

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**UNESP**

**Ana Luisa Toledo de Sanches Osório**

**Citotoxicidade de membranas à base de ácido polilático e poli- $\epsilon$ -caprolactona  
com a incorporação de fosfato de lantânio e oxiapatita dopada com lantânio**

**Araraquara**

**2015**

**Ana Luisa Toledo de Sanches Osório**

**Citotoxicidade de membranas à base de ácido polilático e poli- $\epsilon$ -caprolactona com a incorporação de fosfato de lantânio e oxiapatita dopada com lantânio**

TCC apresentado ao curso de Farmácia-Bioquímica como pré-requisito para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista “UNESP”

Profa. Dra. Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote – Orientadora

**Araraquara**

**2015**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho de conclusão de curso a toda minha família, os quais sempre estiveram ao meu lado, mesmo que distantes, acompanharam todo o meu esforço e crescimento durante o período da faculdade.

Dedico também a todo o Departamento de Morfologia, em especial à minha orientadora, Profa. Dra. Ticiano Sidorenko de Oliveira Capote, a qual atenciosamente se dedicou a me ensinar e ajudar, permitindo que concluísse este projeto.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) de Araraquara pelo suporte durante esses cinco anos de faculdade.

Agradeço também aos verdadeiros amigos que fiz durante esses anos, principalmente à minha república, que me apoiou e me forneceu os melhores anos de minha vida.

## Sumário

RESUMO .....	6
1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVO.....	18
3. MATERIAL E MÉTODO .....	18
<b>Preparo do eluato</b> .....	18
<b>Cultura Celular</b> .....	19
<b>Ensaio de Citotoxicidade (XTT)</b> .....	19
<b>Ensaio de Citotoxicidade (Sobrevivência Clonogênica)</b> .....	20
<b>Análise estatística</b> .....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
5. CONCLUSÃO .....	25
6. REFERÊNCIAS.....	26

## RESUMO

Desde a antiguidade, enxertos e membranas são estudados para promoverem um reparo ósseo otimizado. O reparo ósseo consiste na reabsorção do tecido necrosado e de seu coágulo, juntamente com um processo inflamatório que libera fatores de crescimento que irão reparar o osso danificado. Em algumas situações, o osso lesionado não tem a capacidade de se auto reparar, portanto, são necessárias intervenções cirúrgicas para inserir um enxerto ósseo. Entretanto, há uma grande dificuldade em se encontrar um material que forneça os fatores necessários para o crescimento ósseo. Para isso, foram confeccionadas membranas à base de ácido polilático e poli- $\epsilon$ -caprolactona (PLC) (Purasorb: PLC 7015 – Purac, Holanda), com a incorporação de fosfato de lantânio (PLC/LaPO<sub>4</sub>) e oxiapatita dopada com 20% de lantânio (PLC/La<sub>20</sub>OAP) pelo Instituto de Química de Araraquara, UNESP. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade desses materiais por meio dos testes XTT e sobrevivência clonogênica. Os eluatos foram preparados com as membranas citadas de acordo com a ISO 10993-12. O cloridrato de doxorubicina foi utilizado como controle positivo para ambos os testes. Como Controle Negativo (CN) foram utilizadas somente as células CHO-K1 (sem a ação de qualquer tratamento) por 24 horas. Os eluatos foram mantidos em contato com células CHO-K1 por 24 horas. Como os dados apresentaram aderência à curva normal, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido dos testes de Tukey e Dunnett ( $p < 0,05$ ). Verificou-se que os materiais testados não demonstraram absorvância estatisticamente diferente em relação ao CN ( $p > 0,05$ ; Dunnett – XTT) e também não causaram comprometimento na capacidade proliferativa das células ( $p > 0,05$ ; Dunnett – Sobrevivência clonogênica). Assim, pode-se concluir que as amostras de

PLC, PLC/LaPO<sub>4</sub> e PLC/La<sub>20</sub>OAP não apresentaram citotoxicidade em células CHO-K1.

## 1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo que possui uma matriz extracelular mineralizada com determinado grau de rigidez e elasticidade, conferindo ao corpo a função de suporte. Tal tecido, por ser o maior reservatório de cálcio do organismo, ajuda a manter o pH interno do corpo, transmite e conduz o impulso elétrico aos nervos e músculos. Pode ser dividido em componentes microestruturais: células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores sinalizadores solúveis. É composto por 25% de matriz orgânica, dividido em 95% de colágeno, principalmente colágeno tipo I, e 5% de proteínas não-colagenosas (osteocalcina, osteonectina, proteínas morfogenéticas, proteoglicanas, sialoproteínas, etc). A matriz inorgânica corresponde a 65% do tecido ósseo, sendo composta principalmente por hidroxiapatita e 10% de água [74].

O processo de reparo ósseo envolve múltiplos eventos que incluem a reabsorção do tecido ósseo necrosado e do coágulo subsequente ao trauma e concomitante a esses eventos, o desenvolvimento de processo inflamatório que propicia a liberação de fatores de crescimento que irão auxiliar na diferenciação celular e, conseqüente, na formação do tecido ósseo. Para o reparo do tecido ósseo, há a demanda da presença de células osteoprogenitoras (células com a potencialidade de se diferenciar em osteoblastos) e, com potencial osteoindutor, matriz osteocondutora e adequado aporte sanguíneo [26].

O processo de reparo ósseo transcorre sem complicações na maioria dos casos (90 a 95%) [15]. Porém, o uso de materiais biológicos para propiciarem a melhora no processo de reparação óssea se faz necessário em casos de defeitos críticos ou fraturas.

O uso de enxertos e membranas que propiciem a melhora do processo de neoformação e remodelação óssea é descrito desde a antiguidade. Neste contexto, para enxertia óssea até o momento, o auto enxerto ainda é considerado “padrão ouro” [27]. Efetivamente, este é o que apresenta as melhores características de osteogênese, osteoindução e osteocondução. Ou seja, para ocorrer regeneração tecidual é necessária a presença de células capazes de formar novo tecido ósseo (osteogênese); estas consigam aderir, crescer e atravessar todo o material (osteocondução) e estejam presentes fatores que estimulem a sua diferenciação fenotípica em osteoblastos (osteoindução) [73].

Entretanto, este tipo de enxerto apresenta algumas desvantagens como a necessidade de remover o tecido ósseo de outra região do paciente (sítio doador), o que demanda outra cirurgia com suas respectivas morbidade e complicações pós-operatórias. Sendo assim, o material ideal para reconstrução óssea deveria possuir as qualidades de um osso autógeno sem as desvantagens relacionadas ao sítio doador. É difícil concentrar as três propriedades num material sintético, mas é possível adicionar a uma matriz osteocondutora materiais cerâmicos, como a hidroxiapatita ou o fosfato tricálcico, ou, ainda agentes bioativos como o aspirado de medula e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) [33,49].

