
KELEN JORGE RODRIGUES DA COSTA

**Efeito da incorporação da Testosterona ao compósito de poli ácido
lático-co-glicólico/policaprolactona/Fosfato de cálcio bifásico na
resposta biológica *in vitro* e *in vivo***

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte**

2014

KELEN JORGE RODRIGUES DA COSTA

Efeito da incorporação da Testosterona ao compósito de poli ácido láctico-co-glicólico/policaprolactona/Fosfato de cálcio bifásico na resposta biológica *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia - área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés

Co-Orientadora: Célia Regina M. Lanza

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte

2014

C837e
2014
T

Costa, Kelen Jorge Rodrigues da.
Efeito da incorporação da Testosterona ao compósito de poli ácido láctico-coglicólico/policaprolactona/fosfato de cálcio bifásico na resposta biológica in vitro e in vivo / Kelen Jorge Rodrigues da Costa. – 2014.

229 f. : il.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés.
Co-orientadora: Célia Regina M. Lanza.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Gerais,
Faculdade de Odontologia.

1. Testosterona. 2. Regeneração óssea. 3. Materiais biocompatíveis. I. Cortés Segura, Maria Esperanza. II. Lanza, Célia Regina Moreira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV Título.

Ao **Nilson** pelo apoio, incentivo e amor incondicional.

Aos meus pais, **Antonio Carlos e Carminha**, exemplos de sabedoria.

E, especialmente, para **Laura**.

MEU AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora,

Prof^a Dr^a Maria Esperanza Cortés,

*Pelo exemplo de competência, paciência, conhecimento e determinação.
Pela preciosa orientação, ensinamentos recebidos, pela confiança em mim depositada. Pela dedicação, apoio, convivência, amizade e incentivo constante que foram fundamentais para a realização deste trabalho e contribuíram muito para o meu desenvolvimento e crescimento profissional e pessoal.*

Meu sincero respeito e gratidão

“Educar é ensinar a pensar sozinho”

À Prof^a Dr^a Célia Regina Moreira Lanza,

Exemplo de serenidade, doçura e dedicação, obrigada pelo incentivo e ensinamentos sempre que precisei. Agradeço a amizade e a força nos momentos mais difíceis.

Minha gratidão

**“Vivemos com o que recebemos,
mas marcamos a vida com o que damos.”**

Winston Churchill

Ao Prof Dr Rubén Dario Sinisterra,

Pela oportunidade de desenvolver grande parte deste trabalho no Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais do Departamento de Química – ICEX – UFMG, onde adquiri conhecimento técnico e científico. Pelas sugestões valiosas que contribuíram significativamente com o trabalho. Pelo exemplo de profissionalismo, conhecimento e dedicação. Pela confiança em mim depositada, pela amizade que muito me honra, e pelo privilégio dessa convivência, que contribui de modo especial para a minha formação.

Meu reconhecimento e gratidão

“Uma nuvem não sabe por que se move em tal direção e em tal velocidade, sente o impulso... é para este lugar que devo ir agora. Mas o céu sabe os motivos e desenhos por trás de todas as nuvens, e você também saberá, quando se erguer o suficiente para ver além dos horizontes.”

Richard Bach

Ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFMG, na pessoa da Prof^ª Dr^ª Maria Cássia Ferreira de Aguiar, pelo apoio.

Ao CNPq, FAPEMIG e INCT Nanobiofar, na pessoa do coordenador Prof Dr Robson A. Santos, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Joel J. Passos pela grandiosa ajuda na análise térmica, amizade e ensinamentos.

Ao Alfonso Gala-García pela amizade e grande contribuição nos trabalhos experimentais *in vivo*. Obrigada pela disposição em ajudar, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao Prof Dr Thiago Romero do Departamento de Farmacologia – ICB – UFMG, pela liberação da hospedagem dos meus ratinhos no biotério deste departamento e ao técnico Rinaldo pelo cuidado dispensado com os animais.

Ao Prof Dr Vagner Santos pela grande ajuda e ensinamentos na análise histopatológica.

Ao Leonardo e Pollyana pelo tempo e pela ajuda nos procedimentos com os animais.

A todos os colegas do LEMB e do Laboratório de Microbiologia e Biomateriais pelas valiosas discussões científicas e pelos momentos de descontração.

Ao Bruno F. Lorenço que sempre me ajudou nas questões mecânicas e computacionais do trabalho; obrigada pela presteza em ajudar e pela sincera amizade.

À secretaria do Colegiado de Pós-Graduação, representada por Laís e Beth, pela atenção e presteza em ajudar.

A toda minha família pelo carinho e apoio sempre incondicionais.

SUMÁRIO

	Índice de Figuras	x
	Índice de Quadros e Tabelas	xvii
	Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xviii
	Resumo	xxi
	Abstract	xxiii
1.	INTRODUÇÃO	25
1.1	<i>Scaffolds</i> carreadores de fármacos osteogênicos	29
2.	REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1	Andrógenos: Fisiologia e Efeitos no Osso	32
2.1.1	Receptores de Andrógenos em Células Ósseas	33
2.1.2	Fatores que Controlam a Expressão do Receptor de Andrógenos e a Função dos Osteoblastos	34
2.1.2.1	Proliferação de Osteoblastos	34
2.1.2.2	Diferenciação Celular	34
2.1.2.3	Microambiente Ósseo	34
2.2	Testosterona	35
2.3	Polímeros Biodegradáveis	36
2.4	Fosfato de Cálcio Bifásico	40
2.5	Tecido Ósseo	41
2.5.1	Osteoblastos	43
2.6	Cultura de Células	44
2.6.1	Cultura de Osteoblastos	45
2.7	Ensaio <i>in vitro</i>	47
2.7.1	Viabilidade Celular (MTT)	47
2.7.2	Produção de Fosfatase Alcalina	48
2.7.3	Colágeno	50
2.7.4	Osteocalcina (OCN)	51
2.7.5	Osteoprotegerina (OPG)	53
2.7.6	Óxido Nítrico	55
2.8	Biocompatibilidade	58
2.9	A resposta tecido/implante	61
3.	OBJETIVOS	64
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1	Materiais	65
4.2	Métodos	66
4.2.1	Preparo dos compósitos	66
4.2.2	Análise térmica	67
4.2.2.1	Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)	67
4.2.3	Extração de Testosterona	67
4.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura- Espectroscopia de Raio-X de Energia Dispersiva (MEV-EDS)	68
4.2.5	Variação do pH	69
4.2.6	Cultura de osteoblastos	69
4.2.7	Viabilidade e Proliferação Celular (MTT)	70
4.2.8	Atividade de fosfatase alcalina e conteúdo total de proteínas	70
4.2.8.1	Atividade de Fosfatase Alcalina	71
4.2.8.2	Quantificação de proteínas	71
4.2.9	Dosagem de colágeno	72

4.2.10	Quantificação de osteocalcina-----	72
4.2.11	Quantificação de osteoprotegerina-----	73
4.2.12	Mineralização da matriz pelo método Von Kossa-----	74
4.2.13	Concentração de óxido nítrico-----	74
4.3	Estudo <i>in vivo</i> -----	75
4.3.1	Animais-----	75
4.3.2	Pré-operatório-----	75
4.3.3	Procedimento cirúrgico-----	76
4.3.4	Procedimento cirúrgico para remoção dos implantes-----	77
4.3.5	Análise histopatológica-----	78
4.3.6	Microscopia Eletrônica de Varredura-----	80
4.4	Análises Estatísticas-----	80
5.	RESULTADOS -----	81
5.1	Análise térmica-----	81
5.2	Extração de Testosterona-----	85
5.3	MEV-EDS dos compósitos-----	86
5.4	Variação do pH-----	91
5.5	Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular-----	92
5.6	Atividade de Fosfatase Alcalina-----	93
5.7	Produção de colágeno-----	94
5.8	Quantificação de Osteocalcina-----	97
5.9	Osteoprotegerina-----	98
5.10	Mineralização da matriz pelo método Von Kossa-----	100
5.11	Concentração de Óxido Nítrico-----	101
5.12	Análise macroscópica descritiva-----	103
5.13	Análise microscópica qualitativa-----	103
5.13.1	Avaliação após 15 dias-----	103
5.13.2	Avaliação após 30 dias-----	107
5.13.3	Avaliação após 60 dias-----	111
5.14	Avaliação microscópica da superfície dos compósitos implantados através de MEV-----	115
6.	DISCUSSÃO -----	123
7.	CONCLUSÕES -----	137
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS -----	138
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	139
	ANEXOS -----	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da policaprolactona-----	37
Figura 2	Representação estrutural dos monômeros do PGA, PLA e PLGA, respectivamente-----	37
Figura 3	Rota metabólica de biodegradação do PLA e PGA.-----	38
Figura 4	Redução de MTT à formazan-----	47
Figura 5	Fotografias da moldagem dos compósitos, e estes após o pastilhamento. A) Compósitos nos moldes cilíndricos e B) Compósitos após o pastilhamento-----	67
Figura 6	Fotografia da identificação dos animais, representada por um animal do grupo PLGA/PCL/BCP.-----	76
Figura 7	Fotografias da região do implante após tricotomia (A) e antissepsia (B).-	77
Figura 8	Fotografias da incisão (A), da divulsão do tecido (B e C) e do compósito no tecido (D).-----	78
Figura 9	Fotografia da peça cirúrgica para processamento histopatológico e microscopia eletrônica de varredura.-----	78
Figura 10	Curvas termogravimétricas (TG) da (A) testosterona, do (B) fosfato de cálcio bifásico, da (C) policaprolactona, do (D) poli ácido láctico-co- glicólico, do (E) compósito PLGA/PCL/BCP e do (F) compósito PLGA/PCL/BCP/T-----	83
Figura 11	Análise térmica diferencial (DTA) do (A) Propionato de Testosterona (T); do (B) Fosfato de cálcio bifásico (BCP); da (C) PCL;do (D) PLGA; do (E) PLGA/PCL/BCP e do (F) PLGA/PCL/BCP/T-----	84
Figura 12	Curva de calibração da concentração de propionato de testosterona com análise de regressão linear-----	86

Figura 13	A) Fotomicrografia do compósito PLGA/PCL/BCP/T, mostrando sua estrutura porosa e B) Espectro EDS do mesmo compósito, mostrando a predominância de cálcio e fosfato em sua composição química-----	87
Figura 14	A) Fotomicrografia do compósito PLGA/PCL/BCP/T, após 21 dias em SBF, mostrando uma maior exposição dos poros ao meio e B) Espectro EDS do mesmo compósito, após 21 dias em SBF, mostrando maior intensidade dos picos de cálcio e fosfato-----	88
Figura 15	A) Fotomicrografia do compósito PLGA/PCL/BCP, mostrando sua estrutura porosa e B) Espectro EDS do mesmo compósito, mostrando a predominância de cálcio e fosfato em sua composição química-----	89
Figura 16	A) Fotomicrografia do compósito PLGA/PCL/BCP, após 21 dias em SBF, mostrando uma maior exposição dos poros ao meio e B) Espectro EDS do mesmo compósito, após 21 dias em SBF, mostrando maior intensidade dos picos de cálcio e fosfato-----	90
Figura 17	Gráfico da variação do pH em função do tempo em horas, mostrando uma queda no pH nas primeiras 24 h, seguida de uma rápida elevação a partir de 48 h e manutenção deste até 21 dias-----	91
Figura 18	Ensaio MTT em cultura de osteoblastos após 7, 14 e 21 dias de cultivo com os compósitos. Gráfico mostrando que os osteoblastos cultivados com os compósitos permanecem viáveis até 21 dias de cultivo. -----	92
Figura 19	Gráfico da atividade de fosfatase alcalina em μmol de NBT reduzido por minuto por mg de proteínas totais. No grupo controle a atividade de fosfatase alcalina diminuiu com o tempo, enquanto nos grupos com os compósitos aumentou. As principais diferenças significativas ($p < 0.05$) foram assinaladas no gráfico. A análise estatística completa está em	

	anexo-----	93
Figura 20	Curva de calibração da concentração de proteínas totais em culturas de osteoblastos após 7, 14 e 21 de cultivo com os compósitos. Legenda: absorbance = absorvância; protein concentration in $\mu\text{g/mL}$ = concentração de proteínas em $\mu\text{g/mL}$ -----	94
Figura 21	Concentração de colágeno nas culturas de osteoblastos em função do tempo em cada grupo experimental. As principais diferenças significativas ($P < 0.05$) foram assinaladas no gráfico. A análise estatística completa encontra-se em anexo-----	95
Figura 22	Curva de calibração do padrão de referência de colágeno tipo I de rato---	96
Figura 23	Concentração de osteocalcina em ng/mL em função do tempo em cada grupo experimental. A concentração de osteocalcina foi maior ($P < 0.001$) no grupo do compósito com hormônio após 21 dias comparado com o sem hormônio-----	97
Figura 24	Curva de calibração do padrão de osteocalcina de rato-----	98
Figura 25	Concentração de osteoprotegerina em pg/mL em função do tempo em cada grupo experimental. Não houve diferença significativa em nenhuma comparação entre os grupos e nem intragrupo-----	99
Figura 26	Curva de calibração do padrão de osteoprotegerina de rato-----	100
Figura 27	Unidades de nódulos de mineralização (U) em função do tempo por grupo. Os osteoblastos cultivados com o compósito PLGA/PCL/BCP/T apresentaram maior capacidade de mineralização da matriz extracelular comparado com os do grupo PLGA/PCL/BCP a partir de 14 dias-----	101
Figura 28	Concentração de óxido nítrico em função em culturas de osteoblastos com os compósitos PLGA/PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP-----	102

Figura 29	Curva de calibração do padrão de nitrito em diferentes concentrações----	103
Figura 30	Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato (grupo controle). A. 15 dias após cirurgia, 5X. B. Maior aumento evidenciando infiltrado inflamatório crônico moderado, 10X.-----	104
Figura 31	Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato (grupo controle), após 15 dias da cirurgia, em maior aumento, 40X, com presença de células linfoplasmocitárias (círculo), microcirculação ativa (seta).-----	105
Figura 32	Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 15 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP/T. A. Vista panorâmica do tecido adjacente ao implante de compósito, 5X. B. Maior aumento evidenciando tecido em contato com o material, 10X. C. Infiltrado inflamatório crônico leve com predominância de células linfoplasmocitária, células gigantes, 40X. D. Neoformação capilar e fibroblastos, 40X.-----	106
Figura 33	Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 15 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP. A. Menor aumento do corte, 5X. B. Presença de infiltrado inflamatório crônico moderado, 10X. C. Predominância de células linfoplasmocitárias e células gigantes, 40X. D. Maior aumento evidenciando a neoformação capilar, fibroblastos e as fibras colágenas, 40X.-----	107
Figura 34	Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato (grupo controle). A. 30 dias após cirurgia, 5X. B. Maior aumento evidenciando infiltrado inflamatório crônico leve, 10X. C. Predominância de células linfoplasmocitárias, 40X. D. Neoformação	

	capilar, 40X.-----	109
Figura 35	Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 30 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP/T. A. Vista panorâmica do corte histológico, 5X. B. Maior aumento, onde se observa as fibras colágenas mais organizadas com fibroblastos com aspecto de menor atividade, 10X. C. Infiltrado inflamatório crônico leve com predominância de células linfoplasmocitária e células gigantes, 40X. D. Neoformação capilar e fibroblastos, 40X.-----	110
Figura 36	Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 30 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP. A. Menor aumento do corte, 5X. B. Presença de infiltrado inflamatório crônico moderado com predominância de células linfoplasmocitárias e células gigantes, 10X. C. Fibras colágenas mais organizadas na região adjacente ao implante, 10X. D. Maior aumento mostrando a presença de fibroblastos e fibras colágenas, 40X.-----	111
Figura 37	Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato (grupo controle). A. 60 dias após cirurgia, 5X. B. Ausência de infiltrado inflamatório crônico, 5X. C. Predominância de fibroblastos, 10X. D. Fibroblastos, fibras colágenas e neoformação capilar, 40X.-----	112
Figura 38	Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 60 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP/T. A. Vista panorâmica do corte histológico, 5X. B. Maior aumento, onde se observa aumento da densidade de fibroblastos, 10X. C. Ausência de infiltrado inflamatório crônico, 40X. D. Neoformação capilar e fibroblastos, 40X.-----	113

- Figura 39** Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 60 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP. **A.** Menor aumento do corte, 5X. **B.** Presença de cápsula envolvendo o compósito, 10X. **C.** Fibras colágenas mais organizadas na região adjacente ao implante, 10X. **D.** Aumento da densidade de fibrosamento e discreto infiltrado inflamatório com predominância de células linfoplasmocitárias, 40X.----- 114
- Figura 40** Gráfico da avaliação da intensidade de inflamação no tecido subcutâneo de rato após 15, 30 e 60 dias de implantação dos compósitos PLGA/PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP. Control = controle (apenas animal incisionado). Score 0 = ausência de inflamação; 1= inflamação leve; 2 = inflamação moderada e 3 = inflamação intensa. Gráfico representando a média \pm desvio padrão de 6 cortes histológicos de 3 animais diferentes. ----- 115
- Figura 41** Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP/T 15 dias após implantação em tecido subcutâneo de rato. F: fibroblasto; TC: tecido conjuntivo; H: hemácias; C: compósito; V: vasos sanguíneos. A. 1000X; B. 1500X; C. 1500X; D. 5000X.----- 117
- Figura 42** Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP/T após 30 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo. A) 1000X; B) 1500X; C) 1500X.----- 118
- Figura 43** Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP/T após 60 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo; V: vasos sanguíneos; C: compósito. A) 1500X; B) 5000X; C) 1500X; D) 5000X.----- 119

Figura 44	Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP após 15 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo; F: fibroblastos; C: compósito. A) 1500X; B) 5000X; C) 1000X; D) 5000X.-----	120
Figura 45	Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP após 30 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo; F: fibroblastos; V: vasos sanguíneos; C: compósito. A) 1500X; B) 5000X; C) 1500X; D) 5000X.-----	121
Figura 46	Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP após 60 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo; C: compósito; F: fibroblasto; V: vasos sanguíneos. A) 1500X; B) 1500X; C) 1000X; D) 2500X.-----	122

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Composição celular óssea e suas características-----	43
Tabela 1: Determinação da quantidade de Testosterona por pastilha de compósito-----	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3D	Tridimensional
3 β HSD	3 β – hidroxisteróide desidrogenase
17Bhsd	17 β – hidroxisteróide desidrogenase
μ m	Micrometro
m/m	massa/massa
p/p	peso/peso
%	Porcento
A	Androstenediona
AR	Receptor de andrógenos
ATP	Adenosina trifosfato
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
BCP	Fosfato de cálcio bifásico
BMP's	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
Ca	Cálcio
°C	Grau Celsius
DHT	Dihidrotestosterona
DHEA-S	Sulfato de Dehidro-Epi-Androsterona
DNA	Ácido desoxirribonucléico

E1	Estrona
E2	17 β estradiol
EAA's	Esteróides Anabolizantes Androgênicos
Faos	Fosfatase alcalina óssea
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HA	Hidroxiapatita
IGFs	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
IL6	Interleucina 6
IL1	Interleucina 1
LH	Hormônio luteinizante
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide
NBT	Nitro tetrazólio azul
Nm	Nanômetro
ON	Óxido nítrico
PO ₄ ³⁻	Fosfato
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)

PGA	Poli(ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa β
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β
T	Testosterona/ Propionato de Testosterona
TGF β	Fator de crescimento de transformação beta
TNF	Fator de necrose tumoral

RESUMO

Efeito da incorporação da Testosterona ao compósito de poli ácido láctico-co-glicólico/policaprolactona/Fosfato de cálcio bifásico na resposta biológica *in vitro* e *in vivo*

A testosterona é um hormônio andrógeno natural, que tem papel fundamental para a manutenção da massa óssea e foi sugerida a atividade tópica na formação de tecido ósseo. Os compósitos de cerâmicas de fosfato de cálcio/polímero são materiais promissores na engenharia de tecido ósseo, pois combinam a bioatividade das biocerâmicas com a flexibilidade dos polímeros. O objetivo desta pesquisa foi caracterizar a incorporação da Testosterona (T) ao compósito de poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA), policaprolactona (PCL) e fosfato de cálcio bifásico (BCP) e avaliar *in vitro* e *in vivo* a resposta celular e biocompatibilidade. Os compósitos PLGA/PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP foram preparados e caracterizados através de análise térmica e MEV-EDS. Os resultados da análise térmica mostraram que a incorporação de testosterona ao compósito modificou o perfil de degradação térmica do compósito PLGA/PCL/BCP. A morfologia e composição química da superfície dos compósitos determinadas por MEV e EDS, respectivamente, mostraram uma estrutura porosa homogeneamente distribuída e a prevalência de cálcio e fosfato em sua composição. O teste de bioatividade *in vitro* mostrou que, após 21 dias em SBF, houve maior exposição dos poros e maior intensidade dos picos de cálcio e fosfato, caracterizando uma camada semelhante à hidroxiapatita. Osteoblastos de cultura primária, derivados de calvária de ratos *Wistar* neonatos, foram cultivados com os compósitos e após 7, 14 e 21 dias, ensaios *in vitro* foram realizados para a avaliação da citotoxicidade e atividade biológica dos mesmos. Os resultados do MTT mostraram que

a adição de T ao compósito aumentou significativamente ($P < 0.05$) a viabilidade e a proliferação dos osteoblastos em relação ao compósito sem hormônio. A atividade de fosfatase alcalina, a produção de colágeno até 14 dias e a concentração de osteocalcina nas culturas de osteoblastos cultivados com o compósito PLGA/PCL/BCP/T foram significativamente maiores ($P < 0.05$) comparadas às culturas com o compósito sem testosterona. Assim como, o processo de mineralização da matriz no grupo do compósito com T foi acelerado, apresentando nódulos de mineralização a partir de sete dias. A concentração de osteoprotegerina e de óxido nítrico no sobrenadante das culturas, não sofreram influência da adição do hormônio ao compósito PLGA/PCL/BCP. Os resultados da implantação subcutânea em ratos dos compósitos mostraram que eles são biocompatíveis, que promovem neovascularização capilar e que há uma forte interação tecido/biomaterial, independente da adição de T. A associação da testosterona ao compósito estimula positivamente as células ósseas, aumentando a viabilidade e a proliferação, a produção de matriz extracelular e a mineralização; sendo, o compósito PLGA/PCL/BCP/T um biomaterial promissor na engenharia de tecido ósseo.

Palavras-chave: Compósitos; Fosfato de Cálcio Bifásico; Polímeros Biodegradáveis; Testosterona; Engenharia de Tecido Ósseo.

ABSTRACT

Effect of addition of Testosterone to the composite of poly (lactic-co-glycolic acid) /Polycaprolactone/biphasic calcium phosphate on biological response *in vitro* and *in vivo*

Testosterone is a natural androgen hormone, which plays a key role in maintaining bone mass and it was suggested that it has a topical activity in the bone tissue formation. The calcium phosphate ceramic/polymer composite are promising materials in bone tissue engineering, because it combines the bioactivity of bioceramics with the flexibility of the polymers. The aim of this research was to characterize the testosterone (T) incorporation to the composite of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polycaprolactone (PCL) and biphasic calcium phosphate (BCP) and to evaluate the cellular response and biocompatibility *in vitro* and *in vivo*. The PLGA/PCL/BCP/T and PLGA/PCL/BCP composites were prepared and characterized by thermal analysis and SEM-EDS. The results of the thermal analysis showed that the testosterone incorporation to the composite modified the profile of thermal degradation of the PLGA/PCL/BCP composite. The morphology and the surface composition of the composites determined by SEM and EDS, respectively, showed a porous structure homogeneously distributed and prevalence of calcium and phosphate in the composition. *In vitro* bioactivity test has shown that after 21 days in SBF was greater the exposure of the pores and increased intensity of the peaks of calcium and phosphate, featuring a layer similar to hydroxyapatite. Primary culture osteoblasts derived from neonatal *Wistar* rat calvaria were grown with the composites and after 7, 14 and 21 days, *in vitro* assays were performed to evaluate the biological activity and cytotoxicity thereof. The results of the MTT assay showed that the addition of T to the composite

increased significantly ($P < 0.05$), the viability and proliferation of osteoblasts with respect to the composite without hormone. The alkaline phosphatase activity, the collagen production by 14 days and the concentration of osteocalcin in osteoblasts cultures seeded with the PLGA/PCL/BCP/T composite were significantly higher ($P < 0.05$) compared to cultures with the composite without testosterone. As well as, the matrix mineralization process in the group of composite with T was accelerated, featuring mineralization nodules from seven days. The concentration of osteoprotegerin and nitric oxide in the cultures supernatants were not influenced by the addition of hormone to the PLGA/PCL/BCP composite. The results of subcutaneous implantation in rats of the composites showed that they are biocompatible, that promote neovascularization and there was a strong tissue/biomaterial interaction, regardless of the T addition. The association of testosterone to the composite stimulates bone cells positively increasing the viability and proliferation, the extracellular matrix production and mineralization. Therefore, the PLGA/PCL/BCP/T composite is a promising biomaterial for bone tissue engineering.

Keywords: Composites, Biphasic Calcium Phosphate; Biodegradable Polymers; Testosterone; Bone Tissue Engineering.

1. INTRODUÇÃO

A demanda crescente da necessidade de reconstruções do tecido ósseo degenerado tem proporcionado o aprimoramento técnico e o avanço de estudos de biomateriais que possam substituir ou aperfeiçoar os procedimentos de enxertia. Os enxertos ósseos podem ser obtidos de diferentes origens: autógeno (do mesmo indivíduo), alógeno (de indivíduos da mesma espécie), xenógeno (de espécies diferentes) ou aloplástico (sintético) (Peleg *et al.*, 2006; Garofalo, 2007; Jones *et al.*, 2009). Em 2002, cerca de 1500 procedimentos mensais do SUS na área de ortopedia demandaram enxertos ósseos, e esse número aumentou, em 2003, para 3200 procedimentos/mês.

Estes enxertos servem de suporte estrutural e agem como uma matriz osteocondutora para a neoformação óssea. Atualmente, considera-se padrão ouro o transplante ósseo do próprio paciente, enxerto autógeno (Chen *et al.*, 2011). No entanto, este procedimento apresenta restrições como à quantidade limitada de osso recuperado e alta morbidade, além da necessidade de se realizar um segundo sítio cirúrgico no mesmo paciente (Langer, 2000; Olszta *et al.*, 2007; Garofalo, 2007; Seeman, 2008; Tabata, 2009).

Na tentativa de superar estas limitações do enxerto autógeno, as pesquisas têm focado nos biomateriais ou enxertos aloplásticos (Lobo *et al.*, 2010). Dentre as técnicas mais promissoras em desenvolvimento, cita-se a utilização de matrizes (*scaffolds*) biodegradáveis, que promovem a adesão celular e suportam o crescimento, proliferação e diferenciação celular, com o objetivo de regenerar o tecido danificado. Para que a regeneração aconteça, os *scaffolds* têm que apresentar determinadas características com respeito a sua porosidade, às suas propriedades de superfície e propriedades mecânicas.

Esse material deve também possuir uma taxa de degradação adequada e ser biocompatível com o tecido onde será implantado, permitindo a neoformação tecidual (Reis *et al.*, 2007; Pataro *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Gala-García *et al.*, 2012).

Dentre os biomateriais mais utilizados como suportes para o crescimento de células estão os polímeros biodegradáveis. Os polímeros podem ser de origem natural ou sintética. Apresentam características diferentes consoantes a sua origem, por exemplo, os polímeros naturais, como alginato, colágeno, e quitosana promovem um maior crescimento celular, pois apresentam uma estrutura semelhante à matriz extracelular do tecido a ser regenerado. No entanto, a sua taxa de degradação não é controlável dificultando a sua utilização. Os polímeros de origem sintética como o PCL (policaprolactona) e o PLGA (poli ácido lático-co-glicólico) não reproduzem as características e comportamento da matriz extracelular, mas a sua grande vantagem sobre os polímeros naturais é a possibilidade de poderem ser facilmente fabricados em massa e as suas propriedades, taxa de degradação e comportamento mecânico, poderem ser adaptados para aplicações específicas (Tang *et al.*, 2005; Rezwan *et al.*, 2006; Vert, 2007; Panchence *et al.*, 2007; Matsuno *et al.*, 2010; Jee *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2010).

No entanto, apesar desses polímeros serem biocompatíveis e aprovados para serem utilizados em humanos, eles não são bioativos em relação ao tecido ósseo. Portanto, para melhorar esta característica, compósitos de biocerâmica de fosfato de cálcio bifásico e polímeros biodegradáveis têm sido desenvolvidos na busca de uma matriz ideal (Ciapetti *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Pataro *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2007; Shor *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008; Mavis *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012).

As biocerâmicas de fosfato de cálcio são reconhecidamente biocompatíveis e possuem propriedades bioativas. Apresentam constituição química inorgânica semelhante à do osso natural, o que as torna substitutos ósseos promissores nos campos ortopédicos e maxilofacial (Fellah *et al.*, 2007). A hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e o beta fosfato tricálcio (β -TCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ são cerâmicas de fosfato de cálcio largamente utilizadas. Estes biomateriais são atóxicos, reabsorvíveis, apresentam ótima atividade osteocondutora e não desencadeiam respostas imuno-inflamatórias prejudiciais. Eles se diferem não apenas na composição, mas também na taxa de degradação (Manjubala *et al.*, 2002; Daculsi *et al.*, 2003). Os materiais à base de hidroxiapatita porosa e não porosa são pouco ou não reabsorvíveis, ao contrário da β -TCP que é mais solúvel, sendo biodegradada ou bioreabsorvida (Wang *et al.*, 2005; Pataro *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Gala-García *et al.*, 2012; Trajano, 2012; Costa *et al.*, 2012).

Com o objetivo de se obter uma melhor matriz para o ganho de volume ósseo e conseqüentemente, um melhor desempenho do que a HA e o β -TCP isolados, foram desenvolvidas cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (BCP), que consistem de uma mistura de HA e β -TCP (Legeros *et al.* 2003; Daculsi *et al.* 2003; Manjubala *et al.*, 2006; Lobo *et al.*, 2010). O conceito da BCP é baseado no ótimo equilíbrio entre a fase mais estável (HA) e a mais solúvel (β -TCP). As biocerâmicas BCP são gradualmente dissolvidas *in vivo*, contribuindo para a nova formação óssea, à medida que liberam íons cálcio e fosfato no microambiente (Zafirau *et al.*, 1996; Legeros *et al.*, 2003; Daculsi *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2006; Lobo *et al.*, 2010).

Aliado à matriz biodegradável (*scaffold*), pode-se associar agentes indutores e/ou moléculas sinalizadoras para regeneração óssea. Os andrógenos modulam o ciclo de remodelação óssea através da atividade androgênica direta ou pela transformação em

estrógenos. Os andrógenos também aumentam a massa e a força muscular, além de alterarem o balanço entre reabsorção e formação, em favor da formação óssea (Notelovitz, 2002; Callewaert *et al.*, 2010). Conforme Notelovitz (2002) concluiu em seu trabalho, os andrógenos, diretamente ou via sua aromatização a estrógeno, têm profunda influência na preservação do osso e da massa muscular.

Kasperk *et al.* (1989) concluíram que os andrógenos estimulam diretamente a proliferação de células ósseas *in vitro* e que podem estimular a proliferação de células osteoblásticas humanas e de ratos, induzindo a expressão do marcador de diferenciação fosfatase alcalina, presumivelmente por um mecanismo mediado por um receptor de andrógenos. Os autores relataram que a Testosterona (o maior andrógeno circulante), o methenolone (um anabólico esteróide) e a fluoximesterona (um andrógeno sintético) igualmente estimulam a síntese de DNA nas células ósseas de ratos.

Baseados no estudo prévio e pioneiro de Costa *et al.* (2012), o qual evidenciou que a associação de testosterona ao compósito PLGA/PCL/BCP aumentou significativamente a viabilidade e a proliferação dos osteoblastos, após 3 dias de cultivo; o presente estudo avaliou a resposta celular *in vitro* ao compósito PLGA/PCL/BCP/T a longo prazo, procurando determinar se os osteoblastos, na presença deste, permanecem funcionalmente viáveis, produzindo matriz extracelular e mineralizando-a até 21 dias de indução. Bem como, foi comparada com a resposta tecidual do tecido subcutâneo de rato em contato com os compósitos PLGA/PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP.

1.1 Scaffolds carreadores de fármacos osteogênicos

Fármacos osteogênicos têm sido propostos em engenharia biomédica para estimular a regeneração óssea *in situ*, principalmente pela vantagem da diminuição dos efeitos tóxicos sistêmicos através da diminuição da dosagem necessária do fármaco.

Neste contexto, o grupo de pesquisa do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais da UFMG vem trabalhando na busca de um biomaterial ideal para reconstrução e regeneração óssea. Segundo Pataro *et al.*(2007), os compósitos PLA/BCP e PLGA/BCP na razão estequiométrica 1:3 p/p, respectivamente, carregando tetraciclina, apresentaram maior biocompatibilidade quando comparados ao fosfato de cálcio bifásico isolado, além de terem sido favoráveis a colonização por fibroblastos. Além disso, o desempenho da resposta biológica das células aos compósitos foi melhorado pela incorporação de tetraciclina a estes. No entanto, apresentou rápida degradação do compósito PLGA/BCP e a resposta tecidual a este compósito exibiu um acúmulo moderado de células inflamatórias mononucleares por mais tempo. Já Gala-García *et al.*(2012) analisaram o compósito PLGA/BCP sem fármaco em capeamento pulpar direto em dentes de ratos, comparando com o hidróxido de cálcio e o fosfato de cálcio bifásico isolados. Os resultados mostraram que o compósito apresentou melhor desempenho clínico, com capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado (ponte dentinária) após 30 dias da intervenção, sem a presença de tecido necrosado.

Compósitos com degradação prolongada foram obtidos com PCL/BCP (1:4 p/p) e incorporação de doxiciclina (Dox). Neste estudo foram analisadas a viabilidade e proliferação celulares, a produção de fosfatase alcalina e de colágeno pelos osteoblastos. As células cultivadas com o compósito PCL/BCP/Dox apresentaram maior viabilidade e proliferação, além de maior produção de fosfatase alcalina e de colágeno quando comparado às células sem tratamento (Trajano, 2012).

O uso da testosterona em scaffolds foi proposto em um estudo preliminar por Costa *et al.*(2012), em anexo, que prepararam os compósitos PCL/BCP (1:4) e PLGA/PCL/BCP (1:1:8) e incorporaram propionato de testosterona (T). A testosterona foi adicionada ao compósito, de forma inovadora, em função da possibilidade do seu uso tópico em células de tecido ósseo para induzir a reparação e a neoformação óssea. Os compósitos foram caracterizados, físico-quimicamente, por FTIR e DRX: os espectros de FTIR dos compósitos mostraram a sobreposição dos espectros dos materiais isolados. Enquanto os perfis dos difratogramas de raios-X dos compósitos PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP/T mostraram-se amorfos. Avaliaram-se a viabilidade e a proliferação de osteoblastos, cultivados com os compósitos por 24, 48 e 72 h, bem como se avaliou qualitativamente a morfologia e a adesão celular aos mesmos compósitos utilizando-se MEV, 24 h após o contato das células aos compósitos. As células aderiram aos dois compósitos, sendo que no compósito PLGA/PCL/BCP/T elas apresentaram morfologia espalhada e com prolongamentos citoplasmáticos, o que caracteriza uma maior interação entre as células e o compósito. Por sua vez, quando se utilizou o compósito PCL/BCP/T, as células apresentaram morfologia arredondada. A adição do PLGA ao compósito PCL/BCP/T permitiu que os osteoblastos estivessem significativamente mais viáveis e tivessem maior proliferação, quando comparados àqueles cultivados com o PCL/BCP/T. Este fato talvez tenha ocorrido porque as blendas de PLGA e PCL adquirem características diferentes dos polímeros isolados, além disso, o hormônio talvez possa ser liberado mais rapidamente do compósito PLGA/PCL/BCP/T do que do PCL/BCP/T. Portanto, naquele estudo, o compósito PLGA/PCL/BCP/T estimulou a proliferação de osteoblastos, funcionou como matriz (*scaffold*) bioativa, sendo promissores para regeneração óssea.

Baseados nos resultados obtidos no trabalho anterior, foi levantada a hipótese de que as funções metabólicas dos osteoblastos e a resposta *in vivo* seriam beneficiadas por compósitos contendo polímeros, biocerâmica e testosterona, na razão estequiométrica proposta por Costa *et al.* (2012), principalmente pela liberação do hormônio *in situ*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Andrógenos: Fisiologia e Efeitos no Tecido Ósseo

O metabolismo primário de andrógenos e estrógenos é realizado em quatro lugares: no testículo, no ovário, no córtex adrenal, e no tecido adiposo, com adicionais contribuições do metabolismo de esteróides sexuais no músculo e cérebro (Notelovitz, 2002).

A atividade dos esteróides sexuais é determinada por várias enzimas, muitas das quais são encontradas no osso. Estas enzimas incluem atividade aromatase (convertendo T a E₂ [estradiol]); a 17-β hidroxisteroide dehidrogenase (controlando o “caminho” da androstenediona para T e, E₁ [estrona] para E₂); e, sulfatase, a enzima que regula a sulfatação da estrona. A Testosterona é promovida à Dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α-redutase. Nas células periosteais, não se detecta atividade de 5α-redutase, indicando que a Testosterona pode ser um metabólito ativo neste sítio clinicamente importante. Os maiores andrógenos da glândula adrenal incluem sulfato de Dehidro-Epi-Androsterona (DHEA-S) e androstenediona (A). Os esteróides androgênicos – diretamente ou por conversão a E₂ – medeiam as funções fisiológicas através da ligação andrógeno-receptor. Isto confirma que há um receptor específico para andrógenos nos osteoblastos (Notelovitz, 2002; Vanderschueren *et al.*, 2004; Callewaert *et al.*, 2010).

Os andrógenos podem afetar o esqueleto masculino tanto diretamente, através da ativação do receptor de andrógenos (AR), como indiretamente, através da estimulação dos receptores de estrógenos após aromatização. Em camundongos machos foi constatado que a ação da Testosterona mediada pelo receptor de andrógenos é essencial para formação periosteal óssea e contribui para manutenção do osso trabecular (Vandenput *et al.*, 2004).

2.1.1 Receptores de Andrógenos em Células Ósseas

Receptores de andrógenos foram encontrados nas três células ósseas: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Estes receptores são similares a outros receptores esteroidais (estrógeno, progesterona e glicocorticóides) e foram encontrados primariamente dentro do núcleo. Os receptores de andrógenos são mais expressados em osteoblastos e, em maior proporção, no osso cortical que no esponjoso. A expressão dos receptores de andrógenos é maior em culturas de osteoblastos de osso jovem quando comparada com osso senil. Estes receptores têm predominância de atividade nos osteoblastos dos sítios de formação óssea (Notelovitz, 2002; Callewaert *et al.*, 2010).

Os receptores de andrógenos no núcleo são responsáveis pela transcrição genômica clássica de mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) de osteoblastos. Os ligantes, testosterona ou dihidrotestosterona, difundem-se livremente através da membrana plasmática até o núcleo e ligam-se aos receptores de andrógenos (ARs). Uma vez o complexo AR-ligante ativado, a metade protéica é liberada com a formação de um homodímero. Modulado por vários co-ativadores e co-repressores, o receptor de andrógenos liga-se ao DNA, influenciando a transcrição e translação de genes que governam a função dos osteoblastos. Isto é abundante tanto para receptores de andrógenos como para receptores de estrógenos nos osteoblastos, indicando o duplo papel da T e E na fisiologia normal do osso (Notelovitz, 2002; Callewaert *et al.*, 2010).

Os andrógenos podem regular a atividade dos osteoblastos pela transcrição genômica clássica de mRNA de osteoblastos através dos AR no núcleo ou através de uma via mais rápida, um mecanismo não-genômico de receptores direto na superfície celular dos osteoblastos (Notelovitz, 2002).

Receptores de andrógenos são também encontrados em células da medula óssea regulando a osteoclastogênese. A regulação dos esteróides sexuais na função

osteoclástica é controlada primariamente por E₂ e pelo receptor de estrógeno. Uma possibilidade de efeito indireto da Testosterona é através da aromatização para E₂. Receptores de andrógenos foram encontrados em osteócitos presos na matriz óssea (Notelovitz, 2002; Callewaert *et al.*, 2010).

2.1.2 Fatores que Controlam a Expressão do Receptor de Andrógenos e a Função dos Osteoblastos

2.1.2.1 Proliferação de Osteoblastos

Receptores de andrógenos são regulados por andrógenos no osso. Os andrógenos estimulam a proliferação de osteoblastos, mas, sob condições experimentais, a exposição prolongada a andrógenos pode inibir a proliferação de células osteoblásticas significativamente. Por isso, a terapia intermitente com andrógenos melhora a densidade óssea mineral em mulheres, mais do que a terapia androgênica contínua (Notelovitz, 2002; Callewaert *et al.*, 2010).

