

FILIFE AUGUSTO DE FARIA FONSECA MACEDO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO  
COMPÓSITO BIOCERÂMICA/POLI( $\epsilon$ -  
CAPROLACTONA) COM ANGIOTENSINA 1-7 E  
AVALIAÇÃO EM CULTURA PRIMÁRIA DE  
OSTEOBLASTOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Clínica Odontológica

**Orientadora: Prof.ª. Dra. Maria Esperanza Cortés**

**Co-orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Santos**

## Dedicatória

Todas as minhas conquistas, eu dedico a minha família, em especial ao meu pai e minha mãe, principais responsáveis pela minha formação.

## Agradecimentos

À minha orientadora professora Maria Esperanza que sempre me apoiou. Terei sempre na memória tudo o que a senhora pode fazer por mim, tanto no lado acadêmico, à medida que me ofereceu o que precisasse para realizar esta pesquisa ou qualquer outra que quisesse realizar, quanto pelo lado pessoal, o qual a senhora sabe o tanto que me ajudou. A senhora foi muito mais que orientadora, foi uma “mãezona”.

Ao meu co-orientador professor Robson Augusto Santos pelo apoio dado para que esta pesquisa se realizasse.

Ao professor Ruben Sinisterra que permitiu que eu utilizasse toda a infra-estrutura do laboratório do departamento de química além de me abrir as portas em inúmeros outros laboratórios.

Ao professor Vagner Santos pelo acompanhamento e sua alegria contagiante.

Ao professor Wander L. Vasconcelos por permitir que fosse realizada a caracterização morfológica dos materiais.

Aos meus outros orientadores de iniciação científica: prof. Anderson José Ferreira, profa. Elizabeth Rodrigues Alfenas e profa. Mara Vasconcelos que também são responsáveis pela minha formação em pesquisa.

À Viviane Gomide por me ensinar a trabalhar com cultivo celular e pela amizade.

Ao meu grande amigo Alfonso Gala-Garcia que nunca mediu esforços para me ajudar.

À Karina Teixeira que sempre me apoiou nas duras tarefas de laboratório.

Ao Eduardo H.N. Martins, principal responsável pela caracterização morfológica dos meus materiais.

A todos os colegas da pós-graduação, em especial Mariana De Luca pelas boas risadas.

Aos amigos de laboratório do Departamento de Química.

Ao Departamento de Química – ICEX UFMG por manter as portas abertas.

Ao apoio financeiro do NANOBIOFAR-INCT-CNPq, FAPEMIG e CAPES.

## Sumário

Lista de figuras.....	7
Lista de fluxograma .....	8
Lista de figuras do artigo .....	9
Lista de tabelas do artigo .....	10
Terminologias e definições .....	11
Lista de Símbolos e Abreviaturas .....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. Introdução.....	15
2. Revisão de Literatura .....	18
2.1. Tecido Ósseo .....	18
2.2. Engenharia de tecido ósseo .....	22
2.3. Arcabouços para Reconstrução Óssea.....	22
2.3.1. Estrutura micro e macroporosa .....	23
2.3.2. Propriedades mecânicas .....	24
2.3.3. Degradação controlada.....	25
2.4. Polímeros utilizados para regeneração óssea .....	25
2.4.1. Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL).....	26
2.5. Biocerâmica.....	27
2.6. Compósitos de Policaprolactona/Biocerâmica (PCL/BC).....	28
2.5. Sistema renina angiotensina e tecido ósseo .....	28
3. Objetivos .....	32
3.1. Objetivos específicos .....	32
4. Hipóteses .....	33
5. Metodologia.....	34
5.1. Preparação dos compósitos.....	34
5.2. Caracterização Morfológica .....	35
5.2.1. Microtomografia Computadorizada .....	35
5.3. Análises <i>in vitro</i> .....	40
5.3.1 Cultura de osteoblastos .....	40
7. Conclusão.....	68
8. Perpesctivas futuras .....	69
9. Referências Bibliográficas .....	70
10. Anexos .....	78



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Seção óssea mostrando as formas: cortical e esponjosa.....	13
<b>Figura 2.</b> Esquema mostrando parte de um Sistema de Havers com dois osteócitos (esquerda). Nas lamelas contíguas do sistema, as fibras colágenas são cortadas segundo diferentes incidências, porque tem diferentes orientações (embora isso não apareça claramente neste diagrama simplificado).....	14
<b>Figura 3.</b> Estrutura química tridimensional da poli-( $\epsilon$ -caprolactona).....	19
<b>Figura 4.</b> Visão atual simplificada do Sistema Renina Angiotensina. ACE- enzima conversora de angiotensina; Ang- angiotensina; AT- receptores para angiotensina II; MAS- receptor para angiotensina-(1-7); NEP- natural endopeptidase; PCP- prolilcarboxipeptidase; PEP- prolilendopeptidase.....	23
<b>Figura 1.</b> Reconstrução de objeto a partir de diversos números de projeções.....	35
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática das etapas de aquisição, reconstrução e geração de imagens e modelos 3D na microtomografia de raios X.....	36
<b>Figura 7.</b> I. Fotografia do microtomógrafo <i>SkyScan 1172</i> ; II. Computador de controle e aquisição de dados ( <i>host</i> ); III. <i>Cluster</i> de computadores.....	37

## **Lista de fluxograma**

<b>Fluxograma 1. Preparação das estruturas porosas.....</b>	<b>28</b>
---	-----------

## Lista de figuras do artigo

**FIGURE 1.** Three dimensional distribution of the ceramic phase in the polymeric matrix (PCL:BCP 1:1). Figure generated from the  $\mu$ -CT data.....48

**FIGURE 2.** Three dimensional distribution of the ceramic phase in the polymeric matrix (PCL:BCP 3:1). Figure generated from the  $\mu$ -CT data.....49

**FIGURE 3.** Percentage of viable cells relative to the culture plate control following 72 h and 7 days' growth on composites (\* represents the significant difference of the composite A compared with A1, B1, and C; + represents the significant difference of the composite B compared with A, B, C, and C1; § represents the significant difference between A1 and C1 during 3 days; \*\* represents the significant difference of the composite A1 compared with all others during 7 days; ++ represents the difference between B1 and C1, and <sup>§§</sup> represents the difference between C and C1). Results represent mean  $\pm$  SD of eight samples from two separate experiments (p<0.001).....51

**FIGURE 4.** Alkaline phosphatase production of osteoblasts after 72h and 7 days of incubation: cells showed no significant difference in presence of the composites (A, B, C and C1) when compared to control cells (\* represents the significant difference of the composite A1 compared with A, B, C1, and Control during 7 days'; + represents the significant difference of the composite B1 compared with A, B, and C1). Results represent mean  $\pm$  SD of eight samples from two separate experiments (p<0.001).....52

## Lista de tabelas do artigo

<b>TABLE I.</b> Weight ratios of components in PCL:BCP scaffolds and correspondent grouping.....	47
<b>TABLE II.</b> Main morphological parameters measured for the analyzed samples.....	50

## Terminologias e definições

**Biocerâmica:** cerâmica para uso biológico.

**Cerâmicas:** Materiais compostos sólidos formados pela aplicação de calor, algumas vezes calor e pressão, constituídos por ao menos um metal (M) e um sólido elementar não-metálico (SENM) ou um não-metal (NM), dois SENM, ou um SENM e NM (BARSOUM, 1997).

**Compósitos:** associação de materiais para uma finalidade comum, buscando otimização de propriedades (LEGEROZ 2008).

**Bioatividade:** capacidade do material de induzir a deposição de cristais de apatita sobre sua superfície (LEGEROZ 2008).

**Bioativo:** refere-se a um material que induz uma resposta biológica específica, sendo o oposto de bioinerte (LEGEROZ 2008).

**Osteocondução:** processo no qual é provido um arcabouço micro e macroscópico para possibilitar a migração de elementos celulares envolvidos na formação óssea (p.e.células mesenquimais, osteoblastos, osteoclastos e vasculatura) (FITCH *et al.*, 1997).

**Osteoindução:** processo de recrutamento de células mesenquimais circundantes que diferenciarão em células formadoras de cartilagem e osso, sob a influência de BMPs (URIST, 1980; STEVENSON, 1999), onde a bioação envolvida é a osteogênese (RIPAMONTI, 1996).

**Osteogênese:** em um senso comum, osteogênese refere-se à formação óssea sem a indicação de origem celular, ou seja, o osso neoformado pode se originar de células vivas do enxerto ou de células derivadas do hospedeiro (STEVENSON, 1999). Uma definição mais estrita e mais comumente utilizada para osteogênese refere-se à formação óssea pelo transplante de células vitais (FITCH *et al.*, 1997).

**Polímeros:** longas cadeias de moléculas que consistem em um número de pequenas unidades repetidas (RATNER *et al.*, 1996).

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

- $\alpha$  - Alpha
- Ang I - Angiotensina I
- Ang II - Angiotensina II
- Ang-(1-7) - Angiotensina 1-7
- Ang-(1-9) - Angiotensina 1-9
- AT1 - Receptor da Angiotensina II do subtipo 1
- AT2 - Receptor da Angiotensina II do subtipo 2
- ACE - Enzima conversora de Angiotensina
- ACE2 - Enzima conversora de Angiotensina 2
- BCP – Cerâmica Bifásica
- g – Grama
- HA - Hidroxiapatita
- L - Litro
- $\mu$ L - Microlitro
- $\mu$ m – Micrometro
- $\mu$ -CT – Microtomografia Computadorizada
- Mas - Receptor da Angiotensina 1-7
- mg - Miligrama
- mL - Mililitro
- mm – Milímetro
- MTT - (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- NEP - Neutral endopeptidase
- PCL - Policaprolactona
- PEP - Prolilendopeptidase
- PLA - Poli-lactide acid
- PLG - Poli glicolide acid
- PLGA - Poly-lactide- glycolide acid
- RAS - Sistema renina-angiotensina
- SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
- TCP – Trifosfato de cálcio

## RESUMO

A estrutura de um biomaterial para regeneração óssea é fator chave para seu sucesso clínico. Não existe um único biomaterial usado para reparo e regeneração óssea capaz de preencher todos os requisitos para um enxerto ósseo ideal. Assim, optou-se por utilizar neste estudo dois biomateriais largamente utilizados na engenharia de tecido ósseo, a policaprolactona (PCL) e cerâmica bifásica (BCP). Neste estudo, compósitos porosos tridimensionais de PCL:BCP (3:1 e 1:1 p:p) foram fabricados utilizando a combinação das técnicas de evaporação do solvente e lavagem de partículas de sal com ou sem a adição de Angiotensina (Ang)-(1-7). Os compósitos de PCL:BCP com alta porosidade e interconectividade obtidos foram analisados usando microtomografia computadorizada ( $\mu$ -CT). A viabilidade dos compósitos com e sem a adição da Ang-(1-7) foram analisados utilizando osteoblastos de cultura primária nos períodos de 3 e 7 dias utilizando o teste de MTT e secreção de Fosfatase Alcalina. Diferenças significativas de todas as variáveis foram testadas através de análises multivariáveis ( $p < 0,05$ ). Demonstrou-se uma estrutura mais uniformemente distribuída quando a razão PCL/BCP foi aumentada. A conectividade dos poros foi mensurada através do índice de fragmentação (FI) demonstrando estruturas desconexas nas amostras analisadas possuindo valores de FI próximos. Quanto maior a razão PCL/BCP, maior a dimensão fractal (FD). Análises *in vitro* utilizando o teste do MTT demonstraram que as amostras contendo ou não Ang-(1-7) possuíram efeitos citotóxico médio e moderado, respectivamente. A análise da atividade de fosfatase alcalina não mostrou diferença entre as amostras no período de 3 dias decrescendo sua atividade nas amostras contendo Ang-(1-7) no período de 7 dias. Dessa forma, utilizando a combinação das técnicas de evaporação do solvente e lavagem do sal, obtiveram-se estruturas porosas tridimensionais, desejável para defeitos ósseos tendo capacidade para sistema de transporte de drogas podendo ser avaliada em futuros testes *in vivo*.

**Palavras chave:** Compósitos, Angiotensina-(1-7), Micro tomografia, Cerâmicas bifásicas, Policaprolactona, Viabilidade *in vitro*.

## **ABSTRACT**

Polycaprolactone (PCL) and biphasic ceramics (BCP) each have many applications as tissue repair materials. In this study, three-dimensional (3D) porous composite scaffolds of PCL: BCP (in 3:1 and 1:1 weight ratios) were fabricated using solvent casting and particulate leaching method with or without Angiotensin-(1-7). PCL:BCP scaffolds with high porosity and interconnected 3D pores were obtained and were analyzed using micro-computed tomography (micro-CT). The biocompatibilities of PCL:BCP with or without Ang-(1-7) were investigated during 3 and 7 days using MTT test and Alkaline Phosphatase Activity. Significant differences of all variables were tested by multivariate analysis ( $p < 0.05$ ). The results showed a structure with more finely distribution within the sample when the PCL/BCP weight ratios were increased. The connectivity of pores was measured between fragmentation index (FI), and we noted that both analyzed samples present disconnected structures, with close values of FI. The higher is PCL/BCP weight ratios leads to higher fractal dimension (FD). The *in vitro* tests using MTT showed that the constructs with and without Ang-(1-7) showed mild and moderate cytotoxic effects respectively. The Alkaline Phosphatase Activity showed no differences on the constructs with 3 days and only has decreasing activity on the constructs containing Ang-(1-7) on the 7 day. Thus, using solvent casting and particule leaching method we obtained 3D porous composites which have suitable shapes for bone defects having potential for drug delivery system and can be used in future *in vivo* tests.

**KEY WORDS: Composites, Angiotensin-(1-7), Micro tomography, Biphasic Ceramics, Polycaprolactone, *In vitro* Viability.**

## 1. Introdução

Enxertos ósseos têm sido usados para recuperar defeitos causados por doenças ou traumas, como fraturas, infecções e tumores (KIM et al., 2006). Como padrão ouro, existe o enxerto autógeno na qual o tecido é removido do sítio doador do próprio paciente e é transplantado. Como vantagens, possui mínimos problemas éticos e imunológicos. Mas, existem importantes limitações como disponibilidade limitada, segundo local com morbidade e algumas vezes comprometimento da biomecânica local (KIM et al., 2006). Pode-se substituir o autógeno por osso homólogo de cadáver humano. Entretanto, disponibilidade, requerimentos de drogas de imunossupressão, risco de rejeição e de transmissão de doenças e preocupações éticas e religiosas são limitações deste tipo de enxerto (HENCH, 1998; JONES, EHRENFRIED E HENCH, 2006). Existe a possibilidade de utilizar enxerto de outras espécies, vivas ou não vivas e são chamadas de heterogênos ou xenógenos, mas os resultados clínicos são inferiores aos anteriormente citados (HENCH, 1998).

Para suprir a necessidade de uma área com crescente demanda, observa-se grande avanço na engenharia de tecido ósseo no desenvolvimento de materiais biodegradáveis como substitutos de enxertos ósseos (KIM et al., 2006, PORTER et al., 2009). Estes materiais devem manter adequadas propriedades mecânicas, serem osteocondutivos e degradarem de forma controlada permitindo nova formação óssea. Adicionalmente, estes substitutos podem atuar como veículos para liberação controlada de fármacos (XUE et al., 2009).

A reprodução da arquitetura óssea porosa, com uma matriz orgânica e constituintes minerais parece ser o modelo ideal para utilização prática dos biomateriais (enxertos aloplásticos), por possuírem propriedades osteocondutoras (NÄRHI et al., 2003; COOMBES et al., 2004; KIM, KNOWLES, KIM, 2004).

As razões para o desenvolvimento de biomateriais baseados em fosfato de cálcio (CaP) são sua similaridade em composição com a fase mineral do osso e algumas propriedades ósseas similares como biodegradação, bioatividade e osteocondução (LEGEROS 2008, CAO & KUBOYAMA, 2010). Entretanto, apesar destas desejáveis

propriedades, estes biomateriais possuem pobres propriedades mecânicas, não sendo indicados para áreas com grande carga (LEGEROS 2008).

A utilização de polímeros na engenharia óssea tem sido utilizada extensivamente (LAM et al., 2008; GE et al., 2008), sendo a poli-(ε-caprolactona) (PCL) um dos polímeros mais indicados para esta aplicação (PORTER et al., 2009, CHUENJITKUNTOWORN et al., 2010).

Os polímeros absorvíveis têm sido utilizados como sistema de liberação lenta e controlada de fármacos. A incorporação de fatores estimuladores de crescimento ósseo e diferenciação de células mesenquimatosas em células osteoprogenitoras e osteoblastos podem incrementar a matriz com a capacidade osteoindutora (COOMBES et al., 2004; KIM et al., 2006; KHAN, KATTI, LAURENCIN, 2004; SINHA et al., 2004; TADDEI et al., 2006).

Com crescente interesse na inibição do Sistema Renina Angiotensina (RAS) no contexto do sistema cardiovascular foi descoberto há mais de 30 anos a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (SEMPLE et al. 1976; SEMPLE & MORTON 1976), que tem demonstrado neutralizar os efeitos causados pela Ang(II) (SANTOS et al., 2000). Estudos clínicos recentes têm demonstrado uma possível ligação entre drogas betabloqueadoras e antihipertensivas diminuindo o risco de fraturas (SCHLIENGER et al., 2004; LYNN et al., 2004; REID et al., 2005). Estudos *in vitro* utilizando osteoblastos e osteoclastos têm demonstrado a presença de receptores para a Angiotensina (Ang) II que é o principal efetor do RAS e principal alvo de ação de inibição das drogas antihipertensivas (IZU et al., 2009; GUO et al., 2011). Entretanto, não existem pesquisas associando a Ang-(1-7) e células ósseas como osteoblastos.

Neste estudo utilizar-se-á um compósito poroso fabricado pela combinação das técnicas de evaporação do solvente e lixiviação de sal (NaCl) formada pelo polímero absorvível (PCL) e por uma biocerâmica (BCP) com o intuito de avaliar a sua morfologia através de microtomografia computadorizada ( $\mu$ -CT) e sua resposta *in vitro* utilizando osteoblastos de cultura primária (CIAPETTI et al., 2003; CHOI et al., 2004; COOMBES et al., 2004; KIM, KNOWLES, KIM, 2004; KHAN, KATTI, LAURENCIN, 2004; RAI et al., 2004; SCHILLER et al., 2004; TADDEI, et al., 2006). Também será incorporada

no compósito de PCL/BC a Ang-(1-7), antagonista da Ang 2 (IZU et al., 2009) e avaliada sua resposta em osteoblastos de cultura primária.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

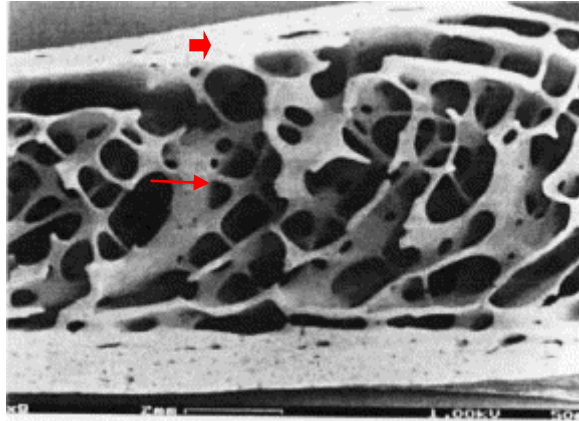
A engenharia de tecidos vem desenvolvendo materiais com aplicações na substituição, reparação e regeneração de tecidos vivos (HENCH, 1998; CIAPETTI et al., 2003; VALÉRIO et al., 2004). Contudo, estes materiais ainda sofrem problemas de estabilidade superficial na interface com os tecidos do hospedeiro, problemas biomecânicos de elasticidade e resistência, subprodutos de degradação irritantes e inviabilização de angiogênese no seu interior. Além disto, estes materiais não apresentam as características de auto-restauração e adaptabilidade de suas estrutura e propriedades que são inerentes aos tecidos vivos (HENCH, 1998; JONES, EHRENFRIED e HENCH. 2006).

