

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

Alexandre da Silveira Gerzson

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE, ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E FIBROBLASTOS
NIH3T3 CULTIVADAS EM MATRIZ DE PLGA COM rhGH.**

Porto Alegre

2016

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE, ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E FIBROBLASTOS
NIH3T3 CULTIVADAS EM MATRIZ DE PLGA COM rhGH.**

Autor: Alexandre da Silveira Gerzson

Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2016

Catálogo na Publicação

G388a Gerzson, Alexandre da Silveira

Avaliação da viabilidade, adesão e proliferação de células tronco da medula óssea e fibroblastos NIH3T3 cultivadas em matriz de PLGA com RHGH / Alexandre da Silveira Gerzson. – Porto Alegre, 2016.
68 p.

Tese (Doutor) – Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

1. Materiais Biocompatíveis. 2. Polímeros.
3. Hormônio do Crescimento. 4. Odontologia.
I. Pagnoncelli, Rogério Miranda. II. Título.

CDD 617.695

Bibliotecária Responsável: Salete Maria Sartori, CRB 10/1363

Agradecimentos.

À minha esposa, Darlene Ribeiro Gerzson, pelo apoio incondicional, compreensão e amor, ao longo destes 13 anos de convivência, sendo quase 7 anos de casamento, parceira de Odontologia e de vida.

Aos meus pais, Cremilda e Volmar, pelo grande incentivo durante toda a minha vida aos estudos, obrigado por todas as oportunidades.

Aos meus familiares, colegas e amigos, por estarem presentes, apoiando e incentivando meus objetivos profissionais e pessoais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli, por toda ajuda, compreensão e conselhos durante esse período de pós graduação, acredito ter crescido durante nossa convivência.

À Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado, pela participação e apoio, fundamentais na execução dessa pesquisa e pela disponibilização da utilização do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS.

À Prof. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira, pelo incentivo e estímulo na realização de meu doutorado.

À Rafaela Radomski da Silva, por todos os testes realizados, dedicação e disponibilidade na realização deste trabalho.

Ao Daniel Marinovic, por todas as sugestões, reuniões e auxílio na execução deste trabalho.

À Cristhiane Alvin Valente, pela disponibilidade, auxílio na confecção das matrizes, etapa fundamental para nossos resultados.

À Prof. Dra. Nara Regina de Souza Basso, por juntamente com o Daniel e a Cristhiane, me ajudar no planejamento de importante etapa do experimento, momento de extrema relevância na execução desta pesquisa.

À Prof. Dra. Rosane Ligabue, obrigado pelo apoio e consultoria ao longo deste trabalho, e pela disponibilização da utilização do Laboratório de Resinas e Organometálicos (LOR/PUCRS).

Ao laboratório Central de Microscopia Eletrônica e Microanálise IDÉIA - PUCRS, especialmente ao Wagner Prates pelo auxílio na preparação e análise das amostras.

À todos os professores do PPPGO/PUCRS, aqui representados pela Prof. Dra. Ana Spohr.

À todos os professores, funcionários e alunos da faculdade de Odontologia da PUCRS, aqui representados pelo Diretor Prof. Dr. Alexandre Bahlis.

Aos colegas de pós-graduação da PUCRS, especialmente à Aline Duarte, Fernanda Boing, Ricardo Garcia, Fernando Antonini e Henrique de Oliveira.

Muito Obrigado !

Resumo.

Biomateriais como alternativas ao osso autógeno e outros tecidos biológicos, são muito utilizados no tratamento de pacientes na rotina cirúrgica da região maxilofacial. Neste contexto, um biomaterial com características de arcabouço (osteocondutor), e associado à um fator de crescimento (osteoindutor), seria de grande interesse para pesquisa e aplicação clínica. Polímeros biodegradáveis, utilizados para a liberação lenta de medicamentos, vem sendo estudados, demonstrando bons resultados e interessante potencial. O rhGH pode ser liberado através da sua incorporação à estes polímeros. Desta forma, se faz necessário a avaliação da biocompatibilidade e toxicidade de um biomaterial polimérico para liberação lenta do medicamento.

Através da técnica de evaporação de solvente foram preparados matrizes de PLGA e PLGA/PCL na razão 70/30 de PLGA e PCL, respectivamente, associados ou não ao rhGH. Os biomateriais foram testados relacionados à sua toxicidade e viabilidade celular, através de um ensaio de MTT com células de camundongo NIH 3T3 ATCC. A avaliação da toxicidade celular foi realizada nos tempos de 24 horas, 48 horas, 72 horas e 7 dias de exposição dos biomateriais com o meio de cultura. Após, os biomateriais foram testados relacionados à sua adesão e proliferação celular, através do cultivo em células-tronco mesenquimais de rato Wistar, com ensaio de coloração DAPI e posterior contagem celular, além de microscopia eletrônica de varredura. A avaliação da adesão e proliferação celular foi realizada nos tempos de 24 e 72 horas de exposição dos biomateriais com o meio de cultura.

Todos os polímeros testados apresentaram altas taxas de viabilidade celular, porém, os grupos associados ao rhGH parecem demonstrar melhores resultados do que os grupos de polímeros sem associação ao hormônio quando comparados ao grupo controle em alguns períodos do experimento. O que pode sugerir uma preferência das células à presença do rhGH no biomaterial presente no meio de cultura, principalmente na matriz

de PLGA. Os polímeros testados, apresentaram adesão e proliferação celular, porém, os biomateriais à base de PLGA, principalmente associados ao rhGH pareceram demonstrar maior proliferação celular quando avaliada a diferença do crescimento de 24 para 72 horas. O GH modificou a superfície do polímero, aumentando a rugosidade e microporosidade. Aspecto visualizado principalmente quando incorporado ao PLGA. Mais estudos são necessários para verificar alternativas de novos biomateriais para liberação lenta de fármacos.

Palavras Chaves (DeCS): Materiais biocompatíveis, hormônio do crescimento, polímeros

Abstract.

Biomaterials, as an alternative to autogenous bone and other biological tissues, have been widely used in oral and maxillofacial surgery. In this context, a biomaterial that functions as a scaffold (osteoconductor), combined with a growth factor (osteoinductor), would be of great interest for clinical application. Biodegradable polymers used for slow drug release have been investigated, demonstrating good results and interesting potential. Growth hormone (rhGH) may be released by incorporating it into these polymers. This study aimed to evaluate cell adhesion and proliferation of a polymeric biomaterial for slow release of rhGH.

PLGA and PLGA/PCL (at a 70/30 ratio of PLGA to PCL) matrices were prepared by the solvent evaporation method, combined or not with GH. The biomaterials were tested for toxicity and cell viability using an MTT assay with NIH3T3 mouse cells (ATCC). Cell toxicity was assessed at 24, 48, 72 hours, and 7 days of biomaterial exposure to culture medium. After were tested for cell adhesion and proliferation by culture in mesenchymal stem cells derived from Wistar rat bone marrow, DAPI staining, and subsequent cell counting, in addition to scanning electron microscopy. Cell adhesion and proliferation was assessed at 24 and 72 hours of biomaterial exposure to culture medium.

All polymers had high cell viability rates. However, from 48 hours onwards, the groups with rhGH-polymer combinations had better results than the polymer groups without association with GH when compared to the control group. At 7 days of culture, only the pure PLGA matrix showed a significant difference from the control group. These results may suggest a preference of cells for the presence of rhGH in the biomaterial in culture medium especially in the PLGA matrix. GH appeared to contribute to the increase in cell viability observed at some assessment time points, especially when combined with PLGA as compared to pure PLGA. All tested polymers exhibited cell adhesion and proliferation. However, PLGA-based biomaterials, especially when combined with rhGH, showed

greater cell proliferation when the difference in growth from 24 to 72 hours was evaluated. rhGH appeared to modify the polymer surface, with increased roughness and microporosity. This feature was more evident in the PLGA+rhGH combination. Further studies are required to clarify this potential for development of new biomaterials.

Keywords (MeSH): Biocompatible materials, growth hormone, polymers, PLGA.

Lista de Ilustrações e tabelas.

Artigo 1 - Avaliação da viabilidade de células de fibroblastos NIH3t3 cultivadas em matrizes poliméricas com rhGH.

Figuras 1A e 1B. Matrizes puras de PLGA e PLGA/PCL e Matrizes de PLGA e PLGA/PCL com GH após processo de produção. ————— **31**

Gráfico 1. Porcentagens de viabilidade celular dos grupos testados em 24,48,72 horas e 7dias. ————— **34**

Tabela 1. Tabela comparativa da viabilidade entre os grupos às 24horas ————— **34**

Tabela 2. Tabela comparativa da viabilidade entre os grupos às 48 hs. ————— **35**

Tabela 3. Tabela comparativa da viabilidade entre os grupos às 72 hs. ————— **36**

Tabela 4. Tabela comparativa da viabilidade entre os grupos às 7 dias. ————— **36**

Artigo 2 - Avaliação da adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais da medula óssea em matriz Polimérica com rhGH.

Tabela 1. Tabela comparativa da proliferação celular dentro dos grupos ao longo do tempo. ————— **53**

Tabela 2. Tabela comparativa do delta e do percentual de mudança entre os grupos.— **54**

Figura 1. Imagens da microscopia, demonstrando a adesão celular sobre o arcabouço polimérico e as contagens dos núcleos celulares, através do Image Pro Plus®, em 24hs e 72hs. ————— **55**

Figura 2. Características do arcabouço polimérico em aumento de 5.000x, no período de 24 horas. ————— **57**

Figura 3. Adesão celular das células-tronco mesenquimais no arcabouço polimérico em aumento de 1.000x, no período de 72 horas. ————— **58**

Lista de símbolos, abreviações e siglas.

GFs - Fatores de crescimento.

GH ou rhGH - Hormônio do crescimento Humano.

PLA - Ácido polilático.

PLGA - Ácido glicólico polilático.

PLA - Ácido poli lático.

PGA - Ácido poli glicólico.

ROG - Regeneração óssea guiada.

PCL - Policaprolactona.

FDA - Food and Drug Administration.

rhBMP-2 - Proteína óssea morfogenética

® - Registrado

ATCC - American Type Culture Collection

DMEM - do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Media

PBS - Do inglês *Phosphate Buffer Solution*

DMSO - Dimetil sulfóxido

MTT - do inglês - (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

DO - Densidades Óticas

DAPI - Coloração. 4',6-diamino-2-phenylindole

HA - Hidroxiapatita

TCP - Tricálcio fosfato

βTCP - Beta tricálcio fosfato

g - Grama

mg- Miligrama

µg - Micrograma

mL - Mililitros

θ - diâmetro

ISO - Do inglês *International Organization for Standardization*

cm² - Centímetros quadrados

CEUA - Comitê de ética no uso de animais

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Su

SUMÁRIO

Introdução e Revisão da literatura	12
Justificativa do estudo	20
Objetivos	22
Hipótese	23
Artigo científico 1	24
"Avaliação da viabilidade de células de fibroblastos NIH3t3 cultivadas em matrizes poliméricas com rhGH."	
Resumo	25
Abstract	26
Introdução	27
Material e métodos	29
Resultados	33
Discussão	36
Conclusão	39
Artigo científico 2	43
"Avaliação da Adesão e Proliferação de Células Tronco da Medula Óssea Em Matriz Polimérica com rhGH."	
Resumo	44
Abstract	46
Introdução	47
Material e métodos	48
Resultados	52
Discussão	59
Conclusão	61
Considerações finais	65

1. Introdução e revisão da literatura.

Procedimentos para o aumento ou manutenção de tecido ósseo podem ser requeridos no tratamento de perdas ósseas em traumas bucomaxilofaciais, lesões periodontais, lesões císticas, enxertos ósseos e preparação de leito para colocação de implantes. ¹

Um biomaterial que tenha a maior semelhança possível com o tecido ósseo, seria de grande benefício para tratamentos com necessidade de enxertos ósseos, pois as vantagens inerentes do osso autógeno estariam associadas a menor morbidade, disponibilidade de grandes quantidades de material e maior aceitação pelo paciente. Neste contexto, os fatores de crescimento surgem como uma excelente alternativa para a osteoindução em biomateriais.

Os enxertos autógenos ainda são considerados os melhores devido a sua capacidade osteogênica, osteoindutora e osteocondutora. Mesmo causando maior morbidade pós-operatória e, apresentando limite quanto à quantidade de osso disponível, ainda é considerado o melhor material para reconstruções ósseas nos maxilares sendo considerado “padrão ouro”. ³ Apesar de perder sua vitalidade celular, sofre revascularização e se incorpora ao sítio receptor, permitindo a instalação de implantes dentários. ⁴

Os enxertos ósseos segundo Carvalho e colaboradores (2004) devem possuir as seguintes propriedades: ²

- Não induzir a formação de trombos como resultado do contato entre o sangue e o enxerto ósseo;
- Não induzir resposta imunológica adversa;
- Não ser carcinogênico;
- Não ser tóxico;

- Não produzir resposta inflamatória aguda ou crônica;
- Não perturbar o fluxo sanguíneo.

Moléculas osteoindutoras são caracterizadas por sua habilidade em promover a formação óssea. As moléculas osteoindutoras, em sua grande parte, são citocinas, as quais constituem proteínas extracelulares ou peptídeos que intermedeiam a sinalização de uma célula para outra. As proteínas morfogenéticas ósseas e alguns fatores de crescimento e diferenciação celulares são exemplos de citocinas osteoindutoras. ⁵

Dentre os fatores de crescimento (GFs), destaca-se o hormônio do crescimento (GH-growth hormone), que é um regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal e do remodelamento ósseo. Na infância e puberdade, há um grande aumento na massa óssea via formação óssea endocondral. Observa-se ainda um aumento gradual na massa óssea até ocorrer o pico de massa óssea, em torno dos 20- 30 anos de idade. Subsequentemente, a massa óssea vai diminuindo, de maneira acelerada nas mulheres após a menopausa. O remodelamento ósseo é regulado pelo balanço entre a reabsorção e a formação óssea. Nesse processo, o rhGH tem um papel fundamental. O rhGH exerce efeito sobre os osteoclastos e mais acentuadamente sobre os osteoblastos, criando a base teórica para o seu possível efeito de anabolismo no esqueleto. ^{6, 7, 8, 9, 10,11,12}

Estudos com biomateriais estão sendo desenvolvidos com o objetivo de auxiliar na regeneração tecidual em sítios específicos. Os polímeros biodegradáveis como o PLA (ácido polilático), o PLGA (ácido glicólico polilático) e a PCL (policaprolactona) estão sendo testados com boas perspectivas, estes polímeros são uma interessante opção de matriz para liberação de substâncias. Diversos fármacos são utilizados para serem liberadas nesses sistemas, como antibióticos, anticoncepcionais e proteínas, neste raciocínio, podemos incluir o hormônio do crescimento humano. ^{13,14}

Tendo em vista a necessidade de criação de um substituto ósseo ideal, com propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, de fácil manipulação e que seja

absorvido em tempo compatível na formação óssea com manutenção da mesma, novas pesquisas estão sendo desenvolvidas.

Biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética que têm sido desenvolvidas para serem usadas na restauração ou substituição de órgãos, tecidos ou funções do corpo humano. Esses produtos não devem provocar qualquer resposta biológica adversa, seja ela local ou sistêmica.^{15,16} Estes produtos não devem produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, e apresentam diversas vantagens já citadas. Desta forma, deve ser atóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico.¹⁷

Os biomateriais representam grande parte dos tratamentos com enxertos ósseos em cirurgias bucomaxilofaciais, neste raciocínio, os polímeros podem apresentar grande potencial de uso, pois além de boas possibilidades de produção, apresentam principalmente, características mecânicas semelhantes aos materiais biológicos.^{17,18}

1.1 Polímeros biodegradáveis.

Diversos polímeros e copolímeros podem ser utilizados na preparação de matrizes absorvíveis que funcionam como arcabouços osteocondutores, entre eles, o PLGA e o PCL (policaprolactona). A combinação de diferentes polímeros ou diferentes formas do mesmo polímero, obtendo materiais com diferentes propriedades químicas e mecânicas, e que são degradados em diferentes períodos de tempo, podem causar diferentes reações inflamatórias no sítio receptor. O número destes materiais utilizados como carreadores de substâncias aumentou drasticamente na última década, devido à capacidade de funcionar como veículo de liberação de substâncias.^{18,19,20,21}

1.2 Ácido glicólico polilático (PLGA).

O PLGA é um copolímero de poli ácido láctico (PLA) e de poli ácido glicólico (PGA), é considerado um dos mais atraentes candidatos poliméricos usados para fabricar dispositivos para a entrega de drogas e em aplicações na engenharia tecidual, entre suas características podemos destacar ser biocompatível e biodegradável, possuir uma ampla gama de tempos de erosão, ajustáveis propriedades mecânicas e possuir a aprovação da FDA (Food and Drug Administration). Em particular, o PLGA tem sido estudado para o desenvolvimento de dispositivos para liberação controlada de medicamentos de pequenas moléculas, proteínas e outras macromoléculas em uso comercial e em pesquisa.²²

O PLGA apresenta degradação lenta e propriedade de osteocondução, demonstrada pela proliferação de células de medula óssea humana. Além disso é possível realizar diversos desenhos de acordo com a utilidade desejada em engenharia tecidual, o que é de grande interesse da área farmacêutica.^{13,18, 22} É definido como um dos melhores biomateriais disponíveis para a entrega de biofármacos no que diz respeito ao seu desenho estrutural e desempenho.²² É um polímero relativamente hidrofóbico, instável em condições de umidade e biodegradável, sofrendo hidrólise para produzir monômeros de ácido láctico e glicólico, que são degradados nas mitocôndrias pelo ciclo de Krebs.¹⁴

Além de ser processado em diversos formatos, pode encapsular moléculas de qualquer tamanho. É solúvel em uma gama variada de solventes, incluindo os solventes a base de cloro, tetrahidrofurano, acetona ou acetato de etila.²³

A mudança das propriedades, tais como peso molecular, porcentagem de PLA e PGA, do PLGA durante sua biodegradação influencia as taxas de liberação e degradação da droga incorporada. O PLGA tem propriedades físicas próprias que dependem de inúmeros fatores, incluindo o peso molecular inicial, a proporção de láctico para glicólido, o

tamanho do dispositivo, a exposição à água e de armazenamento. A resistência mecânica do PLGA é afetada pelas propriedades físicas, tais como peso molecular e índice de polidispersão. Essas propriedades também afetam a capacidade de ser formulado como um dispositivo de entrega de biofármacos e podem controlar a taxa de degradação do dispositivo e hidrólise. Além disso, estudos recentes revelaram que o tipo de droga também desempenha um papel na determinação da velocidade de liberação.^{22,23}

A composição do polímero é um dos aspectos mais importantes para se determinar as características hidrofílicas e/ou hidrofóbicas e o índice de degradação da matriz do polímero. Estudos sobre a composição dos polímeros utilizados para este fim demonstraram a degradação destes em diversos grupos.¹⁷ Os resultados mostram que o aumento do percentual de ácido glicólico acelera a perda de peso e acelera a degradação do polímero. Uma matriz de PLGA construída em uma proporção de 50% de PLA e 50% de PGA (PLGA 50:50) demonstra uma degradação mais rápida que uma matriz de PLGA 65:35, devido a hidrofiliabilidade do PGA, o que causa uma degradação mais rápida nos polímeros com maior concentração de PGA. Conseqüentemente, o PLGA 65:35 possui degradação mais rápida que o PLGA 75:25, e assim por diante, sendo o PLGA de 85:15 de degradação mais lenta. Assim, o índice de degradação é acelerado com o aumento da proporção de PGA na composição do polímero, pois a quantidade de ácido poli-glicólico é um importante aspecto para se customizar as características hidrofílicas da matriz e assim influenciar a velocidade de degradação e conseqüentemente o padrão de liberação de fármacos.^{24,25}

1.3 Policaprolactona (PCL).

Assim como o PLGA, a policaprolactona têm sido um dos polímeros bastante estudados ao longo da última década, como matriz de liberação de substâncias. A PCL, degrada muito mais lentamente que outros polímeros biodegradáveis conhecidos, entre

eles o PLGA, o que a torna uma das mais interessantes opções na liberação lenta de fármacos.²⁶

Apresenta alta flexibilidade e cristalinidade, que garantem um processo de degradação relativamente lento quando implantada em sistemas biológicos. Esse polímero pode conter grupos terminais hidroxílicos ou vinílicos dependendo do mecanismo de polimerização, podendo ser incorporado à rede de sílica. A Policaprolactona, pertence aos poliésteres alifáticos e é conhecida, em geral, por ser compatível com a viabilidade e o crescimento celular, sendo atóxica e utilizada na liberação de fármacos. Este polímero ainda apresenta baixa viscosidade, propriedade que concede ao polímero a característica de boa processabilidade. Apresenta boas propriedades mecânicas como tenacidade e flexibilidade além de possuir uma grande miscibilidade com muitos tipos de polímeros.^{27,28,29}

A PCL, é encontrada também em polímeros mistos com o PLGA, com o objetivo de facilitar a adesão de osteoblastos. Os diferentes arcabouços criados para o crescimento celular podem possuir diferentes rugosidades na superfície do biomaterial, o que influencia diretamente na adesão e proliferação celular. Identificar quais características das superfícies têm relacionamentos íntimos com molhabilidade e adesão celular, podem ser interessantes. O PLGA, na proporção de 65:35, adicionado ao filme polimérico de PCL, em proporção 30% de PLGA e 70% de PCL, com o objetivo de modificar a morfologia do polímero. Tal situação tem sido utilizada para melhorar a adesão e proliferação de osteoblastos humanos.^{26,28}

O PLGA apresenta maior potencial de crescimento de células ósseas quando comparada à PCL, que pode ser considerada um polímero não osteogênico. A

incorporação de PLGA em matrizes de PCL, pode ser promissor no crescimento de células osteoblásticas.³⁰

1.4 Hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH).

O hormônio do crescimento humano (rhGH) é um peptídeo com 191 aminoácidos secretado pela glândula pituitária anterior, que estimula o processo de crescimento, atuando como um regulador metabólico e mitogênico. Esse hormônio afeta o desenvolvimento de vários órgãos e tecidos como o fígado, os rins, os músculos e os ossos. Seus efeitos são mediados principalmente pelo fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), um peptídeo de setenta aminoácidos que é sintetizado em quase todos os tecidos, mas fundamentalmente no fígado e no tecido condral sob estimulação do rhGH.^{31,32,33,34}

Dentre as principais ações metabólicas do rhGH destacam-se o aumento do anabolismo de proteínas, do catabolismo de ácidos graxos e a redução da utilização de glicose como fonte de energia. Assim, esse hormônio, é um poupador de aminoácidos. No tecido ósseo, observa-se que a sua ação promove a deposição aumentada de proteínas pelos condrócitos em osteoblastos.¹²

O rhGH é uma das substâncias que regulam o crescimento e a remodelação óssea, podendo também atuar como um fator de crescimento produzido localmente, sendo secretado por vários tipos de células, exercendo efeitos endócrinos, assim como parácrinos e autócrinos. O rhGH é capaz de estimular o crescimento ósseo por meio da estimulação direta dos condrócitos e dos osteoblastos, tanto in vivo como in vitro.^{32, 34}

Foi observado em estudos passados, que a administração local do GH, quando liberado a partir de um biomaterial carreador tipo fosfato, é capaz de melhorar o processo

de substituição do biomaterial por osso, pela aceleração do processo de remodelação óssea.³⁵ Avaliou-se também, em outro estudo, que a administração local do GH, como uma dose única no momento cirúrgico do implante, pode acelerar o processo de osseointegração.³¹

O tratamento com rhGH está indicado em todo indivíduo que apresentar deficiência da produção deste pela hipófise, independentemente da faixa etária. O médico endocrinologista pode utilizar o tratamento com o hormônio, de forma benéfica, em situações de deficiência hormonal com início na infância (nanismo hipofisário) ou na vida adulta, em consequência de alguma alteração sistêmica ou após um tumor na hipófise por exemplo, entre outras situações. O tratamento com rhGH é feito por meio de injeções diárias, aplicadas ao deitar, por via subcutânea ou por inalador nasal. Quando bem indicado e sob orientação médica é bem tolerado, sem maiores complicações ou efeitos adversos.^{8,10}

Como consideração geral, hormônios utilizados em níveis fisiológicos produzem efeitos benéficos com poucos efeitos adversos. Em casos de suplementação com rhGH, em altas doses e por longos períodos de tempo, pode-se induzir à acromegalia, à hipoglicemia, à disfunção hepática e à trigliceridemia aumentada¹⁰. Mas em nenhum dos estudos experimentais para uso em Odontologia tem-se relatado tais efeitos, pois, a utilização do hormônio seria associado com um biomaterial, em dose única e de aplicação local, o que reduz ainda mais o risco de efeitos adversos.³⁴

Nos últimos anos, várias substâncias têm sido usadas para melhorar a resposta do reparo ósseo em enxertos ósseos e na osseointegração. Proteína morfogenética (rhBMP2), fatores de crescimento e, mais recentemente hormônios, tais como, o rhGH. Autores demonstraram que o uso local de rhGH foi capaz de melhorar a resposta óssea

em implantes colocados em tíbias de coelho jovem em um nível estatisticamente significativo.³¹

Em estudo de 2009, autores mostraram que a aplicação tópica de 4UI de rhGH na superfície de implantes apresentou um aumento na formação óssea. Isso pode ser interpretado como um efeito direto do hormônio em células progenitoras mesenquimais, estimulando linhagens de osteoblastos. Sugere-se que o efeito positivo se dá durante o processo de integração óssea precoce. Assim, a possibilidade de aplicação do rhGH, no momento da inserção dos implantes, poderia potencializar a previsibilidade do tratamento. Ainda, há a necessidade de avaliar no caso de rhGH, o seu uso na presença de doença periodontal.³⁶

2. Justificativa do estudo.

A necessidade de desenvolvimento de materiais que substituam de forma cada vez mais semelhante o osso autógeno, é de grande interesse em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

O uso de substitutos ósseos, xenógenos e aloplásticos associados ao uso ou não de membranas absorvíveis com o objetivo de barreira em enxertos ósseos de seio maxilar, preservação de alvéolo pós-exodontia, regeneração óssea guiada (ROG) e como materiais de preenchimento em implantes imediatos pós exodontia, estão bem documentados na literatura com indicações e resultados previsíveis. ^{37,38,39,40,41,42,43} Porém, os biomateriais de forma geral, não reúnem todas as características desejáveis da neoformação óssea, uma vez que a osteogênese somente estaria presente no osso autógeno. A presença da osteocondução e da osteoindução, tornariam o biomaterial mais próximo de uma formação óssea previsível e com bons resultados.

A osteoindução parece ser o futuro no desenvolvimento de biomateriais em Odontologia. Existem poucos estudos utilizando o rhGH associado ao PLGA e outros polímeros em um tecido biológico, aplicados à cirurgias na região bucomaxilofacial. A possibilidade de termos osteocondução e osteoindução em um único biomaterial seria de grande potencial para aplicação clínica. Desta forma, considera-se, então, pertinente a realização de um estudo para esclarecer estas questões de pesquisa.

3. Objetivos.

Os objetivos da pesquisa são:

1. Avaliar a viabilidade celular do biomaterial-teste (Matriz de PLGA associada ou não ao rhGh, matriz de PLGA/PCL associada ou não ao rhGh) em um meio de fibroblastos NIH3T3;
2. Avaliar a capacidade do biomaterial-teste (Matriz de PLGA associada ou não ao rhGh, matriz de PLGA/PCL associada ou não ao rhGh) em promover a adesão e proliferação celular de células tronco da medula óssea.

4. Hipóteses.

1. Os diferentes biomateriais-teste, apresentam viabilidade celular para serem utilizados em um meio biológico.

2. Os biomateriais-teste permitem a adesão celular, e quando associados ao rhGH aumentam a proliferação celular.

5. Artigo científico I.

Submetido ao Journal Clinical Oral Implants Research. Qualis A2 e fator de impacto de 3.889. Anexo 1

Avaliação da viabilidade de células de fibroblastos NIH3t3 cultivadas em matrizes poliméricas com rhGH.

Assessment of the viability of NIH3T3 fibroblast cells cultured in polymer matrices with rhGH

Running title: Cell viability in polymer matrices with rhGH

Alexandre da Silveira Gerzson,¹ Denise Cantarelli Machado,² Rafaela Radomski da Silva,³

Cristhiane Alvim Valente,⁴ Rogério Miranda Pagnoncelli⁵

¹ PhD student, Oral and Maxillofacial Surgery, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS; Professor, School of Dentistry, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil.

² Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Biomedical Research Institute; Medical School, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Collaborator in the Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Biomedical Research Institute, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ PhD student, Materials Engineering and Technology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵ Professor, Oral and Maxillofacial Surgery, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Financial disclosure: The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to disclose.

Resumo.

Biomateriais como alternativas ao osso autógeno e outros tecidos biológicos, são muito utilizados no tratamento de pacientes na rotina cirúrgica da região maxilofacial. Neste contexto, um biomaterial com características de arcabouço (osteocondutor), e associado à um fator de crescimento (osteoadutor), seria de grande interesse para pesquisa e aplicação clínica. Polímeros biodegradáveis, utilizados para a liberação lenta de medicamentos, vem sendo estudados, demonstrando bons resultados e interessante potencial. O rhGH pode ser liberado através da sua incorporação à estes polímeros. Desta forma, se faz necessário a avaliação da biocompatibilidade e toxicidade de um biomaterial polimérico para liberação lenta de rhGH.

