



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Campus de Araçatuba

Tamires Melo Francati

**Avaliação histométrica do processo de reparo em defeitos
de calvária de ratos com membrana de PCL e membrana de
colágeno porcino.**

Araçatuba

2017

Tamires Melo Francati

Avaliação histométrica do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de PCL e membrana de colágeno porcino.

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

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

Araçatuba

2017

*À memória de minha mãe, por tudo que me
ensinou e todo carinho que me deu
enquanto esteve presente. Meu maior
exemplo de força e persistência, que fez
muita diferença em todos esses anos da
minha vida. Não são poucos os
admiradores que deixou, dentre os quais,
sou uma das mais ardorosas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que esteve sempre me fortalecendo, guiando e orientando por toda a minha vida, proporcionando-me momentos maravilhosos e ajudando-me nas dificuldades.

À toda minha família por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Em especial ao meu pai, Eduardo Fancati, que me ajudou muito todos esses anos. À minha avó, Maria Eunice Bernardes Melo, por toda paciência e apoio nesta longa jornada. À minha irmã, aos meus tios, primos e madrastra que me fortaleceram nos momentos de dificuldades, ajudando-me a enfrenta-los.

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

À todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica, em especial a minha professora orientadora Ana Paula Farnezi Bassi pela paciência, incentivo, compreensão e confiança, me auxiliando nas dificuldades e ajudando a tornar possível a conclusão desta tese. À doutoranda Danielle Mendes da Camara que me orientou e fortaleceu no início da minha graduação, com tamanho carinho e apoio. Ao Guilherme André Del Arco Ramires por toda colaboração na jornada tanto do estágio quanto desta tese.

Aos meus amigos, que me deram muita força por todos esses anos, tornando esta longa caminhada mais agradável. Juntos conseguimos passar por todas as dificuldades. Vocês sempre farão parte da minha vida!

À PIBIC e FAPESP, pelo apoio financeiro e institucional.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!

“A felicidade exige valentia.”

Fernando Pessoa

Francati, T.M. **Avaliação histométrica do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de PCL e membrana de colágeno porcino.** 2017. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

O uso de membranas que auxiliem no processo de regeneração óssea guiada (ROG) é também uma vertente dos estudos de biomateriais compatíveis que auxiliam nesse processo de reparo. Membrana de polímero biodegradável, desenvolvida recentemente, que apresenta como base nano fibras de policaprolactona (PCL), com um ritmo controlável de degradação, mantém a estrutura durante um maior período do crescimento celular. O objetivo deste projeto foi avaliar por meio da análise histológica o potencial de auxiliar na neoformação óssea da membrana de PCL com 5% de HA e da membrana porcina no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos. Foram usados 36 ratos para análise histológica nos tempos de 7, 30 e 60 dias divididos em três grupos: G1: Coágulo, G2: Membrana Porcina, G3: PCL. Na análise histológica a membrana de PCL apresentou bom comportamento biológico com os tecido, pois não foi verificado reação de corpo estranho e nem reações inflamatórias, também foi possível verificar que a mesma permitiu que a ROG ocorresse tanto aos 30 quanto aos 60 dias, sendo que em alguns espécimes foi verificado o fechamento completo do defeito crítico. Concluiu-se que a membrana de PCL mostrou-se biocompatível com potencial para auxiliar nos processos de ROG.

Palavras Chave: Membranas. Polímeros. Reparo.

FRANCATI, T.M. Repair process histometric evaluation in skulls from defects in mice with membrane PCL and porcine collagen membrane. 2017. 42 f. Completion of course work (Graduation) - College of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

The use of membranes that help in the process of guided bone regeneration (GBR) is also an aspect of the study of biomaterials compatible that assist in the process of repair. Still in a study phase membrane developed at the University of San Carlos is based on nano polycaprolactone (PCL) fibers which is a biodegradable polymer with a rhythm is controllable degradation, maintaining the structure during a longer period of cell growth. The objective of this project was to evaluate by means of histological analysis the potential to aid in bone neoformation PCL membrane with 5% of HA and porcine membrane in the process of critical bone defects repair in rat calvarium. 36 rats were used for histological analysis of critical defects in rat calvarium in times of 7, 30 and 60 days divided into three groups: G1: Blood clot, G2: Porcine embrane, G3: PCL. Histological analysis showed that the PCL membrane has a biological behavior with the fabric since it was not verified foreign body reaction in any specimen, it was also possible to verify that it allowed the GBR occurred both to 30 about the 60 days, and in some specimens it was verified the complete closure of the defect. The PCL membrane proved to be biocompatible with the potential to assist in the processes of GBR.

Keywords: Membrane. Polymer. Repair.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Membrana de PCL. B. Membrana de colágeno porcino	18
FIGURA 2 - A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Trefina de 8mm. C. Remoção da cortical da região de calvária	19
FIGURA 3 – GC. 7 dias. HE. Imagem panorâmica.	21
FIGURA 4 – GC. 30 dias. HE. Imagem panorâmica.	22
FIGURA 5 – GC. 30 dias. HE. Aumento de 40X. A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito.	22
FIGURA 6 – GC. 60 dias. HE. Imagem panorâmica.	23
FIGURA 7 - GC. 60 dias. HE. Aumento de 400x. Coto direito. TON (seta preta). TC (seta amarela). LO (seta verde). Osteócitos (seta azul).	23
FIGURA 8 - GC. 60 dias. HE. Aumento de 400x. Centro do defeito crítico. Ausência de TON. TC (seta amarela). Neutrófilos (seta vermelha).	24
FIGURA 9 – GPCL. 7 dias. HE. Imagem panorâmica.	24
FIGURA 10 – GPCL. 7 dias. Aumento de 6.3X. Centro do defeito. A. HE. B. Tricrômico de Masson.	25
FIGURA 11 – GPCL. 7 dias. HE. Coto esquerdo. A. Aumento de 6.3X. B. Aumento de 25X.	25
FIGURA 12 – GPCL. 7 dias. Tricrômico de Masson. Aumento de 12.5X. A. Coto esquerdo. B. Coto direito.	26
FIGURA 13 – GPCL. 30 dias. HE. Imagem panorâmica.	26
FIGURA 14 – GPCL. 30 dias. HE. Aumento de 40X. TON (seta preta). TC (seta amarela). LO (seta verde). Osteócitos (seta azul). Membrana (seta vermelha). A. Coto direito. B. Coto esquerdo. C. Centro do defeito crítico.	27
FIGURA 15 – GPCL. 60 dias. HE. Imagem panorâmica.	27
FIGURA 16 – GPCL. 60 dias. HE. Aumento de 12.5X. TON (seta preta). TC (seta amarela). Osteócitos (seta azul). A Coto Direito. B. Coto esquerdo. C. Centro do defeito crítico.	28
FIGURA 17 – GBG. 7 dias. HE. Imagem panorâmica.	28

FIGURA 18 – GBG. 7 dias. HE. Aumento de 12.5X. A. Células Gigantes (seta preta).
B. Centro do defeito crítico. 29

FIGURA 19 – GBG. 30 dias. HE. Imagem panorâmica. 29

Figura 20 – GBG. 30 dias. HE. Aumento de 12.5X. Coto (seta preta), TC (seta amarela), membrana remanescente (seta azul). A. Coto direito. B. Coto esquerdo. C. Centro do defeito crítico. 30

Figura 21 – GBG. 30 dias. HE. Aumento de 25X. Membrana remanescente (seta verde). Centro do defeito crítico. 30

Figura 22 – GBG. 30 dias. HE. Aumento de 400X. A. Coto esquerdo. TON (seta preta). TON nos espaços da membrana (seta verde). Membrana remanescente (seta azul). membrana remanescente integrada ao TON (seta vermelha). TC (seta amarela). B. Coto direito. TON (seta preta). Membrana remanescente (seta vermelha). Tecido osteóide (seta amarela). Osteócitos (seta azul). C. Centro do defeito crítico. TON (seta preta). Membrana remanescente (seta azul). TC (seta amarela). Membrana remanescente integrada a TON (seta verde). Osteócitos (seta vermelha). 31

Figura 23 – GBG. 60 dias. HE. Imagem panorâmica. 31

Figura 24 – GBG. 60 dias. HE. Aumento de 40X. TON (seta preta), TC (seta amarela). Tecido osteóide (seta azul). A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito. 32