### 2.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo com matriz extracelular mineralizada, possuindo algum grau de rigidez e elasticidade, que confere ao corpo a função de suporte. Este tecido por ser o maior reservatório de cálcio do organismo também participa da manutenção do pH interno do corpo, transmissão e condução do impulso elétrico em nervos e músculos. Pode ser categorizado em quatro componentes microestruturais: células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores sinalizadores solúveis. É composto por 25% de matriz orgânica, dividido em 95% de colágeno, principalmente colágeno tipo 1 e 5% de proteínas não colagenosas (osteocalcina, osteonectina, proteínas morfogenéticas, proteoglicanas, sialoproteínas, etc). A matriz inorgânica corresponde a 65% do tecido ósseo sendo composta principalmente por hidroxiapatita e 10% de água (VALÉRIO et al.,2004; GE et al., 2008).

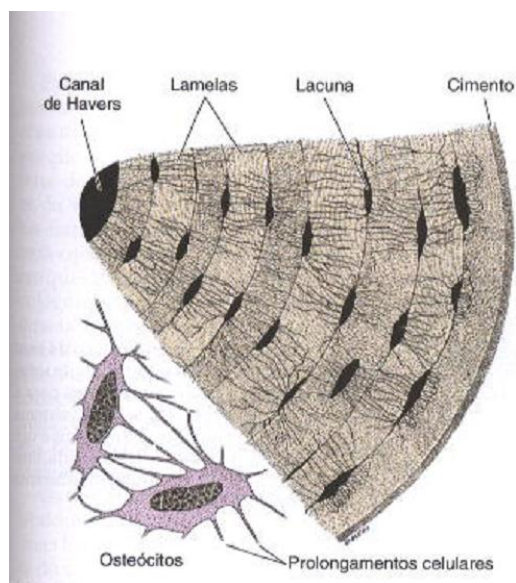
Existem dois tipos morfológicos de osso: cortical e esponjoso (Figura 1). A forma cortical possui porosidade variando de 50 a 95%, sendo observada normalmente em ossos cubóides, chatos e nas terminações de ossos longos. Os poros são interconectados e preenchidos com a medula (tecido composto por vasos sanguíneos, nervos e vários tipos de células que tem como característica principal a produção de

células sangüíneas básicas) enquanto a matriz tem a forma de planos e estruturas chamadas trabéculas, com espessura de cerca de 200 $\mu$ m e variada disposição (DOBLARÉ, GARCÍA e GÓMEZ. 2004).



**Figura 1.** Seção óssea mostrando as formas: cortical (seta espessa) e esponjosa (seta normal)  
(Fonte: WILLIANS PL. 1995).

A forma cortical possui cerca de 5 a 10% de porosidade e variados tipos de poros. A porosidade vascular é a mais larga (50 $\mu$ m de diâmetro), formada por canais de Havers e de Volkmann com capilares e nervos. Outras porosidades são associadas com lacunas (cavidades conectadas por pequenos canais chamados canalículos) e com espaço entre o colágeno e a hidroxiapatita (cerca de 10 $\mu$ m). O osso cortical é formado por estruturas cilíndricas conhecidas como Sistema de Havers (Figura 2), com diâmetro de cerca de 200 $\mu$ m formado por lamela cilíndrica ao redor dos canais de Havers (DOBLARÉ, GARCÍA e GÓMEZ. 2004).



**Figura 2.** Esquema mostrando parte de um Sistema de Havers com dois osteócitos (esquerda). Nas lamelas contíguas do sistema, as fibras colágenas são cortadas segundo diferentes incidências, porque tem diferentes orientações (Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO. 2004)

Os principais fenótipos celulares associados ao osso são as células osteoprogenitoras, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. As células osteoprogenitoras são células com atividade ainda não completamente conhecida (PORTER et al., 2009). Osteoblastos são células jovens com intensa atividade metabólica e responsáveis pela produção da parte orgânica da matriz e regulação da mineralização. Durante a formação óssea, à medida que se dá a calcificação da matriz óssea, os osteoblastos acabam ficando em lacunas, diminuem sua atividade metabólica e passam a ser denominados de osteócitos, células adultas que atuam na manutenção dos componentes da matriz. Nas regiões ocupadas pelas ramificações dos osteoblastos formam-se os canais e canalículos, que permitem uma comunicação entre os osteócitos e os vasos sanguíneos que os alimentam. Os osteoclastos são células gigantes, originadas dos monócitos, multinucleadas responsáveis pela degradação do tecido ósseo em condições fisiológicas e patológicas. Originam-se pela fusão de células mononucleares da medula óssea, sendo porém observadas somente nas superfícies ósseas. Os osteoclastos secretam ácidos, colagenase e outras enzimas que atacam e liberam  $\text{Ca}^{2+}$  (GE, JIN e CAO. 2008).

As células mesênquimais diferenciam-se em osteoblastos através de três subseqüentes estágios: proliferação, secreção de matriz e mineralização. Durante a formação óssea, múltiplos fatores de crescimento são expressos sendo que cada um possui diferente papel no desenvolvimento deste tecido. Embora o processo de regeneração não seja exatamente homólogo ao que ocorre durante a embriogênese, o reparo de fratura recapitula os processos cruciais que controlam o desenvolvimento ósseo (DOBLARÉ, GARCÍA e GÓMEZ. 2004).

A importância da integridade da estrutura óssea torna-se clara nos casos de doenças como osteogênese imperfeita, osteoartrites, osteomielites e osteoporose. Estas doenças associadas com traumas, cirurgias ortopédicas e ressecção de tumor levam ou induzem defeitos ósseos, sendo aumentado a cada ano o impacto clínico e econômico destes tratamentos (PORTER et al., 2009).

Por uma variedade de razões (como tamanho do defeito ósseo, infecção e outros), o osso traumatizado pode não ser capaz de auto reparar-se, resultando em uma não união óssea. Para defeitos com tamanhos críticos ou sem união, um material substituto deve ser usado para preencher o espaço ósseo defeituoso. Atualmente, o padrão ouro no tratamento de defeitos ósseos com tamanho crítico é o enxerto autógeno (LEGEROS 2008). Neste tratamento, remove-se de outro sitio cirúrgico tecido ósseo do próprio paciente (tipicamente da Crista Ilíaca). Entretanto, a taxa de complicação neste tipo de enxerto é superior a 30% incluindo morbidade do local de remoção do enxerto, dor, prolongada hospitalização, parestesia, aumento do risco de infecção, hematoma além de restringida disponibilidade de tecido (HEARY et al., 2002).

Outra opção para pacientes e cirurgiões, é o uso de tecido de outro humano (tipicamente cadáver), sendo denominado alógeno. O sucesso clínico nestes dois tipos de enxertos é atribuído à similaridade física e biológica do doador (sítio ou paciente) com o tecido hospedeiro. Entretanto, enxertos alógenos possuem taxa de incidência de infecção acima de 13%, além de possível resposta imune do hospedeiro (NISHIDA et al., 2008). Assim, devido ao alto custo e limitada disponibilidade de enxertos autógenos e alógenos existe a necessidade de desenvolver biomateriais sintéticos para reparo, substituição e preenchimento ósseo (NISHIDA et al., 2008).

## 2.2. Engenharia de tecido ósseo

Para Jones, Ehrenfried e Hench (2006) a engenharia de tecidos é uma técnica que consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos através do recrutamento de tecidos do próprio paciente, que são dissociados e cultivados sobre suportes em três dimensões para serem inseridos no paciente.

Estudos comparativos de compósitos têm sido estabelecidos e existe uma considerável variação de níveis de bioatividade, como mensurado por valores de ligação do osso ao implante ou porcentagem de proliferação óssea em presença de partículas bioativas. Classe A de bioatividade são considerados aqueles materiais que são osteoprodutivos e osteocondutivos. Osteoprodução ocorre quando o osso prolifera na superfície de uma massa devido ao aumento da atividade osteoblástica. Aumentam tanto a mitose quanto a diferenciação de osteoblastos. Na classe B são considerados materiais que exibem potencial osteocondutor (HENCH, 1998; JONES, EHRENFRIED e HENCH, 2006).

## 2.3. Arcabouços para Reconstrução Óssea

Um arcabouço ou “scaffold” para aplicação em engenharia de tecido ósseo deve preencher vários critérios. Primeiro o arcabouço deve ser biocompatível (não tóxico) e atuar como modelo 3D para crescimento ósseo tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Para isto é necessário que existam poros interconectados com um diâmetro de pelo menos 100µm para permitir migração celular, crescimento de tecido e vascularização (RATNER et al.,1996).

O arcabouço deveria ser o único a promover adesão e atividade celular, idealmente promover osteogênese em nível genético e ter propriedades mecânicas semelhantes ao do osso receptor. A interface do biomaterial com o osso não deve possuir a formação de tecido cicatricial, deve possuir uma interface estável e uma porcentagem de degradação semelhante à regeneração óssea. Os produtos da degradação não devem ser tóxicos e devem ser facilmente excretados pelo organismo

de modo que o osso original retorne a sua forma e função original (JONES, EHRENFRIED e HENCH, 2006).

O processo de fabricação dos arcabouços deve permitir que sejam produzidas várias formas para adequar ao defeito ósseo, permitir esterilização e ter potencial para ser comercializado nos padrões internacionais de utilização clínica (JONES, EHRENFRIED e HENCH, 2006).

### 2.3.1. Estrutura micro e macroporosa

A porosidade é um fator crítico para a migração celular e elaboração de uma matriz óssea. Kim, Knowles e Kim (2004) reportaram que os osteoblastos preferem poros com tamanhos variando de 200 a 400 $\mu$ m de diâmetro para facilitar a migração, adesão e proliferação. Esse fato pode ser explicado pela curvatura do poro que provê ótima compressão e tensão nos mecanorreceptores celulares, permitindo que eles migrem para as aberturas de tamanhos específicos (HOU, GRIJPMA e FEIJEN, 2003; DHANARAJU et al., 2003).

A porosidade mínima necessária para o tecido ósseo regenerado mineralizado geralmente é considerada em torno de 50 à 100 $\mu$ m. Poros inferiores ao anteriormente citado resultam em não crescimento do tecido osteóide, somado ao fato de haver somente penetração de tecido fibroso nestes poros (KASTEN et al., 2008).

Arcabouços de materiais orgânicos e inorgânicos biodegradáveis para a engenharia de tecidos óssea devem apresentar macro-porosidade. Além disso, deve haver uma intercomunicação dessas macro-porosidades para permitir o crescimento ósseo de forma tri-dimensional por toda a estrutura. A interconectividade pode ser otimizada em um estágio *in vitro*, através do emprego de condições de cultura dinâmicas (KIM, KNOWLES e KIM, 2004).

A micro-porosidade influencia no desempenho biológico dos arcabouços *in vivo*, uma vez que a taxa e distribuição da osteogênese por volta e ao longo desses são afetadas pelo número e tamanho dos canais intercomunicantes. A porosidade pode

afetar importantes propriedades mecânicas de um polímero. Pode reduzir sua maleabilidade e aumentar sua fragilidade. (KIM, KNOWLES e KIM, 2004).

### 2.3.2. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos arcabouços como também do subsequente osso formado devem ser capazes de suportar a carga de atividades físicas diárias. *In vitro*, os andaimes devem ter resistência mecânica suficiente para suportar pressões hidrostáticas e manter a porosidade requerida para o crescimento celular e produção da matriz. *In vivo*, devido o osso estar em contínuo estresse, as propriedades mecânicas do arcabouço devem idealmente assemelhar-se ao do tecido ósseo (SALGADO, COUTINHO e REIS. 2004). As propriedades mecânicas são importantes tanto a nível microscópico quanto a nível macroscópico. Apesar do aumento da porosidade e do tamanho dos poros facilitar o crescimento de tecido ósseo, o resultado é a redução das propriedades mecânicas do material podendo inclusive comprometer a integridade do biomaterial (KARAGEORGIU & KAPLAN 2005).

Assim, a porosidade deve ter um tamanho crítico – pequeno o suficiente para manter a integridade mecânica do arcabouço e grande o suficiente para prover ótima atividade biológica (HENRIKSEN et al., 2011).

Para prevenir a ocorrência de fratura inicial no arcabouço, as propriedades deste devem ser fortes o suficiente para resistir às cargas aplicadas – assim a porosidade inicial deve ser pequena, ou as propriedades mecânicas devem suficientemente fortes para suportar as cargas enquanto o material se torna mais fraco com a degradação. Assim, segundo Byrne et al. (2007) deve-se achar o ponto de equilíbrio entre porosidade e a porcentagem de degradação para se determinar ótimos parâmetros de um arcabouço.

### 2.3.3. Degradação controlada

Como a regeneração óssea e subsequente remodelamento têm duração de vários meses, é importante que a degradação do arcabouço ocorra de forma controlada permitindo que o novo osso formado ocupe o espaço do biomaterial que foi absorvido (WOODRUFF & HUTMACHER 2010).

### 2.4. Polímeros utilizados para regeneração óssea

Existem diversos tipos de polímeros (biológicos ou sintéticos), podendo também ser classificados em degradáveis e não degradáveis. O termo “polímero biodegradável” refere-se à susceptibilidade de um polímero ser decomposto no organismo ou por fatores ambientais. De acordo com a ASTM (Sociedade Americana para Testes e Materiais - [www.astm.org](http://www.astm.org)) a definição padrão de biodegradável refere-se à capacidade de decomposição em CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, componentes inorgânicos ou biomassa.

Entretanto, como um material para ser usado na engenharia de biomateriais, os polímeros biodegradáveis podem ser decompostos em moléculas biológicas aceitáveis (sem a produção de intermediários nocivos) que podem ser metabolizados e removidos do corpo por metabolização ou excreção. Poliésteres alifáticos são polímeros sintéticos mais utilizados devido a sua fácil degradação no organismo por hidrólise da ligação éster e seus produtos de degradação são absorvidos por metabolização (GE, JIN e CAO. 2008).

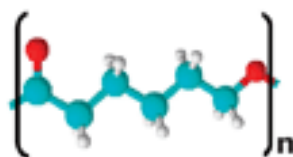
Polímeros biológicos como o colágeno, alginato, agarose e ácido hialurônico podem ser utilizados na engenharia de biomateriais devido suas propriedades e biocompatibilidade.

Os polímeros sintéticos têm a vantagem de facilidade de fabricação e controlada degradação (HUTMACHER 2000). Entretanto, os polímeros sintéticos são quimicamente e biologicamente inertes não induzindo dessa forma a adesão celular e a formação de tecido. Para superar isto, hidroxapatitas (HA) e trifosfato de cálcio (TCP)

têm sido adicionados para aumentar a ostecondutividade do biomaterial (WANG et al., 2005).

#### 2.4.1. Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)

O estudo para a polimerização da Policaprolactona (PCL) começou por volta de 1930 e sua propriedade de biodegradação foi primeiramente estudada em 1973 (VAN NATTA ET AL., 1934; SINHA et al., 2004). O PCL (Figura 3) é um polímero sintético biodegradável e biocompatível da classe dos poliésteres alifáticos aprovado para utilização em humanos (COOMBES et al., 2004; SINHA et al., 2004).



**Figura 3.** Estrutura química tridimensional da poli-( $\epsilon$ -caprolactona).

A PCL é utilizada para liberação controlada de medicamentos devida sua alta permeabilidade para vários fármacos. É um material mais resiliente que outros polímeros já utilizados [por exemplo: poli ácido láctico (PLA), poli ácido glicólico (PLG) e Poli ácido láctico co-ácido glicólico(PLGA)], com características melhores para reparação óssea por manter as propriedades físicas da matriz por pelo menos seis meses (CIAPETTI et al., 2003).

Dessa forma, a PCL tem apresentado várias aplicabilidades na engenharia de tecidos como andaime e como sistema de liberação controlada de fármaco de longa duração, em microeletrônica e como adesivo. Sua vasta aplicabilidade e interessantes propriedades (controlada degradação, miscibilidade com outros polímeros, biocompatibilidade e potencial para ser fabricada através de fontes renováveis) fazem da PCL um polímero de primeira escolha na engenharia de tecido ósseo (LABET & THIELEMANS 2009).

## 2.5. Biocerâmica

Osteosynt® é uma biocerâmica (BC) bifásica micro-macro porosa, composta por 65% de  $\beta$ -Trifosfato de Cálcio ( $\beta$ -TCP), que é a fase mais solúvel, e 35% de Hidroxiapatita (HA), que é a fase mais estável. Apresentam macro-poros intercomunicantes, na faixa de 50 $\mu$ m a 400 $\mu$ m, que induzem uma resposta orgânica mais efetiva, forte ligação e crescimento tecidual intrínseco e micro-poros intercomunicantes (inclusive com os macroporos) na faixa de 1 $\mu$  e 10 $\mu$  que aumentam o contato tecidual, a solubilidade e a capacidade de trocas com os líquidos orgânicos, além de poros intermediários de 10 $\mu$ m a 50 $\mu$ m (PI0602372-0, PATARO et al., 2007).

Preferivelmente, o material cerâmico deve ser capaz de prover uma superfície de fosfato de cálcio, '*in vitro*' ou '*in vivo*', apresentando essa estrutura de superfície específica. É preferido, adicionalmente, que o material cerâmico seja capaz de adsorver os agentes biologicamente ativos, como fatores de crescimento (por exemplo: BMP's) '*in vitro*' ou '*in vivo*'. Exemplos satisfatórios de materiais cerâmicos incluem fosfato de cálcio, biovidros e materiais que contêm cálcio fosfato e/ou biovidros (LEGEROS, 2008).

Entretanto, as hidroxiapatitas (HA) apresentam algumas limitações, como: (1) limitada capacidade de suportar carga de torção; (2) pouca tolerância de corte; e (3) uma reabsorção mínima quando as HA puras policristalinas são usadas. Por essas razões, o seu uso em regiões esqueléticas submetidas a altos esforços são limitadas, o que já não acontece da mesma forma com as biocerâmicas bifásicas micro/macroporosas. Contudo, tem-se uma grande utilização nos reparos e/ou reconstruções das perdas ósseas em geral em odontologia e medicina (RIPAMONTI & DUNEAS, 1996).

Dessa forma, tratamentos superficiais e/ou a preparação de compósitos entre os diferentes biomateriais (metais, ligas metálicas, cerâmicas e polímeros, por exemplo) são as estratégias hoje usadas para o melhoramento das propriedades e otimização do uso dos mesmos dentro de sua especificidade (CIAPETTI et al., 2003).

