuncture in the horse. **Journal of Equine Veterinary Science** 59:1-6.

Dash TK, Konkimalla VB (2012) Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release** 158:15-33.

De Jong WH, Bergsma JE, Robinson JE, Bos RRM (2005) Tissue response to partially in vitro predegraded poly-L-lactide implants. **Biomaterials** 26:1781-1791.

Dias PDP, Chinelatto MA (2019) Effect of poly(ε-caprolactone-b-tetrahydrofuran) triblock copolymer concentration on morphological, thermal and mechanical properties of immiscible PLA/PCL blends. **Journal of Renewable Materials** 7:129-138.

Fagliari JJ, Silva SL, Silva PC, Pereira GT (2008) Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo submetidos à laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 60:322-328.

Favi PM, Benson RS, Neilsen NR, Hammonds RL, Bates CC, Stephens CP, Dhar MS (2013) Cell proliferation, viability, and *in vitro* differentiation of equine mesenchymal stem cells seeded on bacterial cellulose hydrogel scaffolds. **Materials Science and Engineering: C** 33:1935-1944.

Ferraz GC, Teixeira-Neto AR, Mataqueiro MI, Lacerda-Neto JC, Queiroz-Neto A (2008) Effects of intravenous administration of caffeine on physiologic variables in exercising horses. **American Journal of Veterinary Research** 69:1670-1675.

Finotti PFM, Costa LC, Capote TSO, Scarel-Caminaga RM, Chinelatto MA (2017) Immiscible poly(lactic acid)/poly(ε-caprolactone) for temporary implants: compatibility and cytotoxicity. **Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials** 68:155-162.

Franco LG, Moreno JCD, Teixeira-Neto AR, Souza MC, Silva LAF (2014) Tramadol effects on clinical variables and the mechanical nociceptive threshold in horses. **Ciência Rural** 44:517-523.

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

Gartner LP, Hiatt JL (2012) Introdução à histologia. In: _____ (Eds.) **Histologia essencial**. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, p. 1-10.

Gowda C, Kokila G, Gopinathan PA, Praveen KS (2017) Picrosirius red and polarization microscopy – a tool for gender differentiation. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** 11:107-109.

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

Guirro ECBP, Sobrinho GR, Ferreira IMM, Valadão CAA (2009) Pre-emptive epidural injection of xylazine or amitraz, in horses: antinociceptive effect. **Ciência Rural** 39:104-109.

Hench LL, Pereira MM, Oréfice RL, Jones JR (2012) Biocompatibilidade, bioatividade e engenharia de tecidos. In: Oréfice RL, Pereira MM, Mansur HS (Eds.) **Biomateriais: Fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 16, p. 479-506.

Hooijberg EH, van den Hoven R, Tichy A, Schwendenwein I (2014) Diagnostic and predictive capability of routine laboratory tests for the diagnosis and staging of equine inflammatory disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 28:1587-1593.

Höglund OV, Hagman R, Olsson K, Mindemark J, Borg N, Lagerstedt AS (2011) A new resorbable device for ligation of blood vessels – a pilot study. **Acta Veterinaria Scandinavica** 53:1-7.

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

Höglund OV, Ingman J, Södersten F, Hansson K, Borg N, Lagerstedt AS (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** 7:825-831.

Ishii D, Ying TH, Mahara A, Murakami S, Yamaoka T, Lee W, Iwata T (2009) *In vivo* tissue response and degradation behavior of PLLA and stereocomplexed PLA nanofibers. **Biomacromolecules** 10:237-242.

Jacobsen S, Nielsen JV, Kjelgaard-Hansen M, Toelboell T, Fjeldborg J, Halling-Thomsen M, Martinussen T, Thoenfner MB (2009) Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. **Veterinary Surgery** 38:762-769.

Jardim ECG, Manrique GR, Mendonça JCG, Hanssessian A, Barros RMG (2013) Uso de técnicas de análise histológica e imunohistoquímica em Odontologia. **Archives of Health Investigation** 2:40-49.

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

Junqueira LCU, Carneiro J (2017) Métodos de estudo em Histologia. In: _____ (Eds.) **Histologia básica: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-20.

Kai W, Hirota Y, Hua L, Inoue Y (2008) Thermal and mechanical properties of a poly(ϵ -caprolactone)/graphite oxide composite. **Journal of Applied Polymer Science** 107:1395-1400.

Kang YM, Lee SH, Lee JY, Son JS, Kim BS, Lee B, Chun HJ, Min BH, Kim JH, Kim MS (2010) A biodegradable, injectable, gel system based on MPEG-b-(PCL-ran-PLLA) diblock copolymers with an adjustable therapeutic window. **Biomaterials** 31:2453-2460.

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

Kastellorizios M, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ (2015b) Multiple tissue response modifiers to promote angiogenesis and prevent the foreign body reaction around subcutaneous implants. **Journal of Controlled Release** 214:103-111.

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

Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, Changotade S (2014) Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissue. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry** 62:751-758.

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

Lindegaard C, Vaabengaard D, Christophersen MT, Ekstøm CT, Fjeldborg J (2009) Evaluation of pain and inflammation associated with hot iron branding and microchip transponder injection in horses. **American Journal of Veterinary Research** 70:840-847.

Love EJ, Murrell J, Whay HR (2011) Thermal and mechanical nociceptive threshold testing in horses: a review. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia** 38:3-14.

McManus C, Tanure CB, Peripolli V, Seixas L, Fischer V, Gabbi AM, Menegassi SRO, Stumpf MT, Kolling GJ, Dias E, Costa JBG (2016) Infrared thermography in animal production : an overview. **Computers and Electronics in Agriculture** 123:10-16.

Menezes LM, Freitas MPM, Gonçalves TS (2009) Biocompatibilidade dos materiais em ortodontia: mito ou realidade? **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial** 14:144-157.

Middleton JC, Tipton AJ (2000) Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials** 21:2335-2346.

Mohamed RM, Yusoh K (2015) A review on the recent research of Polycaprolactone (PCL). **Advanced Materials Research** 1134:249-255.

Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ (2010) Biomaterials/tissue interactions: Possible solutions to overcome foreign body response. **The AAPS Journal** 12:188-196.

Moreira RC, Graaf GMMVD, Pereira CA, Zoppa ALDVD (2016) Mechanical evaluation of bone gap filled with rigid formulations castor oil polyurethane and chitosan in horses. **Ciência Rural** 46:2182-2188.

Murphy CA, Costa JB, Silva-Correia J, Oliveira JM, Reis RL, Collins MN (2018) Biopolymers and polymers in the search of alternative treatments for meniscal regeneration: state of the art and future trends. **Applied Materials Today** 12:51-71.

Nääs IA, Garcia RG, Caldara FR (2014) Infrared thermal image for assessing animal health and welfare. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology** 2:66-72.

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

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

Niu Y, Chen KC, He T, Yu W, Huang S, Xu K (2014) Scaffolds from block polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(ethylene glycol) (PEG) for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials** 35:4266-4277.

Nóbrega FS, Ferreira MP, Facó LL, Selim MB, Zoppa ALV (2014) Uso da termografia para avaliação da resposta tecidual após implante de polímero a base de poliuretano de mamona em osso III metacarpiano de equinos. **Acta Scientiae Veterinariae** 42:1-5.

Nóbrega FS, Selim MB, Arana-Chavez VE, Correa L, Ferreira MP, Zoppa ALV (2017) Histologic and immunohistochemical evaluation of biocompatibility of castor oil polyurethane polymer with calcium carbonate in equine bone tissue. **American Journal of Veterinary Research** 78:1210-1214.

Nyska A, Schiffenbauer YS, Bami CT, Maronpot RR, Ramot Y (2014) Histopathology of biodegradable polymers: challenges in interpretation and the use of a novel compact MRI for biocompatibility evaluation. **Polymers Advanced Technologies** 25:461-467.

Onuma Y, Serruys PW (2011) Bioresorbable scaffold. **Circulation** 123:779-797.

Pavelski M, Silva DM, Leite NC, Junior DA, Sousa RS, Guérios SD, Dornbusch PT (2015) Infrared thermography in dogs with mammary tumors and healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 29:1578-1583.

Petit A, Redout EM, Van de Lest CH, Grauw JC, Müller B, Meyboom R, van Midwoud P, Vermonden T, Hennink WE, van Weeren PR (2015) Sustained intra-articular release of celecoxib from *in situ* forming gels made of acetyl-capped PCLA-PGE-PCLA triblock copolymers in horses. **Biomaterials** 53:426-436.

Piel MJ, Kroin JS, Van Wijnen AJ, Kc R, Im HJ (2014) Pain assessment in animal models of osteoarthritis. **Gene** 537:184-188.

Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM (2015) Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova** 38:957-971.

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

Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E (2010) Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress in Polymer Science** 35:403-440.

Pyles MD, Alves ALG, Hussni CA, Thomassian A, Nicoletti JLM, Watanabe MJ (2007) Parafusos bioabsorvíveis na reparação de fraturas experimentais de sesamóides proximais em equinos. **Ciência Rural** 37:1367-1373.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen J, Lemons JE (2012) Biomaterials science: an evolving, multidisciplinary endeavor. In: _____ (Eds.) **Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine**. Waltham: Academic Press, p. 25-39.

Redaelli V, Bergero D, Zucca E, Ferrucci F, Costa LN, Crosta L, Luzi F (2014) Use of thermography techniques in equines: principles and applications. **Journal of Equine Veterinary Science** 34:345-350.

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

Ring FJ, Ammer K (2012) Thermal imaging in diseases of the skeletal and neuromuscular systems. In: Diakides M, Bronzino JD, Peterson DR (Eds.) **Medical Infrared Imaging: Principles and Practices**. Boca Raton: CRC Press, p. 1-15.

Rumbaugh ML, Burba DJ, Tetens J, Oliver JL, Williams J, Hosgood G, LeBlanc CJ (2004) Effects of intra-articular injection of liquid silicone polymer in the equine middle carpal joint. **Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**. 50:306-310.

Saini P, Arora M, Ravi Kumar MNV (2016) Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews** 107:47-59.

Schmitz DG (1998) Abdominal ultrasonography. In: Rantanen NW, McKinnon AO (Eds.) **Equine Diagnostic Ultrasonography**. Baltimore:Williams & Wilkins, p. 47-71.

Schuh JCL (2008) Medical device regulations and testing for toxicologic pathologists. **Toxicologic Pathology** 36:63-69.

Schweitzer MH, Avci R, Collier T, Goodwin MB (2008) Microscopic, chemical and molecular methods for examining fossil preservation. **Comptes Rendus Palevol** 7:159-184.

Selim MB, Nóbrega FS, Facó LL, Hagen SCF, Zoppa ALV, Arana-Chavez VE, Corrêa L (2018) Histological and radiographic evaluation of equine bone structure after implantation of castor oil polymer. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 31:405-412.

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

Shalaby SW, Burg KJL (Eds.) (2003) **Absorbable and biodegradable polymers**. Boca Raton: CRC press. 304p.

Söbbeler FJ, Kästner SBR (2017) Effects of transdermal lidocaine or lidocaine with prilocaine or tetracaine on mechanical superficial sensation and nociceptive thermal thresholds in horses. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia** 45:227-233.

Soroko M, Dudek K, Howell K, Jodkowska E, Henklewski R (2014) Thermographic evaluation of racehorse performance. **Journal of Equine Veterinary Science** 34:1076-1083.

Taboga SR, Vilamaior PSL (2013) Microscopias. In: Carvalho HF, Recco-Pimentel SM (Eds.) **A célula**. Barueri:Manole, p. 45-54.

Taylor FGR, Brazil TJ, Hillyer MH (2010) Submission of laboratory samples and interpretation of results. In: _____ (Eds.) **Diagnostic Techniques in Equine Medicine**. Philadelphia: Saunders, cap. 1, p. 14.

Thomas S, Harrats C, Groeninckx G (2006) Micro- and nanostructured polymer blends: state of the art, challenges and future prospects. In: Harrats C, Thomas S, Groeninckx G (Eds.) **Micro- and nanostructured multiphase polymer blend systems: phase morphology and interfaces**. Boca Raton: CRC Press, p. 1-42.

Vulcani VAS, Macoris DG, Plepis AMG, Martins VCA, Lapena MH (2008) Obtenção, caracterização e aplicação cirúrgica de matrizes de colágeno na parede abdominal de equinos. **Ciência Animal Brasileira** 9:778-785.

Waller JM, Maibach HI (2005) Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. **Skin Research and Technology** 11:221-235.

Xiao L, Wang B, Yang G, Gauthier M (2012) Poly(Lactic Acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications. In: Ghista DN (Ed.) **Biomedical Science, Engineering and Technology**. London: InTech, p. 247-282.

Zhang C, Zhai T, Turng LS, Dan Y (2015) Morphological, mechanical, and crystallization behavior of Polylactide/Polycaprolactone blends compatibilized by L-lactide/caprolactone copolymer. **Industrial & Engineering Chemistry Research** 54:9505-9511.

CAPÍTULO 2 – Poli(ácido láctico) (PLA) e blenda PLA/poli(ε-caprolactona) (PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ε-caprolactona e tetrahidrofurano apresentaram biocompatibilidade e biodegradação em equinos¹

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o descarte inadequado de polímeros derivados do petróleo tem gerado inúmeros problemas ambientais, devido seu longo tempo de degradação no meio ambiente. Diante do cenário atual, de preocupação com a preservação ambiental, faz-se necessário o desenvolvimento de materiais que sejam ambientalmente amigáveis ao término de sua vida útil. Assim, o uso de biopolímeros se torna opção vantajosa, pois esses, além de serem produzidos a partir de recursos renováveis, são, em grande parte, biodegradáveis, sendo que sua degradação resulta em substâncias orgânicas simples por meio de interações com microrganismos no meio ambiente [1].

O poli(ácido láctico) (PLA) é um dos polímeros disponíveis comercialmente, sendo alternativa sustentável aos materiais biocompatíveis não biodegradáveis com alto custo, como os metais ou cerâmicas. No campo da medicina, o PLA é amplamente utilizado devido à sua alta biocompatibilidade com o corpo humano. Esse pode ser empregado em implantes temporários, pois, além de ser biodegradável e biocompatível, é bioreabsorvível. No entanto, o PLA apresenta baixa tenacidade e ductilidade, além de alta hidrofobicidade e baixa taxa de degradação, propriedades limitantes para o uso em várias áreas [2].

Algumas técnicas de produção são utilizadas para superar limitações mecânicas do PLA, como copolimerização, reticulação, plastificação e variação na composição [3]. Outro método alternativo de produção seria a mistura mecânica do PLA com polímeros flexíveis a temperatura ambiente, como o poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT), poli(butileno succinato) (PBS) ou poli(ε-caprolactona) (PCL), formando o que se conhece hoje por blendas poliméricas. A mistura mecânica de dois ou mais polímeros é uma das formas mais rápidas e econômicas para alterar a

¹Este capítulo corresponde a artigo científico escrito nas normas do periódico Biomaterials no formato de “Original Research”.

propriedade de um polímero, minimizando custos e esforços envolvidos no desenvolvimento de novos materiais [4].

Particularmente, blendas PLA/PCL têm despertado o interesse científico e tecnológico, pois o PCL, assim como o PLA, é biodegradável, biocompatível e bioreabsorvível, embora seja um polímero derivado do petróleo. Também, o PCL promove estabilidade mecânica do PLA, elevando sua flexibilidade e ductilidade, acompanhadas por redução da resistência à tração e elasticidade. Entretanto, o alto desempenho mecânico de blendas PLA/PCL é difícil de ser atingido, devido à imiscibilidade dos polímeros, prejudicando algumas propriedades mecânicas. Neste caso, a melhoria das propriedades mecânicas é conseguida por meio da utilização de compatibilizantes, os quais são responsáveis pelo aumento da interação entre os polímeros [5].

Tanto na Medicina como na Medicina Veterinária observa-se um interesse crescente, por parte da indústria, no desenvolvimento de materiais alternativos, onde biopolímeros apresentam-se como opção economicamente viável [1]. Eles possuem potencial para serem utilizados como implantes terapêuticos, pois podem mimetizar tecidos, promovendo proliferação celular, reconstituição tecidual e formação de cápsula conjuntiva. Ademais, podem ser combinados com fármacos para ação sistêmica ou local. Entretanto, para que esses possam ser utilizados faz-se necessário que eles sejam biocompatíveis e bioreabsorvíveis [6,7].

Além disso, a utilização de materiais poliméricos tem importância para a produção de materiais de sutura e como alternativa ao uso de enxertos autólogos e heterólogos, os quais têm apresentado limitações na medicina equina, devido a grande massa corpórea destes animais [8,9].

Com relação à importância econômica, segundo estatísticas da FAO (2017) [10], o rebanho mundial de equinos é de aproximadamente 66 milhões de cabeças. Entre eles, os cavalos atletas possuem grande importância na indústria equestre, perfazendo um total de 16 milhões de indivíduos, que movimentam quantidade significativa de recursos financeiros [11]. Assim, os equinos contribuem economicamente de diversas maneiras, seja como animal de trabalho na agropecuária, seja como forma de entretenimento e recreação, sendo responsáveis pela geração de milhares de empregos. Globalmente, o agronegócio do cavalo

representa uma indústria multibilionária. Tal fato mostra a necessidade crescente de estudos que envolvam o desenvolvimento de novos materiais biomédicos para a espécie equina.