Um biomaterial ideal deve manter as suas propriedades e características estruturais, mas simultaneamente substituir a função para a qual foi criado. Também é necessário que permita uma boa adesão celular à sua superfície, tenha uma resistência mecânica suficiente para ser usado em locais onde há incidência de carga, não tenha características oncogênicas, seja hemostático, esterilizável e, por fim, quando implantado em tecido ósseo deverá ser, principalmente, osteocondutor [84].

Ainda, a eficácia de um enxerto no organismo depende, principalmente, de dois fatores: a biofuncionalidade e a biocompatibilidade do material, estando diretamente relacionada com a capacidade do biomaterial em desempenhar uma determinada função no organismo e na análise das reações ocorridas no implante durante a sua implantação e, ao longo do tempo, quando este sofre um processo de degradação e desgaste, respectivamente [54].

A crescente evolução tecnológica tem permitido a compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos na neoformação e remodelação óssea e, como consequência, resultando no desenvolvimento de novos biomateriais e métodos promissores para reparação óssea. Desta forma, os substitutos ósseos sintéticos e/ou naturais processados biotecnologicamente tornaram-se materiais potenciais para aplicações clínicas nas diversas áreas da saúde [41,72,83].

Atualmente, vários materiais sintéticos são usados para reconstrução de estruturas tridimensionais do esqueleto, tais como: biocerâmicas ( $\beta$ -fosfato tricálcio, fosfato de cálcio bifásico e hidroxiapatita), vitro-cerâmicas, polímeros (colágeno, poliácido (lático-co-glicólico), polietileno poroso de alta densidade, polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona e polihidroxibutirato), além do osso bovino poroso desmineralizado e liofilizado, bem como, a associação entre esses biomateriais [1,3,6,14,30,53,76].

Polímeros biológicos como o colágeno, alginato, agarose e ácido hialurônico podem ser utilizados na engenharia de biomateriais com base nas suas diferentes propriedades: a biocompatibilidade, bioinércia, biotolerância, bioatividade e reabsorção [79].

Os polímeros sintéticos têm como vantagem a facilidade de fabricação e controlada degradação [31]. Entretanto, são quimicamente e biologicamente inertes, não induzindo a adesão celular e a formação de tecido. Para superar isto, a

hidroxiapatita e o fosfato tricálcico têm sido adicionados para aumentar a osteocondutividade do biomaterial, devido às características de bioatividade e reabsorção, promovendo ligação direta com os tecidos vivos e a degradação lenta e gradual do biomaterial com a finalidade de substituição dos tecidos em que são implantados, respectivamente [81].

As biocerâmicas baseadas em fosfato de cálcio (hidroxiapatita sintética e fosfato tricálcico) se assemelham aos componentes inorgânicos do tecido ósseo. Esta similaridade as torna propícias à adesão celular e a neoformação do tecido ósseo [52]. Entretanto, as biocerâmicas possuem baixa resistência mecânica quando comparado a materiais poliméricos e metálicos, cuja propriedade interfere diretamente na produção de materiais com formas e tamanhos apropriados para a reconstrução óssea [17]. A associação destas cerâmicas com materiais polímeros tem se tornado uma opção atrativa para o desenvolvimento de compósitos para reconstrução óssea, pois, desta forma, obtêm-se materiais com resistência mecânica adequada e ainda com bioatividade favorecida pela cerâmica [33,61].

Os polímeros absorvíveis têm sido utilizados como um sistema de liberação lenta e controlada de fármacos. A incorporação de fatores estimuladores de crescimento ósseo e diferenciação de células mesenquimatosas em células osteoprogenitoras e osteoblastos podem incrementar a matriz com a capacidade osteoindutora [9].

Nos últimos anos, o polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona) tem se destacado na produção de “scaffolds” para engenharia tecidual quando comparado a outros polímeros reabsorvíveis como o poli (ácido láctico) (PLA) e poli (ácido glicólico) (PGA) e seus copolímeros [46].

O polímero ácido polilático (PLA), assim como outros polímeros que têm sido utilizados para reparo ósseo, possui fácil controle de síntese, origem ilimitada, não sofre degradação mediada por células, possui superfície hidrofóbica, além de ser biodegradável e biocompatível. Porém, possui pouca resistência mecânica e sofre redução de tamanho ao longo do tempo, acrescido a sua questionável interação com as células com possibilidade de reação tóxica local pela liberação de produtos ácidos de degradação [59].

Ainda, em um estudo do copolímero com associação de PLA e ácido poliglicólico (PGA), 70% e 30% respectivamente, o copolímero apresentou biocompatibilidade e permitiu neoformação óssea em contato com o implante. Além disso, ocorreu o processo de osseointegração em ambos os grupos, mesmo na ausência de estabilidade primária dos implantes [55]. Ou seja, o PLA é um polímero que já foi evidenciado que em associação a outros polímeros possui grandes possibilidades de sucesso como biomaterial.

Segundo Queiroz (2006), variações entre os resultados de toxicidade do material apresentados em diferentes estudos de associação de PLA e PGA podem estar relacionadas às diferentes técnicas cirúrgicas, à anatomia óssea, às diferentes formas de utilização do polímero, suas formulações, bem como às finalidades de seu emprego [55].

O estudo para a polimerização da poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) começou por volta de 1930 e sua propriedade de biodegradação foi primeiramente estudada em 1973 [75].

O PCL é um polímero sintético relativamente biodegradável e biocompatível da classe dos poliésteres alifáticos aprovado para utilização em humanos [9]. Possui excelentes propriedades mecânicas, sendo mais resiliente quando comparado aos

outros polímeros citados devido às suas características favoráveis para reparação óssea, pois mantêm as propriedades físicas da matriz por pelo menos seis meses [7]. Porém, devido à sua hidrofobicidade intrínseca e falta de grupos bioativos funcionais, o PCL não é muito favorável para o crescimento celular, desta forma, restringindo sua aplicação para engenharia tecidual [46].

No entanto, muitos métodos têm sido desenvolvidos para modificar a superfície e propriedades físico-químicas dos materiais à base de PCL para melhorar suas propriedades tanto mecânica quanto de biocompatibilidade, além do tempo de reabsorção. Dentre estes métodos se destaca a adição de fases inorgânicas, como hidroxiapatita ou fosfato de cálcio [4,6,87].

O PCL tem sido usado para carreamento de fármacos, já o PLA como instrumento ortopédico, o material desenvolvido com a união destes, o poli- $\epsilon$ -caprolactona-co-ácido lático está disponível em diversas formas para ser utilizado como material de preenchimento ósseo. No estudo de Ekholm et al. (1999) [16], foi observado que o copolímero  $\epsilon$ -caprolactona-co-ácido lático provocou uma reação inflamatória severa quando implantado em músculos e reação moderada quando implantado em osso. Essa resposta ocorreu, segundo os autores, provavelmente devido à maior vascularização do músculo e à maior quantidade de material implantada. Além disso, o material promoveu no músculo uma reação inflamatória inicial moderada com piora do quadro, o que pode ser devido à grande concentração de material degradado ou à maior vascularização do tecido muscular, fato que poderia ser evitado com menor concentração do material, o que ainda teria promovido uma reabsorção do polímero em menor tempo [16].