## 2.6. Compósitos de Policaprolactona/Biocerâmica (PCL/BC)

Muitos compósitos de polímero com biocerâmica podem ser usados para conferir diferentes características e controlar suas propriedades como biocompatibilidade, absorção de água, porcentagem de degradação e propriedades mecânicas, fazendo destes materiais desejáveis para aplicação médica.

A incorporação de BC em dispositivos poliméricos oferece uma estrutura mineral que disponibiliza Cálcio (Ca) e Fósforo (P) para a neoformação óssea, além de neutralizar os subprodutos ácidos da degradação polimérica. A Hidroxiapatita (HA), quando presente na estrutura do compósito apresenta características osteocondutoras (CIAPETTI et al., 2003).

Os compósitos de biocerâmica:polímero (Osteosynt:Polímero) apresentam propriedades de indução de dentina reparadora, formação de ponte dentinária compacta e uma matriz com geometria favorável para a deposição mineral. Esse material induz uma reparação tecidual mais efetiva e provoca uma resposta histológica compatível com o processo de regeneração tecidual normal (PI0602372-0).

Para ser utilizada efetivamente em compartimentos ósseos, as propriedades mecânicas da BC e as estruturas dos poros devem ser modificadas para permitir porosidade, adequado encapsulamento, liberação controlada e tamanho dos poros (KIM, KNOWLES e KIM. 2004).

O compósito formado apresenta propriedades melhores que os dois produtos isoladamente, especialmente pelas características termoplásticas do polímero, melhorando assim as deficientes propriedades mecânicas da cerâmica, permitindo sua utilização prática (PATARO, 2005).

## 2.5. Sistema renina angiotensina e tecido ósseo

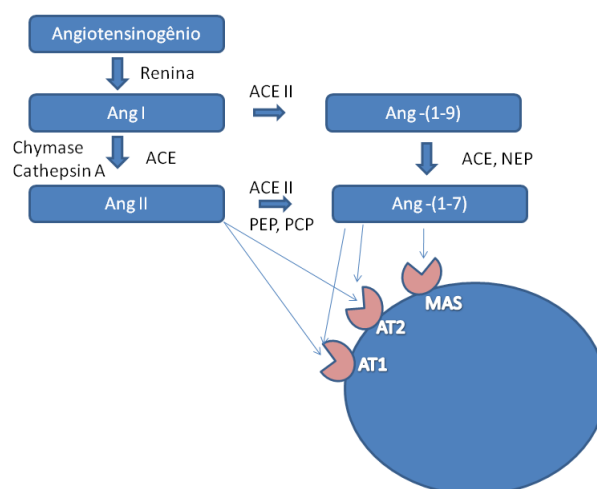
A hipertensão e a osteoporose são duas doenças comuns que atingem a população idosa e são causadas pela interação de fatores genéticos e ambientais. Como 50% da população hipertensa corresponde a mulheres pós-menopausa com

risco para osteoporose, a hipertensão representa um considerável problema para essa população (SHIMIZU et al., 2009). Evidências em animais e estudos epidemiológicos sugerem que alta pressão sanguínea está associada com anormalidades do metabolismo do cálcio, levando ao aumento da perda deste íon, ativação secundária da glândula Paratireóide e perda desse íon do tecido ósseo, levando desse modo ao aumento do risco de osteoporose (RESNICK et al., 1983; CAPPUCCIO et al., 2000).

De fato, estudos clínicos têm demonstrado que drogas anti-hipertensivas têm diminuído o risco de fraturas pela redução da excreção renal de cálcio (SCHOOFS et al., 2003). Entretanto, outras drogas anti-hipertensivas ( $\beta$ -bloqueadoras e inibidores da enzima conversora de angiotensina - ACE) estão também associadas com a redução do risco de fraturas (SANADA et al., 2004; IZU et al., 2009).

Estudos clínicos recentes também demonstraram o benefício dos inibidores da ACE em reduzir o risco de fraturas ou aumentar o metabolismo ósseo sugerindo a associação do Sistema Renina Angiotensina (RAS) ao metabolismo ósseo (REJNMARK et al., 2006).

O RAS tem um papel central no controle da pressão sanguínea e tem sido um importante alvo para drogas anti-hipertensivas (ASABA et al., 2009). No conceito clássico do RAS o angiotensinogênio produzido no fígado é seqüencialmente clivado pela renina, enzima produzida nos rins e secretada na circulação, que quebra o angiotensinogênio para o decapeptideo inativo angiotensina I, que posteriormente é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ACE) gerando Ang II que opera tanto sistemicamente quanto localmente em vários tecidos (Figura 4).



**Figura 4.** Visão atual simplificada do Sistema Renina Angiotensina. ACE- enzima conversora de angiotensina; Ang- angiotensina; AT- receptores para angiotensina II; MAS- receptor para angiotensina-(1-7); NEP- natural endopeptidase; PCP- proilcarboxipeptidase; PEP- prolilendopeptidase (SANTOS & FERREIRA, 2007; IUSUF et al., 2008; FERRARIO 2011).

Osteoclastos e osteoblastos expressam receptores para angiotensina II tipo 1 e 2 (AT1 e AT2) sugerindo a atividade do RAS localmente no osso (HATTON et al. 1997; LAVOIE & SIGMUND, 2003; SAKAI et al., 2007; SHIMIZU et al., 2009).

A expressão de receptor AT1 foi observado em cultura de osteoblastos (BANDOW et al., 2007) e a Ang II inibiu a diferenciação óssea via receptor AT1 em células osteoblásticas da calvária de ratos (HAGIWARA et al., 1998).

Em contraste ao receptor AT1, não houve significativo efeito em células de calvária de ratos via bloqueador de receptor AT2 (HAGIWARA et al., 1998). Entretanto, Izu et al.(2009) demonstraram que o bloqueio de receptores AT2 significativamente aumentou os níveis de massa óssea sendo esse efeito baseado no aumento da atividade osteoblástica como também na diminuição da atividade osteoclástica *in vivo*.

A angiotensina-(1-7) tem sido explorada no contexto da função cardiovascular desde que foi descoberta. Tem sido demonstrado através de pesquisas farmacológicas que a Ang-(1-7) neutraliza os efeitos causados pela Ang II tanto através da inibição da ACE quanto pelo bloqueio dos receptores AT1 (IUSUF et al., 2008). A descoberta da ACE2 que é uma das enzimas formadoras da Ang-(1-7) e a identificação do receptor

Mas, através do quais muitas ações da Ang-(1-7) é mediada, tem estabelecido direções através dos quais o RAS regula a homeostase.

Efeitos estabelecidos da Ang-(1-7) são a regulação da pressão sanguínea, função cardíaca e crescimento celular da musculatura lisa e do miocárdio (SANTOS et al., 2006). Pesquisas envolvendo este peptídeo são feitas observando o remodelamento cardiovascular, regulação da pressão sanguínea, cicatrização de feridas e câncer (SANTOS et al., 2006). Entretanto, não há pesquisas avaliando a influencia da Ang-(1-7) em cultura de osteoblastos e sua aplicação na engenharia de tecidos.

### 3. OBJETIVOS

Este projeto visa a preparação de compósitos em base de biocerâmicas e polímeros biodegradáveis, contendo angiotensina (1-7), encapsulados ou não, micro-particulados, na forma de implantes para o processo de reparação tecidual.

#### 3.1. Objetivos específicos

a) preparar um arcabouço micro e macroporoso formado pelo compósito de Policaprolactona/Biocerâmica (PCL/BC).

b) caracterizar morfológicamente, através da Micro tomografia Computadorizada ( $\mu$ -CT) o compósito PCL/BC.

c) incluir a Ang-(1-7) ao compósito PCL/BCP,

d) avaliar a viabilidade e a proliferação de osteoblastos na presença dos compósitos contendo ou não a Ang-(1-7) através dos testes de MTT e secreção de Fosfatase alcalina *in vitro*.

## 4. HIPÓTESES

O compósito formado por PCL e BC deve:

- Ser biocompatível,
- Apresentar propriedades de superfície que permitam sua implantação,
- Apresentar uma microestrutura porosa compatível com a neoformação vascular,
- Prover íons minerais para a incorporação na matriz do osso neoformado,
- Liberar o peptídeo incorporado de maneira lenta e contínua,

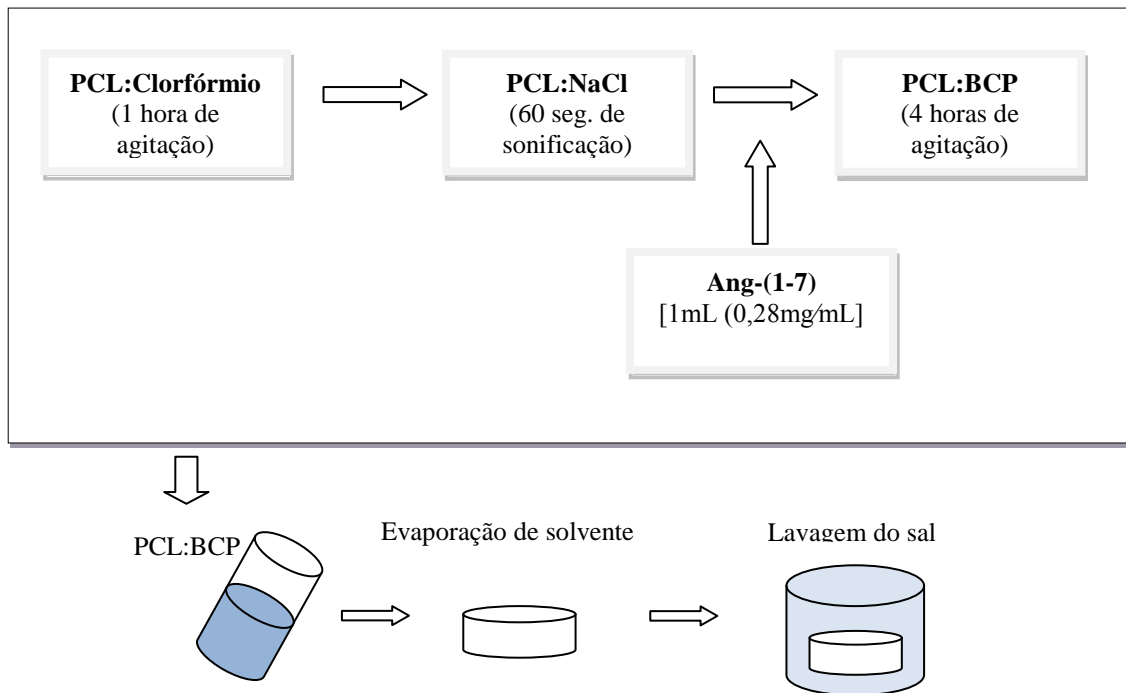
## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Preparação dos compósitos

Compósitos de policaprolactona (PCL; Aldrich;  $P_m=80.000\text{g/mol}$ ) foram fabricados pela combinação modificada das técnicas de *solvent casting* e *particle leaching* descrita por Mikos et al. (1994). Como solvente e formador de poros foram usados respectivamente: Clorofórmio [Labscan (Asia), Thailand] e NaCl (Sigma-Aldrich, EUA). A cerâmica bifásica (BCP) utilizada foi  $\beta$ -Trifosfato de cálcio/Hidroxiapatita (Einco Biomaterial, Minas Gerais, Brasil) com a granulação de 80-100 mesh.

Inicialmente, várias quantidades de PCL (12,25%, 18,75% e 25% g/mL) foram dissolvidas em Clorofórmio ficando sob agitação durante 1 hora a temperatura ambiente. Certas quantidades de BCP foram adicionadas à solução de PCL e ficando sob agitação durante 4h à temperatura ambiente (PCL/BCP= 3/1, 1/1 e 4/0). Partículas de NaCl foram separadas usando peneiras (Fisher, USA) padronizadas pela Sociedade Americana para Testes de Materiais (ASTM) com diâmetro de 212-355 $\mu\text{m}$ . Oito gramas de NaCl foram adicionados à solução de PCL por sonificação (60 seg) formando uma solução altamente viscosa. Em determinados compósitos foi adicionada 1 mL de Ang-(1-7) (0,28mg/ml) (Bachem, USA) possuindo concentração fixa nos compósitos testados [Ang-(1-7) / (PCL/BCP) = 0,00014 p/p].

Posteriormente a suspensão foi vertida em discos de vidro com 5mm de profundidade ficando a temperatura ambiente durante 2 dias. Após a evaporação do solvente, os arcabouços formados foram lavados com água destilada por 2 dias para remoção do sal. Após a lavagem, os materiais ficaram secando a vácuo por 48 horas.



**Fluxograma 1.** Preparação das estruturas porosas

## 5.2. Caracterização Morfológica

### 5.2.1. Microtomografia Computadorizada

Desde a descoberta dos raios X por Wilhelm C. Roentgen em 1895, esta radiação eletromagnética se tornou uma importante ferramenta de investigação para a ciência. Este fato, aliado ao notável avanço tecnológico experimentado pela indústria microeletrônica nas últimas décadas, possibilitou o desenvolvimento de modernas técnicas de processamento de imagens, tal como a microtomografia computadorizada de raios X ( $\mu$ -CT) (WITTE et al., 2008). Esta técnica se baseia na obtenção de um conjunto de projeções bidimensionais do objeto analisado e na construção de modelo tridimensional mediante aplicação de algoritmo matemático (FERNANDES et al., 2009). O material investigado é rotacionado, sendo obtida uma projeção para cada ângulo de rotação. A resolução da imagem produzida é proporcional ao número de projeções

adquiridas (vide Figura 5). Na Figura 6 é exibida representação esquemática das etapas de aquisição, reconstrução e geração de imagens e modelos 3D na microtomografia de raios X.

Segundo Lasso *et al.* (2008) , a tomografia de raios X é uma técnica bastante versátil, pois além de ser não-destrutiva, permite obter importantes parâmetros morfológicos dos materiais investigados sem exigir uma preparação especial das amostras. Sua aplicação mais difundida e de maior impacto na sociedade é no diagnóstico médico, onde esta técnica foi primeiramente introduzida. A utilização inicial da tomografia em outras áreas da ciência foi fortemente inibida pelo alto custo dos equipamentos. Entretanto, recentemente surgiram no mercado aparelhos mais acessíveis que os tomógrafos médicos. Estes equipamentos, denominados microtomógrafos, possibilitam a obtenção de imagens tridimensionais de alta resolução (micrometros) em amostras de dimensões reduzidas. Atualmente várias universidades, centros de pesquisa e empresas privadas em todo o mundo utilizam estes equipamentos no desenvolvimento de suas pesquisas e em testes de controle de qualidade.

Durante o ensaio de microtomografia o feixe de raios X proveniente de um tubo de raios catódicos atravessa o material analisado, havendo transmissão, espalhamento e absorção de fótons. A relação entre as intensidades transmitida e incidente ( $I/I_0$ ) é dada pela lei de Lambert-Beer (SIEGBAHN 1965):

$$I/I_0 = \exp(-\mu x)$$

onde  $\mu$  representa o coeficiente de atenuação linear do material ( $cm^{-1}$ ) e  $x$  a espessura da amostra ( $cm$ ). Se o objeto escaneado for composto por diferentes fases:

$$I/I_0 = \exp \left[ \sum_i (-\mu_i x_i) \right]$$

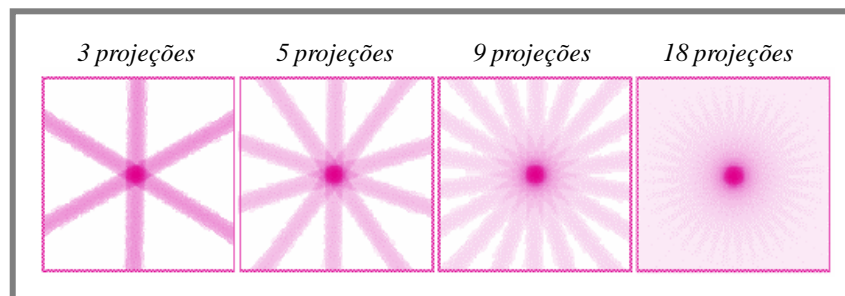
estando o índice  $i$  associado a cada fase presente no material. O coeficiente de atenuação em massa  $\mu'$  ( $cm^2.g^{-1}$ ) é expresso por:

$$\mu' = \frac{\mu}{\rho}$$

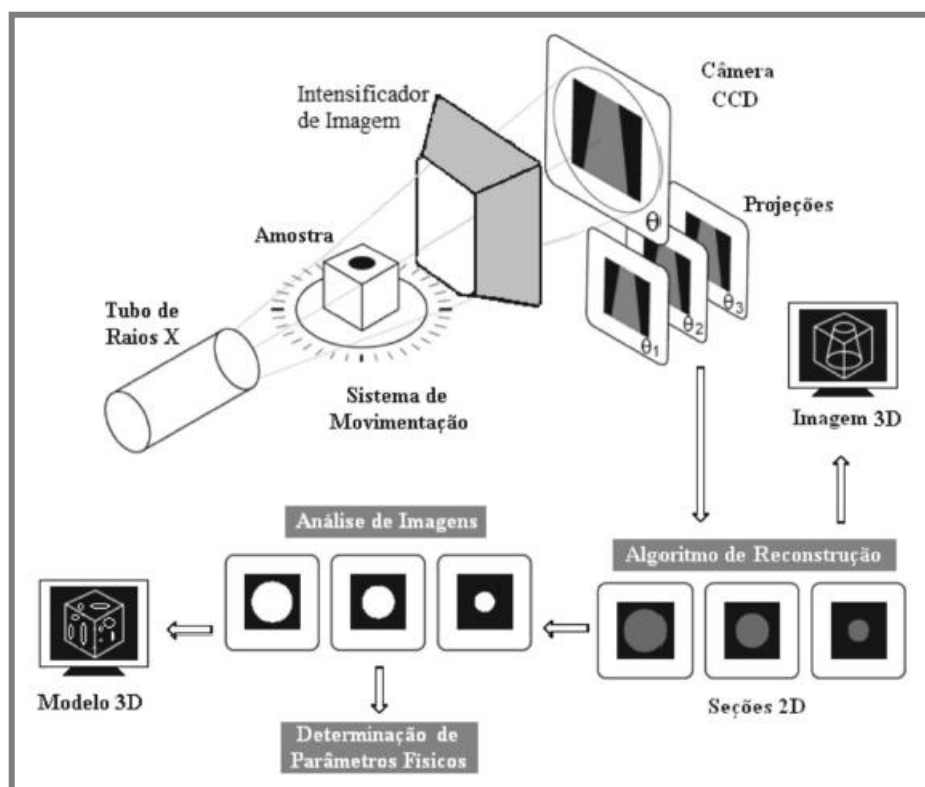
sendo  $\rho$  a densidade do material ( $g.cm^{-3}$ ). A porosidade  $\phi$  da amostra pode ser determinada através da equação (PHOGAT & AYLMOORE, 1989):

$$\phi = 100 \left( \frac{\mu_s - \mu_p}{\mu_s} \right)$$

na qual  $\mu_s$  e  $\mu_p$  são os coeficientes de atenuação linear para sólido denso e poroso.