Figura 25 – GBG. 60 dias. HE. Aumento de 400X. TON (seta preta). TC (seta amarela). Tecido osteóide (seta azul). Osteócito (seta verde). A. Coto esquerdo. B. Coto direito. C. Centro do defeito crítico. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Área de TON em função dos grupos experimentais aos 7, 30 e 60 dias 33

LISTA DE ABREVIATURAS

AON = área de osso neoformado

GBG = grupo Bio-Gide®

GC = grupo coágulo

GPCL = grupo PCL

HA = hidroxiapatita

HE = hematoxilina e eosina

LO = linha de osteotomia

nHA = nanohidroxiapatita

PCL = poli-caprolactona

PLA = ácido poli-láctico

PVPI = polivinil pirrolidona iodo

ROG = regeneração óssea guiada

TC = tecido conjuntivo

TON = tecido osseo neoformado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Manta de PCL associado a nHA	17
3.1.1 Desenvolvimento da manta de PCL	17
3.2 Amostras	17
3.3 Cirurgia experimental	18
3.4 Etapa laboratorial	19
3.5 Análise histológica	20
3.6 Análise histomorfométrica	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Avaliação histológica	21
4.1.1 GC	21
4.1.2 GPCL	24
4.1.3 GBG	28
4.2 Avaliação histomorfométrica	33
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A implantodontia atual, cada vez mais se utiliza de métodos para reconstrução do processo alveolar, com a finalidade de possibilitar a instalação de implantes em posição adequada do ponto de vista estético e funcional.¹

A regeneração óssea guiada (ROG) é comumente usada na prática clínica para o tratamento de situações de defeitos ósseos alveolares limitantes nos maxilares. É caracterizada pelo uso de meios físicos (membranas ou barreiras), que promovem o isolamento anatômico de um local, permitindo a seleção e proliferação de um grupo de células, predominantemente osteoblastos, a partir do leito receptor e simultaneamente impedem a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração. Nesta técnica é imperioso que haja um espaço biológico entre a barreira ou membrana e o defeito ósseo.²

Para um material ser utilizado como membrana para ROG, ele deve satisfazer algumas propriedades físico-químicas tais como ser biocompatível, ter baixa imunogenicidade, promover integração tecidual, exclusividade celular (impedir a passagem de células do tecido conjuntivo para a área submembranosa), possuir capacidade de manter o espaço e ser de fácil utilização clínica.¹

Atualmente, as membranas de colágeno reabsorvível dominam os procedimentos de ROG na prática clínica e a sua utilização tornou-se tratamento padrão para ROG e apresenta várias vantagens em comparação com as membranas não absorvíveis: estabiliza a ferida, permite vascularização precoce, atrai os fibroblastos através da quimiotaxia e são semipermeáveis, o que facilita a transferência dos elementos nutritivos. Devido à propriedade hidrofílica da membrana, facilita a técnica cirúrgica e sua estabilização sobre o enxerto, além de não necessitar de cirurgia para remoção.³

Uma das mais utilizadas e documentadas membranas de colágeno, é derivada de suínos e não reticulada (Bio-Gide, Geistlich). As características de hidrofília e maleabilidade desta membrana a tornam fácil de ser adaptada sobre o enxerto e, quando colocada em dupla camada, ocorre uma melhor estabilização, dispensando assim a utilização de tachinhas ou parafusos para fixação, além disso quando expostas não causam infecção local porque os tecidos moles geralmente cicatrizam por segunda intenção.¹

As membranas podem servir também como suporte do crescimento celular por possuir uma estrutura que mimetiza a matriz extracelular, permitindo assim crescimento, proliferação, migração e diferenciação de tecidos específicos para uma futura implantação.⁴ A matriz extracelular é composta de uma interligação de fibras protéicas (colágeno e elastina), proteoglicanas e depósitos de minerais no caso do tecido ósseo. Os polímeros desenvolvidos para essas membranas podem ser ou não biodegradáveis, possuem propriedades hidrofílicas, químicas, físicas e mecânicas necessárias para permitir o crescimento celular.⁵ Dois dos polímeros mais estudados são poli-ácido-láctico (PLA) e poli-caprolactona (PCL). Ambos são biodegradáveis³ e biocompatíveis^{6,7}, sendo de uso freqüente na área médica como parafusos de fixação óssea, placas, veículo de drogas ou estrutura para engenharia tecidual. Estudos recentes mostram que membranas baseadas em matriz de PCL associadas ou não a diferentes substâncias, podem dar um suporte eficiente para o desenvolvimento celular permitindo a regeneração de cartilagens, tecido vascular, tecido cardíaco, pele, olho, tecido nervoso, entre outros.^{8,9,10,11} Contudo, o PCL é mais hidrofóbico que o PLA^{12,13,14,15} e possui uma degradação mais lenta em soluções salinas.¹⁶ Um estudo demonstrou que quando associados à hidroxiapatita (HA) o peso molecular do PCL aumentou drasticamente, enquanto o peso molecular do PLA teve uma queda.¹⁷ Um maior peso molecular define um tempo de degradação do polímero mais lento, possibilitando uma regeneração tecidual guiada mais segura. A propriedade mecânica dessas membranas podem influenciar o crescimento celular e a morfologia pode influenciar na adesão celular.

É possível incorporar proteínas aos polímeros, aumentando sua compatibilidade através de co-encapsulação de sais tampão e estabilizadores de proteína que podem alterar o pH interno das microesferas,^{18,19} melhorando as propriedades do PCL.

Membranas de polímeros biodegradáveis com nanohidroxiapatita (nHA)^{20,21,22,23} tem sido intensamente estudadas nos últimos anos, pois sua estrutura, além de ser mantida por mais tempo, é mais favorável para os osteoblastos. A nHA constitui 70% do tecido ósseo e quando incorporada no polímero pode promover uma rápida neoformação óssea induzindo células tronco a se diferenciarem em osteoblastos. A vantagem do uso do polímero biodegradável é que o seu ritmo de degradação é controlável, mantendo a estrutura durante um maior período do crescimento celular e as mantas possuem vazios nanométricos entre as nanofibras

que podem ancorar as células. As nanofibras podem ser processadas de forma a serem porosas, induzindo a cristalização da nHA^{21,22} por meio de tratamento adequado, ou podem ser tratadas superficialmente com plasma²⁴ para aumentar sua molhabilidade, aumentando a ancoragem e o grau de compatibilidade de células-matriz. Para melhorar a dispersão da nHA, compatibilizantes foram usados²⁵ mostrando uma melhor resposta dos osteoblastos. Em alguns estudos,²⁶ verificou-se que a adição de pequenas concentrações de nHA reforça as nanofibras, enquanto a adição de elevadas concentrações produz defeitos nas nanofibras, diminuindo o módulo de armazenamento.

2 PROPOSIÇÃO

A proposta deste projeto foi avaliar por meio da análise histométrica e histológica o potencial de auxiliar na neoformação óssea da membrana de PCL com 5% de HA (membrana em desenvolvimento com tecnologia nacional) em comparação com a membrana porcina Bio-Gide® no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da FOA sob o Processo FOA nº 2013-01489

3.1 Manta de PCL associado a nHA

Material desenvolvido pelo Departamento de Engenharia de Materiais, UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

3.1.1 Desenvolvimento da manta de PCL

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

3.2 Amostras

Foram utilizados um total de 54 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em três grupos (n=18 por grupo), e submetidos à eutanásia em três momentos do experimento, aos 7, 30 e 60 dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP. Sendo assim, em cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico na calvária (8 mm), como discriminado a seguir:

- Grupo coágulo (GC) (controle negativo) – n= 18: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 30 e 60 dias após a cirurgia).
- Grupo PCL com 5% de HA (GPCL) (grupo experimental) – n= 18: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma

membrana de PCL com 5% de HA, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 30 e 60 dias após a cirurgia).

- Grupo Bio-Gide® (GBG) (controle positivo) – n= 18: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 30 e 60 dias após a cirurgia).

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



Fonte: Do autor.

3.3 Cirurgia experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Foi realizada a tricotomia na região da calvária, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10% Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Foi realizada incisão triangular no sentido occipitofrontal de aproximadamente 2 (dois) cm, com lâmina n° 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi n° 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha) (Figura 2A). Em seguida com auxílio de broca trefina de 7 mm de diâmetro (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens,

EUA) acoplada em baixa-rotação de 500 rpm, sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8 mm de diâmetro, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 2B e C). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino (GBG – n=18), ou com uma membrana de PCL com 5% de HA (GPCL com 5% de HA – n=18), ou sem recobrimento (GC – n=18).