Existem poucos estudos com o uso de biopolímeros em equinos, sendo que, em alguns, esses animais são utilizados apenas como modelos experimentais para humanos, devido às semelhanças de tipos de lesões, carga e tamanho das articulações entre as duas espécies [12]. Grande parte dos trabalhos envolveu utilização de materiais para reparação de fraturas ósseas [9, 13-15] ou de lesões articulares [16-19]. Além disso, alguns estudos focaram na liberação de fármacos ou de cultura de células para o tratamento de diversas enfermidades como fraturas ósseas, lesões articulares traumáticas e doenças articulares degenerativas [14, 17, 19].

Alguns estudos avaliaram a biocompatibilidade de biopolímeros implantados em animais. Para tal finalidade as pesquisas utilizaram métodos não invasivos para monitoramento do possível processo inflamatório induzido pela implantação de polímeros, como a termografia [20, 21]. Além disso, métodos invasivos, realizados a partir de biópsia cutânea, como análise histopatológica para avaliação da reação inflamatória [19, 22-24] e da camada de colágeno [18, 25], e microscopia eletrônica de varredura [15, 26, 27] também já foram previamente utilizados.

Na presente pesquisa foi avaliada a biocompatibilidade do PLA puro e da blenda PLA/PCL desenvolvida por Dias e Chinelatto (2018) [5], que analisaram o efeito de compatibilizante de copolímero tribloco derivado de ϵ -caprolactona e tetradhidrofurano em blenda imiscível de PLA com PCL. Estes autores mostraram que o copolímero tribloco agiu eficientemente na compatibilização da blenda, especialmente nas blendas contendo 5% de compatibilizante. É importante ressaltar que esta blenda nunca foi avaliada *in vivo* e, até onde nosso conhecimento atinge, o PLA puro implantado pela via subcutânea nunca foi estudado em equinos. Assim, a hipótese do presente estudo é que o PLA puro ou a blenda PLA/PCL são biocompatíveis, com potencial de uso na Medicina Equina. Desta maneira, objetivou-se avaliar a segurança e a biocompatibilidade do PLA e sua blenda polimérica implantados pela via subcutânea em equinos. Paralelamente, estudo ultrassonográfico, bem como de biodegradabilidade também foram realizados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação dos polímeros

As blendas foram preparadas no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, segundo Dias e Chinelatto (2018) [5] pelo processo de mistura, no estado fundido, contendo PLA Ingeo®3251D (NatureWorks, USA), PCL Capa™ 6500 (Perstorp, Suécia) e compatibilizante CAPA 7201A (Perstorp, Suécia). Este último trata-se de copolímero tipo tribloco ABA, em que A indica blocos da ϵ -caprolactona e B representa o bloco do tetrahidrofurano. Antes do processamento foi realizada a secagem do PLA à 80°C por 8 h em estufa com circulação de ar, e do PCL à 40°C em estufa à vácuo por, pelo menos, 16 h. Após a secagem dos polímeros, foi realizada a pré-mistura mecânica manual dos grânulos de PLA/PCL secos com o agente compatibilizante.

A formulação PLA continha 100% de poli(ácido láctico); e a blenda PLA/PCL possuía 71,43% em massa de poli(ácido láctico), 23,81% em massa de poli(ϵ -caprolactona) e 4,76% em massa de compatibilizante. O processamento foi realizado numa extrusora de rosca simples (modelo LAB-16, AX-Plásticos®), com rosca de 40 cm de comprimento e 16 mm de diâmetro e elemento de mistura distributivo. O perfil de temperatura adotado foi 180°C, a rotação da rosca de 60 rpm e torque de 30 N.m. Os implantes dos polímeros foram confeccionados via prensagem a quente a 180°C com dimensões de 1 cm quadrado (cm²) e 1 mm de espessura e esterilizados por óxido de etileno (Acecil®- Central de esterilização Comércio e Indústria Ltda).

2.2 Animais

Utilizaram-se 6 equinos adultos, sem raça definida, 3 machos castrados e 3 fêmeas, com peso médio de 405 kg $\pm$ 37 e idade entre 10 e 18 anos, provenientes do rebanho didático do Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ), do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

Os equinos foram mantidos em piquete e alimentados com silagem e sal mineral (Essence Fós®, Presence, Brasil) à vontade, além de 0,2% do peso corpóreo em ração farelada uma vez ao dia. A água foi fornecida *ad libitum*. Os animais foram submetidos a exame físico completo, além de exames hematológicos e bioquímicos para determinação de higidez anteriormente à realização do experimento. Além disso, os cavalos foram previamente tratados com anti-helmínticos (Eqvalan® Gold, Boehringer Ingelheim, Brasil) os quais foram repetidos a cada 4 meses; e vacinados contra raiva (Rabmune®, Ceva Saúde Animal Ltda, Brasil), toxóide tetânico, encefalomielite equina leste e oeste e influenza equina tipos A1 e A2 (Tri-equi®, Ceva Saúde Animal Ltda, Brasil). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP- *Câmpus* de Jaboticabal (protocolo nº 006548/17)

2.3 Grupos experimentais

Uma visão geral dos sítios de implantação pode ser observada na **Figura 1**. Como local dos implantes utilizou-se a face lateral cervical (tábua do pescoço), esquerda e direita, dos 6 equinos. Desta maneira utilizaram-se 12 faces laterais do pescoço para implantação, sendo que o experimento foi composto por 4 grupos experimentais. O primeiro grupo (PLA; n=6) recebeu implante de PLA puro na face lateral cervical direita do pescoço. O segundo grupo (PLA/PCL; n=6) foi submetido à implantação da blenda PLA/PCL na face lateral cervical esquerda. O terceiro grupo, denominado grupo implante negativo (IN; n=12), foi submetido somente à incisão cirúrgica, de forma semelhante aos grupos implantados com biopolímeros (PLA ou PLA/PCL). Tal procedimento foi realizado bilateralmente. Finalmente, o grupo controle (C; n=12) não foi submetido a nenhum procedimento invasivo, sendo realizada somente tricotomia para avaliação da pele íntegra.

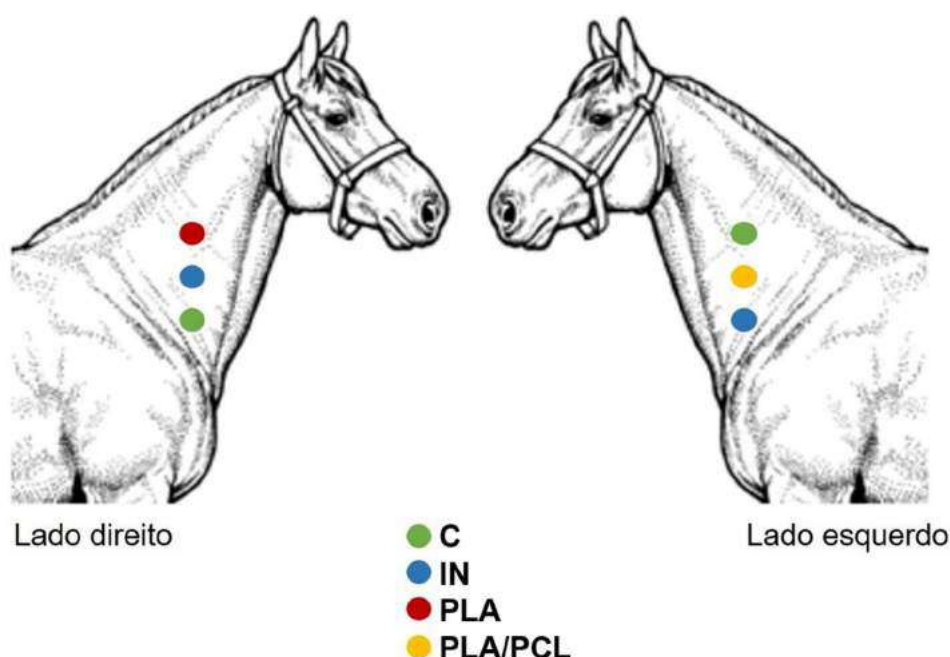


Figura 1. Ilustração esquemática dos sítios de avaliação de um dos animais utilizados no experimento. C = grupo controle; IN = implante negativo; PLA = poli(ácido láctico) puro; PCL = poli(ϵ -caprolactona) PLA/PCL = blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano.

Os procedimentos para implantação dos biomateriais (PLA ou PLA/PCL), bem como a obtenção dos grupos IN ou C foram realizados aleatoriamente, sendo que no primeiro procedimento foram utilizados 2 equinos para o grupo PLA, 2 equinos para o grupo PLA/PCL e 2 equinos para o grupo IN. O grupo C foi realizado concomitantemente aos grupos anteriores, sempre na face cervical contralateral. Exemplificando, quando um filme de PLA, PLA/PCL fosse implantado ou IN fosse realizado, uma área para o grupo C foi, imediatamente após, determinada na face contralateral. Tais procedimentos foram repetidos a cada 14 d até realização das 4 implantações em cada animal (PLA, PLA/PCL e IN em cada face cervical). Tal intervalo foi estipulado para que não houvesse possível sobreposição de respostas sistêmicas inflamatórias oriundas de implantações anteriores, sendo que foi utilizado como guia o biomarcador fibrinogênio plasmático (FP), proteína de fase aguda indicadora de inflamação (**Figura 2**). Durante processo inflamatório agudo, a concentração desta proteína pode aumentar entre 24 a 72 h, permanecendo elevada

se o agente agressor persistir no organismo [28]. Deste modo, os procedimentos foram realizados se as concentrações de fibrinogênio se encontrassem na faixa normal de referência para espécie equina.

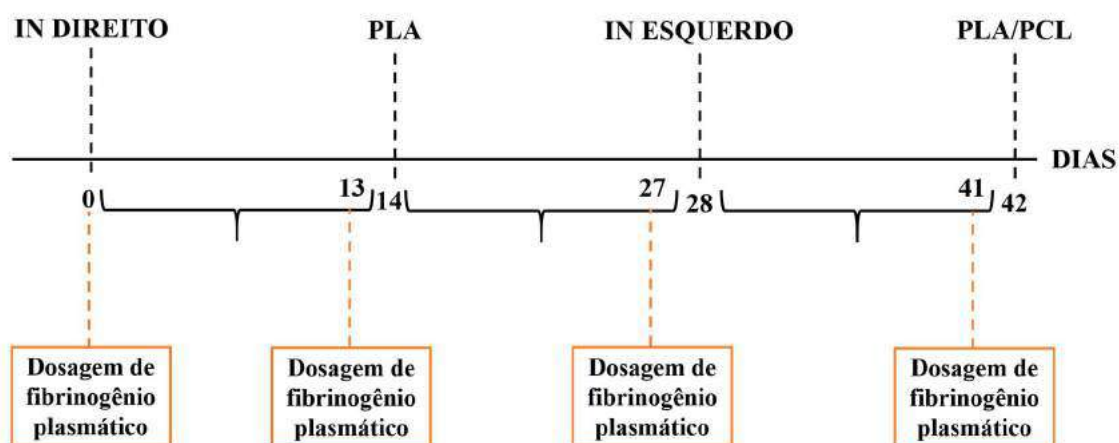


Figura 2. Fluxograma dos procedimentos cirúrgicos de um dos animais utilizados durante o experimento. As implantações foram realizadas com intervalos de 14 dias para que não houvesse sobreposição da reposta inflamatória sistêmica, sendo o fibrinogênio plasmático utilizado como biomarcador inflamatório em equinos [28]. IN = implante negativo; PLA = poli(ácido láctico) puro; PCL = poli(ϵ -caprolactona) PLA/PCL = blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano.

2.4 Procedimento para implantação dos biopolímeros

Uma área de aproximadamente 8 cm² da face lateral cervical (direita ou esquerda) foi previamente submetida à tricotomia. Importante informar que tal área foi estabelecida para ajustar o tamanho do transdutor durante o exame ultrassonográfico, de forma que as áreas dos três locais de avaliação não se sobrepussem. Subsequentemente, os animais foram sedados por meio da administração intravenosa de cloridrato de detomidina (0,01 mg.kg⁻¹) (Dormiun V®, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil). Realizou-se antisepsia do local com digliconato de clorexidina 2% e álcool 70%. Ato contínuo realizou-se bloqueio anestésico infiltrativo ao redor do local de incisão com 2,0 mL de cloridrato de lidocaína a 2% (Hipolabor farmacêutica, Brasil) (**Figura 3A**). Foi realizada uma incisão horizontal de 2 cm com lâmina de bisturi nº15 na área determinada na face lateral cervical (**Figura 3B**). Por divulsão romba obteve-se espaço entre pele e músculo cutâneo (**Figura 3C**), onde o biopolímero foi

implantado (**Figura 3D**). Importante destacar que a divulsão foi realizada distalmente à incisão para que o fio de sutura não interferisse na realização do exame ultrassonográfico. Em seguida foi realizada dermorrafia em padrão simples separado com fio nylon 0 (BC Suture, Bioline Fios Cirúrgicos Ltda., Brasil) (**Figura 3E e 3F**). Ao término do procedimento de implantação (duração média de 8,3 min), a sedação foi revertida com ioimbina ($0,12 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Nutrivet Farmácia Veterinária, Brasil). O pós-operatório consistiu na realização de limpeza do local com o uso de gaze e solução fisiológica 0,9%, além da utilização de pomada de unguento (Unguento Vansil, Vansil Saúde Animal, Brasil) ao redor da ferida cirúrgica uma vez ao dia durante 14 dias. Não foi fornecido qualquer tipo de medicamento analgésico e/ou anti-inflamatório durante todo o período experimental. A retirada dos pontos foi realizada no 7º dia após a realização do procedimento cirúrgico. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião.

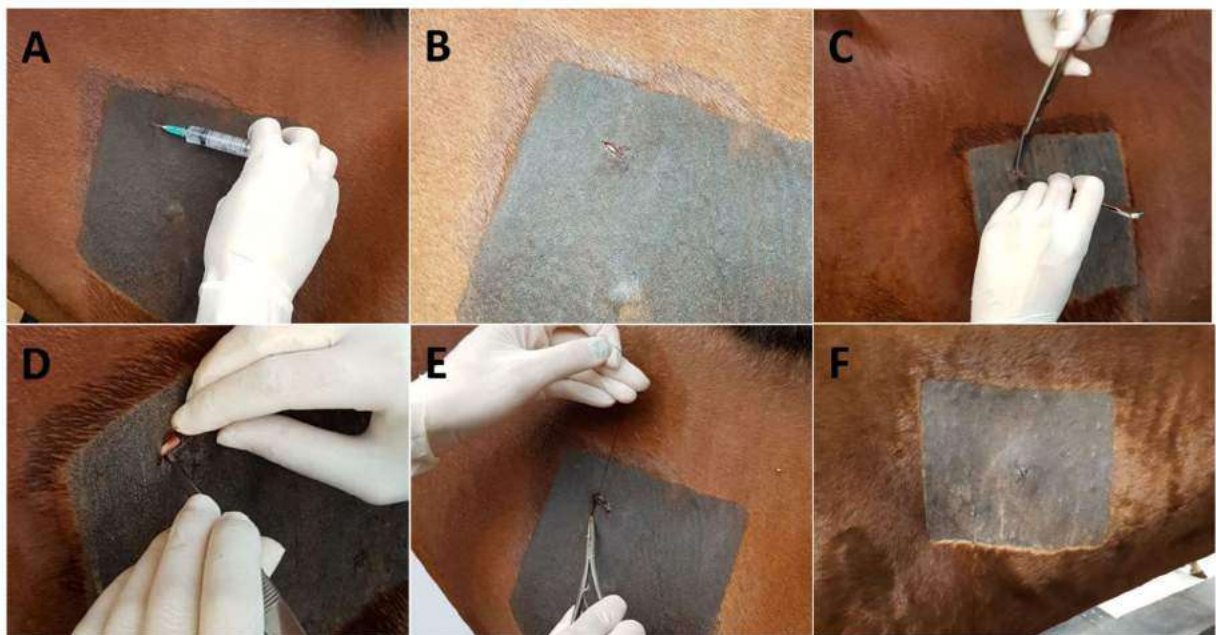


Figura 3. Procedimento cirúrgico realizado para implantação de PLA puro e blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano no tecido subcutâneo de equinos. **(A)** Bloqueio anestésico infiltrativo ao redor do local de incisão com 2,0 mL de cloridrato de lidocaína a 2% **(B)** Incisão horizontal de 2 cm com lâmina de bisturi nº15 na área determinada na face lateral cervical **(C)** Obtenção de espaço entre pele e músculo cutâneo por divulsão **(D)** Implantação do polímero **(EF)** Dermorrafia em padrão simples separado com fio nylon 0.

2.5 Métodos de avaliação

2.5.1 Avaliação clínica

Foi realizada avaliação da ferida cirúrgica quanto à integridade da sutura e presença de secreção. Por meio do exame físico foram quantificados frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura corporal (TC), por meio de medição retal, motilidade intestinal (MI), grau de hidratação (GH), coloração de mucosas aparentes (CMA) e tempo de preenchimento capilar (TPC). As variáveis foram obtidas sempre no mesmo horário, no início da manhã (exceto no momento 6 e 12 h após implantação), e pelo mesmo avaliador.

2.5.2 Fibrinogênio plasmático (FP)

Para determinação da concentração de FP utilizou-se a técnica cronométrica descrita por Clauss (1957) [29]. As amostras de sangue (3,6 mL) foram colhidas em tubos contendo citrato de sódio a 3,2%. O plasma foi separado e congelado a -80 °C. Após descongelamento, diluíram-se 200 µL das amostras numa solução tampão contendo barbitol sódico, na razão de 1:10. Posteriormente, essa solução foi acrescida de 100 µL de trombina, responsável pela polimerização do fibrinogênio. O tempo de formação do coágulo foi determinado a 37°C, por meio de coagulômetro (COAG 1000; Wama Diagnóstica), que automaticamente converteu o tempo obtido em concentração de fibrinogênio (mg/dL).

