



MÔNICA FERESINI GROPPPO

**EFEI TO DE UMA MEMBRANA DE PCL I MPREGNADA COM
HI DROXI APATI TA EM DEFEI TO ÓSSEO I NDUZI DO
NA CALVÁRI A DE RATOS.**

PI RACI CABA

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MÔNICA FERESINI GROPPPO

**EFEITO DE UMA MEMBRANA DE PCL IMPREGNADA COM
HIDROXIAPATITA EM DEFEITO ÓSSEO INDUZIDO
NA CALVÁRIA DE RATOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Buco-Dental, na Área de Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Rossi

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Mônica Feresini Groppo e orientada pela Profa. Dra. Ana Cláudia Rossi.

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

G911e Groppo, Mônica Feresini, 1965-
 Efeito de uma membrana de PCL impregnada com hidroxiapatita em defeito
ósseo induzido na calvária de ratos / Mônica Feresini Groppo. – Piracicaba, SP :
[s.n.], 2014.

 Orientador: Ana Cláudia Rossi.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

 1. Nanofibras. 2. Hidroxiapatita. 3. Modelos animais. I. Rossi, Ana
Cláudia, 1988-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia
de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The effect of a PCL membrane impregnated with hydroxyapatite in bone healing defect induced in rat calvaria

Palavras-chave em inglês:

Nanofibers

Hydroxyapatite

Models, animal

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestra em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Ana Cláudia Rossi [Orientador]

Felippe Bevilacqua Prado

Rogério Heládio Lopes Motta

Data de defesa: 11-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 11 de Agosto de 2014, considerou a candidata MÔNICA FERESINI GROPPPO aprovada.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Ana Cláudia Rossi", written over a horizontal line.

Profa. Dra. ANA CLÁUDIA ROSSI

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Rogério Heládio Lopes Motta", written over a horizontal line.

Prof. Dr. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Felipe Bevilacqua Prado", written over a horizontal line.

Prof. Dr. FELIPPE BEVILACQUA PRADO

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi observar o efeito de uma membrana de nanofibras poliméricas a base de poli-epsilon-caprolactona (PCL), impregnadas ou não com hidroxiapatita (HA), na reparação óssea em defeitos críticos produzidos artificialmente na calvária de ratos. Foram utilizados 36 ratos, divididos aleatoriamente em seis grupos de seis animais. Para a indução do defeito ósseo padronizado foram realizadas duas perfurações, por meio de trefina de 3 mm de diâmetro, na calvária dos animais, uma em cada lado, sendo que o lado direito recebeu os tratamentos (HA ou PCL-HA) e os controles (coágulo ou PCL) foram feitos no lado esquerdo. Decorridos 30, 60 e 90 dias da cirurgia, os animais foram mortos por aprofundamento da anestesia. As cabeças foram submetidas à tomografia, considerando um voxel de 0.12 mm, com campo visual de 06 × 16 cm e tempo de aquisição de 40s. Foram utilizados 120 kV, 8 mA e 36.12 mA/s na aquisição. Os diâmetros dos orifícios foram medidos por meio do software Invesalius 3.0. As cabeças foram fixadas com solução de formol tamponado (pH 7,2) em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, durante 72 horas e submetidas à descalcificação em solução de EDTA a 7% e formol a 5% até verificação de completa descalcificação (aproximadamente 30 dias). Cortes semi-seriados de 7 µm foram corados por Hematoxilina-Eosina e foram observadas as características histológicas do processo de cicatrização óssea nas lâminas nos diferentes tempos do estudo. A comparação quantitativa das medidas dos orifícios obtidas com a tomografia foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis (teste de Dunn como *post hoc*), considerando um nível de significância de 5%. As imagens tomográficas revelaram uma tendência de redução do volume do orifício ao longo do tempo, a qual foi maior em 90 dias para todos os tratamentos. O tratamento com PCL+ HA mostrou menor volume de orifício do que os outros tratamentos independentemente do período. As medidas histológicas mostraram maior formação de osso induzida pela membrana de PCL com ou sem HA do que os outros tratamentos independentemente do período. A HA mostrou maior aumento da cicatrização óssea com ou sem o PCL. Concluímos que a HA adicionada às nanofibras de PCL melhorou significativamente a cicatrização óssea em defeitos provocados na calvária de ratos.

Palavras-Chave: nanofibras poliméricas, poli-epsilon-caprolactona, hidroxiapatita, reparo ósseo, modelo animal.

ABSTRACT

The aim of the present study was to observe the effect of a polymeric-nanofiber membrane of poly-epsilon-caprolactone (PCL) with or without hydroxyapatite (HA) on bone healing of critical defects induced in rat calvaria. 36 animals were randomly divided into six groups. The standardized bone defects were obtained by two perforations with 3.0 mm diameter trephine directly into the animals' calvaria, one in each side. The right side received the treatments (HA or PCL-HA) and the left side the controls (blood clot or PCL). After 30, 60 and 90 days of the surgical procedure, all animals were killed; the head was sectioned and submitted to tomography (voxel of 0.12 mm, visual field of 6x16 cm, acquisition time of 40s, 120 kV, 8mA and 36.12 mA/s). The perforation diameters were measured using the software Invesalius 3.0. After tomography, all heads were fixed by buffered formol (pH= 7.2) in 0.1M sodium-phosphate buffer during 72 hours and submitted to decalcification in 7% EDTA/5% formol solution until complete decalcification (approximately 30 days). Semi-serial 7 µm cuts were stained with Hematoxylin-Eosin. Histological characteristics of bone healing were observed according to groups and periods. Quantitative comparisons of perforation measurements from both tomography and histological analysis were performed by Kruskal-Wallis (Dunn *post hoc*) test with a 5% significance level. Tomography images revealed a tendency to reduce the perforation volume along time, which was higher at 90 days for all treatments. The treatment with PCL+ HA showed the lower volumes of perforations than the other treatments irrespectively of the period. Histological measurements showed more osseous formation induced by treatment with PCL with or without HA than the other treatments irrespectively of the period. HA appear to increase bone healing with or without PCL. We concluded that HA added to PCL nanofibers significantly improved the bone healing in bone defects of rat calvaria.

Key words: polymeric nanofibers, poly-epsilon-caprolactone, hydroxyapatite, bone healing, animal model.

SUMÁRIO

Tópico	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Reparação óssea	3
2.2 Utilização de enxertos ósseos	6
2.2.1 Enxertos autógenos	7
2.2.2 Enxertos ósseos alógenos	10
2.2.3 Enxertos ósseos sintéticos	12
2.2.3.1 Membranas nanoméricas	15
3. PROPOSIÇÃO	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Amostra	20
4.2 Preparação da HA	21
4.3 Preparação da biomembrana	22
4.4 Procedimento cirúrgico	24
4.5 Escaneamento e processamento das imagens	25
4.6 Análise tridimensional do volume ósseo	26
4.7 Processamento histológico	27
4.8 Análise histomorfométrica	28
4.9 Forma de análise dos resultados	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Análise tridimensional do volume ósseo	30
5.2 Histologia – Análise qualitativa	32
5.3 Histologia - Análise quantitativa	34
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO 1	47

Dedicatória

Dedico a este trabalho aos meus pais, Ottilio (*in memoriam*) e Guiomar que sempre acompanharam todos os momentos da minha vida.

À minha família: meu esposo Francisco, meus filhos Francisco, Rafael (*in memoriam*) e Sofia. Meu amor incondicional.

Aos meus irmãos: Maria Amélia, Carlos Norberto e Roberta, que estiveram sempre presentes.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Ana Cláudia Rossi que me auxiliou na elaboração deste trabalho, sempre demonstrando conhecimento e segurança nas orientações transmitidas.

Ao Prof. Dr. Paulo H. F. Caria, meu primeiro orientador que propiciou meu retorno aos estudos e que, com competência, transmitiu conhecimentos importantes auxiliando no meu crescimento profissional.

À Alexandre Rodrigues Freire, colega de pós-graduação, que auxiliou em diversas fases do trabalho, transmitindo principalmente seus conhecimentos em reconstrução tridimensional e medição das tomografias, sem medir esforços e com extrema competência.

À Maria Aparecida Varela, amiga e técnica do laboratório de histologia, sempre solícita e persistente, que me orientou e transmitiu seus conhecimentos em técnicas de histologia, para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Rosário Elida Suman Bretas do Laboratório de Eletrofiação do DEMa-UFSCar por ceder as membranas de PCL utilizadas nesse estudo.

Ao doutorando Wilson Alves Ribeiro Neto do Laboratório de Eletrofiação do DEMa-UFSCar que produziu as membranas e colaborou em diversas fases, inclusive na obtenção das imagens em MEV.

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto da Área de Radiologia da FOP-UNICAMP pelas imagens tomográficas e por ceder o uso do tomógrafo.

Ao Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto do Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA-ESALQ-USP de Piracicaba, por permitir a esterilização das membranas utilizadas nesse estudo.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do seu magnífico reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), na pessoa do seu digníssimo diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

À coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Prof^a. Dr^a. Renata C. Matheus R. Garcia.

Ao Prof. Dr. Paulo H. F. Caria, Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz Duarte Gavião, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP, os quais foram responsáveis por essa etapa importante da minha formação.

À Sr^a. Érica Alessandra Sinhoreti, à Sr^a. Raquel Quintana Sachi e à Sr^a. Roberta Clares Morales dos Santos, secretárias da Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pela solicitude e presteza de seus serviços.

À Eliene Narvaes, amiga e técnica de laboratório, pelas orientações fornecidas.

À todos os funcionários do Departamento de Morfologia pela colaboração.

À todos os colegas de Pós Graduação, por todos os momentos que passamos juntos.

À Srt^a. Suzete Neder secretária do Departamento de Morfologia, pela solicitude e presteza de seus serviços.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos não convencionais

PCL - poli-epsilon-caprolactona

PCL-HA - membrana de nanocompósitos poliméricos eletrofiados biodegradáveis adicionados de hidroxiapatita

HA, HAp ou OHAp - Hidroxiapatita

DEMa-UFSCar – Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF-beta - fator de transformação de crescimento

VEGF - fator de crescimento endotelial

PEO - óxido de polietileno

PLLA - poli-L-ácido láctico

PEG - poli-etileno-glicol

PLGA - poli-D,L-ácido láctico-co-glicólico

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

PBAT – Poli-butilileno adipato-co-tereftalato

MMT - argila montmorilonita sódica

CEEA - Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP

CEMIB-UNICAMP – Centro de Bioterismo da UNICAMP

NPB - nanocomposito polimérico biodegradável

CENA-ESALQ-USP - Centro de Energia Nuclear na Agricultura

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

FDA – Food and Drug Administration ou Administração de Alimentos e Drogas dos EUA

kGy – quilograys – unidade de radiação

1. INTRODUÇÃO

Com a expansão biotecnológica, as descobertas científicas devem ser exploradas em possíveis aplicações na área da saúde. Dentre estas, os biomateriais vêm ganhando grande destaque. Um biomaterial pode ser entendido como um material que ao entrar em contato com o sistema biológico humano ou animal possa avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou, ainda, uma determinada função do organismo (Oliveira, 2004).