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água ad libitum.

Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 7, 30 e 60 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico.

Figura 2 - A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Trefina de 7mm. C. Remoção da cortical da região de calvária



Fonte: Do autor.

3.4 Etapa laboratorial

As calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal,

separando os defeitos ósseos. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente, receberam cortes de 6 µm de espessura e montadas em lâminas. As lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE). Para análise histológica foram avaliadas 3 lâminas por animal onde todo o defeito foi analisado. Previamente a realização da análise histológica, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conheceu a quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconheceu o respectivo grupo da secção.

3.5 Análise histológica

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.) as lâminas foram analisadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá).

3.6 Análise histomorfométrica

Mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (Leica R DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (Leica R DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland). Essas imagens foram armazenadas como figuras (jpg), e foram analisadas no programa Image J (NIH, Bethesda, ML, USA). Foi avaliada a área total do defeito ósseo e área de neoformação óssea. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos de pixels, para valores percentuais para permitir a aplicação do teste estatístico.

O programa computacional SigmaPlot 12.3 foi utilizado (Exact Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA), considerando o nível de 5% de significância. Inicialmente o teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado, o qual notou homogeneidade dos dados em função da curva de normalidade ($p > 0,05$). Assim, a Análise de Variância (ANOVA) de 2 fatores (grupos experimentais e períodos de análise) foi aplicada. Para ambas as interações, foi observada alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em que o pós-teste Tukey foi aplicado.

4 RESULTADOS

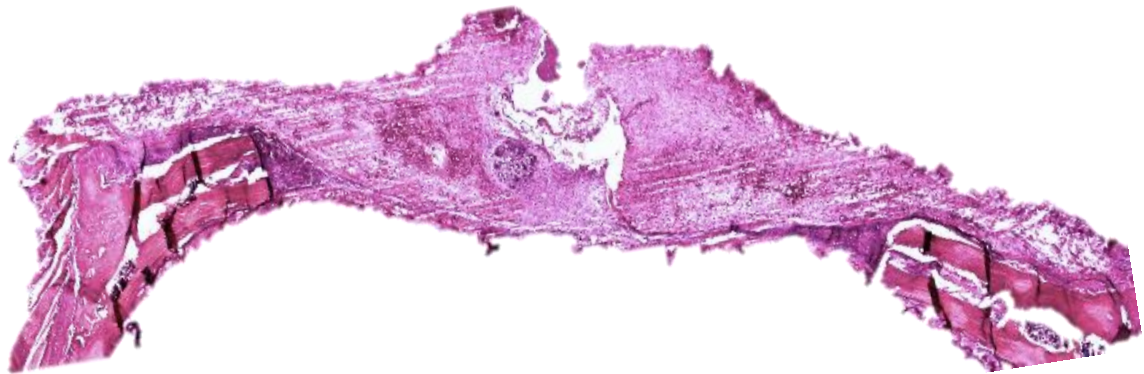
4.1 Avaliação histológica

4.1.1 GC

7 dias

A citoarquitetura das secções microscópicas aos 7 dias para os defeitos sem membrana mostrou hipervascularização no tecido ósseo neoformado (TON) e presença de atividade fibroblástica. Verificou-se na borda do defeito ósseo, indo em direção ao centro da ferida, neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, ricamente celularizado por osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. A neoformação óssea somente foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central, com abundância de tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblasto e pouca matriz extracelular preenchendo a região central da ferida (Figura 3).

Figura 3 – GC. 7 dias. HE. Imagem panorâmica



Fonte: Do autor.

30 dias

No período de 30 dias (Figura 4), o GC apresentou uma área óssea neoformada maior próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes estava preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado.

Figura 4 – GC. 30 dias. HE. Imagem panorâmica



Fonte: Do autor.

Foi possível observar, em maior aumento, indicados pela seta, a área de osteotomia com os cotos ósseos esquerdo (Figura 5A) e direito (Figura 5C) com discreta neoformação óssea em suas margens, e o centro do defeito crítico preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Figura 5B).

Figura 5 – GC. 30 dias. HE. Aumento de 40X. A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito



Fonte: Do autor.

60 dias

No período de 60 dias (Figura 6) observou-se maior aproximação dos cotos, porém, o defeito ósseo permanece sem reparo e a área central apresenta-se preenchida por tecido conjuntivo fibroso.

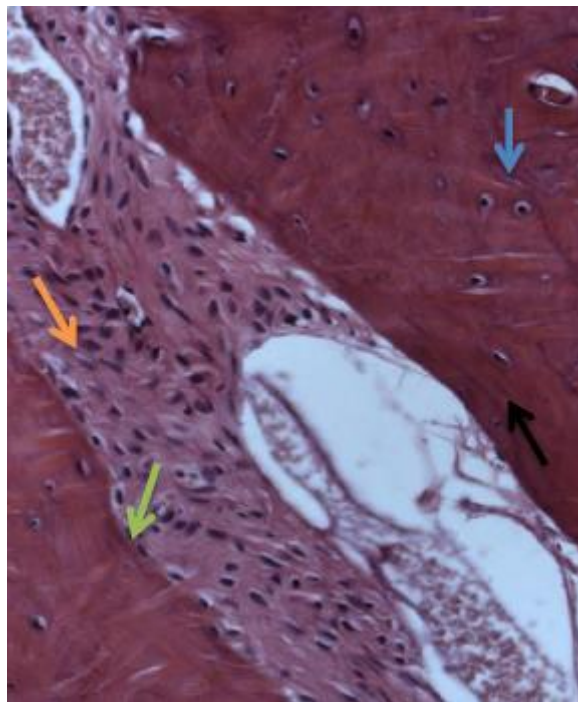
Figura 6 – GC. 60 dias. HE. Imagem panorâmica



Fonte: Do autor.

No aumento de 400x observa-se TON, presença de tecido conjuntivo (TC), linha de osteotomia (LO) e osteócitos nos cotos esquerdo e direito (Figura 7).

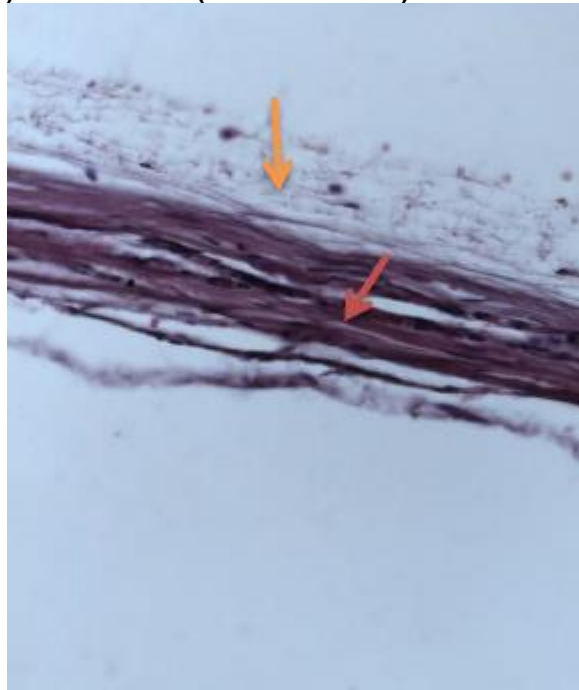
Figura 7 - GC. 60 dias. HE. Aumento de 400x. Coto direito. TON (seta preta). TC (seta amarela). Linha de osteotomia (LO) (seta verde). Osteócitos (seta azul)



Fonte: Do autor.

No centro do defeito há ausência de TON e presença de TC e neutrófilos polimorfonucleares (Figura 8).

Figura 8 - GC. 60 dias. HE. Aumento de 400x. Centro do defeito crítico. Ausência de TON. TC (seta amarela). Neutrófilos (seta vermelha)



Fonte: Do autor.