2.1.2.2 Diferenciação Celular

A exposição a andrógenos aumenta a diferenciação de osteoblastos e a síntese de proteínas na matriz extracelular, tanto como colágeno tipo 1, osteocalcina e osteonectina. Isto é refletido por um aumento na dose-resposta na atividade de fosfatase alcalina específica do osso. Os andrógenos também estimulam a mineralização. Em síntese, andrógenos parecem ter uma importante função na regulação da organização e produção de matriz óssea (Notelovitz, 2002).

2.1.2.3 Microambiente Ósseo

Os andrógenos também influenciam a função de células ósseas através de seus efeitos no local ou de fatores sistêmicos que controlam o micro-ambiente das células ósseas. Os andrógenos têm um profundo efeito no fator de transformação de crescimento (TGF- β), o qual é um dos mais potentes mitógenos de osteoblastos. A Dihidrotestosterona medeia aumentos de atividade de TGF- β para via TGF- β 2, mas

outras isoformas podem estar envolvidas. Tanto DHT quanto T regulam a síntese de TGF- β . Nesta forma latente, TGF- β é armazenado no osso, funcionando como um meio de reserva do corpo para este fator de crescimento. Outros sistemas de fatores de crescimento são possivelmente influenciados por andrógenos, incluindo o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento símile a insulina (IGF) II. O segundo efeito é causado por um aumento de afinidade no ligando de IGF-II e não por um aumento na quantidade média de IGF-I ou IGF-II na cultura de osteoblastos. Andrógenos também diminuem a gênese de osteoclastos por inibição na produção de interleucina-6 (IL-6) no estroma de células do osso medular. Isto resulta em maturação e desenvolvimento diminuído de osteoclastos. Testosterona e DHT também regulam a atividade de osteoclastos por inibição, tanto do hormônio da paratireóide e IL-1 quanto estimulando a produção de prostaglandina E2 (PGE2) (Notelovitz, 2002).

Notelovitz (2002) concluiu que os esteróides sexuais estão diretamente envolvidos na modulação da osteogênese, no metabolismo e na função das células musculares. Neste contexto, pode-se concluir que os andrógenos têm influência profunda na preservação do osso e na força e massa muscular.

2.2 Testosterona

A Testosterona é um hormônio esteróide sintetizado e secretado nos homens pelas células intersticiais ou células de Leydig, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH), também chamado estimulador das células de Leydig e também a partir da androstenediona secretada pelo córtex supra-renal (Ganong, 2000). Devido à proximidade existente entre as células de Leydig e as células de sertoli dos túbulos seminíferos, há uma relação parácrina entre elas, pois as células de Sertoli e as células peritubulares são as células-alvo primárias da Testosterona. O padrão de secreção da

Testosterona pelas células de Leydig segue o padrão de liberação pulsátil característico do LH (Hakola *et al.*, 1998).

A testosterona é responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características masculinas normais, sendo também importante para a função sexual normal e o desempenho sexual. Apesar de ser encontrado em ambos os sexos, em média, o organismo de um adulto do sexo masculino produz cerca de 20 a 30 vezes mais quantidade de testosterona que o organismo de um adulto do sexo feminino, tendo assim um papel determinante na diferenciação do sexo na espécie humana (Henderson, Baranski, Bickel, 2006).

Lieberherr e Grosse (1994) avaliaram a ação de andrógenos sobre o osso e encontraram um rápido efeito da T sobre o cálcio livre citosólico e o metabolismo de fosfolípidios da membrana em osteoblastos de ratos machos. Estes efeitos foram produzidos por concentrações fisiológicas. Segundo os autores, a T desencadeia um transitório aumento no cálcio, acompanhado pela manutenção de uma fase platô.

2.3 Polímeros Biodegradáveis

Um polímero é dito biodegradável se todos seus componentes orgânicos sofrerem uma biodegradação total. Dentre os principais polímeros biodegradáveis atualmente bastante estudados e utilizados na área biomédica estão o poli(ácido lático) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA), a policaprolactona (PCL), e o copolímero do ácido lático e glicólico, o poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) entre outros (Oréfice *et al.*, 2006).

A policaprolactona é um poliéster biodegradável, semicristalino e alifático. A biodegradabilidade do polímero é devida a susceptibilidade da ligação alifática éster a hidrólise, sendo os produtos gerados metabolizados pela via do ciclo do ácido tricarbóxico ou eliminados diretamente por excreção renal. É um material mais resiliente que outros polímeros (PLA, PGA, PLGA), com características melhores para

reparação óssea por manter as propriedades físicas da matriz por pelo menos seis meses (Ciapetti *et al.*, 2003; Taddei *et al.*, 2005). A representação da estrutura química do PCL pode ser visualizada na **Figura 1**.

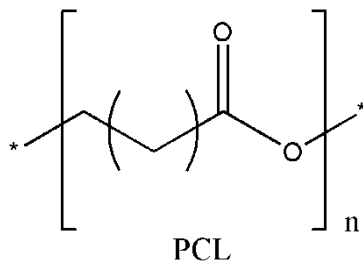


Figura 1 Estrutura química da policaprolactona.

O copolímero derivado do ácido láctico e glicólico, PLGA, é sintetizado por uma reação de condensação, através da abertura do anel dos dímeros cíclicos (ácido láctico e/ou ácido glicólico), representados na **Figura 2**. A polimerização geralmente ocorre por um período de duas a seis horas, sob temperatura em torno de 175°C, utilizando, como catalisador, principalmente, o cloreto estanoso.

PGA	PLA	PLGA

Figura 2 Representação estrutural dos monômeros do PGA, PLA e PLGA, respectivamente.

Pode-se dizer que quanto maior a proporção de ácido láctico no PLGA, maior a hidrofobicidade do copolímero e menor será a velocidade de degradação. A biodegradação deste polímero ocorre por erosão, por meio de clivagem da cadeia

polimérica por hidrólise, liberando o ácido lático e glicólico. Estes ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo, são incorporados ao ciclo de Krebs e eliminados na forma de gás carbônico e água, de acordo com a **Figura 3** (Jalil *et al.*, 1990).

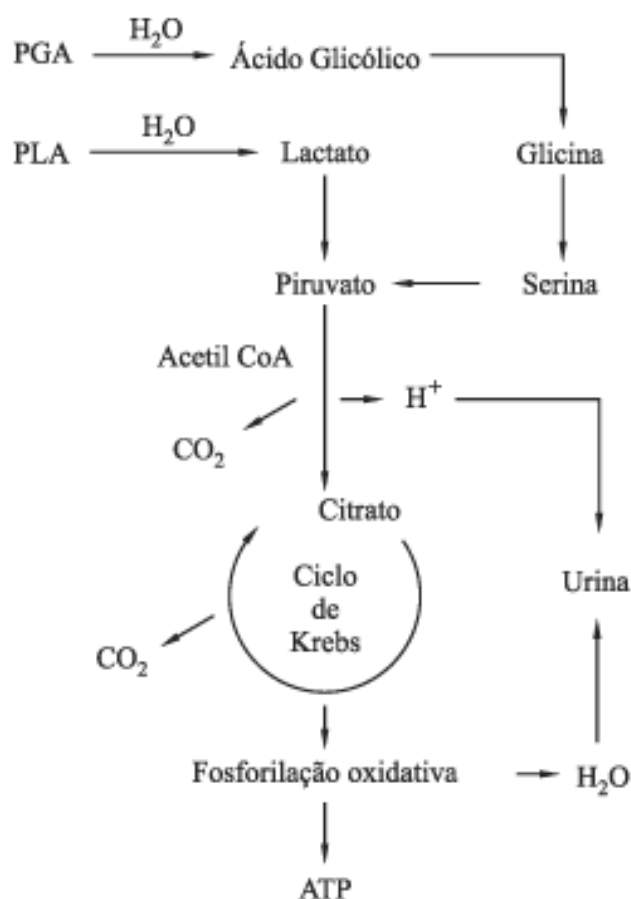


Figura 3 Rota metabólica de biodegradação do PLA e PGA. Fonte: Jalil *et al.*, 1990.

Os polímeros biodegradáveis são amplamente empregados como sistemas de liberação controlada de fármacos. Nos últimos anos, vários produtos e processos foram desenvolvidos, a fim de se obter sistemas de liberação controlada, objetivando controlar a velocidade de liberação do fármaco, manter seu nível terapêutico por um período de tempo maior, e também dirigir sua ação a um sítio específico. Tais características promoveriam redução de efeitos adversos e tóxicos, além da redução do número de administrações e maior adesão do paciente ao tratamento (Lima *et al.*, 1999).

Garvin *et al.* 1994, demonstraram que o sistema de liberação controlada formado por PLGA e gentamicina é mais eficiente no tratamento de osteomielite quando comparado ao tratamento parenteral.

Polímeros biodegradáveis vêm sendo associados à biocerâmicas em situações nas quais a absorção é desejada, como por exemplo, para expor superfícies ou tecidos à liberação de fármacos tais como antibióticos, antiinflamatórios, hormônios e fatores de crescimento de tecidos. O compósito polimérico e biocerâmico biodegradável serve como *scaffold* para a proliferação das células ósseas (Black, 1991).

Kim *et al.* 2004, estudaram compósitos formados por policaprolactona em uma matriz cerâmica de hidroxiapatita e tetraciclina em diferentes proporções de cerâmica, polímero e fármaco. Foi constatado que a cinética de liberação do fármaco, bem como as propriedades mecânicas é dependente da razão entre os constituintes do compósito.

Vários fatores contribuem significativamente no tempo de degradação dos poliésteres, entre eles o tamanho e a forma do dispositivo, a cristalinidade e a massa molar do polímero (Jalil *et al.*, 1990).

A incorporação de BCP 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). O compósito formado apresenta propriedades melhores que os dois produtos isoladamente, especialmente, pelas características termoplásticas do polímero, melhorando assim as propriedades mecânicas da cerâmica, permitindo sua utilização prática (Pataro *et al.*, 2007).

2.4 Fosfato de Cálcio Bifásico

As biocerâmicas de fosfato de cálcio bifásico, micro-macro porosa, são compostas por 35% de β -trifosfato de cálcio (β -TCP) e 65% de hidroxiapatita (HA). Apresentam macro-poros intercomunicantes, de 50 μ m e 400 μ m, que induzem uma resposta orgânica mais efetiva, forte ligação e crescimento tecidual intrínseco. Adicionalmente, apresentam micro-poros intercomunicantes (inclusive com os macro-poros) de 1 μ m e 10 μ m que aumentam o contato tecidual, a solubilidade e a capacidade de trocas com os líquidos orgânicos. Também, apresentam poros intermediários de 10 μ m a 50 μ m (Pataro *et al.*, 2007).

Esta estrutura arquitetônica porosa torna esta biocerâmica um eficaz e importante veículo condutor e liberador de drogas e substâncias num período desejável. Assim como sua topografia superficial permite atividade metabólica osteoblástica e expressão desejável dos fenótipos adequados para cada etapa dos fenômenos de neoformação tecidual (Pataro *et al.*, 2007).

A formação de tecido ósseo requer três componentes básicos: 1) um sinal osteocondutor, isto é uma substância osteocondutora; 2) um suporte que sirva como matriz para a liberação do sinal osteocondutor e como suporte para o novo osso formado; e 3) células hospedeiras capazes de sofrer diferenciação em células ósseas ou as próprias células ósseas (Ripamonti & Duneas, 1996).

Fosfatos de cálcio como a hidroxiapatita são conhecidos por serem osteocondutores e bioativos. Isto significa que eles agem como um modelo ao longo do qual pode ocorrer o crescimento ósseo. Adicionalmente, a formação óssea pode acontecer diretamente à superfície do material, obtendo-se uma forte adesão ao tecido ósseo. Por outro lado, a osteoindução é considerada como uma propriedade dos materiais que induzem a formação de tecido ósseo (Ripamonti & Duneas, 1996).

Em princípio, qualquer material cerâmico que é biocompatível e biodegradável pode ser usado como um implante em tecido vivo. O material cerâmico é capaz de prover uma superfície de fosfato de cálcio, *in vitro* ou *in vivo*, apresentando essa estrutura de superfície específica. Adicionalmente, é interessante que o material cerâmico seja capaz de adsorver os agentes biologicamente ativos, como fatores de crescimento, BMP's etc, *in vitro* ou *in vivo*. Exemplos satisfatórios de materiais cerâmicos incluem fosfato de cálcio, biovidros e materiais que contêm cálcio, fosfato e/ou biovidros (Ripamonti & Duneas, 1996).

No entanto, as hidroxiapatitas apresentam algumas limitações, como: 1) limitada capacidade de suportar carga de torção; 2) inadequada tolerância de corte; e 3) uma reabsorção mínima quando as hidroxiapatitas puras, policristalinas são usadas. Por essas razões, o seu uso em regiões esqueléticas submetidas a altos esforços são limitadas, o que já não acontece com as biocerâmicas bifásicas micro/macroporosas. Com isso, 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 (Ramoshebi *et al.*, 2002).

2.5 Tecido Ósseo

O tecido ósseo pode ser dividido em quatro componentes microestruturais: células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores sinalizadores solúveis (Buckwalter *et al.*, 1996).

Este tecido é constituído de 70% de componentes inorgânicos e 30% de componentes orgânicos. Na parte orgânica encontramos 2% de células e 98% de matriz extracelular,

onde o colágeno protéico fibroso representa 95% do total, enquanto os 5% restantes são preenchidos por polissacarídeos, lipídeos e fosfolipídeos (Buckwalter *et al.*, 1996).

Entre os componentes inorgânicos encontramos o cálcio e o fósforo, que formam a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e outros elementos como magnésio, sódio, potássio e, em menor concentração, zinco, manganês, flúor e molibdênio. Nesta parte estão depositados 99% do cálcio, 85% do fósforo e 66% do magnésio encontrados no organismo humano (Seeman, 2008).

Além de sua função de suporte e proteção, o tecido ósseo funciona como reservatório de minerais, e sua complexa fisiologia é controlada por fatores hormonais, forças mecânicas, fatores de crescimento e citocinas (Tencate, 1994).

As etapas do desenvolvimento ósseo são reguladas por uma hierarquia de programas genéticos, endócrinos e mecânicos (Brachvogel *et al.*, 2003).

Em relação à genética, é necessário que seja compreendida como um programa regulável, que expressa ou não suas características dependendo do estímulo a que a célula é submetida. Portanto, não existe mais o antigo conceito de predeterminação genética imutável no que concerne a formação de tecido ósseo. Muitos caminhos de sinalização têm se mostrado de fundamental importância na comunicação inter-osteoblastos, gerando um campo de resposta maior do que o sítio não-estimulado (Nomura *et al.*, 2000).

Células ósseas são organizadas em uma rede de interconexão que se estende dos osteócitos enclausurados na matriz até os osteoblastos presentes na superfície óssea. O tecido ósseo exhibe propriedades de memória de curto e longo prazo, semelhante às células nervosas (Turner *et al.*, 2002).

Os principais fenótipos celulares associados ao osso são o osteócito, o osteoblasto e o osteoclasto. Suas origens, funções e localizações estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição celular óssea e suas características.

Tipo celular	Origem	Localização	Função
Osteócitos	Diferenciação de osteoblastos	Matriz extracelular	Secreção de fatores de crescimento
Osteoblastos	Células mesenquimais	Maioria no periósteo	- Formação óssea - Regulação do metabolismo ósseo - Mineralização da matriz óssea
Osteoclastos	Precursores mononucleados provenientes da medula óssea	Locais de maior atividade óssea: fraturas, tumores, metástases	Reabsorção óssea

Fonte: Turner *et al.*, 2002.

Macroscopicamente o tecido ósseo é composto por osso cortical, correspondente a 80% de seu peso total no organismo humano, mas ocupa apenas 50% da área, sendo encontrado principalmente na diáfise dos ossos longos. O restante da área é ocupada pelo osso esponjoso, que corresponde aos demais 20% do peso. Quanto ao metabolismo, o osso esponjoso é oito vezes mais ativo, apresentando maior remodelação (Turner *et al.*, 2002).

As características dos osteoblastos se encontram detalhadas no item 3.5.1 abaixo, visto que esse tipo celular é objeto do presente trabalho.

2.5.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese, deposição e mineralização da matriz extracelular óssea (Langer, 2000).

Células-tronco, células osteoprogenitoras e seus precursores mesenquimais aparecem no embrião em grande quantidade. No organismo adulto verifica-se a presença das células citadas acima, porém em menor número, indicando que elas

contribuem para a reposição de osteoblastos no *turnover* ósseo e nos processos reparativos (Yang *et al.*, 2002). Sabe-se hoje que essa ação é regulada pela expressão diferenciada de genes ligados à proliferação e diferenciação das células ósseas (Boyan *et al.*, 1996)

Durante o processo de osteogênese, os osteoblastos são progressivamente transformados em osteócitos, à medida que ficam envolvidos nos seus próprios produtos de secreção (Aubin, 1998). Eles têm um extenso retículo endoplasmático e muitos ribossomas livres no citoplasma (Tencate, 1994). São conectados entre si e com os osteócitos adjacentes por junções *gap* (Moss, 1997).

Os osteoblastos iniciam e controlam a mineralização óssea. Todas as células osteogênicas contribuem individualmente para o remodelamento ósseo.

A interação entre elas controla a atividade e a intensidade deste remodelamento. Essa interação de contato célula-célula pode ser mediada por moléculas da família das integrinas ou pode ser mediada pela liberação de polipeptídeos que funcionam conectando-se a receptores específicos. Entre os fatores polipeptídicos conhecidos, uma família de citocinas pleiotrópicas que partilham um sinal comum, desempenha um papel chave no remodelamento ósseo. Desta família fazem parte entre outras, a IL6 e a IL1 (Georges *et al.*, 2009).

2.6 Cultura de Células

A utilização de cultura de células sobre materiais sintéticos é antiga e vem sendo utilizada em inúmeras áreas da engenharia biomédica. A cultura celular *in vitro* permite diagnosticar doenças, avaliar a citotoxicidade de um material, mutagenicidade, propagar vírus para a confecção de vacinas, assim como para a síntese específica de moléculas

orgânicas de alta complexidade. O procedimento dos experimentos são atualmente padronizados e protocolados (Valério *et al.*, 2005).

Aplicadas à Engenharia de Tecidos, a cultura celular além de fornecer dados relativos à citotoxicidade e à indução ao crescimento, representam o início da recomposição do tecido natural. É fundamental o conhecimento das características de adesão e diferenciação celular durante o processo (Anselme, 2000).

2.6.1 Cultura de Osteoblastos

Os princípios da cultura celular começaram a ser definidos no início do século XX, quando pesquisadores começaram a manter em meio de cultura fragmentos não desagregados de tecido e observar que ocorriam mitoses na periferia desses fragmentos (Butler, 2006).

Com o passar do tempo, as culturas celulares se transformaram num importantíssimo instrumento para estudo da biologia celular, permitindo observação apurada das relações autócrinas e parácrinas dessas células (Romanello *et al.*, 2002), influência de fatores específicos na expressão gênica (Wagner *et al.*, 1998), diferenciação fenotípica e citotoxicidade (Hendrich *et al.*, 1996).

Essa descoberta de que células podem ser cultivadas e multiplicadas *in vitro* (Valério *et al.*, 2005) e o desenvolvimento de meios de cultura apropriados para cada objetivo de pesquisa, permitem então observar o comportamento celular de forma bastante específica. Células em cultura mostram um comportamento de proliferação e diferenciação representativo do que ocorre numa população celular *in vivo* (Jones *et al.*, 1976).

O estabelecimento de protocolos para isolamento de células osteoprogenitoras e osteoblastos a partir da digestão seqüencial de calvária de rato, propiciou um

interessante modelo para estudo do comportamento das células ósseas de forma efetiva e barata e tem sido usado como base para experimentos de vários pesquisadores (Aubin, 1998; Malaval *et al.*, 1999; Mancini *et al.*, 2000).

Vários estudos fizeram comparação do aspecto morfológico dessas células *in vitro* e *in vivo*. As diferenças mais frequentes observadas são a forma menos alongada da célula de cultura, uma diferença na sua orientação espacial e uma ligação intercelular mais forte quando em cultura (Boyde *et al.*, 1976).

Osteoblastos de cultura primária estão aptos a desempenhar suas funções *in vitro* (Jones *et al.*, 1976). Como possuem alta capacidade proliferativa, podem ser repicados e usados em experimentos quando nas passagens 2 a 3. Após várias passagens começam a sofrer descaracterizações.

O cultivo de células ósseas *in vitro* permite quantificar ou caracterizar a secreção de vários produtos, o que proporciona parâmetros importantes para o estudo da interação célula-biomaterial (Coelho *et al.*, 2002). Esse modelo atende aos critérios internacionais em termos de qualidade e acurácia dos resultados obtidos, oferecendo possibilidade de análise e repetição padronizada dos fatores envolvidos na biocompatibilidade (Hendrich *et al.*, 1996).

Linhagens celulares obtidas através de modificações genéticas de células primárias têm sido muito usadas em testes *in vitro*. No entanto, esse uso é bastante discutível quando se pretende reproduzir o mais próximo possível o que aconteceria *in vivo*, uma vez que essas modificações a que são submetidas para imortalizá-las, alteram sobremaneira suas características originais (Valério *et al.*, 2005).

2.7 Ensaios *in vitro*

2.7.1 Viabilidade Celular (MTT)

Ensaio de MTT é um teste de laboratório e um ensaio colorimétrico padrão (um ensaio que mede mudanças na cor) para medição de proliferação celular. É usado para determinar a citotoxicidade de agentes medicinais potenciais e de outros materiais tóxicos. O MTT amarelo (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) é reduzido a formazan roxo na mitocôndria de células vivas. Uma solução de solubilização é adicionada para dissolver o produto de "formazan" roxo insolúvel em uma solução colorida. A absorção dessa solução colorida pode ser quantificada por medição a certo comprimento de onda (normalmente entre 500 e 600nm) por um espectrofotômetro.

Essa redução só acontece quando as enzimas mitocondriais reductase estão ativas, portanto a conversão está diretamente relacionada ao número de células vivas, representada na **Figura 4**. Quando a quantidade de formazan roxo produzido por células tratadas com um agente é comparada com a quantidade de formazan produzido por células de controle não tratadas, a efetividade do agente em causar a morte de células pode ser deduzida (Valério *et al.*, 2004).

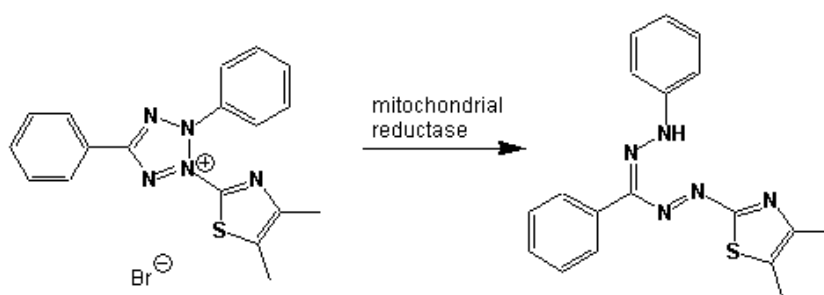


Figura 4 Redução de MTT à formazan. Fonte: Valério *et al.*, 2004.

A mitocôndria é a organela celular responsável pela produção de energia. É uma organela basicamente membranosa. Seu envoltório é formado por duas membranas, a membrana externa e a membrana interna, ambas com composição química e estrutural semelhante à plasmalema.

A membrana externa é "lisa" e mais permeável que a membrana interna. Há entre as duas membranas um espaço denominado espaço intermembranoso onde ocorrem muitas reações importantes do metabolismo celular. A membrana interna é formada por pregas que se expandem no espaço intramitocondrial (matriz mitocondrial) denominadas cristas mitocondriais.

A matriz mitocondrial contém enzimas (relacionadas principalmente com o ciclo de Krebs), ribossomos e o DNA mitocondrial. Nas cristas mitocondriais localizam-se as enzimas responsáveis pela cadeia respiratória - as proteínas transportadoras de elétrons e as ATPsintases (Valério *et al.*, 2005).

2.7.2 Produção de Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina óssea (faos) é um marcador bioquímico do metabolismo ósseo, onde podemos definir como substâncias que retratam a formação ou a reabsorção óssea. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação (fosfatase alcalina óssea) na realidade medem produtos decorrentes da ação destas células.

Os marcadores de formação são todos eles frutos da síntese osteoblástica. A fosfatase alcalina óssea é uma glicoproteína específica encontrada na superfície dos osteoblastos. Sua função ainda não está de todo elucidada, porém seu papel na mineralização do esqueleto está confirmado. A avaliação da atividade sérica da fosfatase alcalina óssea é um marcador ósseo que fornece informações úteis do

remodelamento ósseo na osteoporose, na doença de Paget e no acompanhamento de terapias preventivas e de reposição hormonal ou de outras terapias antiabsortivas (Valério *et al.*, 2005).

A fosfatase alcalina contida no plasma humano é fisiologicamente a somatória de várias isoenzimas que provêm do osso, do fígado, do intestino e da placenta, durante a gravidez. Esta enzima é codificada pelo gene, tecido não-específico, localizado no cromossomo 1.

Em condições normais, as duas formas predominantes em circulação (>90% do total) de fosfatase alcalina, são a óssea e a hepática, em quantidades equivalentes. A outra forma circulante, em concentrações significativas, é a forma intestinal, que representa menos de 5% do total. A fosfatase alcalina é uma ectoenzima, ou seja, está localizada na superfície externa da célula, onde exerce sua atividade.

As alterações encontradas na hipofosfatasia, doença devida a uma mutação no gene codificador da enzima, predominantemente osteomalácia, sugerem fortemente que a enzima tenha papel fundamental na mineralização.

Estudos já demonstraram que a produção de fosfatase alcalina pelos osteoblastos quando estes estão em contato com diferentes biomateriais tem um comportamento alterado, dependendo da composição destes biomateriais (Best *et al.*, 1997), sendo então a verificação qualitativa e quantitativa da secreção desta enzima um parâmetro importante para análise dos efeitos causados no tecido ósseo, uma vez que ela reflete a atividade osteoblástica (Hajime *et al.*, 1993).

Um aumento na produção de fosfatase alcalina já foi demonstrado quando os osteoblastos estão em presença de apatitas (Nishio *et al.*, 2000) e de biovidro com 45% de sílica (Xynos *et al.*, 2000).

2.7.3 Colágeno

O colágeno, também conhecido como gelatina é uma das maiores moléculas protéicas do organismo humano. Encontra-se presente na estrutura dos tecidos conjuntivos, cartilagosos e fibrosos, como pele, ossos, tendões, dentes, vasos sanguíneos, músculos, unhas, cabelos, articulações (líquido sinovial), entre outros, representando mais de 30% das proteínas presentes no organismo. Sua composição de aminoácidos é bastante específica, sendo formada principalmente por glicina e prolina.

Para a síntese de colágeno é necessário que estes aminoácidos sejam agrupados e hidroxilados. Para que esta reação ocorra é fundamental a presença do ácido ascórbico (Vitamina C) para a ativação da enzima que irá catalisar este processo (Valério *et al.*, 2005).

Colágeno é uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz celular do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas. No homem existem pelo menos 28 tipos de colágeno, possuindo diferentes funções.

O colágeno é sintetizado intracelularmente em pequenas porções e exportado para fora da célula, onde, através da atuação de enzimas polimerizantes, é definido com a estrutura própria de colágeno, em alfa-hélice-tripla. A molécula de colágeno possui uma composição de aminoácidos não muito comum. É formado por um grande número de glicinas e prolinas, assim como por mais dois aminoácidos que são modificados após serem colocados pelos ribossomos: a hidroxiprolina e a hidroxilisina. Após a hidroxilação e sob a ação da glicosiltransferase, açúcares residuais são acoplados à cadeia e começa a conformação helicoidal fixada por duas pontes dissulfeto na extensão C. Formada, a molécula é então transferida para o aparelho de Golgi onde o terminal C

é remodelado e forma-se então o chamado procolágeno. O procolágeno é transportado para a superfície celular, onde o terminal C é removido juntamente com o terminal N pela procolagenopeptidase. As cadeias remanescentes então se alinham e ocorre uma série de conexões entre essas fibrilas. Esse alinhamento é mantido por pontes de hidrogênio intermoleculares.

No caso das células ósseas, ocorrerá mineralização da fibra colágena juntamente com outras proteínas não colagenosas também secretadas pelos osteoblastos. Para que isso ocorra haverá a necessidade da ação da fosfatase alcalina que desfosforilará algumas fosfoproteínas nas regiões de conexão.

O cálcio e o fósforo podem precipitar pela regulação membrano-simile dos osteoblastos havendo evidências de que são extruídas vesículas com dupla membrana ricas destes dois íons e que seriam derivadas do aparelho de Golgi por cisão parcial (Douglas, 1998).

É sabido que o metabolismo ósseo pode ser avaliado pela análise da síntese de colágeno possibilitando estudo e controle de possíveis alterações (Vargas, 1997). Também é viável avaliar a interação entre o tecido ósseo e biomateriais com diferentes características, pela quantificação da síntese de colágeno pelos osteoblastos, que podem ser estimulados ou inibidos por substâncias liberadas pelos biomateriais no meio (Anselme, 2000).

2.7.4 Osteocalcina (OCN)

A OCN é uma proteína secretada por osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos. Possui seu gene localizado no cromossoma 1 (1q25-q31) sendo constituída por uma seqüência de 49 aminoácidos cujas posições 17, 21 e 24 são ocupadas pelo ácido γ -carboxiglutâmico (Gla) que é responsável pela fixação do cálcio

e da hidroxiapatita na matriz extracelular, o que equivale a dizer que é responsável pela efetiva mineralização que se verifica no tecido ósseo (Ishimoto & Price, 1980; Owen *et al.*, 1990). Resíduos γ -carboxiglutamil são formados após γ -carboxilação pós-traducional do resíduo glutamil onde a vitamina K₁ constitui co-fator essencial para ocorrência de tal processo que permitirá a mineralização da matriz depositada (Ishimoto & Price, 1980).

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam, ainda, ter participação no recrutamento e diferenciação osteoclástica (Chenu *et al.*, 1994).

Sabe-se que a OCN é totalmente destruída quando sob ação de enzimas osteoclásticas não sendo, portanto, útil como marcador bioquímico de reabsorção óssea. Apesar de originar-se da matriz óssea, pequenas porções podem ganhar a circulação sanguínea e serem hidrolizadas no fígado e rim por metaloproteases tornando sua vida plasmática bastante curta, embora possam ser identificadas por métodos bioquímicos de análise nas suas diversas formas moleculares circulantes. Assim teremos distribuídas: forma intacta cerca de 36%, contendo um fragmento amino terminal grande 1-43 (40%) e fragmentos menores contendo frações de aminoácidos de 1-19, 20-43 e 29-49 (34%) cuja excreção é dependente da função renal de modo que valores acima do habitual podem ser encontrados quando a filtração pelos túbulos renais estiver comprometida (Delmas *et al.*, 2000). É interessante notar que sua liberação está condicionada a um ciclo circadiano fazendo com que a reabsorção seja maior durante a noite com pico às 4 horas e nadir às 17 horas com uma diferença de aproximadamente 15% (Delmas, 1993; Sarainen *et al.*, 1994; Saraiva & Castro, 2002). Seus valores acham-se acima das concentrações normais na doença de Paget e no hiperparatireoidismo primário (Delmas *et al.*, 2000; Heshmati *et al.*, 1998).

O interesse pela OCN explica-se por sua relação com o processo de mineralização do tecido ósseo.

2.7.5 Osteoprotegerina (OPG)

Nos últimos dez anos ocorreram grandes progressos na compreensão dos mecanismos de formação e reposição do osso. Por exemplo, a descoberta da osteoprotegerina e o seu papel na osteoclastogênese ajudaram a entender os mecanismos reguladores de formação e ativação de osteoclastos (Haynes *et al.*, 2001).

A osteoprotegerina (OPG – protetora de osso), também conhecida como fator inibidor de osteoclastogênese, é uma proteína com semelhança com os membros da família de receptor para TNF (fator de necrose tumoral). A OPG funciona como um receptor solúvel para RANK, competindo com RANKL, uma molécula da família do TNF. Ambos são elementos importantes na remodelação óssea e regulam as interações entre linfócitos T e células dendríticas. RANK e RANKL são essenciais no desenvolvimento e ativação de osteoclastos e perda óssea em relação a todos os estímulos conhecidos (Haynes *et al.*, 2001).

A inibição da função de RANKL via OPG previne perda óssea em articulações inflamadas e tem benefícios parciais na injúria da cartilagem articular. A OPG é secretada como um homodímero com tamanho de 110 kDa. Camundongos deficientes de OPG apresentam osteoporose severa e alta incidência de fraturas, mostrando que a massa óssea correlaciona-se com os níveis de OPG nas células. A expressão de OPG em células da medula óssea é influenciada negativamente por fatores como a vitamina D3, prostaglandinas e corticóides e positivamente por elementos de cálcio e fator de transformação beta (TGF- β) (Haynes *et al.*, 2001).

Osteoblastos e osteoclastos são células importantes na manutenção do processo de cinética óssea, envolvidos em formação e reabsorção óssea, respectivamente (Hofbauer *et al.*, 2001).

Em estados patológicos, células ativadas contribuem com outras moléculas no balanço entre atividade osteoblástica e osteoclástica. O principal sinal intercelular que regula a remodelação óssea é medido por três membros da família do fator de necrose tumoral (TNF) e receptor de necrose tumoral (TNFR) (Hofbauer *et al.*, 2001).

A identificação de um novo sistema de receptor/ ligante mostrou ser importante no metabolismo ósseo. A interação entre o fator ativador RANK e o seu ligante RANKL mostrou ser crítica para que ocorra a formação de osteoclastos. Além disso, a identificação da osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel, se tornou importante, ligando-se ao RANKL impedindo a conexão RANK/RANKL, e conseqüentemente à formação de osteoclastos e reabsorção óssea. No caso sadio, a OPG mantém o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Lipton *et al.*, 2001; Sattler *et al.*, 2004).

Em certas situações clínicas e modelos experimentais, a OPG previne a perda óssea apesar da continuidade do estímulo inflamatório. Tanto em modelos experimentais como em situações clínicas é possível visualizar um potencial efeito benéfico inibindo a atividade osteoclástica e a reabsorção óssea. Efeitos colaterais do uso clínico de OPG ainda precisam ser estabelecidos (Sattler *et al.*, 2004).

Em modelos experimentais, o tratamento com OPG leva ao desaparecimento de perda de massa óssea em sítios articulares e periarticulares. Tanto RANK como RANKL são expressos em condrócitos e sua relevância funcional ainda são desconhecidos. A administração de OPG em base teórica deve funcionar como protetora de cartilagem além de osso (Bolon *et al.*, 2002).

Em humanos, em um estudo fase 1 com osteoprotegerina recombinada (AMGN-0007) administrada por via subcutânea em pacientes com lesões ósseas metastáticas, ocorreu uma redução importante na doença óssea e nos marcadores ósseos (Body *et al.*, 2003).

2.7.6 Óxido Nítrico

O sistema imunológico é um notável sistema de adaptação para defesa que evoluiu nos vertebrados para protegê-los de microorganismos patogênicos invasores. É capaz de gerar um grande número de células e moléculas que podem especificamente ou inespecificamente eliminar uma variedade aparentemente ilimitada de agentes invasores. Essas células e moléculas agem em conjunto proporcionando uma rede dinâmica primorosamente adaptável (Goldsby *et al.*, 2000; Charalampos *et al.*, 2005). Entre elas destacam-se neutrófilos, macrófagos, monócitos com papel essencial na atividade fagocítica e apresentadora de antígeno. (Huffnagle *et al.*, 2003; McCormack *et al.*, 2003; Romani, 2004).

Os macrófagos desempenham importante papel na resposta imune, seja por atuarem como células apresentadoras de antígenos ou por produzirem e liberarem mediadores inflamatórios e quimiotáticos. Também atuam como primeira linha de defesa do hospedeiro pela liberação de um grande número de fatores, incluindo os intermediários reativos do nitrogênio, como o ON, um potente mediador das respostas imune e inflamatória (Hibbs *et al.*, 1988; Johnston, 1988; Laskin *et al.*, 1994).

As células dendríticas, altamente especializadas, capturam e processam os antígenos, expressam moléculas co-estimuladoras para os linfócitos, migram para os órgãos linfóides e secretam citocinas para iniciar a resposta imune. São consideradas as principais células apresentadoras de antígenos e desempenham papel crucial na

iniciação da resposta imune primária (Banchereau & Steinman, 1998; Koga *et al.*, 2001).

A seqüência clássica de diferenciação do sistema mononuclear fagocitário segue de promoblasto para monoblasto, promonócito, monócito e macrófago maduro. Todos esses tipos morfológicos são encontrados na medula óssea, sendo que os monócitos são liberados na corrente sanguínea e, então, se disseminam para todos os tecidos (Zwilling & Eisenstein, 1994).

Uma vez ativados, os macrófagos se caracterizam por um rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica, podendo desempenhar funções paralelas além da fagocitose. Essas células também secretam mais de cem produtos, dentre eles, enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação e citocinas (Roitt *et al.*, 2001).

Alguns aspectos da fisiologia dos macrófagos são influenciados de alguma forma pelo lipopolissacarídeo (LPS), um produto das bactérias gram-negativas. O LPS induz aumento do consumo de glicose e oxigênio e a célula adquire a capacidade de matar microorganismos e células tumorais. Os macrófagos também desenvolvem um mecanismo refinado para reconhecer o LPS no ambiente e, portanto, é um dos mais potentes estimuladores de macrófagos (Zwilling & Eisenstein, 1994).

Os compostos intermediários do nitrogênio (RNI) e do oxigênio (ROI) representam dois importantes mediadores da atividade microbicida e antitumoral dos macrófagos (Xie *et al.*, 1997), contribuindo para a resposta inespecífica do hospedeiro e para o processo inflamatório. Tanto os ROI como os RNI, atuam na sinalização e regulação da resposta inflamatória e imune das doenças infecciosas e fúngicas (Balish *et al.*, 2005).

O óxido nítrico é produzido por células do sistema imune como as células dendríticas, células NK, mastócitos e macrófagos (Bogdan, 2001). Durante o final da década de 80 e início de 90, importantes conhecimentos sobre o ON foram descobertos, sua característica de molécula mensageira (sinalizador inter e intracelular) e como toxina atuando em inúmeros processos patológicos (Flora Filho & Zilberstein, 2000).

O ON é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica devido à presença de radical livre que a torna um agente químico altamente reativo. Quando diluído, tem meia vida de menos de 10 segundos devido a sua rápida oxidação a nitrato e nitrito. Liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contêm o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica (Snyder & Bredt, 1992).

Essa pequena e versátil molécula é formada através da oxidação do átomo de nitrogênio do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e, logo em seguida, se transforma em nitrito (NO_2) (Myers *et al.*, 2003). A L-arginina é um aminoácido semi-essencial produzido no organismo. A arginina é utilizada na síntese de creatinina e fornece a ornitina para a síntese de poliaminas.

Proteínas digeridas são degradadas até arginina, podendo ser diretamente absorvidas e utilizadas no ciclo da uréia no tecido hepático, ou transformadas no epitélio intestinal em ornitina, que juntamente com a glutamina são convertidas em citrulina (Stuehr *et al.*, 1991). A citrulina pode ser convertida diretamente em L-arginina no citoplasma das células endoteliais e dos macrófagos (Flora Filho & Zilberstein, 2000). O NO está envolvido em numerosos processos homeostáticos como regulação do tônus vascular, modulação da citotoxicidade por macrófagos ativados, regulação da proliferação celular, regulação da migração celular, ativação de fatores de transcrição, indução de

genes sítio protetores, modulação da produção de citocinas tóxicas e neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico (Nathan *et al.*, 1992).

No sistema imune o ON interfere em vários processos como o de diferenciação, proliferação e apoptose de células imunológicas, na produção de citocinas e outros mediadores solúveis além da síntese de componentes da matriz extracelular (Marshall *et al.*, 2000; Bogdan *et al.*, 2001).

2.8 Biocompatibilidade

O termo biocompatibilidade refere-se ao conjunto de propriedades desejáveis a um material que será inserido em um organismo vivo. Os autores definem a biocompatibilidade sob diversos aspectos, sendo a resposta biológica o mais importante.

Park & Lakes (1992) definem biocompatibilidade como a aceitação de um implante artificial pelos tecidos circundantes e pelo corpo como um todo, em termos de propriedades mecânicas, químicas, superficiais e farmacológicas.