Através da técnica de evaporação de solvente foram preparados matrizes de PLGA e PLGA/PCL na razão 70/30 de PLGA e PCL, respectivamente, associados ou não ao rhGH. Os biomateriais foram testados relacionados à sua toxicidade e viabilidade celular, através de um ensaio de MTT com células de camundongo NIH 3T3 ATCC. A avaliação da toxicidade celular foi realizada nos tempos de 24 horas, 48 horas, 72 horas e 7 dias de exposição dos biomateriais com o meio de cultura.

Todos os polímeros testados apresentaram altas taxas de viabilidade celular, porém, os grupos associados ao rhGH parecem demonstrar melhores resultados do que os grupos de polímeros sem associação ao hormônio quando comparados ao grupo controle em alguns períodos do experimento. O que pode sugerir uma preferência das células à presença do rhGH no biomaterial presente no meio de cultura, principalmente na matriz de PLGA.

Palavras Chaves (DeCS): Materiais biocompatíveis, hormônio do crescimento, polímeros

Abstract.

Developing a biomaterial that functions as a scaffold (osteoconductor), combined with a growth factor (osteoinductor), is of great interest for clinical application in oral and maxillofacial surgery. Human Growth hormone (rhGH) is a good candidate, as it is a major regulator of postnatal bone growth and remodeling. Pure PLGA and 70/30 PLGA/PCL matrices were prepared by the solvent evaporation method, combined or not with GH, and tested for toxicity and cell viability using an MTT assay with NIH3T3 mouse cells (ATCC). Cell toxicity was assessed at 24, 48, 72 hours, and 7 days of biomaterial exposure to culture medium. All polymers had high cell viability rates. However, from 48 hours onwards, the groups with GH-polymer combinations had better results than the polymer groups without association with GH when compared to the control group. At 7 days of culture, only the pure PLGA matrix showed a significant difference from the control group. These results may suggest a preference of cells for the presence of rhGH in the biomaterial in culture medium, especially in the PLGA matrix. The rhGH appeared to contribute to the increase in cell viability observed at some assessment time points, especially when combined with PLGA as compared to pure PLGA.

Keywords (MeSH): Biocompatible materials, growth hormone, polymers, PLGA.

Introdução.

Procedimentos para o aumento ou manutenção de tecido ósseo podem ser requeridos no tratamento de perdas ósseas em traumas bucomaxilofaciais, lesões periodontais, lesões císticas, enxertos ósseos e preparação de leito para colocação de implantes. ¹

Tendo em vista a necessidade de criação de um substituto ósseo ideal, com propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, de fácil manipulação e que seja absorvido em tempo compatível na formação óssea com manutenção da mesma, novas pesquisas estão sendo desenvolvidas. Um biomaterial que tenha a maior semelhança possível com o tecido ósseo, seria de grande benefício para tratamentos com necessidade de enxertos ósseos, pois as vantagens inerentes do osso autógeno estariam associadas a menor morbidade, disponibilidade de grandes quantidades de material e maior aceitação pelo paciente. Neste contexto, os fatores de crescimento surgem como uma excelente alternativa para a osteoindução em biomateriais. ^{2,3,4,5}

Dentre os fatores de crescimento (GFs), destaca-se o hormônio do crescimento (GH-do inglês, growth hormone), que é um regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal e do remodelamento ósseo. O GH exerce efeito sobre os osteoclastos e mais acentuadamente sobre os osteoblastos, criando a base teórica para o seu possível efeito de anabolismo no esqueleto. ^{6,7,8,9}

Tresguerres et al., em 2003, em estudo em coelhos, demonstraram que a administração do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) no local da osteotomia, antes da instalação do implante, resultou em maior formação de trabeculado ósseo próximo às roscas do implante em avaliação histomorfométrica após duas semanas.¹⁰ Em Cirurgia Bucomaxilofacial, a utilização do rhGH seria associado com um biomaterial, em dose única e de aplicação local, com o objetivo de liberação lenta do hormônio para reconstruções ósseas por exemplo. Neste sentido surgiu a concepção de

associar o rhGH em uma matriz polimérica de lenta degradação. Diversos polímeros e copolímeros podem ser utilizados na preparação de matrizes absorvíveis que funcionam como arcabouços osteocondutores, entre eles, o PLGA (ácido glicólico polilático) e a PCL (policaprolactona). A combinação de diferentes polímeros ou diferentes formas do mesmo polímero, obtendo materiais com diferentes propriedades químicas e mecânicas, e que são degradados em diferentes períodos de tempo, são interessantes opções na liberação de fármacos.^{11,12,13}

Assim como o PLGA, a policaprolactona têm sido um dos polímeros bastante estudados ao longo da última década, como matriz de liberação de substâncias. A PCL possui uma degradação mais lenta quando comparada ao PLGA, apresenta facilidade de manuseio para formatos diferentes, flexibilidade, é atóxica e boa miscibilidade com outros polímeros, como o PLGA por exemplo, dando a opção de polímeros mistos.^{14,15}

Poucos biomateriais reúnem todas as características desejáveis da neoformação óssea, uma vez que a osteogênese somente estaria presente no osso autógeno, a osteocondução e a osteoindução, tornariam o biomaterial o mais próximo de uma formação óssea previsível e com bons resultados. A osteoindução parece ser o futuro no desenvolvimento de biomateriais em cirurgia bucomaxilofacial. Existem poucos estudos utilizando o rhGH associado à polímero, aplicados à cirurgias no complexo maxilofacial. A possibilidade de termos osteocondução e osteoindução em um único biomaterial seria de grande potencial para aplicação clínica. Desta forma, considera-se, então, pertinente a realização de um estudo para esclarecer estas questões de pesquisa.

Biomateriais são substâncias origem natural ou sintética que têm sido desenvolvidas para serem usadas na restauração ou substituição de órgãos, tecidos ou funções do corpo humano. Estes produtos não devem provocar qualquer resposta biológica adversa, seja ela local ou sistêmica. e apresentam diversas vantagens já citadas. Entre as principais características de um biomaterial destacam-se a sua biocompatibilidade e sua

atoxicidade.¹⁶ Desta forma, se faz necessário a verificação dos níveis de toxicidade seguros, para o desenvolvimento de um biomaterial compatível, visando sua posterior aplicação clínica.

Material e métodos.

Desenvolvimento do biomaterial.

Os reagentes utilizados na confecção dos filmes foram: Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) Razão 85:15, Purasorb®; Policaprolactona Mn 80,000, Aldrich®; Clorofórmio Synth®, Hormônio do crescimento humano, Saizen®, contém: Somatropina (r-hGH) – 1,33 mg (4 UI) Excipientes: manitol, fosfato dissódico dihidratado, fosfato monossódico monohidratado.

Preparo dos biomateriais, matrizes de PLGA e PLGA/PCL puros (sem rhGH).

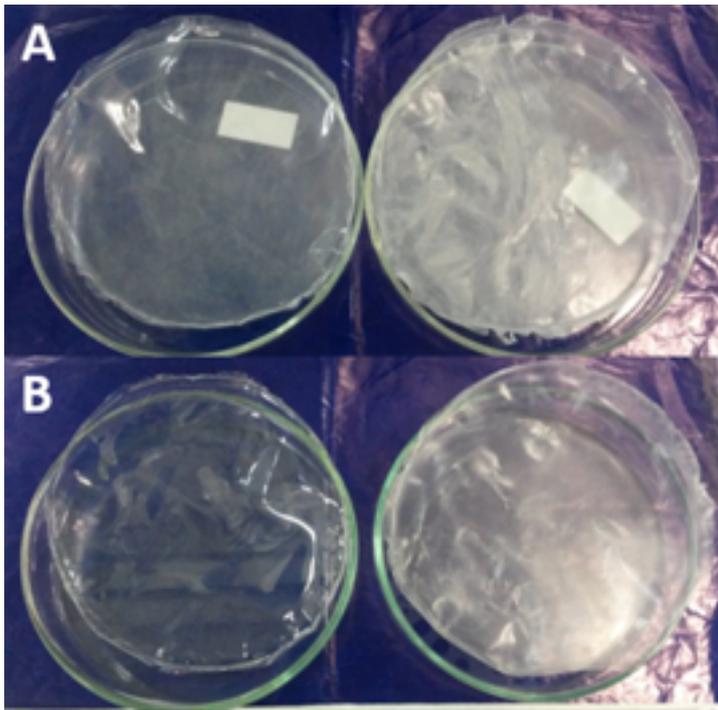
Através da técnica de evaporação de solvente¹⁷ foram preparados matrizes de PLGA e PLGA/PCL na razão 70/30 de PLGA e PCL, respectivamente.

O PLGA e PLGA/PCL foram solubilizados em clorofórmio (4% m/v), com 0,8g de PLGA para a confecção das matrizes de PLGA puro e de 0,56g e 0,24g na proporção de 70/30 nas matrizes mistas PLGA/PCL, e as soluções deixadas em banho ultrassônico de 40 kHz (Unique, modelo USC-1600) por 3 horas à temperatura ambiente. Após total solubilização, as soluções poliméricas foram vertidas em placas Petri de vidro (Ø 9,5 cm). Em uma bancada de nível horizontal, o solvente é evaporado por 48h em temperatura ambiente. Posteriormente, as matrizes passaram por uma secagem à vácuo a 40 °C por 8h.

Preparo dos biomateriais, matrizes de PLGA e PLGA/PCL com rhGH.

Matrizes de PLGA/rhGH e PLGA/PCL/rhGH foram preparadas através da metodologia da evaporação de solvente.¹⁷ Soluções de PLGA e PLGA/PCL foram previamente solubilizadas em clorofórmio (4% m/v) conforme o procedimento experimental utilizado para a preparação dos filmes puros, sem o rhGH.

Uma solução de rhGH Saizen® com concentração de 1330 µg/mL do hormônio Somatropina foi preparada em clorofórmio. A solução contendo o hormônio Somatropina após 30 minutos em banho ultrassônico (40 kHz) permaneceu 30 minutos em agitação magnética para total dispersão e homogeneização da solução. Posteriormente adicionou-se 5 mL da solução de rhGH em cada uma das soluções de PLGA e PLGA/PCL previamente preparadas. Após adição de 665 µg do hormônio, cada solução polimérica contendo hormônio foi agitada por 5 minutos para melhor distribuição e homogeneização do hormônio na solução matriz. As soluções com hormônio foram vertidas nas placas Petri de vidro (Ø 9,5 cm) e as etapas da evaporação do solvente seguiram como para os filmes sem rhGH. Logo quantidade de hormônio presente por cm² do biomaterial, calculada através da divisão da dose utilizada pela área da matriz foi de 9,4 µg de rhGH/cm² do biomaterial aproximadamente. As matrizes podem ser visualizadas nas figuras 1A e 1B. Após o preparo das matrizes, estas foram esterilizadas através de ETO (óxido de etileno).



Figuras 1A e 1B: Matrizes puras de PLGA e PLGA/PCL (70/30) (lado esquerdo) e Matrizes de PLGA e PLGA/PCL (70/30) com rhGH (lado direito) após processo de produção.

Amostra.

Foram testados quatro grupos experimentais em triplicata, através do método de extração, sendo A (PLGA puro), B (PLGA/rhGH), C (PLGA/PCL), D (PLGA/PCL/rhGH) além do grupo E (controle negativo para toxicidade/meio celular). A proporção da área da superfície da amostra para o volume de meio foi de 3 cm²/mL, de acordo com ISO 10993/12. A área da superfície foi calculada com base na dimensão total da amostra, desconsiderando a porosidade.^{18,19} A avaliação da toxicidade celular foi realizada nos tempos de 24 horas, 48 horas, 72 horas e 7 dias de exposição dos biomateriais com o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de gentamicina e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina .

Avaliação da toxicidade.

Fibroblastos de camundongo da linhagem NIH/3T3 (ATCC®-American Type Culture Collection-TCC, Old Town, Maryland, USA) foram cultivados em garrafas de cultura de 25cm² (TPP®, Zollstrasse, Suíça) com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media; Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de gentamicina e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco®) a 37 °C em uma estufa (Sanyo®) sob uma atmosfera umedecida com 5% CO₂ até atingirem uma confluência de 80%.

Para cada período de tempo analisado, foram preparadas placas de 96 poços com 200µL de meio DMEM suplementado contendo 4,5 X 10⁵ células NIH3T3 para cada poço . As células foram cultivadas por 24 horas e após esse período foram lavadas com DPBS® (Dulbeco's Phosphate Buffer Saline). Após a lavagem, as células foram expostas ao meio condicionado que estava em contato com os biomateriais, obedecendo o sistema de triplicata. Como Controle Negativo, livre de toxicidade, foram mantidos poços apenas com cultivos celulares (sem exposição ao meio condicionado com biomaterial). As células foram então cultivadas por 24h sob as mesmas condições iniciais de cultivo.

Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e foi adicionado 200µL de solução MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) na concentração de 5mg/mL em meio DMEM suplementado. As células foram então incubadas por 4 horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO₂, O MTT foi então solubilizado em 200µL de dimetil sulfóxido (DMSO) para realização da leitura. As Densidades Óticas (DO) foram medidas em um comprimento de onda de 570 nm em leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark, Hercules, USA). A viabilidade celular foi então calculada, através da seguinte fórmula: Viabilidade Celular (%) = Média DO do grupo teste X 100 / Média DO do grupo controle.

Análise estatística.

A análise estatística da viabilidade celular foi realizada, através da digitação dos dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis pela mediana, o mínimo e o máximo. Os dados entre grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e feita à ordenação por postos da variável para realizar as suas comparações múltiplas pelo teste *post-hoc* de Tukey. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados.

Os resultados relacionados à viabilidade celular dos biomateriais testados, apresentaram índices de 100% de viabilidade em todos os grupos testados nos períodos de 24 e 48 horas, havendo um decréscimo, principalmente no grupo A (PLGA puro) em 72 horas com 74,7% de viabilidade celular, enquanto os grupos B (PLGA/GH), C (PLGA/PCL) e D (PLGA/PCL/GH) em 72 horas apresentaram respectivamente 94,9%, 99,5% e 94,9% de viabilidade celular. Ao final de 7 dias de experimento, a viabilidade de forma geral sofreu um ligeiro decréscimo, exceto no grupo A; Mas este se manteve com o menor desempenho quando comparado aos demais grupos, apresentando em A,B,C,D viabilidade celular de 77%, 90,9%, 88,5% e 89% respectivamente. Apesar desta queda da viabilidade quando comparada aos períodos de 24 e 48 horas, podemos observar um excelente resultado relacionado à viabilidade celular, com taxas inexistentes ou muito baixas de toxicidade dos materiais testados. Podemos observar as porcentagens de viabilidade celular em cada grupo no gráfico 1.