4.1.2 GPCL

7 dias

No período de 7 dias foi possível verificar a presença de um TC frouxo, sem a presença de infiltrado inflamatório. Próximo aos cotos já nota-se a presença de uma neoformação óssea. (Figura 9)

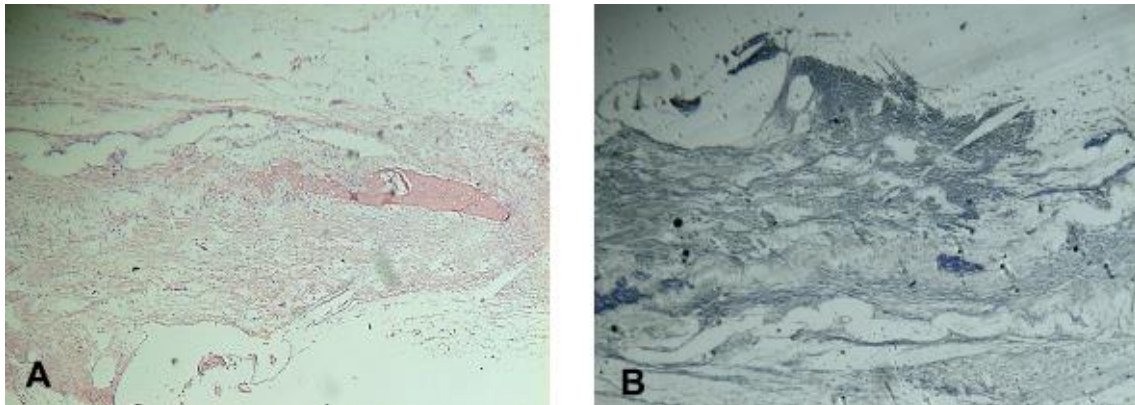
Figura 9 – GPCL. 7 dias. HE. Imagem panorâmica



Fonte: Do autor.

No centro do defeito é possível verificar um TC frouxo e em alguns espécimes foi verificado áreas de TON (Figura 10 A e B).

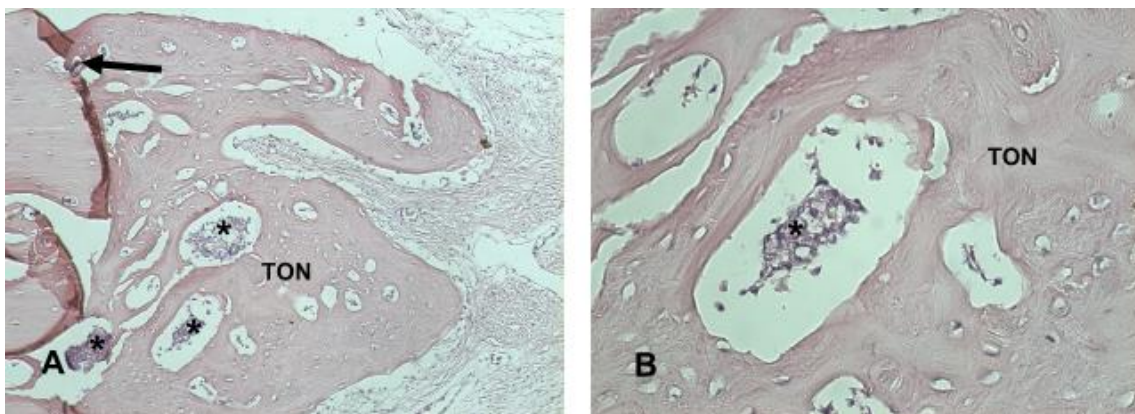
Figura 10 – GPCL. 7 dias. Aumento de 6.3X. Centro do defeito crítico. A. HE. B. Tricrômico de Masson



Fonte: Do autor.

É possível observar a presença da membrana de PCL, próximo aos cotos, envoltos por TON (*). A seta da figura 11A indica a LO. Ambas as lâminas foram coradas por HE. (Figuras 11A e B).

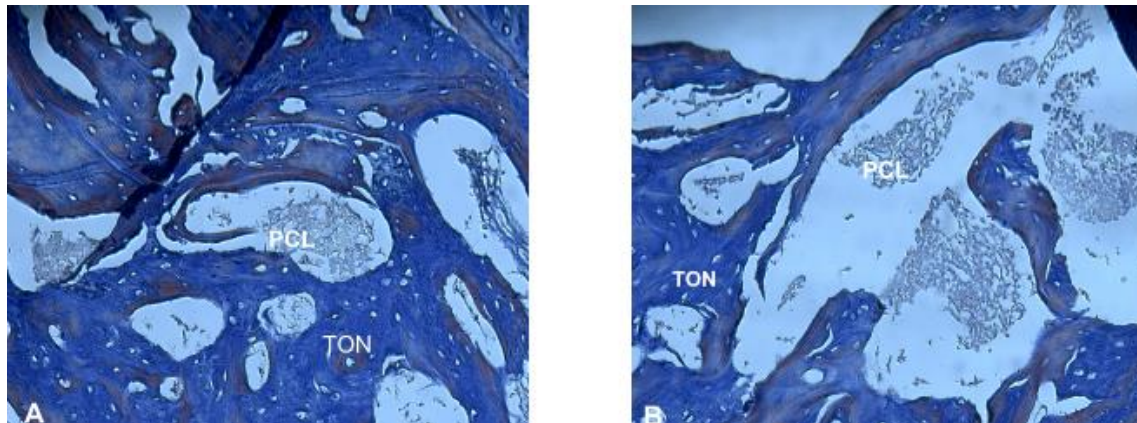
Figura 11 – GPCL. 7 dias. HE. Coto esquerdo. A. Aumento de 6.3X. B. Aumento de 25X



Fonte: Do autor.

Em um aumento de 12.5X com lâminas coradas por Tricrômico de Masson, é possível notar o TON adjacente a presença de fragmentos da membrana de PCL no coto esquerdo (Figuras 12A) e direito (Figuras 12B).

Figura 12 – GPCL. 7 dias. Tricrômico de Masson. Aumento de 12.5X. A. Coto esquerdo. B. Coto direito



Fonte: Do autor.

30 dias

Nesse tempo experimental foi verificado uma área maior de neoformação óssea, diminuindo o tamanho da cavidade. O centro do defeito apresenta-se preenchido por TC (Figura 13).

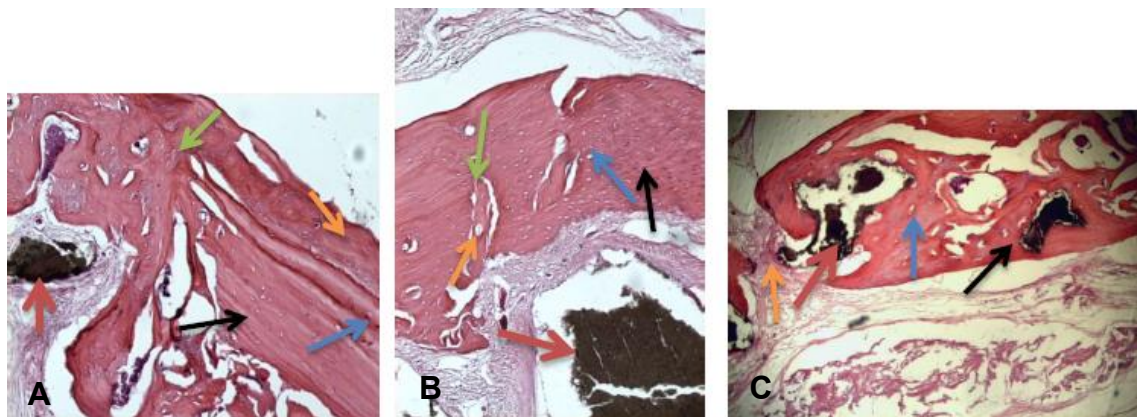
Figura 13 – GPCL. 30 dias. HE. Imagem panorâmica



Fonte: Do autor.

Em um aumento de 40x é possível notar TON nos coto direito (Figura 14A), esquerdo (Figura 14B) e no centro do defeito (Figura 14C) continuamente, apresentando remanescentes da membrana envolta por TON e TC.

Figura 14 – GPCL. 30 dias. HE. Aumento de 40X. TON (seta preta). TC (seta amarela). LO (seta verde). Osteócitos (seta azul). Membrana (seta vermelha). A. Coto direito. B. Coto esquerdo. C. Centro do defeito crítico



Fonte: Do autor.

60 dias

Nesse tempo experimental foi verificado em alguns espécimes o fechamento completo do defeito crítico e em outros quase a sua totalidade. Na figura 15 observa-se o defeito preenchido por TON e uma pequena porção central com TC (Figura 15).