Segundo Jones (2001), o biomaterial ideal deveria apresentar as seguintes características:

- a) ser biocompatível;
- b) não ser tóxico (há exceções) ou carcinogênico;
- c) ser quimicamente projetado para suas funções;
- d) apresentar estabilidade mecânica adequada ao seu uso;
- e) apresentar peso e densidade adequados;
- f) apresentar custo baixo, ser reproduzível e de ampla fabricação;
- g) estimular reações biológicas favoráveis em relação a sua função;
- h) apresentar longevidade ou ser absorvível;
- i) se necessário, liberar íons.

Dentre os biomateriais mais pesquisados, aqueles que podem servir como suporte para o desenvolvimento ou crescimento ósseo têm se destacado. Como características desejáveis a um candidato a substituinte ósseo podem ser citadas a

promoção da reparação óssea por ação osteocondutora ou osteoindutora, a facilidade de sua utilização, a eficiência no preenchimento dos espaços vazios, o auxílio na recomposição ou regeneração do tecido ósseo e um custo aceitável. Na osteocondução, o biomaterial deve funcionar como um suporte para as células osteoprogenitoras facilitando dessa maneira o crescimento das células ósseas em sua direção. Na osteoindução há a necessidade de diferenciação celular através de proteínas osteoindutoras após a colocação do biomaterial no local (Fardin et al., 2010).

A hidroxiapatita sintética (HA) e seus derivados estão entre os materiais mais testados como estimulantes do crescimento ósseo ou como substituintes deste tipo de tecido. 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 (Caria et al., 1999), embora não apresente boas propriedades de osteoindução (Franco et al., 2001).

Na tentativa de melhorar as propriedades da HA, vários estudos têm sido conduzidos, observando as propriedades da adição de colágeno (Huang et al., 2009); poli-hidroxibutirato (Carlo et al., 2009); quitosana (Pramanik et al., 2009) e lipossomas (Franco et al., 2001). Nanofibras de nanocompositos associados ou não à HA têm sido produzidas por vários laboratórios no Brasil. O presente estudo avaliou as propriedades biológicas junto à reparação óssea de duas dessas nanofibras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reparação óssea

O tecido ósseo tem várias características que lhe permitem uma grande capacidade tanto de regeneração como de reparação, sendo que a ocorrência de cicatrizes conjuntivas não ocorre na maioria dos casos. O tamanho da lesão óssea pode ser decisivo para a não regeneração completa do tecido ósseo e, consequentemente, levar a deformidades permanentes (Fardin et al., 2010).

A cicatrização óssea é uma das cascatas de eventos mais complexas do organismo e visa a reparação da fratura do osso. Vários tipos de células e vias de sinalização levam a alterações no perfil bioquímico e fisiológico da área afetada (Rahn, 1987).

O reparo ósseo pode ocorrer por processo primário (ou direto) ou secundário (ou indireto), sendo que a maioria das fraturas cicatriza indiretamente num processo dividido em vários estágios, como mostra a Figura 1 (adaptada de Pountos et al., 2012). O processo indireto inicia imediatamente após a fratura com a interrupção do suprimento sanguíneo local, hipóxia e a formação do hematoma. Citocinas e fatores de crescimento são liberados tanto local quanto sistemicamente e induzem efeitos osteogênicos e mitogênicos em células osteoprogenitoras (Dimitriou et al., 2005).

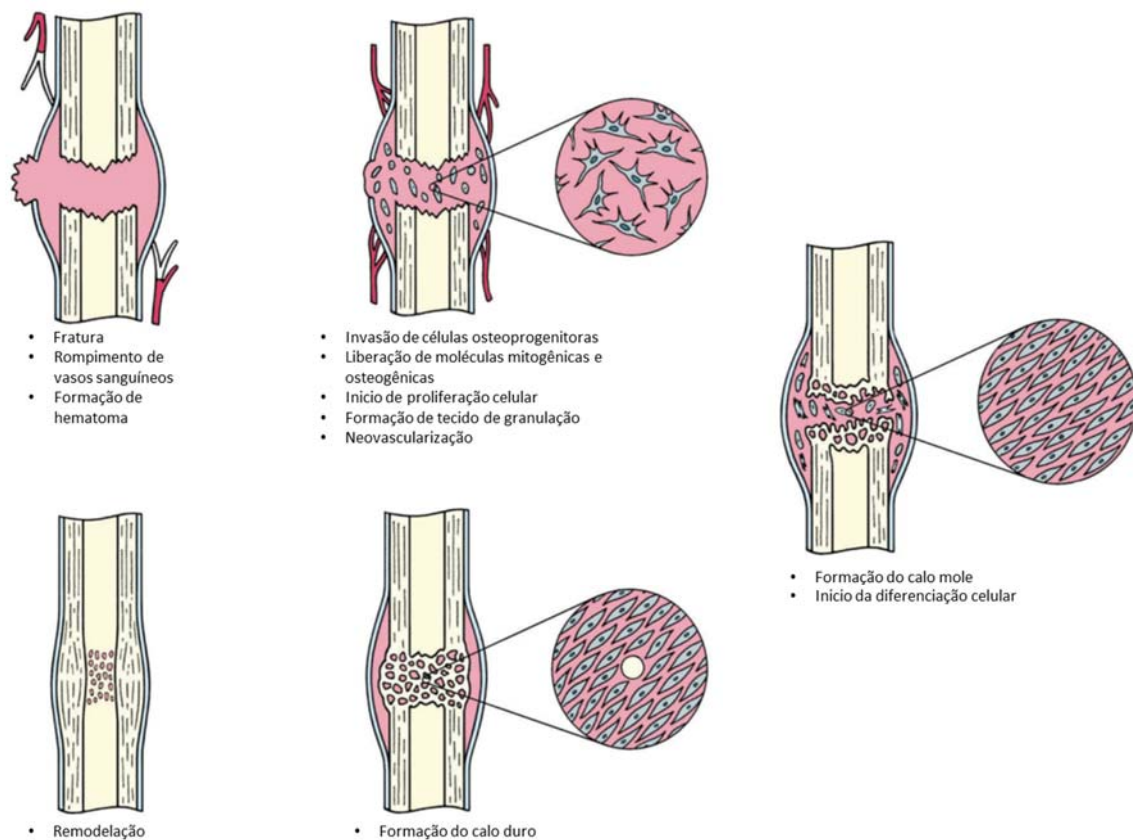


Figura 1. Cascata de cicatrização óssea (adaptada de Pountos et al., 2012).

A formação de novos vasos sanguíneos, em associação com a produção de fatores de crescimento e prostaglandinas, promove a diferenciação de células tronco mesenquimais em linhagens condrogênicas ou osteogênicas, formando inicialmente osso imaturo e, com o tempo, um calo duro (Radi & Khan, 2005).

A finalização do processo ocorre após um extenso período de remodelação caracterizado pela reabsorção e nova formação óssea, resultando na restauração da força mecânica e estabilidade (Cruess & Dumont, 1975; Pountos et al., 2012).

A cicatrização óssea pode ser afetada por diversos fatores locais e sistêmicos em graus variados, incluindo vazios no traço da fratura, fragmentação, distúrbios no fluxo sanguíneo, dano no tecido mole de suporte, estabilidade mecânica insuficiente, pouca nutrição aos tecidos, idade, fumo, utilização de vários fármacos (esteroides, quimioterápicos, etc.), entre outros (Yamaji et al., 2001).

Do ponto de vista ortopédico, o tratamento para fraturas e falhas ósseas visa estimular a capacidade regenerativa do osso. Infelizmente, a condição de cicatrização espontânea nem sempre é a ideal, como já mencionado anteriormente. Durante anos, o homem tem reconhecido a importância da imobilização da fratura, mas, mesmo com as técnicas modernas de fixação, ocorrem infecções, problemas com vascularização e perda substancial de tecido ósseo ou mole. Os enxertos ósseos, substitutos ósseos e fatores bioativos são utilizados para facilitar e aumentar o processo de cicatrização quando as condições para que isso ocorra não são adequadas (Roberts & Rosenbaum, 2012).

O procedimento padrão para fraturas mais sérias, defeitos ou em pacientes muito idosos tem sido a cirurgia invasiva, visando alinhar e estabilizar o osso usando pinos metálicos, parafusos e placas. Entretanto, estes procedimentos causam aumento do período de cicatrização e muitas vezes requerem múltiplas cirurgias (Holzwarth & Ma, 2011).

2.2 Utilização de enxertos ósseos

A utilização de enxertos ósseos tem se tornado um procedimento comum e, dentre os procedimentos de transplante de tecido, perdem em frequência apenas para as transfusões sanguíneas. São amplamente utilizados em ortopedia, odontologia e cirurgias craniofaciais (Frohbergh et al., 2012). Estima-se que, anualmente, milhões de pacientes necessitem de enxertos ósseos. Os enxertos ou substitutos ósseos mais utilizados são os autógenos (provenientes do próprio doador), alógenos (oriundos de outras espécies, como bovino, por exemplo), homólogos (provenientes de banco de ossos humanos) e sintéticos (Wang et al., 2002; Xia et al., 2013).

Embora o transplante ósseo autógeno ainda seja o padrão ouro em relação ao reparo ósseo e os alógenos se mantenham como alternativa, ambos têm muitos problemas inerentes aos seus respectivos modelos, como a disponibilidade limitada, efeitos indesejáveis no local da retirada do osso e risco de transmissão de doenças transmitidos pelo doador, entre outros. Estes desafios têm limitado a sua aplicação clínica (De Long, 2007; Yuan et al., 2010; Xia et al., 2013).

Assim, o desenvolvimento de materiais sintéticos, tais como membranas biológicas, vidros bioativos e derivados da hidroxiapatita, surgiu basicamente da necessidade em evitar a morbidade dos procedimentos cirúrgicos e repor o osso autógeno com substitutos que apresentassem suas propriedades (Fardin et al., 2010).

A principal classificação dos materiais destinados para enxerto ósseo se relaciona a sua integração com o tecido ósseo pré-existente, sendo classificados como osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Enquanto os primeiros são entendidos como materiais orgânicos que estimulam a formação do osso pelos osteoblastos, os segundos induziriam os osteoblastos e condroblastos a partir da diferenciação das células mesenquimais, levando ao aumento da formação óssea no local. Geralmente inorgânicos, os osteocondutores seriam aqueles que serviriam de base para a formação de novo osso na sua superfície, necessitando, obviamente, de tecido ósseo no local, permitindo desenvolvimento de novas células a partir daquelas existentes nesse tecido (Masters, 1988; Fardin et al., 2010).