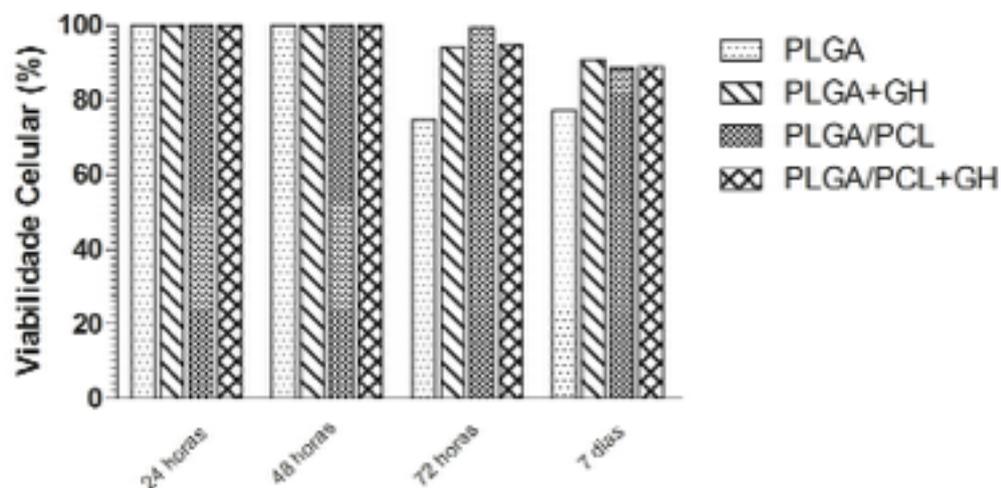


Gráfico 1. Porcentagens de viabilidade celular dos grupos testados em 24,48,72 horas e 7dias. A = PLGA puro, B = PLGA/rhGH, C = PLGA/PCL, D = PLGA/PCL/rhGH.

Na tabela 1, observamos a comparação da viabilidade entre os grupos às 24horas, e não observamos diferença estatisticamente significativa ($P=0,388$). Podemos verificar que todos os grupos apresentaram valores superiores ao grupo controle, demonstrando a viabilidade celular de 100% descrita anteriormente.

Tabela 1. Tabela comparativa da viabilidade entre os grupos às 24 hs.

	24hs
PLGA	0,520 (0,490 - 0,552)
PLGA+GH	0,542 (0,526 - 0,572)
PLGA/PCL	0,559 (0,513 - 0,570)
PLGA/PCL+GH	0,515 (0,424 - 0,617)
Controle	0,396 (0,387 – 0,530)
P	0,388

Dados apresentados pela mediana (mínimo-maximo) das densidades óticas no período. * P obtido através do teste de Kruskal-Wallis.

Na tabela 2, observamos a comparação da viabilidade entre os grupos às 48 horas, e observamos diferenças estatisticamente significativas ($P=0,038$). As diferenças estão localizadas entre o grupo controle e o grupo PLGA+rhGH, e o grupo controle e o grupo PLGA/PCL+rhGH. Podemos verificar novamente os valores de todos os grupos superiores ao controle, demonstrando, mesmo com diferenças entre os grupos, total viabilidade celular.

Tabela 2. Tabela comparativa da viabilidade entre os grupos às 48 hs.

	48hs
PLGA	0,316 (0,287 - 0,326)
PLGA+GH	0,360 (0,354 - 0,366)
PLGA/PCL	0,329 (0,307 - 0,359)
PLGA/PCL+GH	0,342 (0,294 - 0,362)
Controle	0,266 (0,246 - 0,269)
P	0,038

Dados apresentados pela mediana (mínimo-maximo) das densidades óticas no período. * P obtido através do teste de Kruskal-Wallis.

Na tabela 3, observamos a comparação da viabilidade entre os grupos às 72 horas, e verificamos diferenças estatisticamente significativas ($P=0,025$). As diferenças estão localizadas entre o grupo controle e o grupo PLGA, que às 72 horas apresentou o menor índice viabilidade celular durante o experimento, e entre o grupo PLGA e o grupo PLGA/PCL.

Tabela 3. Tabela comparativa da viabilidade entre os grupos às 72 hs.

	72hs
PLGA	1,419 (1,389 - 1,468)
PLGA+GH	1,808 (1,688 - 1,867)
PLGA/PCL	1,902 (1,845 - 1,907)
PLGA/PCL+GH	1,803 (1,765 - 1,829)
Controle	1,887 (1,849 - 1,947)
P	0,025

Dados apresentados pela mediana (mínimo-maximo) das densidades óticas no período. * P obtido através do teste de Kruskal-Wallis.

Na tabela 4, observamos a comparação da viabilidade entre os grupos aos 7 dias, e observamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo PLGA (P=0,036).

Tabela 4. Tabela comparativa da viabilidade entre os grupos aos 7 dias.

	7 dias
PLGA	1,615 (1,549 - 1,710)
PLGA+GH	1,872 (1,848 - 1,993)
PLGA/PCL	1,914 (1,723 - 1,926)
PLGA/PCL+GH	1,911 (1,707 - 1,974)
Controle	2,087 (2,003 - 2,183)
P	0,036

Dados apresentados pela mediana (mínimo-maximo) das densidades óticas no período. * P obtido através do teste de Kruskal-Wallis.

Discussão.

Os resultados do presente estudo, demonstraram altos índices de viabilidade celular dos diferentes biomateriais testados. Os resultados em 24 e 48 horas, demonstraram total viabilidade celular em todos os grupos, em 48 horas houveram diferenças estatísticas entre os grupos, demonstrando que o rhGH parece contribuir para

viabilidade celular aumentada neste período, ainda que todos os grupos apresentem 100% de viabilidade. Os grupos com a incorporação do hormônio apresentaram os melhores resultados em 48 horas quando comparados ao grupo controle, o que pode sugerir uma preferência das células ao meio de cultura com a presença do rhGH.

Em 72 horas de MTT, observamos a mesma tendência, no que diz respeito ao PLGA, que apresentou neste período o que podemos chamar de pior desempenho relacionado à viabilidade celular. Neste período, novamente a incorporação do rhGH ao PLGA, demonstra maior proximidade ao grupo controle, sem a diferença significativa observada no PLGA puro comparado ao grupo controle em 72 horas. Os grupos mistos de polímero, PLGA/PCL com e sem o hormônio, apresentaram comportamento semelhantes no período.

Finalmente aos 7 dias de experimento, verificamos que o único grupo com diferença significativa comparada ao controle é o A (PLGA puro), o que reforça a possibilidade do hormônio do crescimento humano de sustentar a viabilidade celular do PLGA, o qual apresenta bons resultados neste trabalho confirmando resultados de outros estudos.^{11, 20}

É frequente na literatura, encontrarmos estudos que buscam alterar a morfologia de superfície de polímeros buscando a melhor adesão e proliferação celular, desta forma, polímeros mistos vem sendo testados, buscando modificar as características hidrofílicas e hidrofóbicas do polímero, o que pode alterar o tempo de degradação e também modificar as características de arcabouço. Neste contexto, vem sendo testados a incorporação de hidroxiapatita, com objetivos de engenharia tecidual para reparo ósseo; Polímeros mistos de PCL e PLGA com objetivo de aumentar a adesão de osteoblastos do polímero através da incorporação do PLGA; Gelatina de colágeno na tentativa de facilitar a adesão celular.

14,20,21,22

Este estudo buscou produzir arcabouços poliméricos de PLGA e PLGA/PCL com incorporação do rhGH. Os resultados demonstraram que em alguns momentos o hormônio resultou em um acréscimo na viabilidade e na sustentação celular das matrizes.

Diversos estudos demonstraram que biomateriais poliméricos, entre eles o PLGA e o PCL, em diferentes formatos e associações apresentam biocompatibilidade e baixa toxicidade, indo de acordo com os resultados do presente estudo.^{23, 24}

O PCL é um polímero que apresenta degradação mais lenta que o PLGA, o que na liberação de fármacos seria uma interessante alternativa, por outro lado, o PCL sozinho não apresenta afinidade com células ósseas, por isso o polímero misto com o PLGA.^{14,15,}

25

Devido aos bons relatos na literatura do uso de misturas poliméricas²⁶ neste estudo optou-se pela mistura entre o PLGA e PCL. O PCL não deve ser utilizado em altas porcentagens em compósitos de PLGA/PCL devido ao seu alto custo e estabilidade durante o manuseio e armazenamento²⁷. Materiais à base de PCL podem manter uma resistência mecânica de longa duração, sendo uma vantagem para aplicações que precisam de mais tempo para sua ação terapêutica.²⁸

Estudos sobre a composição dos polímeros, demonstraram a degradação destes em diversas proporções. Os resultados mostram que o aumento do percentual de ácido glicólico acelera a perda de peso do polímero. Uma matriz de PLGA construída em uma proporção de 50% de PLA e 50% de PGA (PLGA 50:50) demonstra uma degradação mais rápida que uma matriz de PLGA 65:35, devido a hidrofiliabilidade do PGA, o que causa uma degradação mais rápida nos polímeros com maior concentração de PGA. Consequentemente, o PLGA 65:35 possui degradação mais rápida que o PLGA 75:25, e este degrada de forma mais acelerada que o PLGA 85:15. Assim, o índice de degradação é acelerado com o aumento da proporção de PGA na composição do polímero. A quantidade de ácido poli-glicólico é um parâmetro crítico para se customizar as

características hidrofílicas da matriz e assim influenciar a velocidade de degradação e o padrão de liberação de agentes farmacológicos.^{25, 29, 30}

Devido à estes aspectos foi utilizado o PLGA 85:15 e também a associação com o PCL, buscando aumentar o tempo de degradação do polímero, pois desta forma o biomaterial permanece por um tempo maior como arcabouço celular o que poderia aumentar o tempo da osteocondução por exemplo, e também permitir a liberação de substâncias de forma lenta. A incorporação com o rhGH foi a tentativa de otimizar a biocompatibilidade e viabilidade celular, característica que foi possível de se observar no presente estudo.

Conclusões.

Os biomateriais testados apresentaram um alto índice de viabilidade celular em todos os grupos testados. O rhGH parece contribuir para o aumento da viabilidade celular em alguns dos períodos testados, principalmente quando associado ao PLGA comparado com o PLGA puro .

A engenharia tecidual é uma interessante alternativa em procedimentos reconstrutivos em cirurgias bucomaxilofaciais, neste contexto, biomateriais poliméricos associados a fatores de crescimento, neste estudo, o hormônio do crescimento humano recombinante, podem, em um futuro próximo, estar contribuindo de forma efetiva no tratamento de pacientes. É importante salientar que para isso, mais estudos são necessários para o desenvolvimento e pesquisa de novos biomateriais.

Referências

1. Chan, C., Thompson, I., Robinson, P., Wilson, J., Hench, L. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Int. Journal Oral Maxillofac Surg*, v. 31, p. 73-77, 2002.
2. Carvalho, P. S. P., Bassia, A. P. F., Violin, L. A. Revisão e proposta de nomenclatura para biomateriais. *Implant News*, v. 3, p. 256-261, 2004.
3. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jan;41(1):114-20.
4. Litsas G. Growth hormone therapy and craniofacial bones: a comprehensive review. *Oral Dis* 2013; 19(6):559-67.5.
5. Pagnoncelli RM, Gerzson AS, Camilotti RS, Jasper J, J Böing F. Hormônio do crescimento humano e a perspectiva futura em Odontologia. *RFO, Passo Fundo*, v. 19, n. 3, p. 379-383, set./dez. 2014
6. Varkey M, Gittens SA, Uludag H. Growth factor delivery for bone tissue repair: an update. *Expert Opin Drug Deliv*. 2004 Nov; 1(1):19-36.
7. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders, 2006.
8. Simpson AH, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br*. 2006 Jun; 88 (6): 701-5.
9. Tran GT, Pagkalos J, Tsiridis E, Narvani AA, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E. Growth hormone: does it have a therapeutic role in fracture healing? *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Jul; 18(7):887- 911.
10. Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres JA. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(6):807-11.
11. Makadia HK And Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011, 3, 1377-1397; doi:10.3390/polym3031377
12. Lee JY, Bashur CA, Milroy CA, Forciniti L, Goldstein AS, Schmidt CE. Nerve Growth Factor-Immobilized Electrically Conducting Fibrous Scaffolds for Potential Use in Neural Engineering Applications. *Ieee Transactions On Nanobioscience*, Vol. 11, No. 1, March 2012
13. Chu XH, Xu Q, Feng ZQ, Xiao Jq, Qiang LI, Sun XT, Cao Y And Ding YT. In vitro biocompatibility of polypyrrole/PLGA conductive nanofiber scaffold with cultured rat hepatocytes. *Mater. Res. Express* 1 (2014) 035402

14. Tang Zg, Hunt Ja. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation *in vitro*. *Biomaterials* 27 (2006) 4409–4418
15. Díaz E, Sandonis I, Valle MB. In Vitro Degradation of Poly(caprolactone)/nHA Composites. *Journal of Nanomaterials*. Volume 2014, Article ID 802435, 8 pages
16. Helmus M, Gibbons D, Cebon D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. *Toxicologic pathology* Jan 2008; 36:70-80.
17. Rezende, C.A.; Luchesi, C.; Barbo, MaL.P.; Duek, E.A.R. Membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação *in vitro* e *in vivo*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 3, p. 232-238, 2005.
18. Müller U. In vitro biocompatibility testing of biomaterials and medical device. *Med Device Technol.* 2008; 19(2): 30, 32-4
19. ISO 10993. Use of International Standard. Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing within a risk management process. 2013.
20. Pamula E, Kokoszka J, Cholewa-Kowalska K et al. Degradation, Bioactivity, and Osteogenic Potential of Composites Made of PLGA and Two Different Sol–Gel Bioactive Glasses. *Biomedical Engineering*. 2011 Aug. 39 (8) 2114–2129.
21. Meng ZX, Wang YS, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng YF. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 30 (2010) 1204–1210
22. Moncy VJ, Vinoy T, Kalonda TJ, Dean DR, Nyairo E. Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 305–315
23. M. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 72–82
24. Subramanian A, Uma Maheswari Krishnan Um, Sethuraman S. In Vivo Biocompatibility of PLGA-Polyhexylthiophene Nanofiber Scaffolds in a Rat Model. *BioMed Research International*. Volume 2013, Article ID 390518, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/390518>
25. Sun H, Mei L, Song C, Cui X, Wang P. The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials*. 2006; 27:1735–1740
26. Chen L, Bai Y, Liao G, Peng E, Wu B, et al. (2013) Electrospun Poly(L-lactide)/Poly(ε-caprolactone) Blend Nanofibrous Scaffold: Characterization and Biocompatibility with Human Adipose-Derived Stem Cells. *PLoS ONE* 8(8): e71265. doi:10.1371/journal.pone.007126541
27. Hiep NT, Lee BF. Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *J Mater Sci: Mater Med* (2010) 21:1969–1978
28. Li X, Yang C, Li L, Xiong J, Xie L, Yang B, Yu M, Feng L, Jiang Z, Guo W And Tian W. A Therapeutic Strategy for Spinal Cord Defect: Human Dental Follicle Cells Combined with Aligned PCL/PLGA Electrospun Material. Hindawi Publishing Corporation *BioMed*

Research International. Volume 2015, Article ID 197183, 12 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/197183>

29. Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai H, Leite SM, Tamada JA, Uyama S, Vacanti JP, Langer R, Mikos AG. In vitro and in vivo degradation of porous poly(-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*. 2000;21:1837–1845.