Figura 15 – GPCL. 60 dias. HE. Imagem panorâmica

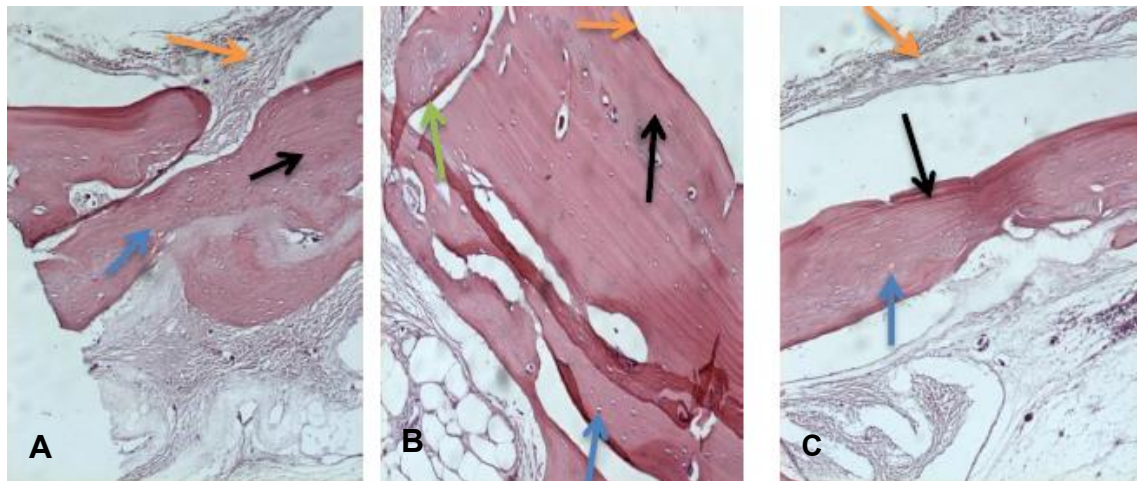


Fonte: Do autor.

A neoformação óssea é contínua nos cotos direito (Figura 16A) e esquerdo (Figura 16B), assim como no centro do defeito (Figura 16C), que apresenta o

fechamento completo. Ou seja, após 60 dias a regeneração tecidual ocorreu totalmente. Nesse período os remanescentes da membrana já foram reabsorvidos.

Figura 16 – GPCL. 60 dias. HE. Aumento de 12.5X. TON (seta preta). TC (seta amarela). Osteócitos (seta azul). A Coto Direito. B. Coto esquerdo. C. Centro do defeito crítico



Fonte: Do autor.

4.1.3 GBG

7 dias

Nota-se a presença da membrana de colágeno porcino em todo defeito preenchido por um tecido altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório, com início de neoformação óssea próximo aos cotos (Figura 17).

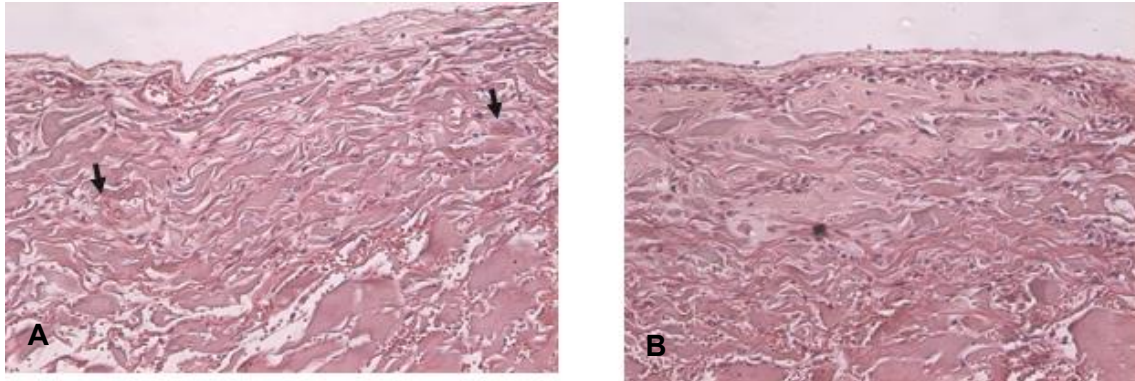
Figura 17 – GBG. 7 dias. HE. Imagem panorâmica



Fonte: Do autor.

Presença de células gigantes indicando a fagocitose da membrana (Figura 18A). Início de neoformação óssea no centro do defeito (Figura 18B).

Figura 18 – GBG. 7 dias. HE. Aumento de 12.5X. A. Células Gigantes (seta preta). B. Centro do defeito crítico

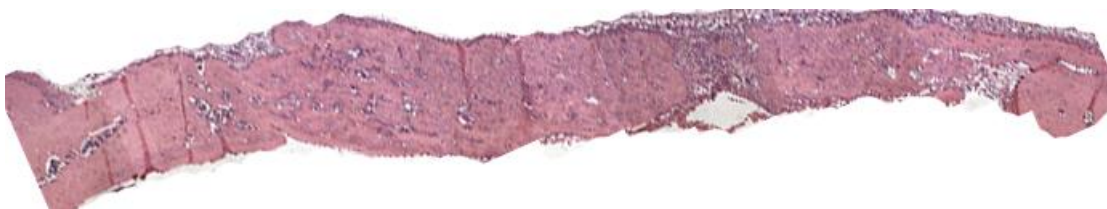


Fonte: Do autor.

30 dias

O centro do defeito apresenta-se preenchido por TON e TC fibroso organizado, com neoformação óssea a partir dos cotos em direção a porção central. Nota-se grande quantidade de TON entremeado por fragmentos da membrana de colágeno porcino (Figura 19).

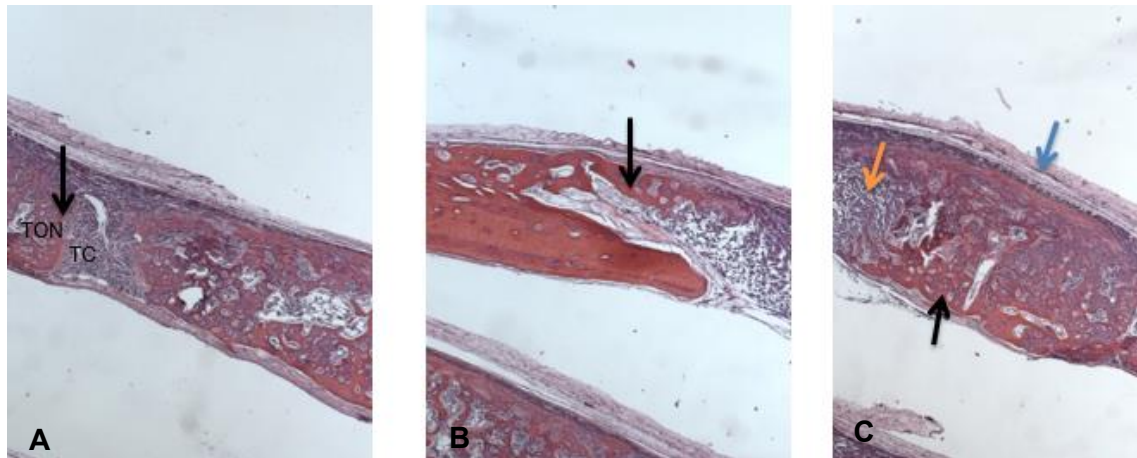
Figura 19 – GBG. 30 dias. HE. Imagem panorâmica



Fonte: Do autor.

Na observação das lâminas em um aumento de 12.5X nota-se a presença de neoformação óssea a partir dos cotos ósseos (Figuras 20A e B) e no centro do defeito (Figura 20C), com a imagem mostrando remanescente da membrana entre a área de TON e TC organizado.

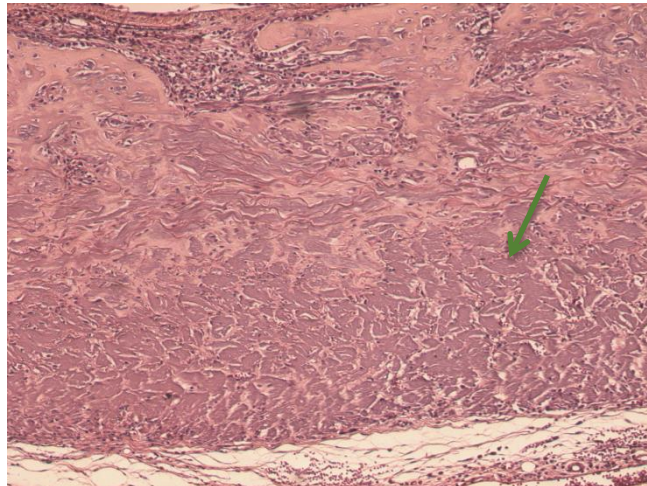
Figura 20 – GBG. 30 dias. HE. Aumento de 12.5X. Coto (seta preta), TC (seta amarela), membrana remanescente (seta azul). A. Coto direito. B. Coto esquerdo. C. Centro do defeito crítico



Fonte: Do autor.