Uma tendência no desenvolvimento de compósitos poliméricos, para aplicações médicas e odontológicas, tem sido torná-los radiopacos para facilitar a sua visualização em diagnósticos por imagens [26,35,51,58,61].

As metodologias utilizadas para aumentar ou fornecer propriedades de radiopacidade aos polímeros são geralmente pela incorporação de agentes radiopacificantes tais como, pó de metais pesados, elementos pesados, sais inorgânicos ou compostos iodados, por meio de diversas formas, desde dispersões heterogêneas, quelação, copolimerização [12,20,35,51,56,58,61,70,71]. Um método que vem sendo bastante utilizado para incorporação de radiopacificantes em polímeros é sintetizar monômeros vinílicos contendo átomos halogênicos ligados de forma covalente, como o iodo ou bromo, e copolimerizar estes monômeros com outros monômeros vinílicos sem estes átomos [20,32,39,77]. Embora a incorporação de elementos halogênicos aos polímeros tem sido eficaz e promissora como agentes radiopacificantes, ainda busca-se um biopolímero radiopaco com propriedades biológicas e mecânicas ideais para aplicação em regeneração óssea.

Uma alternativa atrativa em relação aos compostos iodados, os quais podem provocar reações alérgicas devido à reação ao contraste iodado [21,48], são os elementos terras-raras (ETR), como o lantânio (La). Os Elementos Terras Raras (ETR) compõem um grupo de elementos químicos da série dos lantanídeos, para as quais se utiliza o símbolo Ln. Correspondem aos elementos do lantânio (La, Z = 57) ao lutécio (Lu, Z = 71), entre os quais se incluem o ítrio (Y, Z = 39) e o escândio (Sc, Z = 21). Porém, segundo recomendações da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), usam-se os termos lantanídeos para designar os elementos do La ao Lu e terras raras quando aos lantanídeos são incluídos o Sc e o Y. A expressão terras raras é imprópria para designar estes elementos, os quais

receberam esta denominação porque foram inicialmente conhecidos em forma de seus óxidos, que se assemelham aos materiais conhecidos como terras. Além da expressão "terras" não ser apropriada à denominação de tais elementos, a expressão "raras" também não está de acordo, pois os lantanídeos são mais abundantes (com exceção do promécio que não ocorre na natureza) do que muitos outros elementos [22,37,50].

Lantânio é um cátion trivalente que atua como bloqueador do canal de cálcio e tem sido usado *in vitro* em canais iônicos em estudos para a sinalização de cálcio [38,62,64]. O lantânio tem sido amplamente usado em muitas áreas tais como, agricultura, indústria eletrônica, farmacologia e medicina [85]. O lantânio é um produto da indústria nuclear e está sendo usado em aplicações óticas e semicondutoras, no setor da agricultura na China, em manufatura de metal e até mesmo em componentes de lâmpadas fluorescentes e baterias recarregáveis [2,28,38,62]. Especialmente na medicina, os lantanídeos têm sido diretamente usados em terapias para tratamento de câncer, feridas por queimadura e diagnósticos de imagem por ressonância magnética [10,44], devido às suas relevantes propriedades físico-químicas, principalmente em relação ao tempo médio de vida de emissão, o qual é maior quando comparado aos demais fluoróforos tradicionais (fluoresceína, rodamina).

De acordo com a literatura, a incorporação de fosfato de La ( $\text{LaPO}_4$ ) às cerâmicas tem mostrado uma melhora significativa na redução de formação e propagação de trincas, desta forma, melhorando o acabamento e polimento dos materiais cerâmicos. Isto ocorre devido ao  $\text{LaPO}_4$  servir como uma interface fraca na matriz de compósitos cerâmicos [11,43,47]. Além do  $\text{LaPO}_4$  melhorar o acabamento cerâmico, também promove uma maior estabilidade térmica dos compostos

cerâmicos [43]. Biocerâmicas contendo La têm sido sintetizadas para aplicações biomédicas [17,23,45,60], as quais não apresentaram citotoxicidade [23] e também favoreceram a adesão de osteoblastos [17]. Além disso, o La proporciona radiopacidade à biocerâmica, permitindo sua nítida visualização em radiografias médicas-odontológicas [45].

Embora os ETR sejam amplamente aplicados em diversas áreas incluindo a medicina, indústria e agricultura, estudos têm revelado eventuais acúmulos desses elementos no corpo humano [88], pois os ETR entram no nosso organismo por diversas vias, como comida, bebida, água, ar e também agentes terapêuticos e de diagnóstico. O La apresenta efeito antibacteriano e promove regulação da imunidade celular [24]. O carbonato de lantânio [ $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$ ] é utilizado para tratamento de hiperfosfatemia e hipercalcemia, agindo na regulação sérica do fósforo em pacientes renais crônicos em hemodiálise [29,30,63]. O lantânio é absorvido pelo intestino e acumulado nos tecidos; a taxa de absorção no intestino aumenta a probabilidade de doenças renais crônicas [36,57,66]. Uma vez que é absorvido, o lantânio é distribuído e acumulado em vários tecidos, especialmente no fígado, osso, rim e cérebro [36]. Portanto, a preocupação com o acúmulo de La está relacionada à dose ingerida, administrada ou ao tempo de exposição ao longo da vida, pois elevados níveis podem promover efeitos adversos ao organismo, tanto em curto quanto em longo prazo. Estudos realizados na China têm revelado que os ETR podem afetar negativamente as funções cognitivas como a atenção, aprendizado e memória de crianças e a velocidade de transmissão do sinal no cérebro de pessoas que vivem em regiões com altos níveis de ETR [18,89]. Outros estudos realizados em animais têm revelado o acúmulo de cloreto de lantânio ( $\text{LaCl}_3$ ) no cérebro, principalmente, na região do hipocampo, afetando a memória e o desenvolvimento neural dos animais

[5,19]. Um outro estudo recente revelou que animais expostos a  $\text{LaCl}_3$  por 1 mês apresentaram danos neurais no hipocampo e também apresentaram aumento significativo nos níveis de glutamato e  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, além de outras taxas representativas, os quais levam à apoptose de células neurais, gerando possível aparição de doenças neurodegenerativas [86]. Outro estudo mostrou que o cloreto de lantânio se liga ao sulfato de condroitina, maior componente da cartilagem que está envolvido na mineralização óssea [25].

Com o objetivo da obtenção de um biomaterial para regeneração óssea, que fosse radiopaco, o Instituto de Química de Araraquara, UNESP, elaborou membranas à base de ácido polilático e poli- $\epsilon$ -caprolactona (Purasorb: PLC 7015 – Purac, Holanda) associadas ao lantânio.

Para uso seguro, um biomaterial não deve apresentar potencial citotóxico, genotóxico, mutagênico e ao mesmo tempo deve ser biocompatível. Assim, a avaliação da citotoxicidade é um resultado preliminar da resposta celular frente ao biomaterial e que indicará se o material deverá ser modificado ou se os outros testes poderão ser realizados.