30. Alexis F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly (lactic acid) and poly [(lactic acid)-co-(glycolic acid)] *Polym Int*. 2005;54:36–46.

6. Artigo científico II.

Submetido a revista IJOMI, qualis A1 - Anexo 2

Journal Impact Factor: 1.491 5-year Impact Factor: 2.435

Avaliação da Adesão e Proliferação de Células Tronco Mesenquimais da Medula Óssea Em Matriz Polimérica com rhGH.

Assessment of adhesion and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in polymer matrices with rhGH.

Alexandre da Silveira Gerzson,¹ Denise Cantarelli Machado,² Daniel Rodrigo Marinovic,³ Rogério Miranda Pagnoncelli⁴

¹ PhD student, Oral and Maxillofacial Surgery, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS); MSc and specialist in Oral and Maxillofacial Surgery, Universidade Sagrado Coração; Specialist in Implant Dentistry, Associação Brasileira de Odontologia do Rio Grande do Sul; Professor, School of Dentistry, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil.

² Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Biomedical Research Institute; Medical School, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ PhD student, Medicine and Health Sciences, with a concentration in Neuroscience, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ Professor, PhD, Oral and Maxillofacial Surgery, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Resumo.

Introdução: Biomateriais como alternativas ao osso autógeno e outros tecidos biológicos, são muito utilizados no tratamento de pacientes na rotina cirúrgica da região maxilofacial. Neste contexto, um biomaterial com características de arcabouço (osteocondutor), e associado à um fator de crescimento (osteoindutor), seria de grande interesse para pesquisa e aplicação clínica. Polímeros biodegradáveis, utilizados para a liberação lenta de medicamentos, vem sendo estudados, demonstrando bons resultados e interessante potencial. O rhGH pode ser liberado através da sua incorporação à estes polímeros. Desta forma, se faz necessário a avaliação da adesão e proliferação celular de um biomaterial polimérico para liberação lenta de rhGH.

Material e métodos: Através da técnica de evaporação de solvente foram preparados matrizes de PLGA e PLGA/PCL na razão 70/30 de PLGA e PCL, respectivamente, associados ou não ao rhGH. Os biomateriais foram testados relacionados à sua adesão e proliferação celular, através do cultivo em células-tronco mesenquimais de rato Wistar, com ensaio de coloração DAPI e posterior contagem celular, além de microscopia eletrônica de varredura. A avaliação da adesão e proliferação celular foi realizada nos tempos de 24 e 72 horas de exposição dos biomateriais com o meio de cultura.

Resultados: Todos os polímeros testados apresentaram adesão e proliferação celular, porém, os biomateriais à base de PLGA, principalmente associados ao rhGH parecem demonstrar maior proliferação celular quando avaliada a diferença do crescimento de 24 para 72 horas. O rhGH parece alterar a superfície do polímero, aumento a rugosidade e microporosidade. Aspecto visualizado principalmente quando incorporado ao PLGA.

Conclusões: Os biomateriais testados apresentaram marcada adesão celular em todos os grupos testados, o rhGH parece contribuir para o aumento da proliferação celular principalmente quando associado ao PLGA comparado com o PLGA puro. Mais pesquisas

devem ser realizadas, buscando um maior entendimento e desenvolvimento de novos biomateriais.

Palavras Chaves (DeCS): Materiais biocompatíveis, hormônio do crescimento, polímeros

Abstract.

Purpose: Biomaterials, as an alternative to autogenous bone and other biological tissues, have been widely used in oral and maxillofacial surgery. In this context, a biomaterial that functions as a scaffold (osteoconductor), combined with a growth factor (osteoinductor), would be of great interest for clinical application. Biodegradable polymers used for slow drug release have been investigated, demonstrating good results and interesting potential. Human Growth hormone (rhGH) may be released by incorporating it into these polymers. This study aimed to evaluate cell adhesion and proliferation of a polymeric biomaterial for slow release of rhGH.

Materials and Methods: PLGA and PLGA/PCL (at a 70/30 ratio of PLGA to PCL) matrices were prepared by the solvent evaporation method, combined or not with GH. Biomaterials were tested for cell adhesion and proliferation by culture in mesenchymal stem cells derived from Wistar rat bone marrow, DAPI staining, and subsequent cell counting, in addition to scanning electron microscopy. Cell adhesion and proliferation was assessed at 24 and 72 hours of biomaterial exposure to culture medium.

Results: All tested polymers exhibited cell adhesion and proliferation. However, PLGA-based biomaterials, especially when combined with rhGH, showed greater cell proliferation when the difference in growth from 24 to 72 hours was evaluated. The rhGH appeared to modify the polymer surface, with increased roughness and microporosity. This feature was more evident in the PLGA+ rhGH combination.

Conclusions: The biomaterials tested showed pronounced cell adhesion in all test groups, and rhGH appeared to contribute to the increase in cell proliferation, especially when combined with PLGA as compared to pure PLGA. Further studies are required to clarify this potential for development of new biomaterials.

Keywords (MeSH): Biocompatible materials, growth hormone, polymers, PLGA.

Introdução.

Um biomaterial que tenha a maior semelhança possível com o tecido ósseo, seria de grande benefício para tratamentos com necessidade de enxertos ósseos, pois as vantagens inerentes do osso autógeno estariam associadas a menor morbidade, disponibilidade de grandes quantidades de material e maior aceitação pelo paciente. Neste contexto, os fatores de crescimento surgem como uma excelente alternativa para a osteoindução em biomateriais.^{1,2,3}

O hormônio do crescimento (GH - do inglês Grow Factor) é uma das substâncias que regulam o crescimento e a remodelação óssea in vivo, podendo também atuar como um fator de crescimento produzido localmente.^{2,3} O hormônio do crescimento recombinante (rhGH) é um peptídeo com 191 aminoácidos secretado pela glândula pituitária anterior, que estimula o processo de crescimento, atuando como um regulador metabólico e mitogênico. Dentre as principais ações metabólicas do rhGH destacam-se o aumento do anabolismo de proteínas, do catabolismo de ácidos graxos e a redução da utilização de glicose como fonte de energia. Assim, esse hormônio, é um poupador de aminoácidos.⁴

Foi observado em estudos passados, que a administração local do rhGH, quando liberado a partir de um biomaterial carreador tipo fosfato, é capaz de melhorar o processo de substituição do biomaterial por osso, pela aceleração do processo de remodelação óssea.⁵ Avaliou-se também, em outro estudo, que a administração local do rhGH, como uma dose única no momento cirúrgico do implante, na perfuração óssea, antes de instalar o implante, pode acelerar o processo de osseointegração.⁶

Estudos com biomateriais estão sendo desenvolvidos com o objetivo de auxiliar na regeneração tecidual em sítios específicos. Os polímeros biodegradáveis como o PLA (ácido polilático), o PLGA (ácido glicólico polilático) e a PCL (policaprolactona) estão sendo testados com boas perspectivas, estes polímeros são uma interessante opção de

matriz para liberação de substâncias. Diversos fármacos são utilizados para serem liberadas nesses sistemas, como antibióticos, anticoncepcionais e proteínas. Neste raciocínio, podemos incluir o hormônio do crescimento humano.^{7,8}

Os polímeros apresentam as vantagens de serem processados em diversos formatos, encapsular moléculas de qualquer tamanho, mudar composições para controlar tempo de degradação e apresentar solubilidade em uma variada gama de solventes. Estas características, além de biocompatibilidade e possibilidade de modificar a superfície de acordo com a necessidade de arcabouço, geram grande interesse para pesquisas e para a indústria farmacêutica.^{9,10,11,12,13}

Materiais usados para fabricação de biomateriais não são determinados somente por suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, e estabilidade mecânica; mas, também como sinalizadores de processos de diferenciação celular que estimulem a formação tecidual, neste contexto, se justifica a realização desta pesquisa, com o objetivo de verificar a adesão e proliferação celular em um arcabouço polimérico e presença de hormônio do crescimento humano (rhGH).

Material e métodos.

Desenvolvimento do biomaterial.

Os reagentes utilizados na confecção dos filmes foram: Poli (ácido láctico-co-glicólico), PLGA, Razão 85:15, Purasorb®; Policaprolactona Mn 80,000, Aldrich®; Clorofórmio Synth®; Hormônio do crescimento humano Saizen®, contém: Somatropina (r-hGH) – 1,33 mg (4 UI) Excipientes: manitol, fosfato dissódico dihidratado, fosfato monossódico monohidratado.

Preparo dos biomateriais, matrizes de PLGA e PLGA/PCL puros (sem GH).

Através da técnica de evaporação de solvente¹⁴ foram preparados filmes de PLGA e PLGA/PCL na razão 70/30 de PLGA e PCL, respectivamente.

O PLGA e PLGA/PCL foram solubilizados em clorofórmio (4% m/v), com 0,8g de PLGA para a confecção das matrizes de PLGA puro e de 0,56g e 0,24g na proporção de 70/30 nas matrizes mistas PLGA/PCL, e as soluções deixadas em banho ultrassônico de 40 kHz (Unique, modelo USC-1600) por 3 horas à temperatura ambiente. Após total solubilização, as soluções poliméricas foram vertidas em placas Petri de vidro (Ø 9,5 cm). Em uma bancada de nível horizontal, o solvente é evaporado por 48h em temperatura ambiente. Posteriormente, as matrizes passaram por uma secagem à vácuo a 40 °C por 8h.

Preparo dos biomateriais, matrizes de PLGA e PLGA/PCL com rhGH.

Matrizes de PLGA/GH e PLGA/PCL/GH foram preparados através da metodologia da evaporação de solvente.¹⁷ Soluções de PLGA e PLGA/PCL foram previamente solubilizadas em clorofórmio (4% m/v) conforme o procedimento experimental utilizado para a preparação dos filmes puros, sem o rhGH.

Uma solução de rhGH Saizen® com concentração de 1330 µg/mL do hormônio Somatropina é preparada em clorofórmio. A solução contendo o hormônio Somatropina após 30 minutos em banho ultrassônico (40 kHz) permaneceu 30 minutos em agitação magnética para total dispersão e homogeneização da solução. Posteriormente adicionou-se 5 mL da solução de rhGH em cada uma das soluções de PLGA e PLGA/PCL previamente preparadas. Após adição de 665 µg do hormônio Somatropina, cada solução polimérica contendo hormônio foi agitada por 5 minutos para melhor distribuição e homogeneização do hormônio na solução matriz. As soluções com hormônio foram

vertidas nas placas Petri de vidro (θ 9,5 cm) e as etapas da evaporação do solvente seguiram como para os filmes sem GH. Logo quantidade de hormônio presente por cm² do biomaterial, calculada através da divisão da dose utilizada pela área da matriz foi de 9,4 μ g de GH/cm² do biomaterial aproximadamente. Após o preparo das matrizes, estas foram esterilizadas através de ETO (óxido de etileno).

Obtenção de células-tronco mesenquimais da medula óssea.

Após aprovação pelo Comitê de ética da PUCRS (comitê de ética no uso de animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, anexos 3, 4 e 5), a extração de células da medula óssea do rato Wistar doador foi realizada após a eutanásia do mesmo através da administração dos seguintes anestésicos: Ketamina intraperitoneal (solução a 50 mg/ml) e Xilazina intracardíaca (solução a 20 mg/ml). Conforme o peso do animal, seguindo os valores base de 80 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente.

As células da medula óssea foram obtidas das diáfises do fêmur e tíbia e preparadas para o transplante. A medula óssea foi mobilizada com agulha fina, lavada com uma pequena quantidade de meio de cultura e, sequencialmente, passada através de agulhas 12 e 22 g para produzir uma suspensão de células individuais.

As células foram então separadas, por centrifugação, em gradiente de densidade usando Histopaque®-1119 (Sigma Diagnostics, USA). Para tanto, as células foram ressuspensas com 30mL de meio de cultura DMEM, colocadas em 15mL de Histopaque® e centrifugadas a 400g, durante 30 minutos. A camada de células mononucleares foi retirada e lavada com 10 ml de DPBS e centrifugada a 1.500 rpm, por 3 minutos. A quantificação e viabilidade celular foram avaliadas pelo método de exclusão com azul tripan. As células foram ressuspensas a uma densidade de 10⁵ células/mL para plaqueamento e cultura.

Amostra.

Foram testados quatro grupos experimentais em triplicata, sendo A (PLGA puro), B (PLGA/rhGH), C (PLGA/PCL), D (PLGA/PCL/rhGH), utilizando superfície de placa de 2cm²¹⁸, e avaliados em relação a adesão e proliferação celular em 24 horas e 72 horas.

Ensaio de adesão celular através de coloração por DAPI.

Para avaliar a capacidade de adesão e proliferação celular, as células - tronco mesenquimais foram cultivadas sobre as matrizes poliméricas, na concentração de 10⁵ células por poço por 24 horas e 72 horas (n=2 em cada grupo, A - PLGA, B - PLGA + rhGH, C - PLGA/PCL, D - PLGA/PCL + rhGH). Após cada período de tempo, o meio de cultura foi aspirado e as matrizes lavadas com tampão PBS (do inglês *Phosphate Buffer Solution*) pH 7,4 (Gibco ®) e fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 minutos. As matrizes foram novamente lavadas com DPBS e então foi adicionado DAPI (5 mg/mL) e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Foram capturados 10 campos de cada grupo utilizando microscópio confocal LSM 5 Exciter (Zeiss) e os núcleos presentes sobre as matrizes foram quantificados utilizando o software Image Pro Plus® versão 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

Microscopia Eletrônica de Varredura por emissão de campo (MEV-FEG)

A morfologia das amostras poliméricas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS, através de microscópio modelo Inspect F50. As amostras produzidas foram fixadas com auxílio de uma fita dupla face condutora de carbono sobre um suporte (stub) e posteriormente recobertas com platina em um metalizador BALTEC SCD 005. As imagens foram registradas no modo de espalhamento elétrico usando uma onda elétrica de 8 KeV (tensão de aceleração). Os aumentos em

geral variaram de 1000x até 5.000x para observação das características topográficas das amostras.

Análise estatística.