2.5.3 Temperatura termográfica (TT)

Os animais foram conduzidos para ambiente fechado, arejado, livre de correntes de ar e de exposição direta ao sol. O local de implantação foi limpo com gaze seca, 30 min antes da realização das imagens, sendo que a área não foi tocada após a limpeza. Tais procedimentos foram realizados para permitir a aclimação do animal a temperatura do ambiente. A temperatura e umidade do local foram controladas para padronização das medições térmicas. Os animais não foram

sedados durante a realização das avaliações. Importante ressaltar que antes das avaliações a área cutânea de implantação foi submetida a tricotomia, pelo menos, 24 h antes da realização dos exames. Câmera termográfica infravermelha (modelo i50, Flir® Systems, Wilsonville, Oregon, Estados Unidos) foi utilizada, com valor de sensibilidade menor que 0,1°C e emissividade de 0,98, variação de temperatura de -20 a 350°C e resolução de 140 x 140 pixels. Para a realização das imagens termográficas, esta foi posicionada a uma distância de 0,5 m, perpendicularmente, ao local da implantação. Todas as imagens foram realizadas pelo mesmo avaliador. O *software* FLIR Tools (FLIR Systems Inc, Wilsonville, OR, EUA) foi utilizado para análise das imagens. Uma área de 10 cm² foi desenhada na imagem termográfica (implantes e grupo controle) (**Figura 4**), sendo que a avaliação das imagens termográficas foi realizada de maneira cega. A TT média da área delimitada foi calculada pelo *software*. A TT média das áreas delimitadas foi calculada para cada momento.

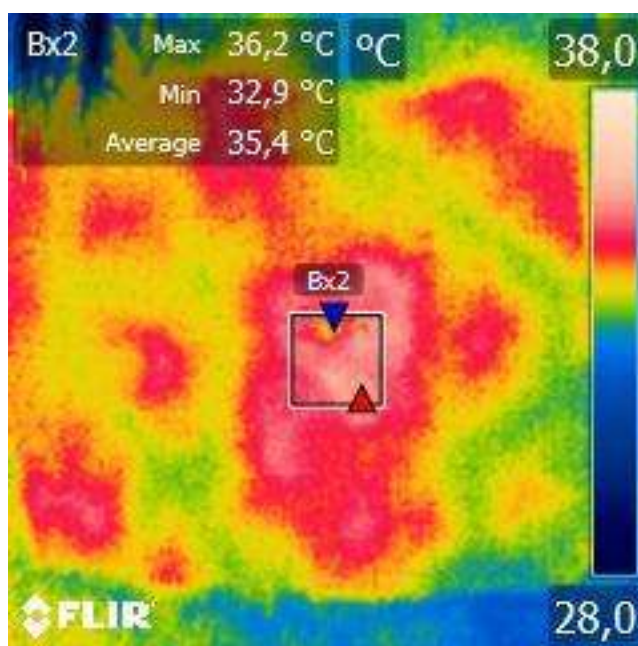


Figura 4. Termograma infravermelho do local da implantação na região cervical lateral de equino implantado com blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano no tecido subcutâneo de equinos. Observar escala de temperatura à direita. O quadrado delimita a região de implantação do biopolímero.

2.5.4 Limiar nociceptivo mecânico (LNM)

Para avaliação do limiar nociceptivo mecânico da pele foram utilizados os Filamentos de Von Frey (FVF) (Stoelting Company, Chicago, Illinois, Estados Unidos). Utilizaram-se 6 filamentos de tamanhos de 5.07 a 6.65, os quais representam força aplicada de 11,8 a 446,7 g, respectivamente. Os filamentos foram aplicados perpendicularmente a pele do animal até que o fio de nylon começasse a dobrar. Realizaram-se quatro aplicações a uma distância aproximada de 1 cm ao redor do sítio de implantação e do local de avaliação do grupo C, com intervalos de 3 segundos. Inicialmente utilizou-se o filamento de menor espessura, sendo que, quando não foi possível observar resposta aversiva, utilizou-se o filamento seguinte, e, assim por diante, até que os animais demonstrassem resposta aversiva ou o maior filamento fosse utilizado. A resposta aversiva foi definida como movimentação da cauda, das orelhas ou da cabeça, escoicear ou pisar para o lado. Simples reflexos de movimento no primeiro toque do filamento na pele não foram aceitos como resposta de aversão, sendo que, nesses casos, o teste foi repetido após 10 s. O mesmo operador realizou todas as medições, sendo que as mesmas foram feitas com os equinos em posição quadrupedal, numa área sem restrições de movimento. Os valores obtidos foram convertidos em força (g) segundo tabela fornecida pelo fabricante.

2.5.5 Avaliação ultrassonográfica

O exame ultrassonográfico foi realizado em todos os grupos para avaliação das alterações locais no tecido. Além disso, nos grupos PLA e PLA/PCL, o material implantado foi analisado. A avaliação foi feita utilizando-se aparelho de ultrassonografia portátil (MyLabTM30GoldVET®, Esaote, Gênova, Itália), com transdutor linear multifrequencial, com frequência ajustada para 12MHz. Para melhor cooptação do transdutor à pele, foi feita tricotomia, higienização e aplicação de gel condutor na região a ser avaliada. Os animais foram mantidos em posição quadrupedal, com pescoço em extensão. Todos os exames foram realizados pelo mesmo avaliador. Nos grupos implantados, houve a preocupação de centralizar o polímero durante o registro das imagens, sempre em planos ortogonais. Para o grupo

IN, o transdutor foi posicionado abaixo da incisão. Ao término do experimento, as imagens obtidas foram analisadas para a presença de edema e ecogenicidade dos polímeros. Todas as avaliações foram realizadas por um mesmo examinador, desconhecedor dos tratamentos (avaliação cega). Para a presença de edema no local de implantação foram utilizados 4 escores, sendo eles: (0) – ausência, (1) – edema discreto, (2) – edema moderado, (3) – edema intenso. A ecogenicidade foi avaliada em relação ao aspecto ultrassonográfico basal do polímero. Para tal, foram atribuídos cinco escores: (1) – 0 a 19%, (2) – 20 a 39%, (3) – 40 a 59%, (4) – 60 a 79% e (5) – 80 a 100%.

2.5.6 Colheita do material e análises histopatológicas

Após 24 semanas (6 meses), os implantes foram retirados, juntamente com fragmentos de tecido circundante, para avaliação histopatológica. Para os grupos IN e C foi retirado um fragmento de pele de tamanho correspondente ao retirado dos grupos implantados. Assim como no procedimento de implantação, os animais foram devidamente sedados, sendo realizada anestesia local infiltrativa previamente a remoção cirúrgica do fragmento. Após retirado, o material biológico foi fixado em solução de glutaraldeído a 3,5% por 24 a 48 h. O material foi então submetido a três lavagens com solução de glicose 5% + 0,1M de cacodilato por 5 min, cortado em dois fragmentos, um para análise histopatológica e um para realização de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os quais foram armazenados em álcool 70% até posterior utilização. Para preparação das lâminas um dos fragmentos foi desidratado em série crescente de etanol, purificado em xilol e embebido em parafina (Histosec, Merck). Seções de 5 µm de espessura foram cortadas com micrótomo Leica RM 2245 e montada em lâminas de vidro para posterior coloração.

2.5.6.1 Coloração Hematoxilina-eosina (HE)

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, visualizadas em microscópio óptico de luz Olympus BX50 (Olympus Corporation, Center Valley, PA, USA), sendo as imagens capturadas por meio do *software* Olympus cellSens Standard

1.18 (Olympus Corporation, Center Valley, PA, USA). As reações do tecido ao implante foram classificadas semi-quantitativamente, por escores, de acordo com os critérios propostos por De Jong e colaboradores (2005) [23], e adaptado para os seguintes parâmetros: caracterização de cápsula, infiltrado/inflamação, crescimento celular dentro do implante e fagocitose. Adicionalmente foi incluída a avaliação da vascularização da cápsula formada ao redor do polímero considerando-se os escores discreto (+), moderado (++) e acentuado (+++). Essa etapa do experimento foi realizada junto ao Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, Brasil.

2.5.6.2 Coloração Picrosirius-hematoxilina (PSH)

Os cortes de pele foram corados pela PSH e observados em microscópio óptico Olympus BX 60, sob luz branca policromática e sob luz polarizada, sendo acoplado a esse aparelho um sistema analisador de imagens pelo software Image-Pro-Plus (Media Cybernetics, USA). A utilização de filtros para a polarização da luz faz-se necessária para a identificação do colágeno dérmico, que, sob o efeito da luz polarizada, exhibe fenômenos anisotrópicos de birrefringência e dicroísmo linear. Fotomicrografias da mesma área foram obtidas no programa de análise de imagens, nas mesmas condições (tempo de exposição), antes e depois da rotação de 90° da platina do microscópio, para alinhar os filtros polarizador e analisador. Essas foram comparadas de forma pareada para averiguar os possíveis efeitos do dicroísmo linear do colágeno. Foram avaliados também a birrefringência (brilho característico, com cores interferenciais que variam do dourado ao laranja avermelhado) e o grau de agregação e compacidade das fibras de colágeno, que, quanto mais compacta e agregada, mais avermelhada é a cor interferencial exibida pela luz polarizada. Essa etapa do experimento foi realizada junto ao Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

2.5.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica dos materiais foi realizada por MEV. Amostras do material original foram criofraturadas manualmente após imersão em nitrogênio líquido por 6 segundos. O material original e o polímero retirado de um dos fragmentos obtidos na preparação para análises histopatológicas foram secos em estufa a 35 °C por 12 h, montados em suportes e pulverizadas com ouro em vácuo (Desk II, Denton Vacuum, Moorestown). Foram feitas análises das superfícies do material e das superfícies de fratura, as quais foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss LSM 880 (Zeiss, Oberkochen, GER), operado a 15 kV. Essa etapa do experimento foi realizada junto ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, Brasil.

2.6 Momentos de avaliação

Foram realizados exames físico, avaliação termográfica, nociceptiva e ultrassonográfica nos seguintes tempos: antes, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h e 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 16 e 24 semanas após a implantação. Especificamente para o FP, os momentos de avaliação foram: antes e 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h e 2 semanas. Após esse período, foi realizada remoção do implante juntamente com fragmentos de tecido circundante para avaliação histopatológica e ultra-estrutural do material e do tecido receptor.

2.7 Delineamento e análise estatística

O esquema experimental utilizado foi o delineamento em blocos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas, na qual cada grupo constituiu uma parcela (4 grupos: C, IN, PLA e PLA/PCL) e cada momentos de avaliação uma subparcela. Empregou-se modelo $Y_{ijk} = \mu + \gamma_k + \alpha_i + \delta_{ik} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$, em que Y_{ijk} é a observação ijk ; μ é a média geral; γ_k é o efeito da face lateral cervical (direita ou esquerda); α_i é o efeito do grupo na parcela principal; δ_{ik} é o efeito conjunto do grupo na parcela principal da

face lateral cervical ($\sim N(0, \sigma_\delta^2)$), β_j é o efeito do momento na subparcela; $(\alpha\beta)_{ij}$ é o efeito conjunto do grupo e do momento e ϵ_{ijk} é o efeito do erro aleatório ($\sim N(0, \sigma^2)$).

Os dados foram submetidos a análise de variância para medidas repetidas no tempo e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para comparação das variáveis histopatológicas dos grupos submetidos à implantação de biopolímeros foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SAS 9.3 com valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

A determinação da higidez dos animais foi avaliada no início do experimento por meio de teste hematológicos e bioquímicos, além de exame físico de rotina, onde nenhuma alteração foi observada (**Apêndices A, B e C**). Os resultados obtidos intragrupos estão apresentados nas **Tabelas 1, 2, 3 e 4**, sendo que os resultados intergrupos foram detalhados graficamente.

3.1 Avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada durante o experimento para averiguar a higidez dos equinos e/ou eventual presença de alterações sistêmicas induzidas pela implantação dos biomateriais. De maneira geral, não se observou desconforto associado à implantação dos materiais, não sendo constatadas alterações comportamentais e/ou no apetite dos animais. Entretanto, um dos animais apresentou reação supurativa no local de implantação da blenda PLA/PCL 5 dias após o procedimento. O local foi limpo e os curativos foram realizados normalmente. Os pontos foram retirados normalmente após 7 dias do procedimento. Ademais, durante o procedimento de retirada dos implantes foi observado sangramento local em todos os animais dos grupos PLA e PLA/PCL.

Para os valores de FC, FR e TR, tanto na comparação intra e intergrupo, foram observadas diferenças estatísticas em alguns momentos, entretanto sem importância clínica, pois os valores encontram-se dentro dos valores de referência para equinos

adultos (28-44 bpm; 8-15 mpm; 37,2- 38,3 °C; [30]). (Tabela 1 e Figura 5). Não houve alteração das variáveis MI, GH, CMA e TPC.

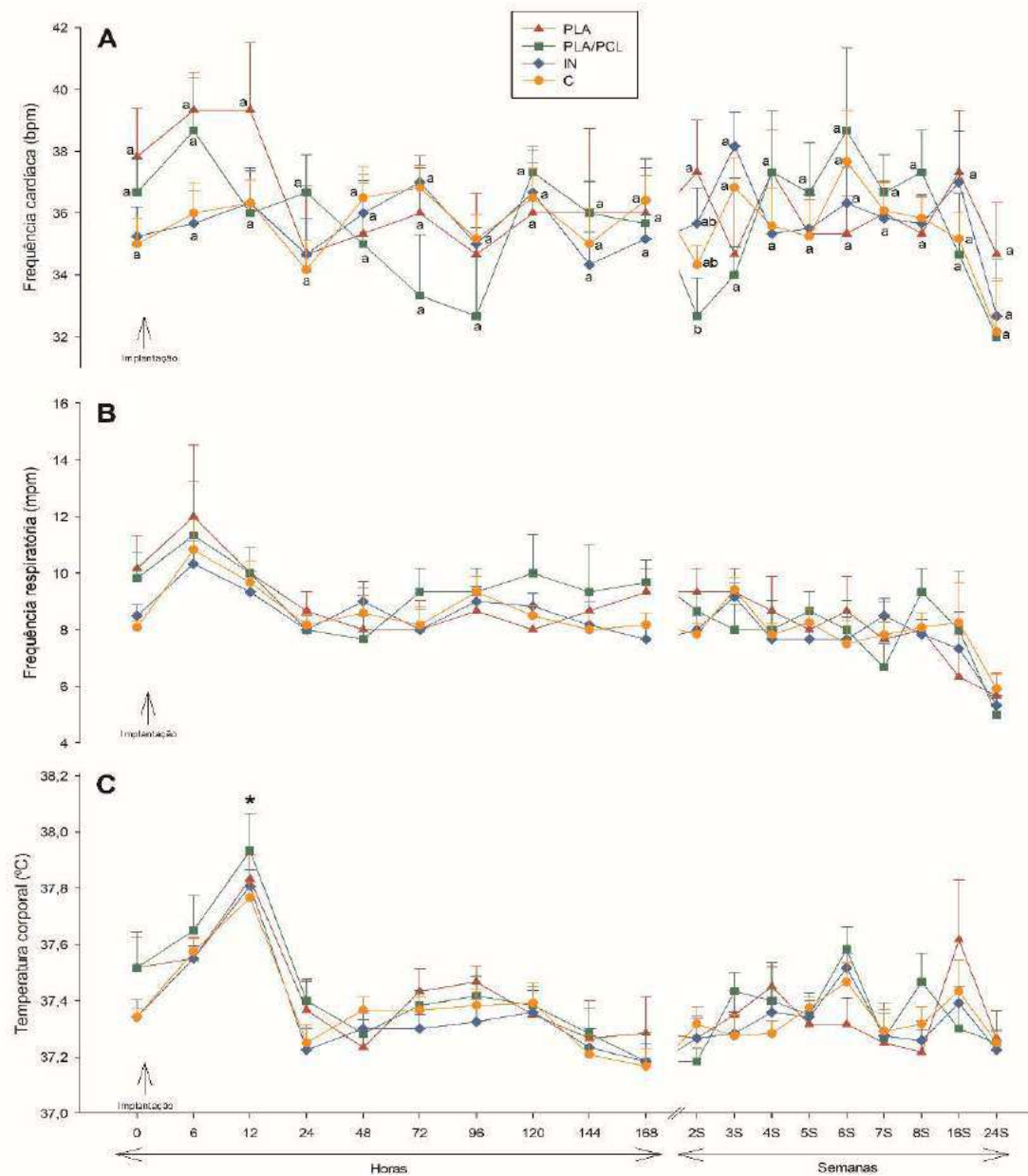


Figura 5. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão da frequência cardíaca (FC) (A), frequência respiratória (FR) (B) e temperatura corporal (TC) (C) de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Médias seguidas de letras diferentes em cada momento diferem entre os grupos por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$). *Indica elevação para todos os grupos experimentais.

Tabela 1. Avaliação intragrupos de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura corporal (TC) de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Resultados expressos em média dos valores $\pm$ EPM.