Horbett *et al.* (1996) citam Williams (1987) definindo um material biocompatível como um material que não induza uma resposta inflamatória aguda ou crônica e não previna a diferenciação dos tecidos ao redor dos implantes. No entanto, o trabalho de Horbett *et al.* (1996) reconhece que uma reação tecidual inflamatória ao redor do biomaterial implantado é inevitável, devido ao trauma cirúrgico durante a inserção. Dessa forma, essa definição indica que a biocompatibilidade depende do propósito do implante.

Portanto, a biocompatibilidade abrange vários aspectos do material, incluindo seu potencial citotóxico, alergênico e mutagênico, não devendo apresentar efeitos tóxicos ou causar danos teciduais (Costa, 2011). Os materiais que preenchem os requisitos biológicos são denominados biomateriais, termo que se refere a qualquer

substância que possa ser usada por qualquer período de tempo como parte de um sistema e que objetive o tratamento ou a reposição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Anusavice, 2005).

A avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais segue recomendações de diversas organizações e federações há mais de 60 anos. Esses testes consistem de uma seqüência de protocolos de pesquisa, descritos e regulamentados, tendo por objetivo regulamentar a avaliação da segurança dos materiais a serem utilizados em humanos.

Os testes podem ser de três níveis: testes iniciais, testes secundários e testes de aplicação. Os testes iniciais pertencem ao primeiro nível, e determinam de maneira preliminar, o comportamento biológico de materiais e de seus componentes de modo a simular as reações biológicas desencadeadas pelos materiais quando colocados em ou dentro dos tecidos do corpo (Hanks *et al.*, 1996). Para este propósito, têm-se utilizado parâmetros como crescimento celular, morfologia celular, conteúdo protéico das células e liberação de mediadores como citocinas e quimiocinas (Hauman & Love, 2003).

Os testes de citotoxicidade são os mais comumente utilizados para esta finalidade e oferecem a oportunidade de estudar a toxicidade promovida pelo material diretamente ou através da liberação de seus componentes (Hauman & Love, 2003); são considerados rápidos, baratos e reprodutíveis (Rezende *et al.*, 2005).

De acordo com Spangberg & Langeland (1973), quando um material for considerado tóxico *in vitro*, sempre causará irritação tissular, entretanto, uma baixa toxicidade *in vitro* não implica em baixa irritação tecidual *in vivo*, pois há muitos fatores envolvidos como a reabsorbilidade, solubilidade nos tecidos, fragmentação pelos fagócitos ou até reação inflamatória induzida.

Dessa forma, é fundamental a execução dos testes secundários, os quais são realizados em animais de pequeno porte como roedores. Neste nível, os materiais teste podem ser injetados diretamente (Figueiredo *et al.*, 2001) ou implantados em tecido subcutâneo (Nassri *et al.*, 2003; Zafalon *et al.*, 2007; De Oliveira *et al.*, 2010) ou intra-ósseo (Sousa *et al.*, 2006). Os testes secundários são realizados no intuito de informar sobre o padrão de resposta tecidual desenvolvido no organismo frente a um material (Costa, 2005).

No terceiro nível, estão os testes de aplicação que envolve o uso de animais, principalmente cães ou macacos (Torabinejad *et al.*, 1997; Leonardo *et al.*, 1999; Bernath & Szabo, 2003). No entanto, são testes considerados caros, demorados e difíceis de serem controlados (Hauman & Love, 2003). Por fim, no intuito de determinar a biocompatibilidade dos biomateriais, é necessário realizar estudos em humanos, estudos clínicos retrospectivos ou prospectivos controlados (Hauman & Love, 2003).

Dessa forma, dentre as várias metodologias utilizadas para os testes iniciais e secundários, os testes de citotoxicidade e de implantação dos materiais em tecido conjuntivo subcutâneo de animais, respectivamente, parecem ser os mais amplamente utilizados (Estrela, 2001).

Adicionalmente, segundo Ripamonti & Duneas (1996), a histologia é frequentemente utilizada para a avaliação da biocompatibilidade de um material implantado em tecidos moles, sendo que a maioria dos protocolos baseia-se na determinação qualitativa de um relativo número de vários tipos celulares e a quantidade de componentes da matriz extracelular ao redor do implante, assim como a espessura da

cápsula fibrosa ao redor do implante tem sido comumente utilizada para mensurar a resposta tecidual do biomaterial implantado.

2.9 A resposta tecido/implante

Uma vez que materiais sintéticos têm sido usados extensivamente nos últimos 50 anos, torna-se necessária a compreensão das respostas celular e tecidual a esses materiais. Já é claro que a interação tecido-polímero envolve a liberação de fatores quimiotáticos, entre outros, e essas moléculas induzem e sustentam uma resposta inflamatória na área do implante (Laurencin *et al.*, 1994).

A reação inflamatória do hospedeiro é uma resposta normal à injúria e presença de corpos estranhos. A magnitude e duração do processo inflamatório têm um impacto direto na bioestabilidade e biocompatibilidade do biomaterial (Kao & Lee, 2001).

A inflamação serve para conter, neutralizar, diluir ou cercar o agente ou processo causador da injúria. Adicionalmente, a inflamação desencadeia uma série de eventos responsáveis pela cura e reconstituição do sítio implantado do hospedeiro através de reposição de tecido lesado pela regeneração de células parenquimais e/ou formação de um tecido fibroso cicatricial (Ratner *et al.*, 1996).

Células sanguíneas, tais como neutrófilos e monócitos têm um papel importante na resposta inflamatória e na incorporação do implante. Linfócitos, plasmócitos, células “natural killers”, macrófagos e células gigantes são ativamente envolvidos no complexo antigênico ou reações imunológicas que estão associadas à incorporação de transplantes ou implantes de origem natural. Reações imunológicas são usualmente de menor importância quando se utilizam materiais como polímeros sintéticos, metais, cerâmicas ou seus compósitos (Ratner *et al.*, 1996).

Linfócitos e plasmócitos migram mais lentamente que os neutrófilos para o foco inflamatório, tendo ação coadjuvante nas atividades macrofágicas. Reconhecem antígenos e desenvolvem respostas para eliminá-los, principalmente em quadros inflamatórios crônicos e granulomatosos.

Fibroblastos têm um importante papel na incorporação do implante e estão envolvidos no processo de encapsulação do mesmo. Seus produtos, tais como mucopolissacarídeos – constituintes primários da matriz de tecido conectivo – e os diferentes colágenos estão envolvidos na aderência aos biomateriais. O fibroblasto e a deposição de seus produtos ao longo das células endoteliais estão envolvidos na formação de importante microvasculatura para incorporação do implante (Ziats *et al.*, 1988).

Neutrófilos e macrófagos estão relacionados à reparação de ferimentos e processo de cura, assim como à eliminação de bactérias que podem causar infecção na área do implante e ameaçar o processo de implantação. Neutrófilos estão principalmente envolvidos na fase aguda da inflamação e têm relativamente curta vida quando comparados aos macrófagos (e seus derivados) que estão envolvidos na inflamação crônica e fase de cura (Ziats *et al.*, 1988).

O macrófago parece ter um papel significativo na regulação da reparação de feridas. Macrófagos ativados estimulam a neovascularização, síntese e deposição de colágeno. Também produzem fatores quimiotáticos para fibroblastos e secretam collagenases envolvidas na quebra do tecido conjuntivo (Laurencin *et al.*, 1994).

Muitos fatores contribuem para a resposta biológica a um material no meio implantado, tais como a formulação química, o tamanho, o formato, o sítio de implantação e a duração do contato do material implantado com o tecido.

Características superficiais de biomateriais e eventos decorrentes das interfaces dos biomateriais têm sido críticas para aceitação, integração e durabilidade de um implante. Um implante de um biomaterial deve ter características de superfície que promovam a adesão de células eucariotas adequadas e crescimento de tecido fibrovascular (Laurencin *et al.*, 1994).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da incorporação da Testosterona ao compósito de polímeros biodegradáveis (PLGA e PCL) e fosfato de cálcio bifásico em células ósseas, bem como a resposta do tecido subcutâneo de ratos em contato com os compósitos.

3.2 Específicos

- 1.** Preparar e caracterizar físico-quimicamente o compósito PLGA/PCL/BCP nas proporções 1:1:8 p/p com testosterona;
- 2.** Verificar os efeitos fenotípicos e genotípicos dos osteoblastos em cultura sob a presença dos compósitos;
- 3.** Avaliar a biocompatibilidade dos compósitos *in vivo* e *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

A biocerâmica Osteosynt[®], fosfato de cálcio bifásico 60-80 mesh constituída de 65% de Hidroxiapatita- $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ e 35% de β -fosfato tricálcio- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, utilizada neste estudo, foi gentilmente cedida pela empresa Einco Biomaterial Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil. O hormônio proprionato de testosterona puro da Pharma Mostra, Belo Horizonte, MG. O copolímero biodegradável de ácido láctico e glicólico (PLGA) (50:50 razão molar) de peso molecular 60.000 g/mol, viscosidade de 0.39 dL/g em HFIP a 30° C, lote D01079 e a policaprolactona (PCL) de peso molecular 10.000 g/mol, viscosidade de 1.01 dL/g em CHCl_3 a 30° C, lote D02042 foram adquiridos da Birmingham Polymers Inc., Pelham, EUA. O diclorometano (lote 24684, densidade 1.320-1.328 g/mL a 20° C, Quimex Produtos Químicos, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como solvente no preparo dos compósitos. Os outros materiais foram os Kits MTT (V-13154), BCIP-NBT (N-6547), Reagente de Griess (G-7921) da Invitrogen Corporation, EUA; o Kit Micro BCA Protein Assay (23235) da Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA; o Kit Elisa de osteoprotegerina de rato (E0108r) da EIAab, Wuhan, China; o Kit EIA de osteocalcina de rato (BT-490) da Biomedical Technologies, Stoughton, MA, EUA e o Kit Sircol da Biocolor, Irlanda do Norte, Reino Unido. Ainda foram adquiridos os seguintes reagentes: Vermelho de Alizarin S da Merck; Nitrato de prata PA, Tiosulfato de sódio e ácido acético glacial da Synth; Safranina da Panreac; DMEM (D2906), Soro Fetal Bovino e Penicilina-Estreptomocina da Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo dos compósitos

Os compósitos foram preparados através do método de evaporação do solvente. Foi pesado em balança analítica (Balance Pinnacle Series PI-225D, Denver Instrument[®]): 937,5 mg de cada polímero, PCL e PLGA; 7,5 g do fosfato de cálcio bifásico (BCP) e 937,5 mg de propionato de testosterona (T). Assim, seguiu-se a proporção de 1:1:8 (PCL:PLGA:BCP) e a relação $T/(BCP+PCL+PLGA) = 0.1$ peso/peso (Kim *et al.*, 2004). Usaram-se as mesmas medidas dos polímeros e biocerâmica para o compósito sem o hormônio (Costa *et al.*, 2012).

Os polímeros foram dissolvidos em 50 mL de diclorometano em agitação (Agitador magnético RH-KTIC, IKA[®]) por 3 h. Em seguida, adicionou-se à solução a biocerâmica e o hormônio, permanecendo em agitação por mais 2 h. Antes da completa evaporação do solvente, os compósitos foram colocados em moldes cilíndricos de 4 mm de diâmetro (**Figura 5A**). Após 48 h estes foram removidos dos moldes e levados à estufa à vácuo (TE-395, Tecnal) a 40° C por 24 h, para a completa evaporação do solvente. Em seguida, os compósitos, em forma de cilindro de 5 cm de altura e diâmetro de 4 mm, foram cortados em pastilhas de 1 mm de espessura em micrótomo IsoMet[®]1000, Buehler (**Figura 5B**). E antes da utilização nos ensaios *in vitro*, os compósitos foram esterilizados com óxido de etileno.

Ao final, foram obtidos os seguintes grupos experimentais:

1. Compósito PLGA/PCL/BCP/T;
2. Compósito PLGA/PCL/BCP.

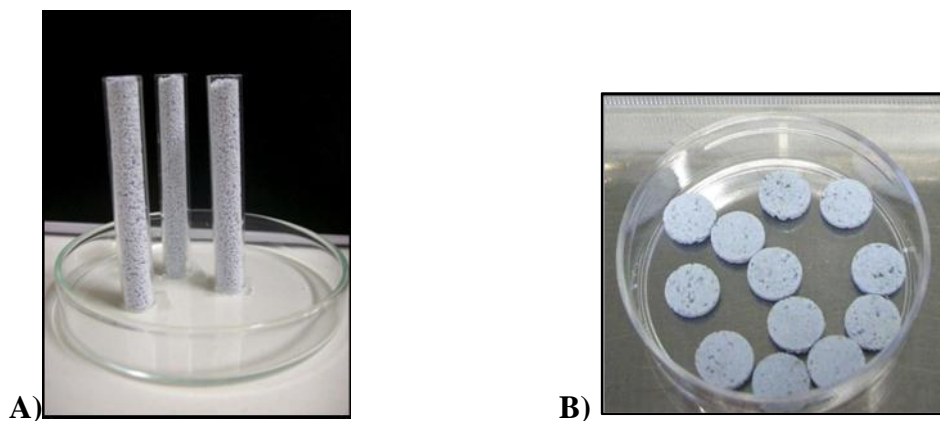


Figura 5 Fotografias da moldagem dos compósitos, e estes após o pastilhamento. A) Compósitos nos moldes cilíndricos e B) Compósitos após o pastilhamento. Fonte: Gala-García, 2010.

4.2.2 Análise térmica

4.2.2.1 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

As análises térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG) foram realizadas utilizando uma termobalança SDT Q600 (TA Instruments, Inc.) em atmosfera de $N_{2(g)}$, com vazão de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, em cadinho de Alumina (Al_2O_3) e uma razão de aquecimento de $10^\circ \text{ C}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa entre $25\text{-}700^\circ\text{C}$. Foi utilizado em média 5 mg das amostras para cada análise. A partir das análises foi possível determinar o perfil térmico dos materiais de partida e dos compósitos.

4.2.3 Extração de Testosterona

Para a determinação da quantidade de testosterona incorporada no compósito foi realizada a extração do hormônio através do solvente metanol. Três amostras aleatórias das pastilhas, pesando aproximadamente 150 mg cada, foram colocadas em béqueres contendo 5 mL de metanol, e mantidas em agitação. Após 24 h, o extrato foi recolhido e a solução de metanol foi substituída. Este passo se repetiu até o limite de detecção do HPLC utilizado (SPD-10A UV-Vis detector, Shimadzu). Antes da injeção do material

recolhido no HPLC para a quantificação do hormônio o volume de metanol foi completado para 5 mL.

Para a quantificação da testosterona nos extratos foi empregada a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector UV-Vis. Foi usada a coluna Nucleosil C18 (250 mm x 3.20 mm) poro 5 µm da Supelco, Inc. A separação foi realizada usando a fase móvel de água 95% metanol com fluxo de 1.6 mL/min. O volume de injeção do extrato foi 20 µL. E o comprimento de onda de leitura foi de 241 nm. A concentração dos extratos foi determinada utilizando-se uma curva padrão.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – Espectroscopia de Raio-X de Energia Dispersiva (MEV-EDS)

Três amostras de cada grupo em estudo foram analisadas por MEV-EDS para avaliação qualitativa da presença de poros e estudo da composição superficial das amostras antes e depois de 21 dias em simulador de fluido corporal (SBF). O SBF foi preparado como descrito previamente por Kokubo (2006), e apresenta concentrações de íons similares às do plasma sanguíneo humano. Os reagentes de grau analítico NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄, MgCl₂, CaCl₂ e Na₂SO₄ foram dissolvidos em água destilada. O pH da solução foi ajustado para 7.4 à 37°C.

A análise de EDS foi realizada para o estudo da propriedade de bioatividade dos compósitos *in vitro*, através da formação de uma camada de apatita similar ao osso em sua superfície antes e após 21 dias em SBF. Os compósitos foram imersos em 2 mL de SBF por 21 dias a 37°C, e a solução de SBF foi renovada a cada três dias.

Foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura FEG - Quanta 200 FEI do Centro de Microscopia da UFMG.

4.2.5 Variação do pH

Três amostras de cada compósito (com e sem hormônio) foram colocadas em eppendorfs contendo 2 mL de PBS pH 7.4 e deixadas em agitação à 37° C em incubadora de bancada (CTM45, Contemp) durante 21 dias. A cada 24 h o sobrenadante era recolhido e substituído por nova solução de PBS, e o pH era medido em pH-metro digital (HI 221, Hanna Instruments®).

4.2.6 Cultura de osteoblastos

Os osteoblastos foram isolados da calvária de ratos neonatos *Wistar*, provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, com 1 a 5 dias de idade. As calvárias foram dissecadas, removido todo o tecido mole, e cortadas e lavadas em PBS tamponado estéril sem cálcio e magnésio. Os fragmentos da calvária foram incubados com 1% tripsina-EDTA por 5 minutos, seguidos por 4 incubações sequenciais com 2% de colagenase II a 37° C por 45 minutos cada uma. Os sobrenadantes das duas primeiras incubações foram descartados. Os sobrenadantes das três últimas incubações com colagenase foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos, e produziram um precipitado de células com grande proporção de osteoblastos. Cada precipitado foi ressuspensionado em 5 ml do meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico-antimicótico, e transferidos para garrafas de cultivo de células. As células aderidas às garrafas caracterizaram a primeira passagem. Quando estas atingiram 80% de subconfluência, foram tripsinizadas e transferidas para outras garrafas de cultivo, ampliando-se a amostra. As células aderidas a estas novas garrafas caracterizaram a segunda passagem celular. Os procedimentos realizados em animais respeitaram as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (certificado em anexo).

Após os osteoblastos de segunda passagem atingirem 80% de subconfluência, as células foram transferidas para placas de 24 poços onde os compósitos foram colocados. A densidade celular utilizada em cada poço foi de 5×10^4 células/cm². Após 7, 14 e 21 dias de incubação com os compósitos, em incubadora de CO₂ (Revco Elite II, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, EUA), as células osteoblásticas foram submetidas a ensaios de viabilidade e proliferação; produção de fosfatase alcalina e conteúdo total de proteínas; produção de colágeno; quantificação de osteocalcina e osteoprotegerina; mineralização pelo método Von Kossa e dosagem de óxido nítrico, como descrito a seguir. Como controle positivo foi utilizado apenas células cultivadas em poliestireno.

4.2.7 Viabilidade e proliferação celular (MTT)

A viabilidade e proliferação dos osteoblastos foram determinadas pelo método do MTT (3-{4,5-dimetiltiazol-2-yl}-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromide, Sigma-Aldrich, UK). Após cada tempo experimental, as células foram incubadas durante 4 horas em 40 µL de solução de MTT (5 mg/ml) à 37°C em atmosfera úmida. Após a completa conversão do MTT pelas mitocôndrias celulares em cristais de formazan, foi acrescentado 400 µL da solução SDS 10% HCl para a solubilização destes. Após incubação por overnight, a medida de densidade óptica foi feita a 570 nm em um espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Finlândia). A viabilidade celular é diretamente proporcional à densidade óptica representada no gráfico.

4.2.8 Atividade de fosfatase alcalina e conteúdo total de proteínas

Para as análises da atividade de fosfatase alcalina e conteúdo total de proteínas dos osteoblastos, retirou-se o meio de cultura dos poços, após cada tempo experimental, e as amostras foram lavadas três vezes com PBS aquecida à 37°C. A seguir, os poços foram preenchidos com 1 mL de água deionizada e as placas submetidas a 5 ciclos de choque térmico (congelamento/descongelamento), que consistiram na exposição da

placa em ambiente à -20°C por 20 minutos em freezer, seguida de 15 minutos a 37°C em incubadora. Isso resulta na lise das células e liberação do seu conteúdo na solução de água deionizada. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi imediatamente utilizado para as análises de atividade de fosfatase alcalina e quantificação de proteínas.

4.2.8.1 Atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina (FA) pode ser medida através do ensaio BCIP-NBT (5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate - nitroblue tetrazolium). A FA cliva o grupo fosfato do BCIP produzindo um próton, que por sua vez reduz o NBT deixando uma coloração azulada.

Para a dosagem de fosfatase alcalina, 150 μL do lisado de cada grupo foram transferidos para uma placa de 96 poços. Então, 50 μl da solução de BCIP-NBT, foram adicionados a cada poço. Após duas horas de incubação, a densidade óptica foi determinada a 595 nm em um espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Finlândia).

A atividade específica (AE) é a unidade enzimática (UE) expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Os resultados foram expressos como atividade de fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo de proteína total (μmol de NBT reduzido por min por mg de proteína).

4.2.8.2 Quantificação de proteínas

A quantidade total de proteínas foi determinada através do kit micro-BCA Protein Assay. O kit Micro BCA Protein Assay da Thermo Scientific é uma formulação de ácido bicinonínico detergente compatível para a detecção colorimétrica e quantificação da proteína total. Uma adaptação do kit Pierce BCA Protein Assay da

Thermo Scientific (Produto No. 23225), o Micro BCA Kit foi otimizado para uso com amostras de proteínas diluídas (0.5-20µg/mL). O método original patenteado utiliza ácido bicinconínico (BCA) como reagente de detecção para Cu^{+1} , que é formado quando Cu^{+2} é reduzida em proteínas em ambiente alcalino. Um produto de reação de cor roxa é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon de cobre (Cu^{+1}). Este complexo solúvel em água exibe uma forte absorvância a 562 nm que é linear com o aumento da concentração de proteína.

Para a quantificação de proteínas totais, 150 µL do lisado de cada grupo foram transferidos para uma placa de 96 poços, acrescentou-se 150 µL da solução de trabalho que consiste em 25:24:1 partes dos reagentes micro BCA A:B:C. Após 2 horas de incubação a 37°C, a medida da densidade óptica foi determinada a 562 nm em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Finlândia). A concentração de proteínas foi determinada a partir de uma curva de calibração do padrão de albumina.

4.2.9 Dosagem de colágeno

A produção do colágeno pelos osteoblastos foi avaliada pelo ensaio de SIRCOL no sobrenadante das culturas. Este método é baseado na propriedade de ligação seletiva do corante Sirius Red a porção terminal [Gly-X-Y] tripeptídeo da molécula de colágeno de mamíferos. O colágeno solubilizado foi quantificado por análise de densidade óptica a 495 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Finlândia). A quantidade de colágeno foi calculada baseada na regressão linear da medida de concentração de um padrão do colágeno tipo I previamente conhecida.

4.2.10 Quantificação de Osteocalcina

Para a quantificação da síntese de osteocalcina foi utilizado o kit: Rat Osteocalcin EIA Kit, nº BT-490 (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA, EUA).

Em cada tempo experimental (7,14 e 21 dias), 25 μL do sobrenadante de cada grupo e do controle mais 100 μL de antissoro de osteocalcina foram incubados a 37°C por 2.5 horas. Em seguida, o conteúdo da placa foi completamente aspirado; lavou-se a placa por 5 vezes com tampão de lavagem fornecido no kit. Adicionou-se 100 μL de peroxidase de burro anti-cabra IgG e incubou-se por 1 h à temperatura ambiente. Após este período de incubação, repetiu-se a lavagem da placa e adicionou-se 100 μL da mistura de (3,3¹,5,5¹-tetrametil benzidina) peroxidase e peróxido de hidrogênio (1:1 v/v) seguida de 30 min de incubação protegido da luz, à temperatura ambiente. Por fim, paralisou-se a reação adicionando-se 100 μL de solução “stop”; a absorbância foi medida em 450 nm utilizando-se o espectrofotômetro Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Finlândia.

4.2.11 Quantificação de Osteoprotegerina

Para a determinação quantitativa de osteoprotegerina foi utilizado o kit de imunoenensaio: Rat Osteoprotegerin, OPG ELISA Kit (Wuhan EIAab Science Co., Ltd., Wuhan, China). Transferiu-se 100 μL do sobrenadante de cada grupo, incluindo-se o controle, a uma placa de 96 poços pré-tratada com anticorpo policlonal conjugado com biotina específico para osteoprotegerina e avidina conjugada a peroxidase (HRP); incubou-se por 2h a 37°C. Em seguida, uma solução de substrato TMB é adicionada a cada poço. Apenas os poços que contêm OPG, anticorpo conjugado com biotina e avidina conjugada a enzima irá apresentar uma mudança de cor. A reação enzima-substrato é terminada pela adição de uma solução de ácido sulfúrico e a mudança de cor é medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm, utilizando-se o espectrofotômetro Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Finlândia. A concentração de OPG nas amostras é então determinada por comparação da densidade óptica das amostras com a curva padrão.

4.2.12 Mineralização da matriz pelo método Von Kossa

As células dos grupos, PLGA/PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP, e do controle foram submetidas à coloração *in vitro* pela técnica de Von Kossa, após cada tempo experimental (7, 14 e 21 dias), para a quantificação da formação de nódulos de mineralização da matriz. Esta técnica revela uma intensa coloração negra destes nódulos. O meio de cultura foi removido, as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído 4%, por 5 minutos. Logo após, a solução foi descartada e as células lavadas com água ultrapura (DI-PAK[®], Milli-DI, Millipore). A seguir, foi adicionada uma solução de nitrato de prata 5% e as placas foram expostas à luz ultravioleta por 60 minutos. As células foram novamente lavadas com água ultrapura, por três vezes, acrescentando-se uma solução de tiosulfato de sódio 5%, por 3 minutos. E, após a remoção desta, as células foram contracoradas com safranina 1%, por 30 segundos.

Os nódulos foram contados em cinco campos aleatórios por poço, com o auxílio de microscópio óptico invertido (10X).

4.2.13 Concentração de óxido nítrico

A concentração de nitrito em sobrenadante de cultura de osteoblastos, uma medida indireta da síntese de NO, foi determinada pela reação de Griess de acordo com o método descrito por Oliveira *et al.* (2000). Os sobrenadantes da cultura de cada grupo e do controle foram coletados nos tempos definidos (7, 14 e 21 dias) e 50 µL destes foram incubados com 50 µL do reagente de Griess, por uma hora, à temperatura ambiente, protegidos da luz. A leitura do ensaio foi realizada a 548 nm em espectrofotômetro Multiskan Spectrum da Thermo Scientific, Finlândia. A concentração de nitrito foi calculada pela média dos valores da curva-padrão de NaNO₂ e os valores foram expressos em µM de nitrito.

4.3 Estudo *in vivo*

4.3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 30 ratos *Wistar* machos, adultos-jovens, pesando em média 250g, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas forradas com serragem, recebendo ração sólida comercial balanceada e água *ad libitum*. O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo N° 304/2012), da UFMG.

4.3.2 Pré-Operatório

Os animais, inicialmente, foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais de acordo com o período de observação histológica (15, 30 e 60 dias). Cada grupo possuía dez animais, subdivididos em três grupos de acordo com o material a serem implantados: PLGA/PCL/BCP/T (n=4); PLGA/PCL/BCP (n=4) e como controle animais apenas incisionados (n=2). Os animais que receberam o compósito PLGA/PCL/BCP/T foram identificados com um furo na orelha direita; os que receberam o compósito PLGA/PCL/BCP foram identificados com um furo na orelha esquerda (**Figura 6**) e os animais do subgrupo controle não tiveram a orelha furada.

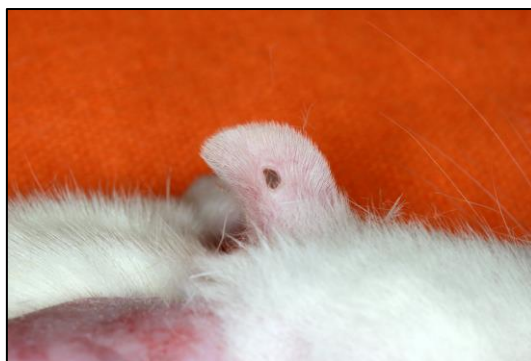


Figura 6 Fotografia da identificação dos animais, representada por um animal do grupo PLGA/PCL/BCP.

4.3.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular com uma seringa descartável de 1 mL, utilizando-se uma formulação composta por 10 mL de anestésico (Ketamina 10%) e 7,5 mL de relaxante muscular (Xilazina 10%) em uma quantidade de 0,1 mL/100g do peso do rato (Maltos *et al.*, 2004; Gala-García *et al.*, 2012).

Os animais anestesiados foram submetidos à tricotomia na região dorsal. Após antissepsia local com iodopovidona, foi realizada uma incisão mediana entre as espinhas ilíacas com divulsão do tecido subcutâneo em direção caudal. Em seguida, as pastilhas de compósito foram introduzidas subcutaneamente na região dorsal em direção caudal.

A incisão foi suturada por meio de ponto simples com fio de sutura de seda 4.0, Shallom, seguindo-se de aplicação local de iodopovidona. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

Após o procedimento cirúrgico, foram mantidos 2 animais por gaiolas plásticas para a cicatrização da ferida cirúrgica. Além disso, os animais permaneceram sob constante observação diária, para que intercorrências não pudessem comprometer o

experimento. Os animais não receberam medicação pós-operatória com o objetivo de não provocar possíveis alterações nos resultados.

4.3.4 Procedimento cirúrgico para remoção dos implantes

Após os tempos experimentais de 15, 30 e 60 dias, os animais foram previamente anestesiados com injeção intramuscular da mistura de 10 mL de anestésico (Ketamina 10%) e 7,5 mL de relaxante muscular (Xilazina 10%) em uma dose de 0,1 mL/100 g de peso do rato, realizou-se novamente a tricotomia e antissepsia da região (**Figuras 7A e B**). Os animais anestesiados foram sacrificados utilizando-se a técnica de deslocamento cervical. Utilizando tesoura, procedeu-se a incisão (**Figura 8A**) e divulsão (**Figuras 8B e C**) da pele com os compósitos e tecidos adjacentes (**Figura 8D**).

As peças para avaliação histológica (**Figura 9**) foram imersas em formol 10% tamponado em PBS 0,1 M por 48 h, e as para análise por MEV (**Figura 9**) foram imersa em glutaraldeído 5% tamponado em PBS 0,1 M por 24 h. As peças foram acondicionadas em frascos individuais opacos, ao abrigo da luz, com identificação do rato e grupo para posterior análise histopatológica e por MEV.

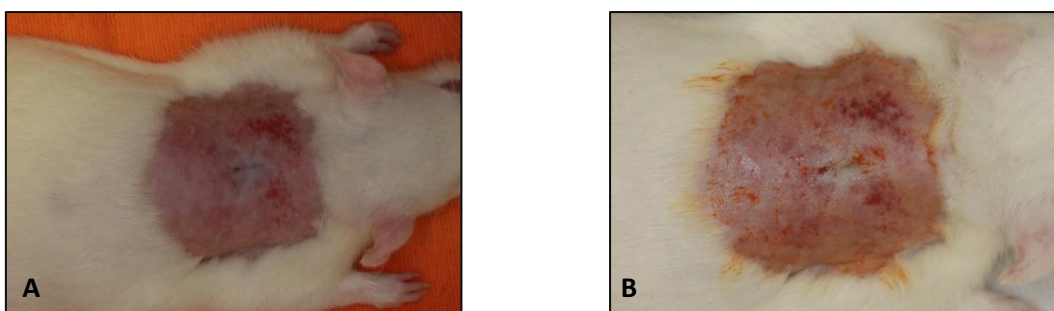


Figura 7 Fotografias da região do implante após tricotomia (**A**) e antissepsia (**B**).

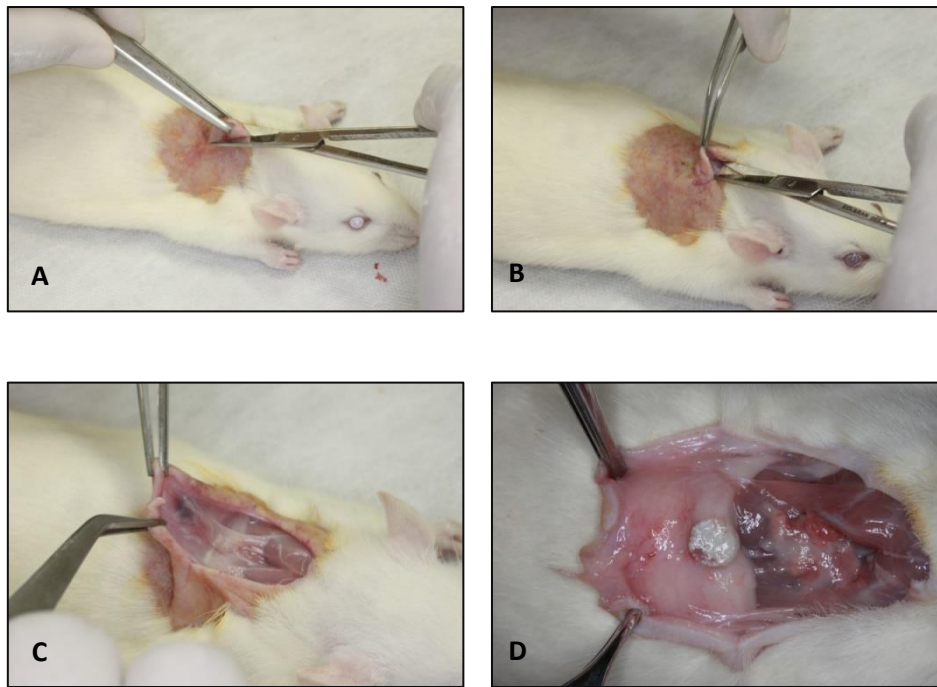


Figura 8 Fotografias da incisão (A), da divulsão do tecido (B e C) e do compósito no tecido (D).



Figura 9 Fotografia da peça cirúrgica para processamento histopatológico e microscopia eletrônica de varredura.

4.3.5 Análise histopatológica

O processo de reparo e intensidade da inflamação do tecido em contato com os compósitos foram avaliados morfológicamente considerando os tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório e as características da cápsula presente na interface implante/tecido conjuntivo.

Para a avaliação histopatológica, foi utilizado microscópio de luz com conjunto óptico para aumentos de 5, 10, 40 e 100X. Para cada espécime, foram analisadas seis lâminas histológicas, na região de interface implante/tecido conjuntivo. Foram avaliados, por meio de análise histopatológica descritiva, diferentes eventos microscópicos, tais como:

- Tipo de infiltrado inflamatório (células polimorfonucleares e/ou células mononucleares)
- Presença de células fagocitárias (macrófago e células gigantes multinucleadas)
- Presença de necrose
- Presença de fibroblastos no local, compondo um tecido conjuntivo denso modelado ou não.

A intensidade da reação inflamatória foi estabelecida de forma descritiva seguindo os critérios (FDI):

- Ausente: ausência de reação inflamatória;
- Leve: escassas células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo;
- Moderada: grande quantidade de células inflamatórias dispostas focalmente;
- Intensa: grande quantidade de células inflamatórias difusas no tecido conjuntivo adjacente.

A intensidade da reação inflamatória observada em cada corte foi convertida em scores 0, 1, 2 e 3 correspondentes a inflamação ausente, leve, moderada e intensa, respectivamente. Os scores foram utilizados para análise estatística dos dados.

4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

As pastilhas de compósitos, retiradas aos 15, 30 e 60 dias de implantação no tecido subcutâneo do rato, foram imersas em solução de glutaraldeído 5% por 24 h. Subsequentemente, foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à desidratatção etanólica e mantidas a 37 °C por 24 h. Logo depois, foram incubadas em aparelho de ponto crítico de CO₂. Posteriormente, as amostras foram montadas em bases metálicas apropriadas (*stubs* de alumínio) e submetidos à metalização com ouro.

As imagens eletromicroscópicas foram obtidas em microscópio FEI Quanta 200 do Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.4 Análises estatísticas

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em hexaplicata, e os resultados foram obtidos de pelo menos dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas através de Análise de variância - ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

Os dados obtidos após a classificação da intensidade da inflamação *in vivo*, convertidos em scores, foram submetidos a teste para verificação da normalidade da amostra. Uma vez que esta não apresentou distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dun's.

Diferenças foram consideradas significativas se $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise Térmica

A curva TG do propionato de testosterona (**Figura 10A**) apresenta um patamar de estabilidade térmica de até 160°C, quando se inicia uma perda de massa contínua até aproximadamente 340°C. A curva DTA do propionato de testosterona (**Figura 11A**) apresenta dois eventos endotérmicos, o primeiro em aproximadamente 110°C que representa uma mudança de fase do material (ponto de fusão) e o segundo em 340°C referente à total degradação do fármaco. Tais resultados estão de acordo com os relatados por Abd El-Mohdy HL (2012).

De acordo com a curva TG da biocerâmica (**Figura 10B**), esta apresenta uma perda de massa de aproximadamente 1.6% até 100°C, relativo à perda de água. De 100°C a 700°C a biocerâmica apresenta um patamar de estabilidade térmica. Verificando-se a curva DTA da biocerâmica (**Figura 11B**), nota-se que esta não apresenta nenhum evento relacionado à decomposição nem a mudanças de fase, já que é termoestável na faixa de temperatura analisada (Dorozhkin, 2011).

A curva TG da policaprolactona (**Figura 10C**) apresenta um patamar de estabilidade térmica até 230°C, onde se inicia uma perda de massa contínua até aproximadamente 500°C, sem formação de resíduos. A curva DTA da policaprolactona (**Figura 11C**) apresenta dois eventos endotérmicos. O primeiro em torno de 50-60°C, representando uma mudança de fase do polímero (fusão), e o segundo em aproximadamente 400°C, representando a total degradação do polímero. Já a curva TG do PLGA (**Figura 10D**) apresenta estabilidade térmica até 250°C, seguido de um único evento térmico em torno de 250°C, referente à total decomposição do polímero. A curva DTA do PLGA (**Figura 11D**) apresenta um evento endotérmico em torno de 45-50°C e outro em 300-370°C, sendo o primeiro associado à transição vítrea e o segundo a

termodecomposição do polímero, respectivamente. Estes resultados se assemelham àqueles de Barbanti *et al.*(2008), analisando os mesmos polímeros.

A curva TG do compósito PLGA/PCL/BCP (**Figura 10E**) apresenta um perfil de decomposição semelhante ao somatório das curvas TG do PLGA, PCL e BCP isolados, o que indica que não houve formação de um novo material. Tal achado é característico de compósitos de polímeros biodegradáveis e biocerâmica. A alta massa residual (79.2%) observada é atribuída a BCP, já que esta é termoestável na faixa de temperatura avaliada. A curva DTA do compósito PLGA/PCL/BCP (**Figura 11E**) apresenta eventos endotérmicos característico dos polímeros isolados: em torno de 56°C associa-se ao ponto de fusão da policaprolactona e, entre 250-350°C, refere-se à decomposição térmica dos dois polímeros (Barbanti *et al.*, 2008; Dorozhkin, 2011).

Enquanto, a curva TG do compósito PLGA/PCL/BCP/T (**Figura 10F**) apresenta estabilidade térmica até aproximadamente 160°C, quando se inicia uma suave perda de massa até se atingir 340°C, quando se observa uma perda de massa contínua até se atingir 360°C. A adição da testosterona ao compósito mudou o perfil de termodecomposição do mesmo: este fato pode ser atribuído a uma possível ligação mais forte entre o hormônio e os polímeros, especialmente o PCL. A curva DTA do compósito (**Figura 11F**) apresenta um perfil particular com alguns eventos endotérmicos associados aos materiais de partida isolados. Por exemplo, o evento observado a 47°C pode ser atribuído a transição vítrea do PLGA, em 56°C sugere-se que seja a fusão do PCL e aquele em torno de 250-350°C corresponde à total degradação dos polímeros e da testosterona (Barbanti *et al.*, 2008; Dorozhkin, 2011; Abd El-Mohdy HL, 2012).

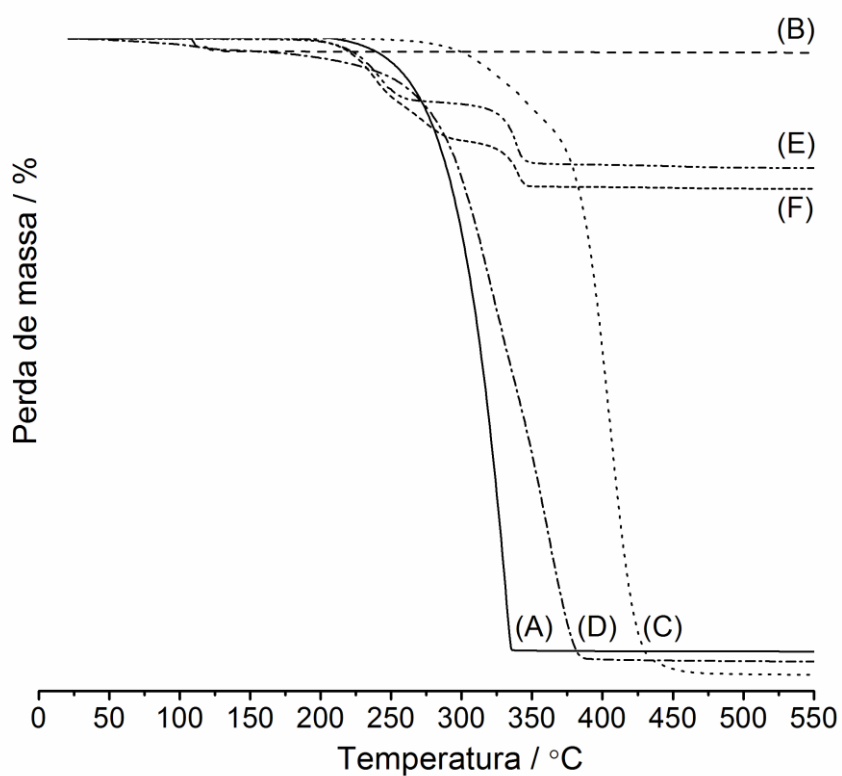


Figura 10 Curvas termogravimétricas (TG) da (A) testosterona, do (B) fosfato de cálcio bifásico, da (C) policaprolactona, do (D) poli ácido lático-co-glicólico, do (E) PLGA/PCL/BCP e do (F) PLGA/PCL/BCP/T.