Segundo Jones (2001) e Fardin et al., (2010) os materiais destinados para enxerto ósseo deveriam como principais características desejáveis a promoção de osteogênese, osteoindução ou osteocondução de forma separada ou conjunta; a ausência de uma resposta imunológica exagerada ou inaceitável do hospedeiro; uma rápida revascularização; e sua rápida substituição por osso do hospedeiro em quantidade e qualidade ideais.

2.2.1 Enxertos autógenos

A enxertia óssea autógena é o processo no qual o osso é colhido de um sítio e transplantado em outro no mesmo paciente. Este enxerto tem completa histocompatibilidade e tem potencial osteoindutivo, osteocondutivo e osteogênico.

Entretanto, tem algumas limitações importantes como dor, inflamação ou infecção no sítio doador, perda sanguínea em procedimentos maiores e tempo operatório aumentado, além de apresentar uma limitação de estoque, particularmente em crianças (Khan et al., 2005).

Existem dois tipos básicos de enxertos autógenos, aqueles com osso esponjoso e os constituídos de osso cortical. Os primeiros são mais comumente usados e têm alta concentração de osteoblastos e osteócitos, permitindo maior potencial osteogênico. Além disso, sua grande área trabecular estimula a revascularização e a incorporação no sítio receptor. A incorporação deste tipo de enxerto tem sido muito estudada e é caracterizada pela formação de novo osso sobre um leito necrótico por um processo duplo de reabsorção e substituição. Um hematoma local se forma após o transplante do osso esponjoso autólogo, o qual é rico em células inflamatórias e agentes mitogênicos quimiotáticos, sob baixa tensão de oxigênio. Este quadro leva ao recrutamento de células tronco mesenquimais, as quais por sua vez produzem tecido de granulação fibroso, tipicamente após 48 horas da injúria (Oakes et al., 2006). Macrófagos também são recrutados e o tecido necrótico é lentamente removido, juntamente a um processo de revascularização (Khan et al., 2005).

A seguir o enxerto é incorporado, sendo que osteoblastos se alinham na periferia das trabéculas mortas e produzem uma matriz orgânica não mineralizada, chamada de osteóide, a qual se forma antes da maturação óssea. Durante essa fase,

o novo osso é então formado num processo que dura entre seis a 12 meses após a enxertia (Oakes et al., 2006).

O osso cortical tem uma integridade estrutural excelente, mas tem limitada quantidade de osteoblastos, osteócitos e outras células progenitoras, limitando suas propriedades osteogênicas e osteoindutivas. Além disso, existem evidências que a maior parte dos osteócitos presentes morrem após o transplante, piorando ainda mais o seu potencial osteogênico (Bae & Waters, 2006).

Devido a sua densidade, a revascularização a partir do osso cortical é comprometida. De uma forma geral, a incorporação desse tipo de enxerto é mais lenta que aquela do osso esponjoso e é mediada predominantemente por osteoclastos e não por osteoblastos. Esse processo é chamado de “creeping substitution” (substituição gradual), ou seja, a lenta e quase completa reabsorção do enxerto com deposição simultânea de osso novo e viável. Esta substituição é tão lenta que pode demorar muitos anos para se completar e, embora o osso necrótico perca até 75% da sua força durante o período de reabsorção, a cicatrização finaliza com mínima perda residual da força óssea (Khan et al., 2005).

A obtenção de enxertos ósseos vascularizados requer a preservação dos seus vasos nutrientes, metafisários e/ou vasos adicionais que os perfundem. Como são anastomosados, ambos artérias e veias são transferidos para o sítio receptor. Além disso, os osteócitos e outras células osteoprogenitoras são preservadas e o enxerto é incorporado por cicatrização primária ou secundária e não por substituição gradual

(Hak, 2007). Isto pode aumentar o potencial osteogênico como um todo e prevenir a perda da resistência óssea observada em outros modelos. Os enxertos vascularizados mais utilizados são o suporte da fíbula, crista do íliaco e parede distal do rádio (Bae & Waters, 2006).

2.2.2 Enxertos ósseos alógenos

São enxertos obtidos de cadáveres humanos, processados, esterilizados e transplantados em pacientes. Podem ser obtidos nas formas osteocondral, cortical, esponjoso ou em derivados altamente processados, tais como a matriz de osso desmineralizado. Dependendo do processo de preparação, estes enxertos exibem potencial osteocondutivo e osteoindutivo. Na maioria das vezes, não incluem células viáveis e, portanto, não são osteogênicos (Bae & Waters, 2006). Estima-se que mais de 200 mil casos utilizando estes enxertos são realizados anualmente nos EUA (Khan et al., 2005).

A ausência de dor no sítio doador, as boas taxas de sucesso e o tempo diminuído de cirurgia têm contribuído para tornar este tipo de enxerto mais popular do que os autógenos. Entretanto, os altos custos e os riscos inerentes, como a transmissão de vírus (rara), contribuem para sua contraindicação. A preparação dos enxertos alógenos envolve a remoção dos tecidos moles e células utilizando etanol, seguido de esterilização por irradiação gama. Entretanto, esta radiação pode, de forma dose-dependente, afetar as propriedades biológicas e a integridade estrutural

do enxerto, alterando suas propriedades osteocondutivas e osteogênicas, além da ruptura da cadeia de polipeptídios e da radiólise da água (Roberts & Rosenbaum, 2012).

Os enxertos alógenos de osso esponjoso são produzidos na forma de pequenos cubos ou “croutons” e, tal como seu similar autógeno, conferem pequena resistência mecânica com pouca promoção de cicatrização secundária, sendo enxertos osteocondutivos. A reação inflamatória local direciona a incorporação, levando à produção de uma camada fibrosa que encapsula o enxerto. Esse tecido fibroso dificulta a deposição de osteóide e osso, retardando muito ou até prevenindo sua completa osteointegração (McKee, 2006).

Os enxertos alógenos provenientes de osso cortical permitem um suporte estrutural rígido, rapidamente instalado e que podem ser utilizados em conjunto com outras técnicas. Podem ser utilizados para preencher grandes defeitos e permitem até suporte para carga imediata, mesmo antes da sua incorporação completa. São empregados comumente em procedimentos na espinha, pois sua resistência a forças compressivas permite sua utilização em áreas que requeiram resistência imediata. Também induzem a fenômenos inflamatórios no local, mas após os estágios iniciais, a cicatrização é mais significativa do que aquela verificada com o enxerto cortical autógeno, sendo a substituição gradual o processo chave da sua incorporação (Khan et al., 2005).

A matriz óssea desmineralizada (MOD) é fácil de ser obtida e é uma forma muito popular de enxerto ósseo, compreendendo cerca de 50% de todos os procedimentos nos EUA. É utilizada para fusão de ossos na espinha, em falhas na união óssea e no preenchimento de defeitos. É uma forma de enxerto altamente processada, sendo constituída por colágeno, proteínas não-colagenogênicas, BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas) e outros fatores de crescimento, os quais lhe garantem propriedades osteocondutivas e osteoindutivas melhores do que os outros enxertos alopáticos. A osteoindução estimula a cicatrização pela diferenciação de osteoblastos a partir de células tronco mesenquimais. Entretanto, foi verificado que a propriedade de osteoindução é grandemente afetada pela técnica de seu preparo. Técnicas que utilizam álcool, ácidos acético, láctico e nítrico têm mostrado efeito negativo e a maior parte da MOD comercializada hoje é lavada com ácido hidrocloreídrico (Roberts & Rosenbaum, 2012).

2.2.3 Enxertos ósseos sintéticos

Substitutos ósseos sintéticos baseados em sais de cálcio são alternativas para ambos os tipos enxertos autógeno e alógeno, pois são facilmente disponíveis, apresentam baixo custo e ausência dos riscos característicos aos enxertos usuais. Entretanto, como são estritamente osteocondutivos, seu papel biológico na cicatrização de fraturas é limitado. Estes substitutos vêm em formas variadas, incluindo pós, “massa”, pellets ou ainda cobrindo a superfície de implantes

metálicos. Podem ser misturados com outros aditivos tais como antibióticos, tornando-os atrativos para o tratamento local de infecções associadas a defeitos ósseos. Alguns estudos estão em andamento visando testar a eficácia da adição de colágeno, fatores de crescimento e até mesmo células tronco mesenquimais nestes enxertos sintéticos (McKee, 2006).

O sulfato de cálcio é relativamente barato e amplamente disponível comercialmente em formas desde pellets duros até fluídos viscosos que endurecem em contato com tecido vivo. Este tipo de substituto sintético é mais rapidamente reabsorvido que os outros tipos. A reabsorção ocorre entre um e três meses, a qual é uma taxa mais rápida do que a taxa de deposição óssea (Hak, 2007).

Os vários sais de fosfato de cálcio (mono-, di-, tri- e tetra-cálcio fosfato, além da hidroxiapatita nas suas formas alfa e beta-cristalina) compõe a família dos organofosfatos de cálcio. A hidroxiapatita, conhecida pelas abreviações HA, HAp ou OHAp, tem fórmula química linear $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e é o mineral que corresponde a cerca de 50% do peso do osso. A maior parte dos compostos desses tipos de sal, são comercializados na forma de mistura dos seus vários tipos. Estes compostos têm características que os tornam atraentes para muitas aplicações, tais como sua lenta biodegradação, sua grande resistência à compressão e sua capacidade de osteointegração (Bohner, 2010).

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 (Caria et al, 1999).

A biocompatibilidade da HA com o osso é devida a similaridade da estrutura cristalina da primeira com o segundo. Embora muito utilizada, a HA não apresenta boas propriedades de osteoindução, sendo considerada um bom material osteocondutor (Franco et al, 2001).

Estudos experimentais da aplicação da HA granular, em tecidos moles ou tecido ósseo, tem demonstrado pouca ou nenhuma resposta inflamatória, deposição de tecido conjuntivo fibroso e neoformação óssea ao redor das partículas (Caria et al, 1999). Embora biocompatível, a HA pode causar uma reação inflamatória branda ao seu redor, particularmente nos períodos mais recentes após sua implantação (Heikkilla et al, 1993). Borges (1998) mostrou que a reação tipo corpo estranho (células gigantes principalmente) pode ocorrer após a implantação da HA.