Em um aumento de 25X observa-se mais nitidamente TON envolvendo a membrana remanescente (Figura 21).

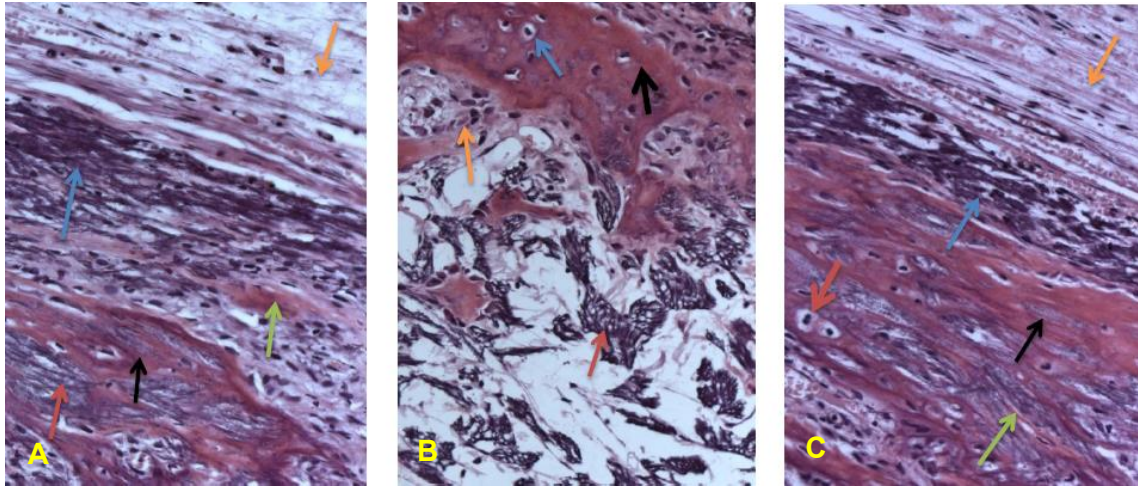
Figura 21 – GBG. 30 dias. HE. Aumento de 25X. Membrana remanescente (seta verde). Centro do defeito crítico



Fonte: Do autor.

No aumento de 400x observa-se nos cotos esquerdo e direito e no centro do defeito TON, TON nos espaços da membrana, membrana remanescente, tecido osteóide, osteócitos e TC (Figura 22).

Figura 22 – GBG. 30 dias. HE. Aumento de 400X. A. Coto esquerdo. TON (seta preta). TON nos espaços da membrana (seta verde). Membrana remanescente (seta azul). membrana remanescente integrada ao TON (seta vermelha). TC (seta amarela). B. Coto direito. TON (seta preta). Membrana remanescente (seta vermelha). Tecido osteóide (seta amarela). Osteócitos (seta azul). C. Centro do defeito crítico. TON (seta preta). Membrana remanescente (seta azul). TC (seta amarela). Membrana remanescente integrada a TON (seta verde). Osteócitos (seta vermelha)



Fonte: Do autor.

60 dias

Aos 60 dias as imagens obtidas da neoformação óssea nos cotos e centro do defeito eram muito semelhantes aos dos animais sacrificados com 30 dias, mas com tecido ósseo neoformado preenchendo praticamente toda a cavidade (Figura 23).

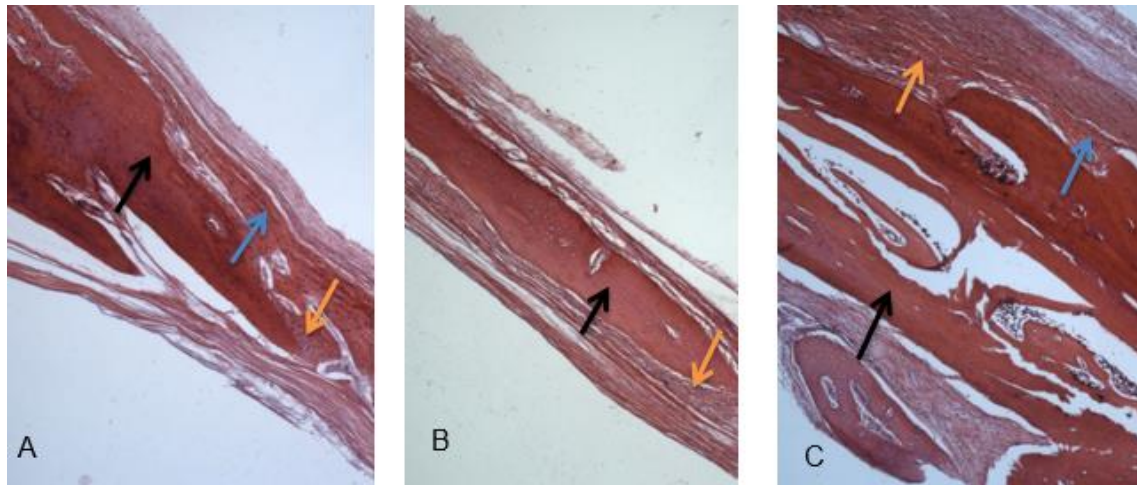
Figura 23 – GBG. 60 dias. HE. Imagem panorâmica



Fonte: Do autor.

No aumento de 40x observou-se em ambos os cotos (Figura 24A e B) e no centro do defeito (Figura 24C) TON, presença de TC e tecido osteóide. Além disso, o coto direito apresentou membrana remanescente (Figura 24B).

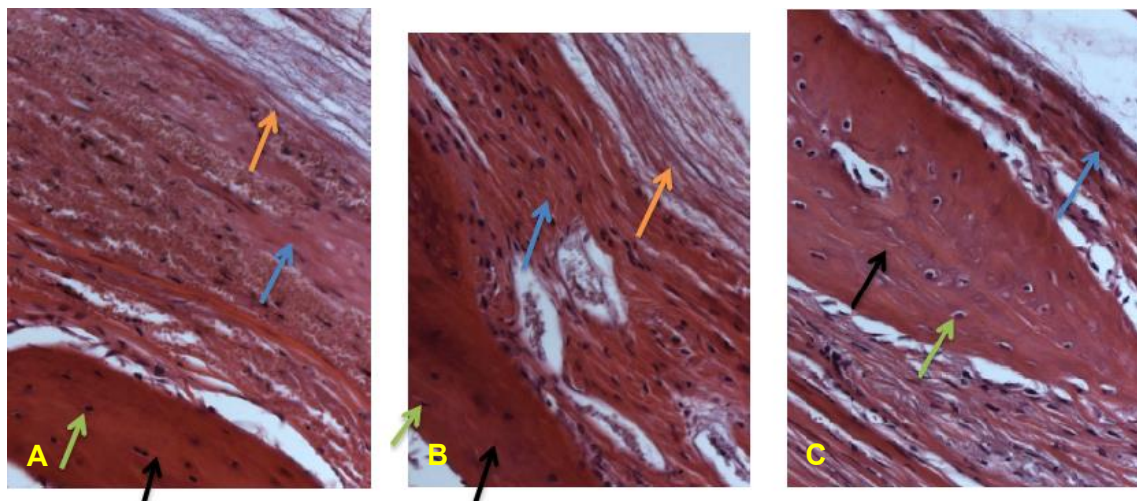
Figura 24 – GBG. 60 dias. HE. Aumento de 40X. TON (seta preta), TC (seta amarela). Tecido osteóide (seta azul). A. Coto esquerdo. B. Centro do defeito crítico. C. Coto direito



Fonte: Do autor.

No aumento de 400x é possível observar mais nitidamente TON, presença de tecido osteóide, osteócitos e TC (Figura 25A, B e C).