Variável	Grupos	Implantação dos polímeros		Momentos de avaliação													
		horas										semanas					
		0	6	12	24	48	72	96	120	144	168	2	4	6	8	16	24
FC (bpm)	C	35 $\pm$ 0,8 ABC	36 $\pm$ 1 ABC	36,3 $\pm$ 0,7 ABC	34,2 $\pm$ 0,9 ABC	36,5 $\pm$ 1 ABC	36,8 $\pm$ 0,7 ABC	35,2 $\pm$ 0,8 ABC	36,5 $\pm$ 0,9 ABC	35 $\pm$ 1,1 ABC	36,4 $\pm$ 0,8 ABC	34,3 $\pm$ 0,6 ABC	35,6 $\pm$ 1,2 ABC	37,7 $\pm$ 1,7 AB	35,8 $\pm$ 0,7 ABC	35,2 $\pm$ 0,8 ABC	32,2 $\pm$ 1,7 C
	IN	35,3 $\pm$ 1 A	35,7 $\pm$ 1 A	36,3 $\pm$ 1 A	34,7 $\pm$ 1,1 A	36 $\pm$ 1 A	37 $\pm$ 0,9 A	35 $\pm$ 0,5 A	36,7 $\pm$ 1 A	34,3 $\pm$ 1 A	35,2 $\pm$ 0,7 A	35,7 $\pm$ 1,2 A	35,3 $\pm$ 1,9 A	36,3 $\pm$ 1,1 A	35,7 $\pm$ 0,9 A	37 $\pm$ 1,6 A	32,7 $\pm$ 1,8 A
	PLA	37,8 $\pm$ 1,6 A	39,3 $\pm$ 1,2 A	39,3 $\pm$ 2,2 A	34,7 $\pm$ 2,2 A	35,3 $\pm$ 1,9 A	36 $\pm$ 1,5 A	34,7 $\pm$ 1,9 A	36 $\pm$ 2,1 A	36 $\pm$ 2,7 A	36 $\pm$ 1,5 A	37,3 $\pm$ 1,7 A	37,3 $\pm$ 1,3 A	35,3 $\pm$ 1,2 A	35,3 $\pm$ 1,2 A	37,3 $\pm$ 2 A	34,7 $\pm$ 1,7 A
	PLA/PCL	36,7 $\pm$ 1,1 A	38,7 $\pm$ 1,7 A	36 $\pm$ 1,5 A	36,7 $\pm$ 1,2 A	35 $\pm$ 2,0 A	33,3 $\pm$ 1,9 A	32,7 $\pm$ 1,9 A	37,3 $\pm$ 0,8 A	36 $\pm$ 1 A	35,6 $\pm$ 2,1 A	32,7 $\pm$ 1,2 A	37,3 $\pm$ 2 A	38,7 $\pm$ 2,7 A	37,3 $\pm$ 1,3 A	34,7 $\pm$ 2 A	32 $\pm$ 1,8 A
FR (mpm)	C	8,1 $\pm$ 0,2 ABCD	10,8 $\pm$ 1,1 A	9,7 $\pm$ 0,8 AB	8,2 $\pm$ 0,4 ABCD	8,6 $\pm$ 0,6 ABCD	8,2 $\pm$ 0,6 ABCD	9,3 $\pm$ 0,6 ABC	8,5 $\pm$ 0,4 ABCD	8 $\pm$ 0,6 ABCD	8,2 $\pm$ 0,4 ABCD	7,8 $\pm$ 0,4 ABCD	7,8 $\pm$ 0,4 ABCD	7,5 $\pm$ 0,8 ABCD	8,1 $\pm$ 0,5 ABCD	8,3 $\pm$ 1,4 ABCD	5,9 $\pm$ 0,5 CD
	IN	8,5 $\pm$ 0,4 ABC	10,3 $\pm$ 0,8 A	9,3 $\pm$ 0,8 AB	8 $\pm$ 0,5 ABC	9 $\pm$ 0,7 ABC	8 $\pm$ 0,7 ABC	9 $\pm$ 0,5 ABC	8,8 $\pm$ 0,5 ABC	8,2 $\pm$ 0,8 ABC	7,7 $\pm$ 0,5 ABC	8 $\pm$ 0,5 ABC	7,7 $\pm$ 0,3 ABC	7,7 $\pm$ 0,8 ABC	7,8 $\pm$ 0,5 ABC	7,3 $\pm$ 1,3 ABC	5,3 $\pm$ 0,6 C
	PLA	10,2 $\pm$ 1,2 AB	12 $\pm$ 2,5 A	10 $\pm$ 0,9 AB	8,7 $\pm$ 0,7 AB	8 $\pm$ 1,5 AB	8 $\pm$ 1 AB	8,7 $\pm$ 1,2 AB	8 $\pm$ 0 AB	8,7 $\pm$ 0,7 AB	9,3 $\pm$ 0,8 AB	9,3 $\pm$ 0,8 AB	8,7 $\pm$ 1,2 AB	8,7 $\pm$ 1,2 AB	8 $\pm$ 0 AB	6,3 $\pm$ 1,5 AB	5,7 $\pm$ 0,8 B
	PLA/PCL	9,8 $\pm$ 0,9 AB	11,3 $\pm$ 1,9 A	10 $\pm$ 0,9 AB	8 $\pm$ 0 AB	7,7 $\pm$ 0,8 AB	9,3 $\pm$ 0,8 AB	9,3 $\pm$ 0,8 AB	10 $\pm$ 1,4 AB	9,3 $\pm$ 1,7 AB	9,7 $\pm$ 0,8 AB	8,7 $\pm$ 0,7 AB	8 $\pm$ 1 AB	8 $\pm$ 1 AB	9,3 $\pm$ 0,8 AB	8 $\pm$ 2,1 AB	5 $\pm$ 0,7 B
TC (°C)	C	37,3 $\pm$ 0,1 BC	37,6 $\pm$ 0,1 AB	37,8 $\pm$ 0,1 A	37,2 $\pm$ 0,1 BC	37,4 $\pm$ 0,1 BC	37,4 $\pm$ 0,1 BC	37,4 $\pm$ 0,1 BC	37,4 $\pm$ 0,1 BC	37,2 $\pm$ 0,1 C	37,2 $\pm$ 0,1 C	37,3 $\pm$ 0,1 BC	37,3 $\pm$ 0,1 BC	37,5 $\pm$ 0,1 ABC	37,3 $\pm$ 0,1 BC	37,4 $\pm$ 0,1 ABC	37,3 $\pm$ 0,1 BC
	IN	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,6 $\pm$ 0,1 AB	37,8 $\pm$ 0,1 A	37,2 $\pm$ 0,1 B	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,4 $\pm$ 0,1 B	37,2 $\pm$ 0,1 B	37,2 $\pm$ 0,1 B	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,4 $\pm$ 0,1 B	37,5 $\pm$ 0,1 AB	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,4 $\pm$ 0,1 B	37,2 $\pm$ 0,1 B
	PLA	37,5 $\pm$ 0,1 AB	37,6 $\pm$ 0,1 AB	37,8 $\pm$ 0,1 A	37,4 $\pm$ 0,1 AB	37,2 $\pm$ 0,1 B	37,4 $\pm$ 0,1 AB	37,5 $\pm$ 0,1 AB	37,4 $\pm$ 0,1 AB	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,5 $\pm$ 0,1 AB	37,3 $\pm$ 0,1 AB	37,2 $\pm$ 0,1 B	37,6 $\pm$ 0,2 AB	37,3 $\pm$ 0,1 B
	PLA/PCL	37,5 $\pm$ 0,1 AB	37,7 $\pm$ 0,1 AB	37,9 $\pm$ 0,1 A	37,4 $\pm$ 0,1 AB	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,4 $\pm$ 0,1 B	37,4 $\pm$ 0,1 AB	37,4 $\pm$ 0,1 B	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,2 $\pm$ 0,1 B	37,2 $\pm$ 0,5 B	37,4 $\pm$ 0,1 AB	37,6 $\pm$ 0,1 AB	37,5 $\pm$ 0,1 AB	37,3 $\pm$ 0,1 B	37,3 $\pm$ 0,1 B

Médias seguidas da mesma letra em cada linha não diferem entre si a 5% de probabilidade no Teste Tukey.

EPM = Erro padrão da média

3.2 Fibrinogênio plasmático

A concentração do FP foi determinada para verificar se houve processo inflamatório sistêmico frente à implantação dos biopolímeros. Os valores de FP permaneceram dentro da faixa dos valores de referência para a espécie equina (100-400 mg/dL; [31]) durante todo o período de avaliação para todos os grupos (**Figura 6 e Tabela 2**). Como não se observou aumento do FP nos grupos implantados com biopolímeros e no grupo IN, não houve necessidade da realização da dosagem para o grupo C.

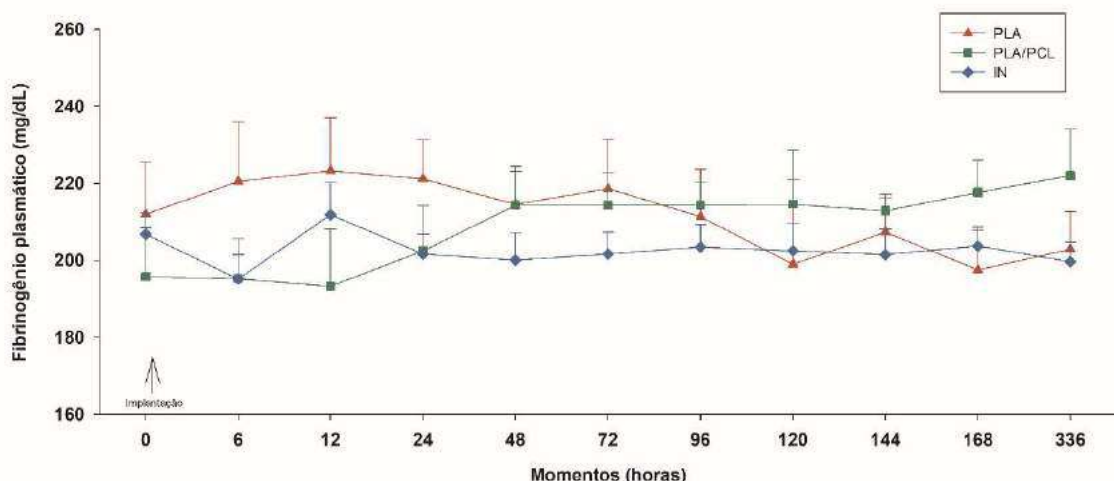


Figura 6. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão da concentração de fibrinogênio plasmático (mg/dL) de equinos submetidos à implantação de polímero (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano ou à realização de incisão cirúrgica (IN).

3.3 Temperatura termográfica cutânea

A avaliação termográfica foi utilizada com o objetivo de detectar alterações no padrão de temperatura cutânea em função do calor emitido, devido à resposta inflamatória induzida pela implantação. Entre os momentos 12 a 168 h foi possível observar elevação da TT cutânea nos grupos PLA, PLA/PCL e IN, quando comparados ao grupo C. Os grupos PLA e PLA/PCL apresentaram maiores valores de TT cutânea em relação ao grupo IN entre os momentos 24 a 72 h. A partir da segunda semana de implantação não houve diferença na TT entre os grupos

experimentais (**Figura 7A**). Além disso, na avaliação intragrupos, é possível observar uma diminuição da TT no momento 24 semanas em relação ao valor basal para os grupos C e PLA (**Tabela 2**).

3.4 Limiar nociceptivo mecânico

Os FVF foram utilizados para detectar respostas nociceptivas, por meio do limiar nociceptivo mecânico, no local de implantação. No presente estudo foi possível observar redução do LNM nos grupos PLA, PLA/PCL e IN, quando comparado ao grupo C, entre os momentos 6 e 120 h. Ainda, no momento 48 h foi possível verificar aumento do LNM no grupo IN em relação aos grupos implantados com biopolímeros (**Tabela 2 e Figura 7B**). A partir do momento 144 h houve reversão do LNM nos grupos implantados (PLA e PLA/PCL).

3.5 Avaliação ultrassonográfica

A ultrassonografia foi utilizada para avaliar as alterações teciduais locais à presença do material, além da ecogenicidade dos polímeros ao longo do tempo. Observou-se que, inicialmente, o material se apresentava hiperecogênico, com formação de sombra acústica. Houve perda gradual da ecogenicidade ao longo do tempo. Além disso, observou-se a presença de fluido anecóico adjacente ao material, caracterizando presença de seroma e edema local. Posteriormente, notou-se a formação de uma camada hiperecótica circundando os polímeros, evidenciando a formação de cápsula fibrosa. Foi possível observar presença de edema (ED) entre os momentos 6 e 168 h para os grupos PLA, PLA/PCL e IN, quando comparados ao grupo C. Os grupos PLA e PLA/PCL apresentaram maior grau de edema em relação ao grupo IN entre os momentos 48 e 96 h. Ainda, o grupo PLA/PCL apresentou maior grau de ED em relação ao grupo PLA de 144 h a 4 semanas após o procedimento. A partir da 5ª semana de implantação não houve diferença no grau de edema entre os grupos experimentais (**Tabela 3 e Figura 8**).

A diminuição do edema local foi concomitante ao início da perda de ecogenicidade (EG) dos polímeros, a qual foi observada a partir da quinta semana de

implantação para o grupo PLA, e a partir da 6ª semana para o grupo PLA/PCL. Não foram observadas diferenças significativas para esta variável entre os grupos em nenhum momento da avaliação (**Tabela 4 e Figura 9**).

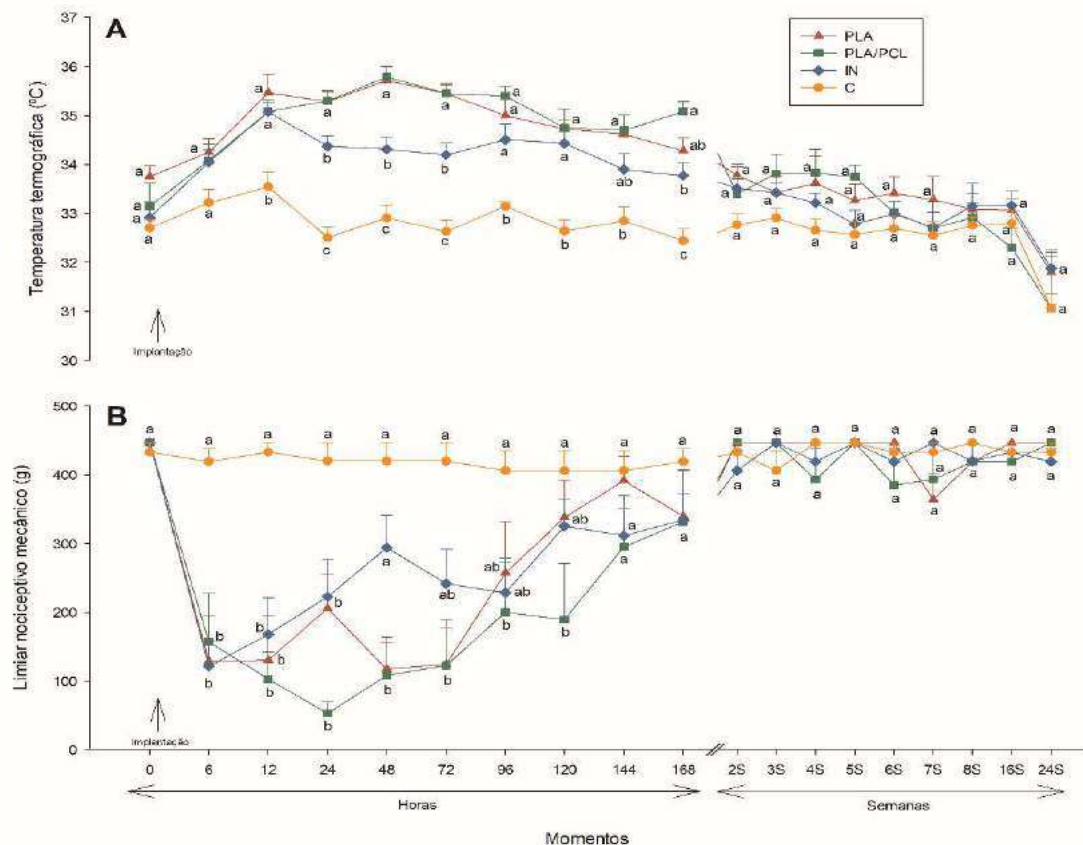


Figura 7. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão da temperatura termográfica (TT) (**A**) e do limiar nociceptivo mecânico (LNM) (**B**) de equinos submetidos a implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Médias seguidas de letras diferentes em cada momento diferem entre os grupos por meio do Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Avaliação intragrupos de fibrinogênio plasmático (FP), temperatura termográfica (TT) e limiar nociceptivo mecânico (LNM) de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ε-caprolactona e tetrahidrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Resultados expressos em média dos valores ± EPM.