Na tentativa de melhorar as propriedades da HA, vários estudos têm sido conduzidos, observando as propriedades da adição de colágeno (Huang et al, 2009); poli-hidroxibutirato (Carlo et al, 2009); quitosana (Pramanik et al, 2009) e lipossomas (Franco et al, 2001). Estes últimos autores compararam, em cães, a HA pura, a HA associada ao colágeno e a HA associada a lipossomas (98,7% de HA e 1,3% de lipossoma) em defeitos provocados na tíbia dos animais. A HA associada ao lipossoma mostrou melhor reparação óssea.

2.2.3.1 Membranas nanoméricas

O uso combinado das técnicas de *electrospray* e *spinning* permitiu a criação de uma técnica versátil chamada *electrospinning* ou eletrofiação em giro. Um campo elétrico muito alto é aplicado ao gotejamento de um fluido num primeiro eletrodo, o que leva à deformação da gota e à ejeção de um jato carregado em direção ao segundo eletrodo, formando fibras de forma contínua. Estas fibras podem ter a espessura de poucos nanômetros com grande área superficial, de excelentes propriedades mecânicas, de fácil obtenção e de muita utilidade em várias aplicações. A aplicação na área biomédica é uma das mais importantes visando a obtenção de filtros, material de proteção, material elétrico, óptico, sensores, etc. (Agarwal et al., 2008).

Uma grande variedade de polímeros naturais e sintéticos tem sido submetidos transformados em nanofibras, sendo os sintéticos mais fáceis de serem obtidos, refletindo na maior disponibilidade desse tipo de polímero (Huang et al., 2004).

Os polímeros naturais são muitas vezes misturados com os sintéticos ou com sais para aumentar a viscosidade ou consistência da solução durante o *electrospinning* (Buttafoco et al., 2006). A eletrofiação de fibras compostas por alginato e quitosana, por exemplo, recebeu a adição de óxido de polietileno (PEO) para aumentar as ligações das cadeias e diminuir a condutividade da solução carregada com polissacarídeos (Jeong et al., 2011). Outros polímeros naturais incluem as gelatinas e colágenos, o qual é eletrofiado com diâmetros de 100 nm e

tem propriedades estruturais similares ao colágeno biológico (Matthews et al., 2002).

Os polímeros sintéticos incluem a poli-epsilon-caprolactona (PCL), poli-l-ácido láctico (PLLA), poliuretana, copolímeros de poli-etileno-glicol (PEG) e poli-d,l-ácido láctico-co-glicólico (PLGA) entre outros. Adicionalmente, fibras compostas podem ser criadas, tais como nanofibras de quitosana-poli-vinil-alcool, seda, PEO e com nanopartículas de hidroxiapatita (Dahlin et al., 2011).

O Laboratório de Eletrofição do DEMa-UFSCar tem produzido nanofibras de nanocompósitos (Pedido de patente, INPI/SP, n. PI0703280-3). A Figura 2 (adaptada de Ribeiro-Neto, 2009) mostra uma micrografia das mantas das nanofibras obtidas pelo método de intercalação no estado fundido e uma micrografia das nanofibras de PBAT/MMT. Jose et al. (2009) mostraram a viabilidade de produção de suportes para crescimento celular feitos de nanofibras de nanocompósitos de poli-D,L-lactato-co-glicolato (PLGA) com nano-hidroxiapatita (nano-HA) em diferentes concentrações.

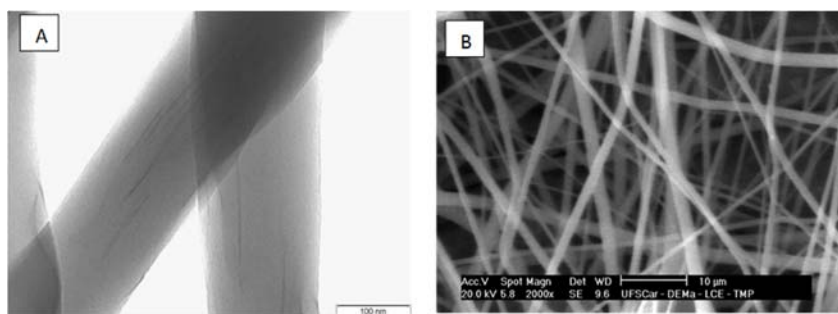


Figura 2. Nanofibras de nanocompósitos de; a) PA66 com MMT; b) PBAT/MMT. Adaptado de Ribeiro-Neto, 2009.

Travis et al. (2008) e Agarwal et al. (2008) observaram que o processo de fabricação, além de outros parâmetros, tais como a orientação e a porosidade da fibra são essenciais para aumentar a adesão celular, a liberação de fármacos e propriedades de transferência de massa. Além da biocompatibilidade e biodegradabilidade, a arquitetura das fibras também seria importante para a adesão celular. A Figura 3 (adaptada de Ribeiro-Neto, 2009) mostra exemplos desses suportes. Dependendo da morfologia do suporte (microporoso, microfibrado ou nanofibrado) as células crescem de forma diferente.

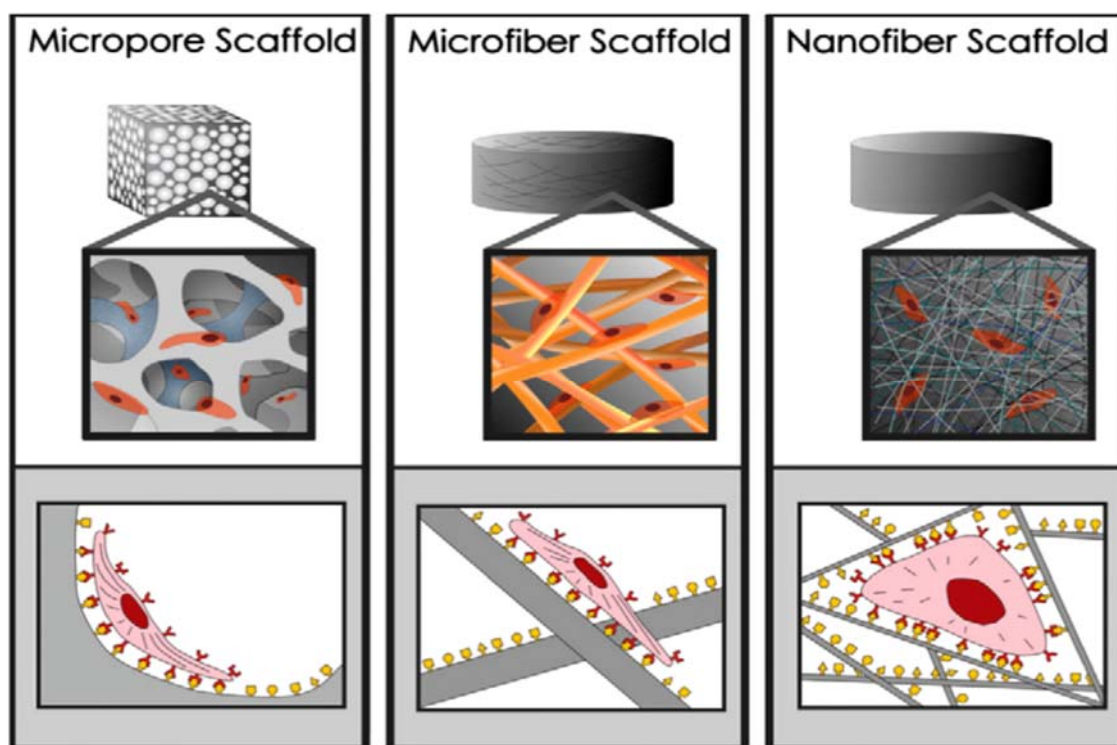


Figura 3. Suportes para crescimento celular com arquiteturas diferentes (adaptado de Ribeiro-Neto, 2009 e Agarwal et al., 2008).

Estudos recentes mostram que membranas baseadas em matriz de policaprolactona (PCL), associadas ou não a diferentes substâncias, podem dar um suporte eficiente para o desenvolvimento celular permitindo a regeneração de cartilagens (Lee et al., 2014), tecido vascular (Fu et al., 2014), tecido cardíaco (Gishto et al., 2014), pele (Lou et al., 2014), olho (Sharma et al., 2014), tecido nervoso (Li et al., 2014), entre outros.

Indubitavelmente, a maior parte dos estudos sobre estas membranas se referem à sua utilização como suporte para a formação de tecido ósseo (Dahlin et al., 2011). Membranas de PCL com diâmetro entre 20 nm a 5 µm mostraram *in vitro* a capacidade em permitir a mineralização e diferenciação de células tronco mesenquimais (Yoshimoto et al., 2003), sendo que estruturas baseadas em fibras de 370 nm contribuíram, além do suporte para as células e mineralização, com altos níveis de fosfatase alcalina e maior produção de osteocalcina e osteopontina (Ruckh et al., 2010).

A efetividade *in vivo* das nanofibras poliméricas contendo células tronco mesenquimais foi avaliada após quatro semanas da sua implantação na membrana peritoneal de ratos. As células se diferenciaram e infiltraram o suporte de fibras, produzindo matriz extra-celular, colágeno tipo I e mineralização (Shin et al., 2004).

Na tentativa de melhorar as propriedades das nanofibras, algumas contendo fatores osteoindutivos também foram criadas. Estas fibras contêm HA, colágeno, quitosanas, entre outros (Dahlin et al., 2011).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de uma membrana de nanofibras poliméricas a base de poli-epsilon-caprolactona (PCL), impregnadas ou não com hidroxiapatita sintética, na reparação óssea em defeitos induzidos na calvária de ratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP sob protocolo número 2149-1 (Anexo 1).

4.1 Amostra

Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos, machos, pesando 200-250g, provenientes do CEMIB-UNICAMP, mantidos em gaiolas coletivas (4 animais/caixa), com temperatura em $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo de luz controlado (12/12 h) e acesso à água e ração *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos (n=6), compreendendo animais que foram submetidos aos tratamentos e que foram mortos depois de 30, 60 e 90 dias, como mostra o Quadro 1 e a Figura 4. Para a indução do defeito ósseo padronizado foram realizadas duas perfurações na calvária dos animais, uma em cada lado, evitando-se a linha de sutura (Figura 6).

Para fins de padronização, o lado direito da calvária recebeu os tratamentos (HA ou PCL-HA) e o lado esquerdo (coágulo ou PCL), em cada animal.

Quadro 1. Distribuição dos ratos nos grupos.

GRUPO 1 (n= 18)			GRUPO 2 (n= 18)		
Período (dias)	Defeito ósseo direito	Defeito ósseo esquerdo	Período (dias)	Defeito ósseo direito	Defeito ósseo esquerdo
30 (n= 6)	HA	Coágulo	30 (n= 6)	PCL-HA*	PCL**
60 (n= 6)	HA	Coágulo	60 (n= 6)	PCL-HA	PCL
90 (n= 6)	HA	Coágulo	90 (n= 6)	PCL-HA	PCL

PCL-HA*: membrana de nanocompósitos poliméricos eletrofiados biodegradáveis adicionados de hidroxiapatita. PCL**: membrana de nanocompósitos poliméricos eletrofiados biodegradáveis.