O ensaio XTT tem sido usado como uma ferramenta rotineira para a quantificação da viabilidade celular no estudo citotóxico de materiais ao medir a atividade metabólica das células. Este teste é baseado na clivagem do sal tetrazólio (sodium 3'- [1-(phenylaminocarbonyl) - 3,4 - tetrazolium] – bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) para formar o corante formazan, de cor alaranjada, por células metabolicamente ativas. Portanto, tal conversão ocorre apenas em células viáveis, devido à atividade de desidrogenases mitocondriais [65]. Já o Ensaio de Sobrevivência Clonogênica é importante para investigar se uma droga pode ter efeito de citotoxicidade tardio, levando à letalidade celular que geraria um efeito

dose-dependente [13]. O teste é capaz de refletir verdadeiramente o perfeito estado metabólico das células, enquanto os demais testes de viabilidade avaliam as células em um determinado momento, sem considerar os efeitos do composto ou da droga na população [68].

Com base nos estudos feitos acima, nos propusemos a realizar testes de citotoxicidade para descobrir a viabilidade de um possível biomaterial desenvolvido, um copolímero formado pela associação dos polímeros PLA e PCL, o PLC. Este, em três formas diferentes: puro, incorporado de oxiapatita dopada de lantânio e com adição de fosfato de lantânio.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de três membranas desenvolvidas à base de ácido polilático e poli- $\epsilon$ -caprolactona (PLC) (Purasorb: PLC 7015 – Purac, Holanda): PLC puro, PLC com adição de fosfato de lantânio (PLC/LaPO<sub>4</sub>) e PLC com adição de oxiapatita dopada com 20% de lantânio (PLC/La<sub>20</sub>OAP) por meio dos testes de sobrevivência clonogênica e XTT.

## **3. MATERIAL E MÉTODO**

As membranas (0,25 mm de espessura) foram confeccionadas pelo Instituto de Química de Araraquara, UNESP e esterilizadas com radiação gama com dose de 15 kGy.

### **Preparo do eluato**

Para os tratamentos com os diferentes biomateriais (PLC, PLC/LaPO<sub>4</sub>, PLC/La<sub>20</sub>OAP) foi utilizado eluato, confeccionado de acordo com a ISO 10993-12,

sendo considerado o peso (0,1g/mL). Os materiais foram imersos em meio de cultura HAM-F10:D-MEN (1:1) com ausência de soro fetal bovino, a 37°C por 72 horas, sob agitação a 133 rpm em incubadora (New Brunswick Scientific – Excella E24 Incubator Shaker Series).

### **Cultura Celular**

Células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), com ciclo de divisão de aproximadamente 14 horas, crescidas em meio de cultura HAM-F10:D-MEN (1:1), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) mantidas em estufa de cultura a 37°C, sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> foram cultivadas e repicadas até atingirem a terceira passagem. Para os testes de citotoxicidade foram feitas três repetições independentes e, ainda, cada tratamento (além do controle negativo e do controle positivo) foi realizado em triplicata, utilizando placas de cultivo celular.

### **Ensaio XTT**

Foram semeadas 20.000 ( $2 \times 10^4$ ) células CHO-K1 em placas de 24 poços num volume de 1mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O eluato preparado com os materiais permaneceu em contato com as células durante 24 horas. O cloridrato de doxorrubicina foi utilizado na concentração de 3,0 µg/mL por 24 horas como controle positivo (CP). Como Controle Negativo (CN) foram utilizadas somente as células CHO-K1 (sem a ação de qualquer tratamento).

Após 24 horas, os tratamentos foram removidos de cada poço, as culturas foram lavadas com 250 µL de PBS 1× e inserido 1 mL meio de cultura HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB em todos os poços. No dia seguinte, as

culturas foram lavadas com 250  $\mu\text{L}$  de PBS 1 $\times$  e, com a luz apagada da câmara de fluxo laminar, foi colocado em cada poço 500  $\mu\text{L}$  de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sem fenol vermelho (Cultilab) com 60 $\mu\text{l}$  da solução XTT/eléctron (Kit-XTT, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) na proporção de 5000 $\mu\text{L}$ :100 $\mu\text{L}$  por poço (concentração final de 0,3 mg/mL), deixando a 37°C na estufa por 3 horas. Em seguida, foi feita a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 492 nm normalizada a 690 nm.

### **Sobrevivência Clonogênica**

Foram semeadas células CHO-K1 ( $5 \times 10^4$ ) em placas de 24 poços com volume de 1 mL de meio de cultura completo em cada poço e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O eluato preparado com os materiais permaneceu em contato com as células durante 24 horas. As células CHO-K1, sem a ação de qualquer tratamento, foram utilizadas como Controle Negativo (CN). Como Controle Positivo (CP) foi utilizado 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de cloridrato de doxorrubicina por 4 horas. Ao final do tratamento, o eluato e o meio de cultura foram removidos de cada poço e a seguir, lavados com 1 mL de PBS 1 $\times$ . Em seguida, as células foram desprendidas pela ação da tripsina, sendo transferidas para um microtubo, num volume de 1 mL de meio de cultura para contagem em Câmara de Neubauer. Assim, para o ensaio de sobrevivência clonogênica, 150 células foram semeadas em frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> com 5 mL de meio de cultura completo, em triplicata por tratamento. Após 7 dias de cultivo, as células foram lavadas com 5 mL de PBS 1 $\times$  e fixadas com metanol:ácido acético:água destilada (1:1:8) por 30 minutos. As colônias foram coradas com 5 mL do corante Giemsa diluído em tampão fosfato, na proporção de

1:20, por 20 minutos. Depois de coradas, as células foram lavadas para remoção do excesso do corante.

O número de colônias contadas no controle negativo foi considerado como 100%. A partir disso, foram realizados os cálculos das frações de sobrevivência (FS):

$$FS = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas em cada tratamento} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de colônias observadas no controle negativo}}$$