Variável	Grupos	Implantação dos polímeros		Momentos de avaliação													
				horas								semanas					
		0	6	12	24	48	72	96	120	144	168	2	4	6	8	16	24
FP (mg/dL)	IN	207±5,5 A	195±6,3 A	212±5,1 A	202±5,1 A	200±7,1 A	202±5,7 A	203±5,8 A	203±7,2 A	201±6,7 A	204±4,9 A	200±5,2 A	-	-	-	-	-
	PLA	212±13, 6 A	221±15, 6 A	223±13, 7 A	221±10, 1 A	215±8,6 A	219±12, 7 A	211±12, 2 A	199±21, 9 A	207±8,8 A	198±10, 3 A	203±9,8 A	-	-	-	-	-
	PLA/PCL	196±12, 7 A	195±10, 3 A	193±14, 9 A	202±11, 7 A	214±10, 1 A	214±8,3 A	214±5,9 A	215±14, 1 A	213±4,3 A	218±8,3 A	222±12 A	-	-	-	-	-
TIV (°C)	C	32,7±0,2 ABC	33,2±0,3 AB	33,6±0,3 A	32,5±0,2 ABC	32,9±0,3 ABC	32,6±0,2 ABC	33,1±0,1 AB	32,6±0,2 ABC	32,8±0,3 ABC	32,5±0,2 ABC	32,8±0,2 ABC	32,7±0,2 ABC	32,7±0,2 ABC	32,7±0,2 ABC	32,8±0,3 ABC	31,1±0,3 D
	IN	32,9±0,3 DEFGH	34,1±0,2 ABCDEF	35,1±0,2 A	34,4±0,2 ABC	34,3±0,3 ABCD	34,2±0,2 ABCDE	34,5±0,3 AB	34,4±0,2 AB	33,9±0,3 ABCDEFG	33,8±0,2 ABCDEFG	33,5±0,2 BCDEFG	33,2±0,2 BCDEFGH	32,9±0,3 CDEFGH	33,2±0,2 BCDEFGH	33,2±0,3 BCDEFGH	31,9±0,3 H
	PLA	33,8±0,2 BCDEF	34,2±0,3 ABCDEF	35,5±0,4 AB	35,3±0,2 ABC	35,7±0,3 A	35,5±0,2 AB	35±0,3 ABCD	34,7±0,2 ABCDE	34,6±0,4 ABCDEF	34,3±0,3 ABCDEF	33,8±0,2 BCDEF	33,6±0,6 CDEF	33,4±0,3 DEFG	33,1±0,1 EFG	33,1±0,2 EFG	31,8±0,4 G
	PLA/PCL	33,1±0,5 BCDEFGH	34,1±0,3 ABCDEF	35,1±0,2 ABCD	35,3±0,2 ABC	35,8±0,2 A	35,4±0,2 AB	35,4±0,2 AB	34,7±0,4 ABCDE	34,7±0,3 ABCDEF	35,1±0,2 ABCD	33,4±0,6 ABCDEFGH	33,8±0,5 ABCDEF	33,1±0,2 BCDEFGH	32,9±0,7 CDEFGH	32,3±0,4 EFGH	31,1±1,2 H
FVF (g)	C	433±14 A	419±19 A	433±14 A	420±27 A	420±27 A	420±27 A	406±29 A	406±29 A	406±29 A	419±19 A	433±14 A	447±0 A	433±14 A	447±0 A	433±14 A	433±14 A
	IN	447±0 A	121±36 D	168±53 CD	223±54 BCD	294±47 ABC	241±49 BCD	228±45 BCD	325±40 AB	312±39 ABC	334±39 AB	406±29 A	419±19 A	419±19 A	419±27 A	433±14 A	419±19 A
	PLA	447±0 A	128±67 B	130±65 B	205±49 BC	117±39 B	124±53 B	257±74 ABC	338±54 AB	392±35 AB	340±68 AB	447±0 A	447±0 A	447±0 A	419±27 AB	447±0 A	447±0 A
	PLA/PCL	447±0 A	157±71 CDE	103±39 DE	53±16 E	108±55 DE	122±67 DE	200±79 BCDE	189±82 BCDE	296±74 ABCD	331±73 ABCD	447±0 A	393±53 ABC	385±62 ABC	419±27 AB	419±27 AB	447±0 A

Médias seguidas da mesma letra em cada linha não diferem entre si a 5% de probabilidade no Teste Tukey.
EPM= erro padrão da média.

Tabela 3. Avaliação intragrupos do grau de edema, obtido por meio de avaliação ultrassonográfica, de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Resultados expressos em média dos valores $\pm$ EPM

Variável	Grupos	Implantação dos polímeros		Momentos de avaliação													
		horas										semanas					
		0	6	12	24	48	72	96	120	144	168	2	4	6	8	16	24
EDEMA	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IN	0 $\pm$ 0 F	1,4 $\pm$ 0,2 AB	1,8 $\pm$ 0,1 A	1,4 $\pm$ 0,2 AB	1,3 $\pm$ 0,1 ABC	1,2 $\pm$ 0,2 ABC	1,3 $\pm$ 0,2 ABC	1,2 $\pm$ 0,2 ABC	1,1 $\pm$ 0,2 ABCD	1,2 $\pm$ 0,2 ABC	0,9 $\pm$ 0,2 BCDE	0,7 $\pm$ 0,1 CDEF	0,3 $\pm$ 0,1 EF	0,2 $\pm$ 0,1 F	0 $\pm$ 0 F	0 $\pm$ 0 F
	PLA	0 $\pm$ 0 E	0,3 $\pm$ 0,2 DE	1,3 $\pm$ 0,2 C	1,7 $\pm$ 0,3 BC	2,7 $\pm$ 0,2 A	2,8 $\pm$ 0,2 A	2,2 $\pm$ 0,3 A	1,5 $\pm$ 0,2 BC	1,2 $\pm$ 0,2 C	1 $\pm$ 0 CD	0,2 $\pm$ 0,2 E	0 $\pm$ 0 E	0 $\pm$ 0 E	0 $\pm$ 0 E	0 $\pm$ 0 E	0 $\pm$ 0 E
	PLA/PCL	0 $\pm$ 0 F	0,8 $\pm$ 0,3 CDEF	1,5 $\pm$ 0,4 ABCDE	1,8 $\pm$ 0,3 ABCD	2,3 $\pm$ 0,2 AB	2,7 $\pm$ 0,2 A	2,3 $\pm$ 0,2 AB	1,8 $\pm$ 0,3 ABCD	2 $\pm$ 0,3 ABC	1,8 $\pm$ 0,4 ABCD	1,3 $\pm$ 0,2 ABCDEF	0,7 $\pm$ 0,3 CDEF	0,3 $\pm$ 0,2 EF	0 $\pm$ 0 F	0 $\pm$ 0 F	0 $\pm$ 0 F

Médias seguidas da mesma letra em cada linha não diferem entre si a 5% de probabilidade no Teste Tukey.

EPM= erro padrão da média.

Tabela 4. Avaliação intragrupos do grau de ecogenicidade, obtido por meio de avaliação ultrassonográfica, de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano. Resultados expressos em média dos valores $\pm$ EPM

Variável	Grupos	Momentos de avaliação											
		semanas											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	16	24	
ECOGENICIDADE	PLA	-	5 $\pm$ 0 A	5 $\pm$ 0 A	5 $\pm$ 0 A	5 $\pm$ 0 A	4,8 $\pm$ 0,1 AB	4,8 $\pm$ 0,1 AB	4,8 $\pm$ 0,1 AB	4,5 $\pm$ 0,2 AB	4,3 $\pm$ 0,2 B	3,4 $\pm$ 0,4 C	
	PLA/PCL	-	5 $\pm$ 0 A	5 $\pm$ 0 A	5 $\pm$ 0 A	5 $\pm$ 0 A	5 $\pm$ 0 A	4,6 $\pm$ 0,2 AB	4,4 $\pm$ 0,3 AB	4,2 $\pm$ 0,3 AB	3,9 $\pm$ 0,3 AB	3 $\pm$ 0,4 B	

Médias seguidas da mesma letra em cada linha não diferem entre si a 5% de probabilidade no Teste Tukey.

EPM= erro padrão da média.

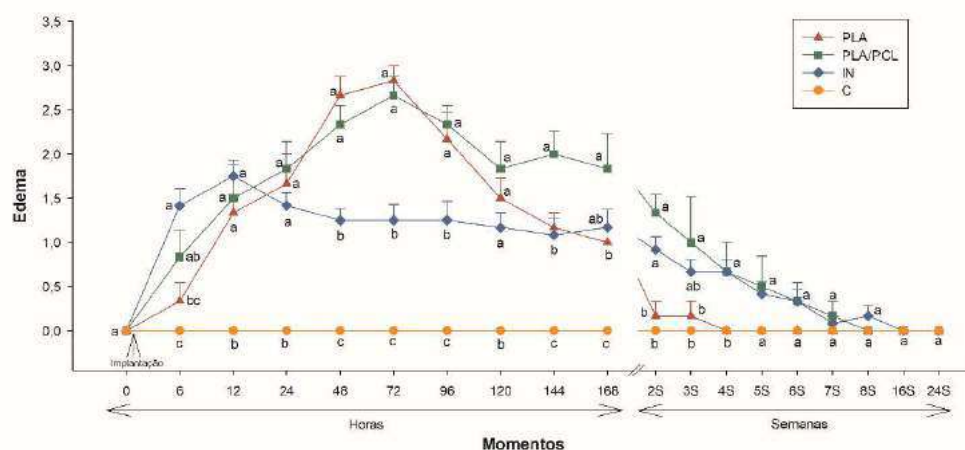


Figura 8. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão do grau de edema, obtido por meio de avaliação ultrassonográfica, de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. IN, implante negativo: somente incisão cutânea; C, controle. Exame ultrassonográfico foi realizado com transdutor linear ajustado para 12 MHz. Médias seguidas de letras diferentes em cada momento diferem entre os grupos por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

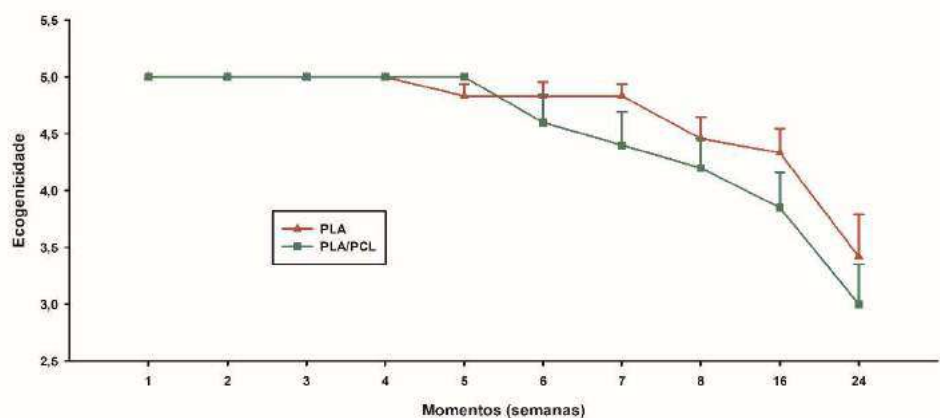


Figura 9. Representação gráfica das médias $\pm$ erro padrão do grau de ecogenicidade, obtido por meio de avaliação ultrassonográfica, de equinos submetidos à implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano. Exame ultrassonográfico foi realizado com transdutor linear ajustado para 12 MHz.

3.6 Análises histopatológicas

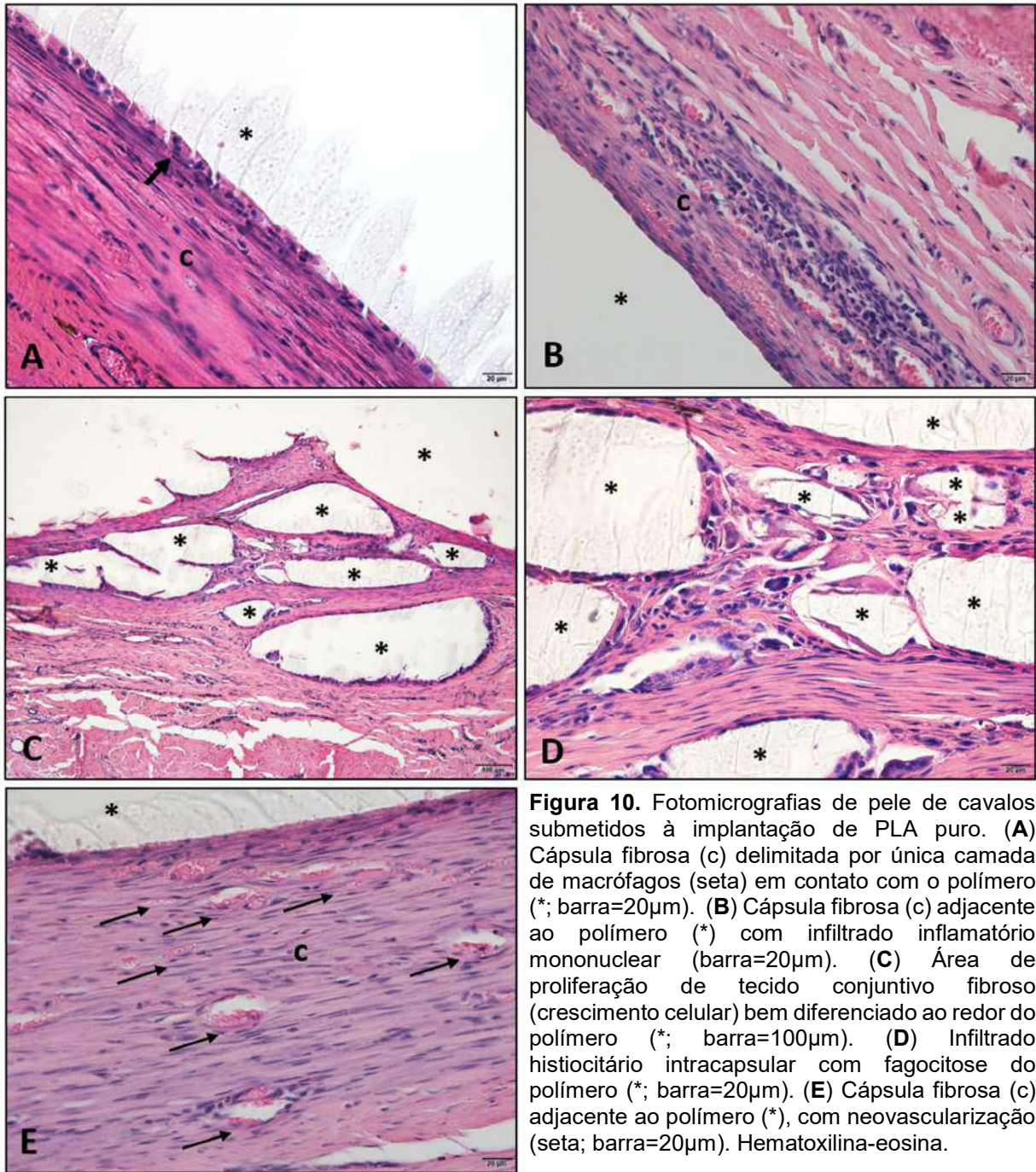
3.6.1 Coloração Hematoxilina-eosina

Esta técnica histoquímica foi realizada para visualização da possível resposta inflamatória crônica induzida pela implantação dos biopolímeros. Entre os achados histopatológicos podemos citar formação de cápsula fibrosa revestindo os polímeros (PLA e PLA/PCL) e infiltrado histiocitário tanto associado ao tecido conjuntivo fibroso quanto entre os polímeros e a cápsula (**Figura 10A e 11A**). A cápsula fibrosa apresentava-se mais espessada nos locais de maior contato com a superfície de ambos os polímeros. Verificou-se fagocitose do biomaterial pelos macrófagos, que emitiram projeções citoplasmáticas que envolviam partes dos biopolímeros (**Figura 11A**). O infiltrado inflamatório na cápsula era predominantemente linfocitário e multifocal (**Figura 10B e 11B**). Alguns animais apresentaram proliferação de tecido fibroso (**Figura 10C e 11C**) ao redor de macrófagos e células gigantes multinucleadas contendo fragmentos do polímero intracitoplasmáticos, (**Figura 10D e 11D**). Angiogênese (**Figura 10E e 11E**) e deposição de pigmento granular acastanhado (hemossiderina) foram verificadas especificamente na cápsula, bem como focos de hemorragia estavam presentes na derme adjacente. Na comparação entre os grupos de polímeros não houve diferença estatística nas reações estudadas ($p>0,05$) (**Tabela 5**). Em um dos animais do grupo PLA/PCL não se observou a presença do polímero ou a formação de cápsula. Entretanto, foi possível constatar extensa área de fibrose, com granuloma associado a fragmentos de polímero e/ou extensos agregados de macrófagos com polímeros entremeados em tecido fibroso. No grupo IN observou-se área focal discreta com presença de tecido fibroso e vasos maduros na derme profunda. Finalmente, no grupo C não foram observadas alterações histopatológicas dignas de nota.

Tabela 5. Alterações histopatológicas de equinos submetidos a 24 semanas de implantação de polímero puro (PLA) ou blenda polimérica (PLA/PCL) compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano. As características da reação inflamatória do tecido ao implante foram classificadas semi-quantitativamente, por escores, de acordo com os critérios propostos por De Jong et al. (2005) [22]. (+) mínimo; (++) moderado; (+++) marcado; (+++++) severo. Coloração Hematoxilina-Eosina.