**Figura 2:** Reconstrução de objeto a partir de diversos números de projeções (Fonte: SKYSCAN 2005).



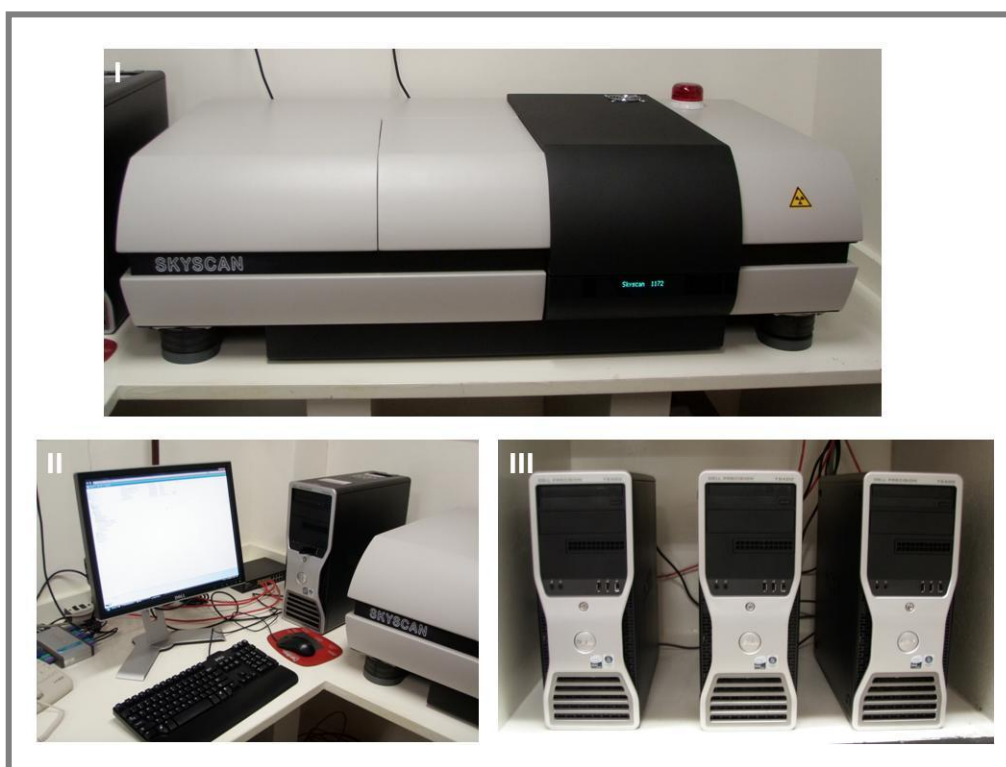
**Figura 6.** Representação esquemática das etapas de aquisição, reconstrução e geração de imagens e modelos 3D na microtomografia de raios X (Fonte: FERNANDES et al.,2009).

Rattanasak & Kendall (2005) empregaram a microtomografia de raios X em estudo acerca da estrutura de poros de compósito cimento/pozolana. A porosidade é um parâmetro estrutural de grande relevância nesses materiais, já que possui influência direta em propriedades como permeabilidade, contração, módulo de elasticidade e resistência mecânica. Os autores observaram que a adição de pozolanas ao cimento diminuiu o seu diâmetro de poros, culminando no aumento da resistência mecânica do compósito.

Através da  $\mu$ -CT, Appoloni *et al.* (2004) investigaram a microestrutura de espumas cerâmicas porosas. Li *et al.*(2006) estudaram a influência da porosidade no crescimento de trincas por fadiga em ligas de alumínio fundido. Farber *et al.* (2003) correlacionaram parâmetros estruturais obtidos através desta técnica e da porosimetria por intrusão de mercúrio em grânulos farmacêuticos. Os autores

notaram que a microtomografia fornece uma série de dados morfológicos que não são acessados na porosimetria por intrusão de mercúrio.

Na Figura 7 é exibida fotografia do microtomógrafo de raios X *SkyScan 1172* presente no Laboratório de Materiais Cerâmicos da UFMG. Com uma fonte de raios X de 20-100 kV e câmera CCD de 10 Mp, este equipamento possui resolução máxima de 0,7  $\mu\text{m}$ . Para auxílio no tratamento das imagens obtidas, o computador que controla o microtomógrafo (*host*) foi conectado em rede a um conjunto de computadores (*cluster*). Durante as etapas de reconstrução e produção dos modelos 3D, as tarefas são divididas entre os computadores do *host* e do *cluster*, aumentando a capacidade de processamento do sistema.



**Figura 7:** I. Fotografia do microtomógrafo *SkyScan 1172*; II. Computador de controle e aquisição de dados (*host*); III. *Cluster* de computadores

Para análise no microtomógrafo *SkyScan 1172*, foi coletado pequeno fragmento de cada material a ser investigado. Como esta técnica se baseia na obtenção de projeções bidimensionais do objeto analisado enquanto ele é rotacionado, é muito

importante que o fragmento retirado possua geometria simétrica. Em seguida, a porção retirada foi posicionada no compartimento de amostras do equipamento e fixada com massa de modelar.

As amostras investigadas foram rotacionadas em ângulos de até 180°, adotando-se passo de 0,30°. Através das projeções adquiridas e dos softwares NRecon e CTAn, foram obtidos parâmetros morfológicos, bem como representação tridimensional das estruturas escaneadas. Para o cálculo da porosidade e do diâmetro de poros médio dos materiais estudados, foram consideradas cem seções bidimensionais ao longo do volume analisado.

### 5.3. Análises *in vitro*

#### 5.3.1 Cultura de osteoblastos

Para os testes com osteoblastos os seguintes materiais foram utilizados. Solução antibiótica-antimicótica (Gibco BRL, NY, EUA), soro fetal bovino (Gibco BRL, NY, EUA), PBS, DMEM (Sigma, St Louis, EUA), tripsina-EDTA, Kit Vybrant MTT (Molecular Probes, Eugene, OR), Kit BCIP-NBT: (Gibco, Burlington, Ont., Canadá). Meio de cultura DMEN (Sigma, São Louis, EUA), garrafas de cultura T25 e placas com 24 poços: Nunc products (Naperville, EUA).

Osteoblastos foram isolados da calvária de ratos Wistar neonatos (3 dias de vida) (CETEA 167-2007). A calvária foi dissecada e limpa de tecidos aderidos a ela, e posteriormente cortada em pequenos fragmentos e lavadas em PBS estéril, que não continha nem cálcio nem magnésio. As peças da calvária ficaram incubadas com tripsina-EDTA 1% durante 5 minutos, seguida de quatro seqüenciais incubações com collagenase 2% a 37°C por aproximadamente 45 minutos cada. O primeiro sobrenadante da incubação com collagenase contendo alta proporção de fibroblastos e hemácias e foram descartados. Os sobrenadantes seguintes foram recolhidos e centrifugados a 1000xg por 5 minutos, o pellet formado foi ressuspenso em 5 ml de meio DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e 1% de antibiótico e

antimicótico. As células ficaram incubadas em garrafas para cultura T25 em 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C de temperatura e 95% de umidade, sendo posteriormente utilizadas para testes na segunda passagem.

Para testar a estimulação dos osteoblastos com o grupo Teste utilizará a densidade celular de  $1 \times 10^4$ , nas placas com 96 poços. Após 24 horas, o meio foi mudado para um meio contendo os grupos testados, controle positivo ou somente o meio puro sem células e sem materiais. Após 72 h e 7 dias de incubação a viabilidade/proliferação e capacidade de secreção de Fosfatase alcalina foram testados.

Os testes de proliferação e viabilidade foram feitos como se segue: após 72h de incubação na presença de cada um dos materiais citados anteriormente, sendo a viabilidade dos osteoblastos mensurada pelo método MTT, baseado na redução do sal do tetrazolio para cristais de formazan pela presença da desidrogenase nas células mitocondriais. A formação dos sais de formazan é diretamente relacionada com a quantidade de desidrogenase, providenciando um método indireto de mensuração. Foi adicionado a cada poço 100 µl de meio de cultura fresco além de 10µl de MTT (solução estoque: 12mM MTT). Quatro horas após, a morfologia celular foi analisada por microscopia de fase invertida e os sais de formazan foram solubilizados com 100 µl de SDS 10% HCl. Após incubação por 18 h, a densidade ótica foi mensurada a 570nm.

A produção de fosfatase alcalina foi mensurada utilizando o kit BCIP-NBT. Este método, baseado na reação cromagênica iniciada pela quebra do grupo fosfato pelo BCIP da Fosfatase alcalina presente nas células. Esta reação produz um próton, que reduz NBT para um precipitado insolúvel púrpura. Brevemente, o sobrenadante de cada poço foi removido e a camada celular foi lavada por duas vezes com PBS. Então, uma solução de 100 µl de BCIP-NBT, foi adicionado para cada poço. Após 2 horas de incubação, as células foram observadas por microscópio invertido e os precipitados insolúveis púrpura foram solubilizados com 100 µl de SDS 10% HCl e incubados por 18 h. A densidade ótica foi mensurada em 595 nm.

Os resultados foram apresentados em gráficos. A significância estatística foi mensurada pelo ANOVA e teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## 6. Resultado

O resultado desse trabalho foi submetido e aceito na revista *Cerâmica* sendo apresentado abaixo.

**A Biodegradable Porous Composite Scaffold of PCL/BCP Containing Ang-(1-7) for Bone Tissue  
Engineering**

Filipe A. Macedo<sup>1</sup>, Eduardo H.M. Nunes<sup>2</sup>, Wander L. Vasconcelos<sup>2</sup>, Robson A. Santos<sup>3</sup>, Ruben D. Sinisterra<sup>4</sup>, Maria E. Cortes<sup>1\*</sup>

<sup>1\*</sup> Dentistry Faculty, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627 Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil. mecortes@yahoo.com

<sup>2</sup> Department of Metallurgical and Materials Engineering – Engineering School, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup> Department of Physiology and Biophysics, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup> Chemistry Department, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## ABSTRACT

It was obtained highly porous three-dimensional biodegradable scaffolds from beta-tricalcium phosphate-hydroxyapatite bioceramic (BCP), PCL, and Angiotensin-(1-7). We used the solvent casting and particulate leaching methods (SC/PL). The processed scaffolds were characterized by X-ray microtomography ( $\mu$ -CT). Biocompatibility tests *in vitro* were performed during three and seven days using MTT and Alkaline Phosphatase Activity (APA) assays. Both the MTT activity and APA were evaluated using a one-way ANOVA test. The  $\mu$ -CT results showed that the increase of the PCL:BCP weight ratio leads to structures with lower pore sizes. The pore interconnectivity of the processed scaffolds was evaluated in terms of the fragmentation index (FI). We observed that the obtained composites present poorly connected structures, with close values of FI. However, as the polymer phase is almost transparent to the X-rays, it was not taken into consideration in the  $\mu$ -CT tests. The MTT activity assay revealed that scaffolds obtained with and without Angiotensin-(1-7) present mild and moderate cytotoxic effects, respectively. The APA assay showed that the rat osteoblasts, when in contact for three days with the PCL composites, presented an APA similar to that observed for the control cells. Nevertheless, for an incubation time of seven days we observed a remarkable decrease in the alkaline phosphatase activity. In conclusion, using the solvent casting and salt leaching method we obtained 3D porous that are composites of PCL, BC and Ang-(1-7), which have suitable shapes for the bone defects, a high porosity and interconnect pores. Furthermore, the viability *in vitro* showed that the scaffolds have potential for drug delivery system and could be used in future *in vivo* tests.

**KEYWORDS:** Angiotensin-(1-7), composite, scaffold, tissue engineering.

## INTRODUCTION

Current treatment strategies for degenerative diseases and damaged bone tissue include autografts, allografts, xenografts, and artificial materials such as metals and bioceramics [1]. Novel strategies are necessary because of the limitations related to these treatments such as inadequate tissue supply, potential for disease transfer, and compliance issue [2].

Bone tissue engineering involves methods from materials engineering and life sciences to create artificial constructs for regeneration of new bone [3]. A key component in tissue engineering for bone regeneration is the scaffold that acts as a template for cell interactions and the formation of bone-

extracellular matrix that provides mechanical support to the newly formed tissue. Scaffolds for bone regeneration must meet several criteria in order to serve this application, including adequate mechanical stability to provide a suitable environment for the formation of new bone tissue, and biodegradability at a rate commensurate with remodeling. In addition, scaffolds also can act as drug delivery vehicles and promote bone tissue ingrowth through them [4].

Currently, composites of polymers and ceramics have been developed with the purpose to increase the scaffold mechanical stability and improve tissue interactions. Calcium phosphate ceramics have been widely used as synthetic bone graft substitutes for over 30 years in dental and orthopedic surgery to fill bone defects and coat metallic implant surfaces in order to improve implant integration with the host bone. Furthermore, commercial hydroxyapatite (HAP) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) have been examined in terms of their suitability as a bone substitute in the clinical setting [3]. However, their clinical applications have been limited because of their brittleness, difficulty of shaping, and the extremely slow degradation rate exhibited by HAP [5]. Moreover, the drug loading on the  $\beta$ -TCP surface takes place by physical adsorption. It is well established that the adsorption capacity is limited, because it mainly depends on the surface area of the material [4].

The use of a synthetic polymer in bone tissue engineering is an alternative strategy widely used nowadays [6,7]. The polycaprolactone (PCL), a US food and drug administration (FDA) approved material for craniofacial surgical procedures, is a biocompatible and biodegradable aliphatic polyester, having a low melting point. PCL presents a slow degradation rate (over two years in vivo) and higher elastic modulus when compared to other biodegradable polyesters approved by FDA [8]. In addition, PCL degradation products are easily resorbed through metabolic pathways and do not produce local acidic environments. Thus, it is a prime candidate to be used in bone scaffolding applications [6,9]. The addition of biodegradable polymers such as PCL to calcium phosphate ceramics would allow better manipulation and control over both the macro- and microstructure in shaping composites to fit bone defects.

Recent clinical studies showed that beta blockers and anti hypertension drugs would reduce the risk of bone fractures in the elderly population. This suggests a possible link between the vascular and skeletal systems [10-12].

Angiotensin II (Ang II), a biologically active octapeptide, is a primary effectors of the Renin Angiotensin System (RAS). Ang II mediates hemodynamic, growth, inflammation and metabolic

responses in numerous tissues [13]. Osteoblasts and osteoclasts express angiotensin II receptors (AT1 and AT2) in cell cultures [14]. It has been reported that Ang II induces bone resorption, suppresses alkaline phosphatase activity *in vitro*, and stimulates the proliferation of osteoblasts [13].

Angiotensin-(1-7) was first discovered more than 30 years ago and since then it has been explored in the context of cardiovascular function [15, 16]. It is well known that it often counteracts the effects caused by angiotensin II [17-19]. Similar to Angiotensin-Converting Enzymes (ACE) inhibitors, the majority of the effects of angiotensin II type 1 receptor blockers are reminiscent of angiotensin-(1-7) functions, and there are evidences that angiotensin-(1-7) is also involved in angiotensin II type 1 receptor blocker effects. Of note, angiotensin-(1-7) can interact directly with angiotensin II type 1 receptor [20, 21], leading to the decrease of their functional regulation [22,23].

In this study, we obtained highly porous three-dimensional biodegradable composite scaffolds from beta-tricalcium phosphate-hydroxyapatite bioceramic (BCP), PCL and Angiotensin-(1-7). We used the solvent casting and particulate leaching methods (SCPL). The processed scaffolds were characterized by X-ray microtomography ( $\mu$ -CT). Biocompatibility tests *in vitro* were also performed.

## MATERIALS AND METHODS

### Scaffolds processing

PCL scaffolds were obtained by the solvent casting and particulate leaching techniques (SCPL). These syntheses were performed as described by Mikos et al. [24] with some modifications. Chloroform (Labscan) and NaCl (Sigma-Aldrich) were used as solvent and porogen, respectively. First, PCL was completely dissolved under stirring in chloroform (0.2g/mL) at room temperature. The BCP powder (Einco Biomaterial Ltda, BH, MG, Brazil) was then added to the PCL solution. Its mean particle size was 80-100 mesh. The PCL:BCP weight ratio was fitted to 1:0, 1:1, and 3:1. The NaCl particles were separated into diameter classes from 212 to 355  $\mu\text{m}$ , according to procedure proposed by the American Society for Testing Materials (ASTM) (Fisher, USA). About 8 g of the sieved NaCl particles were added to the PCL solution under sonication (60 s) until highly viscous slurry was formed. Next, 1mL of an angiotensin (1-7) solution ( $\text{Ang-(1-7)/(HA+PCL)}=0.28 \text{ mg/mL}$ ) was added to the slurry. The obtained solution was then poured into Petri dishes and dried at room temperature for 2 days. After the solvent evaporation was completed, the scaffolds were washed with distilled water for two days in order to dissolve away the porogen. It is worth to mentioning that the distilled water was replaced at each six hours. Lastly, the scaffolds were dried under vacuum for 48 hours. Table 1 presents the composition of the tested experimental groups.

### Scaffolds characterization

The  $\mu\text{-CT}$  tests were performed using the Skyscan 1172 high-resolution desktop X-ray microtomography system. A CCD camera with  $2000 \times 1048$  pixels was used to record the transmission of the X-ray beam through the samples. Three-frame averaging and a rotation step of  $0.30^\circ$  were used, covering a view of  $180^\circ$ . Smoothing and beam-hardening correction steps were applied to suppress noise and beam hardening artifacts. The morphological parameters presented in this work were measured after considering one hundred slices along the analyzed volume in the studied samples. The mean values were obtained by considering a 95% confidence interval. It is worth to mention that because the polymer phase

is almost transparent to the X-rays, it was not taken into consideration in the  $\mu$ -CT experiments. Thus, only the ceramic phase was considered.

### **Biocompatibility tests *in vitro***

Osteoblasts were isolated from the calvaria of three days old neonatal Wistar rats. The calvaria were dissected and freed from soft tissue, cut into small pieces and rinsed in sterile phosphate-buffered saline without calcium and magnesium. The calvaria pieces were incubated with 1% trypsin-EDTA for 5 min, followed by four sequential incubations with 2% collagenase type II at 37°C for 45 min each. The supernatant of the first collagenase incubation, which contain a high proportion of periosteal fibroblasts, were discarded. The other digestions produced a suspension of cells with high proportion of osteoblasts. After centrifugation at 1000g for 5 min, each pellet were resuspended in 5 ml of DMEM (Sigma, St Louis, USA) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, NY, USA) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco BRL, NY, USA). The cells were seeded into 25 ml tissue culture flasks, and led to grow in a controlled 5% CO<sub>2</sub> 95% humidified incubator at 37°C. After confluence the cells were used for experiments on passage 2.

### **MTT and Alkaline Phosphatase Activity assays**

The Vybrant<sup>®</sup> MTT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, OR) was used in order to measure both cell viability and proliferation. The key component of this method is the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). The MTT agent can react with the tetrazolium ring (produced by mitochondrial dehydrogenases of living cells) to produce a blue formazan product which can be measured spectrophotometrically. The amount of formazan produced is proportional to the number of viable cells present in the media. In this process 10<sup>4</sup> cells well<sup>-1</sup> were cultured in 96-well plates. After 24 hours of incubation, the culture medium was aspirated from the cells and replaced by 100  $\mu$ L of fresh medium containing the composite, the positive control, or the empty vector (blank). The positive control used in this test was lauryl sulphate. After three and seven days, the composites were removed and the cells were rinsed three times with phosphate-buffered saline (PBS) in order to eliminate non-viable cells. Next, 100  $\mu$ L well<sup>-1</sup> of fresh culture medium was replaced by 10  $\mu$ L of

12 mM MTT stock solution (PBS : MTT = 1mL : 5mg). The cells were incubated at 37 °C for 4 hours to allow the formazan crystal formation.