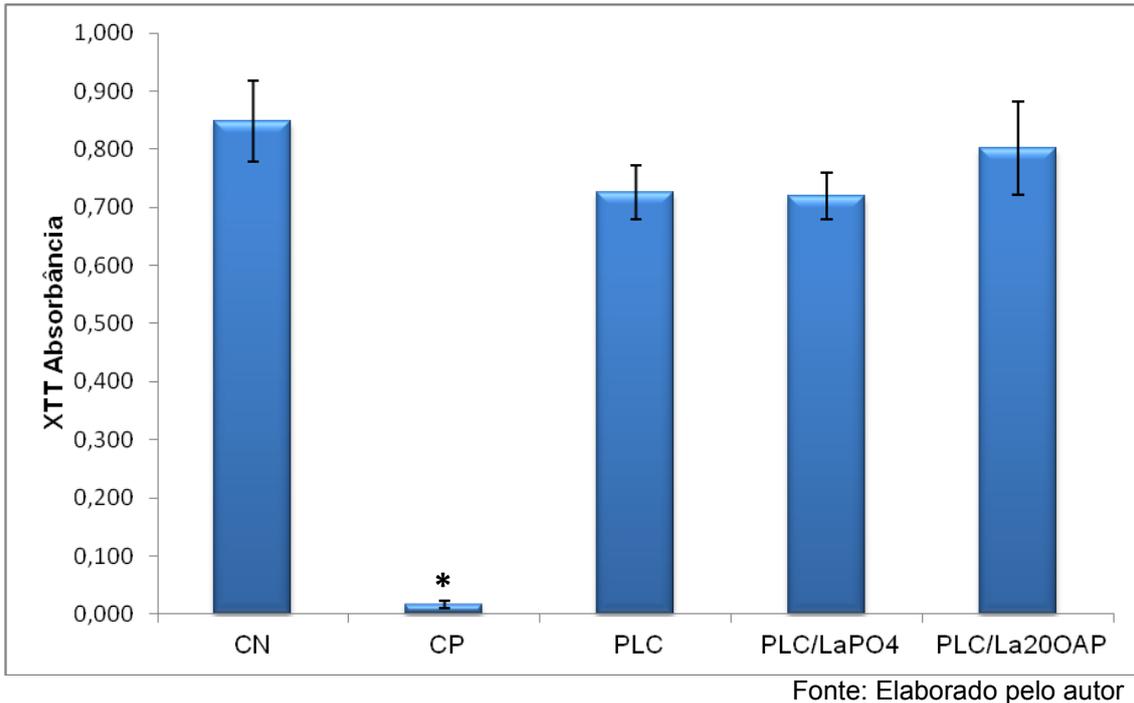
### **Análise estatística**

Para cada material investigado, os resultados provenientes dos testes de citotoxicidade obtidos dos três experimentos independentes (e em triplicata) foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliar se os dados obedeciam a distribuição normal. Como os dados apresentaram aderência à curva normal, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do testes de Tukey. Também foi aplicado o teste de Dunnett que compara os valores obtidos de cada um dos tratamentos com o de uma referência (no caso, o Controle Negativo). Foi utilizado o programa Graphpad Prism e os testes foram considerados ao nível de significância de 5%.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A média e erro padrão da absorbância obtida pelo Método XTT podem ser observados no Gráfico 1.

Gráfico 1. Citotoxicidade avaliada pelo Ensaio XTT. Colunas indicam o valor médio de Absorbância. Barras indicam o erro padrão (\*=p<0,0001; Dunnett).



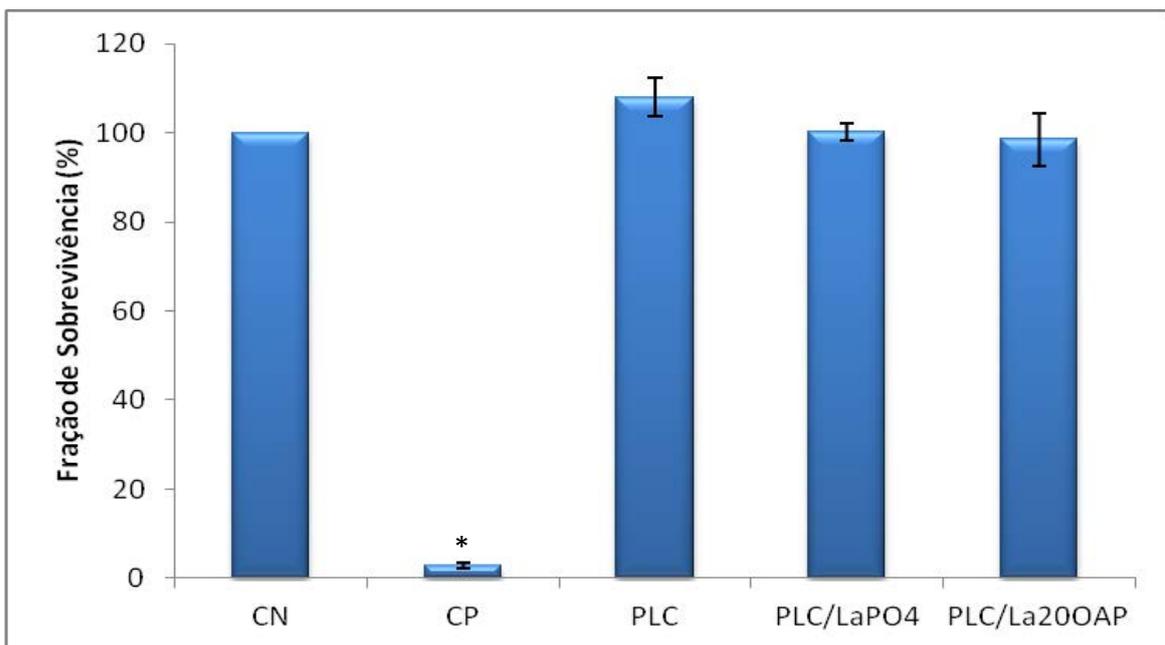
A análise de citotoxicidade pelo método XTT não demonstrou absorvância estatisticamente diferente entre o Controle Negativo e os materiais testados ( $p > 0,05$ ; Tukey). Todos os materiais testados apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle Positivo ( $p < 0,05$ ; Tukey).

Considerando a absorvância obtida do Controle Negativo como referência (teste de Dunnett), os materiais avaliados não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ; Dunnett).

Segundo Silva et al. (2008) [65], o ensaio XTT tem sido usado como uma ferramenta rotineira para a quantificação da viabilidade celular no estudo citotóxico de materiais ao medir a atividade metabólica das células. A redução intracelular dos compostos do Kit - XTT liberam o formazan, um composto que pode ser quantificado por meio de estimativa colorimétrica. Dessa forma, avaliou-se a atividade mitocondrial das células CHO-K1 após passarem pelo tratamento de 24 horas com os eluatos preparados com os materiais propostos por meio do método do XTT, sendo observados que os materiais não se mostraram citotóxicos.

A média e erro padrão da fração de sobrevivência obtidos pelo ensaio de sobrevivência clonogênica podem ser observados no Gráfico 2.

Gráfico 2. Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. Barras indicam o erro padrão (\*= $p < 0,05$ ; Dunnett).



Fonte: Elaborado pelo autor

A análise de citotoxicidade pelo ensaio de sobrevivência clonogênica não demonstrou diferença estatisticamente significativa quanto à capacidade proliferativa das células entre o Controle Negativo e os materiais testados ( $p > 0,05$ ; Tukey, Dunnett). Todos os materiais testados apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle Positivo ( $p < 0,05$ ; Tukey).

Assim, pôde-se verificar que os materiais PLC, PLC/LaPO<sub>4</sub>, PLC/La<sub>20</sub>OAP não demonstraram citotoxicidade pelo ensaio de sobrevivência clonogênica em células CHO-K1 com 24 horas de tratamento com os eluato .