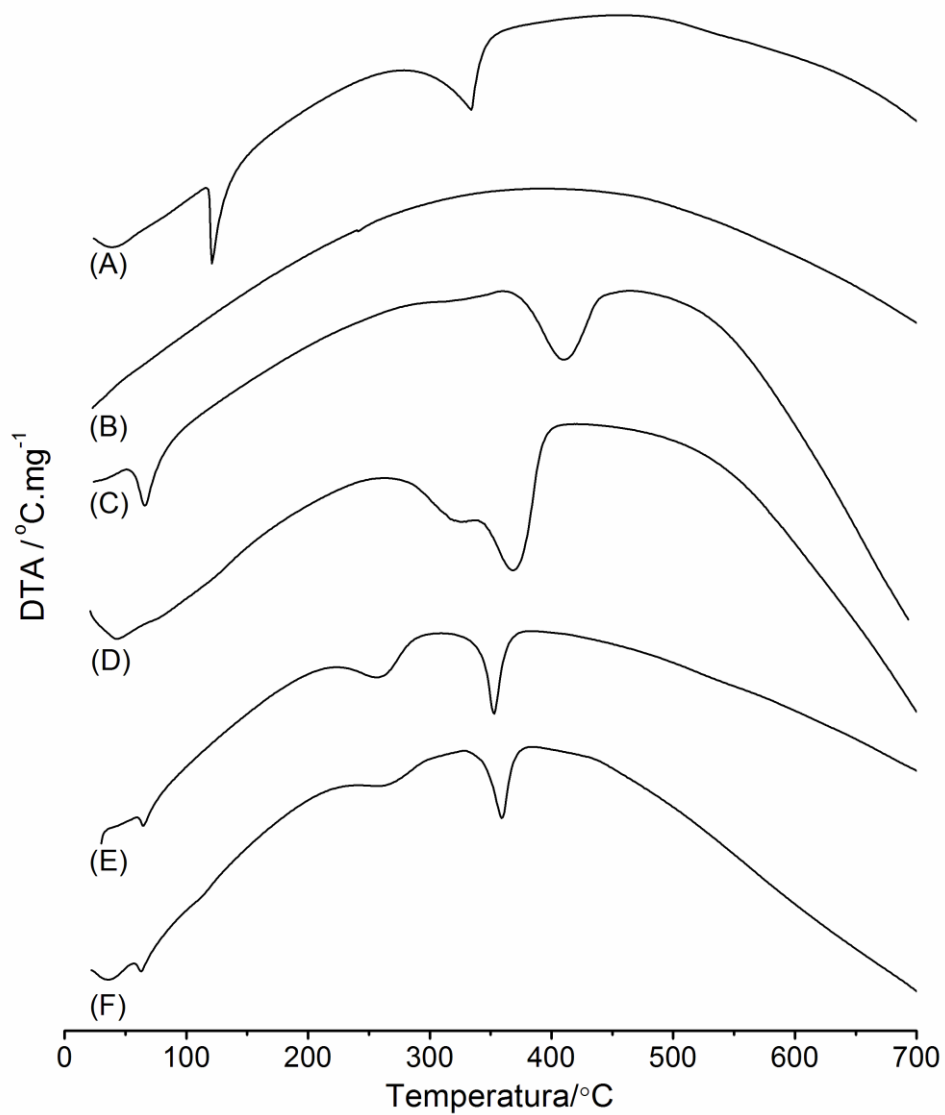


Figura 11 Análise térmica diferencial (DTA) do (A) Propionato de Testosterona (T); do (B) Fosfato de cálcio bifásico (BCP); da (C) PCL; do (D) PLGA; do (E) PLGA/PCL/BCP e do (F) PLGA/PCL/BCP/T.

5.2 Extração de Testosterona

A tabela abaixo representa a concentração (C) em $\mu\text{g/mL}$ e a massa (M) em mg de propionato de testosterona extraído da pastilha de compósito PLGA/PCL/BCP/T de três experimentos independentes. As pastilhas de compósito utilizadas pesaram em média 150 mg. De acordo com os resultados encontrados, cada pastilha de compósito PLGA/PCL/BCP/T apresenta aproximadamente 3.5 mg de propionato de testosterona em sua composição.

Tabela 1: Determinação da quantidade de Testosterona por pastilha de compósito.

PLGA/PCL/BCP/T (n = 3)		
t (h)	C ($\mu\text{g/mL}$)	M (mg)
24	687	3.435
48	13.84	0.0692
72	2.21	0.01105
TOTAL:		3.51525

Legenda: t (h) = tempo em horas; C = concentração de hormônio no extrato e M = massa de testosterona.

A **Figura 12** representa a curva de calibração do propionato de testosterona (PT) realizada no aparelho HPLC. Foram utilizadas cinco soluções de PT em concentrações conhecidas (3.5, 7, 12.5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), e foi obtido o gráfico da área abaixo do pico em relação a concentração de PT. A análise de regressão linear forneceu a equação $Y = A + B * X$, com $R = 0.99966$.

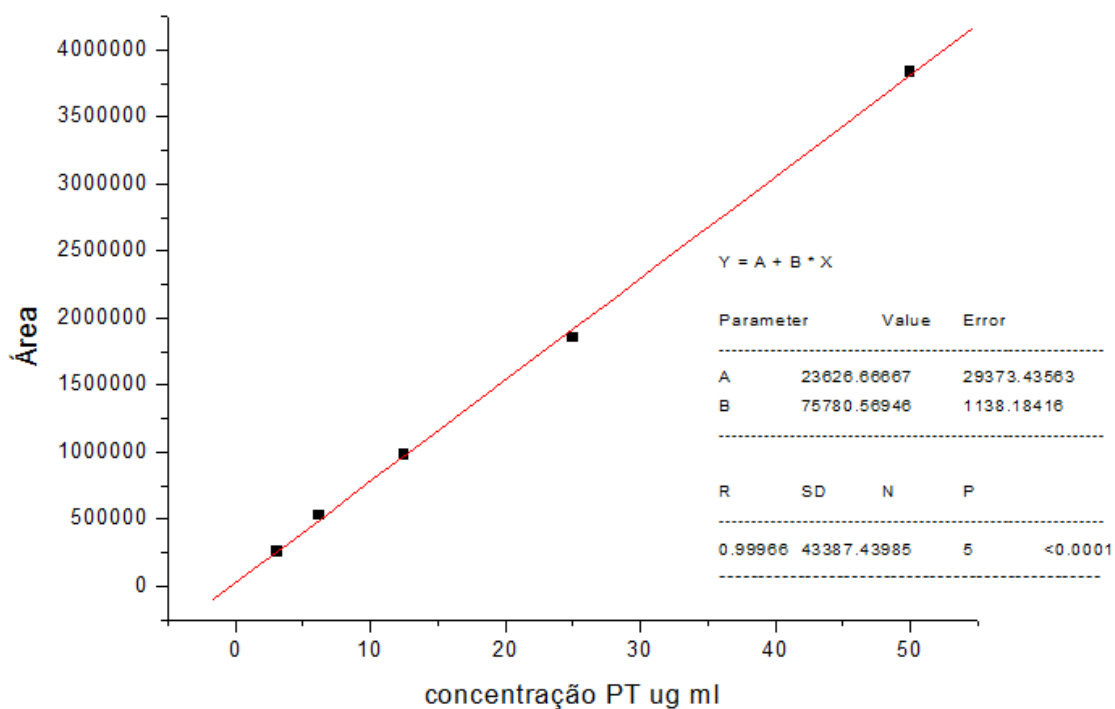


Figura 12 Curva de calibração da concentração de propionato de testosterona com análise de regressão linear.

5.3 MEV- EDS dos compósitos

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a espectroscopia de raio-X de energia dispersiva (EDS) do compósito PLGA/PCL/BCP/T (**Figuras 13A e 13B**, respectivamente) revelou uma estrutura porosa, homogeneamente distribuída, e uma maior predominância de cálcio e fosfato em sua composição química, respectivamente. A MEV-EDS do mesmo compósito, após 21 dias, em meio de cultura (**Figuras 14A e 14B**, respectivamente), mostrou uma maior exposição dos poros, além de maior intensidade dos picos de cálcio e fosfato, respectivamente. A análise do compósito sem hormônio apresentou as mesmas características antes e após 21 dias em meio de cultura (**Figuras 15 e 16**).

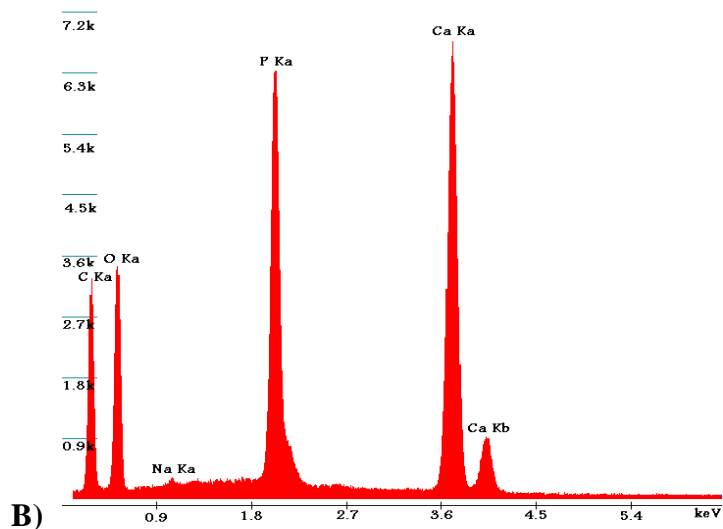
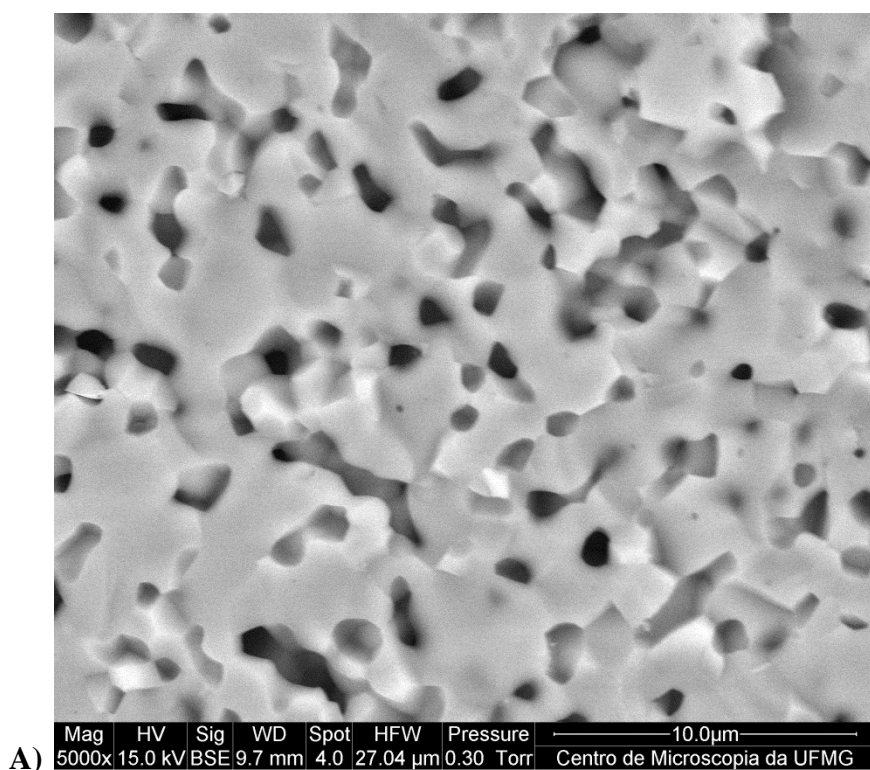


Figura 13 A) Fotomicrografia do compósito PLGA/PCL/BCP/T, mostrando sua estrutura porosa e homogeneamente distribuída, e o B) Espectro EDS do mesmo compósito, mostrando a predominância de cálcio e fósforo em sua composição química.

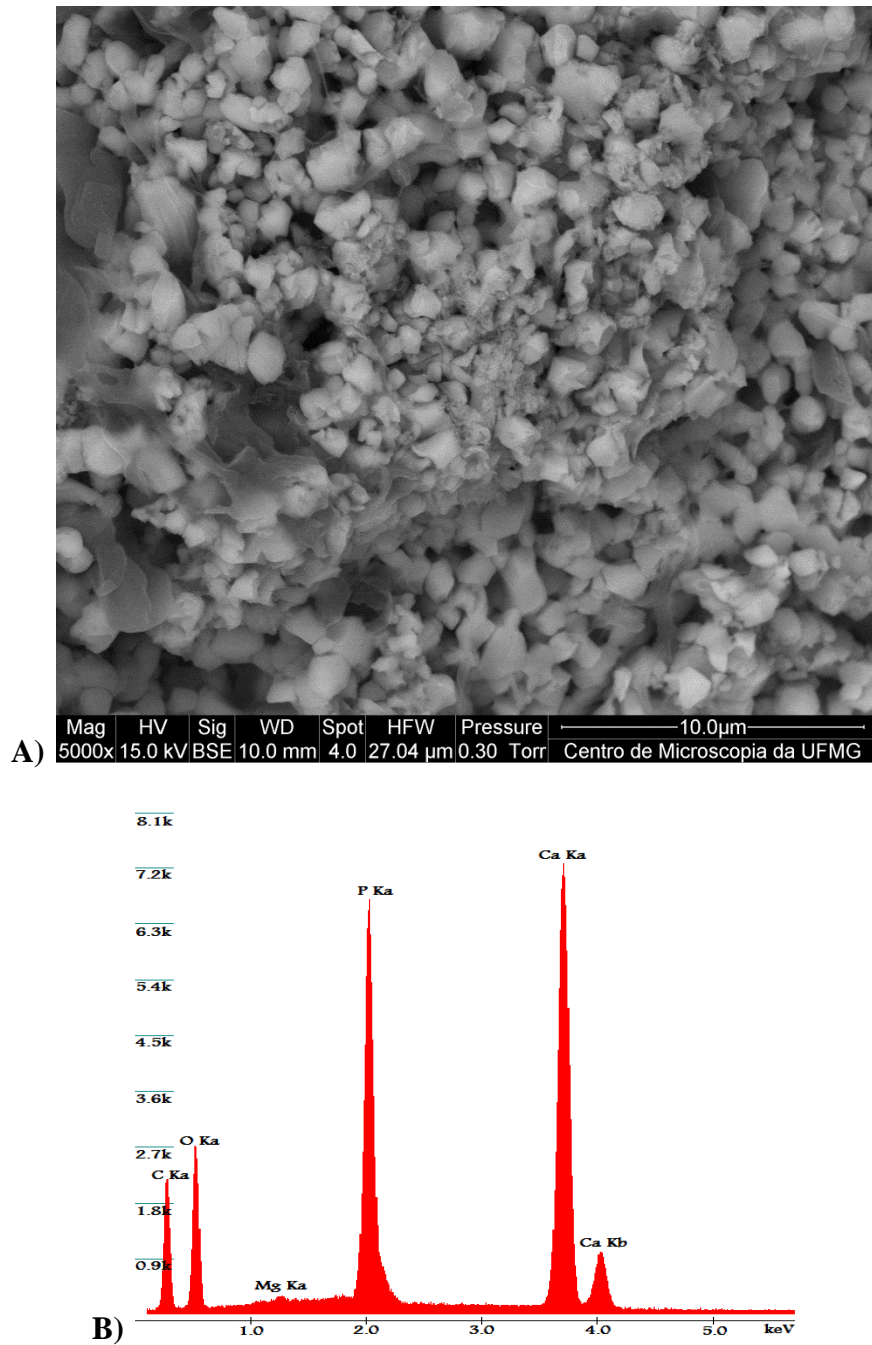


Figura 14 A) Fotomicrografia do compósito PLGA/PCL/BCP/T, após 21 dias em SBF, mostrando uma maior exposição dos poros ao meio e o B) Espectro EDS do mesmo compósito, após 21 dias em SBF, mostrando maior intensidade dos picos de cálcio e fosfato.

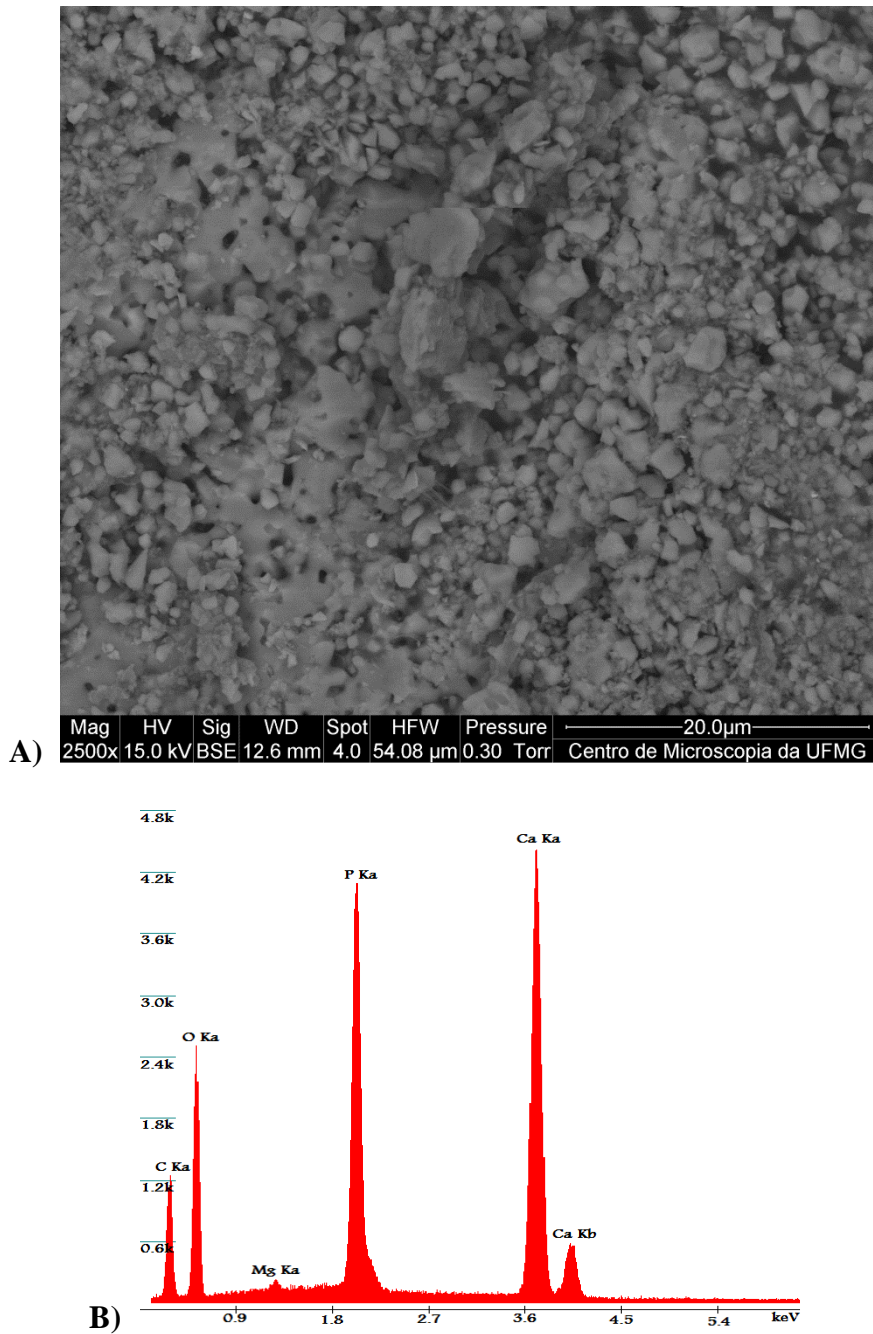


Figura 15 A) Fotomicrografia do compósito PLGA/PCL/BCP, mostrando sua estrutura porosa e o **B)** Espectro EDS do mesmo compósito, mostrando a predominância de cálcio e fosfato em sua composição química.

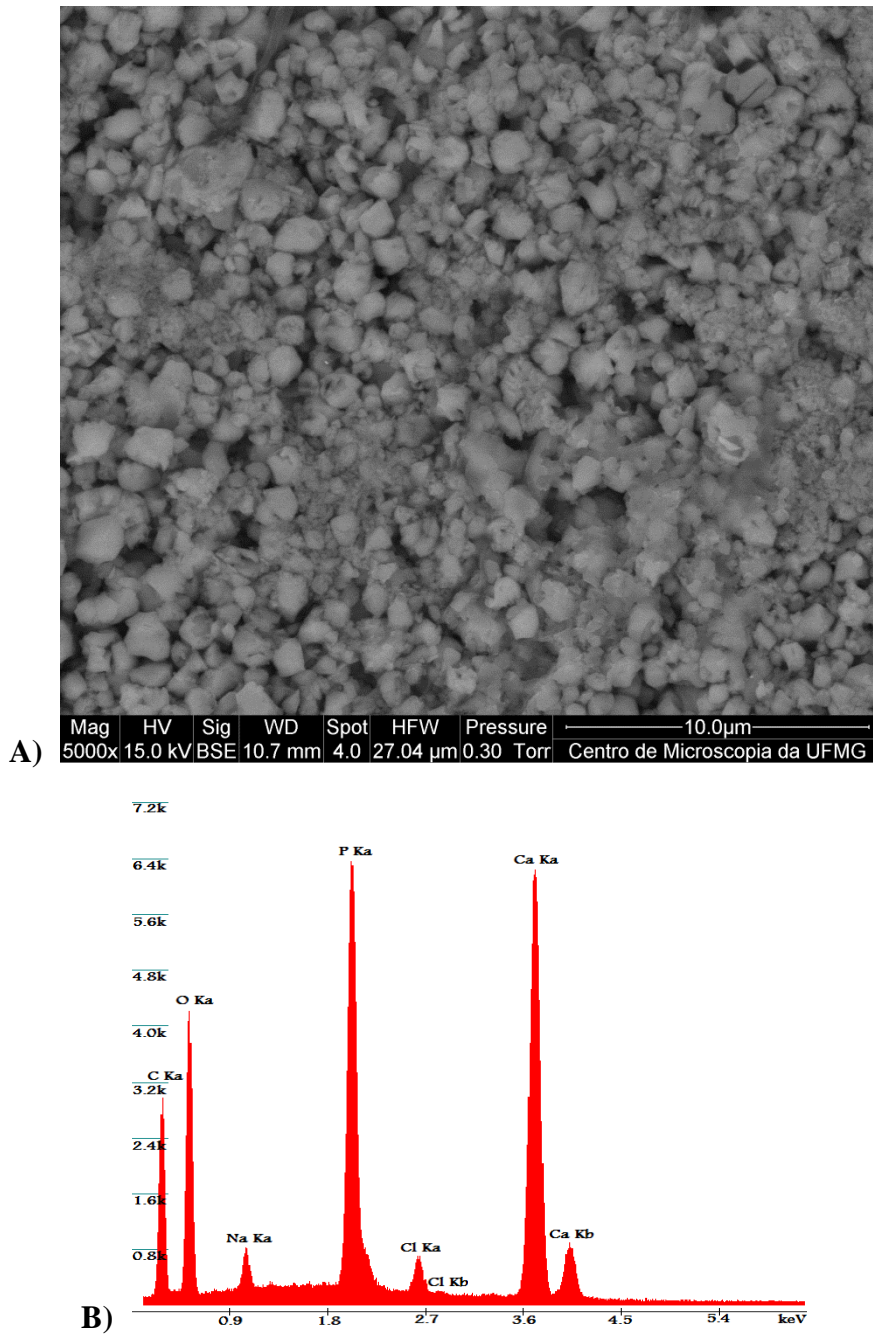


Figura 16 A) Fotomicrografia do compósito PLGA/PCL/BCP, após 21 dias em SBF, mostrando uma maior exposição dos poros ao meio e o **B)** Espectro EDS do mesmo compósito, após 21 dias em SBF, mostrando maior intensidade dos picos de cálcio e fosfato.

5.4 Variação do pH

Durante o período avaliado ocorreu uma diminuição do pH nas primeiras 24h, tornando-se levemente ácido. No entanto, o pH se estabilizou em torno de 7.4, a partir de 48h de avaliação (**Figura 17**). A presença do hormônio testosterona no compósito PLGA/PCL/BCP não influenciou na variação do pH do meio, já que não foi observada diferença significativa ($P > 0.05$) entre os compósitos.

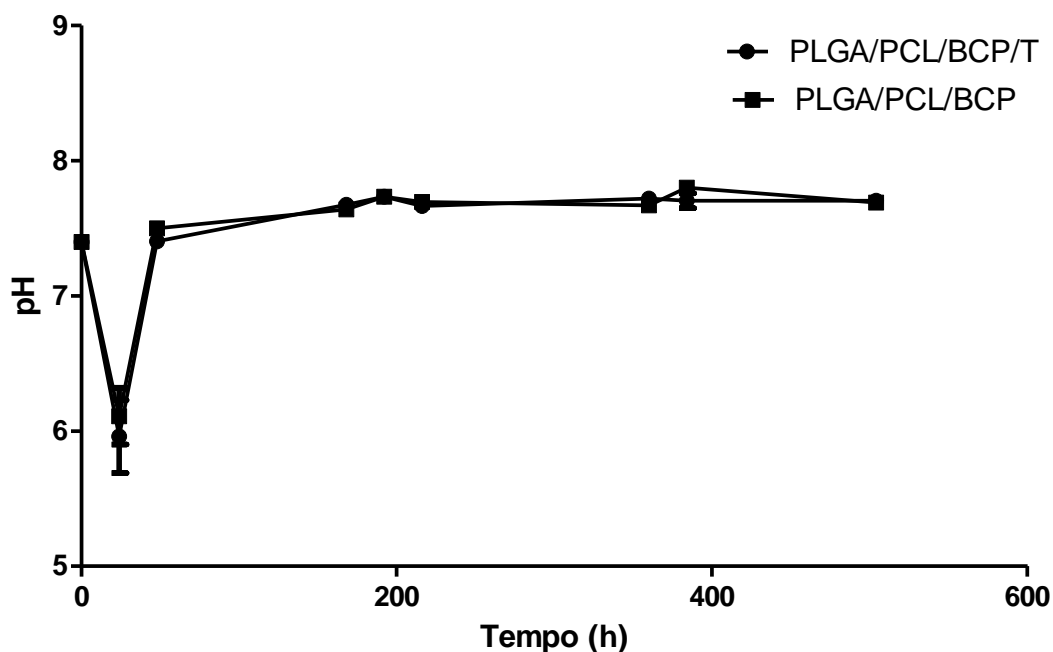


Figura 17 Gráfico da variação do pH em função do tempo em horas, mostrando uma queda no pH nas primeiras 24 h, seguida de uma rápida elevação a partir de 48 h e manutenção deste até 21 dias.

5.5 Ensaios de Viabilidade e Proliferação Celular

Os ensaios de viabilidade e proliferação celular mostraram que nos três tempos experimentais (7, 14 e 21 dias) os osteoblastos cultivados com o compósito PLGA/PCL/BCP/T apresentaram maior quantidade de células viáveis e maior proliferação em relação aos osteoblastos cultivados com o compósito sem hormônio, sendo que a diferença foi estatisticamente maior ($p < 0.001$) após 21 dias de cultivo (Figura 18).

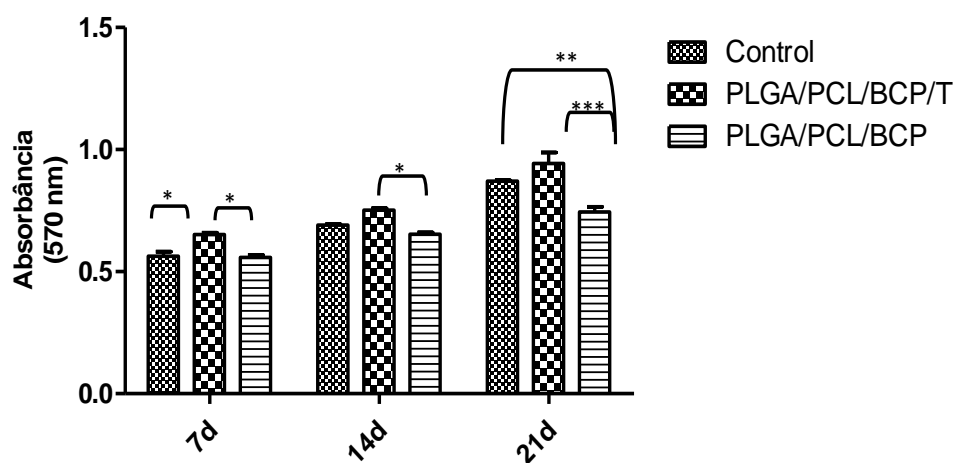


Figura 18 Ensaio MTT em cultura de osteoblastos após 7, 14 e 21 dias de cultivo com os compósitos. Gráfico mostrando que os osteoblastos cultivados com os compósitos permanecem viáveis até 21 dias de cultivo. Legenda: * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$).

5.6 Atividade de Fosfatase Alcalina

As culturas de osteoblastos do grupo do compósito com hormônio apresentaram maior atividade de fosfatase alcalina, representando maior diferenciação celular nos três tempos experimentais (7, 14 e 21 dias), quando comparados com os respectivos controles. Também, os osteoblastos estimulados com o compósito PLGA/PCL/BCP/T apresentaram maior diferenciação ($p < 0.001$) do que aqueles estimulados com o compósito sem hormônio nos três tempos experimentais (**Figura 19**). Sugere-se que a adição da testosterona ao compósito aumente a diferenciação celular após 21 dias de cultivo.

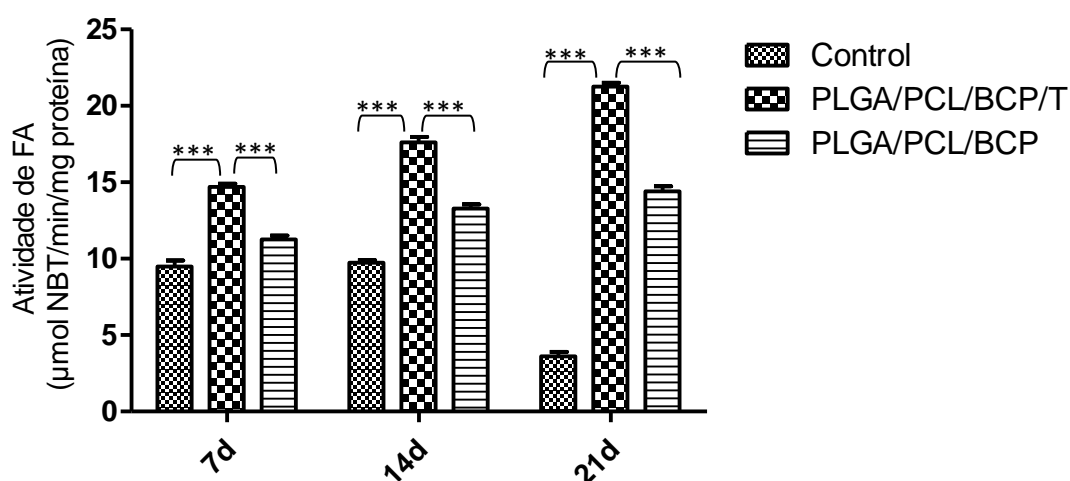


Figura 19 Gráfico da atividade de fosfatase alcalina em μmol de NBT reduzido por minuto por mg de proteínas totais. No grupo controle a atividade de fosfatase alcalina diminuiu com o tempo, enquanto que nos grupos com os compósitos aumentou. As principais diferenças significativas (***) $p < 0.001$ foram assinaladas no gráfico. A análise estatística completa está em anexo.

Abaixo está representada a curva de calibração da concentração total de proteínas (**Figura 20**), utilizada para a normalização dos dados da quantidade de

fosfatase alcalina secretada pelos osteoblastos em cultura com os compósitos. Após análise de regressão linear foi obtida a equação $Y = A + B * X$ com $R = 0.9987$.

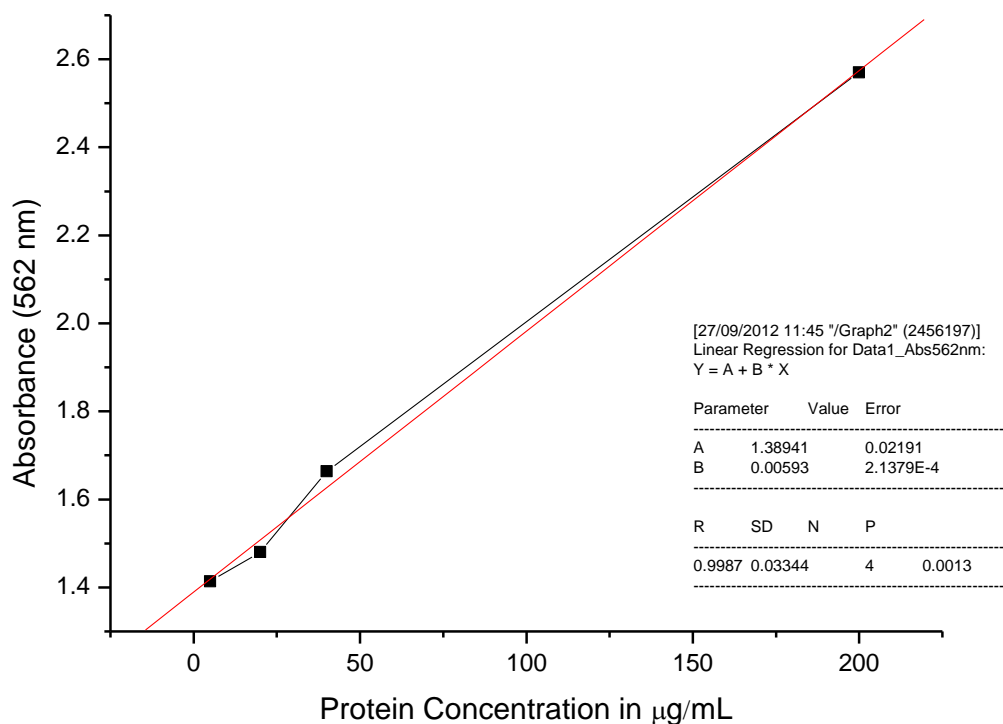


Figura 20 Curva de calibração da concentração de proteínas totais em culturas de osteoblastos após 7, 14 e 21 de cultivo com os compósitos. Legenda: absorbance = absorbância; protein concentration in $\mu\text{g/mL}$ = concentração de proteínas em $\mu\text{g/mL}$.

5.7 Produção de Colágeno

O colágeno é o principal componente da matriz orgânica do osso, sendo um substrato importante para a osteogênese (Rodrigues *et al.*, 2003). A produção de colágeno aumentou nas culturas de osteoblastos sem tratamento (grupo controle) no decorrer do tempo. Por sua vez, no grupo do compósito com o hormônio aumentou de 7 para 14 dias e diminuiu de 14 para 21 dias (**Figura 21**). Este fato pode ser atribuído ao avançado grau de mineralização da matriz que ocorreu a partir do 7º dia neste grupo, de

acordo com os resultados encontrados no ensaio de coloração pelo método Von Kossa (**Figura 27**).

A produção de colágeno pelos osteoblastos do grupo PLGA/PCL/BCP/T foi estatisticamente maior ($P < 0.05$) que a produção de colágeno pelos osteoblastos dos grupos controle e PLGA/PCL/BCP até o 14º dia de estimulação. Após 21 dias de estimulação, a produção de colágeno pelos osteoblastos do grupo PLGA/PCL/BCP/T foi estatisticamente menor que a produção de colágeno no grupo controle; e, após o mesmo período de estimulação, não houve diferença significativa comparando-se os grupos dos compósitos com e sem hormônio.

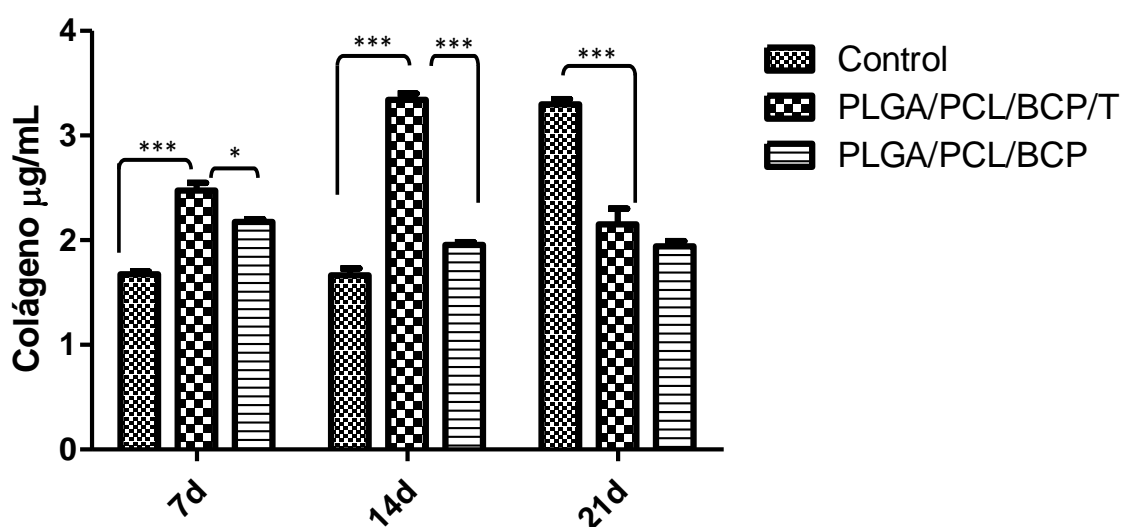


Figura 21 Concentração de colágeno nas culturas de osteoblastos em função do tempo em cada grupo experimental. As principais diferenças significativas (* $p < 0.05$) (***) $p < 0.001$) foram assinaladas no gráfico. A análise estatística completa encontra-se em anexo.

O gráfico abaixo representa a curva de calibração (**Figura 22**) feita a partir de uma solução padrão de referência de colágeno tipo I de rato, com concentração igual a

500 µg/mL. Foram utilizadas nove diluições da solução de padrão de referência de colágeno com concentrações de 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 µg/mL para a confecção da curva. Após análise de regressão linear foi obtida a equação $Y = A + B * X$ com $R = 0.99699$. Esta equação foi utilizada para a determinação da concentração de colágeno nas culturas de osteoblastos após 7, 14 e 21 dias de cultivo com os compósitos.

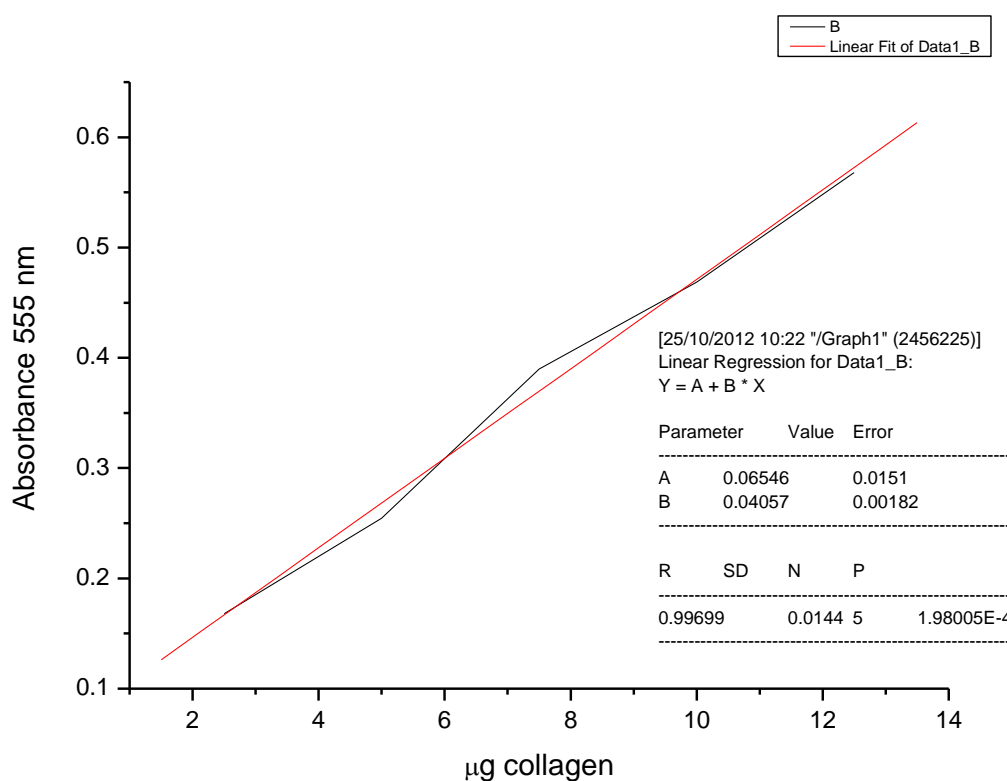


Figura 22 Curva de calibração do padrão de referência de colágeno tipo I de rato.