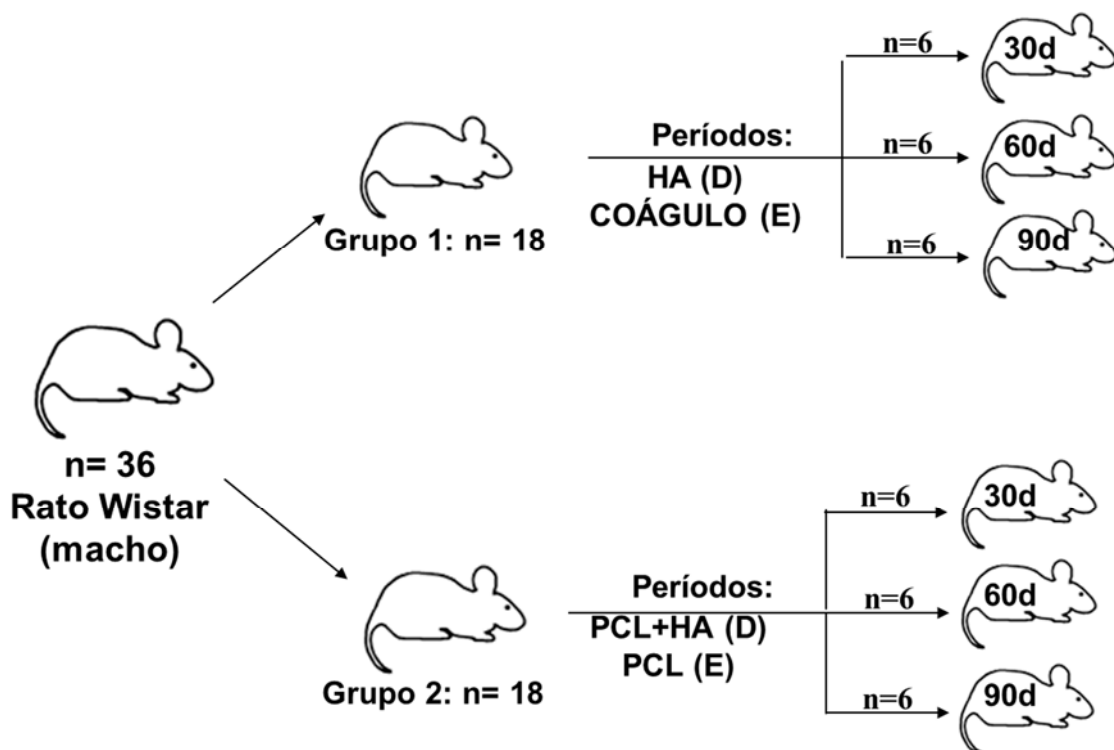
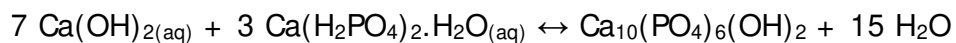


Figura 4. Distribuição dos ratos nos grupos.

4.2 Preparação da HA

A síntese da HA foi realizada no laboratório de Farmacologia da FOP-UNICAMP. O ensaio foi realizado em condições ambientais (temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para a obtenção de 10 g de HA, de acordo com a técnica previamente descrita por Oliveira (2004). Basicamente, a obtenção se baseia na seguinte equação:



A técnica de obtenção consistiu na pesagem de 5,16 g de hidróxido de cálcio, ao qual foi lentamente adicionado 250 mL de água destilada e deionizada, sob

agitação magnética vigorosa durante 10 minutos. Outra solução de fosfato de cálcio monobásico hidratado foi obtida pela pesagem de 7,53 g de fosfato de cálcio monobásico hidratado, adicionado de 250 mL de água destilada e deionizada também sob agitação magnética vigorosa por 10 minutos.

A suspensão de hidróxido de cálcio foi então diluída com a solução de fosfato de cálcio, derramando a suspensão lentamente, sob agitação magnética vigorosa por uma hora. Decorrido este período, a suspensão resultante foi mantida em repouso por 24 horas para decantar. O sobrenadante foi descartado e a suspensão final foi filtrada a vácuo. A pasta retida no filtro foi lavada por três vezes com água deionizada para remoção de íons não reagidos. Esta foi retirada com espátulas metálicas e foi seca em estufa à temperatura de 110°C por 24 horas. O material resultante foi moído até a obtenção de um pó fino.

4.3 Preparação da Biomembrana

A eletrofiação do nanocomposito polimérico biodegradável (NPB) a base de poli-epsilon-caprolactona (PCL) foi feita no Laboratório de Eletrofiação do DEMa-UFSCar. A eletrofiação do NPB foi feita a partir dos filmes soprados de nanocompósitos poliméricos, formando assim estruturas compósitas de camadas alternadas de filmes/mantas de nanofibras/filmes/mantas de nanofibras.

A orientação uniaxial das nanofibras foi aumentada com a utilização de um coletor especial que gira a altas velocidades de rotação (até ~ 2000 rpm). Assim, as

mantas não-tecidas de ambos os nanocompósitos orientadas uniaxialmente foram eletrofiadas e alternadas com mantas não-tecidas orientadas uniaxialmente na direção perpendicular à primeira manta não-tecida, formando uma malha orientada biaxialmente. Após a obtenção das fibras, estas foram impregnadas com hidroxiapatita por meio de contato com suspensões supersaturadas de HA, sob agitação constante.

As membranas foram esterilizadas por radiação gama no laboratório Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA-ESALQ-USP de Piracicaba.

A Figura 5 mostra a distribuição das tramas das nanofibras considerando as membranas PCL (A) e PCL-HA (B) em dois aumentos por MEV.

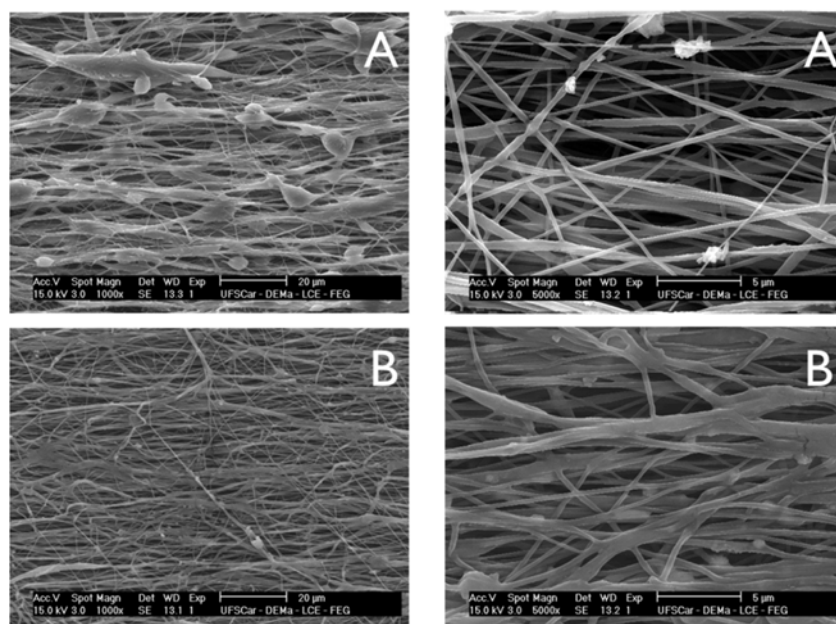


Figura 5. Imagens obtidas por MEV das membranas PCL (A) e PCL-HA (B), em aumentos de 1000 vezes (esquerda) e 5000 vezes (direita).

4.4 Procedimento cirúrgico

A perfuração da calvária foi realizada obedecendo à seguinte sequência a qual foi adaptada de Silva (2009) como mostra a Figura 6:

- 1 – Anestesia utilizando uma solução de quetamina (40-87 mg/kg) e relaxante muscular xilasina (5-13 mg/kg), por via intraperitoneal;
- 2 – Tricotomia da região cranial e antissepsia com solução de álcool iodado a 2%;
- 3 – Incisão de aproximadamente 1 cm, perpendicularmente à coluna vertebral, na derme do crânio com lâmina de bisturi nº 10;
- 4 – Divulsão do tecido subcutâneo com tesoura de ponta romba;
- 5 – Após a exposição dos ossos da calvária, os defeitos ósseos foram obtidos utilizando-se uma trefina de 3 mm de diâmetro (Dentoflex- São Paulo-SP, Brasil) a 500 rpm e irrigação abundante com soro fisiológico à 0,9%;
- 6 – As corticais ósseas obtidas foram removidas com auxílio de cureta;
- 7 – No grupo 1, o defeito ósseo foi então preenchido com a formulação de HA no lado direito, sendo que o lado contralateral foi preenchido com coágulo. No grupo 2, o defeito do lado direito foi preenchido com PCL-HA e no lado esquerdo preenchido com PCL;
- 5 – A sutura foi realizada no plano muscular com fio tipo Vicryl 5.0 (Somerville, NJ, EUA) e fio de Nylon 5.0 (Techsuture, Bauru, SP, Brasil) na derme.

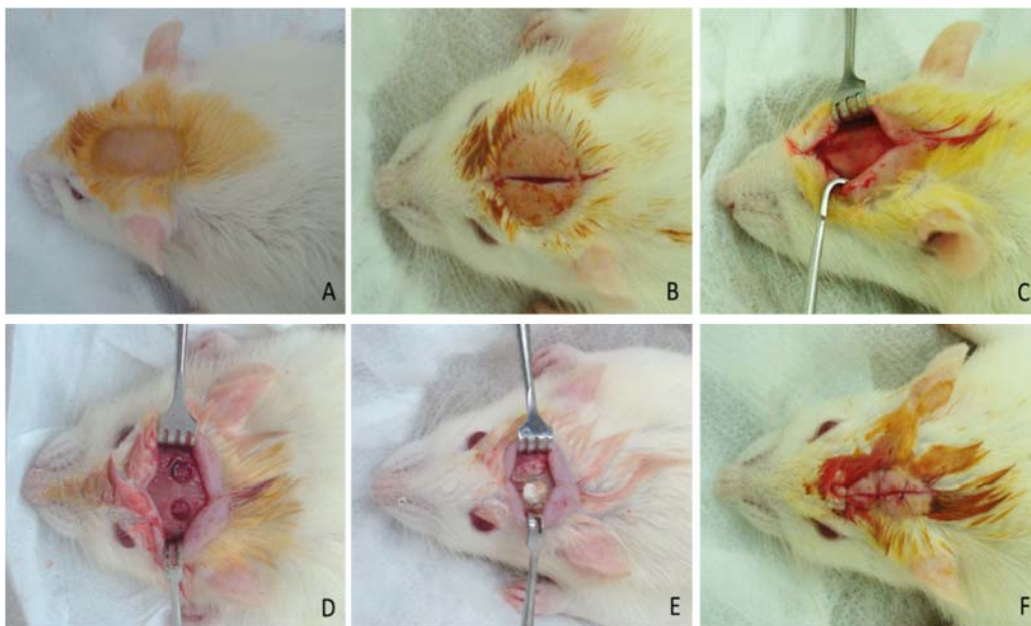


Figura 6. Etapas do procedimento cirúrgico. A – animal anestesiado e tricotomizado. B – Incisão. C – Divulsão e exposição do osso. D – Perfurações. E - Inserção do tratamento. F – Sutura.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais.