Polímero	Animal	Cápsula	Infiltrado/ Inflamação	Crescimento celular	Fagocitose	Vascularização
PLA	1	++	+	+	+	+
	2	++	+	-	+	+
	3	+	+	++	++	+
	4	+	+	++++	++++	+
	5	++++	+++++	+++	+++	+++
	6	+	+	+	+	+
PLA/PCL	1	++	++	++	++	++
	2	++++	+++++	++	+++++	+++
	3	++	+	++	++	++
	4	+	+	++	+	+
	5*	-	++	-	+++	+
	6	+	+	++	+++	+

*Nesse animal não houve a formação característica de cápsula ao redor do polímero



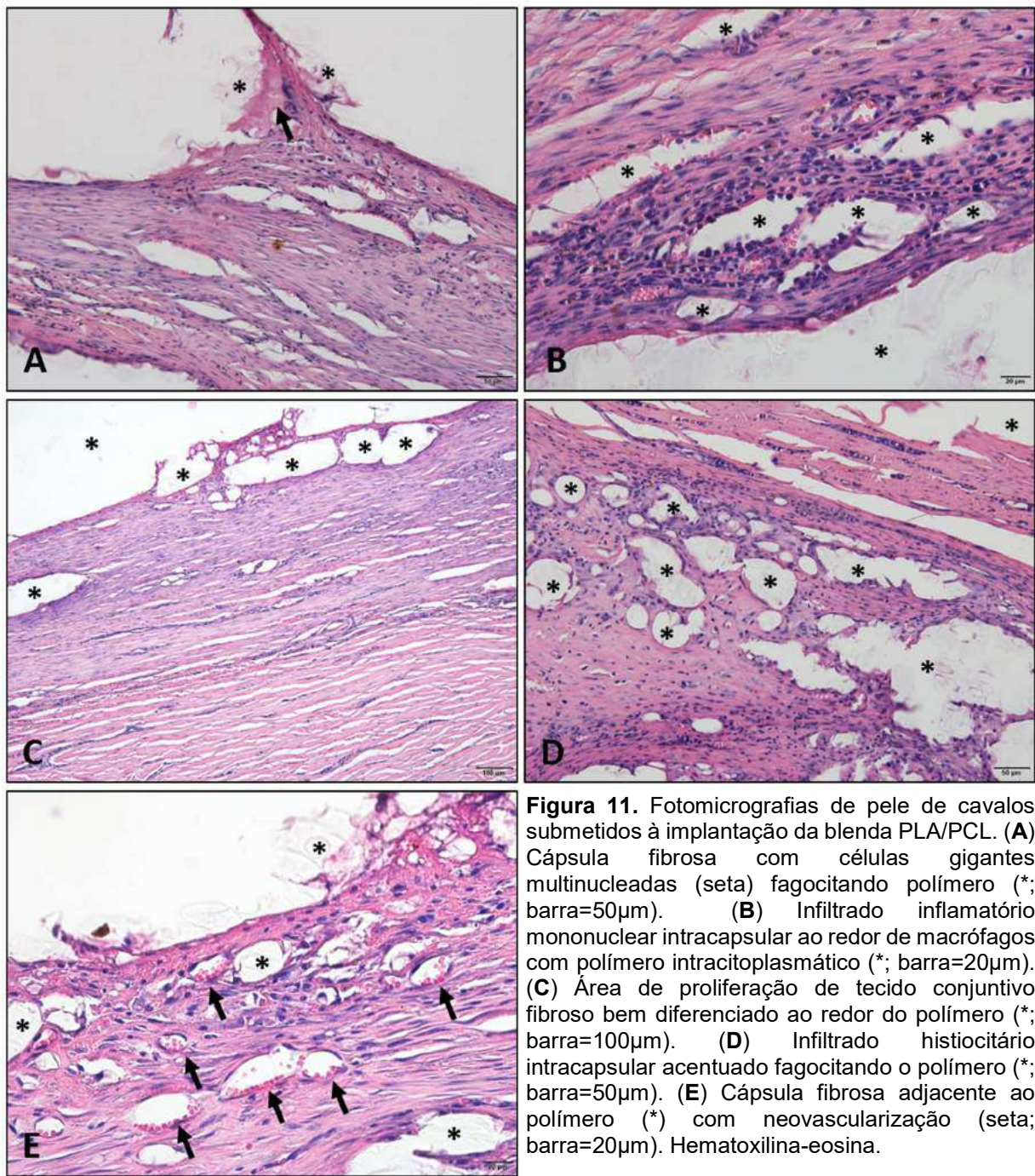


Figura 11. Fotomicrografias de pele de cavalos submetidos à implantação da blenda PLA/PCL. (A) Cápsula fibrosa com células gigantes multinucleadas (seta) fagocitando polímero (*; barra=50µm). (B) Infiltrado inflamatório mononuclear intracapsular ao redor de macrófagos com polímero intracitoplasmático (*; barra=20µm). (C) Área de proliferação de tecido conjuntivo fibroso bem diferenciado ao redor do polímero (*; barra=100µm). (D) Infiltrado histiocitário intracapsular acentuado fagocitando o polímero (*; barra=50µm). (E) Cápsula fibrosa adjacente ao polímero (*) com neovascularização (seta; barra=20µm). Hematoxilina-eosina.

3.6.2 Coloração Picrosirius-hematoxilina (PSH)

Sob luz polarizada, os fundos das seções apareceram em preto, pois não há polarização da luz, e os feixes de colágeno exibiram alta birrefringência com cores interferenciais que variam do dourado ao vermelho-amarelado, indicando diferentes graus de agregação e compacidade do colágeno. No grupo C é possível observar os feixes de colágeno regularmente ordenados com múltiplas orientações dentro da derme e o padrão de birrefringência é amarelado ou dourado (**Figura 12A e 12E**). No grupo IN há presença de uma área focal com alterações no padrão de distribuição das fibras de colágeno, que se apresentam com grau de agregação menor, exibindo assim cores interferenciais alaranjadas (**Figura 12B e 12F**). Tanto a implantação do PLA como da blenda PLA/PCL levou à reação fibrótica com deposição de colágeno ao redor do polímero, sendo que as moléculas nessa região apresentam um grau agregativo mais acentuado, exibindo cores interferenciais que variam do laranja ao vermelho (**Figura 12C – 12H**).

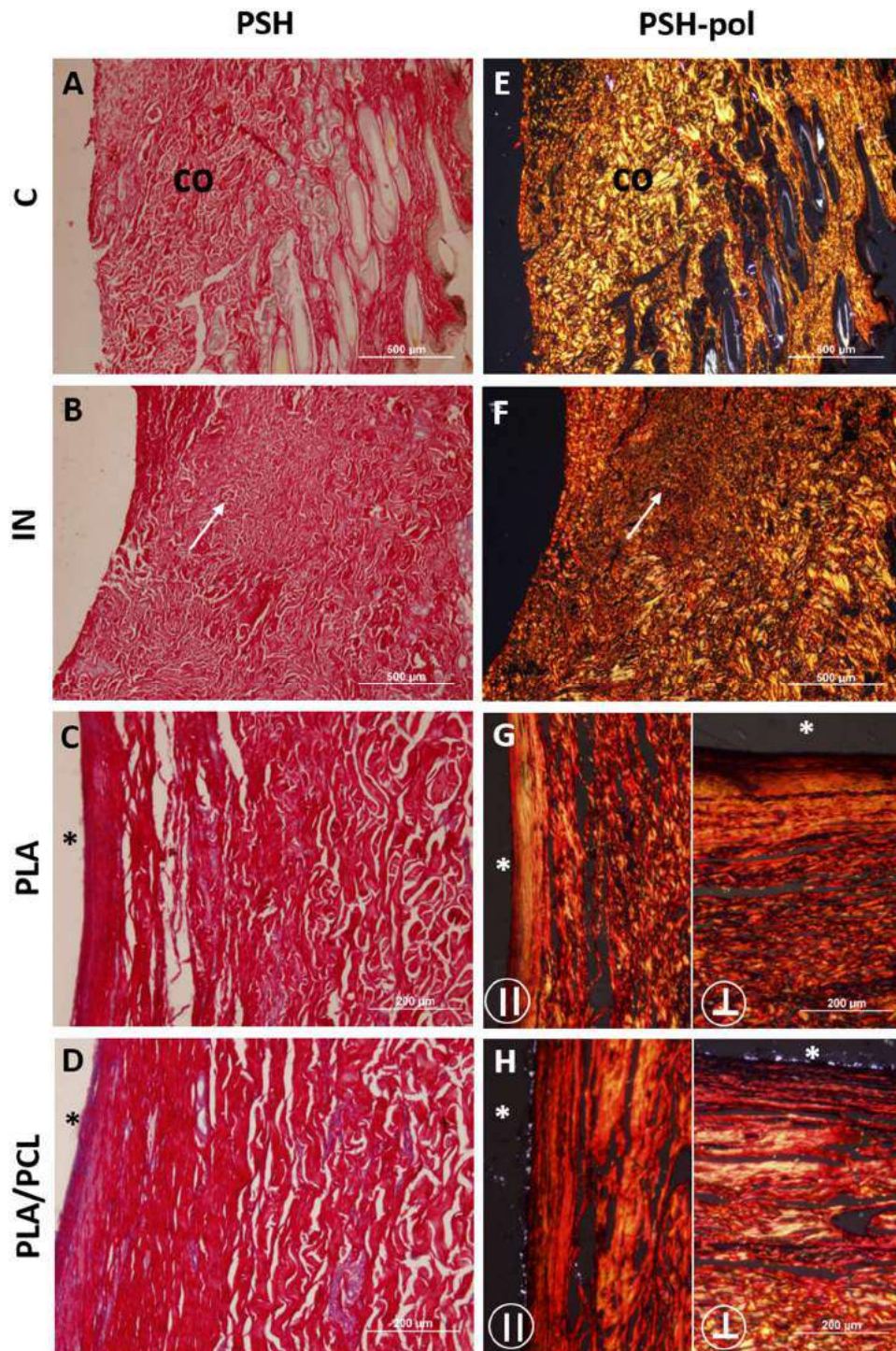


Figura 12. Fotomicrografias de pele de cavalos nas diferentes condições experimentais, coradas pelo método da Picrosirius-Hematoxilina e analisados sob luz policromática (PSH) e sob luz polarizada (PSH-pol). (A) O Colágeno dérmico (co) está evidenciado fortemente corado em vermelho sob luz policromática (barra=500μm) e (E) com intensa birrefringência na luz polarizada (barra=500μm). (B) e (F) Observa-se modificações no padrão de distribuição da fibra no CP devido ao procedimento cirúrgico (seta; barra=500μm). (C), (D), (G) e (H) A implantação dos polímeros PLA e PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado de ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano promoveu uma reação fibrótica com depósito de colágeno, altamente orientado e birrefringente na periferia do material. O comportamento do colágeno é dicróico quando as fibras são dispostas em planos paralelos (II) ou perpendiculares (I) (barra=200μm). (*) localização do polímero no corte.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A **Figura 13** revela micrografias eletrônicas das superfícies dos biomateriais PLA ou PLA/PCL implantados e expostos à biodegradação por 24 semanas. Antes da implantação, as membranas apresentaram morfologia densa sem poros (**Figura 13A** e **13B**). Após 24 semanas foi possível observar irregularidade na superfície, mudança do aspecto morfológico para poroso e presença de fissuras, indicando processo de biodegradação sobre o material (**Figura 13C** e **13D**). A superfície de fratura também mostrou sinais de degradação (**Figura 14**). Além disso, a micrografia da superfície de fratura da blenda PLA/PCL mostra gotículas de PCL dispersas na matriz de PLA (**Figura 14B**).

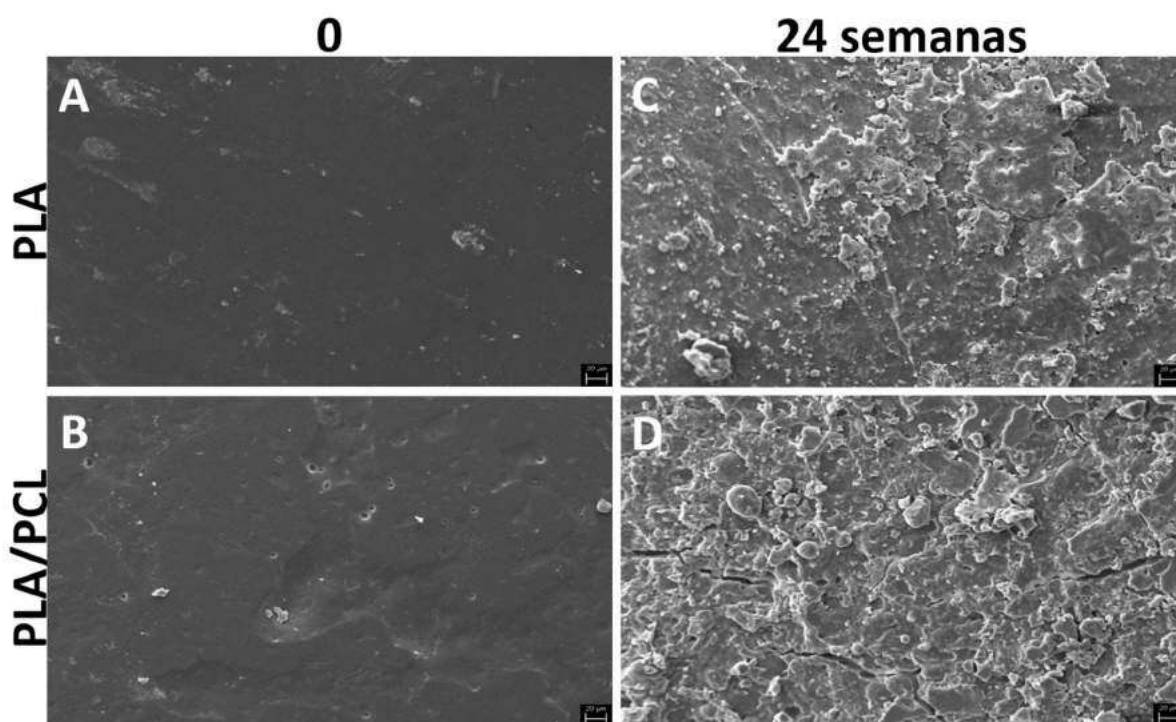


Figura 13. Micrografias eletrônicas da superfície de polímeros implantados pela via subcutânea em equinos. (A) PLA antes da implantação, (B) Blenda PLA/PCL antes da implantação, (C) PLA submetido à degradação por 24 semanas e (D) Blenda PLA/PCL submetida à degradação por 24 semanas. (Barra=20µm). Blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano.

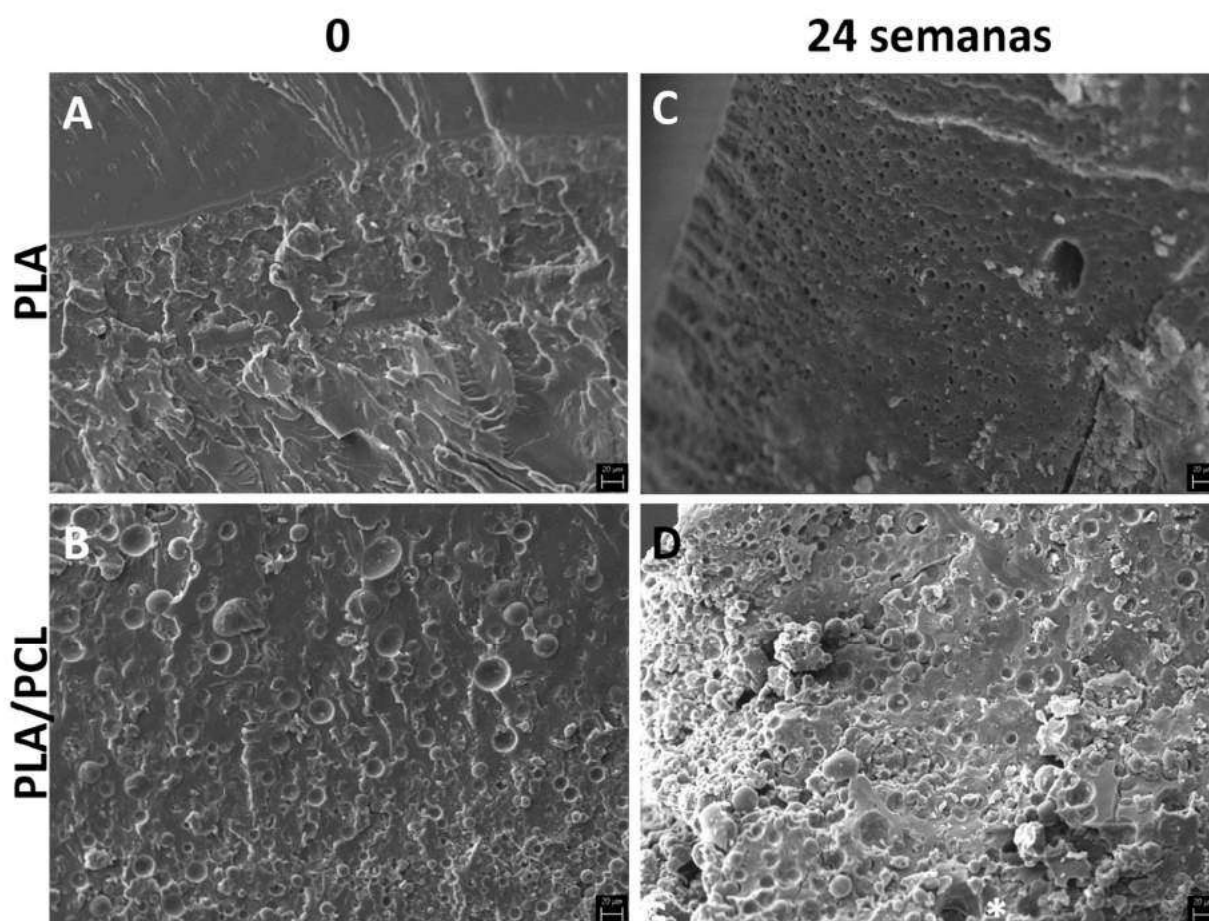


Figura 14. Micrografias eletrônicas da superfície de fratura de polímeros implantados pela via subcutânea em equinos. (A) PLA antes da implantação, (B) Blenda PLA/PCL antes da implantação, (C) PLA submetido à degradação por 24 semanas e (D) Blenda PLA/PCL submetida à degradação por 24 semanas. (Barra=20 μ m). PLA/PCL Blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano. *Indica gotículas de PCL dispersas na matriz de PLA.