A análise estatística foi realizada, através da digitação dos dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis pela mediana, o mínimo e o máximo. Foram comparados os dados dentro dos grupos pelo teste de Wilcoxon. Os dados entre grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e feita a ordenação por postos da variável para realizar as suas comparações múltiplas pelo teste *post-hoc* de Tukey. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados.

Em 24 horas, podemos observar, que o rhGH pareceu reduzir a capacidade de proliferação celular no polímero de PLGA, onde verificamos uma maior quantidade de células nas matrizes puras, grupo A, quando comparadas ao PLGA + rhGH. Enquanto que o polímero misto de PLGA/PCL puro e com rhGH, grupos C e D respectivamente, não apresentaram diferenças em 24 horas. Podemos visualizar estes resultados no período de 24 horas na tabela 1.

Em 72 horas, os polímeros associados ao hormônio do crescimento, apresentaram as maiores medianas e o maiores valores de proliferação celular, sendo o grupo B (PLGA + rhGH) com maiores valores, seguido pelo grupo D (PLGA/PCL + rhGH) mas, apesar deste destaque, não foram significativamente maiores que os outros grupos sem GH (A e C) e também sem diferenças estatísticas entre eles. Podemos visualizar estes resultados dos períodos de 24 e 72 horas na tabela 1.

Tabela 1. Tabela comparativa da proliferação celular dentro dos grupos ao longo do tempo.

	24hs	72hs	P*
PLGA	13,5 (11,0-17,0)	58,0 (46,0-76,0)	0,005
PLGA+GH	7,0 (3,0 -12,0)	87,5 (41,0 -115,0)	0,005
PLGA/PCL	10,0 (5,0 -16,0)	54,5 (33,0 -79,0)	0,005
PLGA/PCL+GH	12,5 (5,0 -18,0)	62,5 (40,0 -85,0)	0,005
P**	<0,001	0,104	

Dados apresentados pela mediana (mínimo - máximo) da proliferação celular. * P obtido através do teste de Wilcoxon; ** P obtido através do teste de Kruskal-Wallis estatisticamente.

É interessante salientar, que quando analisamos os resultados comparando a diferença da proliferação celular de 24 horas para 72 horas, e não somente os resultados do período, verificamos que o grupo B (PLGA + rhGH) apresentou a maior diferença de proliferação (delta), em relação ao grupo A, que obteve o menor crescimento de um período para o outro. Esta diferença significativa de proliferação celular de um período para o outro não se visualizou no polímero misto (grupos C e D), que mantiveram resultados semelhantes relacionados à proliferação celular. Outro interessante aspecto, se refere à porcentagem da diferença da proliferação celular, esta, significativamente maior no grupo B (PLGA + rhGH), que todos os outros grupos testados, Estes últimos resultados descritos na tabela 2 e com imagens da contagem celular no software Image Pro Plus® nas figuras 1, 2, 3 e 4.

Tabela 2. Tabela comparativa do delta (proliferação em 72hs – proliferação em 24hs) e do percentual de mudança ((proliferação 72hs - proliferação 24hs)/proliferação 24hs)*100) entre os grupos.

	Delta	Percentual de mudança
PLGA	46 (29-63)	352 (171-525)
PLGA+GH	81 (34 -108)	1157 (370 -3333)
PLGA/PCL	46 (25 -69)	481 (300 -880)
PLGA/PCL+GH	51 (28 -73)	428 (214 -920)
P*	0,046	0,002

Dados apresentados pela mediana (mínimo - máximo) da proliferação celular.; * P obtido através do teste de Kruskal-Wallis.^{a,b,c} letras diferentes representam dados diferentes estatisticamente.

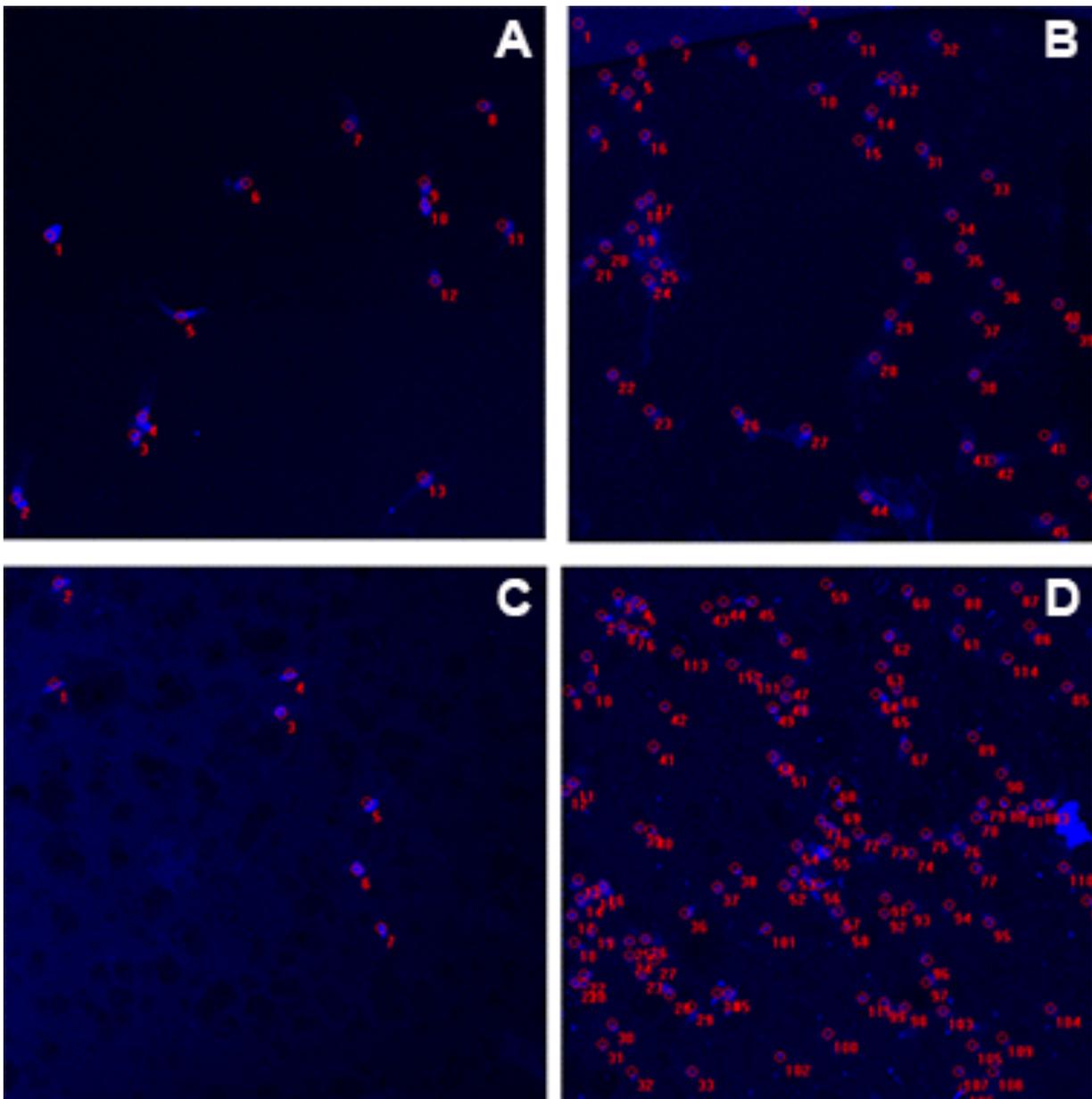


Figura 1. As fotomicrografias mostram a adesão celular nas estruturas de polímero à base de PLGA e a contagem dos núcleos das células no Software Image-Pro Plus: PLGA em 24 horas (A) e 72 horas (B), e PLGA + rhGH em 24 horas (C) e 72 horas (D).

As eletromicrografias capturadas em microscópio eletrônico de varredura foram utilizadas para avaliar a adesão das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea. Todas as matrizes, PLGA e PLGA/PCL com e sem o rhGH, apresentaram superfície porosa e com suaves diferenças topográficas relativamente regulares. Entretanto, visualmente, as matrizes de PLGA parecem apresentar uma microrugosidade mais marcante, do que as matrizes de PLGA/PCL, e na associação PLGA + rhGH, com a presença de microporos, ainda mais evidente este aspecto do que o PLGA puro. O grupo D (PLGA/PCL + rhGH), também apresenta uma rugosidade maior quando comparado ao grupo C (PLGA/PCL).

No período de 24 horas, não se evidenciaram a presença de células aderidas na superfície do biomaterial, o qual pode ser verificado facilmente em 72 horas, onde a proliferação celular e conseqüente aumento da quantidade das células se tornou mais evidente e com marcada adesão à superfície do biomaterial com emissão de prolongamentos celulares para o seu interior, podemos observar esta informação nas figuras 5,6,7 e 8 e figuras 9,10,11 e 12.

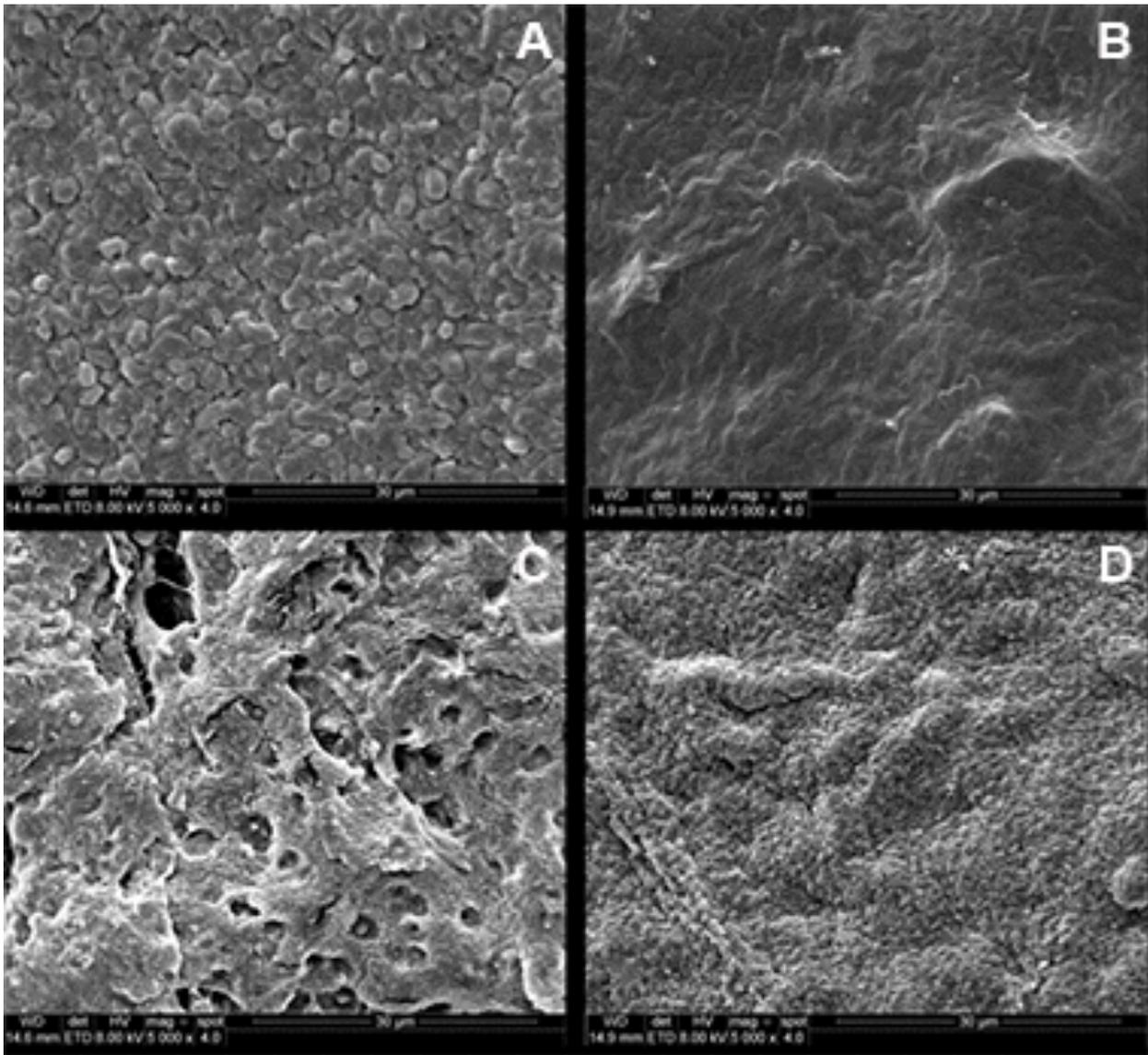
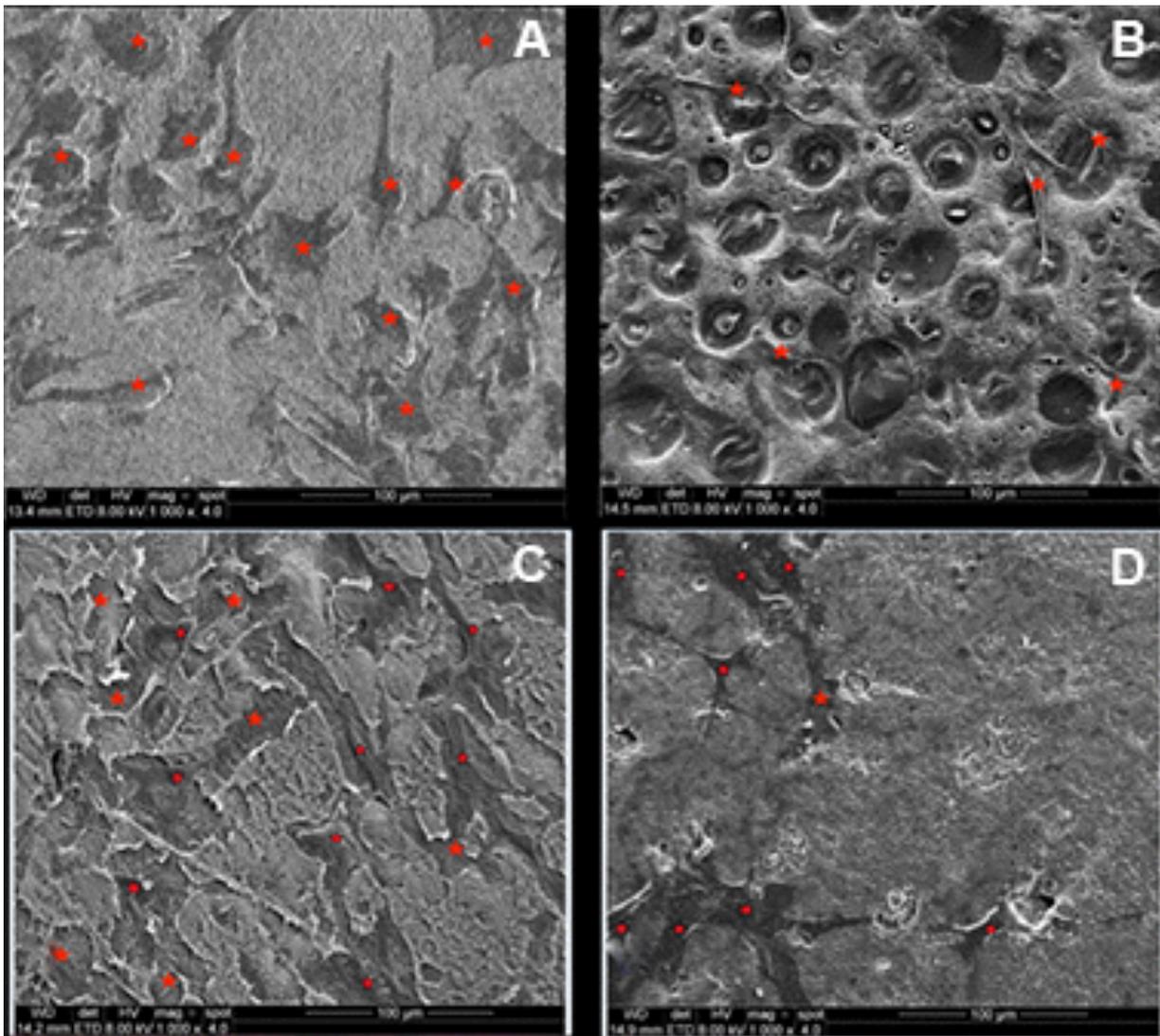


Figura 2. Características topográficas de todos os quatro arcabouços de polímero em 24 horas (ampliação x 5000): (A) PLGA, (B) PLGA / PCL, (C) PLGA + rhGH, e (D) PLGA / PCL + rhGH. Polímeros de PLGA, combinada ou não com rhGH, mostraram rugosidade maior do que PLGA/PCL. O rhGH parece aumentar a rugosidade dos biomateriais, com uma rugosidade mais acentuada com maior presença de microporos, principalmente em (C).