Os animais foram mortos nos períodos propostos anteriormente (30, 60 e 90 dias), por dose excessiva do mesmo anestésico utilizado previamente. A cabeça foi desarticulada do corpo e dissecada para retirada em bloco e fixada em solução de formol a 10% e tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), durante 24h a 4°C.

4.5 Escaneamento e processamento das imagens

As imagens (Figura 7) foram obtidas em tomógrafo i-CAT CBCT (Imaging

Sciences International, Inc, Hatfield, PA, USA), considerando um voxel de 0.12 mm, com campo visual de 06 × 16 cm e tempo de aquisição de 40s.

Foram utilizados 120 kV, 8 mA e 36.12 mA/s na aquisição das tomografias. Para diminuir o tempo entre as tomografias, os animais foram agrupados durante a tomada da imagem de acordo com cada grupo.

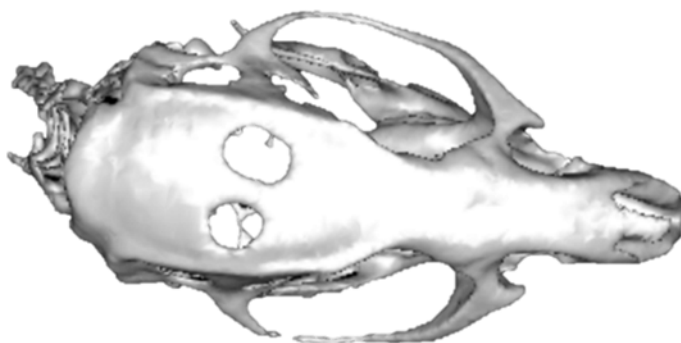


Figura 7. Imagem tridimensional obtida.

4.6 Análise tridimensional do volume ósseo

O conjunto tridimensional (Figura 8A) de imagens contíguas seccionais de cada tomografia foi apresentado em uma escala de cinza, na qual cada valor da escala correspondeu a um valor de intensidade do voxel expresso em unidades *Hounsfield* (HU em inglês) no software InVesalius 3.0 (Centro de Tecnologia da Informação – CTI- Campinas, SP, Brasil). No software realizou-se a marcação do espaço interno (orifício) do defeito ósseo (Figura 8B). A partir da marcação deste espaço foi calculado seu volume (Figura 8C) em mm³, correspondendo ao volume de não formação óssea. Assim, o menor volume do espaço interno correspondeu à

maior formação óssea em relação ao defeito inicial.

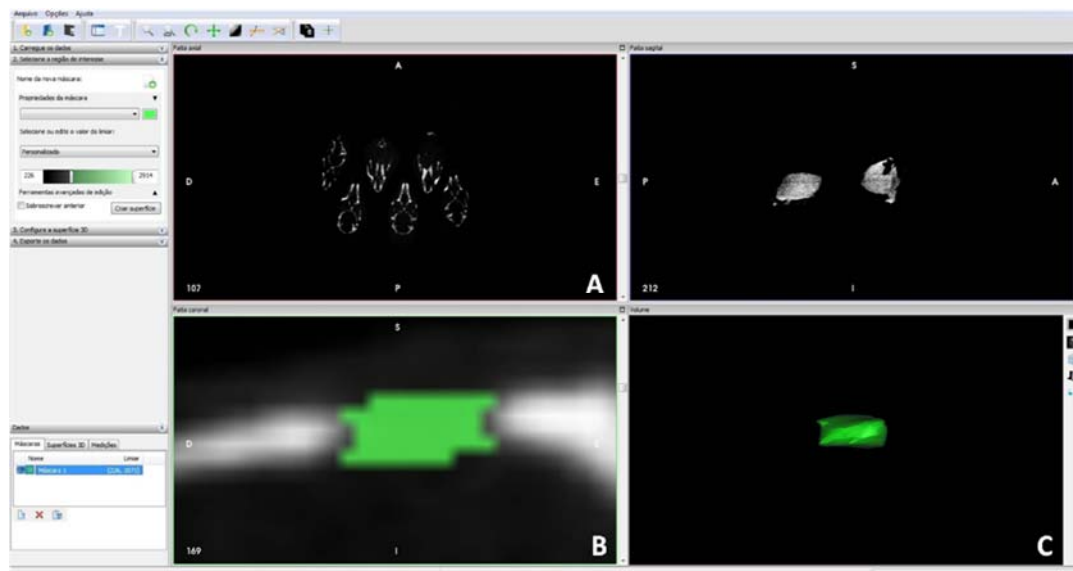


Figura 8. Exemplo de marcação do espaço interno do defeito ósseo no software InVesalius 3.0 (grupo PCL-HA, 30 dias). A) Reconstrução do conjunto tridimensional da amostra – vista axial; B) Marcação (em verde) do espaço interno do defeito ósseo – vista coronal; C) Aspecto tridimensional do espaço interno marcado.

4.7 Processamento histológico

As cabeças foram submetidas à descalcificação em solução de EDTA a 7% e formol a 5% até verificação de completa descalcificação (aproximadamente 30 dias). Após este procedimento, a peça foi delimitada através de uma lâmina, seccionando-se o material excedente.

As peças removidas foram lavadas em água destilada, desidratadas em etanol a 70%, 95% e 100%, diafanizadas em xilol, embebida e incluídas em parafilme (Paraplast®) a 65°C, em sentido longitudinal.

Nos blocos obtidos foram efetuados cortes semi-seriados em micrótomo

manual (Leica, RM 2145) com de 7 micrometros de espessura, os quais foram corados com hematoxilina e eosina (HE) por método de rotina.

Para a aquisição de imagens das lâminas histológicas, foi utilizada câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópico (Carl Zeiss – Axiolab) e conectada ao computador. As imagens foram capturadas num aumento de 5x (microscópico Carl Zeiss – Axiolab).

4.8 Análise Histomorfométrica

Foi realizada a análise qualitativa das lâminas avaliando-se as características histológicas do processo de cicatrização óssea nas lâminas nos diferentes tempos. Para a análise quantitativa, as imagens das lâminas histológicas foram transferidas para o software ImageLab2000®. Neste software, realizou-se a mensuração da área, em mm², de neoformação óssea no interior do orifício (Figura 9).

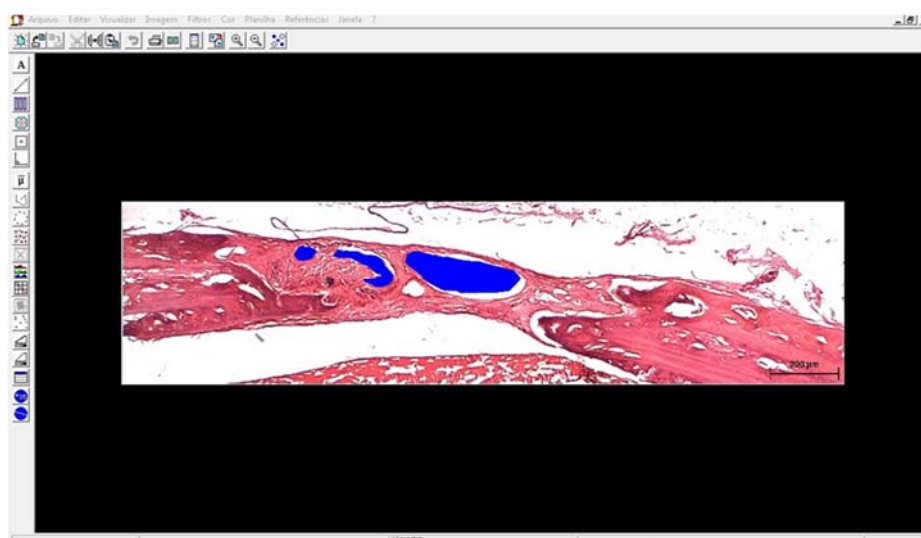


Figura 9. Mensuração da área, em mm², de neoformação óssea no interior do orifício (Software ImageLab2000®).

4.9 Forma de análise dos resultados

A comparação quantitativa das medidas dos orifícios obtidas com a tomografia foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis (teste de Dunn como *post hoc*), considerando um nível de significância de 5%, utilizando o software BioEstat versão 5.0 (Instituto Mamirauá, Belém, PA) e o GraphPad Prims 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

A análise do poder do teste (GraphPad StatMate 2.00, GraphPad Software, San Diego, California USA) mostrou que seis animais permitiram um poder de 90%, considerando o nível de significância (alfa) de 5%, um desvio padrão médio de 10% e diferença entre as médias em torno de 20%.

5.RESULTADOS

5.1 – Análise tridimensional do volume ósseo

A Figura 10 mostra as medidas dos volumes dos orifícios resultantes após os períodos de tempo avaliados, em função dos grupos em estudo.