Legenda: absorbance = absorbância; µg collagen = colágeno em µg.

5.8 Quantificação de Osteocalcina

A concentração de osteocalcina foi estatisticamente maior no grupo do compósito com testosterona quando comparado com os respectivos controles após 7 e 14 dias de estimulação (**Figura 23**). Tais achados demonstram que as células do grupo do compósito com T estão em um estágio de maturação mais avançado que as células do grupo do compósito sem o hormônio (Xynos *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Shor *et al.*, 2007). O grupo do compósito com testosterona apresentou maiores concentrações de OCN ($p < 0.001$) após 21 dias, quando comparado com o grupo do compósito sem hormônio (**Figura 23**).

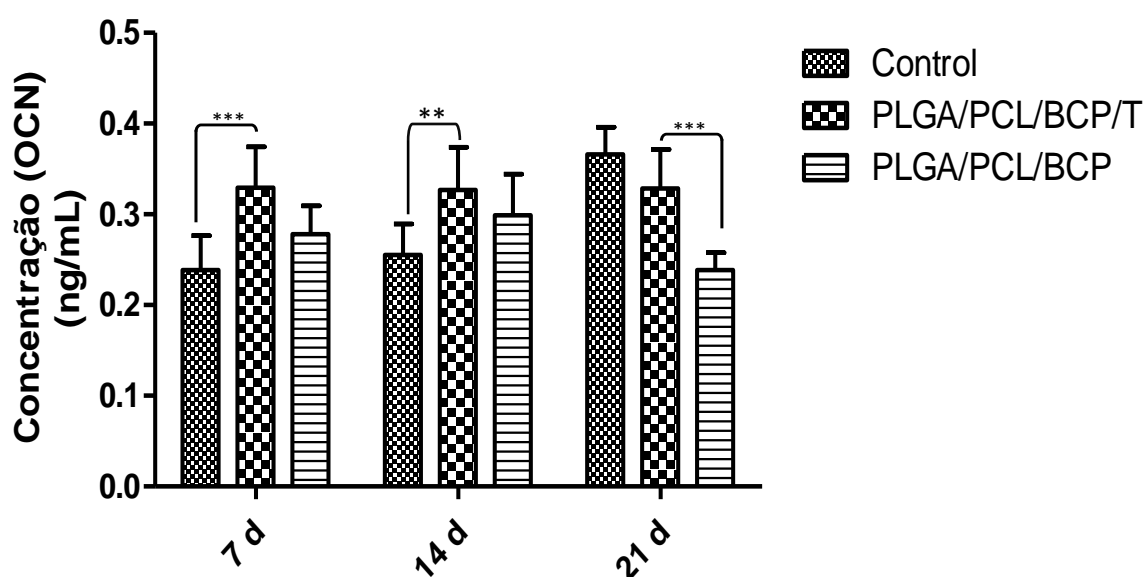


Figura 23 Concentração de osteocalcina em ng/mL em função do tempo em cada grupo experimental. A concentração de osteocalcina foi maior ($P < 0.001$) no grupo do compósito com hormônio após 21 dias comparado com o sem hormônio.

O gráfico abaixo representa a curva de calibração do padrão de osteocalcina de rato (**Figura 24**) utilizada para a determinação da concentração de OCN nas culturas de osteoblastos após 7, 14 e 21 dias de cultivo com os compósitos. A partir de uma solução

estoque com concentração de 100 ng/mL, foram feitas diluições para soluções com concentrações de 0.33, 1.0, 2.5, 5.0, 10 e 20 ng/mL para a confecção da curva. Após análise de regressão não-linear foi obtida a equação $Y = Y_{\text{Intercept}} + \text{Slope} * X$, onde $Y_{\text{Intercept}} = 0.2510$ e $\text{Slope} = 0.7001$, com $R = 0.9936$.

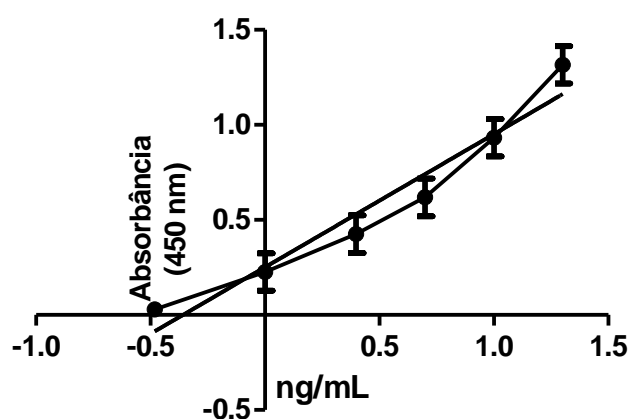


Figura 24 Curva de calibração do padrão de osteocalcina de rato.

5.9 Osteoprotegerina

Os resultados apresentados na **Figura 25** mostram que os compósitos com e sem T não ocasionaram aumento na concentração de osteoprotegerina (OPG) nas culturas de osteoblastos em comparação aos controles ($P > 0.05$) até 21 dias de estimulação.

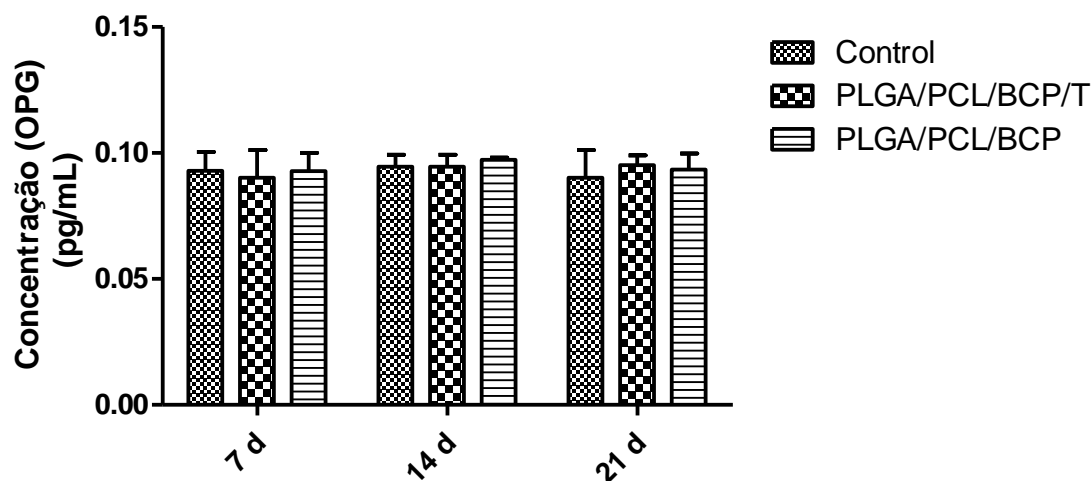


Figura 25 Concentração de osteoprotegerina em pg/mL em função do tempo em cada grupo experimental. Não houve diferença significativa em nenhuma comparação entre os grupos.

O gráfico abaixo representa a curva de calibração do padrão de osteoprotegerina de rato (**Figura 26**) utilizada para a determinação da concentração de OPG nas culturas de osteoblastos após 7, 14 e 21 dias de cultivo com os compósitos. A partir de uma solução estoque com concentração de 1000 pg/mL, foram feitas diluições para soluções com concentrações de 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 e 0.0 pg/mL para a confecção da curva. Após análise de regressão linear foi obtida a equação $Y = A + B * X$ com $R^2 = 0.9963$.

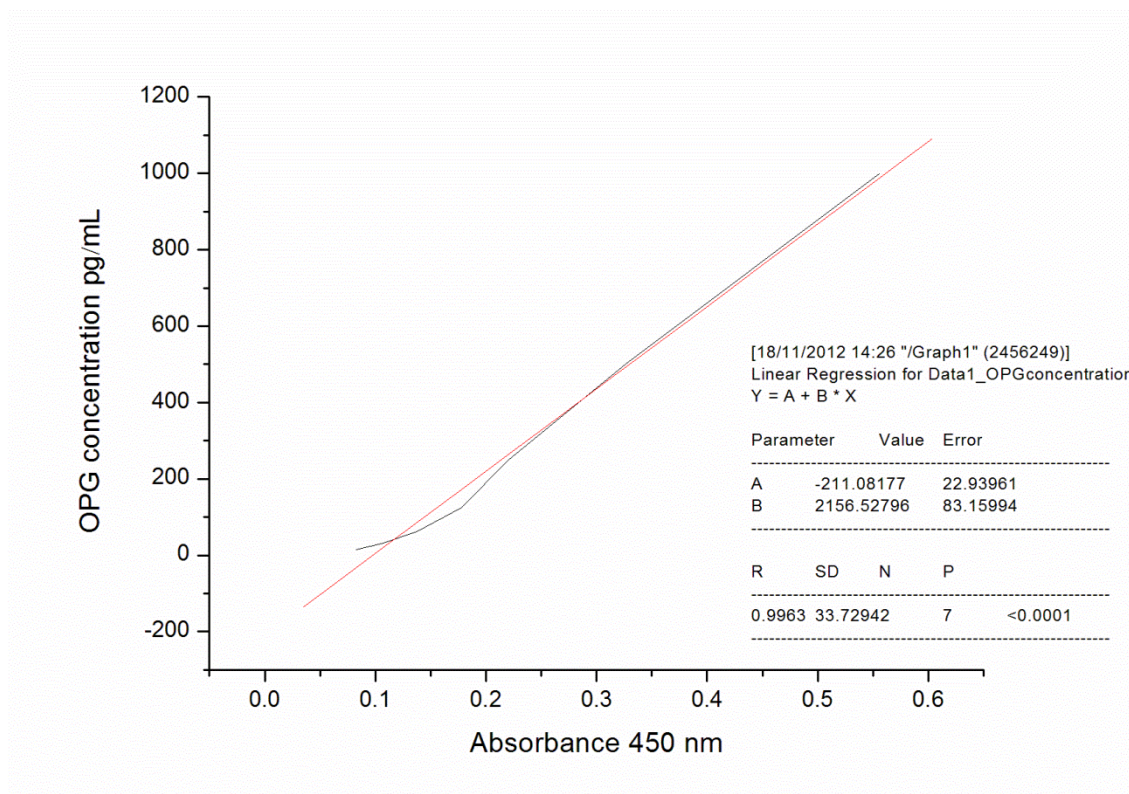


Figura 26 Curva de calibração do padrão de osteoprotegerina de rato.

5.10 Mineralização da matriz pelo método Von Kossa

Após sete dias de cultivo com os compósitos, as culturas de osteoblastos já apresentavam nódulos de mineralização, enquanto que no grupo controle não foi observada a presença dos mesmos (**Figura 27**). As culturas de osteoblastos cultivadas com o compósito com testosterona apresentou maior quantidade de nódulos de mineralização do que as cultivadas com o compósito sem hormônio a partir de 14 dias. Após 21 dias, as células do grupo controle atingiram o mesmo número de nódulos de mineralização que o grupo PLGA/PCL/BCP/T, embora com cinética diferente de desenvolvimento. Esse resultado deixa mais evidente que o compósito com testosterona acelera o processo de mineralização óssea.

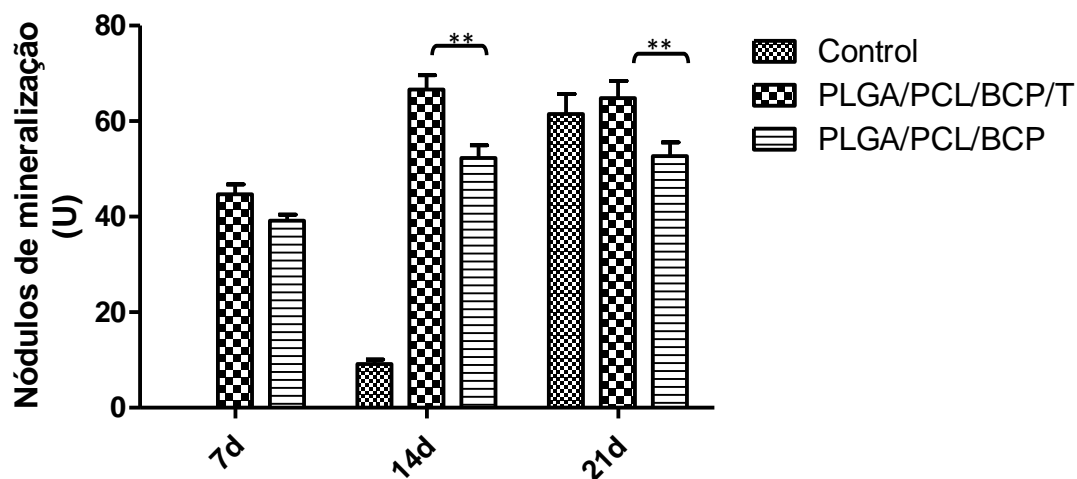


Figura 27 Unidades de nódulos de mineralização (U) em função do tempo por grupo.

Os osteoblastos cultivados com o compósito PLGA/PCL/BCP/T apresentaram maior capacidade de mineralização da matriz extracelular comparado com os do grupo PLGA/PCL/BCP a partir de 14 dias.

5.11 Concentração de Óxido Nítrico

Para avaliar o efeito dos compósitos na produção de óxido nítrico (ON) pelos osteoblastos, a quantidade de nitrito (NO_2^-) foi mensurada no meio de cultura, uma vez que este representa um produto final estável de ON, por meio da utilização do reagente de Griess. Como demonstrado na **Figura 28**, o cultivo das células com os compósitos não promoveu aumento significativo na produção de ON em osteoblastos. Após análise estatística, não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos após 7, 14 e 21 dias de estimulação.

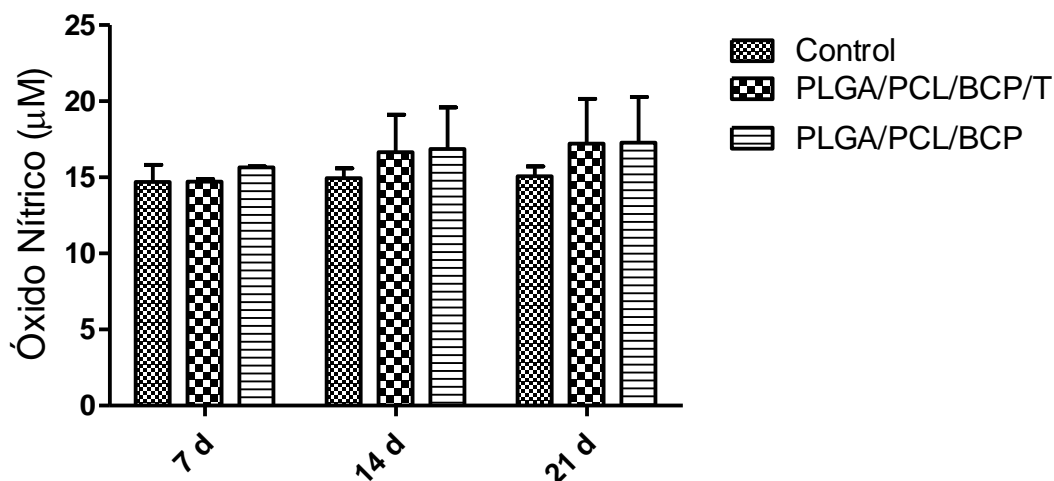


Figura 28 Produção de óxido nítrico em função do tempo por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos.

O gráfico abaixo representa a curva de calibração de nitrito (**Figura 29**) utilizada para a determinação da concentração de óxido nítrico nas culturas de osteoblastos após 7, 14 e 21 dias de cultivo com os compósitos. A partir de uma solução estoque de nitrito com concentração de 1000 µM, foram feitas diluições para soluções com concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 µM para a confecção da curva. Após análise de regressão linear foi obtida a equação $Y = A + B * X$ com $R^2 = 0.9927$.

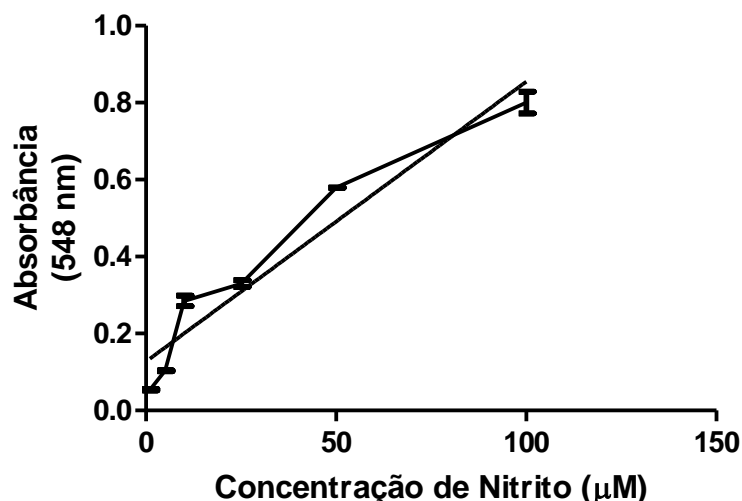


Figura 29 Curva de calibração do padrão de nitrito em diversas concentrações (μM).

5.12 Análise macroscópica descritiva

De acordo com o acompanhamento dos animais ao longo da pesquisa e a análise macroscópica das peças cirúrgicas, em todos os períodos de avaliação, a cicatrização da ferida ocorreu de forma satisfatória, com ausência de exsudado.

5.13 Análise microscópica qualitativa

5.13.1 Avaliação após 15 dias

Grupo Controle: Corte de tecido corado pela hematoxilina e eosina onde se observa epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado, derme apresentando anexos inalterados sendo folículos pilosos e glândulas (**Figura 30A**). Células gordurosas são vistas na camada sub-epitelial. Na lamina própria, tecido conjuntivo frouxo com infiltrado inflamatório crônico moderado (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) (**Figura 30B**) e neoformação capilar (**Figura 31**). Fibroblastos e fibras colágenas completam o quadro.

Grupo PLGA/PCL/BCP/T: Corte histológico corado pela hematoxilina e eosina onde se observa tecido epitelial pavimentoso estratificado ceratinizado, exibindo derme

e epiderme com anexos (folículos pilosos e glândulas) (**Figura 32A**). Células gordurosas (**Figura 32D**) dispostas na camada sub-epitelial e tecido conjuntivo frouxo exibindo infiltrado inflamatório crônico leve (**Figuras 32B e C**) com linfócitos, plasmócitos e macrófagos, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho em torno de material amorfo. Neoformação capilar e fibroblastos, bem como fibras colágenas completam o quadro.

Grupo PLGA/PCL/BCP: Corte histológico de tecido corado pela hematoxilina e eosina onde se observa tecido epitelial pavimentoso estratificado ceratinizado com anexos (**Figura 33A**). Células adipócitos localizadas sub-epitelialmente. Na lamina própria tecido conjuntivo frouxo onde se observa infiltrado inflamatório crônico moderado (linfócitos, plasmocitos, macrófagos) (**Figura 33B**), células gigantes tipo corpo estranho em torno de material amorfo, neoformação capilar, fibroblastos e fibras colágenas (**Figuras 33C e D**).

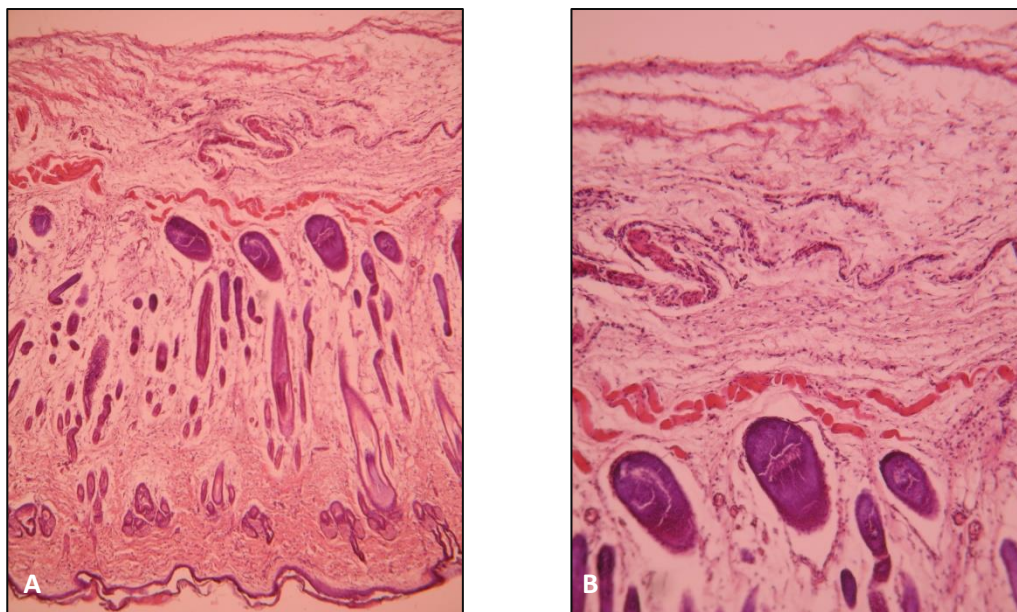


Figura 30 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato (grupo controle). **A.** 15 dias após cirurgia, 5X. **B.** Maior aumento evidenciando infiltrado inflamatório crônico moderado, 10X.

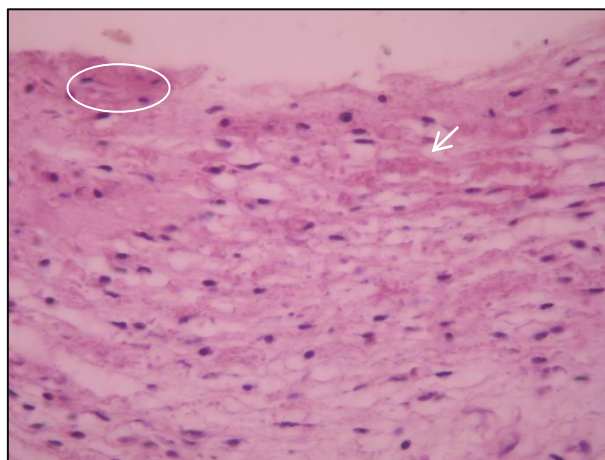


Figura 31 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato (grupo controle) em maior aumento, 40X, com presença de células linfoplasmocitárias (círculo), microcirculação ativa (seta).

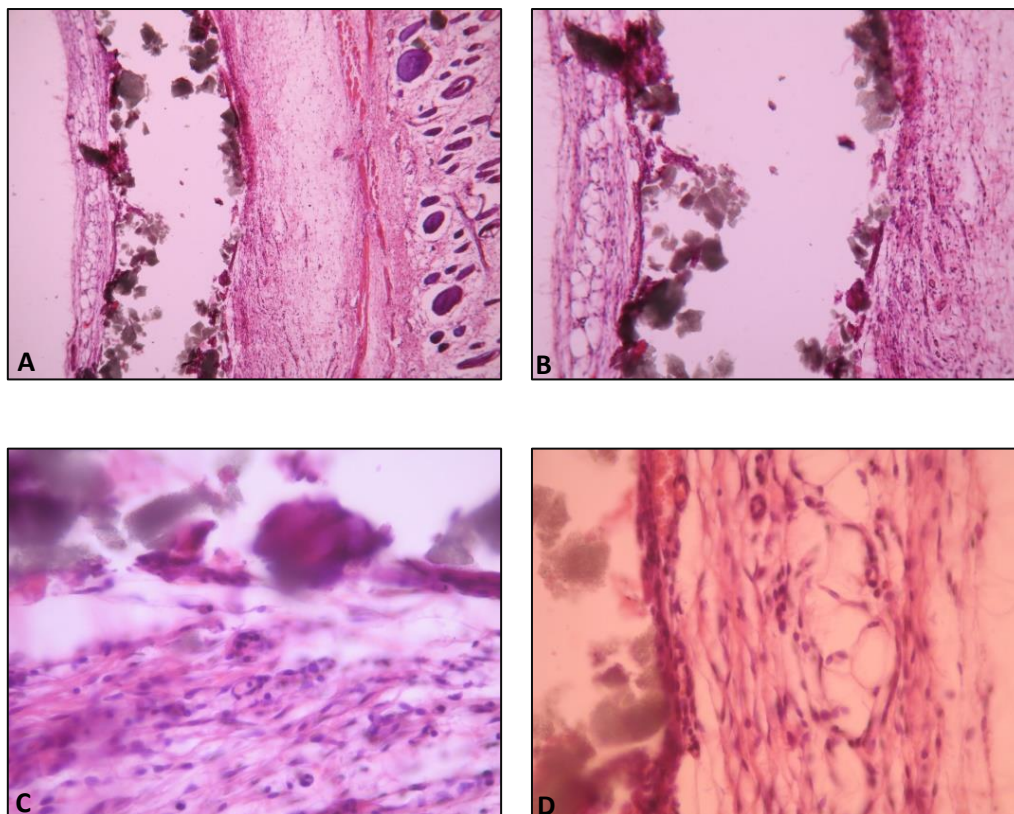


Figura 32 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 15 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP/T. **A.** Vista panorâmica do tecido adjacente ao implante de compósito, 5X. **B.** Maior aumento evidenciando tecido em contato com o material, 10X. **C.** Infiltrado inflamatório crônico leve com predominância de células linfoplasmocitária, células gigantes, 40X. **D.** Neoformação capilar e fibroblastos, 40X.

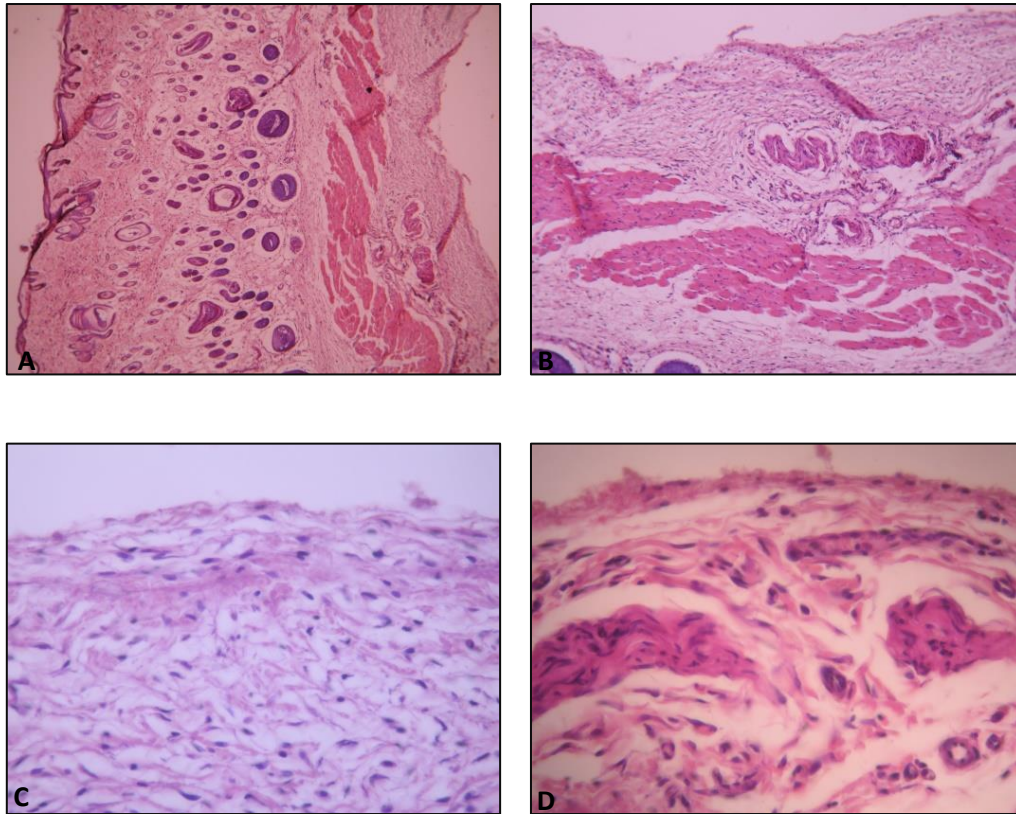


Figura 33 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 15 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP. **A.** Menor aumento do corte, 5X. **B.** Presença de infiltrado inflamatório crônico moderado, 10X. **C.** Predominância de células linfoplasmocitárias e células gigantes, 40X. **D.** Maior aumento evidenciando a neoformação capilar, fibroblastos e as fibras colágenas, 40X.

5.13.2 Avaliação após 30 dias

Grupo Controle: Corte de tecido corado pela hematoxolina e eosina onde se observa epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado, derme apresentando anexos inalterados sendo folículos pilosos e glândulas (**Figura 34A**). Células gordurosas são vistas na camada sub-epitelial. Na lamina própria, tecido conjuntivo frouxo com infiltrado inflamatório crônico leve (linfócitos, plasmocitos e macrófagos) (**Figuras**

34B e C) e neoformação capilar (**Figura 34D**). Fibroblastos e fibras colágenas completam o quadro.

Grupo PLGA/PCL/BCP/T: Corte histológico corado pela hematoxilina e eosina onde se observa tecido epitelial pavimentoso estratificado ceratinizado, exibindo derme e epiderme com anexos (folículos pilosos e glândulas) (**Figura 35A**). Células gordurosas dispostas na camada sub-epitelial e tecido conjuntivo frouxo exibindo infiltrado inflamatório crônico leve (**Figura 35C**) com linfócitos, plasmocitos e macrófagos, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho em torno de material amorfo. Neoformação capilar e fibroblastos, bem como fibras colágenas completam o quadro (**Figuras 35B e D**).

Grupo PLGA/PCL/BCP: Corte histológico de tecido corado pela hematoxilina e eosina onde se observa tecido epitelial pavimentoso estratificado ceratinizado com anexos (**Figura 36A**). Células adipócitos localizadas sub-epitelialmente (**Figura 36B**). Na lamina própria tecido conjuntivo frouxo onde se observa infiltrado inflamatório crônico moderado (linfócitos, plasmocitos, macrófagos) (**Figura 36B**), células gigantes tipo corpo estranho em torno de material amorfo, neoformação capilar, fibroblastos e fibras colágenas (**Figuras 36C e D**).

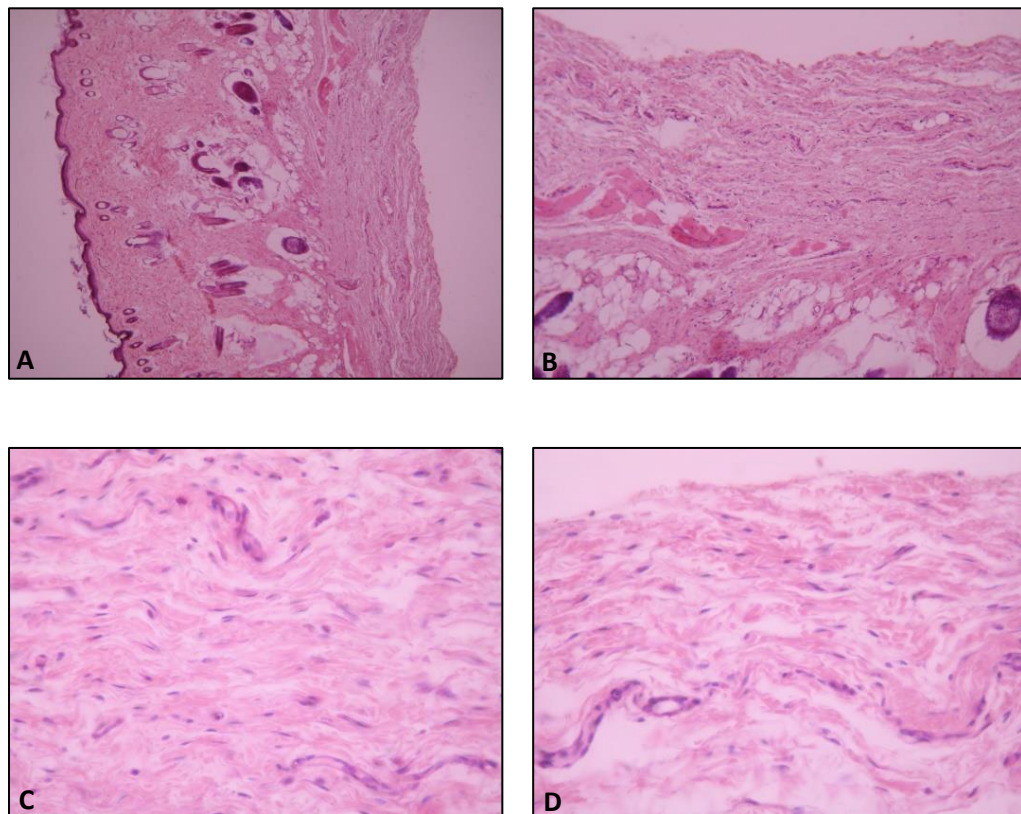


Figura 34 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato (grupo controle). **A.** 30 dias após cirurgia, 5X. **B.** Maior aumento evidenciando infiltrado inflamatório crônico leve, 10X. **C.** Predominância de células linfoplasmocitárias, 40X. **D.** Neoformação capilar, 40X.

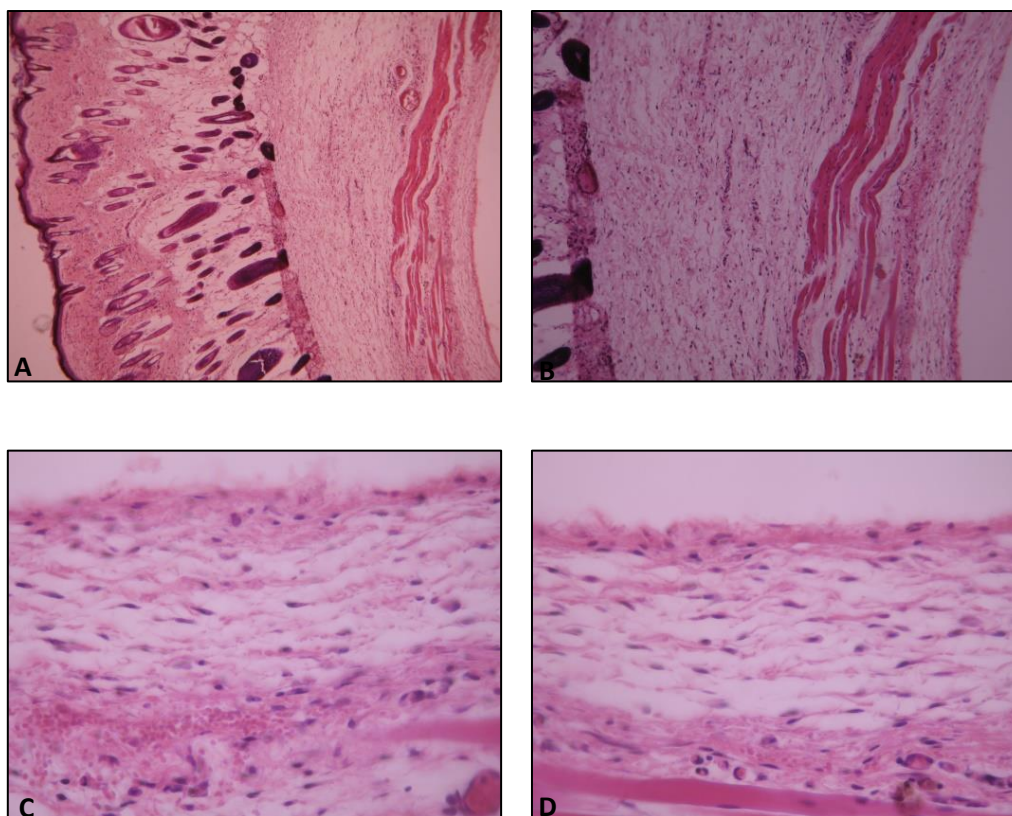


Figura 35 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 30 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP/T. **A.** Vista panorâmica do corte histológico, 5X. **B.** Maior aumento, onde se observa as fibras colágenas mais organizadas com fibroblastos com aspecto de menor atividade, 10X. **C.** Infiltrado inflamatório crônico leve com predominância de células linfoplasmocitária e células gigantes, 40X. **D.** Neoformação capilar e fibroblastos, 40X.

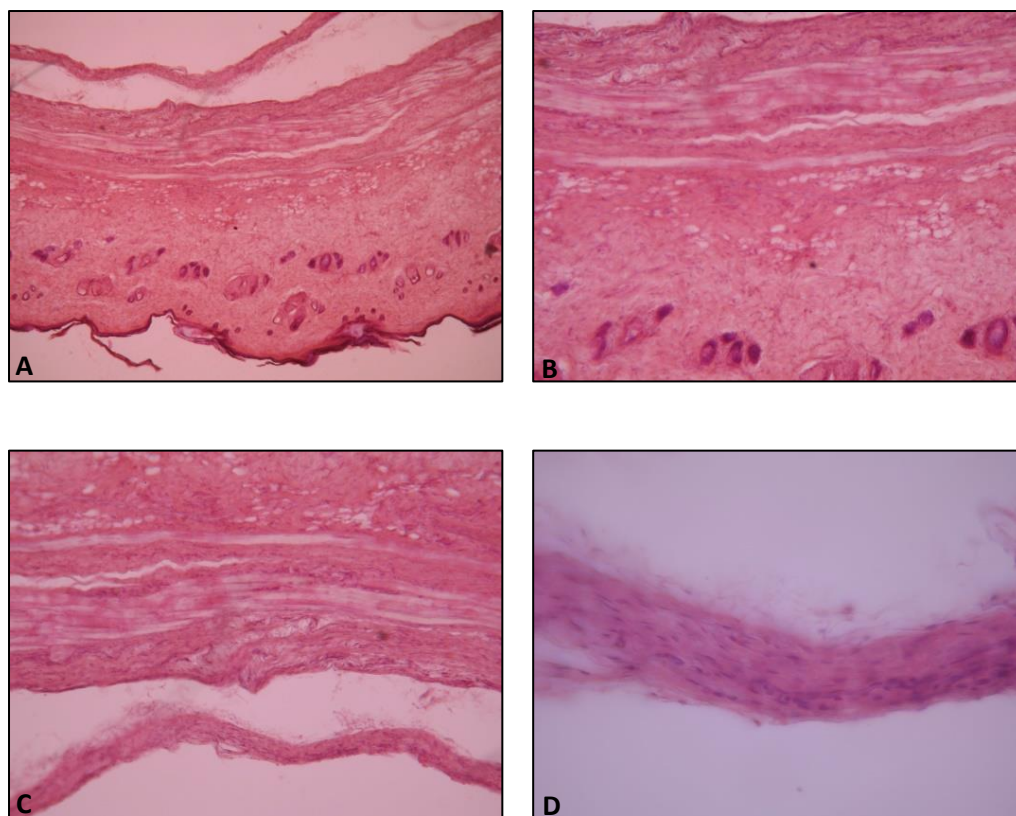


Figura 36 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 30 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP. **A.** Menor aumento do corte, 5X. **B.** Presença de infiltrado inflamatório crônico moderado com predominância de células linfoplasmocitárias e células gigantes, 10X. **C.** Fibras colágenas mais organizadas na região adjacente ao implante, 10X. **D.** Maior aumento mostrando a presença de fibroblastos e fibras colágenas, 40X.

5.13.3 Avaliação após 60 dias

Grupo Controle: A intensidade do processo inflamatório foi predominantemente ausente, sendo leve em dois espécimes e ausente em quatro. Apresentou fibroblastos e fibras colágenas no processo de regeneração tecidual (**Figuras 37A, B, C e D**).

Grupo PLGA/PCL/BCP/T: Epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado com anexos (**Figura 38A**). Tecido conjuntivo caracterizado por infiltrado inflamatório crônico leve, células gigantes tipo corpo estranho em torno de material amorfo, vasos dilatados e hiperemiados, neoformação capilar, fibroblastos e fibras colágenas completam o quadro. Apenas um espécime apresentou infiltrado crônico leve, os demais não apresentaram infiltrado inflamatório (**Figuras 38B, C e D**).