Como se sabe, o PCL é um polímero semi-cristalino, bioabsorvível que pertence ao grupo de poliésteres alifáticos e é conhecido atualmente por sua lenta degradação [8]. Devido a essa propriedade, vem sendo utilizado em diversas aplicações clínicas, inclusive como enxerto ósseo. Porém, resultados citotóxicos foram observados em análises *in vitro* utilizando o teste do MTT, onde foi demonstrado que as amostras contendo ou não angiotensina (Ang 1-7) associados à PCL/BCP (poli- $\epsilon$ -caprolactona/cerâmica bifásica) possuíram efeitos citotóxicos médios e moderados, respectivamente [3,42]. Em nosso trabalho foi utilizada uma associação de 70% de ácido láctico e 30% de poli- $\epsilon$ -caprolactona (Purasorb: PLC 7015 – Purac, Holanda). Verificamos que a porcentagem de PCL utilizada no material não causou efeitos citotóxicos.

Silva (2011) [64] avaliou uma associação de PCL e hidroxiapatita e verificou ausência da citotoxicidade do PCL purificado por meio do teste MTT e ausência de genotoxicidade para a associação PCL/HA (teste do micronúcleo). Não houve evidências de efeitos carcinogênicos e mutagênicos, e na avaliação de imunotoxicidade *in vitro* por meio do teste imunoenzimático de detecção dos níveis de prostaglandina E2, demonstrou não haver ação tóxica do PCL/HA sobre o sistema imunológico sem evidências de possíveis atividades inflamatórias ou de hipersensibilidade. Nos testes de biocompatibilidade *in vivo*, de irritação dérmica e toxicidade sistêmica, as amostras foram classificadas como não irritante e de toxicidade aguda baixa [64]. Portanto, resultados obtidos da literatura indicaram o potencial do polímero como biomaterial para a aplicação na engenharia de tecidos, assim como para a obtenção de dispositivos implantáveis, capazes de melhorar a osteointegração, visando novas aplicações na medicina e odontologia [40,78].

Segundo Vilay et al. (2009) [80], PCL incorporado ao ácido poli-l-lático (PLLA) aprimora a resistência e a falta de estabilidade térmica do material, porém, o material de PCL com PLA são imiscíveis e no caso o PCL prejudicou o processo de cristalização do PLLA [80], porém, em seus estudos não foram realizados testes de toxicidade.

Polímeros a base de ácido lático têm a possibilidade de serem utilizados em muitas aplicações devido ao seu potencial de associação com outros polímeros para torná-lo um biomaterial, além de sua comprovada capacidade de degradação em sistemas biológicos e de sua biocompatibilidade. A necessidade de associação a outros polímeros deve-se principalmente à instabilidade química e térmica em altas temperaturas do material PLA puro [67].

Segundo Taylor, o PLA em solução tampão não apresenta toxicidade, porém, se colocado em água, apresenta toxicidade após 4 semanas [69].

Em nossos testes para avaliação da citotoxicidade, o XTT e a Sobrevivência Clonogênica, obtivemos resultados negativos para a citotoxicidade como se pôde observar nos gráficos 1 e 2.

## **5. CONCLUSÃO**

Assim, pode-se concluir que os materiais de PLC, PLC/LaPO<sub>4</sub> e PLC/La<sub>20</sub>OAP não apresentaram citotoxicidade nas células testadas. Para aplicação segura como biomaterial substituinte ósseo para a área médica e odontológica mais estudos devem ser realizados.

## 6. REFERÊNCIAS

- [1] Barbanti SH, Carvalho Zavaglia CA, de Rezende Duek EA. Effect of salt leaching on PCL and PLGA (50/50) resorbable scaffolds. *Mater Res*, 2008;11:75-80.
- [2] Briner W, Rycek RF, Moellenberndt A, Dannull K Neurodevelopmental effects of lanthanum in mice. *Neurotoxicol Teratol*, 2000;22:573–81.
- [3] Burstein FD, Williams JK, Hudgins R, Boydston W, Reisner A, Stevenson K, et al. Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction: experience in 150 patients. *Plast Reconstr Surg*, 2006;118:484-9.
- [4] Cardoso GBC, Ramos ACD, Higa OZ, Zavaglia CAC, Arruda ACF. Scaffolds of poly(caprolactone) with whiskers of hydroxyapatite. *J Mater Sci*, 2010;45:4990-3.
- [5] Che Y, Cui Y, Jiang X. Effects of lanthanum chloride administration in prenatal stage on one-trial passive avoidance learning in chicks. *Biol Trace Elem Res*, 2009;127:37-44.
- [6] Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 2005;26:6565-78.
- [7] Ciapetti G, Ambrosio L, Savarino L, Granchi D, Cenni E, Baldini N, Pagani S, Guizzardi S, Causa F, Giunti A Osteoblast growth and function in porous poly  $\alpha$ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials*, 2003;24(21):3815-24.
- [8] Chuenjitkuntaworn B, Inrung W, Damrongsri D, Mekaapiruk K, Supaphol P, Pavasant P, Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. *J Biomed Mater Res A*, 2010;94:241-51.

- [9] Coombes AGA, Rizzi SC, Willianson M, Barralet JE, Downes S, Wallace WA. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*, 2004;25:(2):315-25.
- [10] Cutler CS, Smith CJ, Ehrhardt GJ, Tyler TT, Jurisson SS, Deutsch E. Current and potential therapeutic uses of lanthanide radioisotopes. *Cancer Biother Radiopharm*, 2000;15:531-45.
- [11] Davis JB, Marshall DB, Morgan PED. Monazite-containing oxide/oxide composites. *JEur Ceram Soc*, 2000;20:583-7.
- [12] Dawlee S, Jayabalan M. Development of segmented polyurethane elastomers with low iodine content exhibiting radiopacity and blood compatibility. *Biomed Mater*, 2011;6:055002.
- [13] Doyle A, Griffiths JB. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. *Cell Biochem Func*, 1999;17(4);223-90.
- [14] Duan B, Wang M, Zhou WY, Cheung WL, Li ZY, Lu WW. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 2010;6:4495-505.
- [15] Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*, 1995;77:940-56.
- [16] Ekholm M, Hietanen J, Lindqvist C et al. Histological study of tissue reactions to ε-caprolactone lactide copolymer in paste form. *Biomaterials*, 1999; 20:1257-62.
- [17] Ergun C, Liu H, Webster TJ. Osteoblast adhesion on novel machinable calcium phosphate/lanthanum phosphate composites for orthopedic applications. *J Biomed Mater Res A*, 2009;89:727-33.