After incubation, the supernatant was removed and 100 µL of the SDS-HCl solution (0.01 M HCl : SDS = 10 mL : 1mg) was added under shaking to each well in order to dissolve the formazan crystals. The absorbance was measured in a Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, using a test wavelength of 570 nm. The results from eight individual experiments were averaged. The viability reduction (*Viab.*) of a given culture cell when compared to the empty vector was estimated by the equation:

$$\text{Viab.} = 100 \times \frac{\text{OD}_{570c}}{\text{OD}_{570b}} \quad (1)$$

where  $\text{OD}_{570c}$  and  $\text{OD}_{570b}$  are the measured optical densities for the composites and the blanks, respectively. The lower is the *Viab.* value, the higher is the cytotoxicity of the culture cell [24].

The alkaline phosphatase production was evaluated by BCIP-NBT assay. This assay is based on a chromogenic reaction initiated by the cleavage of the phosphate group of BCIP by alkaline phosphatase present in the cells. This reaction produces a proton which reduces NBT to an insoluble purple precipitate. Briefly, the supernatant of each well was removed and the cell layer was rinsed twice with PBS. Then, 200 µl of BCIP-NBT solution, prepared as manufacturer protocol, was added to each well. After 2 h of incubation, the cells were observed by optical microscopy and the insoluble purple precipitates were solubilized with 210 µl of SDS 10% HCl and incubated for 18 h. The optical density measurement was done at 595 nm. Both the MTT activity and alkaline phosphatase activity were evaluated using a one-way ANOVA. Ranking of the means was performed using the Bonferroni multiple-comparison test. P values lower than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### Structural morphology

Figures 1 and 2 show the three-dimensional reconstructions of samples obtained using PCL:BCP weight ratios of 3:1 and 1:1, respectively. From these images one observes that the organic solvent used to dissolve PCL could not effectively disperse the BCP particles. Thus, the BCP particles have agglomerated into larger secondary aggregates. In Table 2 it is shown the main morphological parameters measured for the analyzed samples. We observed that the increase of the PCL:BCP weight ratio leads to a structure with a lower MPS (mean pore size).

The object perimeter / area ratio (OPAR) is a basic parameter in characterizing the complexity of a structure. According to Frisullo et al. [26], this parameter indicates the pore size distribution within the solid; the higher the value, more finely distributed are the pores within the sample. We noticed that the increase of the PCL:BC weight ratio leads to a structure with a higher value of OPAR. This observation matches with the lower MPS measured for the scaffold obtained using a PCL:BCP weight ratio of 3:1.  $V_V$  is the volume fraction of the ceramic phase. Increasing the aforementioned ratio leads to the decrease of the volume fraction of the ceramic phase.

The fragmentation index (FI) is an inverse index of connectivity and it is a measure of the relative convexity or concavity of the pores [27]. It was originally applied by Hahn et al. [28] to 2D images of trabecular bone. A low FI value signifies better-connected solid lattices and has a negative index. On the other hand, a high FI indicates a more disconnected structure and has a positive index [28]. We noticed that both analyzed samples present disconnected structures, with close values of FI. However, it is worth to stress that the polymer phase was not taken into consideration in the  $\mu$ -CT tests.

The fractal dimension (FD) is an indicator of the complexity of a structure, which quantifies how that structure fills space. A fractal object tends to fill up space and its dimension value is not an integer. Based on this concept, some researchers have proposed that different aspects of the microstructure of materials can be described as a fractal. With regard to porosity, FD informs us about the spatial distribution of pores within the sample [29].

There are many specific definitions of fractal dimension and the computational ways to obtain them vary considerably [30, 31]. In the software used (CTAnalyser), FD is calculated using the Kolmogorov or “box counting” method. Since the morphological parameters presented in this work were

measured after considering a series of slices along the analyzed volume for all samples, FD must lie between 1 and 2. As shown in Table 2, the higher the PCL:BC weight ratio, higher is FD.

### **MTT and Alkaline Phosphatase Activity assays**

Figure 3 shows the amount of viable cells of the composites determined by the MTT assay after incubation times of three and seven days. The amount of viable cells at three and seven days of incubation significantly depends on the content of the Ang-(1-7) ( $p < 0.05$ ). We observed that the A1 and B1 groups exhibit lower cell viability than C1. It is worth to point out that the presence of the Ang-(1-7) has decreased the measured amount of viable cells in all analyzed culture media.

The alkaline phosphatase production of the osteoblasts in presence of the Ang-(1-7) composites was similar to that observed for the control cells (Figure 4). The osteoblasts, when in contact for three days with the PCL composites, also presented an alkaline phosphatase production similar to that observed for the control cells. For an incubation time of seven days, the A1 and B1 groups exhibit significantly lower alkaline phosphatase production than A, B, C1 and the control sample.

## DISCUSSION

The complex architecture and variability of properties of bone tissue (e.g. porosity, pore size, mechanical properties and cytokines gradient features), as well as differences in age, nutritional state, activity and disease status of individuals, establish a major challenge in fabricating scaffolds that meet the needs of specific repair sites in specific patients [32]. A key issue to compensate the complexity of bone tissue is to achieve a fast replacement of bone substitute with new mature bone. In this work an organic-inorganic composite material suitable for bone tissue engineering and based on BCP, PCL and angiotensin-(1-7) was studied. Therefore, the strategy of obtaining highly porous three-dimensional scaffolds from biphasic ceramics and degradable polymers is a promising method to develop composite systems for application in hard tissue regeneration [2]. PCL is a semi-crystalline, bioresorbable polymer which belongs to the aliphatic polyester group. It is well known for its slow degradation rate [6]. Because of this property it has been widely used in several clinical applications, including as temporary joint spacer and matrix in the fabrication of composite bone substitutes [9].

According to LeGeros [33]  $\beta$ -TCP is a bioactive and biocompatible ceramic that has a stoichiometry similar to amorphous biological precursors to bone. It is protein free and elicits minimal immunological and foreign body reactions. In addition, calcium phosphates also possess osteoconductive abilities and can bind directly to bone. The presence of BCP in the composite material beneficially offsets the acidic release from the PCL through the alkaline calcium phosphate and mitigates erosion events associated with the release of acidic degradation products. *In vivo* and *in vitro* measurements of pH in bone chambers have shown that the pH drop is about 0.2 near the eroding polymer [2]. The BCP provides mechanical anchorage for osteoblastic cells and a more favorable surface for cell attachment, which determines the ability of the material to support bone ingrowth or to act as a biological template [3]. A bone tissue engineering scaffold should be able in some cases to provide mechanical support at the implantation site for up to a year postoperatively [6]. During this time, neo-tissues would ingress the site, form neo-bone and remodel. In this study, PCL scaffolds intended for use in bone tissue engineering were obtained by solvent casting and particulate leaching techniques. This combined method has been reported to be a promising method to obtain porous structures suitable for bone tissue engineering [9]. As an apatite/polymer composite, the PCL/BCP we obtained mimics the components of natural bones, where BCP is distributed in the PCL matrix (see Figures 1 and 2).

The porosity can be defined as the amount of *void space in a solid* and it is a geometrical property independent of the material. According to Karageorgiou and Kaplan (2005) [34], the minimum requirement for pore size is considered to be 100  $\mu\text{m}$  due to cell size, migration requirements and transport. However, pore sizes greater than 300  $\mu\text{m}$  are recommended, due to the improved formation of new bone and capillaries [35]. According to Chuenjittkuntaworn et al. [6], excellent ingrowth of bone cells has been observed in scaffolds with pore sizes greater than 400 $\mu\text{m}$ . As presented in Table 2, the  $\mu\text{-CT}$  tests revealed mean pores sizes of about  $486 \pm 37$  and  $571 \pm 23$   $\mu\text{m}$ . Because of vascularization, pore size has been shown to affect the progression of osteogenesis. Small pores favored hypoxic conditions and induced osteochondral formation before osteogenesis, while large pores, that are well vascularized, lead to direct osteogenesis (without preceding cartilage formation). Our results on the scaffold porosity do not agree with those obtained by Chuenjittkuntaworn et al. [6]. They showed that the addition of BC particles in PCL scaffolds did not affect the scaffolds porosities. Pores are necessary for bone tissue formation because they allow migration, proliferation and ALP activity of osteoblasts and mesenchymal cells [7]. Nevertheless, pore diameter is not the only one important parameter in an experimental setting; other parameters, including implant chemistry, implant topography, resorption and pore interconnectivity must be considered.

It was proposed by some researchers that in resorbable materials, pore density and interconnection density are more important than pore size [32, 34]. Thus, an incomplete pore interconnection could constrain the overall biological system and limit the blood vessel invasion, which is essential for tissue ingrowth into the porous scaffolds [36]. According to Bohner and Baumgart (2004) [37], bone ingrowth should not be affected by the pore diameter as long as the structure is fully interconnected and the pore interconnections have a diameter larger than 50  $\mu\text{m}$ . Although the increase of both porosity and pore size induce bone ingrowth, it compromises the structural integrity of the scaffold [31, 37, 38].

Based on the results presented in this study, we believe that the lower is the fragmentation index, the higher is the osteogenic differentiation *in vitro* (ALP activity). ALP activity is an important parameter to measure the osteogenic differentiation [39]. However, we observed that both samples analyzed by  $\mu\text{-CT}$  presented close values of FI and no considerable differences in the ALP activity (see Figure 4). This may be related to the hydrophobic character of BCP and PCL, which results in a non-homogeneous

distribution of the BCP particles within the PCL matrix. Organic solvents normally used to dissolve PCL could not effectively disperse the BCP particles [39]. Therefore, the BCP particles have agglomerated into larger secondary aggregates (see Figure 1 and 2). These BCP agglomerates act as a source of failure, decreasing pore interconnectivity. On the basis of these results we should use a surfactant to mediate the interaction between the hydrophilic BCP and the hydrophobic PCL, to create a homogeneous dispersion of BCP particles within the polymer matrix [40].

Schlienger et al. [41] observed that the long term use of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors is associated with a decrease in the risk of bone fracture. However, the actual mechanism by which ACE inhibitors influence bone mass is not well understood. Some researchers believe that this therapeutic effect takes place due to the decrease of angiotensin II levels [42]. Angiotensin (Ang II) is a biologically active octapeptide, and a primary effector RAS. It mediates hemodynamic, growth, the inflammatory process, and the metabolic response in numerous tissues, including the heart, arteries, liver, bone and kidney. This compound acts through two distinct subtypes of cell-surface receptors, the AT1 and AT2 receptors, while osteoblasts express both receptors [14, 43].

The AT1 receptor is required for Ang II induced IL-6 secretion in osteoblasts. IL-6 plays an indispensable role in bone metabolism, which is regulated by a balance between bone formation and resorption by the osteoclasts. IL-6 is recognized to act as a bone resorbing factor, inducing osteoclast formation and stimulating bone resorption [13]. It is well established that Angiotensin-(1-7) often counteracts the effects caused by angiotensin II. This makes this compound an important study subject in both experimental and pharmacological areas [44].

There is now a model concept about the RAS which has been established in human and rat. This concept says that the RAS has two axes, the angiotensin-converting enzyme (ACE)-AngII type (AT) 1 receptor axis and the angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE 2)-Ang-(1-7)-Mas axis. The former axis performs the vasoconstrictive, proliferative and pro-inflammatory functions through the major player AngII, the latter axis always counteracts on the effects of former through the major effector, Ang-(1-7). Ang-(1-7) inhibits a lot of processes stimulated by Ang II, such as vasoconstriction, proliferation of osteoblast-rich populations of cells, prothrombotic actions and fibrogenic responses [43, 45]. All of those processes stimulated by Ang II are mediated by AT 1 receptor, and Ang-(1-7) takes inhibitory effects via a specific receptor, the G-protein-coupled receptor Mas [39]. The Mas receptor is

reported to antagonize AT1 receptor through the formation of a hetero-oligomeric complex in cultured mammalian cells [46, 47]. The present study clearly demonstrates a negative correlation between cell proliferation and Ang-(1-7) content (see Figure 3). However, this negative correlation doesn't characterize the cytotoxic level [25] and could be used *in vivo* tests.

## CONCLUSION

In conclusion, we obtained by the solvent casting and particulate leaching methods highly porous three-dimensional biodegradable scaffolds from beta-tricalcium phosphate-hydroxyapatite bioceramic (BCP), PCL, and Angiotensin-(1-7). The obtained scaffolds presented suitable forms for filling bone defects. Furthermore, the *in vitro* tests revealed that the processed scaffolds have potential for use in drug delivery systems.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thanks for financially support by INCT-CNPq NanoBiofar and FAPEMIG, Brazilian agencies.

## REFERENCES

1. He J, Genetos DC and Leach JK, Osteogenesis and trophic factor secretion are influenced by the composition of hydroxyapatite/poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds, *Tissue Eng Part A* **16** (2010) 127-37.
2. Raucci MG, D'Antò V, Guarino V, Sardella E, Zeppetelli S, Favia P, et al, Biom mineralized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration, *Acta Biomater* **6** (2010) 4090-9.
3. Cao H and Kuboyama N, A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering, *Bone* **46** (2010) 386-95.
4. Xue W, Bandyopadhyay A and Bose S, Polycaprolactone coated porous tricalcium phosphate scaffolds for controlled release of protein for tissue engineering, *J Biomed Mater Res B Appl Biomaterials* **91** (2009) 831-8.
5. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS, Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* **27** (2006) 1399-409.
6. 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* **94** (2010) 241-51.
7. Ge Z, Jin Z, Cao T, Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration, *Biomed Mater* **3** (2008) 022001.
8. Porter JR, Ruckh TT, Papat KC, Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies, *Biotechnol Prog* **25** (2009) 1539-60.
9. Cao T, Ho KH and Teoh SH, Scaffold design and in vitro study of osteochondral coculture in a three-dimensional porous polycaprolactone scaffold fabricated by fused deposition modeling, *Tissue Eng* **9** (2003) S103-12.
10. Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR, Use of beta-blockers and risk of fractures, *JAMA* **292** (2004) 1326-32.
11. Lynn H, Kwok T, Wong SyS, Woo J and Leung PC, Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly Chinese, *Bone* **38** (2006) 584-588.
12. Reid IR, Gamble GD, Grey AB, Black DM, Ensrud KE, Browner WS, Bauer DC, Beta-Blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures, *J Bone Miner Res* **20** (2005) 613-8.
13. Guo L, Wang M, Zhang ZY, Hao L, Lou BY, Li XY, et al., Angiotensin II induces interleukin-6 synthesis in osteoblasts through ERK1/2 pathway via AT1 receptor, *Arch Oral Biol* **56** (2011) 205-11.
14. Izu Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, et al., Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass, *J Biol Chem* **284** (2009) 4857-64.

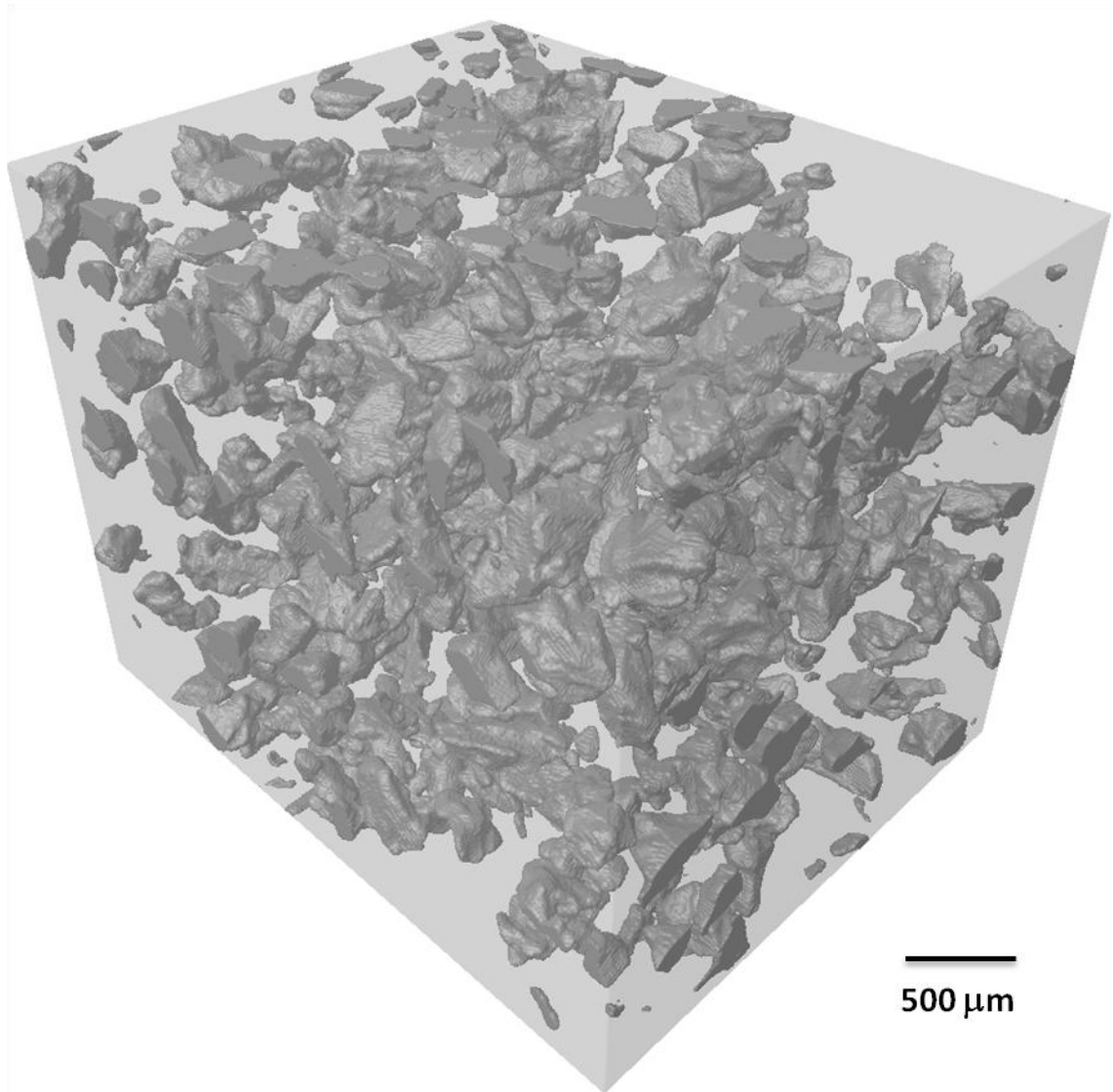
15. Santos RA and Ferreira AJ, Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system, *Curr Opin Nephrol Hypertens* **16** (2007) 122-8.
16. Ferreira AJ, Jacoby BA, Araújo CA, Macedo FA, Silva GA, Almeida AP, et al, The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292** (2007) H1113-9.
17. Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC and Ferrario CM, Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide, *Proc Natl Acad Sci* **85** (1988) 4095-8.
18. Santos RA, Campagnole-Santos MJ and Andrade SP, Angiotensin-(1-7): an update, *Regul Pept* **91** (2000) 45-62, Review.
19. Rowe BP, Saylor DL, Speth RC and Absher DR, Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain, *Regul Pept* **56** (1995) 139-46.
20. Garcia NH and Garvin JL, Angiotensin 1-7 has a biphasic effect on fluid absorption in the proximal straight tubule, *J Am Soc Nephrol* **5** (1994) 1133-8.
21. Vallon V, Heyne N, Richter K, Khosla MC and Fechter K, [7-D-ALA]-angiotensin 1-7 blocks renal actions of angiotensin 1-7 in the anesthetized rat, *J Cardiovasc Pharmacol* **32** (1998) 164-7.
22. Zhu Z, Zhong J, Zhu S, Liu D, Van Der Giet M and Tepel M. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-induced signal transduction, *J Cardiovasc Pharmacol* **40** (2002) 693-700.
23. Raizada MK and Ferreira AJ, ACE2: a new target for cardiovascular disease therapeutics, *J Cardiovasc Pharmacol* **50** (2007) 112-9.
24. Mikos AG, Lyman MD, Freed LE and R Langer R, Wetting of poly ( L -lactic acid) and poly ( DL -lactic-co glycolic acid) foams for tissue culture, *Biomaterials* **15** (1994) 55-8.
25. ISO, Biological evaluation for medical devices, Part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods, International Standards Organization, (1994) ISO/10993-5, London.
26. Frisullo P, Conte A and Nobile NA, A novel approach to study biscuits and breadsticks using X-ray computed tomography, *J Food Science* **75** (2010) E353-8.
27. Lim KS and Barigou M, X-ray micro-computed tomography of cellular food products, *Food Res Internat* **37** (2004) 1001-12.
28. Amling M, Hahn M, Wening VJ, Grote HJ, Delling G, The microarchitecture of the axis as the predisposing factor for fracture of the base of the odontoid process, A histomorphometric analysis of twenty-two autopsy specimens, *J Bone Joint Surg Am* **76** (1994) 1840-6.
29. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M and Delling G, Trabecular bone pattern factor-a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture, *Bone* **13** (1992) 327-30.
30. Chappard D, Legrand E, Haettich B, Chalès G, Auvinet B, Eschard JP, et al, Fractal dimension of trabecular bone: comparison of three histomorphometric computed techniques for measuring the architectural two-dimensional complexity, *J Pathol* **195** (2001) 515-21.
31. Cross SS, The application of fractal geometric analysis to microscopic images, *Micron* **25** (1994) 101-13.

32. Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbühl R, Böhner M and Richter W, Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study, *Acta Biomater* **4** (2008) 1904-15.
33. LeGeros RZ, Calcium phosphate-based osteoinductive materials, *Chem Rev* **108** (2008) 4742-53.
34. Karageorgiou V and Kaplan D, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* **26** (2005) 5474-91, Review.
35. von Doernberg MC, von Rechenberg B, Böhner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller R, et al, In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes, *Biomaterials* **27** (2006) 5186-98.
36. Roohani-Esfahani SI, Nouri-Khorasani S, Lu Z, Appleyard R, Zreiqat H, The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite-PCL composites, *Biomaterials* **31** (2010) 5498-509.
37. Böhner M and Baumgart F, Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes, *Biomaterials* **25** (2004) 3569-82.
38. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS, Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* **27** (2006) 1399-409.
39. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al, BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis, *J Biomed Mater Res* **39** (1998) 190-9.
40. Kim HW, Biomedical nanocomposites of hydroxyapatite/polycaprolactone obtained by surfactant mediation, *J Biomed Mater Res A* **83** (2007) 169-77.
41. Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR, Use of beta-blockers and risk of fractures, *JAMA* **292** (2004) 1326-32.
42. Asaba Y, Ito M, Fumoto T, Watanabe K, Fukuhara R, Takeshita S, et al, Activation of Renin-Angiotensin System induces osteoporosis independently of hypertension, *J Bone Mineral Res* **24** (2009) 241-50.
43. Iusuf D, Henning RH, Van Gilst WH, Roks AJ, Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives, *Eur J Pharmacol* **585** (2008) 303-12.
44. Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, et al, Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts, *FASEB J* **22** (2008) 2465-75.
45. Hiruma Y, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H, Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae, *Biochem Biophys Res Commun* **230** (1997) 176-8.
46. Nie W, Yan H, Li S, Zhang Y, Yu F, Zhu W, et al, Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells, *Mol Immunol* **46** (2009) 355-61.

47. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al, G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor, *Circulation* **111** (2005) 1806-13.

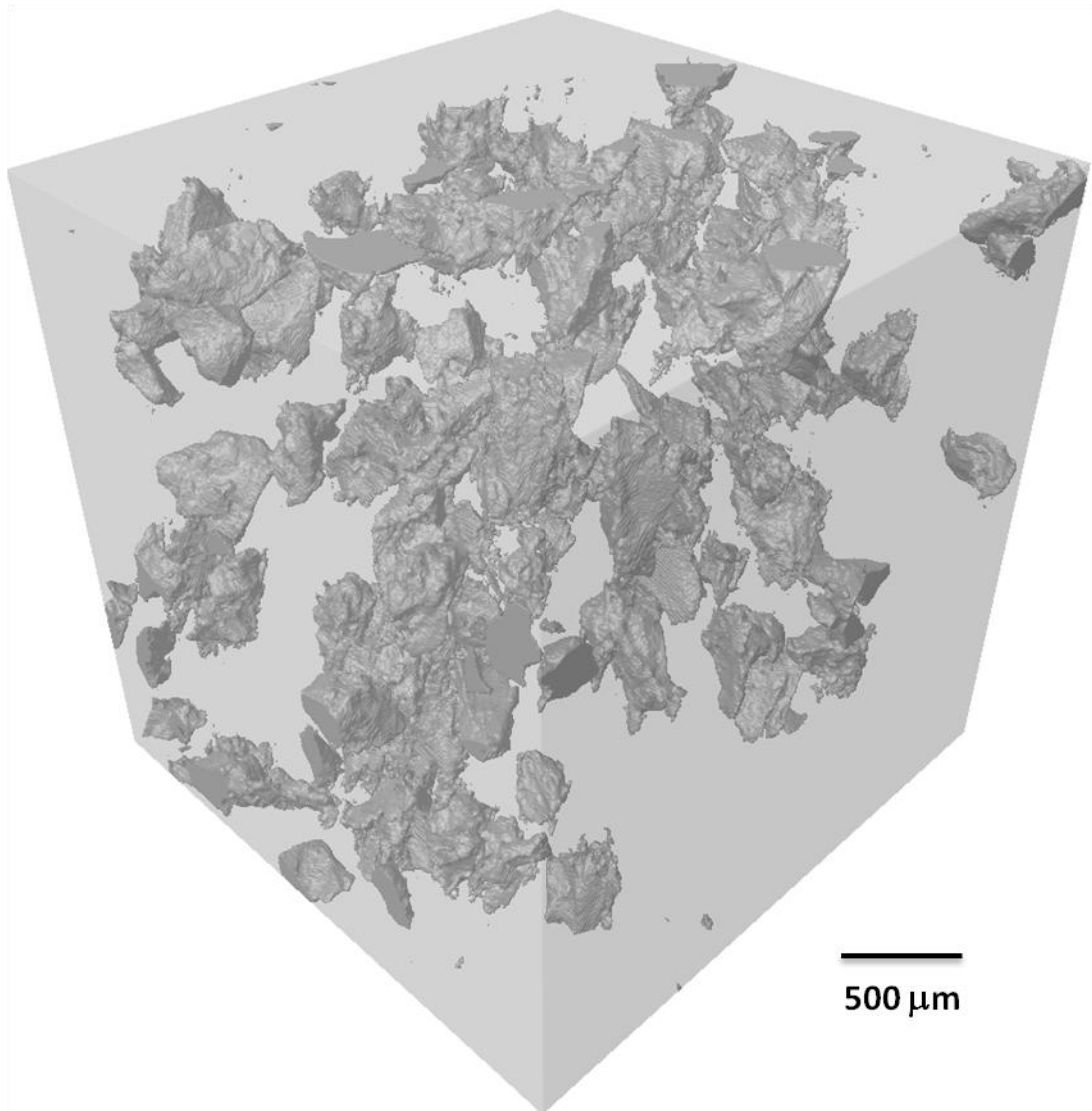
**TABLE 1.** Weight ratios of the components of PCL:βTCP/HA scaffolds

Groups	PCL:βTCP/HA (w/w)	Angiotensin-(1-7)
A	1/1	No
A1	1/1	Yes
B	3/1	No
B1	3/1	Yes
C	1/0	No
C1	1/0	Yes



**Figure 1** . Three dimensional distribution of the ceramic phase in the polymeric matrix (PCL:BC 1:1).

Figure generated from the  $\mu$ -CT data.

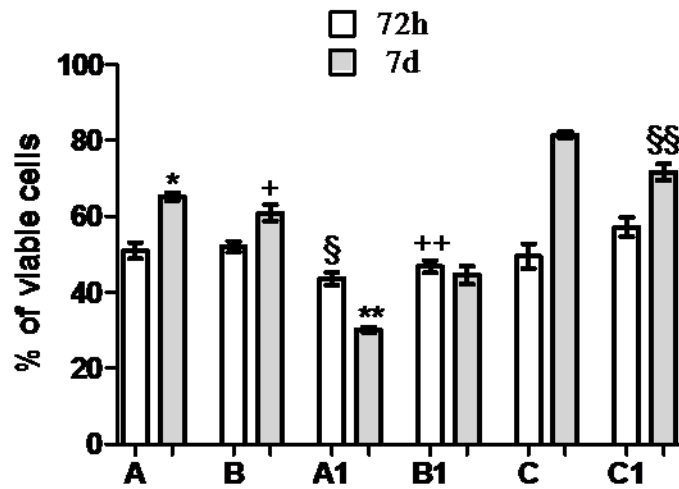


**Figure 2** . Image three dimensional generated from the  $\mu$ -CT data showing the distribution of the ceramic phase in the polymeric matrix (PCL:BC 3:1).

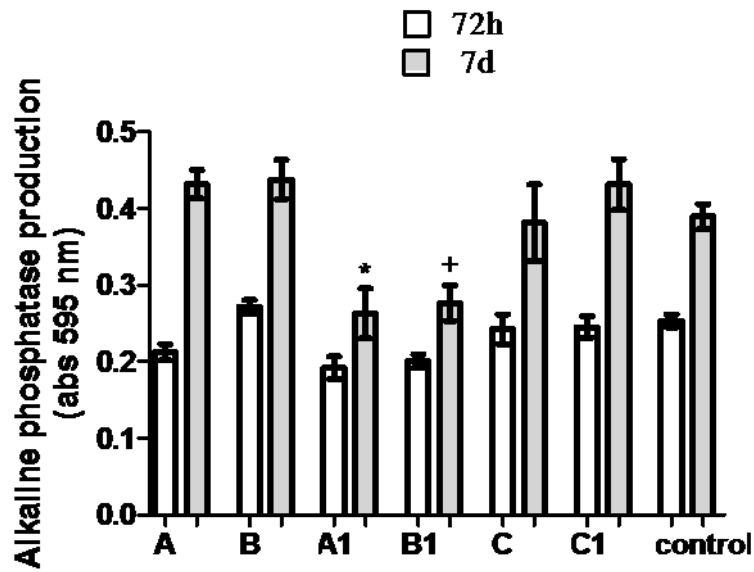
**TABLE 2:** Main morphological parameters measured for the analyzed samples.

<b>Sample</b>	<b>MPS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>V_v</math> (%)</b>	<b>FI (<math>\mu\text{m}^{-1}</math>)</b>	<b>FD</b>	<b>OPAR (<math>\mu\text{m}^{-1}</math>)</b>
PCL-BC 1-1	$572 \pm 23$	$11.7 \pm 0.5$	$0.010 \pm 0.001$	$1.063 \pm 0.003$	$0.035 \pm 0.001$
PCL-BC 3-1	$486 \pm 37$	$4.6 \pm 0.4$	$0.006 \pm 0.001$	$1.092 \pm 0.005$	$0.046 \pm 0.001$

\* MPS: mean pore size;  $V_v$ : volume fraction of the ceramic phase ; FI: fragmentation index; FD: fractal dimension;  
OPAR: object perimeter/area ratio.



**Figure 3.** Percentage of viable cells relative to the culture plate control following 72 h and 7 days' growth on composites (\* represents the significant difference of the composite A compared with A1, B1, and C; + represents the significant difference of the composite B compared with A, B, C, and C1; § represents the significant difference between A1 and C1 during three days; \*\* represents the significant difference of the composite A1 compared with all others during seven days; ++ represents the difference between B1 and C1, and §§ represents the difference between C and C1). Results represent mean  $\pm$  SD of eight samples from two separate experiments ( $p < 0.05$ ).



**Figure 4.** Alkaline phosphatase production of osteoblasts after three and seven days of incubation: cells showed no significant difference in presence of the composites (A, B, C and C1) when compared to control cells (\* represents the significant difference of the composite A1 compared with A, B, C1, and Control during seven days; + represents the significant difference of the composite B1 compared with A, B, and C1). Results represent mean  $\pm$  SD of eight samples from two separate experiments ( $p < 0.05$ ).

## 7. CONCLUSÃO

Pode concluir frente aos resultados obtidos:

- Obteve-se através das técnicas de lixiviação do sal e evaporação do solvente um arcabouço poroso tridimensional contendo biocerâmica (BC), policaprolactona (PCL) e angiotensina-(1-7).
- O arcabouço apresentou formato desejável para preenchimento de defeito ósseo.
- Os testes *in vitro* avaliando a viabilidade celular e secreção de fosfatase alcalina revelaram que o arcabouço desenvolvido apresentou moderada citotoxicidade.
- Quando adicionado ao arcabouço, a angiotensina-(1-7) diminui a proliferação de osteoblastos.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Frente aos resultados apresentados nesse trabalho deve-se destacar a dificuldade em definir a concentração de Angiotensina-(1-7) que está presente no compósito e a concentração deste fármaco que está sendo liberada. Pode-se observar que a técnica utilizada para mensurar o tamanho dos poros e a interconectividade apresentou a limitação de demonstrar somente a fase cerâmica do compósito excluindo assim a fase polimérica. Dessa forma, faz-se necessária a utilização de uma nova técnica para mensurar a interconectividade desse compósito, podendo ser utilizada uma avaliação do nível de hemoglobina que está presente nas diferentes sessões do compósito mensurando indiretamente a interconectividade desse material.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APPOLONI C.R., FERNANDES C.P., INNOCENTINI M.D.M., MACEDO A. Ceramic foams porous microstructure characterization by X-ray microtomography. *Materials Research*, v.7, n. 4, p. 557-564, 2004.
2. ASABA Y., ITO M., FUMOTO T., WATANABE K., FUKUHARA R., TAKESHITA S., NIMURA Y., ISHIDA J., FUKAMIZU A., IKEDA K. Activation of Renin-Angiotensin System induces osteoporosis independently of hypertension. *Journal of Bone and Mineral research*, v.24, n.3, p.241-250, 2009.
3. ASTM, American Society for Testing and Materials, STP 447.
4. BANDOW K., NISHIKAWA Y., OHNISHI T., KAKIMOTO K., SOEJIMA K., IWABUCHI S., KUROE K., MATSUGUCHI T. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1beta expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. *Journal Cell. Physiol*, v. 21, n. 2, p. 392–98, 2007.
5. BYRNE D.P., LACROIX D., PLANELL J.A., KELLY D.J., PRENDERGAST P.J. Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: application of mechanobiological models in tissue engineering. *Biomaterials*, v.28, n.36, p.5544-54, 2007.
6. CAO H. & KUBOYAMA N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering. *Bone*, v.46, n.2, p.386-95, 2010.
7. CAO H. & KUBOYAMA N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering. *Bone*, v.46, p.386-95, 2010.
8. CAPPUCCIO, F. P., KALAITZIDIS, R., DUNECLIFT, S., EASTWOOD, J. B. Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. *Journal Nephrol.*, v.13, p.169-177, 2000.
9. CHOI S., MARRA K. G., KUMTA P. N. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly( $\epsilon$ -caprolactone) composites. *Mat. Res. Bullet.*, v. 39, n. 3, p. 417-432, 2004.
10. 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. *Journal Biomed Mater Res A.*, v.94, n.1, p.241-51, 2010.
11. CIAPETTI G., AMBROSIO L., SAVARINO L., GRANCHI D., CENNI E., BALDINI N., PAGANI S., GUIZZARDI S., CAUSA F., GIUNTI A. Osteoblast growth and function in porous poly  $\epsilon$ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials*, v. 24, n. 21, p. 3815-3824, 2003.
  12. COOMBES A. G. A., RIZZI S. C., WILLIAMSON M., BARRALET J. E., DOWNES S., WALLACE W. A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*, v. 25, n. 2, p. 315-325, 2004.
  13. DHANARAJU M. D., VEMA K., JAYAKUMAR R., VAMSADHARA C. Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones. *Int. Journal Pharm.*, v. 268, n. 1-2, p. 23-29, 2003.
  14. DOBLARÉ M., GARCÍA J.M., GÓMEZ M.J. Modelling boné tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*, v.71, p.1809-40, 2004.
  15. FARBER L., TARDOS G., MICHAELS J.N. Use of X-ray tomography to study the porosity and morphology of granules. *Powder Technology*, v. 132, p. 57-63, 2003.
  16. FERNANDES J.S., APPOLONI C.R., FERNANDES C.P. Determinação de Parâmetros Microestruturais e Reconstrução de Imagens-3D de Rochas de Reservatório por Microtomografia de Raios X. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 11, n.1, p. 35-47, 2009.
  17. FERRARIO C.M. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v.20, p.1-6, 2011.
  18. GE Z., JIN Z., CAO T. Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. *Biomed Mater*, v.3, n.2, p. 022001, 2008.
  19. GUO L., WANG M. ZHANG Z.Y. HAO L. LOU B.Y., LI X.Y., LOO W.T., JIN L., CHEUNG M.N. Angiotensin II induces interleukin-6 synthesis in osteoblasts through ERK1/2 pathway via AT1 receptor. *Arch Oral Biol*, v.56, n.3, p.205-11, 2011
  20. HAGIWARA H., HIRUMA Y., INOUE A., YAMAGUCHI A., HIROSE S. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *Journal Endocrinol.*, v. 156, n.3, p. 543-50, 1998.