Grupo PLGA/PCL/BCP: Infiltrado inflamatório crônico leve em quatro espécimes e moderado em dois com morfologia semelhante ao quadro observado nos 30 primeiros dias (**Figuras 39A, B, C e D**).

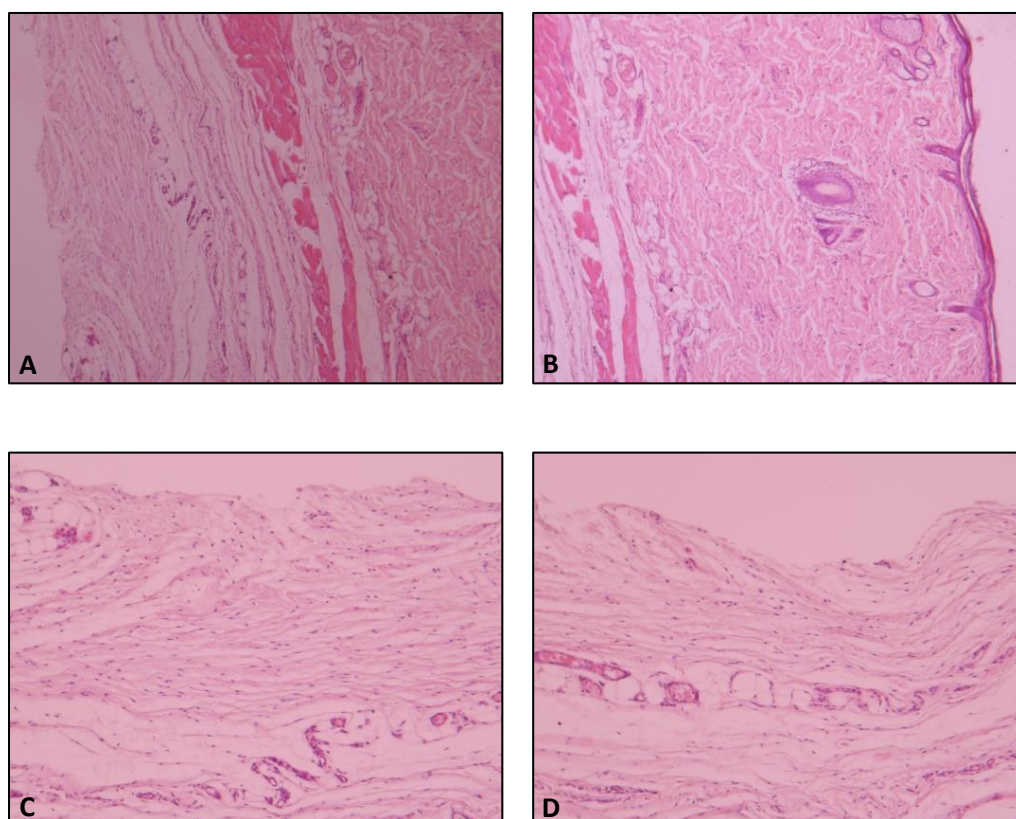


Figura 37 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato (grupo controle). **A.** 60 dias após cirurgia, 5X. **B.** Ausência de infiltrado inflamatório crônico, 5X. **C.** Predominância de fibroblastos, 10X. **D.** Fibroblastos, fibras colágenas e neoformação capilar, 40X.

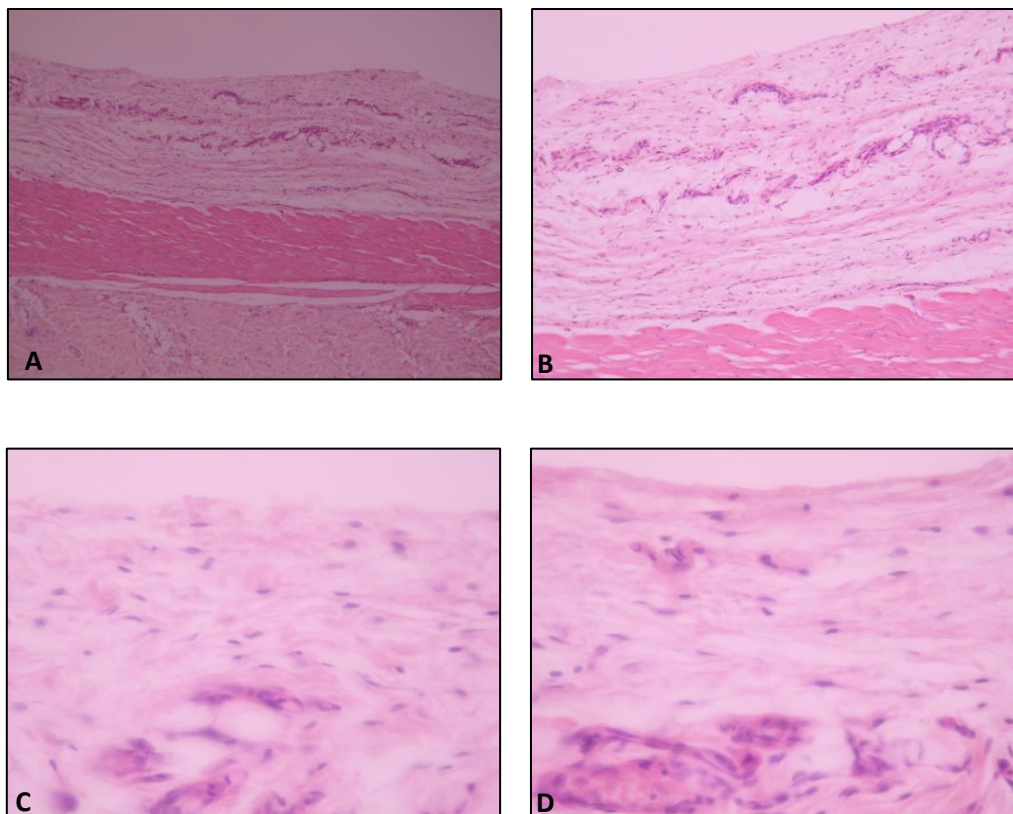


Figura 38 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 60 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP/T. **A.** Vista panorâmica do corte histológico, 5X. **B.** Maior aumento, onde se observa aumento da densidade de fibroblastos, 10X. **C.** Ausência de infiltrado inflamatório crônico, 40X. **D.** Neoformação capilar e fibroblastos, 40X.

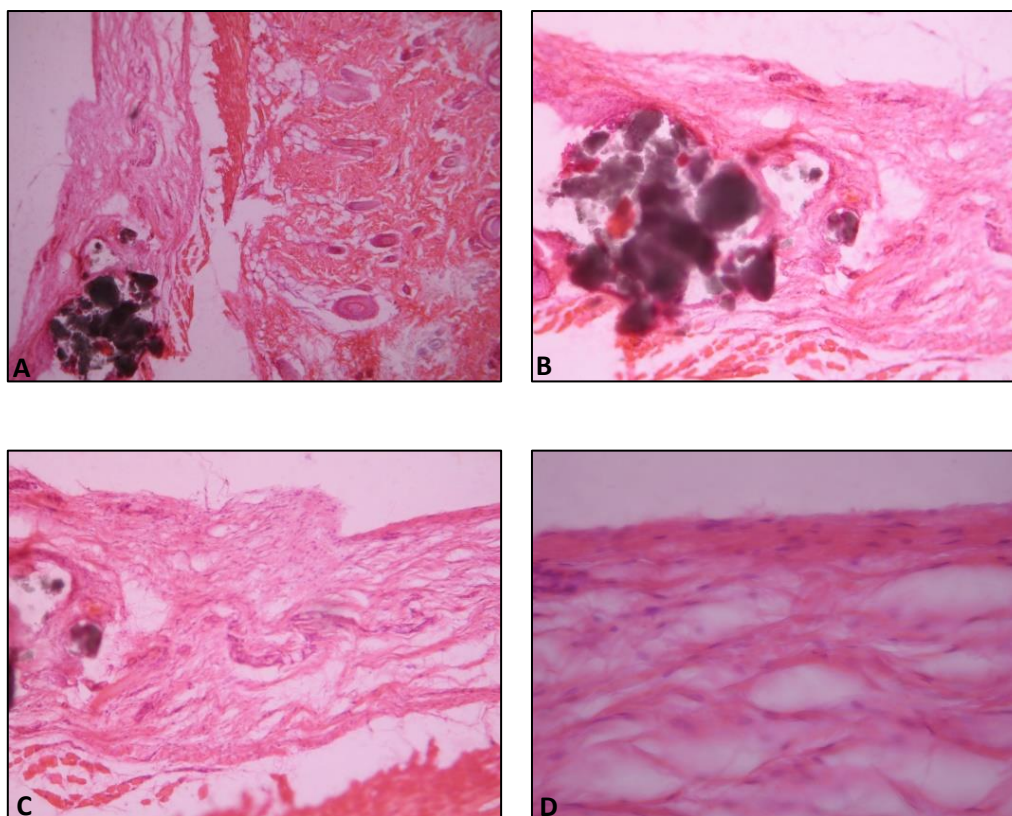


Figura 39 Microscopia óptica de corte histológico de tecido subcutâneo de rato 60 dias após implantação do compósito PLGA/PCL/BCP. **A.** Menor aumento do corte, 5X. **B.** Presença de cápsula envolvendo o compósito, 10X. **C.** Fibras colágenas mais organizadas na região adjacente ao implante, 10X. **D.** Aumento da densidade de fibrosamento e discreto infiltrado inflamatório com predominância de células linfoplasmocitárias, 40X.

Não foi observado em nenhum dos grupos sinais de necrose tecidual. As imagens dos cortes histológicos permitiram observar sinais sugestivos de angiogênese na maioria das lâminas. Os compósitos apresentaram biocompatibilidade aceitável, independente da adição de Testeosterona, como mostra a **Figura 40** abaixo, onde não houve diferença significativa entre os grupos. Além disso, não foi observada a presença ou imagem sugestiva de formação de tecido mineralizado, seja periférico ou à distância.

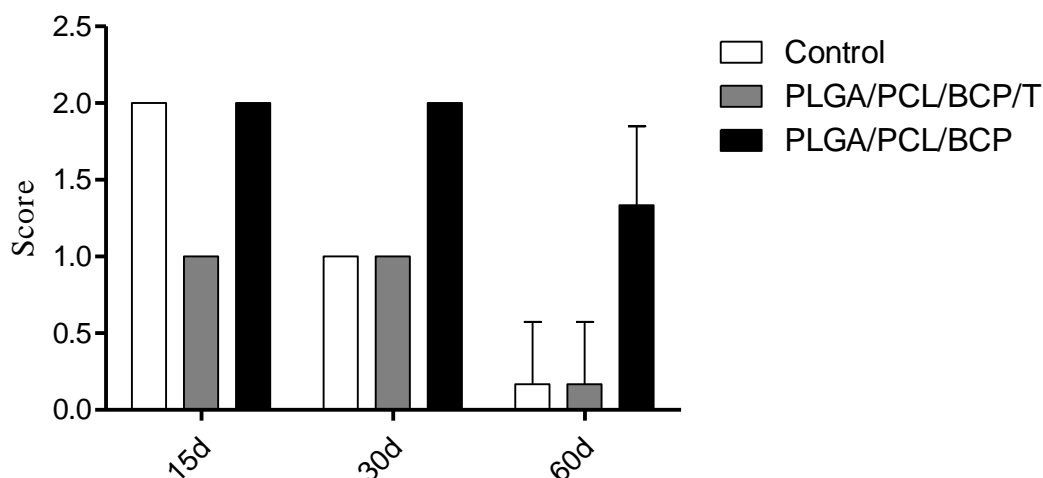


Figura 40 Gráfico da avaliação da intensidade de inflamação no tecido subcutâneo de rato após 15, 30 e 60 dias de implantação dos compósitos PLGA/PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP. Control = controle (apenas animal incisionado). Score 0 = ausência de inflamação; 1 = inflamação leve; 2 = inflamação moderada e 3 = inflamação intensa. Gráfico representando a média \pm desvio padrão de 6 cortes histológicos de 3 animais diferentes.

5.14 Avaliação microscópica da superfície dos compósitos implantados através de MEV

A **Figura 41** demonstra através da MEV a superfície do compósito PLGA/PCL/BCP/T após 15 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. Qualitativamente a avaliação realizada na interface tecido/biomaterial demonstra boa capacidade de interação, ou seja, uma biocompatibilidade. É possível observar adesão celular ao compósito, além de tecido conjuntivo aderido à superfície deste.

A **Figura 42** demonstra através da MEV a superfície do compósito PLGA/PCL/BCP/T após 30 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. Pode-se observar maior organização das fibras colágenas em torno do compósito e presença de hemácias.

A **Figura 43** demonstra através da MEV a superfície do compósito PLGA/PCL/BCP/T após 60 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. É possível observar sinais de degradação do compósito, maior quantidade de vasos sanguíneos e completa integração do tecido conjuntivo com o compósito.

As **Figuras 44, 45 e 46** representam a MEV da superfície do compósito PLGA/PCL/BCP após 15, 30 e 60 dias, respectivamente, de implantação em tecido subcutâneo de rato. Pode-se observar, também, uma ótima biocompatibilidade do material, adesão celular e fibras colágenas na superfície do compósito, além de neovascularização. Bem como, observa-se sinais de degradação do compósito após 60 dias.

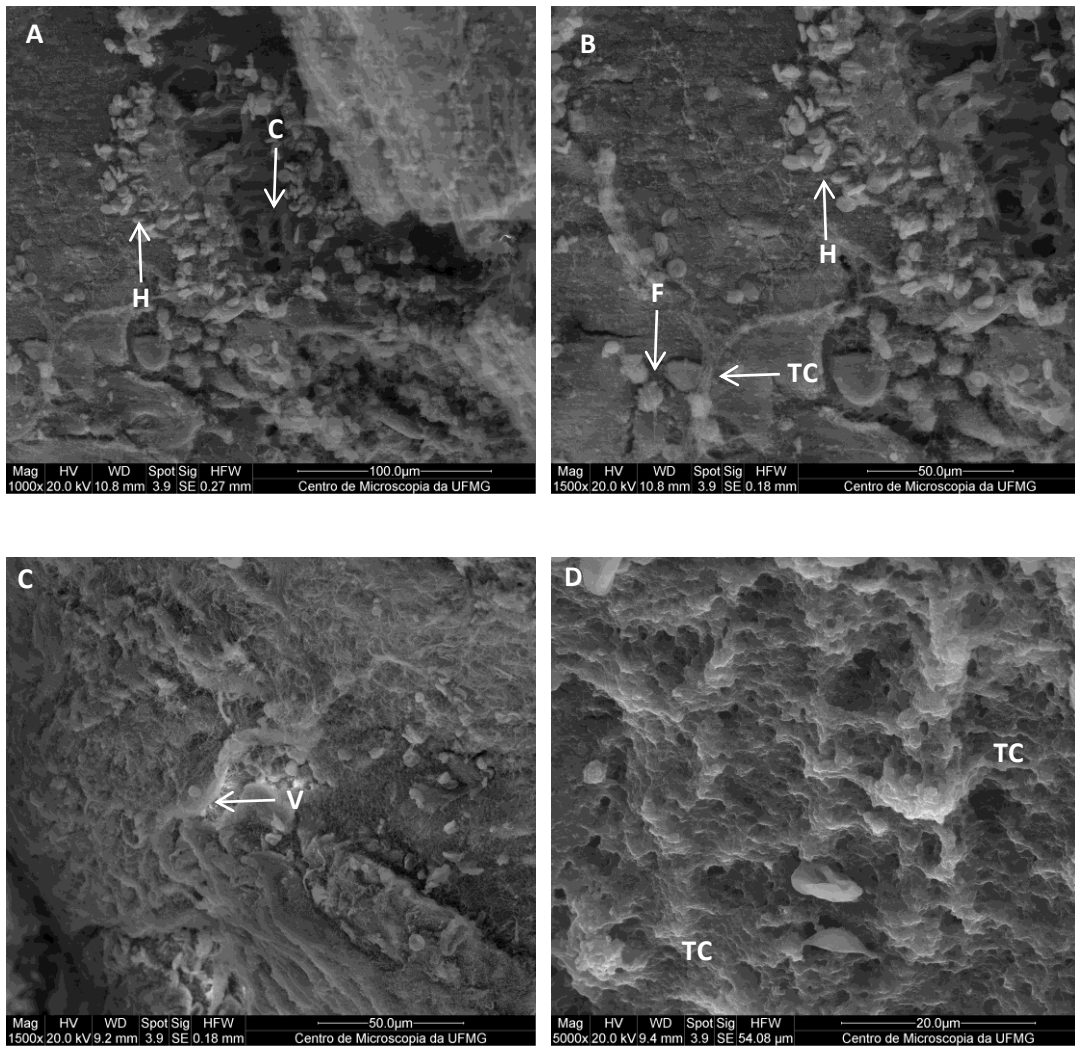


Figura 41 Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP/T 15 dias após implantação em tecido subcutâneo de rato. F: fibroblasto; TC: tecido conjuntivo; H: hemácias; C: compósito; V: vasos sanguíneos. A. 1000X; B. 1500X; C. 1500X; D. 5000X.

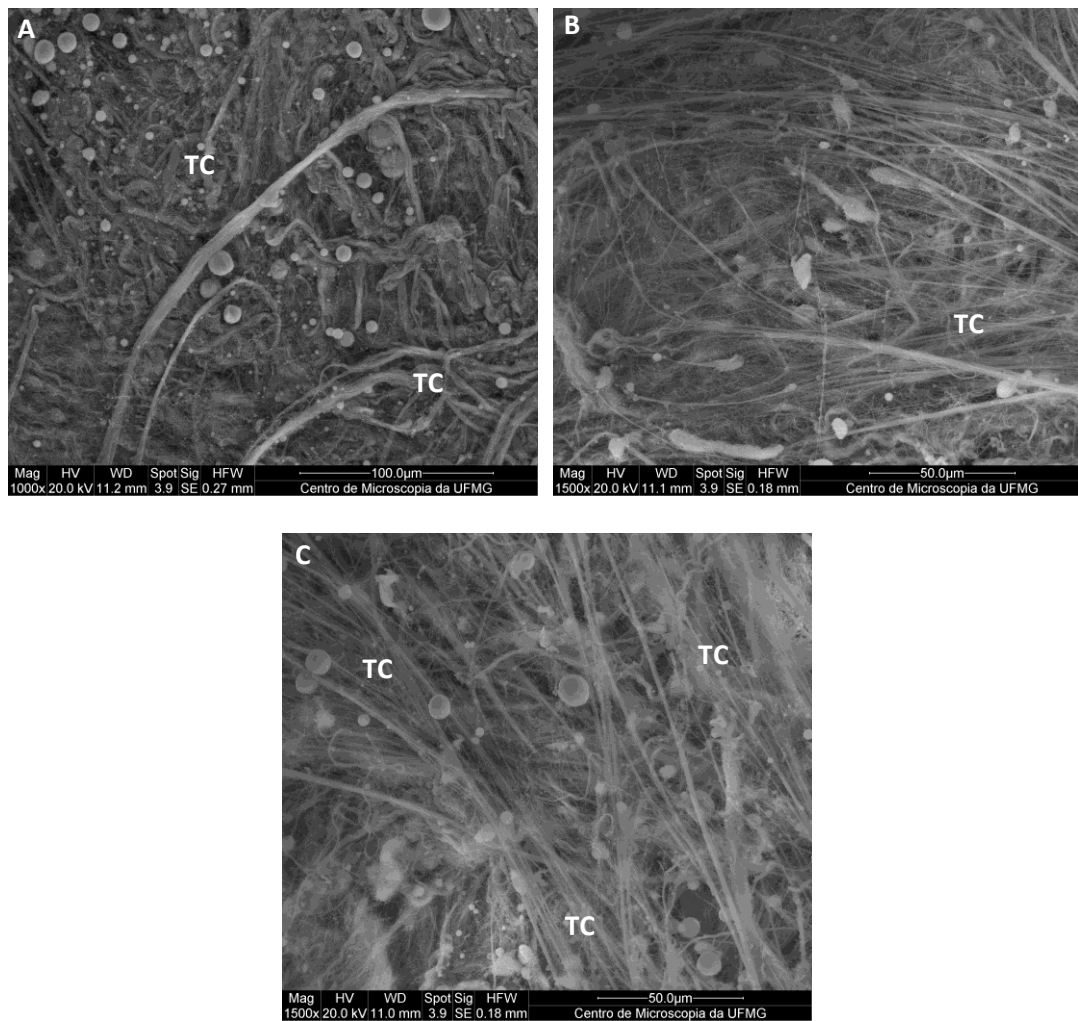


Figura 42 Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP/T após 30 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo. A) 1000X; B) 1500X; C) 1500X.

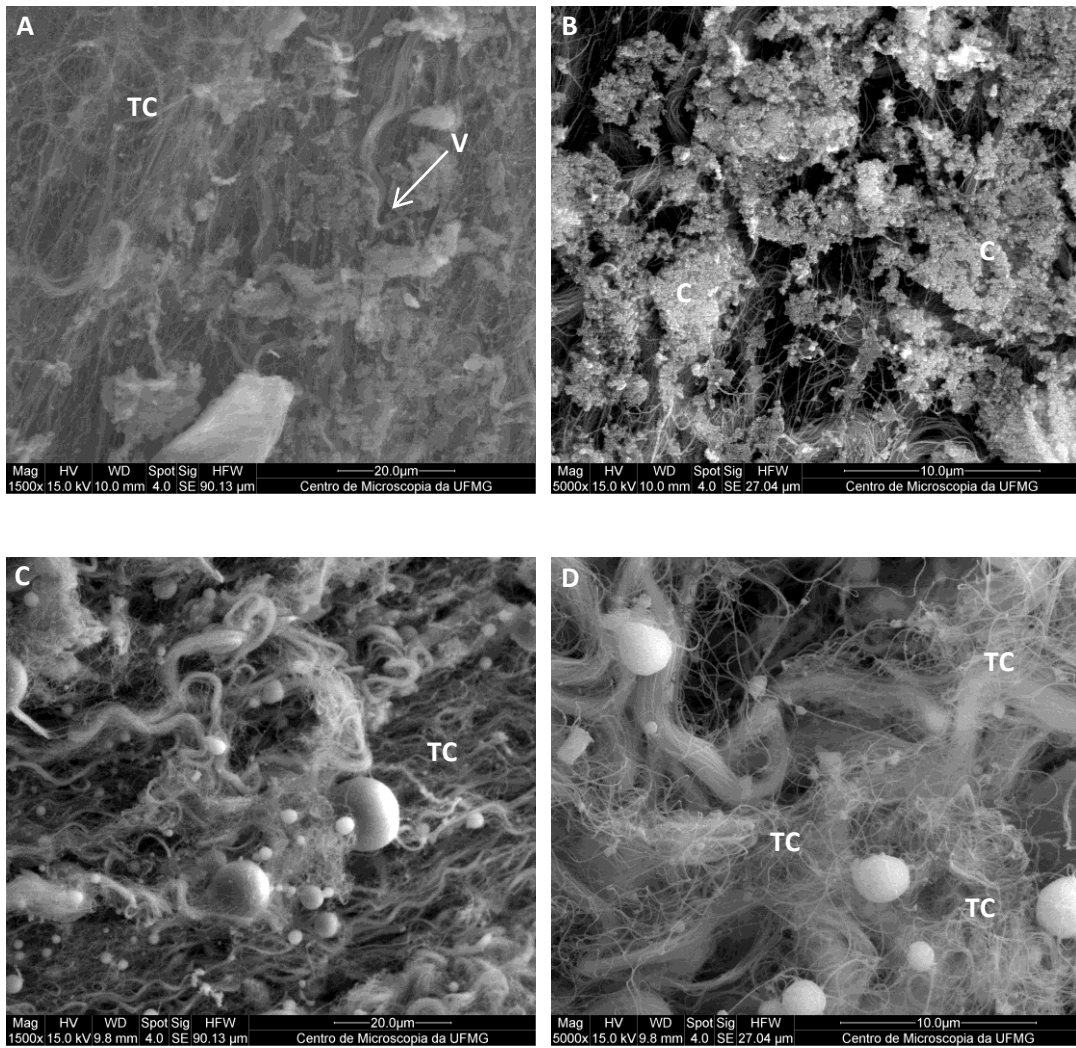


Figura 43 Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP/T após 60 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo; V: vasos sanguíneos; C: compósito. A) 1500X; B) 5000X; C) 1500X; D) 5000X.

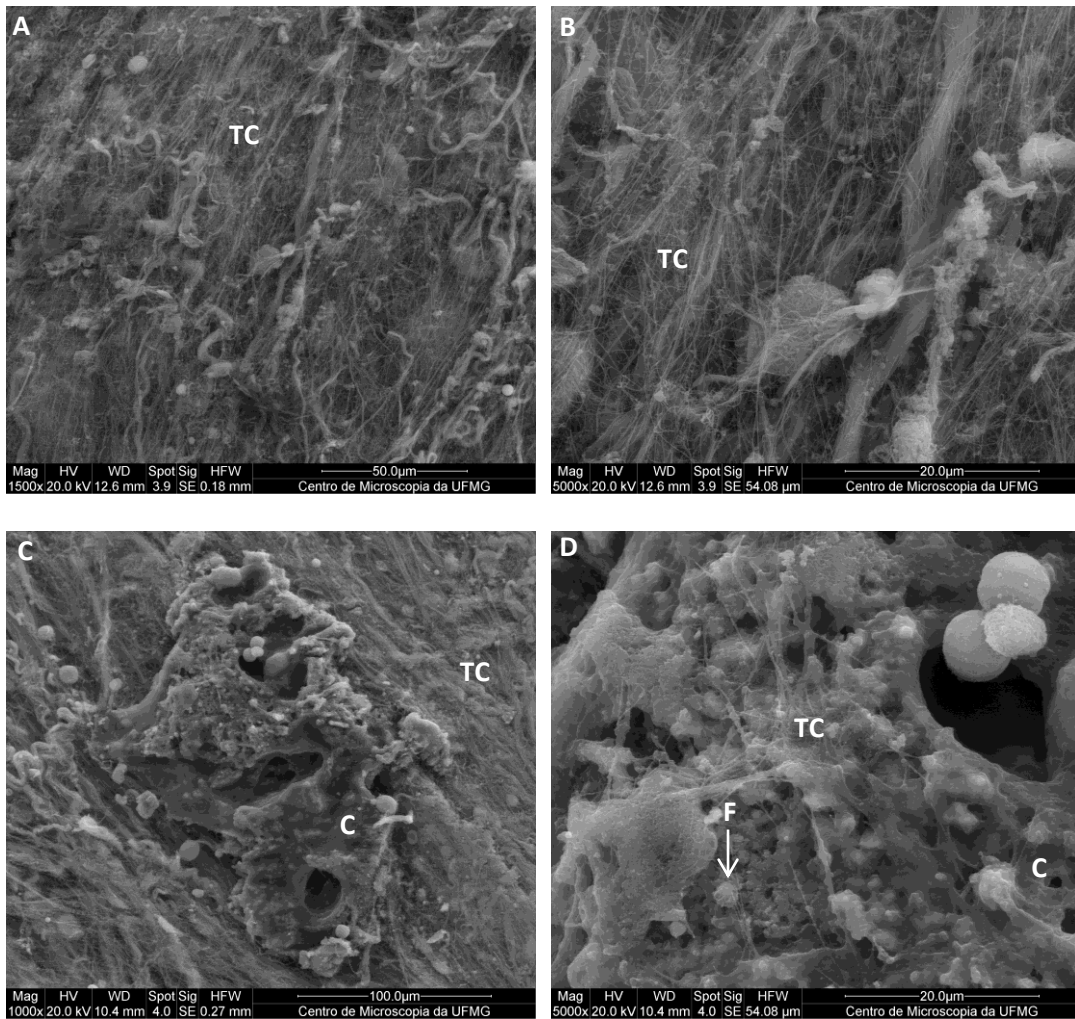


Figura 44 Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP após 15 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo; F: fibroblastos; C: compósito. A) 1500X; B) 5000X; C) 1000X; D) 5000X.

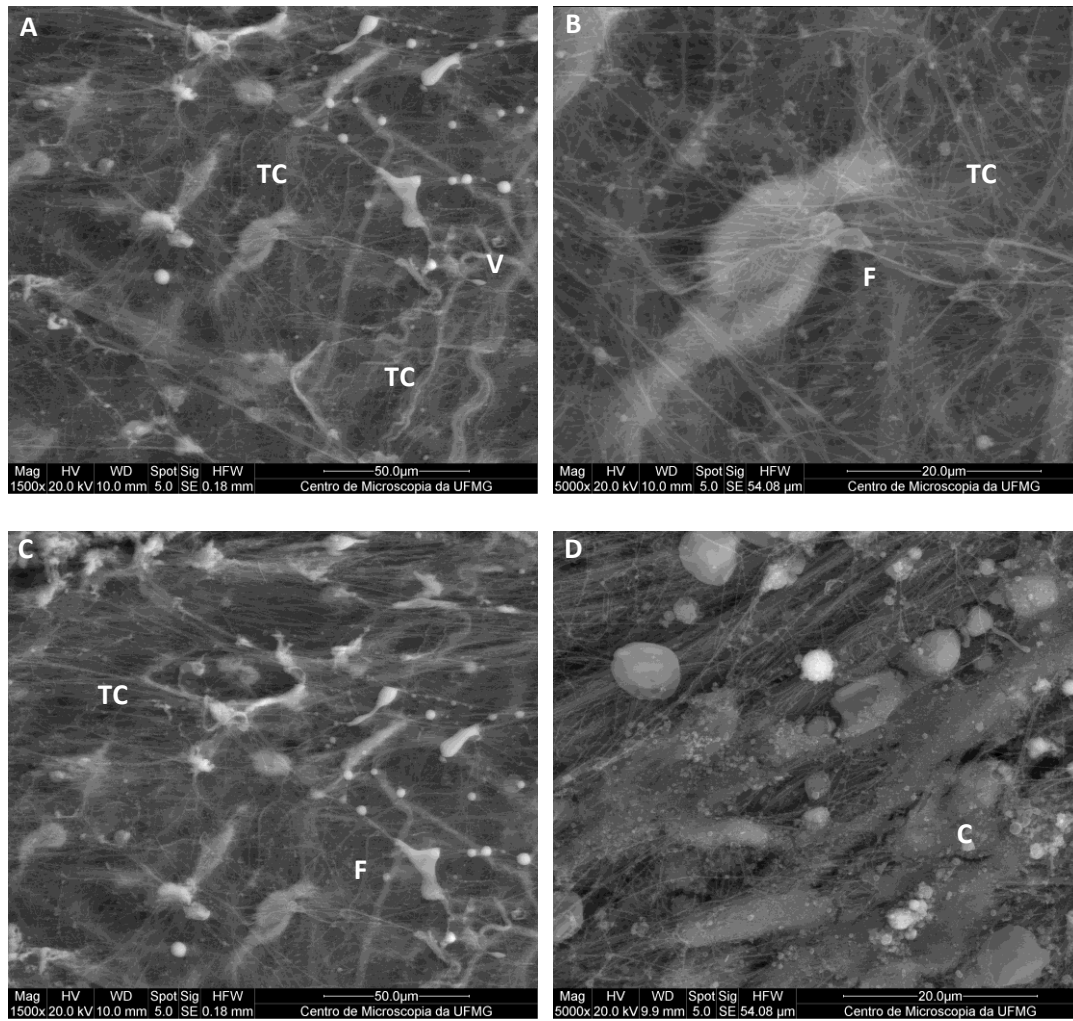


Figura 45 Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP após 30 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo; F: fibroblastos; V: vasos sanguíneos; C: compósito. A) 1500X; B) 5000X; C) 1500X; D) 5000X.

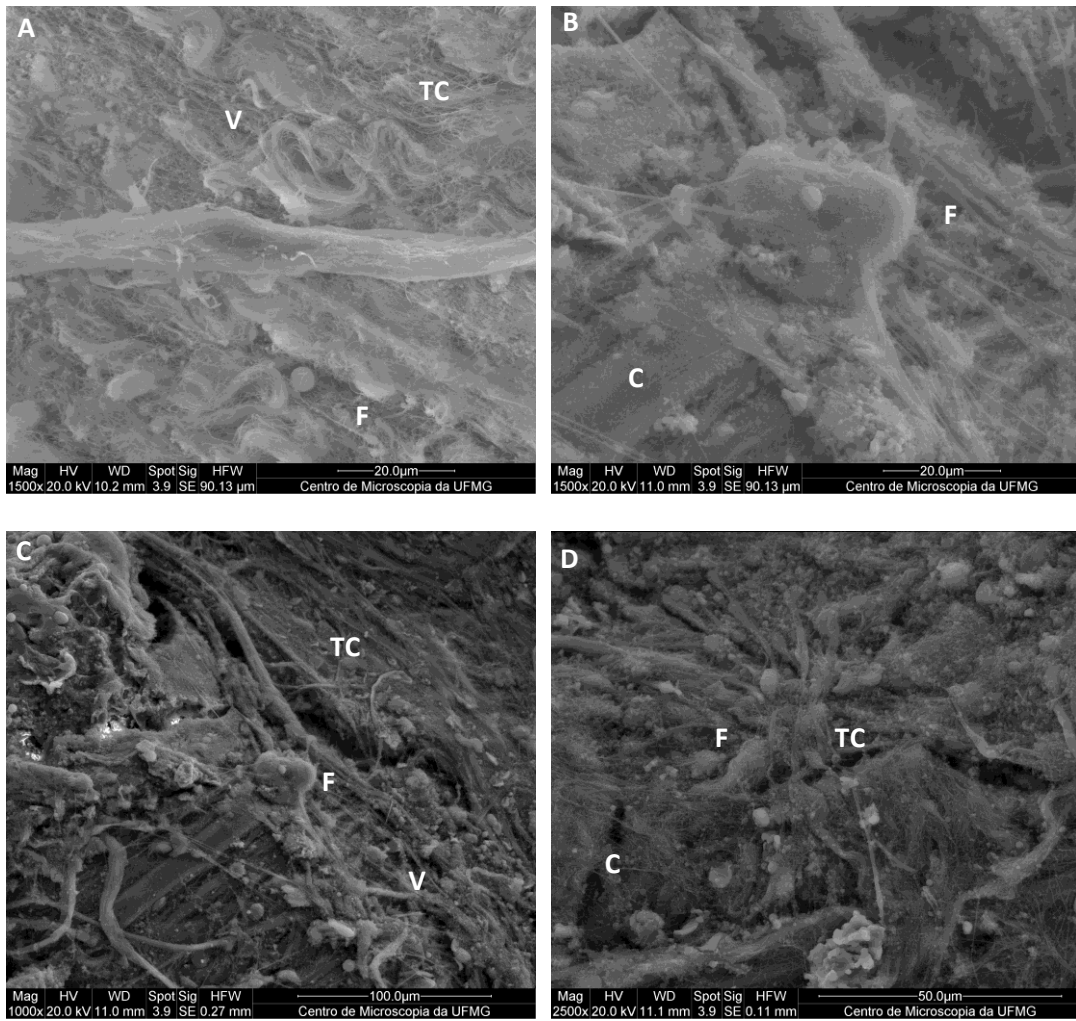


Figura 46 Fotomicrografias do compósito PLGA/PCL/BCP após 60 dias de implantação em tecido subcutâneo de rato. TC: tecido conjuntivo; C: compósito; F: fibroblasto; V: vasos sanguíneos. A) 1500X; B) 1500X; C) 1000X; D) 2500X.

6. DISCUSSÃO

O tratamento de grandes defeitos ósseos resultantes de trauma, infecção, ressecção de tumores ou associados às grandes reabsorções após a perda dos órgãos dentais ainda permanece como um dos grandes desafios no campo da cirurgia ortopédica e maxilofacial, e a engenharia tecidual óssea têm sido considerada, atualmente, uma abordagem promissora para a regeneração destes defeitos (Canceda *et al.*, 2007).

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que combina os princípios de engenharia e pesquisa biológica básica de modo a produzir um material cujo objetivo é reparar um tecido danificado ou restaurar um defeito com a ajuda de biomateriais, células e/ou moléculas sinalizadoras (Langer, 2000).

Investigações recentes demonstraram que o estágio crítico para a regeneração óssea está relacionado com a interação das células e a superfície dos biomateriais (Xynos *et al.*, 2000; Hench, 1998), uma vez que a adsorção de proteínas é um evento precoce na interação entre o biomaterial implantado e os tecidos vivos (Gao *et al.*, 2001). Acredita-se que as respostas celulares constituem-se em um requisito fundamental para o comportamento bioativo dos materiais (Gao *et al.*, 2001). Neste contexto, implantes ideais devem facilitar a adesão de células na sua superfície, para que as mesmas sejam viáveis em eventos subseqüentes como a proliferação, migração, diferenciação, maturação e mineralização do substrato.

Diversos materiais para enxerto, cada um com suas propriedades específicas, são utilizados na tentativa de acelerar a reparação óssea. Muitos destes materiais quando usados sozinhos apresentam efeitos limitados ou variáveis sobre a reparação óssea e, em alguns casos com desvantagens específicas. Por esta razão, combinações de materiais

têm sido feitas a fim de encontrar uma associação que apresente maior eficiência na reparação óssea (Cochran *et al.*, 2003).

O osso autógeno é, ainda, a referência padrão ouro devido as suas excelentes propriedades biológicas e ao seu grande potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor (Miyamoto *et al.*, 2012; Schmitt *et al.*, 2012).

Para um biomaterial ser considerado favorável tornam-se necessárias algumas características ideais que o osso autógeno apresenta como um substituto ósseo, que são: livre de transmissão de doenças, biocompatibilidade, radiopacidade, microporosidade, estimular a indução óssea, reabsorver em período comparativo ao da formação óssea, ser substituído por tecido ósseo, fácil de ser obtido e manipulado, agir como matriz ou veículo para outros materiais e ter baixo custo (Gross, 1997).

No presente trabalho, foram preparadas matrizes biodegradáveis termicamente estáveis até aproximadamente 100°C, o que garante a utilização do compósito PLGA/PCL/BCP/T com segurança em sistemas biológicos, que possuem temperatura em torno de 37°C. Assim, sabe-se que este compósito não perderá suas propriedades mecânicas e nem sofrerá degradação em função das temperaturas de armazenamento. A adição de T ao compósito não alterou sua temperatura de degradação.

De acordo com Notelovitz (2002), a testosterona parece ter uma importante função na regulação da organização e produção de matriz óssea. E, de acordo com trabalho prévio de Costa *et al.*(2012), constatou-se que a presença deste hormônio em compósitos de polímeros biodegradáveis e fosfato de cálcio bifásico aumentam a viabilidade e proliferação de osteoblastos. Assim como, Cheng *et al.*(2013) avaliaram a utilização de *scaffolds*, contendo testosterona ou proteínas morfogenética óssea-2 ou a combinação de ambas, para o tratamento de defeitos ósseos de tamanho crítico em ratos

do tipo selvagem e knockout para o receptor de andrógeno (Arko). Os resultados mostraram que o tratamento com a BMP-2 induziu a formação óssea no prazo de 14 dias após o início do tratamento nos dois tipos de ratos, selvagem e Arko. O tratamento com testosterona também induziu a formação óssea no prazo de 14 dias nos ratos selvagens, mas não em ratos Arko. Ficou comprovado, através de tomografia computadorizada, que o tratamento com testosterona causou graus semelhantes de formação óssea como no tratamento com BMP-2 nos ratos selvagens, mas não teve tal efeito nos ratos Arko, sugerindo que o receptor de andrógeno é necessário para a testosterona iniciar a formação óssea. Estes resultados demonstram que a testosterona é tão eficaz quanto a BMP-2 para promover a cicatrização de defeitos ósseos de tamanho crítico e que a terapia de combinação de testosterona e BMP-2 é superior à terapia única. No presente trabalho, a quantidade de hormônio por pastilha de compósito utilizada nos experimentos *in vitro* e *in vivo* é de aproximadamente 3.5 mg. Essa massa de testosterona não se mostrou citotóxica, já que a sua liberação para o meio ocorre de maneira lenta.

Outro parâmetro importante em relação à estrutura dos *scaffolds* é a presença e tamanho dos poros. A porosidade dos suportes 3D utilizados em Bioengenharia do tecido ósseo possui uma importância considerável, pois influencia vários processos relacionados às propriedades físico-químicas (como a área de superfície, liberação de íons pela matriz, propriedades mecânicas, entre outras) e aos processos biológicos (colonização celular, difusão de gases e nutrientes, formação de novos vasos sanguíneos, etc.).