- [18] Fan G, Yuan Z, Zheng H, Liu Z. [Study on the effects of exposure to rare earth elements and health-responses in children aged 7-10 years]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2004;33:23-8.
- [19] Feng L, Xiao H, He X, Li Z, Li F, Liu N, et al. Neurotoxicological consequence of long-term exposure to lanthanum. *Toxicol Lett*, 2006;165:112-20.
- [20] Ginebra MP, Albuixech L, Fernandez-Barragan E, Aparicio C, Gil FJ, San RJ, et al. Mechanical performance of acrylic bone cements containing different radiopacifying agents. *Biomaterials*, 2002;23:1873-82.
- [21] Greenberger PA, Patterson R, Tapio CM. Prophylaxis against repeated radiocontrast media reactions in 857 cases. Adverse experience with cimetidine and safety of beta-adrenergic antagonists. *Arch Intern Med*, 1985;145:2197-200.
- [22] Greenwood NM, Earnshaw. *A Chemistry of the Elements*. Pergamon Press, Oxford, UK, 1984;(2)265-71.
- [23] Guo DG, Wang AH, Han Y, Xu KW. Characterization, physicochemical properties and biocompatibility of La-incorporated apatites. *Acta Biomater*, 2009;5:3512-23.
- [24] Guo F, Lou YL, Wang Y, Xie A, Li GH. Lanthanum chloride inhibiting expression of inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide. *J Rare Earths*, 2007;25:359-63.
- [25] Harris AF, Cotty VF. The effect of lanthanum chloride and related compounds on calcification. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1970;186:269-78.
- [26] He J, Soderling E, Lassila LV, Vallittu PK. Incorporation of an antibacterial and radiopaque monomer in to dental resin. *Dent Mater*, 2012;28:e110-7.
- [27] Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2004;362:2821-50.

- [28] Hu X, Ding Z, Chen Y, Wang X, Dai L. Bioaccumulation of lanthanum and cerium and their effects on the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Chemosphere*, 2002;48:621-9.
- [29] Hutchison AJ, Barnett ME, Krause R, Kwan JT, Siami GA. Long-term efficacy and safety profile of lanthanum carbonate: results for up to 6 years of treatment. *Nephron Clin Pract*, 2008;110:c15-23.
- [30] Hutchison AJ, Gill M, Copley JB, Poole L, Wilson RJ. Lanthanum carbonate versus placebo for management of hyperphosphatemia in patients undergoing peritoneal dialysis: a subgroup analysis of a phase 2 randomized controlled study of dialysis patients. *BMC Nephrol*, 2013;14:40.
- [31] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21:2529-43.
- [32] Jayakrishnan A, Thanoo BC. T. Synthesis and polymerization of some iodine containing monomers for biomedical applications. *J Appl Polym Sci*, 1992;44:743-8.
- [33] Kang Y, Scully A, Young DA, Kim S, Tsao H, Sen M, et al. Enhanced mechanical performance and biological evaluation of a PLGA coated  $\beta$ -TCP composite scaffold for load-bearing applications. *Eur Polym J*, 2011;47:1569-77.
- [34] Khan SN. Clinical applications of Bone Graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 2000;31:389-98.
- [35] Kiran S, James NR, Jayakrishnan A, Joseph R. Polyurethane thermoplastic elastomers with inherent radiopacity for biomedical. *J Biomed Mater Res A*, 2012;100:3472-9.
- [36] Lacour B, Lucas A, Auchere D, Ruellan N, de Serre Patey NM, Druke TB. Chronic renal failure is associated with increased tissue deposition of lanthanum after 28-day oral administration. *Kidney Int*, 2005;67:1062- 9.

- [37] Lee JD. Química Inorgânica não tão Concisa; Edgard Blücher Ltda, 1999, 527p.
- [38] Lehninger AL, Carafoli E. The interaction of  $\text{La}^{3+}$  with mitochondria in relation to respiration- coupled  $\text{Ca}^{2+}$  transport: Arch Biochem Biophys, 1971;143:506-15.
- [39] Lewis G, Koole LH, van Hooy-Corstjens CS. Influence of powder-to-liquid monomer ratio on properties of an injectable iodine-containing acrylic bone cement for vertebroplasty and balloon kyphoplasty. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009;91:537-44.
- [40] Lotz AS, Havla JB, Richter E, Frölich K, Staudenmaier R, Hagen R, Kleinsasser NH. Cytotoxic and genotoxic effects of matrices for cartilage tissue engineering. Toxicol Lett, 2009;190:128-33.
- [41] Lu L, Mikos AG. The importance of new processing techniques in tissue engineering. MRS Bull, 1996;11:28-32.
- [42] Macedo FAFF, Nunes EHM, Vasconcelos WL, Santos RAS, Sinisterra RD ; Cortés, Maria E. A biodegradable porous composite scaffold of PCL/BCP containing Ang-(1-7) for bone tissue engineering. Cerâmica, 2012;58:481-8
- [43] Marshall DB, Morgan PED, Housley RM. Debonding in multi-layered composites of zirconia and  $\text{LaPO}_4$ . J Am Ceram Soc, 1997;80:1677-83.
- [44] Meares CF, Chmura AJ, Orton MS, Corneillie TM, Whetstone PA. Molecular tools for targeted imaging and therapy of cancer. J Mol Recognit, 2003;16:255-9.
- [45] Medri V, Mazzocchi M, Bellosi A. Doped calcium-aluminium-phosphate cements for biomedical applications. J Mater Sci Mater Med, 2011;22:229-36.
- [46] Mei N, Chen G, Zhou P, Chen X, Shao ZZ, Pan LF, et al. Biocompatibility of Poly(epsilon-caprolactone) scaffold modified by chitosan--the fibroblasts proliferation in vitro. J Biomater Appl, 2005;19:323-39.

- [47] Morgan PED, Marshall DB. Ceramic composites of monazite and alumina. *J Am Ceram Soc*, 1995;78:1553-63.
- [48] Nelson KL, Gifford LM, Lauber-Huber C, Gross CA, Lasser TA. Clinical safety of gadopentetate dimeglumine. *Radiol*, 1995;196:439-43.
- [49] Nishida K, Gilbertson LG, Evans CH, Kang JD. Potential applications of gene therapy to the treatment of spinal disorders. *Spine*, 2000;25:1308-14
- [50] Nomenclature of Inorganic Chemistry, IUPAC Recommendations 1990, ed. G.J. Leigh, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1990, p.43.
- [51] Nordback I, Raty S, Laukkarinen J, Jarvinen S, Piironen A, Leppiniemi J, et al. A novel radiopaque biodegradable stent for pancreatobiliary applications--the. *Pancreatol*, 2012;12:264-71.
- [52] Nordstrom EG, Sanchez Munoz OL. Physics of bone bonding mechanism of different surface bioactive ceramic materials in vitro and in vivo. *Biomed Mater Eng*, 2001;11:221-31.
- [53] Ozturk S, Sengezer M, Isik S, Turegun M, Deveci M, Cil Y. Long-term outcomes of ultra-thin porous polyethylene implants used for reconstruction of orbital floor defects. *J Craniofac Surg*, 2005:973-7.
- [54] Proubasta J, Mur JG, Planell JA. Biocompatibilidad, materiales implantables, tipos de implante. In: *Fundamentos de Biomecânica y Biomateriales*, Ediciones Ergon Madrid. 1997. pp. 271-350
- [55] Queiroz, Pereira T. Avaliação do copolímero de ácido polilático e poliglicólico ao redor de implantes osseointegráveis sem estabilidade primária: análise biomecânica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos. 2006. 119 f. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/88946>>.