21. HATTON R., STIMPEL M., AND CHAMBERS T. Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption *in vitro*. *Journal Endocrinol.*, v. 152, p. 5–10, 1997.
22. HEARY R.F., SCHLENK R.P., SACCHIERI T.A., BARONE D., BROTEA C. Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. *Neurosurgery*, v.59, p.510-6, 2002.
23. HENCH L. L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v. 19, n. 16, p. 1419-1423, 1998.
24. HENRIKSEN S.S., DING M., VINTHER JUHL M., THEILGAARD N., OVERGAARD S. Mechanical strength of ceramic scaffolds reinforced with biopolymers is comparable to that of human bone. *Journal Mater Sci Mater Med.*, v.22, n.5, p.1111-8, 2011.
25. HOU Q., GRIJPMAN D. W., FEIJEN J. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials*, v. 24, n. 11, p. 1937-1947, 2003.
26. HUTMACHER D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, n.24, p.2529-43, 2000.
27. IUSUF D., HENNING R.H., VAN GILST W.H.,ROKS A.J. Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur Journal Pharmacol.*, v.585, n.2-3, p.303-12, 2008.
28. IZU Y., MIZOGUCHI F., KAWAMATA A., HAYATA T., NAKAMOTO T., NAKASHIMA K., INAGAMI T., EZURA Y., NODA M. Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. *Journal. Biol. Chem.*, v. 284, n.8, p. 4857-64, 2009.
29. JONES J.R, EHRENFRIED L.M, HENCH L.L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 964 - 973, 2006.
30. JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J. *Histologia Básica*. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
31. KARAGEORGIU V., KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterial*, v.26, p.5474-5491, 2005.
32. KASTEN P., BEYEN I., NIEMEYER P., LUGINBÜHL R., BOHNER M., RICHTER W.

- Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater.*, v.4, n.6, p.1904-15, 2008.
33. KHAN Y.M., KATTI D.S., LAURENCIN C.T. Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an in vitro evaluation. *Journal Biomed Mater Res A*, v.69, n.4, p.728-37, 2004.
  34. KIM H.W., KNOWLES J. C., KIM H. E. Hydroxyapatite/ poly ( $\epsilon$ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous scaffold for drug delivery. *Biomaterials*, v. 25, n. 7-8, p. 1279-1287, 2004.
  35. KIM S.S., SUN PARK M., JEON O., YONG CHOI C., KIM B.S. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, n.8, p.1399-409. 2006.
  36. LABET M. & THIELEMANS W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.*, v.38, p.3484-3504, 2009.
  37. LAM C.X., SAVALANI M.M., TEOH S.H., HUTMACHER D.W. Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions. *Biomed Mater.*, v.3, n.3, p.034108, 2008.
  38. LASSO P.R.O., VAZ C.M.P., NAIME, J.M. *Recomendações para utilização do microtomógrafo de raios X Sky Scan 1172 em ciências agrárias e biológicas*. São Carlos : Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. p. 22.
  39. LAVOIE J.L. & SIGMUND C.D. Minireview: overview of the renin-angiotensin system-an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*, v.144,n.6, p.2179-83, 2003.
  40. LEGEROS R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev*, v.108, n.11, p.4742-53, 2008.
  41. LI P., LEE P. D., LINDLEY T. C., MAIJER D. M., DAVIS G. R., G. R. ELLIOTT G. R. X-ray microtomographic characterisation of porosity and its influence on fatigue crack growth. *Advanced Engineering Material*, v. 8, n.6, p. 476-479, 2006.
  42. LYNN H., KWOK T., WONG SY.S. , WOO J., LEUNG P.C. Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly

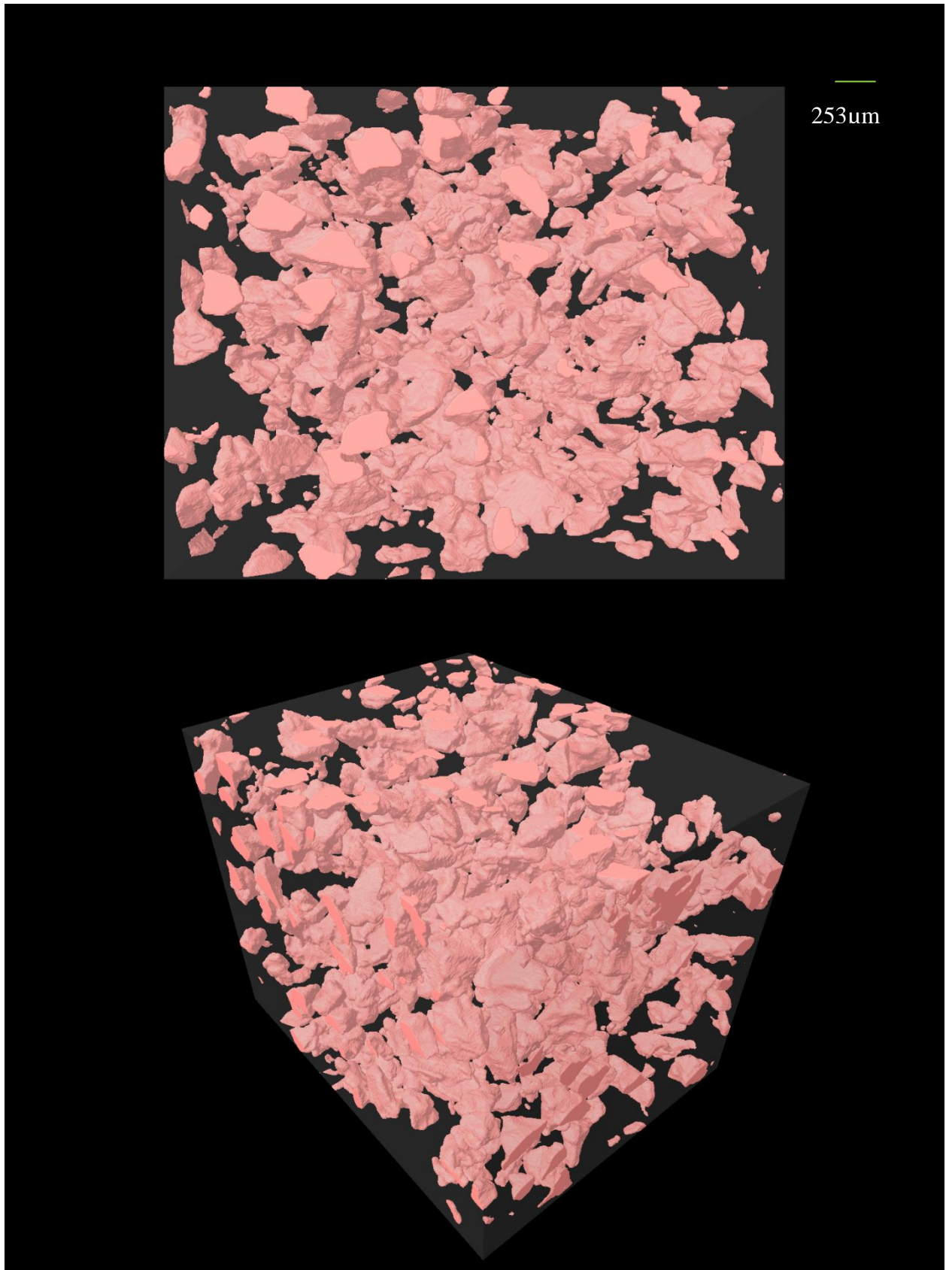
- Chinese. *Bone*, v.38, p.584-588, 2006.
43. MIKOS A.G., LYMAN M.D., FREED L.E., LANGER R. Wetting of poly(L -lactic acid) and poly(DL -lactic-co glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials*, v.15, p.55–8, 1994.
  44. NÄRHI T.O., JANSEN J.A., JAAKKOLA T., RUIJTER A., RICH J., SEPPÄLÄ J., YLI-URPO A. Bone response to degradable thermoplastic composite in rabbits. *Biomaterials*, v. 24, n. 10, p. 1697-1704, 2003.
  45. NISHIDA J. & SHIMAMURA T. Methods of reconstruction for bone defect after tumor excision: a review of alternatives. *Med Sci Monit.*, v.14, p. RA 107-13, 2008.
  46. PATARO A.L., OLIVEIRA M.F., TEIXEIRA K.I., TURCHETTI-MAIA R.M., LOPES M.T., WYKROTA F.H., SINISTERRA R.D., CORTÉS M.E. Polymer: bioceramic composites optimization by tetracycline addition. *Int Journal Pharm.*, v.336, n.1, p.75-81, 2007.
  47. PATARO, A. L. Avaliação Biológica de Compósitos de Polímeros Biodegradáveis em uma Matriz de Biocerâmica com Adição de Tetraciclina. 2005. 152 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica)- Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
  48. PHOGAT V.K. & AYLMOORE L.A.G. Evaluation of soil structure by using computer assisted tomography. *Soil Physics and Hydrology*, v. 27, p. 313-323, 1989.
  49. PORTER J.R., RUCKH T.T., POPAT K.C. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*, v.25, n.6, p.1539-60, 2009.
  50. RAI B., TEOTH S. H., HO K. H., HUTMACHER D. W., CAO T., CHEN F., YACOB K. The effect of rhBMP-2 on canine osteoblast onto 3D bioactive polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials*, v. 25, n. 24, p. 5499-5506, 2004.
  51. RATNER B.D., HOFFMAN A.S., SCHOEN F.J., LEMONS J.E. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine, 1996, 1st ed. San Diego: Academic Press, 484P.
  52. RATTANASAK U. & KENDALL K. Pore structure of cement/pozzolan composites by

- X-ray microtomography. *Cement and Concrete Research*, v. 35, n.4, p. 637-640, 2005.
53. REID I.R., GAMBLE G.D., GREY A.B., BLACK D.M., ENSRUD K.E., BROWNER W.S., BAUER D.C. Beta-Blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. *Journal Bone Miner Res* , v.20, p.613-8, 2005.
  54. REJNMARK, L., VESTERGAARD, P., MOSEKILDE, L. Treatment with  $\beta$ -blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *Journal Hypertens.*, v.24, p.581-589, 2006.
  55. RESNICK, L. M., LARAGH, J. H., SEALEY, J. E., ALDERMAN, M. H. Divalent cations in essential hypertension: relations between serum ionized calcium, magnesium, and plasma renin activity. *N. Engl. Journal Med.*, v.309, p.888-891, 1983.
  56. RIPAMONT, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, v.17,n. 1, p. 31-35, 1996.
  57. RIPAMONTI U., DUNEAS N. Tissue Engineering of Bone by Osteoinductive Biomaterials. *MRS Bulletin*, v. 21, n. 11, 1996.
  58. SAKAI K., AGASSANDIAN K., MORIMOTO S., SINNAYAH P., CASSELL M. D., DAVISSON R. L., SIGMUND C. D. Local production of angiotensin II in the subfornical organ causes elevated drinking. *Journal Clin. Investig.*, v. 117,n.4, p. 1088–95, 2007
  59. SALGADO A.J., COUTINHO O.P., REIS R.L. Bone tissue engineering : State of the art and future trends. *Macromol Biosci.*, v.4, p743-765, 2004.
  60. SANADA M., TAGUCHI A., HIGASHI Y., TSUDA M., KODAMA I., YOSHIZUMI M., OHAMA K. Forearm endothelial function and bone mineral loss in postmenopausal women. *Atherosclerosis.*, V.176, n.2, p.387-92, 2004.
  61. SANTOS R.A., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., ANDRADE S.P. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept.*, v.91, n.1-3, p.45-62, 2000.
  62. SANTOS R.A., CASTRO C.H., GAVA E., PINHEIRO S.V., ALMEIDA A.P., PAULA R.D., CRUZ J.S., RAMOS A.S., ROSA K.T., IRIGOYEN M.C., BADER M., ALENINA N., KITTEN G.T., FERREIRA A.J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in

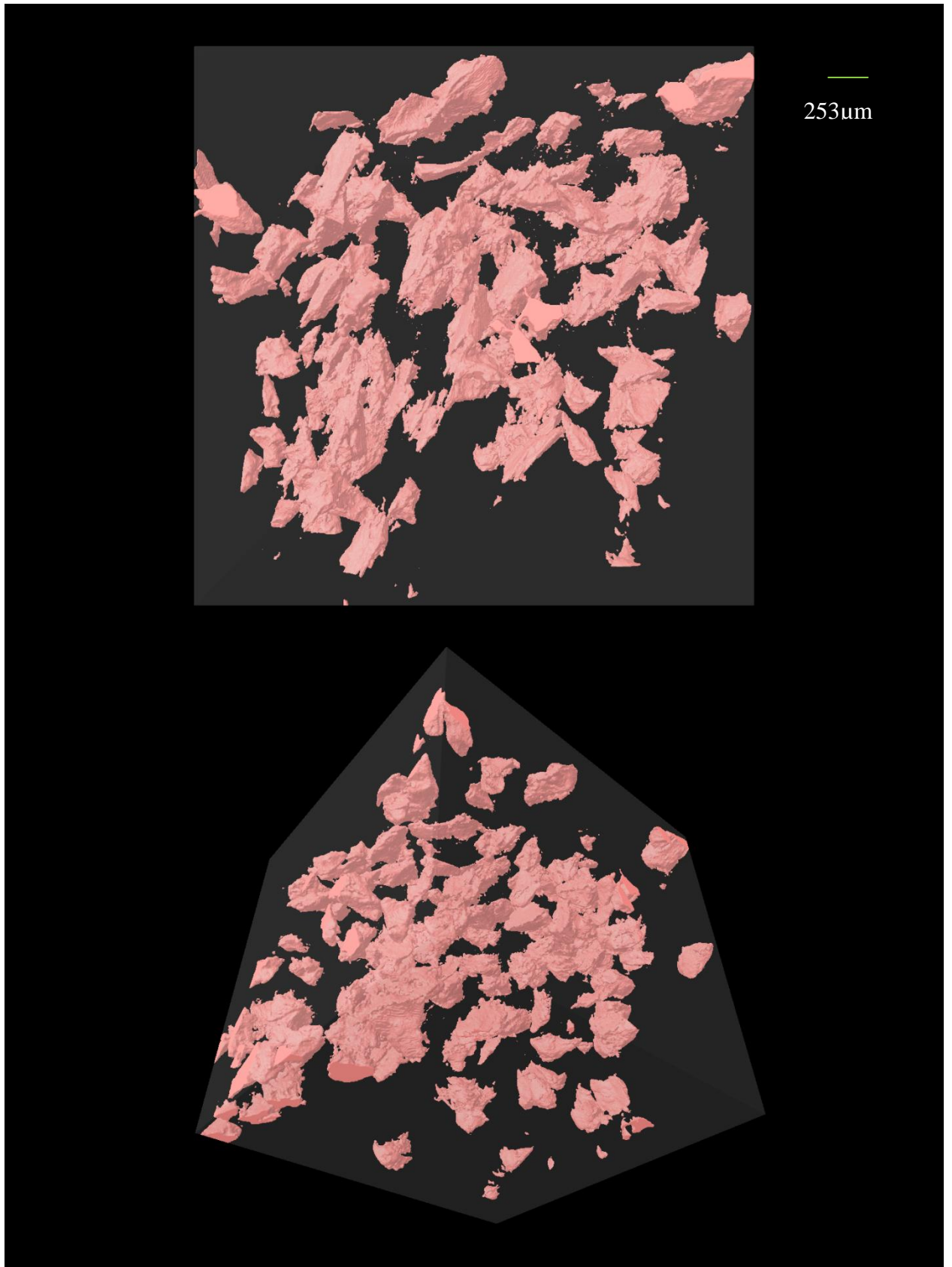
- angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*, v.47, n.5, p.996-1002, 2006.
63. SANTOS R.A., FERREIRA A.J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, v.16, n.2, p.122-8, 2007.
  64. SCHLIENGER R.G., KRAENZLIN M.E., JICK S.S., MEIER C.R. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA*, v. 292, n.11, p.1326-32, 2004.
  65. SCHOOF M.W., VAN DER KLIFT M., HOFMAN A., DE LAET C.E., HERINGS, R.M., STIJNEN, T., POLS, H.A., STRICKER, B.H. Thiazide diuretics and the risk for hip fracture. *Ann. Intern. Med.*, v.139, p.476-482, 2003.
  66. SEMPLE P.F. & MORTON J.J. Angiotensin II and angiotensin III in rat blood. *Circ. Res.*, v.38, p.122–126, 1976.
  67. SEMPLE P.F., BOYD A.S., DAWES P.M., MORTON J.J. Angiotensin II and its heptapeptide (2–8), hexapeptide (3–8), and pentapeptide (4–8) metabolites in arterial and venous blood of man. *Circ. Res.*, n.39, p. 671–678, 1976.
  68. SHIMIZU H., NAKAGAMI H., OSAKO M.K., NAKAGAMI F., KUNUGIZA Y., TOMITA T., YOSHIKAWA H., RAKUGI H., OGIHARA T., MORISHITA R. Prevention of osteoporosis by angiotensin-converting enzyme inhibitor in spontaneous hypertensive rats. *Hypertens Res.*, v.32, n.9, p.786-90, 2009.
  69. SIEGBAHN, K. *Alpha-, Beta- And Gamma-Ray Spectroscopy*. Amsterdam : North-Holland Publishing Company, v. 1, p. 37-76, 1965.
  70. SINHA V.R., BANSAL K., KAUSHIK R., KUMRIA, R., TREHAN A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. Journal Pharm.*, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.
  71. SKYSCAN. *Desktop X-Ray Microtomography*. Aartselaar (Bélgica) : s.n., 2005. p. 53, Manual de instrução do equipamento SkyScan 1172.
  72. TADDEI P., DI FOGGIA M., CAUSA F., AMBROSIO L., FAGNANO C. In vitro bioactivity of poly(epsilon-caprolactone)-apatite (PCL-AP) scaffolds for bone tissue engineering: the influence of the PCL/AP ratio. *Int Journal Artif Organs*, v.29, n.7, p.719-25, 2006.
  73. VALERIO P., PEREIRA M.M., GOES A.M., LEITE M.F. The effect of ionic products

- from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, v.25, n.15, p.2941-8, 2004.
74. VAN NATTA F.J., HILL J.W., CARRUTHERS W.H. Polymerization and ring formation,  $\epsilon$ -caprolactone and its polymers. *Journal Am. Chem. Soc.*, v.56, p. 455-9, 1934.
  75. WANG Y.W., WU Q., CHEN J., CHEN G.Q. Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction. *Biomaterials*, v.26, n.8, p.899-904, 2005.
  76. WILLIAMS O.L. Gray's anatomy. 38 ed. Churchill Livingstone, 1995.
  77. WITTE Y. DE, CNUUDE V., PIETERS K., MASSCHAELE B., DIERICK M., VLASSENBROECK J. , VAN HOOREBEKE L., JACOBS P. X-ray Micro-CT Applied to Natural Building Materials and Art Objects. *X-Ray Spectrometry*, v. 37, p. 383-387, 2008.
  78. WOODRUFF M.A., HUTMACHER D.W. The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p.1217–1256, 2010.
  79. XUE W., BANDYOPADHYAY A., BOSE S. Polycaprolactone coated porous tricalcium phosphate scaffolds for controlled release of protein for tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v.91, n.2, p.831-8, 2009.
  80. PI0602372-0. SANTOS R.A., MILLAN R.D.S., SEGURA M.E.C., PATARO, A.L. OLIVEIRA M.F., LOPES M.T.P., TURCHETTI MAIA R.M.M. Processo de preparação de compósitos em base de biocerâmicas e polímeros biodegradáveis, contendo antibióticos e angiotensina (1-7), encapsulados ou não, micro ou nanoparticulados, para restituição tecidual de produtos derivados.