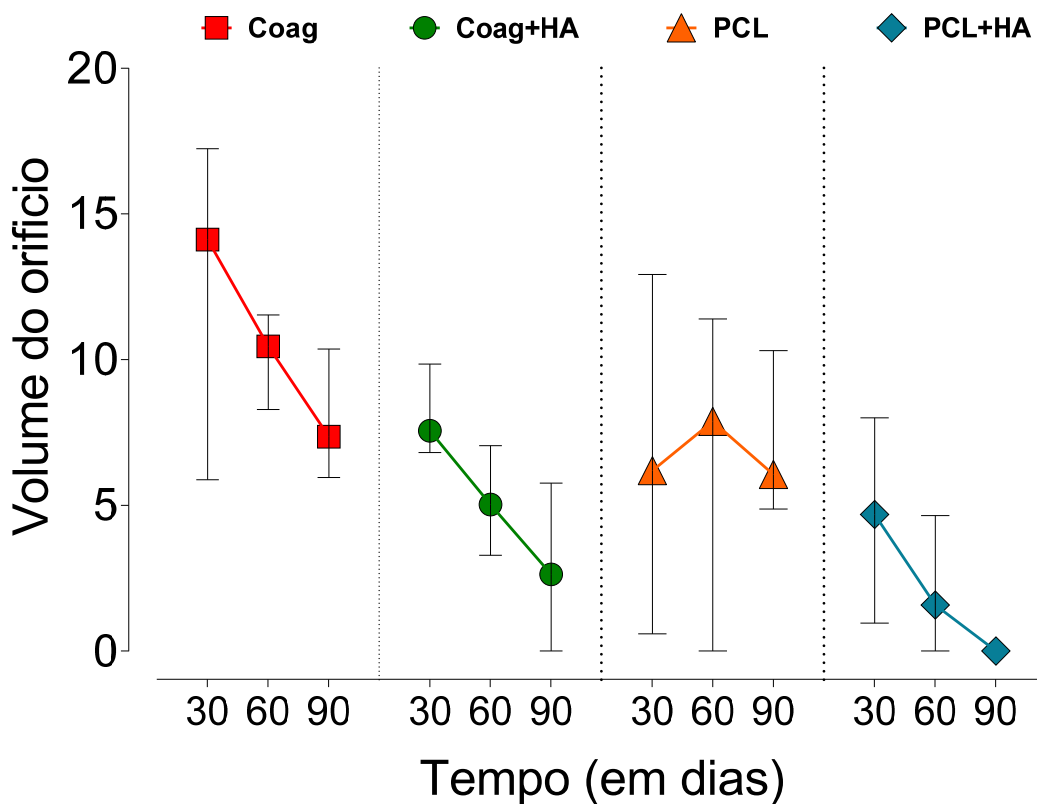


Figura 10. Mediana (desvio interquartílico) do volume do orifício em função dos tempos e dos grupos em estudo.

A análise dos dados revelou que houve diminuição significativa ($p < 0,05$) do volume do orifício no período de 90 dias em relação aos 30 dias para os animais do

grupo 1 (somente coágulo), mas não houve diferenças entre esses períodos e o período de 60 dias.

Para os animais do grupo 1 (coágulo + HA), os períodos de 30 e 60 dias não diferiram entre si, mas ambos apresentaram maior volume de orifício do que os animais no período de 90 dias.

Nos animais do grupo 2 (PCL) não houve diferenças estatisticamente significantes entre os 3 períodos estudados, enquanto que aqueles tratados com PCL+ HA exibiram significativamente menor volume de orifício após 90 dias em relação aos demais períodos de tempo.

No conjunto, esses dados revelam que houve influência significativa do período analisado, havendo tendência em diminuir o volume do orifício e, conseqüentemente, maior cicatrização óssea após 90 dias.

A comparação entre os grupos considerando o mesmo período revelou que, aos 30 dias, os animais do grupo 1 mostraram maior orifício do que os animais do grupo 2, sendo que não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre os animais de um mesmo grupo nesse período.

Após 60 dias, os animais do grupo 1 (somente coágulo) apresentaram maior volume de orifício do que aqueles tratados com PCL+ HA ou com coágulo+ HA, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre aqueles tratados com PCL e com coágulo+ HA. Aqueles tratados com PCL+ HA apresentaram os menores valores nesse período e também após 90 dias. Após 90 dias, não houve diferenças

estatisticamente significantes entre aqueles tratados com coágulo (grupo 1) e com PCL, mas o tratamento com coágulo+ HA gerou menores volumes do que PCL e que o coágulo sozinho.

5.2 Histologia – Análise qualitativa

A cicatrização óssea em cada grupo e período pode ser observada na Figura 11, a qual mostra um exemplo de cada espécime avaliado pela coloração HE. Além disso, a Figura 12 mostra a comparação entre os valores medidos da formação óssea em função dos grupos e períodos.

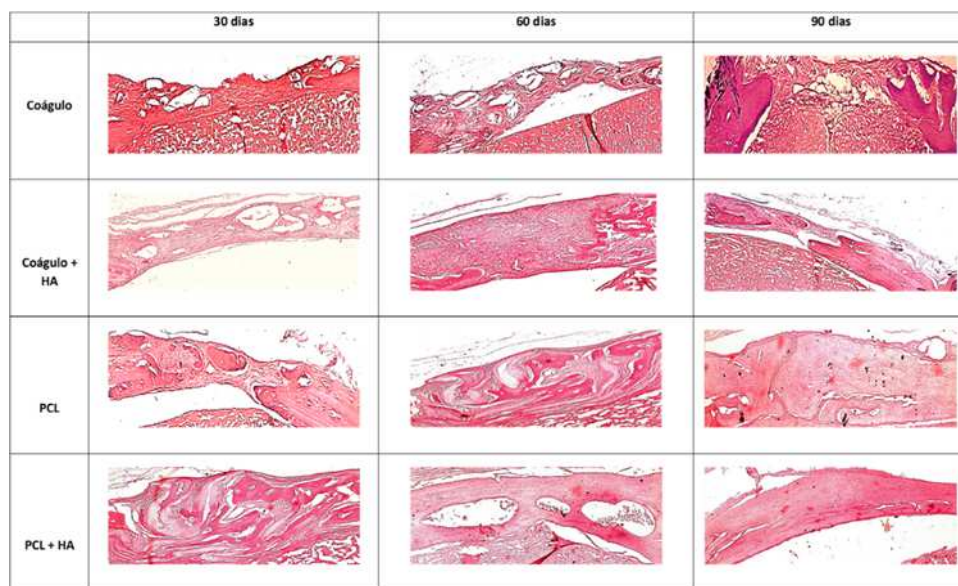


Figura 11. Cicatrização óssea em função dos grupos e períodos (HE, 5x).

A avaliação qualitativa das lâminas histológicas revelou que mesmo em 90 dias não houve completa cicatrização óssea nos animais que não receberam nenhum

tratamento (coágulo). Aqueles que receberam coágulo+ HA também não mostraram formação completa de osso e consequente fechamento do orifício induzido. Entretanto, nesses animais foi possível observar maior formação óssea no interior da massa de coágulo, revelando que a hidroxiapatita pode ter acelerado o processo.

Nos animais submetidos ao tratamento com a membrana de PCL foi possível observar esparsa formação óssea já em 30 dias, sendo nítidas as ilhas ósseas formadas dentro do que seria o arcabouço da membrana, a qual aparece quase que totalmente reabsorvida nesse período. No período de 90 dias, denota-se a completa formação óssea na maioria dos espécimes avaliados, com o fechamento ósseo do orifício completo.

Nos animais tratados com a membrana PCL+ HA foi possível observar, em 30 dias, um quadro de cicatrização óssea similar ao observado nos animais tratados com PCL em 60 dias, o que indica que a HA acelerou o processo de reparo nesse período. Um quadro de cicatrização mais acelerada em relação ao mesmo período com o tratamento com PCL também foi notado para o PCL+ HA em 60 dias. Entretanto, no período de 90 dias, a cicatrização aparece muito similar nos dois tratamentos, indicando completo fechamento do orifício.

5.3 Histologia - Análise quantitativa

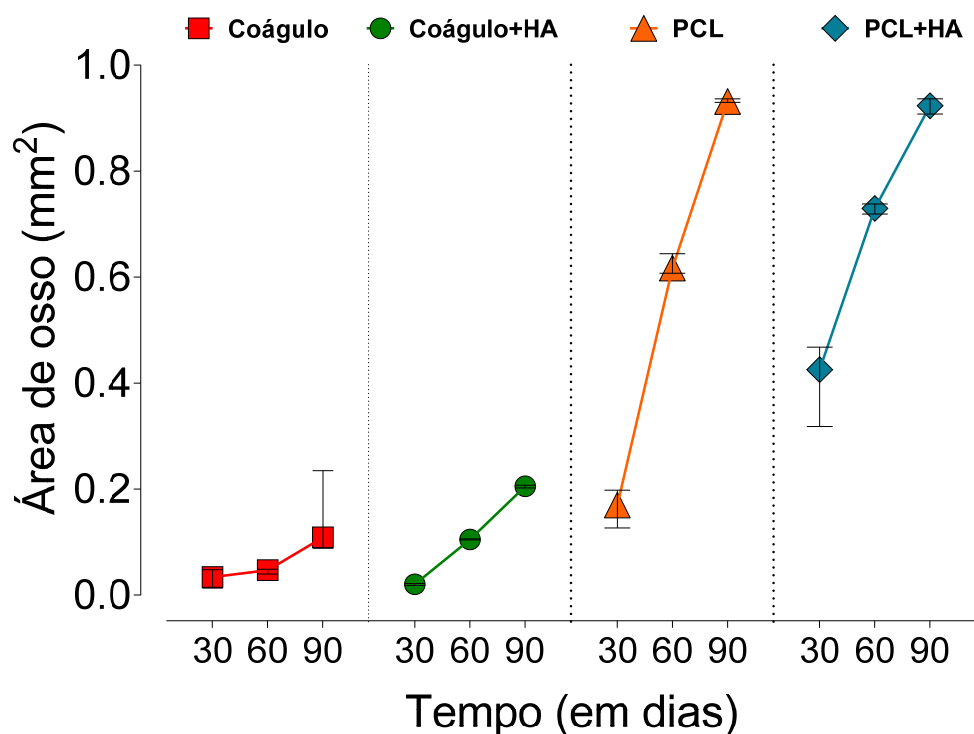


Figura 12. Mediana (desvio interquartil) da superfície de osso (em mm²).

A análise quantitativa dos dados obtidos revelou que em todos os tratamentos houve maior quantidade de osso ($p < 0.05$) nos períodos de 60 dias do que naqueles de 30 dias, sendo que os de 90 dias houve maior formação de osso do que nos antecedentes. A exceção foi para o grupo tratado com coágulo que não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de 30 e 60 dias.

A comparação entre os tratamentos, considerando cada período separadamente, revelou que não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0.05$) entre os valores obtidos com os tratamentos com coágulo e coágulo + HA

em nenhum dos tempos observados. Assim, esses dois tratamentos, do ponto de vista estatístico, podem ser considerados equivalentes.

No período de 30 dias, o tratamento com PCL+ HA mostrou maiores valores ($p=0.0201$) que aqueles obtidos com o PCL sozinho. Nos demais períodos, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p>0.05$) entre esses dois tratamentos.

Em cada um dos períodos foi possível observar que tanto o tratamento com PCL quanto com PLC+ HA mostraram maiores valores ($p<0.05$) que aqueles obtidos com o coágulo adicionado ou não de HA.

6. DISCUSSÃO

A criação de defeitos ósseos na calvaria é conseguida utilizando trefinas dentais contra a superfície do osso da calvária. Nesse modelo, a utilização do coágulo sanguíneo como controle negativo resulta em cerca de 5 a 15% de preenchimento com matriz mineralizada. Além disso, a ausência do coágulo resulta em tecido fibroso fino dentro do defeito, sem osso visível (Spicer et al., 2012). No presente estudo, essas características foram observadas nos animais que receberam apenas o coágulo sanguíneo nos defeitos produzidos.