A presença de poros é uma das principais características que os biomateriais candidatos ao uso como substituto ósseo têm que apresentar. A porosidade é um fator crítico para a migração celular e a elaboração de uma matriz óssea. Boyan *et al.* (1996)

relataram que os osteoblastos preferem se aderir a poros com tamanhos variando de 200 a 400 μm de diâmetro para facilitar a migração, adesão e proliferação. Yamasaki & Sakai (1992) descreveram ter encontrado a formação heterotópica de osso ao redor de grânulos de hidroxiapatita cerâmica porosa, mas não ao redor de grânulos densos. Os grânulos porosos tinham um tamanho entre 200 e 600 μm e uma rede contínua e interconectada, com uma microporosidade variando de 2 a 10 μm de diâmetro.

A porosidade de biomateriais pode ser controlada através de inúmeros processos, como a adição de moléculas durante a síntese ou no processo de liofilização (Yunoki *et al.*, 2006). Nesse trabalho, a porosidade do material não foi controlada e é resultante do processo de moldagem e evaporação do solvente. No entanto, em relação ao tamanho dos poros dos compósitos verificados através da MEV, pode-se afirmar que foram favoráveis para a adesão e migração celular, porque para suportar o crescimento e invaginação de tecido ósseo trabecular, os poros devem ter o tamanho, no mínimo, entre 40 e 100 μm . O tamanho das trabéculas do tecido ósseo varia de 20 a 100 μm , sendo que essa última medida permite que a trabécula conduza o seu próprio vaso sanguíneo, da mesma forma que ocorre com o osso compacto, o qual possui um sistema Harvesiano ou osteons de 50 a 250 μm (Nasr *et al.*, 1999).

As análises de EDS mostraram que a razão molar de Ca/P da superfície do compósito é de aproximadamente 1.63, o que é próximo dos resultados de hidroxiapatita relatados na literatura (Zhao *et al.*, 2008). A biocerâmica de fosfato de cálcio bifásico tem a capacidade de formar apatita similar a osso sobre sua superfície tanto *in vitro* como *in vivo*, a qual reflete o potencial do material de unir-se com o tecido ósseo (Legeros, 2008). Neste trabalho, foi avaliado se o compósito PLGA/PCL/BCP/T afetaria a capacidade de indução de apatita pela BCP. Os resultados demonstraram que a

BCP ainda tem a capacidade de induzir a formação de apatita similar a osso, e que esta atividade foi independente da incorporação de T ao compósito.

O compósito PLGA/PCL/BCP/T aumentou o índice de viabilidade celular e proliferação de osteoblastos. No processo de reparação óssea, é de fundamental importância que as células estejam viáveis e proliferando em alta taxa, uma vez que é necessário um rápido preenchimento do espaço lesado para evitar formação de tecido fibroso (Valério *et al.*, 2005). Foi observado que o compósito PLGA/PCL/BCP/T pode interferir positivamente, do ponto de vista cicatricial, na fisiologia osteoblástica. Estes resultados estão de acordo com os resultados de Costa *et al.* (2012), que após três dias de cultivo de osteoblastos com o compósito PLGA/PCL/BCP/T, evidenciaram fortemente que a adição de testosterona melhorou o desempenho biológico do compósito. Após 21 dias a viabilidade e proliferação foram menores no grupo do compósito sem hormônio.

O pH do meio é um parâmetro crítico para a viabilidade celular. A maioria das células necessitam, para seu crescimento ideal, um pH de 7.0 para 6.5, começando a perder a viabilidade quando o pH atinge 6.5 e 6.0 (Freshney, 1994). De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, ocorre uma leve acidificação do meio nas primeiras 24h de cultivo dos osteoblastos com os compósitos com e sem T. Essa leve acidificação do meio nas primeiras 24h não interfere na adesão e proliferação dos osteoblastos, como demonstrado em trabalho prévio (Costa *et al.*, 2012). Este fato está relacionado à degradação dos polímeros PLGA e PCL que quando em forma de blenda polimérica apresentam maior velocidade de degradação (Lao *et al.*, 2008; Curran *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2009; Lucchesi *et al.*, 2010). No entanto, após 48h de avaliação do pH do meio, ocorre uma estabilização em torno de 7.4. Isso porque a biocerâmica de fosfato de cálcio bifásico em dispositivos poliméricos oferece uma estrutura mineral que

disponibiliza Cálcio (Ca) e Fósforo (P) para a neoformação de tecido ósseo, além de neutralizar os subprodutos ácidos da degradação polimérica (Ciapetti *et al.*, 2003).

McDonald *et al.* (2010) prepararam blendas de PLGA e PCL, e PDLLA e PCL variando suas razões estequiométricas. Avaliaram a taxa de degradação e a taxa de liberação de drogas das diferentes blendas. Os autores observaram que a modulação das razões molares dos polímeros nas blendas ofereceu um controle significativo sobre a taxa de degradação das blendas, além de um perfil de liberação de drogas ajustável, permitindo, assim, a sua utilização numa ampla variedade de aplicações.

A presença do hormônio no compósito PLGA/PCL/BCP/T proporcionou viabilidade celular crescente em relação ao tempo de cultivo na presença destes. Em determinadas situações a perda óssea pode ser de tal magnitude que matrizes tridimensionais são requeridas para preenchimento dos defeitos formados e suporte dos tecidos remanescentes (Valério *et al.*, 2005).

Está bem estabelecido que não só o número, mas também a atividade dos osteoblastos são críticos para o crescimento ósseo e à sua manutenção. Os andrógenos têm um papel chave na regulação do osso, produção e organização da matriz, estimulando a proliferação dos osteoblastos, a diferenciação e a síntese de proteínas da matriz extracelular, tais como colagénio de tipo I, a osteocalcina e também a mineralização (Notelovitz, 2002).

A fosfatase alcalina é sintetizada em quantidades elevadas pelas células e é um marcador da diferenciação osteoblástica. Esta enzima está associada ao processo de mineralização da matriz extracelular, sendo responsável pela hidrólise de fosfatos orgânicos, aumentando a concentração de íons fosfato nos locais de mineralização que,

juntamente com os íons cálcio, promovem a formação de depósitos de fosfato de cálcio durante a mineralização da matriz (Deng *et al.*, 2008).

Para que uma matriz orgânica seja mineralizada, é necessário que a mesma sofra a ação da fosfatase alcalina para disponibilizar sítios de deposição do fosfato de cálcio nas fibras da matriz (Tencate, 1994). Portanto, essa enzima é um importante marcador da atividade fisiológica de osteoblastos, uma vez que se a secreção da fosfatase alcalina estiver diminuída ou inibida, haverá um bloqueio no processo de mineralização. De acordo com os resultados do presente estudo, a atividade de fosfatase alcalina está aumentada nos osteoblastos cultivados com o compósito PLGA/PCL/BCP/T, ou seja, o processo de mineralização da matriz estará acelerado neste grupo. Tal fato foi confirmado no ensaio de mineralização que o mesmo grupo apresentou nódulos de mineralização a partir de sete dias de estimulação. Isso poderia ser explicado pela suprarregulação de receptores androgênicos no osso, e pelo efeito direto da ativação de tais receptores na atividade de condrócitos, osteoclastos, osteoblastos e de seus progenitores (Notelovitz, 2002).

Kasper *et al.* (1989) demonstraram que os andrógenos estimulam diretamente a proliferação de osteoblastos *in vitro* e a análise da ação isolada dos andrógenos sobre as células osteoblásticas isoladas induz a expressão da fosfatase alcalina, um fator de proliferação osteoblástica. Também revelou que esse mecanismo é ativado diretamente, por meio de receptores de andrógenos localizados nos osteoblastos que aumentam a síntese de DNA e a diferenciação, ou através da aromatização do andrógeno.

Pesquisadores têm demonstrado que a ativação do receptor androgênico (RA) em osteoblastos é responsável pelo desenvolvimento e manutenção da massa óssea trabecular (Callewaert *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2009) e que a inativação das vias de

sinalização relacionadas ao RA, especificamente em osteoblastos maduros, resulta em reabsorção óssea aumentada e diminuição da integridade estrutural óssea (Notini *et al.*, 2007). Adicionalmente, Sinnesael *et al.* (2012) verificaram que a inativação seletiva dos receptores androgênicos em osteócitos acelera a deterioração da integridade esquelética, e sugerem que os andrógenos desempenhem papel direto na manutenção de osso trabecular através da ação no RA de osteócitos, e não apenas de osteoblastos.

A literatura destaca a importância da produção de colágeno para a união de moléculas como a fibronectina (Ling *et al.*, 2013). A fibronectina pode ser rapidamente fornecida pelo plasma, que contém integrinas que promovem a adesão celular ao compósito. O colágeno ajuda a guiar os osteoblastos no processo de reparo ósseo. É o principal componente da matriz orgânica do osso, sendo um substrato importante para a osteogênese (Ling *et al.*, 2013). No presente estudo, os resultados do ensaio de produção de colágeno mostraram que o grupo tratado com o compósito PLGA/PCL/BCP/T apresentou grande produção ($P < 0.001$) em relação ao grupo controle até 14 dias, este fato pode ser explicado pelo avançado grau de mineralização da matriz extracelular até 14 dias.

Outro marcador específico dos osteoblastos é a osteocalcina, que é expressa por osteoblastos maduros e está ligada à mineralização da matriz extracelular. Neste estudo, a concentração de osteocalcina foi significativamente maior ($P < 0.001$) no grupo do compósito com hormônio após 21 dias de estimulação em relação ao grupo sem hormônio, implicando que as células em contato com o compósito PLGA/PCL/BCP/T estão em um estágio de maturação mais avançado (Xynos *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Shor *et al.*, 2007). Este resultado vai ao encontro daqueles do MTT, da fosfatase alcalina e do colágeno, quanto à presença da testosterona melhorar a resposta osteoblástica quando na presença do compósito (Costa *et al.*, 2012).

A osteocalcina (OCN) é a proteína não colágena mais específica sintetizada pelos osteoblastos, e sua expressão está ligada à mineralização da matriz extracelular. É inicialmente sintetizada como um precursor de 10 kDa, constituindo mais de 10% das proteínas não colágenas do tecido ósseo maduro. Devido à sua expressão ser específica em osteoblastos, a osteocalcina tem sido utilizada como marcador dessas células, e é utilizada em imuno ensaios para a detecção de formação óssea (Stein *et al.*, 1993; Hughes, Aubin, 1997).

De acordo com os resultados do estudo de Oury *et al.* (2011) a osteocalcina induz a produção de testosterona nos machos, mas não influencia a produção de estrogênio nas fêmeas. Os autores misturaram osteoblastos na cultura de células retiradas dos testículos e dos ovários de roedores e verificaram que, nos ratos machos, a produção de testosterona triplicou, enquanto nas fêmeas, não houve mudanças. Noutra experiência, foi injetada osteocalcina nos testículos dos ratos e o efeito foi idêntico ao anterior, visto que quanto mais osteocalcina recebiam, mais testosterona produziam. Embora os pesquisadores ainda não saibam explicar por que este efeito se verifica apenas nos machos, acreditam que a descoberta pode ajudar homens com baixas taxas de fertilidade. Neste sentido, já estão sendo feitas experiências para testar até que ponto a osteocalcina pode ser usada no tratamento da infertilidade para homens. De acordo com os autores, a relação testosterona-osteocalcina é uma via bilateral, ou seja, a testosterona estimula a produção de osteocalcina pelos osteoblastos e a osteocalcina estimula a produção de testosterona nos machos.

Segundo Notelovitz (2002), os andrógenos regulam a atividade e recrutamento de osteoclastos. Sabe-se que os estrógenos aumentam a expressão de OPG e inibem a expressão de RANKL em osteoblastos, favorecendo a formação óssea (Khosla, 2001). Para avaliarmos o efeito da testosterona sobre a maturação de osteoclastos foi

mensurada a concentração de osteoprotegerina no meio após 7, 14 e 21 dias de cultura dos osteoblastos com os compósitos. A osteoprotegerina (OPG), também conhecida como fator inibidor dos osteoclastos, é uma citocina antagonista, membro da família do fator de necrose tumoral (TNF). A OPG é produzida e liberada pelos osteoblastos e possui um papel importante na regulação do metabolismo ósseo, já que se liga ao RANKL inibindo a maturação e ativação dos osteoclastos. Confirmando a importância do papel da OPG na reabsorção óssea, estudos mostraram que camundongos transgênicos que apresentam expressão e níveis circulantes aumentados de OPG desenvolvem osteopetrose (Simonet *et al.*, 1997; Bucay *et al.*, 1998).

Os resultados do presente estudo permitiram observar que os compósitos com e sem T não ocasionaram aumento na concentração de OPG em comparação aos controles ($P > 0.05$) nas culturas de osteoblastos até 21 dias de estimulação. Esse resultado, talvez, fosse diferente se tivesse sido realizado em modelo de cocultura de osteoblastos e células hematopoiéticas da linhagem monócito-macrófago, precursora dos osteoclastos (Walker, 1973).

Para a avaliação do efeito da T sobre a capacidade de mineralização da matriz extracelular (MEC) pelos osteoblastos em cultura, foi realizada a coloração dos nódulos de mineralização pelo método de Von Kossa, após 7, 14 e 21 dias de cultivo dos osteoblastos com os compósitos PLGA/PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP. Para Nefussi (1997) uma ordenada deposição de mineral é iniciada dentro da MEC destes nódulos, resultando no desenvolvimento de um tecido organizado semelhante ao tecido ósseo, com um arranjo de camadas de colágeno entre os osteoblastos e a MEC mineralizada. E segundo Notelovitz (2002), os andrógenos regulam a produção de matriz óssea, a organização e a mineralização. Além disso, de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, a testosterona parece acelerar o processo de mineralização da MEC.

Com o objetivo de avaliar a propriedade imunoestimuladora dos compósitos PLGA/PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP, a produção de óxido nítrico (ON) foi mensurada, após 7, 14 e 21 dias de exposição das células a esses materiais. Sabe-se que o ON é uma molécula diatômica produzida em células de mamíferos pela enzima ON-sintetase, que catalisa a conversão da L-arginina em ON (Marletta, 1993; Abu-Soud *et al.*, 1997). Trata-se de um radical livre gasoso, considerado como um dos mediadores da inflamação tecidual (Moncada *et al.*, 1991; Moilanen & Vapaatalo, 1995), mediando não somente atividades pró-inflamatórias, mas também sinais para a regulação do crescimento e diferenciação celular (Teixeira *et al.*, 2005).

O ON desempenha duas funções sobre as células: função regulatória e citotoxicidade. Nas funções regulatórias, é produzido em quantidades reduzidas, sob condições fisiológicas, mediando o relaxamento de vasos, o controle da adesão e a agregação de plaquetas e neutrófilos, estando também envolvido na neurotransmissão (Bredt & Snyder, 1994). No entanto, funções citotóxicas podem ser observadas quando o ON é produzido em grande quantidade (Bellows *et al.*, 2006) por osteoblastos e outras células, após exposição a citocinas ou outros produtos bacterianos (Moncada *et al.*, 1991). Além disso, o ON está envolvido no processo de reabsorção óssea periapical (Takeichi *et al.*, 1999) e desempenha papel fundamental na regulação da reação inflamatória periapical, associado a outras citocinas (Hama *et al.*, 2006).

Os resultados do presente estudo permitiram observar que os compósitos com e sem T, em geral não ocasionaram imunoestimulação, ou seja, não elevaram a produção de ON, em comparação aos controles ($P > 0.05$), não sendo, portanto, citotóxicos.

A reparação tecidual é um dos fenômenos mais interessantes que ocorrem nos organismos vivos. Deve-se ter em mente que este não é um processo isolado, mas faz

parte de uma série complexa de eventos biológicos. A reparação dos tecidos biológicos é considerada uma fase da reação inflamatória, de vez que não pode ser separado dos fenômenos vasculares e celulares que ocorrem em resposta a uma agressão (Kummar *et al.*, 2005).

O processo de reparação consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Tal evento é dinâmico envolvendo fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular. Incluem diversos processos, como coagulação, inflamação, depósito de substâncias e síntese de matriz, a angiogênese, fibroplasia, a epitelização, a retração da lesão e remodelação (Mandelbaum, 2003).

O início da coagulação é imediato após o surgimento da ferida. Essa fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Ocorre uma complexa liberação de produtos. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas e ditam o desencadeamento de outras fases. A formação do coágulo serve para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida. Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. Os PMN chegam no momento da injúria tissular e ficam por período que varia de três a cinco dias, são eles os responsáveis pela fagocitose das bactérias (Werner e Grose, 2003). O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase, permanece do terceiro ao décimo dia, fagocita bactérias, debrida corpos estranhos e direciona o desenvolvimento de tecido de granulação. Alta atividade dos macrófagos é observada após o trauma. Os linfócitos aparecem na ferida

aproximadamente em uma semana, seu papel não é bem definido, porém sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos. Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina. Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes da matriz. Além de formar essa base para a matriz extracelular, tem propriedades quimiotáticas e promove a opsonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias. Os mediadores mais frequentes são: Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF); Fatores de Crescimento Transformadores (TGF- β e TGF- α); Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF); Complementos plasma-ativados C3 e C5a (toxinas anafiláticas), eles conduzem a multiplicação das células endoteliais, produzindo novos vasos sanguíneos (angiogênese), duplicando células musculares lisas e sintetizando matriz. Muitos fatores que influem no processo de reparação tecidual são secretados pelos macrófagos, como TGFs, citocinas e interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e PDGF (Mandelbaum, 2003; Werner e Grose, 2003).

Na sequência final está a proliferação, que é o fechamento do processo com a presença do tecido de granulação, angiogênese, fibroplasia e formação da matriz (Lamano-Carvalho *et al.*, 1997).

De acordo com as análises histopatológicas e de microscopia eletrônica de varredura, sugeriu-se uma neovascularização dos tecidos em contato com os compósitos, independente da adição de Testosterona. A angiogênese observada é um fator determinante para a biocompatibilidade, uma vez que possibilita o material enxertado ter acesso a uma maior quantidade de células indiferenciadas e fatores de crescimento, necessários para o sucesso do implante. A angiogênese pode prover

temporariamente um fluxo regulado de populações celulares capazes de expressar o fenótipo osteogênico (Ripamonti *et al.*, 1999; Pataro *et al.*, 2007).

A persistência do infiltrado inflamatório e células gigantes, embora leve, em quase todos os períodos provavelmente devem ser devido à presença da hidroxiapatita que, mesmo sendo biologicamente ativa, pode funcionar como corpo estranho. O efeito da testosterona sobre o processo inflamatório ainda não está bem estabelecido. Porém, sabe-se que os estrógenos aceleram o processo de reparo e que os hormônios masculinos, testosterona e 5 α -dihidrotestosterona, são primariamente deletérios. Os estudos que avaliaram esta relação apresentaram resultados variados, dependentes do tecido e células avaliados, modelo de estudo utilizado e dosagem de T empregada (Gilliver *et al.*, 2007; Engeland *et al.*, 2009; Steffens *et al.*, 2012; Campelo *et al.*, 2012; Steffens *et al.*, 2014). Por exemplo, no estudo de Malkin *et al.*, 2003, os autores apresentaram a hipótese de que as propriedades imunomoduladoras da testosterona podem ser importantes na inibição da formação de ateroma e progressão para a síndrome coronária aguda.

No presente trabalho, não houve diferença significativa entre a intensidade da inflamação do tecido subcutâneo de rato após implantação do compósito com e sem T, talvez porque a dose liberada de hormônio seja muito baixa para influenciar a resposta *in vivo*. Demonstrando que na dose de testosterona estudada não alterou o processo de reparo tecidual, e ao mesmo tempo, nossos resultados corroboram com a literatura que relata que essa relação é dose dependente (Gilliver *et al.*, 2007; Engeland *et al.*, 2009; Steffens *et al.*, 2012; Campelo *et al.*, 2012; Steffens *et al.*, 2014).

7. CONCLUSÕES

Em face dos resultados obtidos é possível concluir que:

1. Os compósitos PLGA/PCL/BCP/T e PLGA/PCL/BCP obtidos pelo método de evaporação do solvente mostraram uma estrutura porosa homogeneamente distribuída e adequada para o crescimento de osteoblastos e as análises térmicas mostraram que são termicamente estáveis até 150°C;
2. A incorporação da testosterona ao compósito aumenta a viabilidade e proliferação dos osteoblastos; a atividade de fosfatase alcalina e a diferenciação osteoblástica; a produção de colágeno e a concentração de osteocalcina, sugerindo que a testosterona estimula a produção de matriz extracelular e influencia a maturação dos osteoblastos, *in vitro*;
3. A presença de testosterona no compósito PLGA/PCL/BCP acelerou a mineralização da matriz extracelular, apresentando nódulos de mineralização a partir de sete dias;
4. A concentração de óxido nítrico e de osteoprotegerina nas culturas não sofreram influência da incorporação do hormônio ao compósito;
5. A resposta tecidual à implantação dos compósitos com e sem T foi de mesma intensidade em relação ao processo inflamatório, não havendo diferença significativa entre os compósitos.

Portanto, a incorporação da Testosterona ao compósito PLGA/PCL/BCP melhora seu desempenho em relação aos padrões metabólicos *in vitro* e com excelente biocompatibilidade *in vivo*. Tratando-se, assim, de um biomaterial bioativo promissor para engenharia de tecido ósseo.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo sugeriu uma proposta interessante em relação à utilização local do hormônio testosterona. E de acordo com os resultados encontrados, a incorporação da T ao compósito PLGA/PCL/BCP melhorou o potencial osteogênico do compósito.

Um achado interessante foi que as células cultivadas com o compósito PLGA/PCL/BCP/T apresentaram características de células jovens, mantendo a proliferação e atividade de fosfatase alcalina até vinte e um dias, como também de células maduras, com liberação de osteocalcina e mineralização da matriz extracelular a partir de sete dias. Ou seja, as células na presença de T amadurecem, mas mantem as características de células jovens.

Outro achado interessante foi em relação à produção de matriz extracelular, onde as células cultivadas com o compósito PLGA/PCL/BCP/T apresentaram uma alta produção até 14 dias. Clinicamente, isso implicaria em um preenchimento mais rápido de defeito ósseo. Além disso, de acordo com os resultados do ensaio de mineralização, implicaria em uma mineralização mais rápida da matriz extracelular. Portanto, teríamos uma restauração do defeito ósseo em até 14 dias.

Em função dos resultados obtidos nesse trabalho sobre a incorporação de T ao compósito PLGA/PCL/BCP em células ósseas, sugere-se a necessidade de avaliar os mesmos parâmetros em sítio ortotópico *in vivo*. Uma vez que as condições do ambiente *in vivo* podem provocar mudanças nos padrões de liberação do hormônio, nas propriedades mecânicas do compósito e na capacidade do compósito estimular a diferenciação celular.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abd El-Mohdy HL. Controlled release of testosterone propionate based on poly N-vinyl pyrrolidone/2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid hydrogels prepared by ionizing radiation. *J Polym Res* 2012;19:9931.
- [2] Abu-Soud HM, Presta A, Mayer B, Stuehr DJ. Analysis of neuronal NO synthase under single-turnover conditions: conversion of Nomega-hydroxyarginine to nitric oxide and citrulline. *Biochemistry* 1997;36:10811-6.
- [3] Aguirre J, Buttery L, O'Shaghnessy M *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation reduced bone volume, defects in osteoblast maturation activity. *Am J Pathol* 2001;158:247-257.
- [4] Alberts B. *Fundamentos da Biologia Celular*, Editora Artmed, 2ª edição, 2000.
- [5] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials (Review). *Biomaterials* 2000;21(7):667-81.
- [6] Anusavice KJ. *Phillips Materiais Dentários*. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- [7] Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell biochem Suppl* 1998;30-31:73-82.
- [8] Balish E, Warner TF, Nicholas PJ, Paulling EE, Westwater C, Schofield DA. Susceptibility of germfree phagocy oxidase- and nitric oxide synthase 2-deficient mice, defectiv e in the production of reative metabolites of both oxygen and nitrogen, to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin. *Infect Immun* 2005;73:1313-1320.
- [9] Baker SC, Rohman G, Southgate J, Cameron NR. The relationship between the mechanical properties and cell behavior on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering. *Biomaterials* 2009;30:1321-1328.
- [10] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
- [11] Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Effect of salt leaching on PCL and PLGA (50/50) resorbable scaffolds. *Mat Res* 2008;11(1):75-80.
- [12] Bellows CF, Alder A, Wludyka P, Jaffe BM. Modulation of macrophage nitric oxide production by prostaglandin D2. *J Surg Res* 2006;132:92-7.
- [13] Bernath M, Szabo J. Tissue reaction initiated by different sealers. *Int Endod J* 2003;36(4):256-61.

- [14] Best S, Sim B, Kayser M, Downes S. The dependence of osteoblastic response on variations in the chemical composition and physical properties of hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8(2):97-103.
- [15] Body JJ, Greipp P, Coleman RE, Facon T, Geurs F, Ferman JP, et al. A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 2003;97(3Suppl):887-92.
- [16] Bolon B, Campagnuolo G, Feige U. Duration of bone protection by a single osteoprotegerin injection in rats with adjuvant-induced arthritis. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(9):1569-76.
- [17] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol New York* 2001;2(10):907-916.
- [18] Borba VZC, Kulak CAM, Castro ML. Controle neuroendócrino da massa óssea: mito ou verdade? *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47(4):453-457.
- [19] Boyan BD *et al.* Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17:137-146.
- [20] Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z. Bone and cartilage tissue engineering. *Clin Plast Surg* 1999;26(4):629-45.
- [21] Boyde A, Jones SJ, Binderman I, Harell A. Scanning electron microscopy of bone cells in culture. *Cell Tissue Res* 1976;166(1):65-70.
- [22] Brachvogel B, Dikschas J, Moch H, Welzel H, von der Mark K, Hofmann C *et al.* Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol* 2003;23(8):2907-13.
- [23] Bredt DS, Snyder SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 1994;13:301-13.
- [24] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C *et al.* Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12(9):1260-8.
- [25] Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone Biology I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization (Review). *Instr Course Lect* 1996;45:371-86.

- [26] Butler MB. Optimization of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems. *Cytotechnology* 2006;50(1-3):57-76.
- [27] Butler KR Jr; Benuzzi HA. Morphometric analysis of the hormonal effect on tissue-implant response associated with TCP bioceramic implants. *Biomed Sci Instrum* 2003;39:535-40.
- [28] Callewaert F, Venken K, Ophoff J, de Gendt K, Torcasio A, van Lenthe GH, *et al.* Differential regulation of bone and body composition in male mice with combined inactivation of androgen and estrogen receptor--alpha. *FASEB J* 2009;23(1):232-40.
- [29] Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2010;21(2):89-95.
- [30] Campelo AE, Cutini PH, Massheimer VL. Cellular actions of testosterone in vascular cells: mechanism independent of aromatization to estradiol. *Steroids* 2012;77:1033-1040.
- [31] Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 2007;28(29):4240-50.
- [32] Charalampous A, Roilides E. Cytokines and fungal infections. *J Hematol* 2005;129:583-596.
- [33] Chen N, Du YF, Guo JL, Zhang SY, Tao JF. Biologic response to autogenous particulate bone graft and shaped titanium mesh in segmental mandibular defect reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26(2):333-40.
- [34] Cheng BH, Chu TMG, Chang C, Kang HY, Huang KE. Testosterone delivered with a scaffold is as effective as bone morphologic protein-2 in promoting the repair of critical-size segmental defect of femoral bone in mice. *PLoS ONE* 2013;8(8):e70234.
- [35] Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zambonin G *et al.* Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 1994;127:1149-58.
- [36] Chiang C, Chiu M, Moore AJ, Anderson PH, Ghasem-Zadeh A, McManus JF, *et al.* Mineralization and bone resorption are regulated by the androgen receptor in male mice. *J Bone Miner Res* 2009;24(4):621-31.

- [37] Ciapetti G, Ambrosio L, Savarino L, Granchi D, Cenni E, Baldini N et al. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials* 2003;24(21):3815-3824.
- [38] Cochran DL, Jones A, Heijl L, Mellonig JT, Schoolfield J, King GN. Periodontal regeneration with a combination of enamel matrix proteins and autogenous bone grafting. *J Periodontol* 2003;74(9):1269-81.
- [39] Coelho MB, Soares IR, Mansur HS, Pereira MM. Effect of the type of surfactant on bioactive glasses foam formation. *Key Engineering Materials* 2002;240-242:257-260.
- [40] Costa CAS, Hebling J, Souza PPC. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: Estrela C. *Metodologia Científica: ciência, ensino e pesquisa*. 2ed. São Paulo: Artes médicas; 2005.p. 233-71.
- [41] Costa KJR, Passos JJ, Gomes ADM, Sinisterra RD, Lanza CRM, Cortés ME. Effect of testosterone incorporation on cell proliferation and differentiation for polymer-bioceramic composite. *J Mater Sci: Mater Med* 2012;23:2751-2759.
- [42] Curran JM, Tang Z, Hunt JA. PLGA doping of PCL affects the plastic potential of human mesenchymal stem cells, both in the presence and absence of biological stimuli. *J Biomed Mater Res Part A* 2008;1-12.
- [43] Daculsi G *et al.* Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci:Mater Med* 2003;14(3):195-200.
- [44] De Oliveira RL, Oliveira Filho RS, Gomes HC, De Franco MF, Enokihara MM, Duarte MA. Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus sealer on its biocompatibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109(1):50-54.
- [45] Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. I. Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. *Am J Med* 1993;95:11S-16S.
- [46] Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2000;Suppl 16:S2-17.
- [47] Deng CH, Sun XZ, Gao Y, Luo DS, Liu GH, Huang YP. An experimental study of the culture, isolation and biological characteristics of rat adipose tissue-derived stromal cells in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2008;14(2):99-105.

- [48] Diener A. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials* 2005;26(4):383-392.
- [49] Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomater* 2011;1(2):121-164.
- [50] Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate coatings, films and layers. *Progress in Biomaterials* 2012;1(1):1-40.
- [51] Douglas CR. *Fisiopatologia oral*. Pancast Editora. 1998.
- [52] Engeland CG, Sabzehei B, Marucha PT. Sex hormones and mucosal wound healing. *Brain, Behavior, and Immunity* 2009;23:629-635.
- [53] Estrela C. *Ciências Endodônticas*. São Paulo: Artes Médicas; 2004.
- [54] Fellah BH, Josselin N. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mater Sci:Mater Med* 2007;18(2):287-294.
- [55] Figueiredo JA, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MA. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J* 2001;34(5):377-85.
- [56] Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade: Metabolismo, síntese e funções. *Rev Ass Med Brasil* 2000;46(3):265-271.
- [57] Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Third Edition. Wiley-Liss, NY. 1994.
- [58] Gala-García A *et al.* In vitro and in vivo evaluation of the biocompatibility of a calcium phosphate/poly (lactic-co-glycolic acid) composite. *J Mater Sci:Mater Med* 2012;23(7):1785-96.
- [59] Ganong WF. *As gônadas: desenvolvimento e função do sistema reprodutor* In: *Fisiologia Médica*. 19ªed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda. 2000(23):299-328
- [60] Gao J, Dennis J, Solchaga L, Awadallah A, Goldberg V, Caplan A. Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2001(7):363-371.

- [61] Garofalo GS. Autogenous, allogenic and xenogenic grafts for maxillary sinus elevation: literature review, current status and prospects. *Minerva Stomatol* 2007;56:373-92.
- [62] Garvin KL, Miyano JA, Robinson D, Giger D, Novak J, Radio S *et al.* Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in treatment of osteomyelitis. *J Bone and Surgery* 1994;76:1500-1506.
- [63] Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Proteases and bone remodeling. *Cytokine & growth factor reviews* 2009;20(1):29-41.
- [64] Gilliver SC, Ashworth JJ, Ashcroft GS. The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clinics in Dermatology* 2007;25:56-62.
- [65] Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarretes R, Cai Y *et al.* The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials* 2011;32:3395-3403.
- [66] Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BAWH. *Kuby immunology*. New York: W.H. Freeman and company, 4ed, p670, 2000.
- [67] Gordon E, Lasserre A, Stull P, Bajpai PK, England B. A zinc based self setting ceramic bone substitute for local delivery of testosterone. *Biomed Sci Instrum* 1997;33:131-6.
- [68] Gross JS. Bone grafting materials for dental applications: a practical guide. *Compend Contin Educ Dent* 1997;18(10):1013-34.
- [69] Hajime O, Dohi Y, Tami S, Tabata S. Osteogenic Differentiation of Stromal Stem Cells In Porous Hydroxyapatite Ceramics. *J Biom Mat Res* 1993;27:401-7.
- [70] Hakola K; Pierroz DD. Dose and time relationships of intravenously injected rat recombinant luteinizing hormone and testicular testosterone secretion in the male rat. *Biol Reprod* 1998;59:338-343.
- [71] Hama S, Takeichi O, Hayashi M, Komiyama K, Ito K. Co-production of vascular endothelial cadherin and inducible nitric oxide synthase by endothelial cells in periapical granuloma. *Int Endod J* 2006;39:179-184.
- [72] Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 1996;12(3):186-93.

- [73] Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003;36(2):75-85.
- [74] Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(6):623-30.
- [75] Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998;19(16):1419-1423.
- [76] Henderson KE, Baranski TJ, Bickel PE. *Endocrinologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006;p.96-145.
- [77] Hendrich C, Geyer M, Scheddin D, Schutze N, Eulert J, Thull R. A new osteoblast cell culture system for standardized testing of biomaterials. *Biomed Tech* 1996;41(10): 278-83.
- [78] Heshmati HM, Riggs BL, Burritt MF, McAlister CA, Wollan PC, Khosla S. Effects of the circadian variation in serum cortisol on markers of bone turnover and calcium homeostasis in normal postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metabol* 1998;83:751-7.
- [79] Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157(1):87-94.
- [80] Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* 2001;92(3):460-70.
- [81] Horbett TA, Ratner BD, Schakenraad JM, Schoen FS on background concepts. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, 1st ed. San Diego: Academic Press, 1996, cap. 3, p. 133-164.
- [82] Huffnagle G B, Deep GS. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:344-350
- [83] Hughes FJ, Aubin JE. Culture of cells of the osteoblast lineage. In: Arnett TR, Henderson B. *Methods in Bone Biology*. Londres, Chapman & Hall 1997;p.1-49.
- [84] Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G *et al*. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol* 2000;41:48-72.

- [85] Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 2006;3:589-601.
- [86] Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009;310:3-10.
- [87] Ishimoto SK, Price PA. Secretion of the vitamin K-dependent protein of bone by rat osteosarcoma cells: evidence of an intracellular precursor. *J Biol Chem* 1980;255:6579-83.
- [88] Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly(lactid acid) and poly(lactide-co-glycolid) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsul* 1990;7(3):297-325.
- [89] Jee SS, Thula TT, Gower LB. Development of bone-like composites via the polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. Part 1: Influence of molecular weight. *Acta Biomaterialia* 2010;6:3676-3686.
- [90] Johnston RB. Current concepts in immunology: monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 1988;318(12):747-752.
- [91] Jones SJ, Boyde A. Morphological changes of osteoblasts in vitro. *Cell Tiss Res* 1976;166(1):101-107.
- [92] Jones AC, Arns CH, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Sheppard AP. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials* 2009;30:1440-51.
- [93] Kao WJ, Lee D. In vivo modulation of host response and macrophage behavior by polymer networks grafted with fibronectin-derived biomimetic oligopeptides: the role of RGD and PHSRN domains. *Biomaterials* 2001;22(21):2901-2909.
- [94] Kasper CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, Baylink DJ. Androgens direct stimulate proliferation of bone cells *in vitro*. *Endocrinol* 1989;124(3):1576-8.
- [95] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinol* 2001;142(12):5050-5.
- [96] Khosla S *et al.* Osteoporosis in men. *Endocr Rev* 2008;29:441-464.
- [97] Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite/ poly (ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials* 2004;25(7-8):1279-1287.

- [98] Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M. Immunohistochemical localization of activated and mature CD83+ dendritic cells in granulomas of sporotrichosis. *Eur J Dermatol* 2001;11(6):527-529.
- [99] Kummar V, Abbas A, Fausto N. Tecido de renovação e reparações: regeneração, cicatrização e fibrose. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, editors. *Patologia – Bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro: elsevier; 2005. p. 91-124.
- [100] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010;75:1-18.
- [101] Lamano-Carvalho TL, Brentegari LG, Bombonato KF. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Braz Dent J* 1997;8(1):9-12.
- [102] Langer R. Tissue engineering (Review). *Mol Ther* 2000;1(1):12-15.
- [103] Langer R & Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:92.
- [104] Lao LL, Venkatraman SS, Peppas NA. Modeling of drug release from biodegradable polymer blends. *Eur J Phar Biophar* 2008;70:796-803.
- [105] Laskin JD, Heck DE, Laskin DL. Multifunctional role of nitric oxide in inflammation. *Trends Endocrinol Metab* 1994;5(9):377-382.
- [106] Laurencin CT, Elgendy H. The biocompatibility and toxicity of degradable polymeric materials: implications for drug delivery polymeric. *Site-specific Pharmacotherapy*. John Wiley & Sons Ltda, 1994.
- [107] Legeros RZ *et al.* Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci: Mater Med* 2003;14(3):201-209.
- [108] Legeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev* 2008;108(11):4742-53.
- [109] Leonardo MR, Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol* 1999;15(1):28-32.
- [110] Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* 2009;63:142-148.
- [111] Lieberherr M; Grosse B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive g-protein. *J Biol Chemistr* 1994;269(10):7217-7223.

- [112] Lima KM, Júnior JMR. Poly-dl-lactide-co-glycolide microsphere as a controlled release antigen delivery system. *Br J Med Biol Res* 1999;32:171-180.
- [113] Lin IC, Smartt JM, Nah HD *et al.* Nitric oxide stimulates proliferation and differentiation of fetal calvarial osteoblasts and dural cells. *Plast Reconstr Surg* 2008;212:1554-66.
- [114] Lindberg MK, Vandenput L, Movèrare Skrtic S, Vanderschueren D, Boonen S, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and the skeleton. *Minerva Endocrinol* 2005;30(1):15-25.
- [115] Ling T, Lin J, Tu J, Liu S, Weng W, Cheng K, Wang H, Du P, Han G. Mineralized collagen coatings formed by electrochemical deposition. *J Mater Sci:Mater Med* 2013;24(12):2709-2718.
- [116] Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Chinchilli V, Witters L, Engle L, *et al.* Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8(7):2306-10.
- [117] Lobo SE, Arinze LT. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone regeneration and tissue engineering applications. *Materials* 2010;3:815-26.
- [118] Lucchesi C, Barbanti SH, Joazeiro PP, Duek EAR. Cell Culture on PCL/PLGA Blends. *J Appl Polymer Sci* 2010;115(5):2609-2615.
- [119] Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin J. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 1999; 15:616-627.
- [120] Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS. Testosterone as a protective factor against atherosclerosis – immunomodulation and influence upon plaque development and stability. *J Endocrinol* 2003;178:373-380.
- [121] Mancini L, Moradi B, Becherini L, Martinetti V. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;274(2):477-481.
- [122] Mandelbaum SH. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte I. *An Bras Dermatol* 2003;78(4):393-410.
- [123] Manjubala I *et al.* Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J Biomed Mater Res* 2002;63(2):200-208.

- [124] Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993;268:12231-4.
- [125] Marshall HE, Stamler JS. NO waiting to exhale in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:685-687.
- [126] Matsuno T, Omata K, Hashimoto Y, Tabata Y, Satoh T. Alveolar bone tissue engineering using composite scaffolds for drug delivery. *Japanese Dental Sci Review* 2010;46:188-192.
- [127] Mavis B, Demirtas TT, Gümüşderelioglu M, Gündüz G, Colak U. Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. *Acta Biomaterialia* 2009;5:3098-3111.
- [128] McCormack FX, Gobbons R, Ward SR, Kuzmenko A, Wu H, Deep GS. Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary colletins. *J Infect Dis* 2003;278:36250-36256.
- [129] McDonald PF, Lyons JG, Geever LM, Higginbotham. In vitro degradation and drug release from polymer blends based on poly(DL-lactide), poly(L-lactide-glycolide) and poly(caprolactone). *J Mater Sci* 2010;45:1284-1292.
- [130] Miyamoto I, Funaki K, Yamauchi K, Kodama T, Takahashi T. Alveolar ridge reconstruction with titanium mesh and autogenous particulate bone graft: computed tomography-based evaluations of augmented bone quality and quantity. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012;14(2):304-11.
- [131] Moilanen E, Vapaatolo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann Med* 1995;27:359-67.
- [132] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- [133] Moss ML. The role of an osseous connected cellular network. *Am J Orthod Dent Orthop* 1997;112:221-227.
- [134] Myers JT, Tsang AW, Swanson JA. Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages. *J Immunol* 2003;171:5447-5453.
- [135] Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontology* 2000 1999;19:74-86.