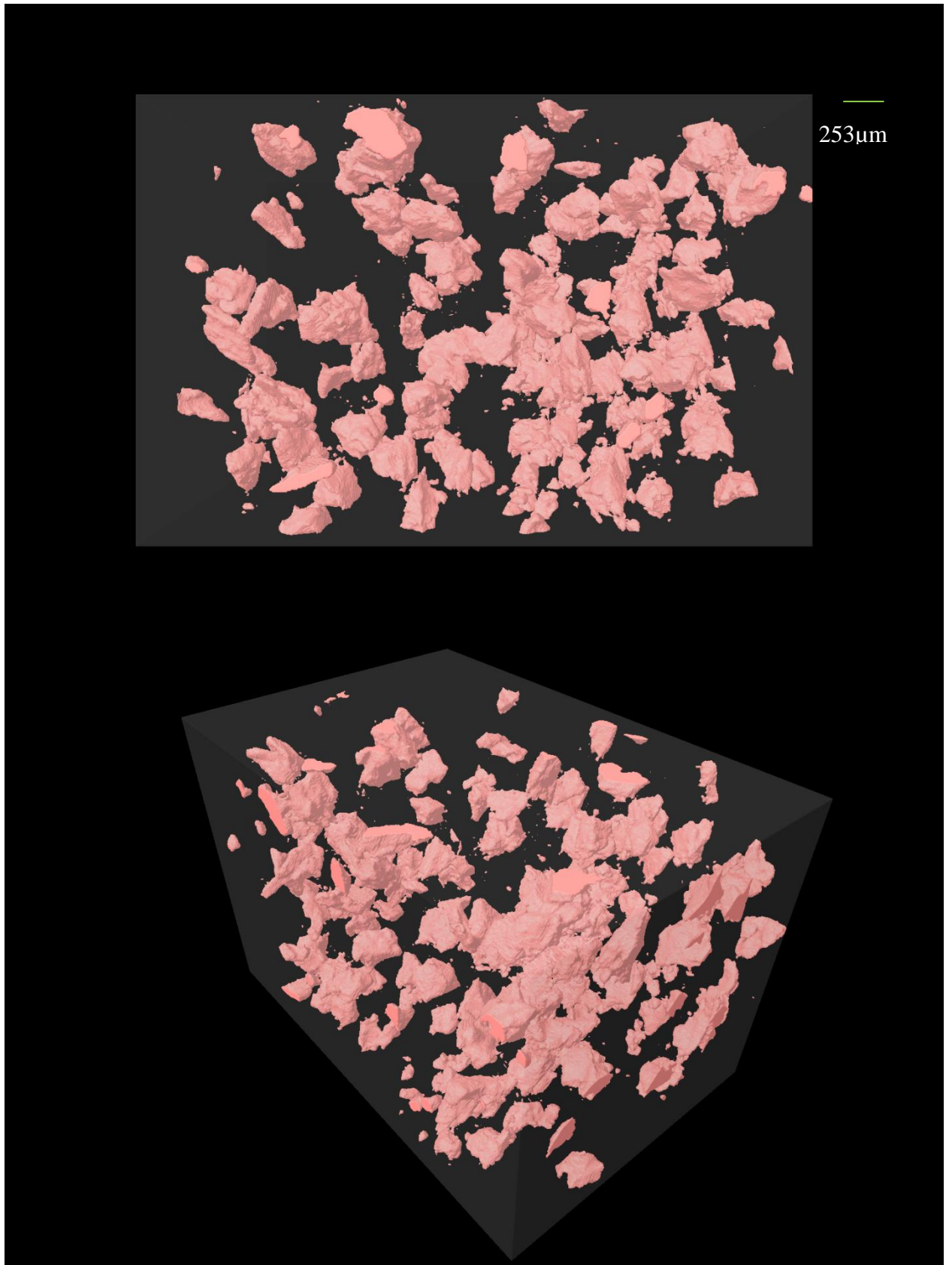
## 10. ANEXOS



ANEXO 1. Microtomografia do compósito PCL:BCP (1:1).



ANEXO 2. Microtomografia do compósito PCL:BCP (3:1).



ANEXO 3. Microtomografia do compósito PCL:BCP (3:1) com Ang-(1-7).

TABELA ANALIZADA	MTT				
Repeated Measures ANOVA					
P value	P<0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	12				
F	57.16				
R squared	0.8909				
Was the pairing significantly effective?					
R squared	0.02769				
F	2.871				
P value	0.0102				
P value summary	*				
Is there significant matching? (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	16800	11	1527		
Individual (between rows)	537.0	7	76.72		
Residual (random)	2057	77	26.72		
Total	19390	95			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
A vs Column B	-14.22	7.780	Yes	***	-22.96 to -5.480
A vs B	-1.003	0.5487	No	ns	-9.740 to 7.735
A vs Column D	-9.918	5.427	Yes	*	-18.66 to -1.180
A vs A1	7.364	4.030	No	ns	-1.374 to 16.10
A vs Column F	20.87	11.42	Yes	***	12.13 to 29.61
A vs B1	4.226	2.312	No	ns	-4.512 to 12.96
A vs Column H	6.418	3.512	No	ns	-2.320 to 15.16
A vs C	1.438	0.7868	No	ns	-7.300 to 10.18
A vs Column J	-30.47	16.67	Yes	***	-39.21 to -21.73
A vs C1	-6.190	3.387	No	ns	-14.93 to 2.548
A vs Column L	-20.71	11.34	Yes	***	-29.45 to -11.98
Column B vs B	13.21	7.231	Yes	***	4.477 to 21.95
Column B vs Column D	4.299	2.353	No	ns	-4.438 to 13.04
Column B vs A1	21.58	11.81	Yes	***	12.84 to 30.32

Column B vs Column F	35.09	19.20	Yes	***	26.35 to 43.82
Column B vs B1	18.44	10.09	Yes	***	9.705 to 27.18
Column B vs Column H	20.64	11.29	Yes	***	11.90 to 29.37
Column B vs C	15.66	8.567	Yes	***	6.918 to 24.39
Column B vs Column J	-16.25	8.892	Yes	***	-24.99 to - 7.512
Column B vs C1	8.028	4.393	No	ns	-0.7098 to 16.77
Column B vs Column L	-6.497	3.555	No	ns	-15.23 to 2.241
B vs Column D	-8.915	4.879	Yes	*	-17.65 to - 0.1776
B vs A1	8.367	4.578	No	ns	-0.3708 to 17.10
B vs Column F	21.87	11.97	Yes	***	13.13 to 30.61
B vs B1	5.228	2.861	No	ns	-3.509 to 13.97
B vs Column H	7.421	4.061	No	ns	-1.317 to 16.16
B vs C	2.441	1.336	No	ns	-6.297 to 11.18
B vs Column J	-29.46	16.12	Yes	***	-38.20 to - 20.73
B vs C1	-5.187	2.838	No	ns	-13.92 to 3.551
B vs Column L	-19.71	10.79	Yes	***	-28.45 to - 10.97
Column D vs A1	17.28	9.457	Yes	***	8.544 to 26.02
Column D vs Column F	30.79	16.85	Yes	***	22.05 to 39.52
Column D vs B1	14.14	7.740	Yes	***	5.406 to 22.88
Column D vs Column H	16.34	8.939	Yes	***	7.598 to 25.07
Column D vs C	11.36	6.214	Yes	**	2.618 to 20.09
Column D vs Column J	-20.55	11.24	Yes	***	-29.29 to - 11.81
Column D vs C1	3.728	2.040	No	ns	-5.009 to 12.47
Column D vs Column L	-10.80	5.908	Yes	**	-19.53 to - 2.059
A1 vs Column F	13.50	7.389	Yes	***	4.766 to 22.24
A1 vs B1	-3.139	1.717	No	ns	-11.88 to 5.599
A1 vs Column H	-0.9463	0.5178	No	ns	-9.684 to 7.791
A1 vs C	-5.926	3.243	No	ns	-14.66 to 2.811
A1 vs Column J	-37.83	20.70	Yes	***	-46.57 to - 29.09

A1 vs C1	-13.55	7.417	Yes	***	-22.29 to - 4.816
A1 vs Column L	-28.08	15.36	Yes	***	-36.82 to - 19.34
Column F vs B1	-16.64	9.107	Yes	***	-25.38 to - 7.905
Column F vs Column H	-14.45	7.907	Yes	***	-23.19 to - 5.712
Column F vs C	-19.43	10.63	Yes	***	-28.17 to - 10.69
Column F vs Column J	-51.34	28.09	Yes	***	-60.07 to - 42.60
Column F vs C1	-27.06	14.81	Yes	***	-35.80 to - 18.32
Column F vs Column L	-41.58	22.75	Yes	***	-50.32 to - 32.84
B1 vs Column H	2.192	1.200	No	ns	-6.545 to 10.93
B1 vs C	-2.788	1.526	No	ns	-11.53 to 5.950
B1 vs Column J	-34.69	18.98	Yes	***	-43.43 to - 25.96
B1 vs C1	-10.42	5.699	Yes	**	-19.15 to - 1.678
B1 vs Column L	-24.94	13.65	Yes	***	-33.68 to - 16.20
Column H vs C	-4.980	2.725	No	ns	-13.72 to 3.758
Column H vs Column J	-36.89	20.18	Yes	***	-45.62 to - 28.15
Column H vs C1	-12.61	6.899	Yes	***	-21.35 to - 3.870
Column H vs Column L	-27.13	14.85	Yes	***	-35.87 to - 18.39
C vs Column J	-31.91	17.46	Yes	***	-40.64 to - 23.17
C vs C1	-7.627	4.174	No	ns	-16.37 to 1.110
C vs Column L	-22.15	12.12	Yes	***	-30.89 to - 13.41
Column J vs C1	24.28	13.29	Yes	***	15.54 to 33.02
Column J vs Column L	9.753	5.337	Yes	*	1.015 to 18.49
C1 vs Column L	-14.52	7.948	Yes	***	-23.26 to - 5.787

<b>TABELA ANALIZADA</b>	<b>FOSFATASE ALCALINA</b>				
Repeated Measures ANOVA					
P value	P<0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	14				
F	15.21				
R squared	0.6849				
Was the pairing significantly effective?					
R squared	0.02005				
F	0.8440				
P value	0.5539				
P value summary	ns				
Is there significant matching? (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	0.8695	13	0.06688		
Individual (between rows)	0.02597	7	0.003710		
Residual (random)	0.4000	91	0.004396		
Total	1.295	111			
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
A vs Column B	-0.2193	6.617	Yes	***	-0.3381 to -0.1006
A vs B	-0.05906	1.782	No	ns	-0.1778 to 0.05970
A vs Column D	-0.2255	6.803	Yes	***	-0.3443 to -0.1068
A vs A1	0.02047	0.6175	No	ns	-0.09828 to 0.1392
A vs Column F	-0.05019	1.514	No	ns	-0.1689 to 0.06856
A vs B1	0.01163	0.3510	No	ns	-0.1071 to 0.1304
A vs Column H	-0.06423	1.937	No	ns	-0.1830 to 0.05453
A vs C	-0.02986	0.9009	No	ns	-0.1486 to 0.08889
A vs Column J	-0.1688	5.091	Yes	***	-0.2875 to -0.05000
A vs C1	-0.03268	0.9857	No	ns	-0.1514 to 0.08608
A vs Column L	-0.2191	6.608	Yes	***	-0.3378 to -0.1003
A vs control	-0.04096	1.236	No	ns	-0.1597 to 0.07779
A vs Column N	-0.1771	5.341	Yes	***	-0.2958 to -0.05829

Column B vs B	0.1603	4.835	Yes	***	0.04153 to 0.2790
Column B vs Column D	-0.006185	0.1866	No	ns	-0.1249 to 0.1126
Column B vs A1	0.2398	7.234	Yes	***	0.1211 to 0.3586
Column B vs Column F	0.1692	5.103	Yes	***	0.05040 to 0.2879
Column B vs B1	0.2310	6.968	Yes	***	0.1122 to 0.3497
Column B vs Column H	0.1551	4.679	Yes	***	0.03636 to 0.2739
Column B vs C	0.1895	5.716	Yes	***	0.07073 to 0.3082
Column B vs Column J	0.05059	1.526	No	ns	-0.06816 to 0.1693
Column B vs C1	0.1867	5.631	Yes	***	0.06791 to 0.3054
Column B vs Column L	0.0002728	0.00822 9	No	ns	-0.1185 to 0.1190
Column B vs control	0.1784	5.381	Yes	***	0.05963 to 0.2971
Column B vs Column N	0.04230	1.276	No	ns	-0.07646 to 0.1611
B vs Column D	-0.1665	5.022	Yes	***	-0.2852 to - 0.04772
B vs A1	0.07953	2.399	No	ns	-0.03923 to 0.1983
B vs Column F	0.008867	0.2675	No	ns	-0.1099 to 0.1276
B vs B1	0.07069	2.133	No	ns	-0.04806 to 0.1894
B vs Column H	-0.005169	0.1559	No	ns	-0.1239 to 0.1136
B vs C	0.02920	0.8807	No	ns	-0.08956 to 0.1480
B vs Column J	-0.1097	3.309	No	ns	-0.2285 to 0.009061
B vs C1	0.02638	0.7958	No	ns	-0.09237 to 0.1451
B vs Column L	-0.1600	4.827	Yes	***	-0.2788 to - 0.04126
B vs control	0.01810	0.5459	No	ns	-0.1007 to 0.1369
B vs Column N	-0.1180	3.559	No	ns	-0.2367 to 0.0007646
Column D vs A1	0.2460	7.421	Yes	***	0.1272 to 0.3648
Column D vs Column F	0.1753	5.289	Yes	***	0.05658 to 0.2941
Column D vs B1	0.2372	7.154	Yes	***	0.1184 to 0.3559
Column D vs Column H	0.1613	4.866	Yes	***	0.04255 to 0.2801
Column D vs C	0.1957	5.902	Yes	***	0.07691 to 0.3144
Column D vs Column J	0.05678	1.713	No	ns	-0.06198 to 0.1755

Column D vs C1	0.1929	5.818	Yes	***	0.07410 to 0.3116
Column D vs Column L	0.006457	0.1948	No	ns	-0.1123 to 0.1252
Column D vs control	0.1846	5.568	Yes	***	0.06581 to 0.3033
Column D vs Column N	0.04848	1.462	No	ns	-0.07028 to 0.1672
A1 vs Column F	-0.07066	2.132	No	ns	-0.1894 to 0.04809
A1 vs B1	-0.008836	0.2665	No	ns	-0.1276 to 0.1099
A1 vs Column H	-0.08470	2.555	No	ns	-0.2035 to 0.03406
A1 vs C	-0.05033	1.518	No	ns	-0.1691 to 0.06842
A1 vs Column J	-0.1892	5.708	Yes	***	-0.3080 to - 0.07047
A1 vs C1	-0.05315	1.603	No	ns	-0.1719 to 0.06561
A1 vs Column L	-0.2395	7.226	Yes	***	-0.3583 to - 0.1208
A1 vs control	-0.06143	1.853	No	ns	-0.1802 to 0.05732
A1 vs Column N	-0.1975	5.958	Yes	***	-0.3163 to - 0.07877
Column F vs B1	0.06183	1.865	No	ns	-0.05693 to 0.1806
Column F vs Column H	-0.01404	0.4234	No	ns	-0.1328 to 0.1047
Column F vs C	0.02033	0.6132	No	ns	-0.09843 to 0.1391
Column F vs Column J	-0.1186	3.576	No	ns	-0.2373 to 0.0001947
Column F vs C1	0.01752	0.5284	No	ns	-0.1012 to 0.1363
Column F vs Column L	-0.1689	5.094	Yes	***	-0.2876 to - 0.05013
Column F vs control	0.009231	0.2785	No	ns	-0.1095 to 0.1280
Column F vs Column N	-0.1269	3.827	Yes	*	-0.2456 to - 0.008102
B1 vs Column H	-0.07586	2.288	No	ns	-0.1946 to 0.04289
B1 vs C	-0.04150	1.252	No	ns	-0.1603 to 0.07726
B1 vs Column J	-0.1804	5.441	Yes	***	-0.2991 to - 0.06163
B1 vs C1	-0.04431	1.337	No	ns	-0.1631 to 0.07444
B1 vs Column L	-0.2307	6.959	Yes	***	-0.3495 to - 0.1120
B1 vs control	-0.05260	1.587	No	ns	-0.1714 to 0.06616
B1 vs Column N	-0.1887	5.692	Yes	***	-0.3074 to - 0.06993
Column H vs C	0.03436	1.037	No	ns	-0.08439 to 0.1531

Column H vs Column J	-0.1045	3.153	No	ns	-0.2233 to 0.01423
Column H vs C1	0.03155	0.9518	No	ns	-0.08720 to 0.1503
Column H vs Column L	-0.1548	4.671	Yes	***	-0.2736 to - 0.03609
Column H vs control	0.02327	0.7018	No	ns	-0.09549 to 0.1420
Column H vs Column N	-0.1128	3.403	No	ns	-0.2316 to 0.005933
C vs Column J	-0.1389	4.190	Yes	**	-0.2576 to - 0.02013
C vs C1	-0.002812	0.08484	No	ns	-0.1216 to 0.1159
C vs Column L	-0.1892	5.708	Yes	***	-0.3080 to - 0.07045
C vs control	-0.01110	0.3348	No	ns	-0.1299 to 0.1077
C vs Column N	-0.1472	4.440	Yes	**	-0.2659 to - 0.02843
Column J vs C1	0.1361	4.105	Yes	**	0.01732 to 0.2548
Column J vs Column L	-0.05032	1.518	No	ns	-0.1691 to 0.06844
Column J vs control	0.1278	3.855	Yes	*	0.009037 to 0.2465
Column J vs Column N	-0.008297	0.2503	No	ns	-0.1271 to 0.1105
C1 vs Column L	-0.1864	5.623	Yes	***	-0.3052 to - 0.06764
C1 vs control	-0.008285	0.2499	No	ns	-0.1270 to 0.1105
C1 vs Column N	-0.1444	4.355	Yes	**	-0.2631 to - 0.02562
Column L vs control	0.1781	5.373	Yes	***	0.05936 to 0.2969
Column L vs Column N	0.04202	1.268	No	ns	-0.07673 to 0.1608
control vs Column N	-0.1361	4.105	Yes	**	-0.2548 to - 0.01733



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- CETEA -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 167/2007**, relativo ao projeto intitulado "*Estudo do reparo ósseo por composto de poli( $\epsilon$ -Caprolactona) biocerâmica com testosterona*", que tem como responsável **Maria Esperanza Cortes Segura**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **19/ 12/2007**.

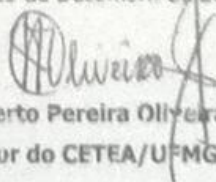
Este certificado expira-se em **19/ 12 / 2012**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 167/2007**, related to the project entitled "*Study of bone repair by composite poly( $\epsilon$ -Caprolactone) bioceramic with testosterone*", under the supervision of **Maria Esperanza Cortes Segura**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 19, 2007**.

This certificate expires in **December 19, 2012**.

Belo Horizonte, 21 de Dezembro de 2007.



**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II - 1º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@ppoa.ufmg.br](mailto:cetea@ppoa.ufmg.br)

Mod. Cert. VI B