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. Alguns autores argumentam que o termo “não-cicatrizantes” deveriam substituir o termo “tamanho crítico” (Einhorn, 1999; Cooper et al., 2010; Spicer et al., 2012).

Schimtz et al. (1990) compararam a cicatrização de defeitos ósseos de 3, 4 e 8 mm induzidos na calvária de ratos e observaram melhor cicatrização dos diâmetros menores. Esses autores, entretanto, não removeram ambas as corticais ósseas, mas apenas aquela mais externa. Concluíram que aqueles defeitos menores do que 4 mm de diâmetro poderiam ser considerados como sendo não-críticos, devido à sua cicatrização espontânea.

Entretanto, Silva (2009) mostrou que os defeitos eram bicorticais, mesmo aqueles com 2 mm de diâmetro não mostravam cicatrização satisfatória, evidenciando que a remoção das corticais interna e externa, causava a neoformação óssea nas margens do defeito, de forma similar ao observado em defeito críticos. Da mesma forma, no presente estudo a remoção de ambas as corticais ósseas interna e externa, induziram respostas características de falha na união óssea, mesmo após 90 dias. Assim, é possível que a melhora do perfil de cicatrização observada com os materiais testados possa ser significativa mesmo em fraturas que tenham tendência na não-união completa da ferida.

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 é um poliéster aprovado pelo FDA, não é tóxico para as células e tem várias propriedades desejáveis, tais como ser biodegradável e ter plasticidade (Yu et al., 2009). Essa característica de pouca toxicidade foi comprovada no presente estudo, uma vez que não houve em nos períodos avaliados nenhuma característica histológica que pudesse indicar rejeição do material inserido.

Um aspecto crítico para utilização desses biomateriais é a sua esterilização. No presente estudo, a esterilização por radiação gama foi empregada, uma vez que Di Foggia et al. (2010) mostraram que a utilização desse tipo de radiação em doses

variando entre 10 e 50 kGy induziram apenas pequenas e aceitáveis modificações estruturais nas fibras com base em PCL.

A HA adicionada às nanofibras de PCL melhorou significativamente a cicatrização óssea em defeitos provocados na calvária. Contrariamente, Ródenas-Rochina et al. (2013) 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. Entretanto, os resultados de estudos *in vitro*, como o de Ródenas-Rochina et al. (2013), apresentam resultados contraditórios na literatura.

Yu et al. (2009) observaram *in vitro* que a HA adicionada a arcabouços de PCL melhorou a biocompatibilidade do polímero para osteoblastos e células endoteliais. Causa et al. (2006) mostrou que a HA (entre 20 e 32%) adicionada ao polímero de PCL melhorou significativamente a sua eficácia mecânica e a suas propriedades osteocondutoras. No presente estudo, a melhora e maior rapidez da cicatrização óssea foram evidentes nos grupos contendo a membrana e também com a HA. Os melhores resultados foram observados na combinação de ambas membrana e HA.

Chen & Chang (2011), 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.

Em outros estudos *in vivo*, como o de Chuenjitkuntaworn et al. (2010), os resultados observados foram similares aos do presente estudo. Estes autores observaram que no arcabouço de PCL-HA houve maior expressão de marcadores de diferenciação osteogênica quando em comparação com o arcabouço de PCL, fato confirmado pela maior neoformação de osso em defeitos induzidos em calvaria de camundongos e recobertos pelas membranas.

No presente estudo foi utilizada HA na forma de pó fino para incorporação ao defeito ósseo com coágulo e também para adição ao PCL. Heo et al. (2009) observaram que o PCL adicionado de nanopartículas de HA promoveu melhores respostas teciduais e formação de osso do que a utilização de micropartículas. Assim, o tamanho da partícula de HA adicionada ao polímero é um fator importante para melhorar a cicatrização óssea e futuros estudos deverão ser direcionados para este fator.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo foi possível concluir que:

- 1 – A hidroxiapatita associada à membrana de PCL foi capaz de melhorar a cicatrização óssea;
- 2 – Ambas as membranas de PCL e PCL+ HA atuaram como osteocondutoras;
- 3 – A membrana de PCL+ HA melhorou o perfil de cicatrização óssea no modelo utilizado.

REFERÊNCIAS *

1. Borges APB. O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia, de cães (*Canis familiares*). Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão. Belo Horizonte, 1998. 112p. Tese (Doutorado), Escola de Veterinária da UFMG.
2. Bretas RES, Branciforti MC, Ribeiro dos Santos C. Pedido de patente, INPI/SP, n. PI0703280-3. Processo de obtenção de nanofibras de nanocompósitos esfoliados de poliamida 66 com nanoargila por eletrofiação e nanofibras obtidas. 04/10/2007.
3. Buttafoco L, Kolkman NG, Engbers-Buijtenhuijs P, Poot AA, Dijkstra P, Vermes I, Feijen J. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2006; 27:724-727.
4. Caria PHF, Kawachi EY, Bertran CA, Camilli JA. Biological assessment of porous-implant hydroxyapatite combined with periosteal grafting in maxillary defects. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2007; 65:847-854.
5. Carlo EC, Borges APB, Vargas MIV, Martinez MM, Eleotério RB, Dias AR, Rodrigues MCD. Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli-hidroxibutirato para substituição óssea em coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2009; 61(4):844-852.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o MedLine.

6. Causa F, Netti PA, Ambrosio L, Ciapetti G, Baldini N, Pagani S, Martini D, Giunti A. Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 76(1):151-62.
7. Chen JP, Chang YS. Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011; 86(1):169-75.
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(1):241-51.
9. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg*. 2010; 125(6):1685-92.
10. Dahlin RL, Kasper FK, Mikos AG. Polymeric nanofibers in tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011; 17(5):349-64.
11. Di Foggia M, Corda U, Plescia E, Taddei P, Torreggiani A. Effects of sterilisation by high-energy radiation on biomedical poly-(epsilon-caprolactone)/hydroxyapatite composites. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21(6):1789-97.

12. Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. Clin Orthop Relat Res. 1999; 1999:S59–67.
13. Franco KL, Borges APB, Vilória MIV, Fernandes ES, Fehlberg AF. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2001; 53(4):1-8.
14. 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. 2014; 9:2335-44.
15. Gishto A, Farrell K, Kothapalli CR. Tuning composition, and architecture of biomimetic scaffolds for enhanced matrix synthesis by murine cardiomyocytes. J Biomed Mater Res A. 2014 [no prelo].
16. Heo SJ, Kim SE, Wei J, Kim DH, Hyun YT, Yun HS, Kim HK, Yoon TR, Kim SH, Park SA, Shin JW, Shin JW. In vitro and animal study of novel nano-hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite scaffolds fabricated by layer manufacturing process. Tissue Eng Part A. 2009; 15(5):977-89.
17. Holzwarth JM, Ma PX. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2011; 32(36):9622-9.

18. Huang Z, Tian J, Yu B, Xu Y, Feng Q. A bone-like nano-hydroxyapatite/collagen loaded injectable scaffold. *Biomed. Mater.* 2009; 4(5):055055.
19. Huang Z, Zhang Y, Ramakrishna S, Lim C. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer* 2004; 45:53-61.
20. Jeong SI, Krebs MD, Bonino CA, Samorezov JE, Khan SA, Alsberg E. Electrospun chitosan-alginate nanofibers with in situ polyelectrolyte complexation for use as tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(1-2):59-70.
21. Jones FH. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf. Sci. Reports* 2001; 42(3-5):75-205.
22. Lee P, Tran K, Chang W, Shelke NB, Kumbar SG, 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.* 2014; 10(8):1469-79.
23. Li Y, Ceylan M, Shrestha B, Wang H, Lu QR, Asmatulu R, Yao L. Nanofibers support oligodendrocyte precursor cell growth and function as a neuron-free model for myelination study. *Biomacromolecules.* 2014; 15(1):319-26.
24. Lou T, Leung M, Wang X, Chang JY, Tsao CT, Sham JG, Edmondson D, Zhang M. Bi-layer scaffold of chitosan/PCL-nanofibrous mat and PLLA-microporous disc for skin tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol.* 2014; 10(6):1105-13.

25. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*. 2002; 3(2):232-8.
26. Oliveira M. Síntese e caracterização de biomateriais à base de fosfato de cálcio. Belo Horizonte, 2004. 180p. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Área de concentração em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Minas Gerais.
27. Pramanik N, Mishra D, Banerjee I, KumarMaiti T, Bhargava P, Pramanik P. Chemical synthesis, characterization, and biocompatibility study of hydroxyapatite/chitosan phosphate nanocomposite for bone tissue engineering applications. *Int J Biomater*. 2009; 2009:512417.
28. Ribeiro Neto WA. Estruturas compósitas a base de filmes soprados e nanofibras de nanocompositos poliméricos. Projeto de doutorado – FAPESP 2009/51057-7, 2009.
29. Ródenas-Rochina J, Ribelles JL, Lebourg M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2013; 24(5):1293-308.
30. Ruckh TT, Kumar K, Kipper MJ, Popat KC. Osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells on poly(ϵ -caprolactone) nanofiber scaffolds. *Acta Biomater*. 2010; 6:29-49.
31. Sharma S, Gupta D, Mohanty S, Jassal M, Agrawal AK, Tandon R. Surface-modified electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffold with improved

- optical transparency and bioactivity for damaged ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55(2):899-907.
32. Shin M, Yoshimoto H, Vacanti JP. In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Eng*. 2004; 10:33-43.
33. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012; 7(10):1918-29.
34. Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 24(12):2077-82.
35. Yu H, Wooley PH, Yang SY. Biocompatibility of Poly-epsilon-caprolactone-hydroxyapatite composite on mouse bone marrow-derived osteoblasts and endothelial cells. *J Orthop Surg Res*. 2009; 4:5.

ANEXO 1



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

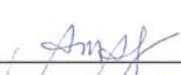
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2149-1, sobre "Efeito da formulação lipossomal e da membrana de nanocomposito polimérico biodegradável impregnadas com hidroxiapatita sintética em defeito ósseo induzido na calvária de ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria / Mônica Feresini Groppo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 03 de maio de 2010.

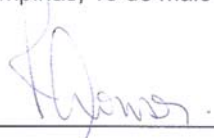
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2149-1, entitled "The effect of a liposomal formulation and a biodegradable nanocomposite polymeric membrane both impregnated with synthetic hydroxyapatite in bone defects induced in rat calvaria", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 3, 2010.

Campinas, 13 de maio de 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>