- [136] Nassri MRG, Lia RCC, Bombana AC. Analysis of the tissue answer regarding two root canal sealers. *J Appl Oral Sci* 2003;11(1):9-14.
- [137] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6(12):3051-3064.
- [138] Nefussi JR, Brami G, Modrowski D, Oboeuf M, Forest N. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem Cytochem* 1997;45(4):403-503.
- [139] Nishio K, Akiyama H, Kobuko T. The effect of alkali and heat treated titanium and apatite formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res* 2000;52:652-66.
- [140] Nomura S, Takano T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 2000;19:91-96.
- [141] Notelovitz M. Androgen effects on bone and muscle. *Fertil Steril*. 2002;77(4):34-41.
- [142] Notini AJ, McManus JF, Moore A, Bouxsein M, Jimenez M, Chiu WS, *et al*. Osteoblast deletion of exon3 of the androgen receptor gene results in trabecular bone loss in adult male mice. *J Bone Miner Res* 2007;22(3):347-56.
- [143] Oliveira PT & Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004;25(3):403-413.
- [144] Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R *et al*. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater Sci Eng R* 2007;58:77-116.
- [145] Oréfice RL, Pereira MM, Mansur HS. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica 2006:59-250;283-298;479-506.
- [146] Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 2011;144:796-810.
- [147] Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS *et al*. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-30.

- [148] Pachence JM, Bohrer MP, Kohn J. Biodegradable Polymers. Chapter Twenty-Three. IN: Lanza, Langer and Vacanti. Principles of Tissue Engineering. 3rd Edition. Elsevier, Inc. 2007: 323-339.
- [149] Park JB, Lakes RS. Biomaterials: An Introduction. Plenum Press, New York, NY, 1992. 394p.
- [150] Pataro AL, Oliveira MF, Teixeira KI, Turchetti-Maia RM, Lopes MT, Wykrota FH et al. Polymer: bioceramic composites optimization by tetracycline addition. Int J Pharm 2007;336(1):75-81.
- [151] Peleg M, Garg AK, Mazor Z. Predictability of simultaneous implant placement in the severely atrophic posterior maxilla: a 9-year longitudinal experience study of 2132 implants placed into 731 human sinus grafts. Int J Oral Maxillofac Implants 2006;21:94-102.
- [152] Peter M, Binulal NS, Nair SV, Selvamurugan N, Tamura H, Jayakumar R. Novel biodegradable chitosan-gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. Chemical Engineering Journal 2010;158:353-361.
- [153] Prado da Silva MH. Recobrimento de titânio com hidroxiapatita: desenvolvimento de processo de deposição eletrolítica e caracterização biológica *in vitro*. Tese de doutorado 1999, COPPE/UFRJ.
- [154] Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, 1996, 1 ed. San Diego: academic press, 484p.
- [155] Reis RL, Silva GA, Coutinho OP, Ducheyne P. Materials in particulate form for tissue engineering: Applications in bone. J Tissue Eng Regen Med 2007;1:97-109.
- [156] Rezende TM, Vargas DL, Cardoso FP, Sobrinho AP, Vieira LQ. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. Int Endod J 2005; 38(12):896-903.
- [157] Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2006;27:3413-3431.
- [158] Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT *et al*. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. J Bone Miner Res 1995;10:439-446.
- [159] Riggs BL *et al*. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev 2002;23:279-302.

- [160] Ripamonti U, Duneas N. Tissue engineering of bone by osteoinductive biomaterials. *Material Research Society Bulletin* 1996;21:36-39.
- [161] Ripamonte U, Crooks J, Kikbride AN. Sintered porous hydroxyapatites with intrinsic osteoinductive activity: geometric induction of bone formation. *S Afric J Sci* 1999;95:335-343.
- [162] Roitt IM, Delves PT. *Roitt's Essencial Immunology*. 10ed, Malben: Blackwell Science, 481p, 2001.
- [163] Romanello M, Bicego M, Pirulli D, Crovella S, D'andrea P. Extracellular NAD: A novel autocrine/paracrine signal in osteoblast physiology. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;299:424-431.
- [164] Romani L. Immunity to fungal infections. *Nature Rev Immunol* 2004;4:1-23.
- [165] Sarainen S, Tähtelä R, Laitinen K, Karonen SL, Välimäki MJ. Nocturnal rise in markers of bone resorption is not abolished by bedtime calcium or calcitonin. *Calcif Tissue Int* 1994;55:349-52.
- [166] Saraiva LG, Castro ML. Marcadores bioquímicos de remodelação óssea na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46(1):72-8.
- [167] Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int* 2004;74(1):103-6.
- [168] Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann BoneCeramic, Bio-Oss, Puros and autologous bone. A randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res* 2012;13.
- [169] Seeman E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *J Bone Miner Metab* 2008;26:1-8.
- [170] Shor L, Güçeri S, Wen X, Gandhi M, Sun W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions *in vitro*. *Biomaterials* 2007;28:5291-5297.
- [171] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R *et al*. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309-19.

- [172] Sinnesael M, Claessens F, Laurent M, Dubois V, Boonen S, Deboel L, *et al.* Androgen receptor (AR) in osteocytes is important for the maintenance of male skeletal integrity: evidence from targeted AR disruption in mouse osteocytes. *J Bone Miner Res* 2012;27(12):2535-43.
- [173] Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 1992;266(5):74-77.
- [174] Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. *J Endod* 2006;32(7):656-62.
- [175] Spangberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973;35(3):402-14.
- [176] Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa Jr C, Spolidorio LC. The effect of supra- and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats – a radiographic and histologic pilot study. *J Periodontol* 2012;83(11):1432-1439.
- [177] Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, Stephens DN, Rossa Jr C, Spolidorio LC, Kantarci A, Van Dyke TE. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res* 2014;46:193-200.
- [178] Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 1993;14(4):424-442.
- [179] Stuehr DJ. Purification and properties of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol* 1996;268:324-333.
- [180] Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface* 2009;6(3):S311-S324.
- [181] Taddei P, Tinti A, Reggiani M, Fagnano C. In vitro mineralization of bioresorbable poly (ϵ -caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: a vibrational and thermal investigation. *Journal of Molecular Structure* 2005;744(47):135-143.
- [182] Takeichi O, Hayashi M, Tsurumachi T, Tomita T, Ogihara H, Ogiso B, Saito T. Inducible nitric oxide synthase activity by interferon-gamma-producing cells in human radicular cysts. *Int Endod J* 1999;32:124-30.

- [183] Tang ZG, Callaghan JT, Hunt JA. The physical properties and response of osteoblasts to solution cast films of PLGA doped polycaprolactone. *Biomaterials* 2005;26:6618-6624.
- [184] Teixeira M, Cerqueira F, Barbosa CM, Nascimento MS, Pinto M. Improvement of the inhibitory effect of xanthenes on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. *J Drug Target* 2005;13:129-35.
- [185] Tencate AR. *Oral histology: Development, Structure, and Function*. Mosby Inc, 1994.
- [186] Trajano VCC. Avaliação *in vitro* da atividade osteogênica da doxiciclina associada a compósitos de polímeros biodegradáveis em matriz de biocerâmica. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia, 2012.
- [187] Tramontana J, Benghuzzi H, Tucci M, Tsao A, Hughes J. Morphometric analysis of cortical bone upon the exposure to sustained delivery of anabolic promoting agents using adult male rats as a model. *Biomed Sci Instrum* 2001;37:293-8.
- [188] Turner CH, Robling AG, Duncan RL. Do bone cells behave like a neuronal network? *Calcify Tissue Int* 2002;70:435-442.
- [189] Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* 2004;25:2941-2948.
- [190] Valério P, Guimarães MHR, Pereira MM, Leite MF, Goes AM. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foam. *Journal of Material Science: Material in Medicine* 2005;16:851-56.
- [191] Vallet- Regí M. Introduction to the World of Biomaterials. *Anales de Química Int Ed* 1997;93:S6-S14.
- [192] Vandenput L, Swinnen JV. Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model. *J Miner Res* 2004;19(9):1462-1470.
- [193] Vanderschueren D *et al.* Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004;25:389-425.
- [194] Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone, *Immuno* 2001;103:255-261.

- [195] Vargas DM. Peptídeos derivados do colágeno; novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Rev Assoc Med Bras* 1997;43:367-370.
- [196] Vert M. Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future. *Prog Polym Sci* 2007;32:755-761.
- [197] Wagner S, Enss ML, Cornberg M, Mix H, Schumann S, Kirshner G *et al.* Morphological and molecular characterization of human gastric mucous cells in long-term primary culture. *Pflugers Arch* 1998;436:871-881.
- [198] Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair. *European Cells and Materials* 2006;11:43-56.
- [199] Walker DG. Osteopetrosis cured by temporary parabiosis. *Science* 1973;180:875.
- [200] Wang *et al.* Periodontal regeneration. *J Perio* 2005;76(9):1601-1622.
- [201] Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokins. *Physiol Rev* 2003;83(3):835-70.
- [202] Williams DF. To engineering is to create: the link between engineering and regeneration. *Trends in Biotechnol* 2006;24(1):4-8.
- [203] Xie Q, Kawakami K, Kudeken N, Zhang T, Qureshi MH, Saito A. Different susceptibility of three clinically isolated strains of *Cryptococcus neoformans* to the fungicidal effects of reactive nitrogen and oxygen intermediates: possible relationships with virulence. *Microbiol Immunol* 1997;41(9):725-731.
- [204] Xynos ID, Buttery LDK, Hench L. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce IGF II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;276:461-465.
- [205] Yamasaki H, Sakai H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials* 1992;13(5):308-312.
- [206] Yang Y, Tian J, Deng L, Ong JL. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. *Biomaterials* 2002;23:1383-1389.
- [207] Yuan H *et al.* Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hidroxyapatite (HA) scaffolds. *Tissue Engineering* 2006;12(6):1607-1615.
- [208] Yunoki S, Ikoma T, Monkawa A, Ohta K, Kikuchi M, Sotome S, Shinomiya K, Tanaka J. Control of pore structure and mechanical property in

- hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth. *Materials Letters* 2006(60):999-1002.
- [209] Zafalon EJ, Veriani MA, Sousa CJ, Moura CC, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(5):388-94.
- [210] Zafirau W, Parker D, Billotte W, Bajpai PK. Development of a ceramic device for the continuous local delivery of steroids. *Biomed Sci Instrum* 1996;32:63-70
- [211] Zhao J, Guo LY, Yang XB, Weng J. Preparation of bioactive porous HA/PCL composite scaffolds. *Applied Surface Science* 2008;255:2942-2946.
- [212] Ziats NP, Miller KM, Anderson JM. In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials* 1988;9:5-13.
- [213] Zwillig BS, Eisenstein TK. *Macrophage-pathogen interactions*. New York: Marcel Dekker, 1994, 634p.

ANEXO 1**Análise Estatística MTT**

Table Analyzed

Data 1

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	3.70	0.0475
Column Factor	18.68	P<0.0001
Row Factor	75.38	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	*	Yes
Column Factor	***	Yes
Row Factor	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	4	0.01018	0.002545	3.707
Column Factor	2	0.05139	0.02570	37.43
Row Factor	2	0.2074	0.1037	151.1
Residual	9	0.006178	0.0006865	

Number of missing values 0

Bonferroni posttests

Control vs PLGA/PCL/BCP/T

Row Factor	Control	PLGA/PCL/BC		95% CI of diff.
		P/T	Difference	
7d	0.5626	0.6523	0.08969	-0.005206 to 0.1846
14d	0.6903	0.7523	0.06202	-0.03288 to 0.1569
21d	0.8708	0.9426	0.07183	-0.02307 to 0.1667
Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7d	0.08969	3.423	P < 0.05	*
14d	0.06202	2.367	P > 0.05	ns
21d	0.07183	2.741	P > 0.05	ns

Control vs PLGA/PCL/BCP

Row Factor	Control	PLGA/PCL/BC		95% CI of diff.
		P	Difference	
7d	0.5626	0.5583	-0.004260	-0.09916 to 0.09064
14d	0.6903	0.6531	-0.03718	-0.1321 to 0.05774

21d	0.8708	0.7444	-0.1264	0.05771 -0.2212 to - 0.03146
Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7d	-0.004260	0.1626	P > 0.05	ns
14d	-0.03718	1.419	P > 0.05	ns
21d	-0.1264	4.822	P < 0.01	**
PLGA/PCL/BCP/T vs PLGA/PCL/BCP				
Row Factor	PLGA/PCL/BC P/T	PLGA/PCL/BC P	Difference	95% CI of diff.
7d	0.6523	0.5583	-0.09395	-0.1888 to 0.0009459
14d	0.7523	0.6531	-0.09920	-0.1941 to - 0.004304
21d	0.9426	0.7444	-0.1982	-0.2931 to - 0.1033
Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7d	-0.09395	3.586	P < 0.05	*
14d	-0.09920	3.786	P < 0.05	*
21d	-0.1982	7.564	P < 0.001	***

ANEXO 2**Análise Estatística Atividade de Fosfatase Alcalina**

Table Analyzed

Data 1

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	21,90	P<0.0001
Column Factor	75,43	P<0.0001
Row Factor	2,31	0,0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
Column Factor	***	Yes
Row Factor	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	4	91,54	22,88	141,0
Column Factor	2	315,3	157,6	971,3
Row Factor	2	9,667	4,834	29,78
Residual	9	1,461	0,1623	

Number of missing values 0

Bonferroni posttests

Control vs PLGA/PCL/BCP/T

Row Factor	Control	PLGA/PCL/B CP/T	Differenc e	95% CI of diff.
7d	9,488	14,70	5,215	3.756 to 6.674
14d	9,734	17,62	7,890	6.431 to 9.349
21d	3,621	21,26	17,64	16.18 to 19.10

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7d	5,215	12,95	P<0.001	***
14d	7,890	19,59	P<0.001	***
21d	17,64	43,78	P<0.001	***

Control vs PLGA/PCL/BCP

Row Factor	Control	PLGA/PCL/B CP	Differenc e	95% CI of diff.
7d	9,488	11,26	1,773	0.3139 to 3.232
14d	9,734	13,29	3,555	2.096 to 5.014
21d	3,621	14,41	10,79	9.330 to 12.25

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
------------	------------	---	---------	---------

7d	1,773	4,401	P<0.01	**
14d	3,555	8,824	P<0.001	***
21d	10,79	26,78	P<0.001	***

PLGA/PCL/BCP/T vs
PLGA/PCL/BCP

Row Factor	PLGA/PCL/BCP/ T	PLGA/PCL/B CP	Differenc e	95% CI of diff.
7d	14,70	11,26	-3,442	-4.902 to - 1.983
14d	17,62	13,29	-4,335	-5.794 to - 2.876
21d	21,26	14,41	-6,848	-8.307 to - 5.389

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7d	-3,442	8,545	P<0.001	***
14d	-4,335	10,76	P<0.001	***
21d	-6,848	17,00	P<0.001	***

ANEXO 3**Análise Estatística Produção de Colágeno**

Table Analyzed Data 1

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	73,29	P<0.0001
Column Factor	19,48	P<0.0001
Row Factor	5,91	0,0005

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
Column Factor	***	Yes
Row Factor	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	4	4,742	1,186	124,6
Column Factor	2	1,260	0,6302	66,22
Row Factor	2	0,3827	0,1914	20,11
Residual	9	0,08565	0,009517	

Number of missing values 0

Bonferroni posttests

Control vs PLGA/PCL/BCP/T

Row Factor	Control	PLGA/PCL/B CP/T	Difference	95% CI of diff.
7d	1,675	2,475	0,8000	0.4467 to 1.153
14d	1,665	3,340	1,675	1.322 to 2.028
21d	3,300	2,150	-1,150	-1.503 to -0.7967

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7d	0,8000	8,201	P<0.001	***
14d	1,675	17,17	P<0.001	***
21d	-1,150	11,79	P<0.001	***

Control vs PLGA/PCL/BCP

Row Factor	Control	PLGA/PCL/B CP	Difference	95% CI of diff.
7d	1,675	2,175	0,5000	0.1467 to 0.8533
14d	1,665	1,955	0,2900	-0.06332 to 0.6433
21d	3,300	1,940	-1,360	-1.713 to -1.007

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7d	0,5000	5,125	P<0.01	**
14d	0,2900	2,973	P < 0.05	*
21d	-1,360	13,94	P<0.001	***

PLGA/PCL/BCP/T vs
PLGA/PCL/BCP

Row Factor	PLGA/PCL/BCP/ T	PLGA/PCL/B CP	Differenc e	95% CI of diff.
7d	2,475	2,175	-0,3000	-0.6533 to 0.05332
14d	3,340	1,955	-1,385	-1.738 to -1.032
21d	2,150	1,940	-0,2100	-0.5633 to 0.1433

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7d	-0,3000	3,075	P < 0.05	*
14d	-1,385	14,20	P<0.001	***
21d	-0,2100	2,153	P > 0.05	ns

ANEXO 4**Análise Estatística Osteocalcina**

Table Analyzed

Data 1

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	37,33	P<0.0001
Column Factor	18,71	0,0002
Row Factor	4,67	0,0800

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
Column Factor	***	Yes
Row Factor	ns	No

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	4	0,06166	0,01541	10,69
Column Factor	2	0,03091	0,01545	10,72
Row Factor	2	0,007707	0,003853	2,672
Residual	45	0,06489	0,001442	

Number of missing values 0

Bonferroni posttests

Control vs PLGA/PCL/BCP/T

Row Factor	PLGA/PCL/B Difference			95% CI of diff.
	Control	CP/T	e	
7 d	0,2385	0,3296	0,09106	0.02720 to 0.1549 0.007871 to
14 d	0,2550	0,3268	0,07173	0.1356 -0.1014 to
21 d	0,3662	0,3287	-0,03749	0.02637

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7 d	0,09106	4,154	P<0.001	***
14 d	0,07173	3,272	P<0.01	**
21 d	-0,03749	1,710	P > 0.05	ns

Control vs PLGA/PCL/BCP

Row Factor	PLGA/PCL/B Difference			95% CI of diff.
	Control	CP	e	
7 d	0,2385	0,2781	0,03960	-0.02426 to 0.1035
14 d	0,2550	0,2991	0,04411	-0.01976 to 0.1080

21 d	0,3662	0,2384	-0,1279	-0.1917 to - 0.06400
------	--------	--------	---------	-------------------------

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7 d	0,03960	1,806	P > 0.05	ns
14 d	0,04411	2,012	P > 0.05	ns
21 d	-0,1279	5,832	P < 0.001	***

PLGA/PCL/BCP/T vs
PLGA/PCL/BCP

Row Factor	PLGA/PCL/BCP /T	PLGA/PCL/B CP	Differenc e	95% CI of diff.
7 d	0,3296	0,2781	-0,05146	-0.1153 to 0.01240
14 d	0,3268	0,2991	-0,02763	-0.09149 to 0.03624
21 d	0,3287	0,2384	-0,09036	-0.1542 to - 0.02650

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7 d	-0,05146	2,347	P > 0.05	ns
14 d	-0,02763	1,260	P > 0.05	ns
21 d	-0,09036	4,122	P < 0.001	***

ANEXO 5**Análise Estatística Osteoprotogerina**

Table Analyzed Data 1

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Column Factor	27.52	0.4190
Row Factor	21.96	0.4858

Source of Variation	P value summary	Significant?
Column Factor	ns	No
Row Factor	ns	No

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Column Factor	2	0.0000000233	0.000000011	1.090
Row Factor	2	0.0000000186	0.000000009	0.8695
Residual	4	0.0000000428	0.000000010	

Number of missing values 0

Bonferroni posttests

Control vs PLGA/PCL/BCP/T

Row Factor	Control	PLGA/PCL/B		Difference	95% CI of diff.
		CP/T			
7 d	0.09822	0.09791	-0.0003170	-0.001113 to 0.0004787	
14 d	0.09792	0.09791	0.000005342	-0.0008011 to 0.0007904	
21 d	0.09793	0.09791	-0.00001262	-0.0008084 to 0.0007831	
Row Factor	Difference	t	P value	Summary	
7 d	-0.0003170	2.166	P > 0.05	ns	
14 d	-0.000005342	0.03650	P > 0.05	ns	
21 d	-0.00001262	0.08623	P > 0.05	ns	

Control vs PLGA/PCL/BCP

Row Factor	Control	PLGA/PCL/B		Difference	95% CI of diff.
		CP			
7 d	0.09822	0.09791	-0.0003125	-0.001108 to 0.0004832	
14 d	0.09792	0.09792	0.000001051	-0.0007947 to	

					0.0007968
					-
			0.000000529		-0.0007963 to
21 d	0.09793	0.09793	0		0.0007952
Row Factor	Difference	t	P value		Summary
7 d	-0.0003125	2.135	P > 0.05		ns
14 d	0.000001051	0.007177	P > 0.05		ns
21 d	-0.0000005290	0.003614	P > 0.05		ns
PLGA/PCL/BCP/T vs PLGA/PCL/BCP					
Row Factor	PLGA/PCL/B CP/T	PLGA/PCL/B CP	Difference		95% CI of diff.
7 d	0.09791	0.09791	0.000004545		-0.0007912 to 0.0008003
14 d	0.09791	0.09792	0.000006393		-0.0007893 to 0.0008021
21 d	0.09791	0.09793	0.00001209		-0.0007836 to 0.0008078
Row Factor	Difference	t	P value		Summary
7 d	0.000004545	0.03105	P > 0.05		ns
14 d	0.000006393	0.04368	P > 0.05		ns
21 d	0.00001209	0.08262	P > 0.05		ns

ANEXO 6**Análise Estatística Von Kossa**

Table Analyzed

Data 1

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	22.69	P<0.0001
Column Factor	40.00	P<0.0001
Row Factor	31.00	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
Column Factor	***	Yes
Row Factor	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	4	6639	1660	40.52
Column Factor	2	11700	5852	142.9
Row Factor	2	9071	4535	110.7
Residual	45	1843	40.96	

Number of missing values 0

Bonferroni posttests

Control vs PLGA/PCL/BCP/T

Row Factor	Control	PLGA/PCL/BC P/T	Difference	95% CI of diff.
7d	0.0000	44.67	44.67	33.90 to 55.43
14d	9.167	66.67	57.50	46.74 to 68.26
21d	61.50	64.83	3.333	-7.431 to 14.10

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7d	44.67	12.09	P<0.001	***
14d	57.50	15.56	P<0.001	***
21d	3.333	0.9021	P > 0.05	ns

Control vs PLGA/PCL/BCP

Row Factor	Control	PLGA/PCL/BC P	Difference	95% CI of diff.
7d	0.0000	39.17	39.17	28.40 to 49.93
14d	9.167	52.33	43.17	32.40 to

					53.93
					-19.60 to
21d	61.50	52.67	-8.833		1.931
Row Factor	Difference	t	P value		Summary
7d	39.17	10.60	P<0.001		***
14d	43.17	11.68	P<0.001		***
21d	-8.833	2.391	P > 0.05		ns
PLGA/PCL/BCP/T vs PLGA/PCL/BCP					
Row Factor	PLGA/PCL/BC P/T	PLGA/PCL/BC P	Difference		95% CI of diff.
7d	44.67	39.17	-5.500		-16.26 to 5.264
14d	66.67	52.33	-14.33		-25.10 to - 3.569
21d	64.83	52.67	-12.17		-22.93 to - 1.403
Row Factor	Difference	t	P value		Summary
7d	-5.500	1.488	P > 0.05		ns
14d	-14.33	3.879	P<0.01		**
21d	-12.17	3.293	P<0.01		**

ANEXO 7**Análise Estatística Óxido Nítrico**

Table Analyzed

Data 1

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	4.79	0.9487
Column Factor	17.79	0.3299
Row Factor	13.76	0.4145

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Column Factor	ns	No
Row Factor	ns	No

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	4	2.521	0.6303	0.1692
Column Factor	2	9.371	4.685	1.258
Row Factor	2	7.248	3.624	0.9728
Residual	9	33.53	3.725	

Number of missing values 0

Bonferroni posttests

CONTROL vs PLGA/PCL/BCP/T

Row Factor	CONTROL	PLGA/PCL/BCP /T	Difference	95% CI of diff.
7 d	14.70	14.72	0.02000	-6.971 to 7.011
14 d	14.96	16.65	1.695	-5.296 to 8.686
21 d	15.07	17.21	2.140	-4.851 to 9.131

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
7 d	0.02000	0.01036	P > 0.05	ns
14 d	1.695	0.8782	P > 0.05	ns
21 d	2.140	1.109	P > 0.05	ns

CONTROL vs PLGA/PCL/BCP

Row Factor	CONTROL	PLGA/PCL/BCP	Difference	95% CI of diff.
7 d	14.70	15.67	0.9650	-6.026 to 7.956
14 d	14.96	16.87	1.910	-5.081 to

					8.901
					-4.786 to
21 d	15.07	17.28	2.205		9.196
Row Factor	Difference	t	P value		Summary
7 d	0.9650	0.5000	P > 0.05		ns
14 d	1.910	0.9896	P > 0.05		ns
21 d	2.205	1.142	P > 0.05		ns
PLGA/PCL/BCP/T vs PLGA/PCL/BCP					
Row Factor	PLGA/PCL/BCP				95% CI of
	/T PLGA/PCL/BCP	Difference			diff.
7 d	14.72	15.67	0.9450		-6.046 to
					7.936
14 d	16.65	16.87	0.2150		-6.776 to
					7.206
21 d	17.21	17.28	0.06500		-6.926 to
					7.056
Row Factor	Difference	t	P value		Summary
7 d	0.9450	0.4896	P > 0.05		ns
14 d	0.2150	0.1114	P > 0.05		ns
21 d	0.06500	0.03368	P > 0.05		ns

ANEXO 8

Análise estatística histopatologia da intensidade de inflamação

Table Analyzed	Data 1		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
	Gaussian		
Exact or approximate P value?	Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	9		
Kruskal-Wallis statistic	47,68		
	Difference in rank	Significant? P < Summar	
Dunn's Multiple Comparison Test	sum	0.05?	y
Control 15d vs PLGA/PCL/BCP/T 15d	22,00	No	ns
Control 15d vs PLGA/PCL/BCP 15d	0,0000	No	ns
Control 15d vs Control 30d	22,00	No	ns
Control 15d vs PLGA/PCL/BCP/T 30d	22,00	No	ns
Control 15d vs PLGA/PCL/BCP 30d	0,0000	No	ns
Control 15d vs Control 60d	36,17	Yes	***
Control 15d vs PLGA/PCL/BCP/T 60d	36,17	Yes	***
Control 15d vs PLGA/PCL/BCP 60d	14,67	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 15d vs PLGA/PCL/BCP 15d	-22,00	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 15d vs Control 30d	0,0000	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 15d vs PLGA/PCL/BCP/T 30d	0,0000	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 15d vs PLGA/PCL/BCP 30d	-22,00	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 15d vs Control 60d	14,17	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 15d vs PLGA/PCL/BCP/T 60d	14,17	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 15d vs PLGA/PCL/BCP 60d	-7,333	No	ns
PLGA/PCL/BCP 15d vs Control 30d	22,00	No	ns
PLGA/PCL/BCP 15d vs PLGA/PCL/BCP/T 30d	22,00	No	ns
PLGA/PCL/BCP 15d vs PLGA/PCL/BCP 30d	0,0000	No	ns
PLGA/PCL/BCP 15d vs Control 60d	36,17	Yes	***
PLGA/PCL/BCP 15d vs PLGA/PCL/BCP/T 60d	36,17	Yes	***
PLGA/PCL/BCP 15d vs PLGA/PCL/BCP 60d	14,67	No	ns
Control 30d vs PLGA/PCL/BCP/T 30d	0,0000	No	ns
Control 30d vs PLGA/PCL/BCP 30d	-22,00	No	ns
Control 30d vs Control 60d	14,17	No	ns
Control 30d vs PLGA/PCL/BCP/T 60d	14,17	No	ns

Control 30d vs PLGA/PCL/BCP 60d	-7,333	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 30d vs PLGA/PCL/BCP 30d	-22,00	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 30d vs Control 60d	14,17	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 30d vs PLGA/PCL/BCP/T 60d	14,17	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 30d vs PLGA/PCL/BCP 60d	-7,333	No	ns
PLGA/PCL/BCP 30d vs Control 60d	36,17	Yes	***
PLGA/PCL/BCP 30d vs PLGA/PCL/BCP/T 60d	36,17	Yes	***
PLGA/PCL/BCP 30d vs PLGA/PCL/BCP 60d	14,67	No	ns
Control 60d vs PLGA/PCL/BCP/T 60d	0,0000	No	ns
Control 60d vs PLGA/PCL/BCP 60d	-21,50	No	ns
PLGA/PCL/BCP/T 60d vs PLGA/PCL/BCP 60d	-21,50	No	ns

ANEXO 9

Quadro 2: Relação do compósito PLGA/PCL/BCP/T e a intensidade da resposta inflamatória em função do período experimental.

Dias		15						30						60					
Amostras		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Inflamação	Ausente													x	x	x	x		x
	Leve	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					x	
	Moderada																		
	Intensa																		

Quadro 3: Relação do compósito PLGA/PCL/BCP e a intensidade da resposta inflamatória em função do período experimental.

Dias		15						30						60					
Amostras		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Inflamação	Ausente																		
	Leve													x	x			x	x
	Moderada	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x		
	Intensa																		

Quadro 4: Relação do controle (apenas animal incisionado) e a intensidade da resposta inflamatória em função do período experimental.

Dias		15						30						60					
Amostras		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Inflamação	Ausente													x	x	x	x	x	
	Leve							x	x	x	x	x	x						x
	Moderada	x	x	x	x	x	x												
	Intensa																		

Quadro 5: Análise do tipo de células inflamatórias na região do compósito PLGA/PCL/BCP/T após 15, 30 e 60 dias.

Dia	Amostras	Infiltrado	Tipo		Macrófagos	Cel. Gigantes
			PMN	LP		
15	1	cronico escasso	-	X	X	X
	2	Crônico escasso	-	X	x	X
	3	Crônico escasso	-	X	x	X
	4	Crônico escasso	-	X	x	X
	5	cronico escasso	-	X	X	X
	6	Crônico escasso	-	X	X	X
30	1	Crônico escasso	-	X	X	X
	2	Crônico escasso	-	X	X	X
	3	cronico escasso	-	X	X	X
	4	Crônico escasso	-	X	X	X
	5	Crônico escasso	-	X	X	X
	6	Crônico escasso	-	X	X	X
60	1	ausente	-	-	-	-
	2	ausente	-	-	-	-
	3	ausente	--	-	-	-
	4	ausente	-	-	-	-
	5	Crônico escasso	-	X	X	X
	6	ausente	-	-	-	-

Quadro 6: Análise do tipo de células inflamatórias na região do compósito PLGA/PCL/BCP após 15, 30 e 60 dias.

Dia	Amostras	Infiltrado	Tipo		Macrófagos	Cel. Gigantes
			PMN	LP		
15	1	Crônico moderado	-	X	X	X
	2	Crônico moderado	-	X	X	X
	3	Crônico moderado	-	X	X	X
	4	Crônico moderado	-	X	X	X
	5	Crônico moderado	-	X	X	X
	6	Crônico moderado	--	X	X	X
30	1	Crônico moderado	-	X	X	X
	2	Crônico moderado	-	X	X	X
	3	Crônico moderado	-	X	X	X
	4	Crônico moderado	-	X	X	X
	5	Crônico moderado	-	X	X	X
	6	Crônico moderado	-	X	X	X
60	1	Crônico escasso	-	X	X	X
	2	Crônico escasso	-	X	X	X
	3	Crônico moderado	-	X	X	X
	4	Crônico moderado	-	X	X	X
	5	Crônico escasso	-	X	X	X
	6	Crônico escasso	-	x	x	X

Quadro 7: Análise do tipo de células inflamatórias na região da incisão após 15, 30 e 60 dias.

Dia	Amostras	Infiltrado	Tipo		Macrófagos	Cel. Gigantes
			PMN	LP		
15	1	Crônico moderado	-	X	X	-
	2	Crônico moderado	-	X	X	-
	3	Crônico moderado	-	X	X	-
	4	Crônico moderado	-	X	X	-
	5	Crônico moderado	-	X	X	-
	6	Crônico moderado	-	X	X	-
30	1	Crônico escasso	-	X	X	-
	2	Crônico escasso	-	X	X	-
	3	Crônico escasso	-	X	X	-
	4	Crônico escasso	-	X	X	-
	5	Crônico escasso	-	X	X	-
	6	Crônico escasso	-	X	X	-
60	1	ausente	-	X	X	-
	2	Ausente	-	X	X	-
	3	Ausente	-	X	X	-
	4	Ausente	-	X	X	-
	5	ausente	-	X	X	-
	6	Crônico Escasso	-	X	x	-

ANEXO 10

Certificado CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 304 / 2012, relativo ao projeto intitulado “Avaliação do potencial osteogênico do compósito PLGA/PCL/Fosfato de cálcio bifásico/Testosterona in vitro e in vivo”, que tem como responsável Maria Esperanza Cortes Segura, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 06/11/2012. Este certificado espira-se em 06/11/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 304 / 2012, related to the Project entitled “Evaluation of the osteogenic potential of the composite PLGA/PCL/Biphasic Calcium Phosphate/Testosterone in vitro and in vivo”, 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 (CEUA/UFMG), and was approved in 06/11/2012. This certificates expires in 06/11/2017.

Renata Adriana Labanca de Almeida Santos
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 06/11/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 200531270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 11

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS RELACIONADAS À TESE

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E CURSOS

1. Seminário Prof Adolfo Contreras Rengifo, PhD da Universidad Del Valle–Colombia. Faculdade de Odontologia. 2012.
2. I Simpósio Brasileiro de Sinalização de Cálcio Bioquímica e Fisiologia Celulares. Belo Horizonte-MG. UFMG. 2012.
3. Modelos Experimentais de Absorção e Permeabilidade. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil. 2011.
4. Congresso Internacional de Odontologia de Minas Gerais. 2011. (Congresso).
5. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. Avaliação da proliferação e diferenciação de osteoblastos cultivados em compósitos de PCL, PLGA, biocerâmica e testosterona. 2011. (Congresso).
6. XIII Reunião da Sociedade Nordeste-Norte de Pesquisa Odontológica. 2011. (Congresso).
7. XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG. Avaliação in vitro da atividade osteogênica da testosterona em compósitos poliméricos biodegradáveis e fosfato de cálcio bifásico. 2011. (Encontro).
8. III Semana de Biologia Celular - Profª Walderez Ornelas Dutra. 2010. (Encontro).
9. Citometria de Fluxo na Comunicação Celular. (Carga horária: 4h). III Semana de Biologia Celular - Profª Walderez Ornelas Dutra. 2010.
10. Cultura Celular em duas e três dimensões. (Carga horária: 4h). III Semana de Biologia Celular - Profª Walderez Ornelas Dutra. 2010.
11. Células Tronco Embrionárias. (Carga horária: 4h). III Semana de Biologia Celular - Profª Walderez Ornelas Dutra. 2010.

PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE COMISSÃO JULGADORA

1. **COSTA, K. J. R.** 1º Encontro de Casos Clínicos - Avaliação de Painéis. 2011. Universidade Federal de Minas Gerais.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ARTIGOS PUBLICADOS

1. **COSTA, KELEN JORGE RODRIGUES**; PASSOS, JOEL J.; GOMES, ALINNE D. M.; SINISTERRA, RUBÉN D.; LANZA, CÉLIA R. M.; CORTÉS, MARIA ESPERANZA. Effect of testosterone incorporation on cell proliferation and differentiation for polymer bioceramic composites. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* (Dordrecht. Online), v. 23, p. 2751-2759, 2012.
2. DENADAI, ÂNGELO M.L.; DE OLIVEIRA, ANDRÉ M.; DANIEL, IZABELA M.P.; CARNEIRO, LUAN A.; RIBEIRO, KHEROLAYNE C.; BERALDO, HELOÍSA DE O.; **DA COSTA, KELEN J.R.**; DA CUNHA, VIVIANNE C.; CORTÉS, MARIA E.; SINISTERRA, RUBÉN D. Chlorhexidine/losartan ionic pair binding and its nanoprecipitation: physico-chemical characterisation and antimicrobial activity. *Supramolecular Chemistry* (Print), v. 1, p. 1-10, 2011.

ARTIGO SUBMETIDO

1. **COSTA, KELEN JORGE RODRIGUES DA**; PASSOS, JOEL J; SINISTERRA, RUBÉN D; LANZA, CÉLIA R M; CORTÉS, MARIA E. Testosterone incorporation improves the osteogenic potential of the polymer-bioceramic composite. *Acta biomaterialia*.

RESUMOS PUBLICADOS

1. **COSTA, K. J. R.** ; TRAJANO VCC ; GALA-GARCÍA A ; SINISTERRA, R. D. ; LANZA CRM ; CORTES, M. E. . Avaliação da proliferação e diferenciação de osteoblastos cultivados em compósitos de PCL, PLGA, biocerâmica e testosterona. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2011, Águas de Lindóia-SP. *Brazilian Oral Research*. São Paulo, 2011. v. 25. p. 334-334.
2. TRAJANO VCC ; **COSTA, K. J. R.** ; PASSOS, J. J. ; SINISTERRA, R. D. ; CORTES, M. E. . Scaffolds de doxiciclina: caracterização e citocompatibilidade. In: Congresso Internacional de Minas Gerais, 2011, Belo Horizonte-MG. *CIOMIG 2011*, 2011.
3. **COSTA, K. J. R.** ; TRAJANO VCC ; SINISTERRA, R. D. ; CORTES, M. E. . Characterization and Cytocompatibility of Doxycycline Composite Scaffolds. In: Society for Biomaterials 2011 Annual Meeting & Exposition, 2011, Orlando, Florida. *Society for Biomaterials 2011 Annual Meeting & Exposition*, 2011. v. XXXIII.
4. **COSTA, K. J. R.** ; GALA-GARCÍA A ; LANZA CRM ; CORTES, M. E. . Avaliação in vitro da atividade osteogênica da testosterona em compósitos de polímeros biodegradáveis e fosfato de cálcio bifásico. In: XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2011, Belo Horizonte-MG. *XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG*, 2011.

5. GALA-GARCÍA A ; **COSTA, K. J. R.** ; CORTES, M. E. . Avaliação da viabilidade, aderência e produção de citocinas de macrófagos frente ao compósito biocerâmica/PLGA. In: XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2011, Belo Horizonte. XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2011.

6. **COSTA, K. J. R.** ; CORTES, M. E. . Avaliação in vitro do potencial osteogênico do compósito de PLGA e biocerâmica osteosynt com liberação de vitamina D3 1,25 dihidroxi. In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2010, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research. São Paulo, 2010. v. 24. p. 35-35.

7. Teixeira LP ; MACEDO, F. A. F. F. ; Gontijo SML ; **COSTA, K. J. R.** ; TEIXEIRA, K. I. R. ; SINISTERRA, R. D. ; PASSOS, J. J. ; CORTES, M. E. . Avaliação celular de compósitos poliméricos biodegradáveis em matriz de biocerâmica com adição de tetraciclina. In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2010, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research. São Paulo, 2010. v. 24. p. 62-62.

8. Angelo Denadai ; PAMPOLINI, I. M. ; RIBEIRO KC ; **COSTA, K. J. R.** ; Vivianne Cunha ; CORTES, M. E. ; SINISTERRA, R. D. . Losartanato de Clorexidina: uma proposta de sistema nanoparticulado de liberação controlada por dissociação iônica. In: Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Viçosa-MG. Sociedade Brasileira de Química, 2010.

9. **COSTA, K. J. R.** ; PASSOS, J. J. ; Gomes ADM ; LANZA CRM ; SINISTERRA, R. D. ; CORTES, M. E. . In vitro evaluation of osteogenic activity of testosterone associated to composites of biodegradable polymers into bioceramic matrix. In: Fall Meeting Materials Research Society, 2010, Boston-MA. MRS, 2010.

APRESENTAÇÃO ORAL EM EVENTOS

1. TRAJANO, V.C.C.; **COSTA, K.J.R.**; CORTES, M.E. Compósitos de Doxíclicina: Caracterização e Citocompatibilidade. I Simpósio Brasileiro de Sinalização de Cálcio.2012.

2. **COSTA, K. J. R.** ; GALA-GARCÍA A ; LANZA CRM ; CORTES, M. E. . Avaliação in vitro da atividade osteogênica da testosterona em compósitos de polímeros biodegradáveis e fosfato de cálcio bifásico. 2011. XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG.

3. **COSTA, K. J. R.** ; TRAJANO VCC ; GALA-GARCÍA A ; SINISTERRA, R. D. ; LANZA CRM ; CORTES, M. E. . Avaliação da proliferação e diferenciação de osteoblastos cultivados em compósitos de PCL, PLGA, biocerâmica e testosterona. 2011. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

ATIVIDADE PROFISSIONAL

UFMG

1. Professora Substituta do Departamento de Odontologia Restauradora nas disciplinas Materiais Dentários I e II em regime de Dedicção Exclusiva no período de Fevereiro a Julho de 2012.