- [56] Rabin O, Manuel Perez J, Grimm J, Wojtkiewicz G, Weissleder R. An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles. *Nat Mater*, 2006;5:118-22.
- [57] Sacchiero R, Berlove D, Brezzani A, Hanus M, Zhorov E, Burke S. Lanthanum deposition in tissues of renal compromised rats fed lanthanum carbonate for 28 days. *J Am Soc Nephrol*, 2003;14:205A.
- [58] Sang L, Wei Z, Liu K, Wang X, Song K, Wang H, et al. Biodegradable radiopaque iodinated poly(ester urethane)s containing. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 102(4);1121-30.
- [59] Santos SK, Paulo MN. Biomaterias na regeneração óssea. Revisão de literatura da pós-graduação em ciência animal da Universidade Federal de Goiás. 2011, 11-12.
- [60] Serret A, Cabañas MV, Vallet-Regi M. Stabilization of calcium oxyapatites with lanthanum(III)-created anionic vacancies. *Chem Mater*, 2000;12:3836-41.
- [61] Shasteen C, Kwon SM, Park KY, Jung SY, Lee SH, Park CG, et al. Biodegradable internal fixation plates enabled with X-ray visibility by a. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2013;101:320-9.
- [62] Shibuya I, Douglas WW. Calcium channels in rat melanotrophs are permeable to manganese, cobalt, cadmium, and lanthanum, but not to nickel: evidence provided by fluorescence changes in fura-2-loaded cells. *Endocrinol*, 1992;131:1936-41.
- [63] Shigematsu T. Multicenter prospective randomized, double-blind comparative study between lanthanum carbonate and calcium carbonate as phosphate binders in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia. *Clin Nephrol*, 2008;70:404-10.

- [64] Silva FM. Desenvolvimento, caracterização e estudo pré-clínico de dispositivos implantáveis biocompatíveis baseados no polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona). Tese de doutorado em ciências na área de Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo (USP). 2011; 156p.
- [65] Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EAR, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT Assay Performance for Studies involving *Candida albicans* Biofilms. *Braz Dent J*, 2008;19(4):364-9
- [66] Slatopolsky E, Liapis H, Finch J. Progressive accumulation of lanthanum in the liver of normal and uremic rats. *Kidney Int*, 2005;68:2809-13.
- [67] Södergård A, Stolta M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, 2002; 27(6): 1123-1163.
- [68] Sumantran VN; Bodul S; Koppikar SJ; Dalvi M; Wele A; Gaire V; Wagh UV. Differential growth inhibitory effects of *W. somnifera* root and *E. officinalis* fruits on CHO cells. *Phytother Res*, 2004;21;469-99.
- [69] Taylor MS, Daniels AU, Andriano KP, Hellert J. Six Bioabsorbable Polymers: In Vitro Acute Toxicity of Accumulated Degradation Products. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 1994; 151-56.
- [70] Thanoo BC, Jayakrishnan A. Barium sulphate-loaded p(HEMA) microspheres as artificial emboli: preparation and properties. *Biomaterials*, 1990;11:477-81.
- [71] Thanoo BC, Sunny MC, Jayakrishnan A. Tantalum-loaded polyurethane microspheres for particulate embolization: preparation and properties. *Biomaterials*, 1991;12:525-8.
- [72] Thomson RC, Yaszemski MJ, Mikos AG. Polymer scaffold processing In: Lanza RP, Langer R, Chick WL. Principles of tissue engineering. Austin, TX, USA: RG Lands Co., 1997;263-72.

- [73] Vaccaro AR, Chiba K, Heller JG, Patel TC, Thalgott JS, Truumees JG, Fischgrund JS, Craig MR, Berta SC, Wang JC. Bone grafting alternatives in spinal surgery. *Spine J*, 2002;2:206-15.
- [74] Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 2004;25(15):2941-8.
- [75] Van Natta FJ, Hill JW, Carruthers WH. Polymerization and ring formation,  $\epsilon$ -caprolactone and its polymers. *J Am Chem Soc*, 1934;56:455-9.
- [76] Van der Stok J, Van Lieshout EM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands - a systematic literature review. *Acta Biomater*, 2011;7:739-50.
- [77] Vazquez B, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA, Lopez Bravo A, San Roman J. Radiopaque acrylic cements prepared with a new acrylic derivative of iodo-quinoline. *Biomaterials*, 1999;20:2047-53.
- [78] Vert M. Polymeric biomaterials: strategies of the past vs. strategies of the future. *Prog Polym Sci*, 2007;32:755-6.
- [79] Vert M, Li MS, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J Mater Sci*, 1992;3:432-46.
- [80] Vilay V, Mariatti M, Ahmad Z et al. Characterization of the Mechanical and Thermal Properties and Morphological Behavior of Biodegradable Poly(L-lactide)/Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and Poly(L-lactide)/Poly(butylene succinate-co-L-lactate) Polymeric Blends. *J Appl Sci*, 2009; 1786-1792.
- [81] Wang YW, Wu Q, Chen J, Chen GQ. Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction. *Biomaterials*, 2005;26(8):899-904.

- [82] Weiss GB, Goodman FR. Effects of lanthanum on contraction, calcium distribution, and Ca movement in intestinal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 1963;169:46.
- [83] Widmer MS, Mikos AG. Fabrication of biodegradable polymer scaffold for tissue engineering. In: Patrick Jr CW, Mikos AG, McIntire LV. *Frontiers in tissue engineering*. New York ,USA: Elsevier Science, 1998;107-20.
- [84] Williams, D. F. *Definitions in Biomaterials*. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Amsterdam: Elsevier Science, 1987; 4.
- [85] Wu J, Yang J, Liu Q, Wu S, Ma H, Cai Y. Lanthanum induced primary neuronal apoptosis through mitochondrial dysfunction modulated by Ca(2)(+) and Bcl-2 family. *Biol Trace Elem Res*, 2013;152:125-34.
- [86] Yang J, Liu Q, Wu S, Xi Q, Cai Y. Effects of lanthanum chloride on glutamate level, intracellular calcium concentration and caspases expression in the rat hippocampus. *Biometals*, 2013;26:43-59.
- [87] Yu H, Matthew HW, Wooley PH, Yang SY. Effect of porosity and pore size on microstructures and mechanical properties of poly-epsilon-caprolactone-hydroxyapatite composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008;86B:541-7.
- [88] Zaichick S, Zaichick V, Karandashev V, Nosenko S. Accumulation of rare earth elements in human bone within the lifespan. *Metallomics*, 2011;3:186-94.
- [89] Zhu W, Xu S, Shao P, Zhang H, Wu D, Yang W, et al. Bioelectrical activity of the central nervous system among populations in a rare earth element area. *Biol Trace Elem Res*, 1997;57:71-7.