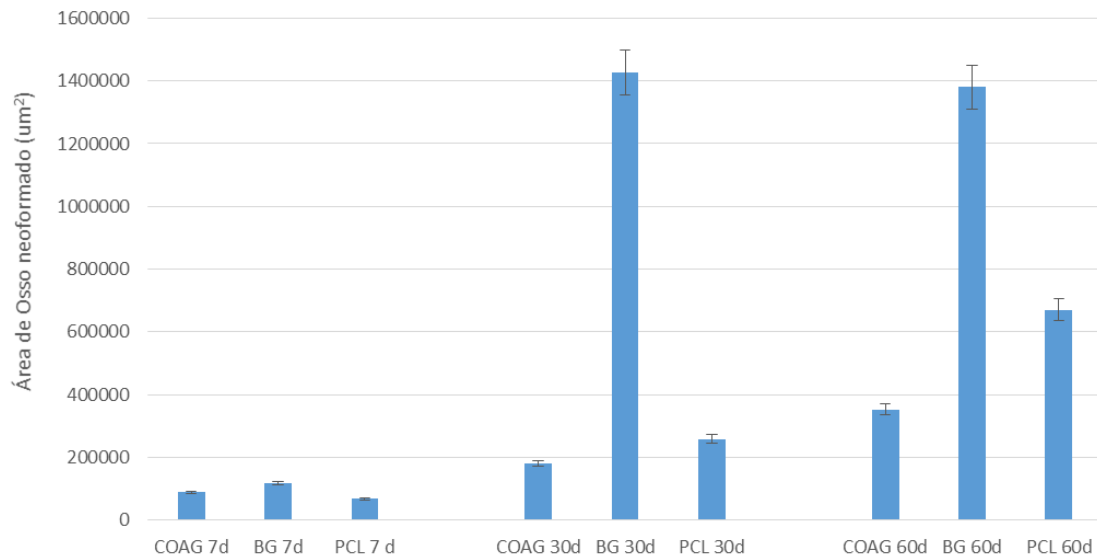
Figura 25 – GBG. 60 dias. HE. Aumento de 400X. TON (seta preta). TC (seta amarela). Tecido osteóide (seta azul). Osteócito (seta verde). A. Coto esquerdo. B. Coto direito. C. Centro do defeito crítico



Fonte: Do autor.

4.2 Avaliação histomorfométrica

Tabela 1 – Área de TON em função dos grupos experimentais aos 7, 30 e 60 dias



A partir dos dados histométricos obtidos (Tabela 1) de área de osso neoformado (AON), no primeiro período experimental, houve similaridade entre os grupos analisados ($p > 0,05$). Nos demais períodos (30 e 60 dias), o GBG apresentou os maiores valores de AON ($p < 0,05$). Aos 30 dias, o GBG foi superior ao GPCL ($p < 0,001$) e este foi similar ao GC ($p = 0,05$) ($BG > PCL = COAG$). Aos 60 dias, os maiores valores foram para o GBG, seguidos dos CPCL e GC ($p < 0,05$) ($BG > PCL > COAG$).

5 DISCUSSÃO

No período de 7 dias, todos os grupos apresentaram pouquíssima neoformação óssea e somente próximo ao coto. Além disso, o tecido conjuntivo formado apresenta-se bem desorganizado. Os remanescimentos da membrana nos GPCL e GBG são bem nítidos e extensos, ocupando todo o centro do defeito.

No período de 30 dias, o resultado menos favorável foi o encontrado no GC, onde os animais receberam apenas o coágulo, apresentando uma formação óssea pequena nos cotos e nenhuma neoformação óssea no centro do defeito. Já os animais do GPCL e GBG apresentaram neoformação óssea nos cotos e na região central do defeito observou-se TON como “ilhas” fusionadas de tecido ósseo e remanescentes da membrana. Os animais do GPCL também apresentaram remanescentes da membrana e os melhores resultados, pois além da neoformação óssea desde os cotos, o TON era mais contínuo.

No período de 60 dias, o GC continuou apresentando os piores resultados, sem neoformação óssea no centro do defeito, apenas preenchimento do defeito com TC. Os animais do GBG apresentaram neoformação óssea melhor aos 60 dias, com quase o fechamento completo do defeito, havendo somente uma pequena faixa no centro com TC e remanescentes da membrana. O GPCL apresentou neoformação óssea contínua em todo o defeito, sendo mais uniforme em comparação ao GBG, o TC já estava mais organizado e a membrana, nesse período, foi absorvida pelo organismo. Em alguns espécimes houve o fechamento completo do defeito ósseo, evento esse que não foi verificado nos outros grupos.

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

No presente estudo a membrana de PCL+HA apresentou bons resultados histologicamente, por causa da adição de hidroxiapatita, devido ao seu papel osteogênico e osteoindutor.^{27,28} Em outros estudos a HA adicionada às nanofibras de PCL melhorou significativamente a cicatrização óssea em defeitos provocados na calvária. Chen e Chang²⁹, por exemplo, utilizando nanofibras muito similares às utilizadas no presente estudo (PCL+HA e PCL), observaram que estas não afetavam negativamente a diferenciação osteogênica, permitindo o crescimento e diferenciação de células mesenquimais. Além disso, observaram que a produção mineral pelas células foi proporcional à concentração de HA na nanofibra. Contrariamente, Ródenas-Rochina et al.³⁰ observaram que a HA não melhorou a proliferação celular e a diferenciação de osteoblastos quando adicionada a suportes à base de PCL, sendo que o PCL sozinho apresentou melhores resultados.

O PCL apresenta algumas desvantagens. Tal como outros polímeros sintéticos, é de natureza hidrofóbica, impedindo a penetração de células aquosas para o interior da estrutura e tem pobres sítios de reconhecimento celular, levando a baixa afinidade e adesão celular.³¹ Além disso, podem produzir subprodutos de ácidos durante a degradação, causando uma resposta inflamatória.³² Contudo, este evento não foi observado nos períodos estudados.

A HA cerâmica e porosa demonstrou capacidade de integrar-se ao leito receptor, sendo osteocondutora e apresentando êxito na reconstrução de falhas ósseas nas áreas médica e odontológica. Um compósito, como a HA, adicionado a membrana melhoraria a biocompatibilidade e integração do tecido duro devido ao fato de que as partículas de cerâmica, que são incorporadas na matriz do polímero, permitem rápido aumento da propagação inicial do soro com proteínas, em comparação com a superfície de polímero mais hidrofóbico.³³

Os polímeros sintéticos e naturais passam por diferentes vias de degradação. Os polímeros sintéticos são geralmente degradados por hidrólise simples, enquanto que os polímeros naturais são principalmente degradados enzimaticamente.³⁴

As tensões locais são necessárias para estimular a neoformação óssea. Reciprocamente, a rigidez em excesso das membranas pode provocar concentrações de tensão no tecido saudável circundante resultando em reabsorção óssea.³⁵

Du et al.³⁶ utilizaram membranas de colágeno como scaffolds. As membranas de colágeno obtidas comercialmente envolviam HA em sua superfície, em seguida eram colocadas sobre o fragmento de osso ao longo da sua superfície. O tamanho dos poros deste material variaram de dezenas a centenas de micrometros, e o material se mostrou flexível e absorvível. Os autores observaram também que as células migravam a partir dos fragmentos ósseos na matriz, o que sugeriu que o material é bioativo. Em um de seus estudos, Wagner-Ecker³⁷ constatou que o colágeno tem capacidade de neoformação óssea. Porém essa propriedade é favorecida quando adicionamos à matriz compósitos como beta-tricalcio-fosfato e hidroxiapatita.

Não há conhecimento de relatos de trabalhos científicos semelhantes ao trabalho apresentado. Uma limitação dos estudos nessa área se refere à fabricação da membrana de PCL, sua confecção requer equipamentos e materiais específicos e um alto investimento financeiro, além do conhecimento e empirismo dos pesquisadores. Por outro lado, as pesquisas na área de biomateriais vêm recebendo cada vez mais investimentos através dos anos e grandes expectativas são depositadas no aprimoramento desses enxertos na busca de minimizar a incidência de defeitos ósseos de qualquer natureza.

6 CONCLUSÃO

A membrana de colágeno porcino e a membrana PCL são materiais biocompatíveis e auxiliaram a regeneração óssea guiada de defeitos críticos em calvária de ratos, porém, a primeira apresentou maior área de tecido ósseo neoformado.

REFERÊNCIAS

- 1 - BUSER, D. **20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry**. 2ht. ed. Chicago: Quintessence, 2010.