4. DISCUSSÃO

O principal achado desta pesquisa foi que, tanto o biopolímero puro PLA como a blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero tribloco derivado da ϵ -caprolactona e tetrahydrofurano implantados pela via subcutânea foram seguros para equinos. Os métodos para avaliação do processo inflamatório sistêmico aqui utilizados, tais como FC, FR, TC e FP, não mostraram alterações sistêmicas relacionadas à implantação dos biomateriais. Entretanto, a termografia, limiar nociceptivo e ultrassonografia revelaram alterações agudas e transitórias. Além disso, os resultados do exame ultrassonográfico, análise histopatológica e microscopia

eletrônica indicaram que houve biodegradação parcial do PLA e da blenda PLA/PCL após 6 meses de implantação.

As variáveis do exame físico permaneceram inalteradas durante todo o experimento, indicando que não houve resposta inflamatória sistêmica devido à implantação dos polímeros. A elevação da TC no momento 12 h, provavelmente, está relacionada com o horário do dia em que a coleta foi realizada (17 – 18 h). Elevações na FC, FR e TC podem estar associadas a liberação de mediadores inflamatórios devido ao estresse ou a dor, sendo parâmetros de fácil quantificação. No entanto, esses parâmetros sozinhos não são específicos para a determinação da presença e gravidade da dor, podendo ser influenciados por fatores externos [32, 33]. Corroborando nossos resultados, estudo em equinos submetidos a modelo de indução experimental de feridas cutâneas não encontrou alterações na FC, FR e TC durante o período de cicatrização de feridas [34], indicando que lesões localizadas, como as implantações realizadas no presente experimento, não foram capazes de gerar alteração sistêmica inflamatória.

Outra ferramenta clínica utilizada para determinação da resposta inflamatória é o FP, proteína de fase aguda comumente utilizada para diagnosticar e monitorar condições inflamatórias na medicina equina, sendo que aumentos persistentes nas concentrações de FP, podem ocorrer em inúmeras enfermidades [35]. Em estudo realizado com diferentes tipos de procedimento cirúrgicos foi possível identificar que traumas moderados a severos levaram à hiperfibrinogenemia. Entretanto, traumas cirúrgicos mínimos não provocaram aumento da concentração de FP [36]. Em estudo para avaliação da cicatrização de feridas cutâneas realizadas experimentalmente foi possível observar aumento da concentração de FP desde o dia seguinte ao procedimento, com pico médio no 5º dia após a cirurgia [34]. Entretanto, esse achado pode estar relacionado com o fato de que foram realizadas 12 feridas cutâneas em cada animal. No nosso estudo não foi encontrado qualquer elevação na concentração de FP, indicando que a lesão provocada pela incisão cutânea, bem como a implantação do PLA puro e da blenda PLA/PCL, não foram capazes de induzir resposta inflamatória sistêmica.

O calor é considerado sinal clássico do processo inflamatório, já que lesões teciduais causam vasodilatação e elevação do metabolismo exotérmico celular

provocando aumento da temperatura no local da injúria. Sendo assim, a avaliação termográfica da superfície cutânea é capaz de fornecer dados quantitativos do grau de inflamação de tecidos subjacentes em função da radiação infravermelha emitida espontaneamente pelo local da injúria tecidual [37, 38]. Aumento de temperatura local observado no presente estudo está parcialmente relacionado ao procedimento cirúrgico realizado, pois foi possível observar aumento de TT nos grupos PLA, PLA/PCL e IN em relação ao grupo C no período entre 12 e 168 h. Entretanto, no período entre 24 a 72 h foi possível evidenciar maior TT nos grupos implantados do que no grupo IN. Assim como no presente estudo, trabalho realizado para avaliar implantação de polímero a base de poliuretana de mamona, em falha óssea induzida em equinos, detectou maior temperatura média sete dias após o procedimento no membro torácico implantado em relação ao grupo controle. Acredita-se que esse achado pode indicar que, mesmo o material apresentando biocompatibilidade, certo grau de resposta inflamatória é esperado, por se tratar de implantação de material exógeno ao tecido receptor [21]. Assim essa resposta, embora mais intensa nos grupos implantados com biomateriais, quando comparados ao grupo IN, foi transitória, achado observado em ambas as pesquisas. A diminuição de TT observada 24 semanas após o procedimento nos grupos C e PLA está associada à diminuição da temperatura ambiente devido a sazonalidade do período experimental, sendo que também foram observadas diminuições da FC e FR no mesmo momento. Embora a temperatura da sala onde as avaliações eram realizadas fosse controlada, não era possível aquecer o ambiente, o que sabidamente poderia interferir nos resultados obtidos em dias de frio.

O teste de dor reflexiva, ou limiar nociceptivo, envolve aplicação de estímulo, seja ele termal, mecânico ou elétrico, a uma parte do organismo até que uma resposta comportamental ou fisiológica seja observada. Os FVF medem hiperalgesia cutânea e alodinia, sendo úteis para mimetizar condições clínicas que apresentam aumento de sensibilidade cutânea, tais como a dor neuropática, dor pós-operatória, inflamação ou osteoartrite [39]. A partir dos resultados obtidos, a redução do LNM está parcialmente associada à reação inflamatória local provocada pela incisão realizada para a implantação do PLA puro e da blenda PLA/PCL, e não pela presença dos materiais *per si*. Interessante, houve coincidência entre os resultados termográficos e

os FVF, notadamente 48 h após a implantação do PLA e da blenda PLA/PCL. Tais métodos de avaliação permitiram os implantes positivos serem diferenciados do implante negativo.

O exame ultrassonográfico é ferramenta de rotina na medicina veterinária, sendo utilizado como meio diagnóstico complementar. O uso da ultrassonografia modo B permite a obtenção de dados sobre espessura das camadas da pele, além de informações sobre mudanças na estrutura do colágeno, processos degenerativos do tecido elástico, entre outras características estruturais da pele, devido aos diferentes graus de ecogenicidade entre as estruturas adjacentes [40]. A presença de seroma e edema ao redor dos materiais sugere a existência de reação inflamatória, a qual também foi observada no grupo IN, concluindo-se, então, que a resposta inflamatória está relacionada, em partes, ao procedimento cirúrgico realizado. Entretanto, o maior grau de edema observado nos grupos implantados entre os momentos 48 e 96 h após o procedimento indica que a presença dos polímeros possivelmente intensificou a reação local. Mas, como nos achados de TIV e LNM, essa resposta foi transitória e restrita em extensão. Além disso, a diminuição gradual do grau de ecogenicidade sugere reabsorção dos polímeros. Nossos resultados corroboram outros estudos que utilizaram a ultrassonografia para avaliação da biocompatibilidade de polímeros, os quais também observaram a perda de ecogenicidade ao longo do tempo [41, 42]. A hiperecogenicidade do material ocorre devido a diferenças na impedância acústica entre o biomaterial e o tecido receptor, sendo que, à medida que o material é biodegradado, há diminuição da diferença de impedância [42]. Nossos resultados mostraram que ambos os polímeros apresentaram degradação semelhante. Tal resultado não era esperado, pois a blenda PLA/PCL deveria apresentar menor tempo de degradação, devido a maior taxa de degradação do PCL, em relação ao PLA [43]. Entretanto, embora o exame ultrassonográfico possa ser utilizado para avaliar o destino de materiais reabsorvíveis, este possui algumas limitações, e o tempo exato de reabsorção dos materiais não pode ser pressuposto pelas imagens [41]. Devido à pouca disponibilidade de estudos com polímeros na literatura, que utilizaram exame ultrassonográfico como método de avaliação das reações do material sob o organismo, as pontuações aqui utilizadas para ecogenicidade do material e grau de

edema nunca foram realizadas antes, tornando-se protocolo de referência para estudos futuros.

O estudo histopatológico da reação local a um implante é feito após aproximadamente três meses de implantação. Após esse período de tempo, em geral, a reação a presença do material pode atingir estado estável, sendo então possível avaliar a reatividade final e a aceitação/rejeição local do material implantado. Teoricamente, não existe estado estável para materiais degradáveis, pois esses estão continuamente em processo de degradação e reabsorção. Sendo assim, o estado estável só ocorre após a reabsorção final do material [23]. No nosso estudo, a avaliação histopatológica à presença do material foi feita com seis meses de implantação, sendo então possível avaliar com precisão a reação do corpo à presença dos materiais.

Materiais implantáveis são reconhecidos pelo mecanismo de defesa do organismo, levando a um processo conhecido como reação de corpo estranho (RCE) que resulta no encapsulamento do implante. O tamanho, forma, propriedades mecânicas, tipo de material, e duração e método de implantação que determinam o tipo de resposta em casos de implantes subcutâneos, sendo que a RCE pode ser minimizada, mas não completamente eliminada [44]. Tais informações mostram que a reação inflamatória formada ao redor dos polímeros estudados aqui foi restrita ao local de implantação e, portanto, esperada.

A metodologia aqui utilizada foi adequada para determinação da biocompatibilidade e da degradação parcial dos biomateriais. Segundo estudo realizado por De Jong e colaboradores (2005) [23], avaliação de amostras de polímeros entre 1 e 2 mm de espessura apresentam maior confiabilidade com relação a reação histopatológica induzida pela implantação, especialmente quando os polímeros são destinados para produção de materiais de fixação óssea. Por esse motivo optou-se pela utilização de amostras de 1 cm² e 1 mm de espessura.

Na análise pela coloração de hematoxilina-eosina não foi possível detectar diferença significativa entre os materiais testados (PLA vs PLA/PCL), sendo que os dois levaram a reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho. A presença de macrófagos na cápsula e na interface do polímero foi observada em outros estudos, estando associada à fagocitose e à depuração do implante [7, 23]. A adesão de

macrófagos e células gigantes multinucleadas nas superfícies dos biomateriais produz um microambiente privilegiado entre a membrana celular e a superfície do biomaterial. Essas células são responsáveis pela liberação de mediadores de degradação, como espécies reativas de oxigênio, enzimas de degradação e ácido, os quais são liberados nessa zona privilegiada. Dessa forma, a inibição desses mediadores é retardada ou reduzida, submetendo o biomaterial a altas concentrações desses agentes degradadores [45].

Além dos macrófagos, os linfócitos estavam regularmente presentes nos infiltrados ao redor do implante. Contudo, no presente estudo não foi observada a presença de polimorfonucleares, já que esses geralmente estão associados à resposta inflamatória aguda [23]. Tais achados estão relacionados a fase crônica da inflamação, a qual é geralmente caracterizada pela presença de monócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfócitos e fibroblastos além da proliferação de vasos sanguíneos [46].

A formação de células gigantes está associada ao tamanho da partícula fagocitada. Partículas maiores que 10 μm levam ao acúmulo de macrófagos, os quais se organizam ao redor do implante, se fundindo para isolar os fragmentos de polímeros e facilitar a fagocitose. Ademais, as células gigantes correspondem ao estágio final do desenvolvimento de macrófagos, estando associadas à diminuição da resposta inflamatória. Apesar da diminuição da capacidade fagocitária dessas células em relação aos macrófagos, há aprimoramento da capacidade de degradação extracelular, permitindo a degradação do colágeno, polímeros, etc [47].

Os fibroblastos são responsáveis pela produção do colágeno, o qual forma cápsula ao redor do material implantado. Essa cápsula pode reduzir o suprimento de oxigênio e nutrientes para as células encapsuladas, podendo, por exemplo, prejudicar a difusão de medicamentos. Apesar disso, a formação da cápsula não indica ausência de biocompatibilidade [46, 48]. Por ser impermeável à maioria das moléculas no microambiente circundante, a cápsula pode ser deletéria para algumas funções do implante [49]. Entretanto, na literatura consultada a cápsula de colágeno formada ao redor dos materiais biocompatíveis é caracterizada como avascular [50]. Neste estudo, os achados de neovascularização associada à cápsula podem ser uma vantagem para o material implantado. Além disso, outros fatores influenciam a

absorção de drogas, como mecanismos de disponibilização do medicamento, pH do meio, disponibilidade de enzimas, entre outros [51].

A proliferação de tecido fibroso ao redor de fragmentos dos polímeros pode estar associada à presença de poros e fissuras nos materiais, como foi possível observar na MEV. Os poros fornecem uma maior área de superfície, permitindo o crescimento celular e facilitando a neovascularização. Na construção de “scaffolds” para a engenharia de tecidos, os poros têm papel importante no crescimento e na proliferação celular para a reorganização do novo tecido [52, 53].

Hemorragia intracapsular e na derme adjacente foram induzidas, provavelmente, durante a manipulação, no procedimento de retirada dos implantes, estando associadas à neovascularização estimulada pela implantação dos materiais. Essa neovascularização também está associada ao sangramento local observado durante o procedimento de retirada dos implantes. Essa neoangiogênese é indispensável para a manutenção da proliferação celular e migração das células do sistema fagocitário [7]. A presença de hemossiderina evidencia a cronicidade do processo, podendo estar relacionada a pequenos traumas causados pelo próprio animal no decorrer do experimento. A hemossiderina é um pigmento amarelo-acastanhado derivado da hemoglobina. Hemorragias nos tecidos são as principais causas do acúmulo desse pigmento dentro das células, pois as hemácias extravasadas no local da lesão são fagocitadas durante dias por macrófagos, os quais destroem a hemoglobina e recuperam o ferro, levando à formação da hemossiderina [54].

No animal do grupo PLA/PCL que não foi possível observar presença do polímero ou formação de cápsula acredita-se que esse resultado esteja relacionado à reação inflamatória exacerbada associada à reação supurativa no local da implantação, sendo que tais reações podem ter acelerado o processo de degradação do polímero. A causa dessa resposta não pareceu ser devido a implantação do polímero, sendo a etiologia relacionada com fatores iatrogênicos e/ou ambientais.

A utilização da coloração de PSH e a avaliação conjugada em microscopia de luz convencional e sob o plano de luz polarizada é útil para revelar a ordem molecular, organização e/ou heterogeneidade da orientação das fibras de colágeno [55]. O dicroísmo linear é expresso pela diferença de absorção do objeto em duas direções

de deslocamento do feixe de luz no próprio objeto, uma perpendicular à outra [56]. Já a birrefringência corresponde a propagação da luz polarizada em diferentes velocidades e direções, as quais promovem brilho característico ao tecido. Esses fenômenos de ordem espectral podem ser aliados importantes na avaliação da integridade e ordem molecular do colágeno na derme. A intensidade da birrefringência do colágeno varia em função da orientação das fibras em relação aos polarizadores cruzados, sendo que a maior birrefringência ocorre a 45° do plano de luz polarizada [57]. A rotação da amostra em relação do plano de luz polarizada não revelou extinção completa da birrefringência, indicando que sempre houveram fibras de colágeno orientadas a $\pm 45^\circ$ em relação à luz polarizada, o que denota que as fibras de colágeno da pele de equinos são orientadas em mais de uma direção, fato esse que ocorre também no tegumento de outros mamíferos, incluindo a espécie humana. Pode-se constatar que o tecido não se mostrou reativo ao implante, pois as fibras de colágeno mantiveram as mesmas características de integridade morfológica e de agregação e compacidade. Sendo assim, a fibrose presente pode ser considerada reacional à presença dos polímeros, e não uma reação exacerbada. Entretanto, no grupo PLA foi encontrada camada de colágeno mais espessa, o que pode significar reação mais intensa pela presença desse polímero. Em estudo analisando dois tipos de arcabouços para utilização como implantes faciais também foi possível perceber diferenças na espessura da camada de colágeno, sendo que o polímero que produziu menor cápsula é o que leva a formação de menor quantidade de tecido cicatricial, o que é altamente desejável [25].

As análises em MEV geralmente permitem observar claramente a morfologia das fases em materiais compósitos, além de fornecerem informações sobre a adesão interfacial [58]. Um estudo que avaliou a interação do polímero com o tecido subcutâneo em ratos Wistar também observou a formação de poros, tanto na superfície do polímero, quanto nas superfícies de fratura [7]. Outros estudos também mostraram separação de fases em blendas de PLA/PCL com ou sem o uso de diversos compatibilizantes, sendo que o PCL assumiu forma esférica. Geralmente, o polímero em menor quantidade fica disperso na matriz do polímero em maior quantidade [5, 59-61]. Da mesma forma, no presente trabalho, as micrografias mostraram a separação de fases característica de blendas imiscíveis.

Dessa forma, uma compreensão adequada da resposta do hospedeiro aos biomateriais e das características do material a ser utilizado são necessárias para projetar materiais que tenham um desempenho adequado em suas aplicações, sendo que os efeitos benéficos devem ser maiores que a resposta inflamatória causada por esses [62]. Sendo assim, é importante ressaltar a necessidade de novos estudos para investigar os possíveis usos dos polímeros aqui estudados. Como implicações, estudos futuros devem ser realizados para avaliar a eficácia dos biomateriais em utilizações mais específicas, como nas áreas de desenvolvimento de fármacos e cirurgia de equinos.