★ = Células tronco mesenquimais aderidas ao arcabouço.

Figura 3. Características topográficas de todos os quatro arcabouços de polímero em 72 horas (ampliação x 1000): (A) PLGA, (B) PLGA / PCL, (C) PLGA + rhGH, e (D) PLGA / PCL + rhGH. Marcante adesão celular à superfície do biomaterial com as células que formam extensões na matriz em todos os grupos; No entanto, isto ocorreu mais facilmente nos polímeros de PLGA, especialmente quando combinado com a rhGH (C).

Discussão.

Com os resultados obtidos através deste estudo, podemos observar que as matrizes poliméricas utilizadas como arcabouço e liberação de fármacos, parecem ser uma interessante opção para o desenvolvimento de biomateriais. A adesão celular foi verificada, assim como foi permitida a proliferação celular entre os períodos de 24 horas para 72 horas. Outros estudos com arcabouços de PLGA demonstram um bom potencial de adesão e proliferação celular do PLGA, que muitas vezes se encontra associado com outros materiais, como outros polímeros e fibras, entre eles quitosan e fibras de seda, assim como, HA (hidroxiapatita) e TCP (tricálcio fosfato), também a PCL associada ao próprio PLGA e outros materiais como os acima citados. Estes polímeros demonstram interessante potencial na engenharia tecidual, com resultados promissores para adesão e proliferação celular.^{15,16,17,18,19}

Neste estudo, associamos ao PLGA, outro polímero, o PCL e também o hormônio do crescimento humano (rhGH), com o objetivo de liberação lenta do hormônio e aumento da proliferação celular. Podemos observar duas situações bastante interessantes, inicialmente o rhGH parece inibir o crescimento celular, já que se encontrou com menor contagem celular que os polímeros puros. Entretanto, foi marcada a diferença entre 72 horas e 24 horas, principalmente quando convertemos os dados em porcentagem, no que diz respeito a proliferação celular. A associação do PLGA ao rhGH proporcionou uma diferença de crescimento celular, sendo significativamente maior do que o crescimento da células sobre o arcabouço de PLGA puro, e também maior do que o PLGA associado ao PCL com e sem rhGH.

Estudo demonstrou um bom potencial na associação do PLGA com rhGh, através da injeção de microesferas, para liberação lenta da substância durante 40 dias em ratos hipofisectomizados, surgindo como boa opção de liberação prolongada de GH, surgindo o efeito desejado de aumento de peso.²⁰

Foi relatado, que a incorporação de PLGA, ao PCL, pode aumentar a adesão de células ósseas, o PCL sofre uma degradação mais lenta que o PCL, mas isoladamente não apresenta afinidade com células ósseas, por este motivo foi testado associado ao PLGA no presente estudo, pois teríamos 30 % de um polímero com degradação lenta , interessante na manutenção de um arcabouço por um maior período de tempo, associado ao PLGA que melhora a adesão de osteoblastos ao PCL. ²¹

As características hidrofóbicas e hidrofílicas de um polímero são fundamentais para determinar seu tempo de degradação e conseqüentemente a liberação mais lenta de um fármaco. Por este motivo utilizamos o PLGA 85:15, pois o PGA é mais hidrofílico do que o PLA, o que aumentaria a velocidade de sua degradação, por isso a predominância do PLA em nossa escolha.²¹ Devido aos bons resultados com células mesenquimais, principalmente a indução à maior proliferação celular com o passar do tempo do PLGA associado ao rhGH, seria interessantes novas pesquisas de aplicação clínica, em defeitos ósseos por exemplo.

Ao verificar nas eletromicrografias a superfície do biomaterial testado, podemos visualizar a microrrugosidade presente nos polímeros, neste contexto, é interessante salientar que o rhGH alterou suavemente a topografia do polímero, aumentando sua rugosidade, o que pode ser favorável para adesão celular. Estudos com alteração de superfície de implantes dentários demonstram que microrrugosidades e alterações de superfície podem favorecer a adesão celular, acelerando e melhorando a qualidade da osseointegração, com maior BIC (do inglês - bone interface contact). Assim como do osso à substitutos ósseos utilizados em enxertos de seio maxilar, a microrrugosidade do biomaterial é um importante característica.^{22, 23, 24, 25}

Acreditamos que pode ser viável o uso de arcabouço de PLGA, associado ao rhGH em tratamentos de defeitos ósseos maxilofaciais, talvez associado à outros biomateriais, como substitutos ósseos, entre eles hidroxiapatita, CaP (Cálcio fosfato) e β -TCP (beta

tricálcio fosfato), que possuem alguns promissores resultados associados ao PLGA.^{18,26,27,28} Kokovic, em 2011, demonstrou bons resultados utilizando β -TCP associado ao PLGA, para dar formato de raiz, em enxerto alveolar após exodontia, com o objetivo de manter o volume ósseo para posterior instalação de implante dentário.²⁷

Seria interessante talvez, associar o rhGH à outros biomateriais, para verificar o comportamento em procedimentos de enxertos ósseos, preservação de alvéolo dentário, seio maxilar e ROG (regeneração óssea guiada). o PLGA permitiria “formatar” o enxerto em diversos formatos, assim como Kokovic, em 2011, utilizando em formato de raiz dentária²⁷, ou em diferentes blocos e/ou membranas associadas ao GH e outros biomateriais como aqui sugerido. Em seu estudo, Kwon, em 2010²⁹, utilizou Fator de crescimento rhGDF-5, associado ao PLGA e β -TCP em defeitos periodontais, em modelo animal, e sugeriu que o rhGDF-5 parece influenciar na degradação do biomaterial e influenciar acelerando a remodelação óssea. Outro estudo, de Zou, 2012³⁰, utilizando PLGA associado à bFGF, em implantes instalados em ratos portadores de diabetes, verificou que o bFGF pode influenciar acelerando o processo de osseointegração. Em estudo semelhante, em coelhos, à aplicação do rhGH no alvéolo cirúrgico previamente a instalação do implante, contribuiu para acelerar o processo de osseointegração.³¹ Entretanto um maior número de pesquisas se fazem necessárias para tais possibilidades, principalmente relacionado à dose e tipo de fator de crescimento, mas é inegável que os polímeros e fatores de crescimento possuem um grande potencial futuro de aplicações clínicas.

Conclusões.

Com as limitações deste estudo, podemos concluir que matrizes de PLGA e PCI, associados ou não ao rhGH, apresentam potencial em engenharia tecidual, na fabricação de arcabouços para adesão e proliferação celular.

O hormônio do crescimento humano, pareceu, neste estudo contribuir para uma maior proliferação de células mesenquimais, principalmente quando incorporado ao PLGA. Biomateriais poliméricos para liberação lenta de fármacos, associados à fatores de crescimento, entre estes o rhGH, surgem como uma interessante opção futura em procedimentos reconstrutivos na região maxilofacial, logicamente, novos estudos são necessários para um maior esclarecimento sobre tal potencial.

Referências

1. Yoon St, Boden SD. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clin Orthop Relat Res.* 2002(395):33-43.
2. Yang S, Cao L, Cai S, Yuan J, Wang J. A systematic review of growth hormone for hip fractures. *Growth Horm IGF Res* 2012; 22(3):97-101.
3. Pagnoncelli RM, Gerzson AS, Camilotti RS, Jasper J, J Böing F. Hormônio do crescimento humano e a perspectiva futura em Odontologia. *RFO, Passo Fundo*, v. 19, n. 3, p. 379-383, set./dez. 2014
4. Tran Gt, Pagkalos J, Tsiridis E, Narvani Aa, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E. Growth hormone: does it have a therapeutic role in fracture healing? *Expert Opin Investig Drugs.* 2009 Jul; 18(7): 887- 911.
5. Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, et al. Human growth hormone locally released in bone sites by calcium-phosphate biomaterial stimulates ceramic bone substitution without systemic effects: a rabbit study. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4):739-48.
6. Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres JA. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(6):807-11.
7. Chu xh, Xu Q, Feng ZQ, Xiao JQ, Qiang Li, Sun XT, Cao Y and DinG YT. In vitro biocompatibility of polypyrrole/PLGA conductive nanofiber scaffold with cultured rat hepatocytes. *Mater. Res. Express* 1 (2014) 035402
8. Tang ZG, Hunt JA. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro. *Biomaterials* 27 (2006) 4409–4418
9. Makadia HK and Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011, 3, 1377-1397; doi:10.3390/polym3031377
10. Wu XS, Wang N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12:21–34.
11. Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai H, Leite SM, Tamada JA, Uyama S, Vacanti JP, Langer R, Mikos AG. In vitro and in vivo degradation of porous poly(-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials.* 2000;21:1837–1845.

12. Alexis F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly (lactic acid) and poly [(lactic acid)-co-(glycolic acid)] *Polym Int.* 2005;54:36–46.
13. Sun H, Mei L, Song C, Cui X, Wang P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials.* 2006; 27:1735–1740
14. Rezende, C.A.; Luchesi, C.; Barbo, M^aL.P.; Duek, E.A.R. Membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação in vitro e in vivo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 3, p. 232-238, 2005.
15. Razavi S, Karbasi S, Morshed M, Esfahan HZ, Golozar M, Ph.D, Vaezifar S. Cell Attachment and Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells on PLGA/Chitosan Electrospun Nano-Biocomposite. *CELL JOURNAL*, Vol 17, No 3, Autumn 2015
16. Jo AR, Hong MW, Lee JH, Kim YY and Cho YS. Fabrication of Cylindrical PCL Scaffolds Using a Knitting Technique and Assessment of Cell Proliferation in the Scaffolds. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 11, No. 1, pp 16-22 (2014)
17. Yu L, Feng Y, Li Q, Hao X, Liu W, Zhou Whi C, Ren X, Zhang W. PLGA/SF blend scaffolds modified with plasmid complexes for enhancing proliferation of endothelial cells. *Reactive & Functional Polymers* 91–92 (2015) 19–27
18. Qian J, Xu M, Suo A, Yang T, Yong X. An innovative method to fabricate honeycomb-like poly(ϵ -caprolactone)/nano-hydroxyapatite scaffolds. *Materials Letters* 93 (2013) 72–76
19. Ghorbani FM, Babak Kaffashi B, Shokrollahi P, Seyedjafari E, Abdolreza A. PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation. *Carbohydrate Polymers* 118 (2015) 133–142
20. Kang J, Wu F, Cai Y, Xu M, He M, Yuan W. Development of Recombinant Human Growth Hormone (rhGH) sustained-release microspheres by a low temperature aqueous phase/aqueous phase emulsion method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 62 (2014) 141–147
21. Alexis F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly (lactic acid) and poly [(lactic acid)-co-(glycolic acid)] *Polym Int.* 2005;54:36–46
22. Shtansky DV, Batenina IV, Yadroitsev IA, Ryashin NS, Ph.V. Kiryukhantsev-Korneev PhV, Kudryashov AE, Sheveyko AN, Zhitnyak IY, Gloushankova NA, Smurov IY, Levashov EA. A new combined approach to metal-ceramic implants with controllable surface topography, chemistry, blind porosity, and wettability. *Surface & Coatings Technology* 208 (2012) 14–23
23. Hung KY, Lo SC, Shih CS, Yang YC, Feng HP, Lin YC. Titanium surface modified by hydroxyapatite coating for dental implants. *Surface & Coatings Technology* 231 (2013) 337–345
24. Rickert D, Slater JJRH, H. J. A. MeijeR HJA, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factors or (solely) bone substitutes. A systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2012; 41: 160–16725.
25. Pettinicchio M, Traini T, Murmura G, Caputi S, Degidi M, Mangano C, Piatteli A. Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans. *Clinical Oral Investigations*, February 2012, Volume 16, Issue 1, pp 45-53
26. Li D, Sun H, Jiang L, Zhang K, Liu W, Zhu Y, Fangteng J, Shi C, Zhao L, Sun H and Yang B. Enhanced Biocompatibility of PLGA Nanofibers with Gelatin/Nano- Hydroxyapatite Bone Biomimetics Incorporation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 9402–9410
27. Kokovic V, Todorovic L. Preimplantation filling of tooth socket with β -tricalcium phosphate/poly(lactic-polyglycolic acid) (β -TCP/PLGA) root analogue: clinical and histological analysis in a patient. *Vojnosanit Pregl* 2011; 68(4): 366–371.