- 2 - NOVAES JR, A.B.; NOVAES, A.B.; VILLAVICENCIO, B.J.J.; MULLER, E.; JULIA PULIDO, E.; BUSTAMANTI, A. **Supportive periodontal therapy in South America. A retrospective multi-practice study on compliance**. Journal of Periodontology, v. 70, n. 3, p. 301- 306, 1999.

- 3 - BÖSTMAN, O.M. **Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants**. J Bone Joint Surg Br, v. 73, p. 679-682, 1991.

- 4 - GÓES, A.M.; ORÉFICE, R.L.; BRETAS, R.S.B.; RIBEIRO NETO, W.A.; PEREIRA, I.H.L.; AYRES, E. C.; PAULA, A.C.C.; AVEROUS, L. **Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth. Electrospinning, characterization and cell viability**. Polymer Degradation and Stability, v. 97, p. 2037e2051, 2012.

- 5 - SHOICHET, M.S. **Polymer scaffolds for biomaterials applications**. Macromol, v. 43, p. 581e91, 2010.

- 6 - NAIR, L.S.; Laurencin, C.T. **Biodegradable polymers as biomaterials**. Prog Polym Sci v. 32, p. 762e98, 2007.

- 7 - BELGACEM, M.N.; GANDINI A.; editors. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Ltd, p. 434, 2008.

- 8 - LEE, P.; TRAN, K.; CHANG, W.; SHELKE,N.B; NB; KUMBAR,S.G.; YU, X. **Influence of chondroitin sulfate and hyaluronic acid presence in nanofibers and its alignment on the bone marrow stromal cells: cartilage regeneration**. J. Biomed. Nanotechnol., v.10, n. 8, p. 1469-1479, 2014.

- 9 - FU, W.; LIU, Z.; FENG, B.; HU, R.; HE, X.; WANG, H.; YIN, M.; HUANG, H.; ZHANG, H.; WANG, W. **Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering**. *Int. J. Nanomedicine.*, v. 44, n. 9 , p. 2335-2344, 2014.

- 10 - GISHTO, A.; FARREL, K.; KOTHAPALLI, C.R. **Tuning composition, and architecture of biomimetic scaffolds for enhanced matrix synthesis by murine cardiomyocytes**. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 103, n. 2, p. 693–708, 2014.

- 11 - LOU, T.; LEUNG, M.; WANG, X.; CHANG, J.Y.; TSAO, C.T.; SHAM, J.G.; EDMONSON, D.; ZHANG, M. **Bi-layer scaffold of chitosan/PCL-nanofibrous mat and PLLA-microporous disc for skin tissue engineering**. *J. Biomed. Nanotechnol.*, v. 10, n. 6, p. 1105-1113, 2014.

- 12 - AURAS, R.; LIM, L.; SELKE, S.E.M.; TSUJI, H.; editors. **Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing and application**. Hoboken, New Jersey: Wiley and Sons, p. 171, 2010.

- 13 - KIM, J.H.; CHOUNG, P.; KIM, I.Y.; LIM, K.T.; SON, H.M.; CHOUNG, Y.; et al. **Electrospun nanofibers composed of poly(ϵ -caprolactone) and polyethylenimine for tissue engineering applications**. *Mater Sci Eng C*, v. 29, p. 1725e31, 2009.

- 14 - BAE, G.Y.; JANG, J.; JEONG, Y.G.; LYOO, W.S.; MIN, B.G. **Superhydrophobic PLA fabrics prepared by UV photo-grafting of hydrophobic silica particles possessing vinyl groups**. *J Colloid Interface Sci* v. 344, n. 2, p. 584e7, 2010.

- 15 - LI, D.; FREY, M.W.; BAEUMNER, A.J. **Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies**. *J Memb Sci*, v. 279, p. 354e63, 2006.

- 16 - YOSHIOKA, T.; KAMADA, F.; KAWAZOE, N.; TATEISHI, T.; CHEN, G. **Structural changes and biodegradation of PLLA, PCL and PLGA sponges during in vitro incubation**. *Polym Eng Sci*, v. 50, n. 10, p. 1895e903, 2010.

- 17 – LI, D.; FREY, M.W.; BAEUMNER, A.J. **Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies**. J. Memb. Sci., v. 279, p. 354-363, 2006.

- 18 – CHO, S.J.; SANG-MYUNG-JUNG, S.M.; KANG, M.; SHIN, H.S.; YOUK, J.H. **Preparation of hydrophilic PCL nanofiber scaffolds via electrospinning of PCL/PVP-bPCL block copolymers for enhanced cell biocompatibility**. Polymer, v. 69, p. 95-102, 2015.

- 19 – DONG, C.M.; GUO, Y.Z.; QIU, K.Y.; GU, Z.W.; FENG, X.D. **In vitro degradation and controlled release behavior of d,l-PLGA50 and PCL-b-d,l-PLGA50 copolymer microspheres**. J. Control. Rel., v. 107, p. 53–64, 2005.

- 20 – CUI, W.; LI, X.; XIE, C.; ZHUANG, H.; ZHOU, S.; WENG, J. **Hydroxyapatite nucleation and growth mechanism on electrospun fibers functionalized with different chemical groups and their combinations**. Biomaterials, v. 31, p. 4620e9, 2010.

- 21 – NIRMALA, R.; NAM, K.T.; PARK, D.K.; WOO-IL, B.; NAVAMATHAVAN, R.; KIM, H.Y. **Structural, thermal, mechanical and bioactivity evaluation of silver-loaded bovine bone hydroxyapatite grafted poly(ϵ - caprolactone) nanofibers via electrospinning**. Surf Coat Technol, v. 205, p. 174e81, 2010.

- 22 – ARMENTANO, I.; DOTTORI, M.; FORTUNATI, E.; MATTIOLI, S.; KENNY, J.M. **Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review**. Polym Deg Stabil, v. 95, p. 2126e46, 2010.

- 23 – WUTTICHAROENMONGKOL, P.; PAVASANT, P.; SUPAPHOL, P. **Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles**. Biomacromolecules, v. 8, p. 2602e10, 2007.

24 – KIM, H.; LEE, H.; KNOWLES, J.C. **Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration.** J Biomater Res Part A, v. 79, p. 643e9, 2006.

25 – JOSE, M.V.; THOMAS, V.; JOHNSON, K.T.; DEAN, D.R.; NYAIRO, E. **Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering.** Acta Biomater, v. 5, p. 305e15, 2009.

26 – VENUGOPAL, J.; LOW, S.; CHOON, A.T.; KUMAR, A.B.; RAMAKRISHNA, S. **Electrospunmodified nanofibrous scaffolds for the mineralization of osteoblast cells.** J Biomed Mater Res Part A, v. 85, p. 408e17, 2008.

27 – GARCÍA-GARETA, E.; COATHUP, M.J.; BLUNN, G.W. **Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration.** Bone, v. 81, p. 112–121, 2015

28 – KULANTHAIVEL, S.; MISHRA, U.; AGARWAL T.; GIRI, S.; PAL, K.; PRAMANIK, K.; BANERJEE, I. **Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion.** Ceram. Inter., v. 41, n. 9, p. 11323-11333, 2015.

29 – CHEN, J.P.; CHANG, Y.S. **Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.** Col. Surf B. Biointerf., v. 86, n. 1, p. 169-175, 2011.

30 – RÓDENAS-ROCHINA, J.; RIBELLES, J.L.; LEBOURG, M. **Comparative study of PCL-Hap and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering.** J. Mater. Sci. Mater. Med., v. 24, n. 5, p. 1293-308, 2013.

31 - MELCHELS, F. P. W.; BARRADAS, A. M. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE BOER, J.; FEIJEN, J.; GRIJPA, D. W. **Effects of the architecture of tissue**

engineering scaffolds on cell seeding and culturing. Acta Biomater., v. 6, p. 4208–4217, 2010.

32 - WU, H.; WAN, Y.; DALAI, S.; ZHANG, R. **Response of rat osteoblasts to polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds.** J. Biomed. Mat. Res. Part A, v. 92, p. 238–245, 2010.

33 – HUTMACHER, D.; KIRSCH, A.; ACKERMANN, K.; HUERZELER, M. **Processing and fabrication of bioresorbable implants and devices e state of the art and future perspectives.** In: STARK, G.B; HORCH R., TANCOS, E., editors. **Processing and fabrication of advanced materials.** Singapore: World Scientific, 1998. p. 1645-1660.

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

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

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

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