5. CONCLUSÕES

Os achados desta pesquisa mostraram que tanto o PLA puro, quanto a blenda PLA/PCL compatibilizada com copolímero tribloco derivado da ϵ -caprolactona e tetrahidrofurano foram biocompatíveis e biodegradáveis, propriedades que fazem desses polímeros, alternativas viáveis para uso em diversas áreas da Medicina Equina.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2017/10959-4) pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] K. M. Nampoothiri, N. R. Nair, R. P. John, An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 8493–8501.
- [2] E. Castro-Aguirre, F. Iñiguez-Franco, H. Samsudin, X. Fang, R. Auras, Poly(lactic acid) – Mass production, processing, industrial applications, and end of life, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107 (2016) 333-366.
- [3] L. Xiao, B. Wang, G. Yang, M. Gauthier, Poly(lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications, In: D. N. Ghista (Ed.) *Biomedical Science, Engineering and Technology*. London: InTech, (2012) 247-282.

- [4] P. Saini, M. Arora, M. N. V. Ravi Kumar, Poly(lactic acid) blends in biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107 (2016) 47-59.
- [5] P. P. Dias, M. A. Chinelatto, 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 (2019) 129-138.
- [6] Y. M. Kang, S. H. Lee, J. Y. Lee, J. S. Son, B. S. Kim, B. Lee, H. J. Chun, B. H. Min, J. H. Kim, M. S. Kim, A biodegradable, injectable, gel system based on MPEG-b-(PCL-ran-PLLA) diblock copolymers with an adjustable therapeutic window, *Biomaterials* 31 (2010) 2453–2460.
- [7] G. S. Ciambelli, M. O. Perez, G. V. Siqueira, M. A. Candella, A. C. Motta, M. A. T. Duarte, M. C. Alberto-Rincon, E. A. R. Duek, 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 (2013) 28–37.
- [8] R. P. John, G. S. Anisha, K. M. Nampoothiri, A. Pandey, Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production, *Biotechnology Advances* 27 (2009) 145–152.
- [9] R. C. Moreira, G. M. M. V. D. Graaf, C. A. Pereira, A. L. D. V. D. Zoppa, Mechanical evaluation of bone gap filled with rigid formulations castor oil polyurethane and chitosan in horses, *Ciência Rural* 46 (2016) 2182-2188.
- [10] FAO 2017. Food and Agriculture Organization, United Nations, Rome. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>> Acesso em 09 de janeiro de 2019.
- [11] D. R. Hodgson, C. McGowan, An overview of performance and sports medicine, In: D. R. Hodgson, K. McKeever, C. McGowan (Eds.) *The athletic horse: Principles and practice of equine sports medicine*. Riverport Lane: Saunders, (2014) 1-8.
- [12] P. M. Favi, R. S. Benson, N. R. Neilsen, R. L. Hammonds, C. C. Bates, C. P. Stephens, M. S. Dhar, Cell proliferation, viability, and *in vitro* differentiation of equine mesenchymal stem cells seeded on bacterial cellulose hydrogel scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* 33 (2013) 1935-1944.
- [13] M. D. Pyles, A. L. G. Alves, C. A. Hussni, A. Thomassian, J. L. M. Nicolett, M. J. Watanabe, Parafusos bioabsorvíveis na reparação de fraturas experimentais de sesamóides proximais em equinos, *Ciência Rural* 37 (2007) 1367-1373.
- [14] F. S. Nóbrega, M. B. Selim, V. E. Arana-Chavez, L. Correa, M. P. Ferreira, A. L. V. Zoppa, Histologic and immunohistochemical evaluation of biocompatibility of castor oil polyurethane polymer with calcium carbonate in equine bone tissue, *American Journal of Veterinary Research* 78 (2017) 1210-1214.

- [15] M. B. Selim, F. S. Nóbrega, L. L. Facó, S. C. F. Hagen, A. L. V. De Zoppa, V. E. Arana-Chavez, L. Corrêa, Histological and radiographic evaluation of equine bone structure after implantation of castor oil polymer, *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 31 (2018) 405-412.
- [16] M. L. Rumbaugh, D. J. Burba, J. Tetens, J. L. Oliver, J. Williams, G. Hosgood, C. J. LeBlanc, Effects of intra-articular injection of liquid silicone polymer in the equine middle carpal joint, *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* (2004).
- [17] D. Barnewitz, M. Endres, I. Krüger, A. Becker, J. Zimmermann, I. Wilke, J. Ringe, M. Sittlinger, C. Kaps, Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts, *Biomaterials* 27 (2006) 2882-2889.
- [18] R. Albert, G. Vásárhelyi, G. Bodó, A. Kenyeres, E. Wolf, T. Papp, T. Terdik, L. Módos, S. Felszeghy, A computer-assisted microscopic analysis of bone tissue developed inside a polyactive polymer implanted into an equine articular surface, *Histology and Histopathology* 27 (2012) 1203-1209.
- [19] A. Petit, E. M. Redout, C. H. Van de Lest, J. C. Grauw, B. Müller, R. Meyboom, P. van Midwoud, T. Vermonden, W. E. Hennink, P. R. van Weeren, Sustained intra-articular release of celecoxib from *in situ* forming gels made of acetyl-capped PCLA-PGE-PCLA triblock copolymers in horses, *Biomaterials* 53 (2015) 426-436.
- [20] T. Bouet, M. Schmitt, C. Desuzinges, R. Eloy, Quantitative *in vivo* studies of hyperemia in the course of the tissue response to biomaterial implantation, *Journal of Biomedical Materials Research* 24 (1990) 1439-1461.
- [21] F. S. Nóbrega, M. P. Ferreira, L. L. Facó, M. B. Selim, A. L. V. De Zoppa, Uso da termografia para avaliação da resposta tecidual após implante de polímero a base de poliuretano de mamona em osso III metacarpiano de equinos, *Acta Scientiae Veterinariae* 42 (2014) 1-5.
- [22] K. Lehle, S. Lohn, G. Reinerth, T. Schubert, J. G. Preuner, D. E. Birnbaum, Cytological evaluation of the tissue-implant reaction associated with subcutaneous implantation of polymers coated with titaniumcarboxonitride *in vivo*, *Biomaterials* 25 (2004) 5457-5466.
- [23] W. H. De Jong, J. E. Bergsma, J. E. Robinson, R. R. M. Bos, Tissue response to partially *in vitro* predegraded poly-L-lactide implants, *Biomaterials*, 26 (2005) 1781-1791.
- [24] M. Pogorielov, A. Hapchenko, V. Deineka, L. Rogulska, O. Oleshko, K. Vodseďáľková, L. Berezkinová, L. Vysloužilová, A. Klápšťová, J. Erben, *In vitro* degradation and *in vivo* toxicity of NanoMatrix3D® polycaprolactone and poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research* 106A (2018) 2200-2212.

- [25] A. D. Bhrany, C. A. Irvin, K. Fujitani, Z. Liu, B. D. Ratner, Evaluation of a sphere-templated polymeric scaffold as a subcutaneous implant, *JAMA Facial Plastic Surgery* 15 (2013) 29-33.
- [26] D. Ishii, T. H. Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, T. Iwata, *In vivo* tissue response and degradation behavior of PLLA and stereocomplexed PLA nanofibers, *Biomacromolecules* 10 (2009) 237-242.
- [27] Y. Niu, K. C. Chen, T. He, W. Yu, S. Huang, K. Xu, Scaffolds from block polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(ethylene glycol) (PEG) for peripheral nerve regeneration, *Biomaterials*, 35 (2014) 4266-4277.
- [28] M. V. Crisman, W. K. Scarratt, K. L. Zimmerman, Blood proteins and inflammation in the horse, *Vet Clin Equine* 24 (2008) 285-297.
- [29] A. Clauss, Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens, *Acta Haematologica* 17 (1957) 237-246.
- [30] T. D. Byars, K. C. Gonda, Equine history, physical examination, records, and recognizing abuse or neglect in patients, In: B. P Smith (Ed.) *Large Animal Internal Medicine*. Riverport Lane: Elsevier (2015) 13-20.
- [31] J. J. Kaneko, J. W. Harvey, M. L. Bruss, *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego: Elsevier (2008) 916p.
- [32] A. E. Wagner, Effects of stress on pain in horses and incorporating pain scales for equine practice, *Veterinary Clinics: Equine Practice* 26 (2010) 481-492.
- [33] J. C. de Grauw, J. P. A. M. van Loon, Systematic pain assessment in horses, *The Veterinary Journal* 209 (2016) 14-22.
- [34] L. Bundgaard, M. A. Sørensen, T. Nilson, E. Salling, S. Jacobsen, Evaluation of systemic and local inflammatory parameters and manifestations of pain in an equine experimental wound model, *Journal of Equine Veterinary Science* 68 (2018) 81-87.
- [35] J. L. Johns, Alterations in blood proteins, In: B. P Smith (Ed.) *Large Animal Internal Medicine*. Riverport Lane: Elsevier, (2015) 386-392.
- [36] S. Jacobsen, J. V. Nielsen, M. Kjelgaard-Hansen, T. Toelboeli, J. Fjeldborg, M. Halling-Thomsen, T. Martinussen, M. B. Thoenner, Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminar study, *Veterinary Surgery* 38 (2009) 762-769.
- [37] V. Redaelli, D. Bergero, E. Zucca, F. Ferrucci, L. N. Costa, L. Crosta, F. Luzi, Use of thermography techniques in equines: principles and applications, *Journal of Equine Veterinary Science* 34 (2014) 345-350.

- [38] C. McManus, C. B. Tanure, V. Peripolli, L. Seixas, V. Fischer, A. M. Gabbi, S. R. O. Menegassi, M. T. Stumpf, G. J. Kolling, E. Dias, J. B. G. Costa Jr., Infrared thermography in animal production: an overview, *Computers and Electronics in Agriculture* 123 (2016) 10–16.
- [39] N. S. Gregory, A. L. Harris, C. R. Robinson, P. M. Dougherty, P. N. Fuchs, K. A. Sluka, An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures, *The Journal of Pain* 14 (2013) 1255–1269.
- [40] J. M. Waller, H. I. Maibach, Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity, *Skin Research and Technology* 11 (2005) 221-235.
- [41] O. V. Höglund, R. Hagman, K. Olsson, C. Carlsson, F. Södersten, A. S. Lagerstedt, Ligation of the ovarian pedicles in dogs with a resorbable self-locking device – a long-term follow-up study, *Journal of Biomaterials Applications* 27 (2013) 961-966.
- [42] O. V. Höglund, J. Ingman, F. Södersten, K. Hansson, N. Borg, A. S. Lagerstedt, 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 (2014) 825-831.
- [43] L. S. Nair, C. T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762-798.
- [44] M. Kastellorizios, F. Papadimitrakopoulos, D. J. Burgess, Prevention of foreign body reaction in a pre-clinical large animal model, *Journal of Controlled Release* 202 (2015) 101-107.
- [45] J. M. Anderson, A. Rodriguez, D. T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Seminars in Immunology* 20 (2008) 86-100.
- [46] J. M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, D. J. Burgess, Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response, *The AAPS Journal* 12 (2010) 188-196.
- [47] Z. Xia, J. T. Triffitt, A review on macrophage responses to biomaterials, *Biomedical Materials* 1 (2006) R1-R9.
- [48] A. Nyska, Y. S. Schiffenbauer, C. T. Bami, R. R. Maronpot, Y. Ramot, Histopathology of biodegradable polymers: challenges in interpretation and the use of a novel compact MRI for biocompatibility evaluation, *Polymers for Advanced Technologies* 25 (2014) 461-467.

- [49] O. Veiseh, J. C. Doloff, M. Ma, A. J. Vegas, H. H. Tam, A. R. Bader, J. Li, E. Langan, J. Wyckoff, W. S. Loo, S. Jhunjhunwala, A. Chiu, S. Siebert, K. Tang, J. Hollister-Lock, S. Aresta-Dasilva, M. Bochenek, J. Mendoza-Elias, Y. Wang, M. Qi, D. M. Lavin, M. Chen, N. Dholakia, R. Thakrar, I. Lacík, G. C. Weir, J. Oberholzer, D. L. Greiner, R. Langer, D. G. Anderson, Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates, *Nature Materials* 14 (2015) 643-652.
- [50] E. Fournier, C. Passirani, C. N. Montero-Menei, J. P. Benoit, Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility, *Biomaterials* 24 (2003) 3311-3331.
- [51] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O. C. Farokhzad, Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release, *Chemical Reviews* 116 (2016) 2602-2663.
- [52] B. B. Mandal, S. C. Kundu, Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds, *Biomaterials* 30 (2009) 2956-2965.
- [53] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. S. Kumar, Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review, *International Journal of Polymer Science* 2011 (2011) 1-19.
- [54] V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster, Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury and death, In: V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster (Eds.) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders (2015) 31-68.
- [55] R. Lattouf, R. Younes, D. Lutomski, N. Naaman, G. Godeau, K. Senni, S. Changotade, Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 62 (2014) 751-758.
- [56] M. Aldrovani, A. M. A. Guaraldo, B. C. Vidal, Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice, *Vision Research* 47 (2007) 3229-3237.
- [57] J. F. Ribeiro, E. H. M. Anjos, M. L. S. Mello, B. C. Vidal, Skin collagen fiber molecular order: a pattern of distributional fiber orientation as assessed by optical anisotropy and image analysis, *PlosOne* 8 (2013) 1-9.
- [58] M. D. Sanchez-Garcia, E. Gimenez, J. M. Lagaron, Morphology and barrier properties of solvent cast composites of thermoplastic biopolymers and purified cellulose fibers, *Carbohydrate Polymers* 71 (2008) 235-244.
- [59] C. Zhang, T. Zhai, L. Turng, Y. Dan, Morphological, mechanical, and crystallization behavior of polylactide/polycaprolactone blends compatibilized by L-lactide/caprolactone copolymer, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 54 (2015) 9505-9511.

- [60] P. F. M. Finotti, L. C. Costa, M. A. Chinelatto, Effect of the chemical structure of compatibilizers on the thermal, mechanical and morphological properties of immiscible PLA/PCL blends, *Macromolecular Symposia* 368 (2016) 24-29.
- [61] P. F. M. Finotti, L. C. Costa, T. S. O. Capote, R. M. Scarel-Caminaga, M. A. Chinelatto, Immiscible poly(lactic acid)/poly(ϵ -caprolactone) for temporary implants: compatibility and cytotoxicity, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 68 (2017) 155-162.
- [62] D. F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials* 29 (2008) 2941-2953.

APÊNDICES

APÊNDICE A - PERFIL CLÍNICO DOS ANIMAIS

	FC (bpm)	FR (mpm)	TC (°C)	MI	GH	CMA	TPC (s)
Cavalo 1	36	8	37,3	Normal	Ok	Rósea	2
Cavalo 2	36	24	36,6	Normal	Ok	Rósea	2
Cavalo 3	28	12	36,7	Normal	Ok	Rósea	2
Cavalo 4	32	12	37	Normal	Ok	Rósea	2
Cavalo 5	32	16	37	Normal	Ok	Rósea	2
Cavalo 6	36	20	37,1	Normal	Ok	Rósea	2
Média	33,3	15,3	37,0	Normal	OK	Rósea	2
DP	3,27	5,89	0,26	-	-	-	-

Valores de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura corporal (TC), motilidade intestinal (MI), grau de hidratação (GH), coloração de mucosas aparentes (CMA) e tempo de preenchimento capilar (TPC). DP = desvio padrão

APÊNDICE B. PERFIL HEMATOLÓGICO DOS ANIMAIS

	He (x10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Le (x10 ³ /μL)	Bas (%)	Eos (%)	Bast (%)	Seg (%)	Linf (%)	Mon (%)	Plaq (x10 ³ /μL)
Cavalo 1	6,94	12,7	35,7	7,1	0	5	0	56	39	0	278
Cavalo 2	6,27	10,3	29,5	9	1	4	0	53	42	0	220
Cavalo 3	7,5	13,2	39,1	6,4	0	2	0	47	51	0	272
Cavalo 4	6,9	12,6	35,8	6,5	1	0	0	62	37	0	258
Cavalo 5	7,65	12,8	37,3	6,7	0	5	0	60	34	1	286
Cavalo 6	5,54	10,6	30	6,1	0	4	0	65	30	1	305
Média	6,8	12,03	34,57	6,97	0,33	3,33	0	57,17	38,83	0,33	269,83
DP	0,79	1,25	3,93	1,05	0,52	1,97	0	6,55	7,25	0,52	28,96

Valores de hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular media (CHCM), leucócitos (Le), basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), bastonetes (Bast), segmentados (Seg), linfócitos (Linf), monócitos (Mon), plaquetas (Plaq). DP = desvio padrão

APÊNDICE C. PERFIL BIOQUÍMICO DOS ANIMAIS

	CREA (mg/dL)	UR (mg/dL)	FA (U/L)	AST (U/L)	BT (mg/dL)	BD (mg/dL)	GGT (U/L)	PT (g/dL)	ALB (g/dL)
Cavalo 1	2,3	39	215	220	1,78	0,58	22	7,1	2,24
Cavalo 2	2	32	248	220	1,11	0,43	15	6,7	2,02
Cavalo 3	2,1	24	157	230	1,91	0,58	15	6,3	2,47
Cavalo 4	1,7	24	174	240	1,29	0,52	30	6	2,3
Cavalo 5	2,4	38	182	240	2,28	0,58	15	5,8	2,45
Cavalo 6	2,2	35	174	261	1,42	0,55	22	6,1	2,3
Média	2,12	32	191,67	235,17	1,63	0,54	19,83	6,33	2,3
DP	0,25	6,66	33,58	15,5	0,44	0,06	6,05	0,48	0,16

Valores de creatinina (CREA), uréia (UR), fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), gamaglutamiltransferase (GGT), proteína total (PT) e albumina (ALB). DP = desvio padrão