28. Reis ECC, Borges APB, Michel, Araújo MVF, Mendes VC, Guan L, Davies JE. Periodontal regeneration using a bilayered PLGA/calcium phosphate construct. *Biomaterials* 32 (2011) 9244e9253
29. Kwon DH, Bischoff FC, Herold RW, Pompe C, Bastone P, Rodriguez NA, Susin C and Ulf Wikesjö UME. Periodontal wound healing/ regeneration following the application of rhGDF-5 in a b-TCP/PLGA carrier in critical-size supra-alveolar periodontal defects in dogs. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 667–674 doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01569.x
30. Zou GK, Song YL, Zhou W, Yu M, Liang LH, Sun DC, Li DH, Deng ZX, and Zhu WZ. Effects of local delivery of bFGF from PLGA microspheres on osseointegration around implants in diabetic rats. *Oral And Maxillofacial Surgery*, Vol. 114 No. 3 September 2012
31. Abreu ME, Valiati R, Hubler R, Moraes AN, Antonini F, de Oliveira Hdo C, Pagnoncelli RM. Effect of Recombinant Human Growth Hormone on Osseointegration of Titanium Implants: A Histologic and Biomechanical Study in Rabbits. *J Oral Implantol*. 2015 Aug;41(4):e102-9.

7. Considerações finais.

Os resultados do presente trabalho, relacionados à citotoxicidade, concordam com a hipótese de que as matrizes poliméricas associadas ao rhGH apresentam viabilidade celular para serem utilizadas em um meio biológico, e em alguns momentos do experimento, o rhGH contribuiu, inclusive, para um aumento estatístico desta viabilidade celular, apesar de esta ser considerada praticamente 100% ou próxima, em todos os grupos, em grande parte dos períodos testados. Esta característica foi marcante principalmente nos grupos com PLGA, onde a associação com o rhGH demonstrou diferença significativa de viabilidade após 72 horas, comparado ao grupo E (controle).

Relacionado à proliferação celular, os resultados concordam parcialmente com a hipótese, pois os resultados apresentaram diferenças significativas no crescimento celular, quando levado em consideração a diferença de 72 horas para 24 horas (delta), e principalmente na porcentagem de mudança de um período para o outro, onde em 72 horas houve diferença significativa do PLGA + GH (grupo B) para todos os outros grupos, demonstrando a maior porcentagem de proliferação celular. Em 24 horas o GH parece dificultar a proliferação, pois os polímeros puros apresentaram maior contagem de núcleos no período, situação que se inverte no período de 72 horas com vantagens para os polímeros com GH, principalmente o grupo B.

Biomateriais poliméricos associados à fatores de crescimento para liberação local lenta do fármaco, parece ser uma alternativa de grande potencial futuro em procedimentos reconstrutivos. Neste aspecto podemos salientar o PLGA associado ao GH, e talvez, em conjunto com outras substâncias, para isso, mais estudos são necessários para elucidar tais questões de pesquisa e desenvolver novos biomateriais.

Referências

1. Chan, C., Thompson, I., Robinson, P., Wilson, J., Hench, L. Evaluation Of Bioglass/ Dextran Composite As A Bone Graft Substitute. *Int. Journal Oral Maxillofac Surg*, V. 31, P. 73-77, 2002.
2. Carvalho, P. S. P., Bassia, A. P. F., Violin, L. A. “ Revisão E Proposta De Nomenclatura Para Biomateriais “. *Implant News*, V. 3, P. 256-261, 2004.
3. Wheeler, Sl.; Holmes, Re.; Calhoun, C J. Six-Year Clinical And Histologicstudy Of Sinus-Lift Grafts. *International Journal Oral Maxillofacial Implants*. V.11, P.26-34, 1996.
4. Paleckis, L.; Et Al. Enxerto Ósseo Autógeno - Por Que E Como Utilizá-Lo. *Implantnews*. V.2, No.4, 2005.
5. Yoon St, Boden Sd. Osteoinductive Molecules In Orthopaedics: Basic Science And Preclinical Studies. *Clin Orthop Relat Res*. 2002(395):33-43.
6. Eriksen Ef, Kassen M, Langdhl B. Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors And Bone Remodeling. *Eur J Clin Investig*. 1996; 26: 225-34.
7. Ohlsson C, Bengtsson B, Isaksson Ogo, Andreassen Tt, Sloomweg Mc. Growth Hormone And Bone. *Endocr Rev*.1998; (19) 1: 55-79.
8. Varkey M, Gittens Sa, Uludag H. Growth Factor Delivery For Bone Tissue Repair: An Update. *Expert Opin Drug Deliv*. 2004 Nov; 1(1):19-36.
9. Guyton Ac, Hall Je. *Textbook Of Medical Physiology*. 11Th Ed. Philadelphia: Saunders, 2006.
10. Simpson Ah, Mills L, Noble B. The Role Of Growth Factors And Related Agents In Accelerating Fracture Healing. *J Bone Joint Surg Br*. 2006 Jun; 88 (6): 701-5.
11. Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicine*. 23 Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.
12. Tran Gt, Pagkalos J, Tsiridis E, Narvani Aa, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E. Growth Hormone: Does It Have A Therapeutic Role In Fracture Healing? *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Jul; 18(7):887- 911.
13. Pamula E, Kokoszka J, Cholewa-Kowalska K Et Al. Degradation, Bioactivity, And Osteogenic Potential Of Composites Made Of Plga And Two Different Sol–Gel Bioactive Glasses. *Biomedical Engineering*. 2011 Aug. 39 (8) 2114–2129.
14. Soares Aq; Oliveira L; François Et Al. Polímeros Biodegradáveis: Novas Prespectivas Para Ciências Farmacêuticas. *Rev. Eletrônica De Farmácia*. 2005 2 (2).
15. Cohen D. *Biomaterials In Cardiology*. (Inspiredmd Corporation, Dereh Hashalom 4, Tel–Aviv). Disponível Em: <[Http://Chemistry.Org.II/Booklet/22/Pdf/Ilana_Cohen.Pdf](http://Chemistry.Org.II/Booklet/22/Pdf/Ilana_Cohen.Pdf)>. Acesso Em: 10 Agosto 2012.

16. Helmus M, Gibbons D, Cebon D. Biocompatibility: Meeting A Key Functional Requirement Of Next-Generation Medical Devices. *Toxicologic Pathology* Jan 2008; 36:70-80.
17. Hench LI. Biomaterials: A Forecast For The Future. *Biomaterials* 1998 Aug;19(16): 1419-23.
18. Barbanti S, Zavaglia C, Duek E. Polímeros Bioreabsorvíveis Na Engenharia De Tecidos. *Polímeros: Ciência E Tecnologia* Jan 2005; 15(1):13-21.
19. LEe Jy, Bashur Ca, Milroy Ca, Forciniti L, Goldstein As, Schmidt Ce. Nerve Growth Factor-Immobilized Electrically Conducting Fibrous Scaffolds For Potential Use In Neural Engineering Applications. *Ieee Transactions On Nanobioscience*, Vol. 11, No. 1, March 2012
20. Chu Xh, Xu Q, Feng Zq, Xiao Jq, Qiang Li, Sun Xt, Cao Y And DinG Yt. In Vitro Biocompatibility Of Polypyrrole/Plga Conductive Nanofiber Scaffold With Cultured Rat Hepatocytes. *Mater. Res. Express* 1 (2014) 035402
21. Tang Zg, Hunt Ja. The Effect Of Plga Doping Of Polycaprolactone Films On The Control Of Osteoblast Adhesion And Proliferation In Vitro. *Biomaterials* 27 (2006) 4409–4418
22. Makadia Hk And Siegel Sj. Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (Plga) As Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011, 3, 1377-1397; Doi:10.3390/Polym3031377
23. Wu Xs, Wang N. Synthesis, Characterization, Biodegradation, And Drug Delivery Application Of Biodegradable Lactic/Glycolic Acid Polymers. Part Ii: Biodegradation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12:21–34.
24. Lu L, Peter Sj, Lyman Md, Lai H, Leite Sm, Tamada Ja, Uyama S, Vacanti Jp, Langer R, Mikos Ag. In Vitro And In Vivo Degradation Of Porous Poly(-Lactic-Co-Glycolic Acid) Foams. *Biomaterials.* 2000;21:1837–1845.
25. Alexis F. Factors Affecting The Degradation And Drug-Release Mechanism Of Poly (Lactic Acid) And Poly [(Lactic Acid)-Co-(Glycolic Acid)] *Polym Int.* 2005;54:36–46.
26. Sun H, Mei L, Song C, Cui X, Wang P. The In Vivo Degradation, Absorption And Excretion Of Pcl-Based Implant. *Biomaterials.* 2006; 27:1735–1740
27. Barros Pp, Cassu Sn, Zoppi Ra, Reis Ns, Dotto Pi, Marão Re, Caparroz Pg. Implantes De Blendas De Policaprolactona E Nafion® Em Tíbia De Ratos. *Rev. Ciênc. Méd., Campinas,* 15(2):123-130, Mar./Abr., 2006
28. Tang Zg, Hunt Ja. The Effect Of Plga Doping Of Polycaprolactone Films On The Control Of Osteoblast Adhesion And Proliferation In Vitro. *Biomaterials.* 2006; 27 4409–4418
29. Díaz E, Sandonis I, Valle Mb. In Vitro Degradation Of Poly(Caprolactone)/Nha Composites. *Journal Of Nanomaterials.* Volume 2014, Article Id 802435, 8 Pages

30. 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
31. Tresguerres If, Blanco L, Clemente C, Tresguerres Ja. Effects Of Local Administration Of Growth Hormone In Peri-Implant Bone: An Experimental Study With Implants In Rabbit Tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(6):807-11.
32. Yang S, Cao L, Cai S, Yuan J, Wang J. A Systematic Review Of Growth Hormone For Hip Fractures. *Growth Horm Igf Res* 2012; 22(3):97-101.
33. Litsas G. Growth Hormone Therapy And Craniofacial Bones: A Comprehensive Review. *Oral Dis* 2013; 19(6):559-67.
34. Pagnoncelli Rm, Gerzson As, Camilotti Rs, Jasper J, J Böing F. Hormônio Do Crescimento Humano E A Perspectiva Futura Em Odontologia. *Rfo, Passo Fundo, V. 19, N. 3, P. 379-383, Set./Dez. 2014*
35. Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, Et Al. Human Growth Hormone Locally Released In Bone Sites By Calcium-Phosphate Biomaterial Stimulates Ceramic Bone Substitution Without Systemic Effects: A Rabbit Study. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4):739-48.
36. Weng D, Poehling S, Pippig S, Bell M, Richter Ej, Zuhr O, Et Al. The Effects Of Recombinant Human Growth/Differentiation Factor 5 (Rhgdg-%) On Bone Regeneration Around Titanium Dental Implants In Barrier Membrane Protected Defects: A Pilot Study In The Mandibule Of Beagles Dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24(1):31-7.
37. Hammerle, C.H. & Jung, R.E. Bone Augmentation By Means Of Barrier Membranes. *Periodontology* 2000, 2003 (33): 36–53.
38. Froum Aj, Wallace Ss, Cho S-C, Elian N, Tarnow D. Histomorphometric Comparison Of A Biphasic Bone Ceramic To Anorganic Bovine Bone For Sinus Augmentation: 6 To 8 Month Postsurgical Assesment Of Vital Bone Formation. A Pilot Study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008. 28. 273 – 281.
39. Bottino Mc, Thomas V. Membranes For Periodontal Regeneration--A Materials Perspective. *Front Oral Biol*. 2015;17:90-100
40. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar Ridge Preservation With Guided Bone Regeneration And A Synthetic Bone Substitute Or A Bovine-Derived Xenograft: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *Clin. Oral Impl. Res*. 21, 2010; 688-698.
41. Araujo M, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss Collagen In The Buccal Gap At Immediate Implants: A 6-Month Study In The Dog. *Clin Oral Impl Res* 22, 2011; 1-8.
42. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary Sinus Floor Augmentation With Bio-Oss Or Bio-Oss Mixed With Autogenous Bone As Graft: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jan;41(1):114-20.
43. Lindgren C, Mordenfeld A, Hallman M. A Prospective 1-Year Clinical And Radiographic Study Of Implants Placed After Maxillary Sinus Floor Augmentation With Synthetic Biphasic Calcium Phosphate Or Deproteinized Bovine Bone. *Clin Imp Dent And Rel Res*. 2012. 14.

					Mais
--	--	--	--	--	------

Clinical Oral Implants Research - Manuscript ID COIR-Apr-16-OR-5509

Lixeira

**coir@zmk.unibe.ch** por manuscriptcentral.com

22:05 (Há 11 horas)

para mim, brigitte.baur

Esta mensagem foi excluída. [Restaurar mensagem](#)

inglês

português

[Traduzir mensagem](#)[Desativar para:](#)

10-Apr-2016

Dear Dr. Gerzson:

Your manuscript entitled "Assessment of the viability of NIH3T3 fibroblast cells cultured in polymer matrices with rhGH" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Oral Implants Research.

Your manuscript ID is COIR-Apr-16-OR-5509.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/coir> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/coir>.

Thank you for submitting your manuscript to Clinical Oral Implants Research.



Alexandre da Silveira Gerzson <alexandregerzson@gmail.com>

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants - JOMI-2016-103 - (5326): Manuscript submission confirmation

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants
<jomi@manuscriptmanager.com>
Para: alexandregerzson@gmail.com

29 de fevereiro de 2016
16:31

Manuscript: JOMI-2016-103 - (5326) - Assessment of adhesion and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in polymer matrices with rhGH

Dear Dr Gerzson

Automatic notification:

Thank you very much for submitting the above manuscript.

The manuscript is being evaluated and we will contact you as soon as a decision has been made.

Please inform us by return of email if the version posted on the web site does not correspond with the version that was submitted.

The progress of your manuscript can be followed from the progress report accessed from your account overview.

Yours sincerely,

The Editorial Office

Website:

www.manuscriptmanager.com/jomi

Email: alexandregerzson@gmail.com

Forgot password? Use CAN'T ACCESS MY ACCOUNT link on the login page above to reset your password.

Ofício 01/14 - CEUA

Porto Alegre, 04 de fevereiro de 2014.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00359, intitulado “**Avaliação da viabilidade, adesão e proliferação de células tronco da medula óssea e fibroplastos NIH3T3 cultivadas em matriz de PLGA com RHGH**”.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
03	Wistar	01/03/14 – 01/03/15

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 29 de maio de 2013

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0024/13

Intitulado: Avaliação da viabilidade, adesão e proliferação de células tronco da medula óssea e fibroastos NIH3T3 cultivadas em matriz de PLGA com RHGH.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

Pesquisadores Associados: Alexandre da Silveira Gerzson

Nível: Tese / Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 29 de maio de 2013.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS.

Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes
Coordenadora da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS



Código SIPESQ: 5219

Porto Alegre, 27 de janeiro de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Subprojeto de Pesquisa "Avaliação da viabilidade, adesão e proliferação de células tronco da medula óssea e fibroblastos NIH3T3 cultivadas em matriz de PLGA com rhGh." coordenado por ROGERIO MIRANDA PAGNONCELLI, vinculado ao Projeto Guarda-Chuva "1741 - Produção e Caracterização de Implantes Nanotexturizados de Titânio Associado ao Hormônio de Crescimento Humano (HGH)" coordenado por ROBERTO HUBLER.

Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA
