

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Henrique do Couto de Oliveira

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE MATRIZES DE PLGA COM
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO RECOMBINANTE
HUMANO: ANÁLISE ESTRUTURAL E DINÂMICA DE
LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO.**

Porto Alegre

2015

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Henrique do Couto de Oliveira

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE MATRIZES DE PLGA COM
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO RECOMBINANTE HUMANO:
ANÁLISE ESTRUTURAL E DINÂMICA DE LIBERAÇÃO DO
HORMÔNIO.**

**Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.**

Linha de pesquisa: Diagnóstico e Terapêutica

Orientador: Rogério Miranda Pagnoncelli

Porto Alegre

2015

Agradecimentos

À Deus, acima de tudo.

Aos meus pais, Nilo e Carmelita, e ao meu irmão, Felipe, por todo apoio incondicional diante de toda e qualquer dificuldade e por estarem sempre presentes em meu coração.

Às minhas sobrinhas, Júlia e Sofia, por sempre me proporcionarem um sorriso sincero, independente do momento.

À minha noiva, Letícia, por todo amor.

A todos os amigos que, longe ou perto, sempre contribuíram e vão continuar contribuindo a todo momento para meu crescimento.

A todos os professores da Odontologia da PUCRS, destacando, obviamente, meu Orientador, Rogério Miranda Pagnoncelli, pela grande oportunidade.

À Prof. Rosane Ligabue e à aluna do curso de doutorado da Química, Fabiana Gonçalves por toda a paciência e contribuição notáveis.

A todos os colegas de mestrado da CTBMF, em especial ao grande parceiro Fernando Antonini.

A todos os demais funcionários da PUCRS, em especial do INTOX, do LABCEMM e do LOR-FAQUI.

À Força Aérea Brasileira

Muito Obrigado!!!

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque no além, para onde tu vais, não há obra, nem projetos, nem conhecimento, nem sabedoria alguma.”

Eclesiastes 9:10

Resumo

Fatores de crescimento como o hormônio do crescimento humano recombinante vêm ganhando atenção no campo da reconstrução óssea. No entanto, devido à sua meia-vida curta, polímeros biodegradáveis, como o PLGA, vêm sendo utilizados visando liberação mais lenta e controlada deste hormônio quando de sua aplicação tópica.

Objetivo: Avaliar, *in vitro*, o comportamento de matrizes de PLGA com 2 concentrações diferentes de rhGH.

Materiais e Métodos: Três grupos de amostras em triplicatas foram montados: grupo I com PLGA puro (controle); grupo II com PLGA associado ao rhGH em maior concentração e; grupo III com PLGA associado ao rhGH em menor concentração. Cada grupo foi analisado macroscopicamente e microscopicamente (MEV) e, por meio de teste de degradação hidrolítica, avaliou-se a dinâmica de liberação do rhGH assim como as alterações de pH no meio de incubação ao longo de 29 dias.

Resultados: As matrizes dos 3 grupos de estudo ficaram com características morfológicas indistinguíveis macro e microscopicamente. O grupo II liberou maior quantidade de rhGH que o grupo III, como era o esperado, no entanto, não houve um padrão claro de liberação em ambos os grupos. A liberação de rhGH foi observada até o 22º dia de avaliação e não houve diferença estatística na perda de massas entre os grupos. Os valores de pH encontrados foram compatíveis com a aplicação clínica.

Conclusão: As propriedades morfológicas devem ser avaliadas conforme a aplicação do material e do tecido alvo a ser regenerado/substituído e não foi possível estabelecer um padrão de distribuição do rhGH nas matrizes de PLGA neste estudo. As matrizes podem ser utilizadas como carreadoras de rhGH tendo sido capazes de prolongar a liberação do hormônio por um período de 22 dias. A perda de massas se manteve igual (estatisticamente), a despeito da adição do rhGH ao polímero. O pH das amostras se mostrou favorável à aplicação clínica das matrizes e a redução nas concentrações de rhGH para estudos futuros não deve ser avaliada por esta metodologia, visto que podem se tornar de difícil leitura pelo EAU-Vis

Palavras-chave: Hormônio do crescimento, materiais biocompatíveis, PLGA.

Abstract

Growth factors such as the recombinant human growth hormone are drawing attention on the field of bone reconstruction. However, due to the protein's short half-life, biodegradable polymers, like PLGA, have been applied seeking a slower and controlled drug release for topical applications.

Objective: To assess, *in vitro*, the behavior of PLGA matrices with 2 different rhGH concentrations.

Materials and Methods: Three groups of triplicate samples were created: group I with pure PLGA (control), group II with PLGA loaded with a higher rhGH concentration and group III with PLGA loaded with a lower concentration of the hormone. Each group was analyzed macro and microscopically (SEM) and, by means of the hydrolytic degradation test, the dynamics of release of rhGH as well as the alterations on the pH of the incubation medium were evaluated, throughout 29 days.

Results: Matrices from all groups showed indistinguishable macro and microscopic features. Group II released a higher quantity of rhGH, as expected, however there was no clear release pattern on both groups. rhGH release was observed until the 22^o day and there was no statistically significant difference on weight loss between the 3 groups. pH values found were clinically viable.

Conclusion: Morphological properties of the matrices must be assessed according to its applications and target-tissue to be substituted/regenerated and it was not possible to determine a pattern of rhGH distribution within PLGA matrices on this survey. The matrices can be used as rhGH carriers and were able to extend hormone release for a period of 22 days. Weight loss showed equal patterns (statistically), despite the addition of rhGH to the polymer. The pH values were clinically viable and the reduction of rhGH concentrations on future researches should not be carried out using this methodology, possibly owing to limitations on screening with ultra-violet spectroscopy

Key-Words: Growth hormone, biocompatible materials, PLGA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Embalagem do Hormônio do Crescimento (Saizen®)	10
FIGURA 2. Embalagem do PLGA (Purasorb®)	11
TABELA 1. Divisão de grupos no estudo	13
FIGURA 3. Matrizes em seus moldes	13
TABELA 2. Massa inicial das matrizes	14
GRÁFICO 1. Curva de calibração	16
TABELA 3. Valores de absorvância de cada amostra	18
GRÁFICO 2. Médias de absorvância de cada grupo	19
TABELA 4. Médias de absorvância com desvio-padrão	19
GRÁFICO 3. Médias diárias de absorvância	20
GRÁFICO 4. Concentração de rhGH liberado	20
TABELA 5. Valores de pH de cada amostra	21
GRÁFICO 5. Médias de pH de cada grupo	22
TABELA 6. Médias de pH com desvio-padrão	22
GRÁFICO 6. Médias diárias de pH	23
FIGURA 4. Detalhe da matriz de PLGA	23
FIGURA 5. Matrizes de cada grupo	23
FIGURA 6. Matrizes de cada grupo	24
TABELA 7. Massas inicial e final de cada triplicata	24
GRÁFICO 7. Médias das massas inicial e final	25
FIGURA 7. Superfície das matrizes no MEV	25
FIGURA 8. Amostras criofraturadas	26

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
LOR	Laboratório de Organometálicos e Resinas
PLGA	Poli (ácido lático-co-glicólico)
PLA	Ácido Polilático
PGA	Ácido Poliglicólico
GH	Hormônio do Crescimento
rhGH	Hormônio do Crescimento Humano Recombinante
pH	Potencial hidrogeniônico
GHRH	Hormônio de Liberação do GH
US FDA	United States Food and Drug Administration
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
mm	Milímetro
EAU-Vis	Espectrofotometria Ultravioleta Visível
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
®	Marca Registrada
mg	Miligrama
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
KDa	Quilodalton
ml	Mililitro
rpm	Rotações por minuto
UI	Unidades Internacionais
PBS	Solução tampão fosfato salino
ASTM	American Society for Testing and Materials
°C	Graus Celsius
ABS	Absorbância ou absorvância
nm	Nanômetro
INTOX	Instituto de Toxicologia
KeV	Quilo eV = mil elétrons-volt
dl/g	Decilitro/grama
THF	Tetrahidrofurano
G	Grama
ANOVA	Análise de Variância
P	Valor de Prova
abs	Absorbância
Ng	Nanograma

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA	12
	2.1. PLGA	12
	2.2. rhGH	15
	2.3. COMBINAÇÃO rhGH/PLGA	16
3.	OBJETIVOS	18
	3.1. OBJETIVO GERAL	18
	3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
	4.1. MATERIAIS	19
	4.1.1. HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE	19
	4.1.2. PLGA	20
	4.2. MÉTODOS	21
	4.2.1. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES	21
	4.2.2. ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO	23
	4.2.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO	24
	4.2.4. ANÁLISE DO pH DO MEIO DE INCUBAÇÃO	24
	4.2.5. ANÁLISE MACROSCÓPICA E PERDA DE MASSA DAS MATRIZES	26
	4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
	4.2.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	26
5.	RESULTADOS	27
	5.1. ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO	27
	5.2. ANÁLISE DO pH DO MEIO DE INCUBAÇÃO (PBS)	30
	5.3. ANÁLISE MACROSCÓPICA E PERDA DE MASSA DAS MATRIZES	32
	5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	34
6.	DISCUSSÃO	36
7.	CONCLUSÃO	43
8.	REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A reconstrução de perdas ósseas, que podem ser oriundas de processos patológicos, traumas ou mesmo procedimentos cirúrgicos, ainda representa um desafio para a odontologia, a despeito dos grandes avanços alcançados até o presente momento. Apesar de a utilização do osso autógeno ainda ser considerada o padrão ouro na reabilitação destes defeitos, inconvenientes como a limitada disponibilidade e a necessidade de um segundo sítio cirúrgico doador fazem com que haja uma crescente demanda no desenvolvimento de biomateriais substitutivos para o osso.

Dentre os diversos biomateriais pesquisados no campo da reconstrução óssea, diferentes proteínas endógenas chamadas em conjunto de fatores de crescimento vêm ganhando atenção e podemos destacar neste grupo o Hormônio do Crescimento Humano Recombinante (rhGH)¹⁻³. Desde a descoberta de sua síntese laboratorial na década de 80, o rhGH vem ganhando espaço como importante biomaterial a ser testado e utilizado na reparação óssea^{1,4,5}.

Devido à sua meia vida curta, o rhGH necessitaria de sucessivas aplicações para manutenção de seu efeito, dificultando seu uso e impossibilitando, quando levado de forma tópica no sítio cirúrgico, a manutenção dos efeitos por um período mais longo. Com o intuito de prolongar os efeitos do rhGH sem a necessidade de repetidas aplicações, biomateriais, em particular os sistemas poliméricos, estão sendo estudados como agentes carreadores para facilitação de seu uso e aplicabilidade, levando à liberação mais prolongada e gradual deste hormônio peptídico.

Nesse sentido, o copolímero poli (ácido láctico-co-glicólico), PLGA, é um polímero bioabsorvível promissor para uso clínico em reconstruções ósseas, pois sofre degradação por hidrólise gerando produtos que são absorvidos pelo organismo.

Apresenta baixa toxicidade, baixa atividade alergênica e excelente biocompatibilidade⁶. Como também é osteocondutor, há diversos estudos na área da engenharia tecidual que o pesquisam conjugado a outros agentes⁷⁻¹⁴ no reparo ósseo.

Estudos *in vitro* constituem a base da pirâmide das ciências da saúde baseadas em evidências¹⁵ e, em se tratando de novos biomateriais, sua prática deve ser exaustiva visando o melhor conhecimento possível do comportamento do material testado previamente à sua utilização em estudos *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A odontologia é uma das áreas da saúde com pesquisa mais ativa na engenharia tecidual óssea, visto que desafios na reconstrução maxilofacial, como a anatomia e fatores locais, são ímpares quando comparados a outras áreas do corpo. Nesse sentido, a pesquisa por biomateriais que possibilitem a melhor condição para o reparo ósseo têm sido exaustiva.

Um biomaterial não deve provocar resposta biológica adversa local ou sistêmica, devendo ser atóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico. Há biomateriais permanentes e temporários. Podem ser fisiologicamente divididos em bioativos, bioinertes, biotoleráveis e absorvíveis¹⁶, sendo o copolímero utilizado neste trabalho - poli(D, L-ácido láctico-co-glicólico) - enquadrado como biomaterial absorvível.

2.1. PLGA

O poliéster PLGA é um copolímero dos ácidos polilático (PLA) e poliglicólico (PGA) 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 Krebs¹⁷. É resistente, altamente biocompatível e tem sido estudado exaustivamente como carreador de fármacos, proteínas e várias outras macromoléculas como DNA, RNA e peptídeos¹⁸⁻²⁰.

A sigla PLGA refere-se a um acrônimo para poli (ácido láctico-co-glicólico), onde as formas enantioméricas do ácido poli láctico (D-láctico e L-láctico) podem se encontrar em taxas iguais²¹. Este polímero pode ser processado para praticamente qualquer tamanho ou formato requerido e pode encapsular moléculas de virtualmente qualquer tamanho. É solúvel em grande gama de solventes comumente utilizados como

os clorados, o tetrahidrofurano ou a acetona²². A porção PLA é mais hidrofóbica que a PGA, portanto, polímeros com maior quantidade de ácido láctico são menos hidrofóbicos, absorvem menos água e, subsequentemente, degradam mais lentamente. Além da razão PLA/PGA, as propriedades físicas do PLGA dependem do peso molecular inicial, tamanho da partícula a ser degradada, formato da superfície (exposição á água) e temperatura de armazenamento²³. Adicionalmente, a alteração de certas propriedades do polímero durante a degradação influencia em sua própria continuação de degradação e liberação da droga que o mesmo esteja carregando²¹.

A força mecânica do PLGA é afetada pelo peso molecular e pelo índice de polidispersão. Estas propriedades também afetam a habilidade do polímero de ser utilizado como um dispositivo para entrega de drogas e podem controlar sua taxa de degradação e hidrólise. O tipo de droga a ser carregada também tem seu papel no padrão de liberação²⁴.

O grau de cristalinidade também regula as propriedades do PLGA e é diretamente proporcional a razão PLA/PGA, sendo que um maior conteúdo de PGA (que mostra uma estrutura altamente cristalina) leva a uma maior velocidade de degradação. O grau de cristalinidade e o ponto de fusão dos polímeros são diretamente relacionados ao peso molecular do polímero. A temperatura de transição vítrea do PLGA é reportada como sendo acima da fisiológica de 37°C, portanto o PLGA é de natureza vítrea exibindo uma estrutura interligada francamente rígida. Ademais, a temperatura de transição vítrea diminui com a diminuição do conteúdo de ácido láctico e com o aumento do peso molecular²⁵. Os polímeros comercialmente disponíveis são geralmente caracterizados por sua viscosidade intrínseca, que é diretamente relacionada ao seu peso molecular. Quanto maior a massa molar, mais rápida será sua degradação²¹.

Diversos são os processos de fabricação do PLGA carregado com fármacos e uma das principais preocupações neste processo é a manutenção das características da droga encapsulada, sendo tal fato responsável pela limitada disponibilidade de produtos comercializados neste sentido. Manter a estabilidade de peptídeos e drogas proteicas geralmente requer formulações de estado sólido para limitar as reações de degradação hidrolítica²³, que resultariam na perda do agente farmacológico.

Voltando-se para a aplicação clínica, o PLGA tem sido utilizado na engenharia tecidual óssea predominantemente como um arcabouço carreador de substâncias e fármacos ou combinados a outros compostos que estimulem o reparo ou melhorem suas propriedades mecânicas. Luangphakdy et al⁹ compararam o PLGA com outros biomateriais na reparação de defeitos femorais em cachorros tendo o PLGA obtido resultados inferiores aos outros biomateriais. Cheng et al⁸, no intuito de melhorar as propriedades do PLGA na reconstituição óssea, adicionaram nanotubos de carbono à estrutura do polímero, obtendo melhoria nos resultados quando comparados ao PLGA sozinho. Outra proposta²⁶ visando melhorar as propriedades do PLGA como carreador de células tronco para transplante foi a adição de partículas de hidroxiapatita contendo atelocolágeno e os resultados demonstraram melhora das propriedades do biomaterial combinado em relação ao PLGA sozinho. Em outro estudo²⁷, PLGA carregado com células tronco humanas foi utilizado no reparo de defeitos na calota de ratos com bons resultados. Fatores de crescimento também foram associados ao PLGA visando a otimização da cicatrização óssea²⁸⁻³¹. Desse modo e de uma forma geral, o PLGA é geralmente combinado a outros agentes objetivando melhora nas suas propriedades para uma adequada recuperação óssea.

Em respeito aos estudos no campo da cirurgia maxilofacial, Davies et al⁷, combinaram o PLGA a dois fosfatos de cálcio criando um biomaterial utilizado em dois

casos: uma elevação de seio maxilar e uma reconstrução de alvéolo pós-exodontia, com 3 anos de acompanhamento. Também para cirurgia de elevação de seio maxilar, Mangano et al³², avaliaram histologicamente um caso no qual utilizaram discos de PLGA com células osteoblásticas autógenas e observaram um osso viável após 6 meses de cicatrização, ressaltando a necessidade de se avaliar também o longo prazo da reabilitação, não avaliado naquele momento. Zhu et al¹⁰, compararam o preenchimento de defeitos osteocondrais em cêndilos de cabras e encontraram que o PLGA em conjunto com células tronco obteve os melhores resultados quando comparado ao não preenchimento ou ao uso do PLGA sozinho. Também visando reparo de defeitos focais osteocondrais em cêndilos de coelhos, Dormer et al³³, associaram o PLGA a fatores de crescimento com resultados promissores *in vivo*.

Por fim, arcabouços de PLGA associado a outros biomateriais também já foram fabricados a partir de prototipagem (customizados), possibilitando a individualização de um futuro tratamento de regeneração óssea³⁴.

2.2. HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE

O Hormônio do Crescimento (GH), também chamado de somatotropina, é sintetizado e armazenado na adenohipófise e a regulação na sua produção e secreção se dá por feedback mediado por hormônios hipotalâmicos de estimulação e inibição, fatores de crescimento, esteroides sexuais e condições nutricionais, sendo os hormônios hipotalâmicos de liberação de GH (GHRH) - estímulo - e a somatostatina - inibição - seus principais reguladores. Estruturalmente, o GH é uma cadeia peptídica simples de 22 KDa com 191 aminoácidos e duas ligações dissulfeto^{4,35,36}.

Acredita-se que a atuação do GH no tecido ósseo ocorra diretamente via receptores específicos, ou indiretamente por meio de um aumento na síntese dos Fatores

de Crescimento semelhantes à Insulina 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), sendo que ainda é controversa a ação do segundo no metabolismo ósseo humano. Com a ação do GH, há uma deposição aumentada de proteínas pelos condrócitos e osteoblastos, aumento do número de mitoses e conversão de condrócitos em osteoblastos^{4,35-38}.

Atualmente, o GH tem seu uso terapêutico autorizado pela United States Food and Drug Administration (US FDA) no tratamento de crianças e adultos que sofram de deficiência na produção do hormônio, sendo a via subcutânea sua principal forma de administração. Todavia, o uso tópico ou local do rhGH vem ganhando cada vez mais atenção em estudos relativos ao reparo ósseo tanto associados à implantodontia, quanto no reparo de fraturas³⁸⁻⁴⁷.

Devido à sua meia-vida curta, são necessárias repetidas aplicações do hormônio para manutenção dos seus efeitos, logo, o que se espera da aplicação tópica única do rhGH (forma de pó liofilizado) no reparo ósseo, e o que já foi demonstrado em alguns estudos^{38,42,43-48}, é um efeito inicial expressivo na cicatrização óssea.

O rhGH já foi associado à outros biomateriais para otimização da regeneração óssea e/ou visando liberação mais prolongada do hormônio. O ácido hialurônico já foi associado à micropartículas sólidas de rhGH⁴⁹ visando manutenção de efeitos do hormônio por maior tempo. Guicheux, com diferentes colaboradores em quatro estudos⁵⁰⁻⁵³, obteve resultados promissores na incorporação de rhGH à fosfatos de cálcio.

2.3. COMBINAÇÃO rhGH / PLGA

A ideia de se combinar o rhGH a um biomaterial que proporcione sua liberação lenta é oriunda da tentativa de se evitar a inconveniência das terapias com o hormônio que demandam aplicações de injeções diárias ou periódicas. Johnson et al⁵⁴ aferiram em

macacos, durante um mês, os efeitos de uma injeção de rhGH microencapsulado em microesferas de PLGA com resultados positivos sobre a possibilidade de utilização deste sistema de liberação prolongada do hormônio. Kim e Park em 1999⁵⁵ verificaram que a formação de ligações não covalentes entre as moléculas de rhGH dentro de microesferas de rhGH atrapalhou o padrão de liberação do hormônio, corrigindo o problema em outro estudo⁵⁶ subsequente através da retificação na técnica de fabricação.

García et al⁴⁰ e Santoveña et al⁵⁷ avaliaram técnica de fabricação, controle de liberação e estabilidade da liberação de rhGH de implantes laminares redondos (menos de 500 micrômetros de espessura) de PLGA alcançando um melhor entendimento da dinâmica do biomaterial.

Finalmente Yamagata et al⁵⁸, obtiveram maior liberação do hormônio criando uma microcápsula de um complexo de PLGA com óxido de zinco em detrimento ao PLGA sozinho como dispositivo de liberação prolongada do rhGH.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, o comportamento de matrizes de PLGA com 2 concentrações diferentes de rhGH, previamente ao seu uso clínico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a morfologia do PLGA e um possível padrão de distribuição do rhGH nas matrizes de PLGA;
2. Avaliar a liberação do rhGH incorporado às matrizes de PLGA ao longo do tempo;
3. Avaliar a perda de massa das matrizes de PLGA após o período de degradação;
4. Avaliar alterações de pH no meio de incubação das matrizes de PLGA carregadas com rhGH.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE

O hormônio peptídico utilizado neste estudo foi o rhGH sob a forma de pó liofilizado em frasco-ampola (Saizen®, Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça), contendo 1,33 mg (4 UI) de rhGH, 20 mg de manitol, 2,0-2,4 mg de fosfato dissódico dihidratado e 0,3-0,4 mg de fosfato monossódico monohidratado⁵⁹. Além do frasco-ampola, a medicação apresenta um diluente para injeção, não utilizado neste estudo. O rhGH utilizado é idêntico ao hormônio do crescimento humano sendo uma cadeia polipeptídica com 191 aminoácidos. Foram utilizadas 3 caixas de hormônio do crescimento humano neste estudo (Figura 1).



Figura 1: Apresentação comercial do rhGH da marca Saizen®.

4.1.2. PLGA

O PLGA é um polímero bioabsorvível derivado dos ácidos láctico (PLA) e glicólico (PGA) e possui diferentes apresentações. As variações na composição química possibilitam diferentes tempos de degradação hidrolítica e consequente liberação do rhGh.

Neste estudo, utilizamos o PLGA comercial PDLG 5010 (Purasorb®– PURAC, Gorinchem, Holanda) com razão molar de 50:50 entre os ácidos D,L-láctico e glicólico e viscosidade intrínseca variando entre 0,8 e 1,2 dl/g (ponto médio 1,0 dl/g). Sua fórmula molecular é $(C_6H_8O_4 * C_4H_4O_4)_n$, com nome químico de 3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona, polímero com 1,4-dioxano-2,5-diona⁶⁰. Foram utilizados 13 g do polímero neste estudo (Figura 2).

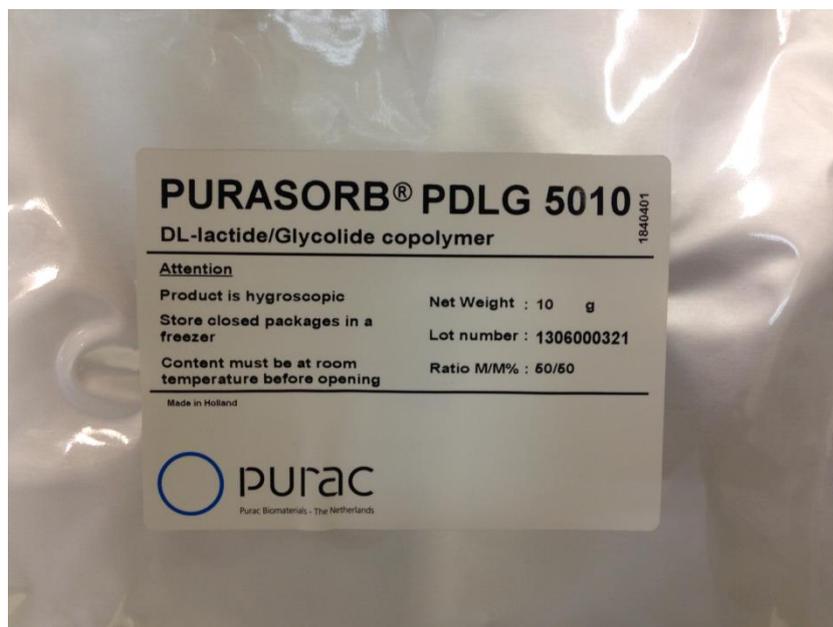


Figura 2: PLGA utilizado no estudo. Purasorb® PDLG 5010.
Envelope com 10 g de PLGA granulada.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES

Foram confeccionadas matrizes de PLGA puro e PLGA com rhGH em duas concentrações distintas no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR), da Faculdade de Química da PUCRS, sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Rosane Angélica Ligabue.

Para as matrizes de PLGA puro, foi utilizada a proporção de 1 grama de PLGA para 4 mililitros de Tetrahydrofurano (THF). Esta mistura permaneceu sob agitação magnética por aproximadamente 90 minutos, até a dissolução completa do PLGA em THF, e a mistura foi vertida em moldes de silicone de 8mm de diâmetro e 2 mm de altura. Esta etapa levou à formação do **Grupo I**, sendo este grupo utilizado como grupo controle para as avaliações.

Previamente à confecção das matrizes de PLGA + rhGH, 1 ampola de rhGH (1,33mg) foi estabilizada com acetato de zinco na proporção 1:6 (rhGH: acetato de zinco), em 1 ml de THF, para cada grupo com hormônio. A mistura foi levada ao agitador magnético por 5 minutos.

Para a confecção das matrizes do **Grupo II**, 2,5 g de PLGA foram misturados a 10 ml de THF, seguindo a proporção anterior de 1g de PLGA para 4 ml do solvente, permanecendo sob agitação magnética por aproximadamente 90 minutos, até dissolução completa do PLGA. O rhGH já estabilizado foi adicionado na mistura de PLGA e THF e esta nova preparação foi mantida em agitação magnética até homogeneização (cerca de 5 minutos). Após, verteu-se a mistura em moldes de silicone idênticos ao já descrito para o grupo I.

Para o **Grupo III**, a mesma metodologia do grupo II foi utilizada, porém, 7,5 g de PLGA foram dissolvidas em 30 ml de THF.

Todas as matrizes em seus moldes (Figura 3) foram acondicionadas em uma câmara de evaporação de solvente, à temperatura ambiente, onde as matrizes foram secas por meio de arraste forçado pela ação de gás nitrogênio, permanecendo nesta câmara até que estivessem completamente secas (cerca de 24 horas). A tabela a seguir demonstra a divisão por grupos com as amostras agrupadas em triplicatas:

Grupo I (controle)	PLGA puro (IA, IB, IC)
Grupo II	2,5 g de PLGA – 1,33 mg de rhGH (IIA, IIB, IIC)
Grupo III	7,5 g de PLGA – 1,33 mg de rhGH (IIIA, IIIB, IIIC)

Tabela 1: Divisão dos grupos no estudo.

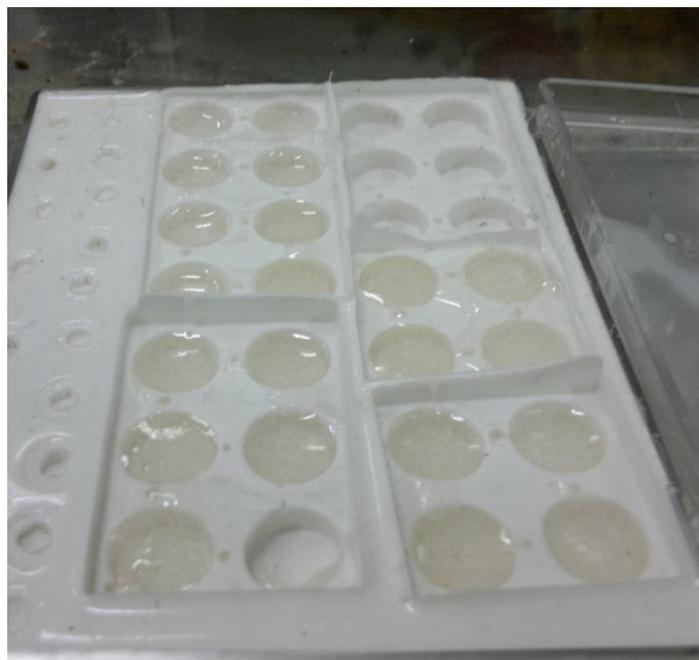


Figura 3: Figura ilustrativa das matrizes em seus moldes a caminho da câmara de evaporação de solvente

4.2.2. ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO

A liberação do hormônio foi avaliada através do método de degradação hidrolítica das matrizes, seguindo a norma ASTM F1635 de 2010⁶¹. Este teste visa simular in vitro quais seriam as condições in vivo para testes de degradação polimérica.

Inicialmente, as matrizes (3 para cada grupo – triplicata) foram pesadas visando utilizar amostras com massas semelhantes (tabela).

	I(A)	I(B)	I(C)	II(A)	II(B)	II(C)	III(A)	III(B)	III(C)
Massa (g)	0,1204	0,1279	0,1264	0,1494	0,1280	0,1311	0,1243	0,1302	0,1435

Tabela 2: Massa inicial (em g) das triplicatas.

Após, foram imersas em solução tampão fosfato salino, PBS (Tampão PBS pH 7,2+/-0,1, Laborclin, , Pinhais-PR, Brasil), dentro de tubos de ensaio previamente esterilizados com óxido de etileno. Em seguida, os tubos foram expostos a um banho termostático (Biomatic Aparelhos Científicos LTDA, Porto Alegre-RS, Brasil) a 37°C e as matrizes ficaram degradando por 24 horas. A cada dia de degradação, o PBS supostamente contendo PLGA e hormônio liberados era trocado por nova solução e levado para leitura no espectrofotômetro ultra-violeta visível (EAU-Vis) Cary 1E (Varian, Palo Alto, Estados Unidos), do INTOX – PUCRS, com pico de absorvância de 280 nm, por um período total de 29 dias, e cada leitura gerava valores distintos de absorvância. Para fins de avaliação da concentração do hormônio liberado diariamente, a absorvância média das triplicatas de cada grupo teste (II e III) era diminuída da absorvância média do grupo controle (I) para posterior correlação na curva de

calibração (ver adiante), visto que os valores de leitura do PLGA puro devem ser descontados para a quantificação do rhGH.

Não foram efetuadas leituras nos dias 5, 6, 12, 13, 19, 20, 26, 27 e 28, devido à impossibilidade de utilização do laboratório, conseqüentemente, as matrizes continuaram degradando por mais de 24 horas nestes períodos.

4.2.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO

Previamente às leituras diárias do PBS no EAU-Vis, foi realizada uma curva de calibração (Gráfico 1) com uma solução de conhecida quantidade de rhGH, a fim correlacionar, através de um gráfico, as absorbâncias às quantidades de hormônio liberadas.

Para a realização desta curva, foi diluído o conteúdo de uma ampola de Saizen® (1,33mg de rhGH) em 10ml de solução tampão PBS. A partir da solução mãe, foram realizadas 7 diluições (2x, 4x, 8x, 16x, 32x, 64x e 128x), obtendo assim concentrações conhecidas de rhGH. Estas soluções foram submetidas à EAU-Vis, em um comprimento de onda padrão (pico de absorbância) de 280nm, gerando valores de absorbância que, por meio da curva criada pelo gráfico, eram correlacionados às concentrações de hormônio. Assim, para cada valor de absorbância constatou-se uma concentração compatível de rhGH, gerando dados para a construção da curva de calibração.

4.2.4. ANÁLISE DO pH DO MEIO DE INCUBAÇÃO (PBS)

Após leitura no espectrofotômetro, o PBS foi levado ao pHmêtro (Mettler-Toledo Ind. e Com. Ltda, Barueri, SP, Brasil) visando verificar as alterações de pH no meio, possibilitando assim trazer maior entendimento sobre as possíveis respostas clínicas com a futura aplicação do biomaterial.

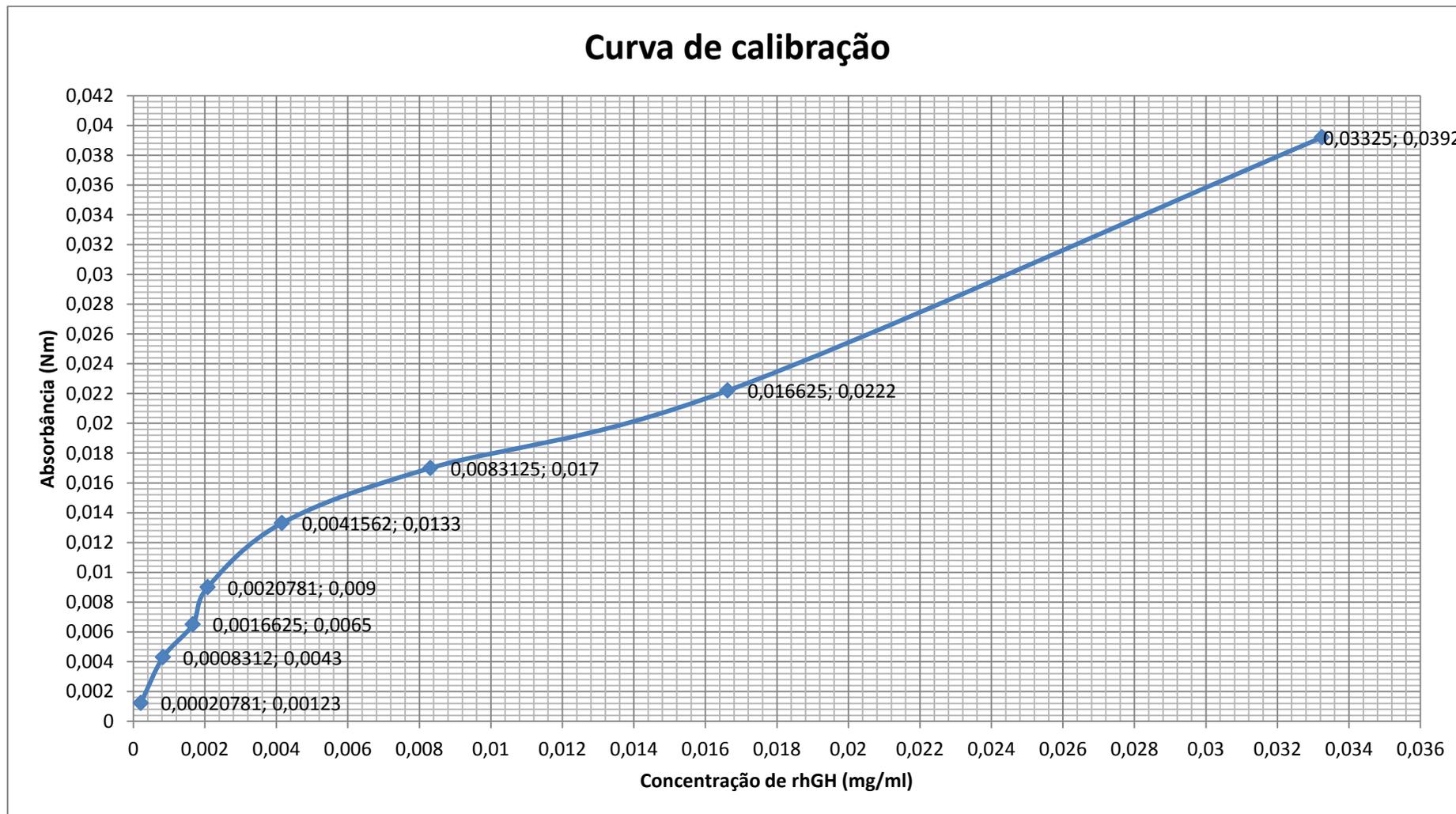


Gráfico 1: Curva de calibração. O primeiro valor de cada ponto é a concentração de rhGH, seguido do valor de absorbância correspondente. Cruzando os valores de absorbância com a curva de calibração se alcança a concentração de rhGH.

4.2.5. ANÁLISE MACROSCÓPICA E PERDA DE MASSA DAS MATRIZES

As matrizes de cada grupo (triplicata) foram avaliadas macroscopicamente e pesadas em uma balança de precisão previamente à degradação e após o período de degradação visando verificar se a incorporação do rhGH leva a alguma diferença na perda de massa e na macroestrutura das matrizes. Para pesagem pós-degradação, as matrizes foram novamente acondicionadas em uma câmara de evaporação de solvente até ficarem secas.

4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Software utilizado na análise estatística foi o SPSS 17.0 (Microsoft Corporation®, EUA) e o teste estatístico aplicado foi o ANOVA para comparação de valores de absorvância, pH e perda massa entre os grupos, com teste de post hoc de Bonferroni. Significância estatística foi definida com $p < 0,05$ (intervalo de confiança de 95%).

4.2.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises qualitativas de MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Microanálise da PUCRS, em um microscópio modelo XL30 da Phillips. As amostras foram colocadas nos *stubs* para metalização com ouro e as imagens foram adquiridas no modo de espalhamento elétrico usando uma onda elétrica com 10 KeV. Duas amostras de cada grupo foram avaliadas, sendo que uma destas amostras teve sua superfície analisada e a outra, seu interior, através de uma fratura criogênica (após congelamento por nitrogênio líquido) do polímero.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO

Os valores de absorvância (abs) diários anotados para os 3 grupos estão contidos na tabela abaixo:

ABS	I(A)	I(B)	I(C)	II(A)	II(B)	II(C)	III(A)	III(B)	III(C)
1	0,0310	0,0289	0,0307	0,0571	0,0511	0,0592	0,0574	0,0357	0,0313
2	0,0333	0,0401	0,0530	0,0489	0,0450	0,0508	0,0381	0,0473	0,0497
3	0,0291	0,0280	0,0277	0,0494	0,0301	0,0367	0,0372	0,0408	0,0401
4	0,0496	0,0188	0,0098	0,0371	0,0302	0,0301	0,0265	0,0270	0,0275
7	0,0649	0,0524	0,0455	0,0778	0,0806	0,0823	0,0685	0,0728	0,0721
8	0,0303	0,0174	0,0200	0,0458	0,0273	0,0337	0,0270	0,0194	0,0252
9	0,0280	0,0220	0,0200	0,0464	0,0290	0,0381	0,0291	0,0232	0,0289
10	0,0300	0,0251	0,0194	0,0433	0,0320	0,0427	0,0440	0,0396	0,0386
11	0,0300	0,0128	0,0117	0,0287	0,0200	0,0233	0,0257	0,0130	0,0260
14	0,0500	0,0399	0,0342	0,0520	0,0458	0,0683	0,0597	0,0363	0,0416
15	0,0500	0,0176	0,0200	0,0367	0,0325	0,0341	0,0316	0,0249	0,0326
16	0,0359	0,0187	0,0220	0,0343	0,0325	0,0302	0,0158	0,0193	0,0285
17	0,0203	0,0205	0,0300	0,0230	0,0148	0,0145	0,0128	0,0091	0,0213
18	0,0159	0,0188	0,0182	0,0264	0,0250	0,0240	0,0177	0,0179	0,0184
21	0,0170	0,0165	0,0213	0,0304	0,0302	0,0296	0,0239	0,0311	0,0301
22	0,0120	0,0134	0,0169	0,0284	0,0284	0,0285	0,0234	0,0304	0,0305
23	0,0287	0,0303	0,0345	0,0299	0,0295	0,0298	0,0292	0,0302	0,0296
24	0,0325	0,0310	0,0390	0,0304	0,0359	0,0383	0,0301	0,0267	0,0273
25	0,0249	0,0302	0,0342	0,0288	0,0289	0,0290	0,0288	0,0302	0,0253
29	0,0271	0,0122	0,0283	0,0231	0,0229	0,0230	0,0211	0,0226	0,0218

Tabela 3: Valores de absorvância (em nanômetros) para cada amostra.

Em relação à média geral, ou seja, ao longo de todo o período de avaliação, apesar dos valores maiores nos grupos teste, os resultados não indicaram diferença estatisticamente significativa (Gráfico 2).

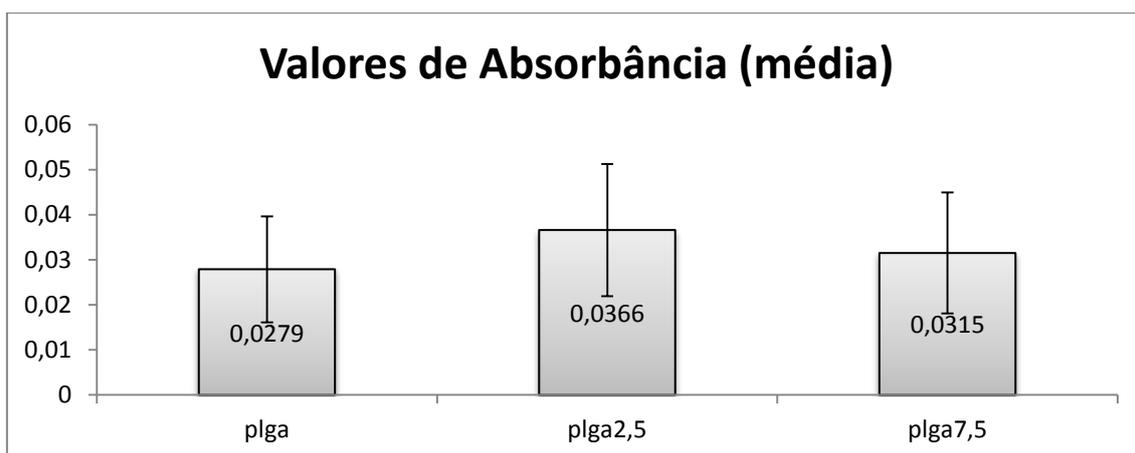


Gráfico 2: Gráfico boxplot das absorvâncias médias ao longo do período estudado.

Grupos	Absorvância	Desvio-padrão
I (plga)	0,0279	0,01177
II (plga 2,5)	0,0366	0,01469
III (plga 7,5)	0,0315	0,01343

Tabela 4: Médias com os desvios-padrão.

A análise estatística dos valores diários está ilustrada no gráfico 3. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II nos dias 1, 7, 9, 10, 18, 21 e 22; entre os grupos I e III nos dias: 3, 7, 10, 21, 22 e 24; entre os grupos II e III nos dias 4, 7, 18 e 24; e entre os 3 grupos no dia 7. Os valores médios dos grupos teste foram maiores que os dos grupos controle na maior parte da avaliação, à exceção dos dias 16 (II>I>III), 17 (I>II>III), 23 (I>II>III), 24 (II>I>III), 25 (I>II>III) e 29 (II>I>III).

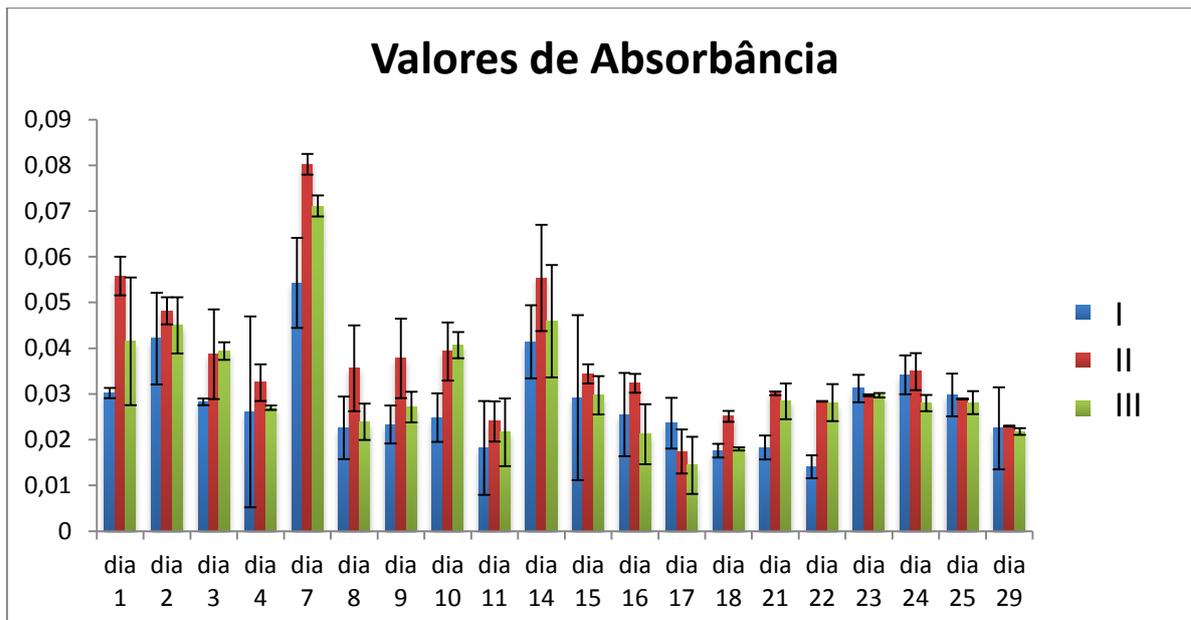


Gráfico 3: Valores médios (diários) de absorbância com o desvio-padrão.

Com relação à quantificação da concentração de rhGH liberada, apenas os valores médios puderam ser utilizados para enquadramento na curva de calibração e estão contidos no gráfico 4.

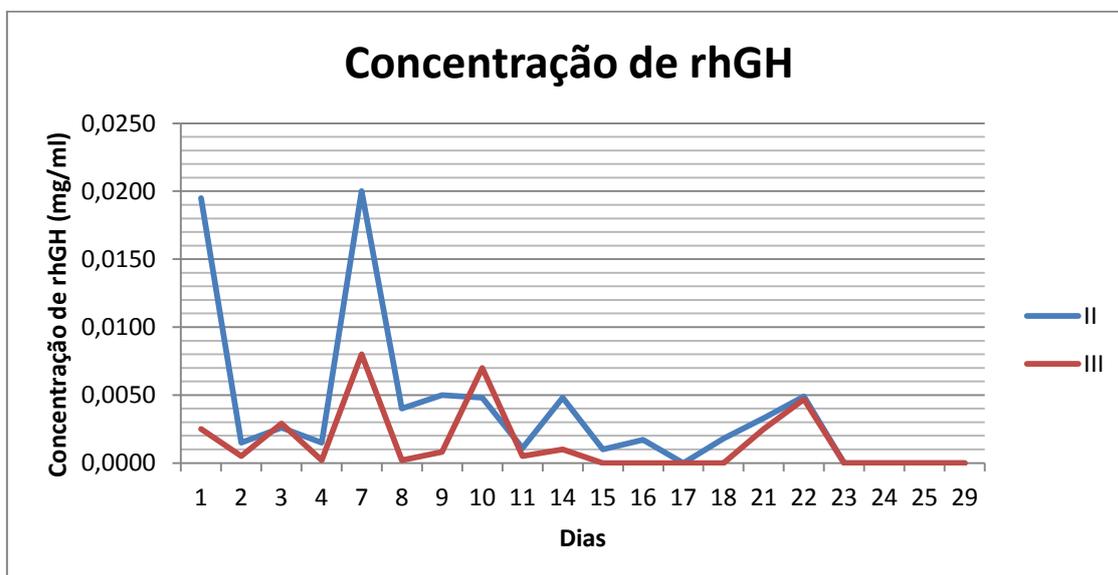


Gráfico 4: Concentrações de rhGH após enquadramento na curva de calibração

5.2. ANÁLISE DO pH DO MEIO DE INCUBAÇÃO (PBS)

Os valores de pH diários anotados para os 3 grupos estão contidos na tabela 5:

pH	I(A)	I(B)	I(C)	II(A)	II(B)	II(C)	III(A)	III(B)	III(C)
1	5,79	5,36	5,47	6,48	6,16	6,54	5,84	5,79	6,01
2	6,51	6,49	6,55	6,46	6,57	6,45	6,39	6,45	6,30
3	6,45	6,43	6,47	6,30	6,49	6,42	6,35	6,35	6,28
4	6,43	6,60	6,52	6,40	6,57	6,50	6,52	6,18	6,23
7	6,20	6,20	6,29	6,03	6,19	6,20	6,13	6,00	6,05
8	6,41	6,53	6,55	6,32	6,29	6,47	6,29	6,43	6,45
9	6,52	6,59	6,48	6,30	6,53	6,44	6,51	6,59	6,53
10	6,39	6,50	6,48	6,29	6,42	6,45	6,22	6,48	6,28
11	6,36	6,40	6,50	6,30	6,45	6,29	6,15	6,40	6,27
14	6,44	6,90	6,80	5,94	6,60	6,51	6,33	6,75	6,50
15	6,62	7,02	7,00	6,37	6,85	6,91	6,67	6,84	6,72
16	6,37	6,95	6,90	6,11	6,66	6,75	6,43	6,69	6,49
17	6,04	6,81	6,60	5,75	6,58	6,52	6,15	6,51	6,30
18	6,88	6,93	6,90	6,43	6,53	6,11	6,51	6,46	6,34
21	6,89	6,71	6,75	6,32	6,41	6,35	6,44	6,50	6,29
22	6,80	6,68	6,63	6,31	6,67	6,46	6,70	6,77	6,70
23	6,46	6,55	6,50	6,20	6,36	6,14	6,42	6,59	6,47
24	7,01	6,72	7,13	6,70	6,55	6,41	6,45	6,54	6,40
25	6,98	6,83	6,86	6,41	6,50	6,41	6,69	6,62	6,73
29	6,68	6,85	6,74	6,41	6,48	6,39	6,70	6,61	6,52

Tabela 5: Valores de pH para as triplicatas de cada grupo.

A média geral dos valores de pH ao longo do tempo de avaliação foi maior no grupo controle do que nos outros grupos, sem significância estatística.

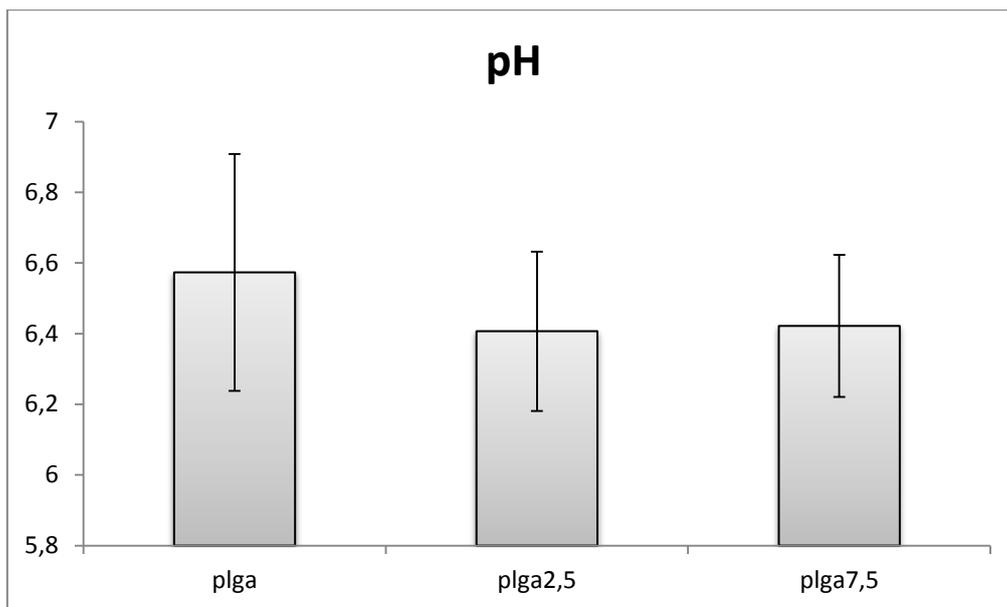


Gráfico 5: Gráfico *boxplot* dos valores de pH médios ao longo do período estudado.

Grupos	pH	Desvio-padrão
I (plga)	6,5733	0,33493
II (plga 2,5)	6,4068	0,22546
III (plga 7,5)	6,4217	0,20129

Tabela 6: Valores de pH médio com o respectivo desvio-padrão.

A análise estatística dos valores diários de pH para cada grupo está ilustrada no gráfico 6. Diferenças estatísticas foram encontradas entre o grupo I e II nos dias 1, 18, 21, 23, 24, 25 e 29; entre o grupo I e III nos dias 1, 18, 21, 23 e 25; entre os grupos II e III somente no dia 25. O valor de pH do grupo I foi maior em praticamente todos os períodos, no entanto no primeiro dia de degradação ficou com valor notavelmente menor que os outros grupos

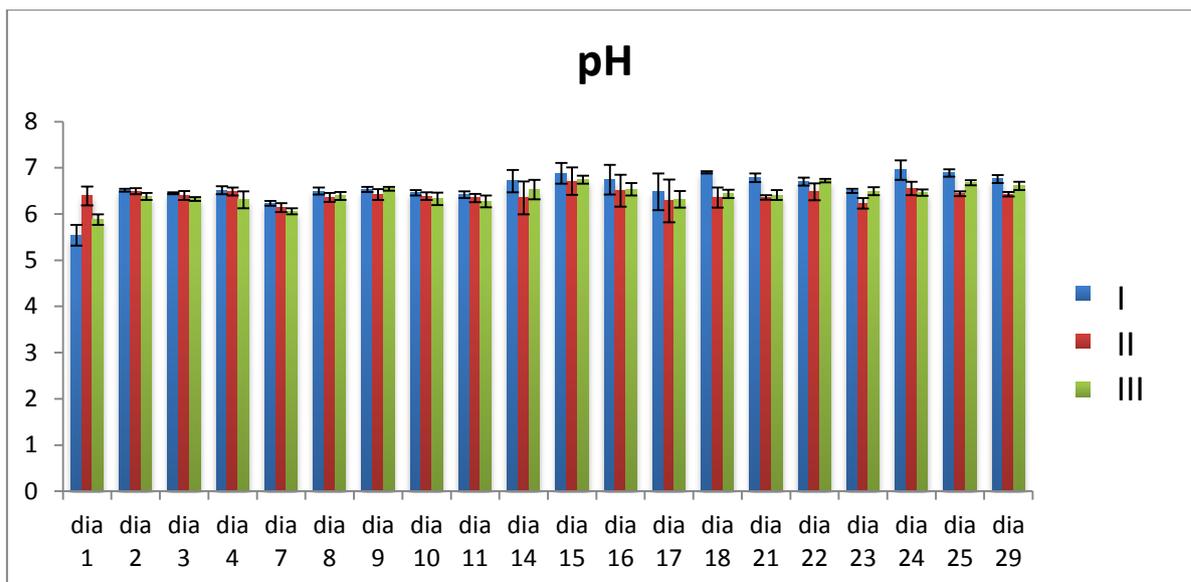


Gráfico 6: Valores diários de pH com desvio-padrão para cada grupo.

5.3. ANÁLISE MACROSCÓPICA E PERDA DE MASSA DAS MATRIZES

As amostras apresentaram superfície lisa com aspecto poroso internamente, observado por transparência, e reproduziram fielmente os moldes utilizados, sendo que a superfície superior (em relação ao posicionamento no molde) foi a única a sofrer alteração no processo de evaporação de solvente, fazendo com que a matriz perdesse parte da sua altura. A consistência ficou maleável e levemente borrachóide, sendo que, à manipulação, observou-se memória elástica média. As matrizes de cada grupo não apresentaram diferenças notáveis no aspecto macroscópico.



Figura 4: Aspecto em detalhe da matriz de PLGA com rhGH.

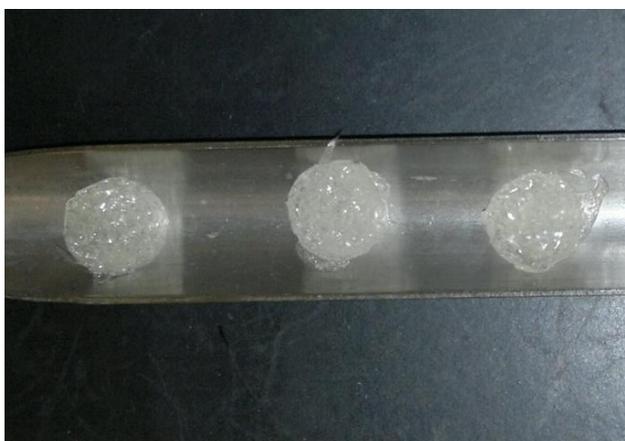


Figura 5: A figura mostra, da esquerda para a direita, uma matriz de cada grupo, I, II, III, respectivamente.

As amostras, após o período de degradação, ficaram quebradiças e pegajosas, além de se fragmentarem facilmente à manipulação.



Figura 6: Matrizes de cada grupo após a degradação. A linha superior na foto corresponde às matrizes do grupo I, a intermediária do grupo II e a inferior do grupo III. Uma matriz do grupo I foi perdida por armazenamento deficiente durante a secagem.

Os valores iniciais e finais de massa de cada matriz estão listados no quadro abaixo:

Massas	I(A)	I(B)	I(C)	II(A)	II(B)	II(C)	III(A)	III(B)	III(C)
Inicial (g)	0,1204	0,1279	0,1264	0,1494	0,1280	0,1311	0,1243	0,1302	0,1435
Final (g)	0,0475	0,0438	0*	0,0635	0,0605	0,0671	0,0551	0,0528	0,07

Tabela 7: Massas iniciais e finais das matrizes de cada amostra. A amostra I(C) foi perdida durante processamento.

Não houve diferença significativa na perda de massa entre os grupos. Abaixo, o gráfico mostra as médias da massa inicial e final de cada grupo.

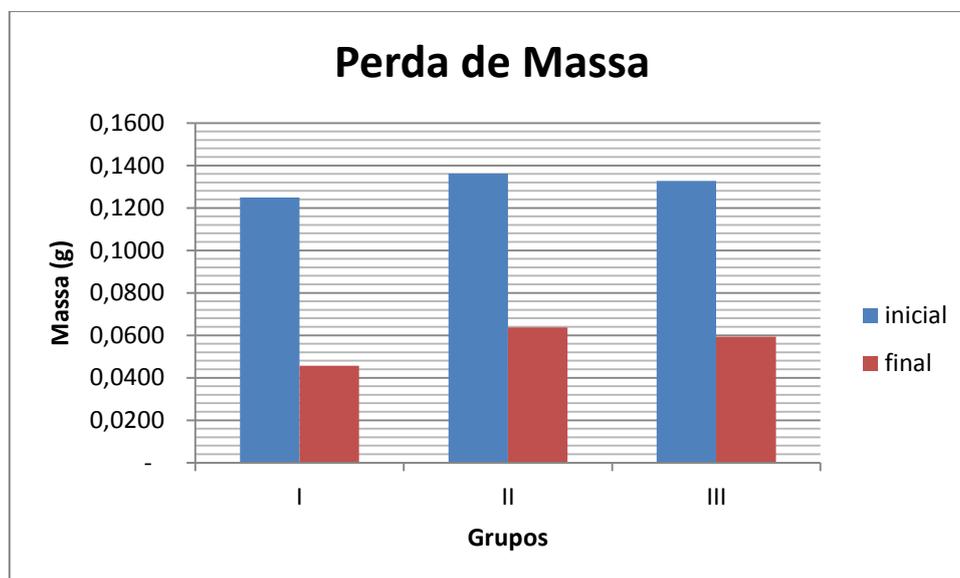


Gráfico 7: Média das massas iniciais e finais de cada grupo. Para fins estatísticos as massas foram convertidas para valores logarítmicos, já que, houve distribuição normal dos dados.

5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens foram adquiridas pelo MEV nas matrizes pré-degradação e revelaram uma superfície predominantemente lisa em todos os grupos, não havendo diferenças entre os mesmos, a despeito da incorporação do rhGH, assim como no aspecto macroestrutural. Não foi possível encontrar estruturas que francamente pudessem ser associadas ao rhGH, como em estudos anteriores^{63,64}.

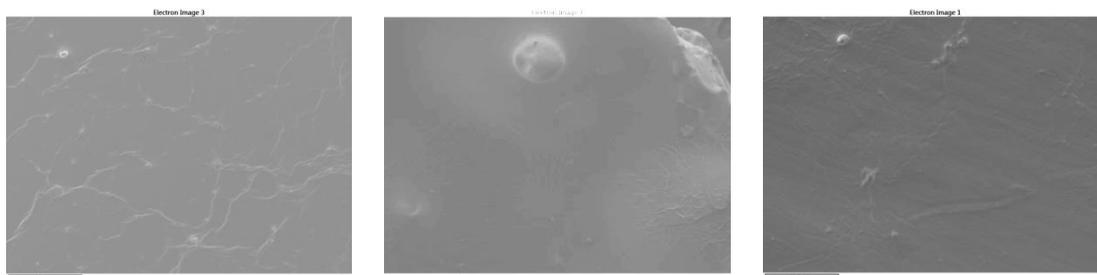


Figura 7: Superfície das matrizes utilizadas na pesquisa em diferentes aumentos. Esquerda: matriz do grupo I. Centro: matriz do grupo II. Direita: matriz do grupo III

Quanto às amostras criofraturadas, também não houveram diferenças entre os grupos, no entanto, a região fraturada demonstrou a irregularidade da distribuição do PLGA, visto que as matrizes fraturam na região de menor resistência.

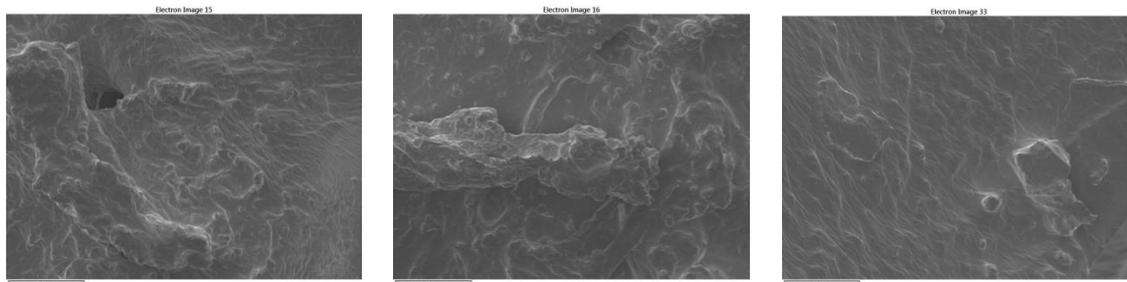


Figura 8: As áreas de criofatura demonstram irregularidade nas zonas de menor resistência da matriz. Esquerda: matriz do grupo I. Centro: matriz do grupo II. Direita: matriz do grupo III

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, optou-se pela utilização tanto do PLGA quanto do rhGH em apresentações comerciais para minimizar vieses de formulação com ambas as substâncias, visto que se tratam de fármacos já disponíveis para aplicação no mercado.

Há vários métodos de fabricação de dispositivos de liberação prolongada de drogas se utilizando do PLGA para este fim⁶². O método utilizado para fabricação do biomaterial neste estudo mais se aproximou do de evaporação do solvente e moldagem por compressão, citado por Makadia e Siegel em 2011²¹. No entanto, não foram utilizadas as elevações de temperatura e pressão preconizadas pelo método para conformação da amostra, evitando assim possíveis alterações na estrutura do rhGH. Metodologia similar pode ser observada nos estudos iniciados por Garcia⁶³ e Duarte⁶⁴ para criação de macroimplantes de PLGA com rhGH.

Seguindo a premissa de evitar estas possíveis alterações no hormônio e contrariando alguns autores na literatura^{40,54-57,63,64}, utilizamos o rhGH liofilizado diretamente na solução de PLGA com THF, ou seja, sem solubilizar o hormônio. Constam nas orientações do fabricante do hormônio⁵⁹ que após a reconstituição / solubilização, o produto deve ser utilizado em até 24 horas, desse modo, a ideia de se manter o rhGH na forma liofilizada procurou que o mesmo somente fosse solubilizado quando em contato com o meio de incubação. Ressalta-se que, em testes preliminares feitos neste estudo, o rhGH não se solubilizou no THF, portanto a forma de pó liofilizado pode representar uma importante barreira a um possível efeito negativo do contato da proteína com o solvente.

A estabilização do rhGH com acetato de zinco, preconizada por alguns autores^{54,63,64}, não é consensual na literatura visto que outros^{40,55-57} já encontraram bons

resultados sem a sua adição à fórmula. Neste estudo, foi utilizado o acetato de zinco, porém sem a formação de uma solução com rhGH, mas diretamente na apresentação em pó, evitando mais uma vez solubilizar o hormônio.

Uma importante vantagem da utilização de macroimplantes, em detrimento às formulações nanoparticuladas/microcapsulares, está na reversibilidade do método caso ocorram reações adversas quando do uso clínico do biomaterial, já que a remoção de uma peça fabricada em nível macroscópico é viável cirurgicamente. As principais desvantagens da técnica estão na impossibilidade de produção em escala industrial devido ao tempo necessário para evaporação do solvente e à possível desnaturação da proteína devido ao contato com o solvente levando à perda da atividade biológica da droga²¹. Todavia, a estabilidade do rhGH já foi testada nos solventes diclorometano e THF, sendo que os autores^{40,57} observaram perda de 20% na concentração do hormônio apenas após 48 horas de contato, tanto no solvente quanto no PBS. O tempo de evaporação do solvente não ultrapassou 24 horas neste estudo.

Outra importante preocupação que direcionou o dimensionamento das matrizes, mais precisamente sua espessura (2 mm), é a prevenção da não evaporação completa do solvente no método utilizado. Quanto mais fina a amostra, mais fácil se dá a evaporação do solvente evitando, assim, a retenção do mesmo no interior da matriz. Dessa forma, para fabricação de amostras maiores talvez seja interessante a aposição de pequenas porções do biomaterial ou a utilização de outro método de preparação.

A seleção do PLGA comercial PDLG 5010 (Purasorb®– PURAC, Gorinchem, Holanda) com razão molar de 50:50 se deu em função do mesmo ter apresentado melhores resultados em termos de liberação mais lenta do hormônio em estudo prévio realizado⁶⁴. Tal afirmação se deu em função da outra amostra (PLGA 75:25) ter

apresentado intensa formação de porosidades possivelmente liberando o rhGH mais rapidamente. Neste estudo, as amostras apresentaram formação visível de porosidades internas (figura 4), todavia, superficialmente a amostra ficou lisa não havendo diferença de um grupo para o outro. A formação de porosidades é importante, pois é imprescindível para auxiliar a migração e adesão celular (induzindo osteocondutividade), as trocas metabólicas, além de proporcionar um suporte mecânico^{7,67}, no entanto as amostras neste estudo tiveram seu aspecto inicial mais liso que as amostras de outros autores que trabalharam com métodos semelhantes^{63,64}.

As matrizes do grupo II foram carregadas com uma proporção de polímero para hormônio de 2,5 g:1,33 mg, respectivamente, enquanto as do grupo III ficaram com 7,5 g:1,33 mg. Duarte⁶⁴ preparou suas matrizes com uma proporção de aproximadamente 1g:1,33mg. Isto pode ser um possível fator causal para a lisura superficial das amostras neste estudo. Ilustrativamente, enquanto uma amostra de 0,1 g do estudo de Duarte⁶⁴ apresentou uma quantidade teórica de 0,133mg de rhGH, o mesmo peso de uma amostra do grupo II apresentou 0,0532 mg e do grupo III, 0,0177 mg. Levando-se em consideração que o nível normal de GH em um homem saudável é menor que 5 ng/ml e em mulheres na mesma condição é menor que 10 ng/ml e que o fármaco possui seus efeitos adversos, optou-se pela redução dos níveis de concentração de hormônio nas matrizes avaliando-se, desse modo, a viabilidade *in vitro* das baixas concentrações de rhGH, ou seja, se seria possível avaliar as diferenças de uma matriz carregada para uma matriz pura.

Outro aspecto importante de ser anotado e que justificaria melhor a diferença macroestrutural desta matriz para as amostras de Duarte⁶⁴ foi a redução expressiva na quantidade de solvente utilizado para cada grama de polímero. Enquanto utilizamos 4 ml de solvente para cada grama do polímero, o outro estudo utilizou cerca de 13 ml por

grama de polímero, desse modo, o espaçamento maior entre as microfibras poliméricas pode ter contribuído para maior porosidade. Ressalta-se novamente que, para a aplicação *in vivo*, quanto menor a quantidade de solvente utilizado, menor será a chance de retenção do mesmo no interior do polímero e menor a chance de alteração das propriedades do rhGH. Outra diferença foi a utilização do THF no presente estudo enquanto uma associação entre diclorometano e metanol foi utilizada anteriormente.

Para a análise de liberação do hormônio, utilizamos o teste de degradação hidrolítica e uma correlação da absorbância anotada no EAU-Vis com a concentração de rhGH foi feita apontando a concentração do hormônio do crescimento. Sabe-se que a faixa de absorbância do rhGH é de 214 a 286 nm, nesse sentido, padronizamos 280 nm como comprimento de onda padrão para as análises. Cabe ressaltar, porém, que nesta faixa de absorbância, resíduos do polímero também, provavelmente, foram captados, assim, para a determinação da concentração de rhGH em cada grupo, tivemos que lançar mão da média de valores de cada triplicata diminuindo os valores médios de ABS das matrizes com hormônio da média anotada para as matrizes puras. Esta metodologia foi semelhante à utilizada nos trabalhos de dissertação de Garcia⁶³ e Duarte⁶⁴. Porém, uma importante diferença no método aqui aplicado residiu na troca diária do meio de incubação^{40,57} para as aferições, com o intuito de simular a capacidade tampão do corpo humano e evitar que qualquer acúmulo de resíduo de PLGA pudesse alterar as leituras.

A liberação de fármacos de polímeros de PLGA ocorre por difusão e por erosão do polímero. Inicialmente, o biomaterial em contato com o meio de incubação libera a droga pela difusão da água na superfície e por entre os poros, gerando um pico inicial de liberação. Após isto, há uma estabilização na liberação da droga, ou seja, forma-se um platô que indica uma segunda fase de liberação mais controlada por depender da erosão do PLGA, liberando a droga encapsulada^{21,40,55-57,62}. Tal padrão relatado na literatura

geralmente para a avaliação da liberação de rhGH de microcápsulas ou nanopartículas⁵⁴⁻⁵⁷ não pôde ser observado neste estudo. O gráfico 4 mostra o padrão de liberação de rhGH para cada grupo baseado na correlação das absorvâncias.

Para o grupo II, os dias significativos foram 1, 7, 9, 10, 18, 21 e 22, portanto considera-se que foram os dias de maior liberação, sendo que a partir do 23º dia as concentrações de rhGH foram anotadas em zero, inclusive ocorrendo inversão de valores de absorvância, ou seja, valores da matriz controle maiores que a teste. Os dois picos de concentração de rhGH ocorreram no 1º dia, justificando a grande liberação ocorrida na fase de difusão, e no 7º dia, sendo que neste segundo período de pico, provavelmente ocorreu acúmulo de rhGH no PBS, devido ao intervalo de 72 horas até a medição. Portanto, *in vitro*, as matrizes do grupo II demonstraram a liberação de rhGH até o 22º dia de degradação, o que representa um possível prolongamento substancial na ação do rhGH comparando-se à sua ação tópica^{38,41,43-48}, no entanto, esta liberação não seguiu o padrão comumente encontrado na literatura de pico inicial de difusão com formação de platô no período de erosão do polímero.

Para o grupo III, com menor concentração de rhGH, os dias significantes foram 3, 7, 10, 21 e 22, com picos nos dias 7 e 10, sendo que no 24º dia houve significância da inversão do valor da absorvância, tendo o grupo controle maior valor que o grupo teste. Como era de se esperar, houve a liberação de menores quantidades de rhGH, inclusive com concentrações desprezíveis nos dias 15 ao 18, quando comparado ao grupo II, porém o período de liberação foi o mesmo, baseado na análise estatística. Ambos os grupos zeraram as concentrações de rhGH a partir do 23º dia, inclusive não havendo captação de hormônio após análise do 25º ao 29º dia, período que supostamente poderia ter levado ao acúmulo de resíduo do rhGH.

Ao se correlacionar tais informações com os estágios do reparo ósseo⁶⁶, pode-se inferir o seguinte desta liberação de rhGH mais prolongada: nos estágios iniciais da cicatrização, ou seja, na fase inflamatória (cerca de 3 a 5 dias), o rhGH pode exacerbar possíveis efeitos inflamatórios tanto positivos quanto deletérios ao local aplicado ou ainda, e o que seria pior, aumentar uma eventual resposta antigênica ao novo biomaterial aplicado. No estágio fibroblástico, que se inicia por volta do 3º dia de cicatrização, estaria a grande vantagem da manutenção dos efeitos do rhGH, pois é neste estágio que se inicia o reparo em si, com intensa deposição de colágeno e neovascularização, durando cerca de 2 a 3 semanas. Para o estágio de remodelação, pouco se teria da ação do rhGH, visto que as concentrações obtidas no estudo após 3 semanas foram mínimas. Porém, lembramos que o rhGH, na aplicação tópica única, demonstrou aceleração do reparo em estágios iniciais após instalação de implantes e reparo de fraturas, portanto, há possibilidade de abreviação destes estágios de cicatrização óssea com a aplicação de um dispositivo de liberação lenta do rhGH.

A análise do gráfico 2, que demonstra não ter havido diferença estatística entre os grupos nos valores de absorvância quando os 29 dias de liberação foram avaliados em conjunto, denota que possivelmente a dinâmica de degradação do polímero não foi alterada pelas diferentes concentrações de rhGH, o que é um fator positivo, pois a não alteração no padrão de degradação do PLGA é um fator relevante clinicamente. O padrão igual de degradação dos polímeros em cada grupo também é reforçado pela igualdade nas perdas de massas entre os grupos. Sabe-se que a adição de drogas aos polímeros é um dos fatores de alteração na dinâmica de degradação de polímeros bioabsorvíveis^{21,63}, não tendo tal fato ocorrido neste estudo.

A análise de pH também apresentou valores significantes apenas nos dias 1, 18 e 21 das análises (gráfico 6), durante o período de liberação do rhGH. O valor de pH das

amostras teste não ficou abaixo de 6 em nenhuma das aferições, sendo que no dia 1 a significância se deu devido à um baixo valor de pH da amostra controle e não nas amostras teste. Na média global (Gráfico 5 e Tabela 6), o pH da matriz controle ficou acima das matrizes teste, porém todas com valores compatíveis com a aplicação clínica. Nestas análises, um importante dado foi coletado de um estudo piloto realizado: amostras inicialmente feitas com maior quantidade de solvente (1g:8ml) apresentaram pH girando em torno de 3 ou 4, ou seja, muito ácido para a utilização clínica e tal dado também auxiliou na diminuição da quantidade de solvente utilizado para confecção das amostras teste.

Quanto à análise macroscópica pré e pós degradação dos polímeros, além da baixa porosidade e rugosidade superficiais, a consistência da matriz se revelou levemente borrachóide e com memória elástica média. O PLGA têm sido utilizado conjugado a outras substâncias visando a melhora na rigidez do polímero⁷⁻⁹. Dessa forma, este biomaterial pode ser utilizado como carreador de rhGH ao tecido alvo, atuando como um potencializador do reparo.

As análises de MEV não foram conclusivas, possivelmente, pela baixa quantidade de rhGH associada às matrizes, além do rhGH ter sido mantido na sua forma liofilizada, o que pode ter contribuído para a aparente homogeneidade nas matrizes de cada grupo. Todavia, Garcia⁶³ e Duarte⁶⁴ foram capazes de visualizar estruturas semelhantes ao rhGH nas suas análises de MEV. As superfícies criofaturadas tiveram aparência mais próxima à distribuição de PLGA das matrizes nestes estudos prévios.

Por fim, cabe lembrar que somente estudos *in vivo* serão de fato capazes de demonstrar a real atividade biológica do biomaterial. Porém, tal fato não exclui a

necessidade imperativa de se conhecer a dinâmica e o comportamento destas matrizes previamente à sua aplicação clínica.

7. CONCLUSÃO

As análises feitas neste estudo permitem as seguintes conclusões:

1. As propriedades morfológicas devem ser avaliadas conforme a aplicação do material e do tecido alvo a ser regenerado/substituído e não foi possível estabelecer um padrão de distribuição do rhGH nas matrizes de PLGA neste estudo;
2. As matrizes podem ser utilizadas como carreadoras de rhGH tendo sido capazes de prolongar a liberação do hormônio por um período de 22 dias;
3. A perda de massas se manteve igual (estatisticamente), a despeito da adição do rhGH ao polímero;
4. O pH das amostras se mostrou favorável à aplicação clínica das matrizes;

8. REFERÊNCIAS:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Ohlsson C, Bengtsson B, Isaksson OGO, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocrinol Rev.* 1998; (19) 1: 55-79.
5. Raschke MS, Kolbec S, Bail H, Schmidmaier G, Flyvbjerg A, Lindner T, Dahne M, Roenne IA, Haas N. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone.* 2001; 29 (4): 368-73.
6. Santos Jr. AR; Wada, MLF. Synthesis, Characterization and in Vitro Degradation of Poly (DLLactode)/Poly(DL-coGlycolide). *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2007 17,(4): 308 – 317.
7. Davies JE, Matta R, Mendes VC, Perri de Carvalho PS. Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. *Organogenesis.* 2010 Jul-Sep;6(3):161-6.
8. Cheng Q, Rutledge K, Jabbarzadeh E. Carbon nanotube-poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Ann Biomed Eng.* 2013 May;41(5):904-16.

9. Luangphakdy V, Walker E, Shinohara K, Pan H, Hefferan T, Bauer TW, Stockdale L, Saini S, Dadsetan M, Runge MB, VasANJI A, Griffith L, Yaszemski M, Muschler GF. Evaluation of osteoconductive scaffolds in the canine femoral multi-defect model. *Tissue Eng Part A*. 2013 Mar;19(5-6):634-48.
10. Zhu S, Zhang B, Man C, Ma Y, Hu J. NEL-like molecule-1-modified bone marrow mesenchymal stem cells/poly lactic-co-glycolic acid composite improves repair of large osteochondral defects in mandibular condyle. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Jun;19(6):743-50.
11. Yang YL, Chang CH, Huang CC, Kao WM, Liu WC, Liu HW. Osteogenic activity of nanonized pearl powder/poly (lactide-co-glycolide) composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Mater Eng*. 2014;24(1):979-85.
12. Sundararaj SK, Cieply RD, Gupta G, Milbrandt TA, Puleo DA. Treatment of growth plate injury using IGF-I-loaded PLGA scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012 Dec 14.
13. Zhang X, Qi YY, Zhao TF, Li D, Dai XS, Niu L, He RX. Reconstruction of segmental bone defects in the rabbit ulna using periosteum encapsulated mesenchymal stem cells-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Nov;125(22):4031-6.
14. Dormer NH, Busaidy K, Berkland CJ, Detamore MS. Osteochondral interface regeneration of rabbit mandibular condyle with bioactive signal gradients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Jun;69(6):e50-7.

15. Countway Library. EBM Tutorials. Disponível em: <http://guides.library.harvard.edu/content.php?pid=42708&sid=320447> Acesso: 20/02/2015.
16. Hench L, Wilson J. In: Introduction. An Introduction to Bioceramics. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1993; 1:1-15.
17. Soares AQ, Oliveira LF, Rabelo D, Souza AR, Polímeros Biodegradáveis: Novas perspectivas para as ciências farmacêuticas, Revista Eletrônica de Farmácia 2005; 2(2):202-205.
18. Bouissou C, Rouse JJ, Price R, van der Walle CF. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: Remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. Pharm Res. 2006; 23:1295–1305.
19. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. Biomaterials. 2000; 21:2475–2490.
20. Ruhe PQ, Hedberg EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos AG. rhBMP-2 release from injectable poly (DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites. J Bone Jt Surg. 2003; 85:75–81.
21. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers 2011, 3, 1377-1397.
22. 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.
23. Houchin ML, Topp EM. Physical properties of PLGA films during polymer degradation. J Appl Polym Sci. 2009; 114:2848–2854.
24. Siegel SJ, Kahn JB, Metzger K, Winey KI, Werner K, Dan N. Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. Eur J Pharm Biopharm. 2006; 64:287–293.

25. Passerini N, Craig DQM. An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. *J Control Release*. 2001; 73:111–115.
26. Takechi M1, Ohta K, Ninomiya Y, Tada M, Minami M, Takamoto M, Ohta A, Nakagawa T, Fukui A, Miyamoto Y, Kamata N. 3-dimensional composite scaffolds consisting of apatite-PLGA-atelocollagen for bone tissue engineering. *Dent Mater J*. 2012;31(3):465-71.
27. Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, Shi D, Liu L, Zheng Q, Gao C, Wang J. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2010 Sep 1;20:109-20.
28. Henslee AM, Spicer PP, Yoon DM, Nair MB, Meretoja VV, Witherel KE, Jansen JA, Mikos AG, Kasper FK. Biodegradable composite scaffolds incorporating an intramedullary rod and delivering bone morphogenetic protein-2 for stabilization and bone regeneration in segmental long bone defects. *Acta Biomater*. 2011 Oct;7(10):3627-37.
29. Reyes R, De la Riva B, Delgado A, Hernández A, Sánchez E, Évora C. Effect of triple growth factor controlled delivery by a brushite-PLGA system on a bone defect. *Injury*. 2012 Mar;43(3):334-42.
30. Lupu-Haber Y1, Pinkas O, Boehm S, Scheper T, Kasper C, Machluf M. Functionalized PLGA-doped zirconium oxide ceramics for bone tissue regeneration. *Biomed Microdevices*. 2013 Dec;15(6):1055-66.
31. Jung MR, Shim IK, Chung HJ, Lee HR, Park YJ, Lee MC, Yang YI, Do SH, Lee SJ. Local BMP-7 release from a PLGA scaffolding-matrix for the repair of osteochondral defects in rabbits. *J Control Release*. 2012 Sep 28;162(3):485-91.

32. Mangano C, Piattelli A, Tettamanti L, Mangano F, Mangano A, Borges F, Iezzi G, d'Avila S, Shibli JA. Engineered bone by autologous osteoblasts on polymeric scaffolds in maxillary sinus augmentation: histologic report. *J Oral Implantol*. 2010;36(6):491-6.
33. Dormer NH, Busaidy K, Berkland CJ, Detamore MS. Osteochondral interface regeneration of rabbit mandibular condyle with bioactive signal gradients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Jun;69(6):e50-7.
34. Li J, Zhang L, Lv S, Li S, Wang N, Zhang Z. Fabrication of individual scaffolds based on a patient-specific alveolar bone defect model. *J Biotechnol*. 2011 Jan 10;151(1):87-93
35. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders, 2006.
36. Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicine*. 23 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.
37. Eriksen EF, Kassem M, Langdahl B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodeling. *Eur J Clin Investig*. 1996; 26: 252-34.
38. Gómez-Moreno G, Cutando A, Arana C, Worf CV, Guardia J, Munoz F, Peña ML, Stephenson J. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Nov-Dec; 24 (6): 1068-73.
39. Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Nociti FH Jr. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dent*. 2000; 9 (2): 126-31.

40. García JT, Dorta JM, Munguía O, Llabrés M, Fariña JB. Biodegradable laminar implants for sustained release of recombinant human growth hormone. *Biomaterials*. 2002; 23: 4759-64.
41. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gómez-Pellico L, Blanco L, Alobera MA, Tresguerres JA. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Dec;13(6):631-6.
42. Andreassen TT, Oxlund H. Local anabolic effects of growth hormone on intact bone healing fractures in rats. *Calcif Tissue Int*. 2003 Sep; 73(3): 258-64.
43. Tresguerres IF, Blanco L, Clement 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 Nov-Dec; 18 (6): 807-11.
44. Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JA. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Mar-Apr; 20 (2): 193-202.
45. Calvo-Guirado JL, Mate-Sanchez J, Delgado-Ruiz R, Ramirez-Fernández MP, Cutando-Soriano A, Peña M. Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Jun;22(6):587-93.
46. Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 Apr;14(2):226-35.

47. Abreu MER. Hormônio Do Crescimento No Processo De Osseointegração De Implantes De Titânio - Estudo Experimental E Revisão De Literatura. Tese (Doutorado em Odontologia). Faculdade de Odontologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2011.
48. Hossam Eldein AM, Elghamrawy SH, Osman SM, Elhak AR. Histological evaluation of the effect of using growth hormone around immediate dental implants in fresh extraction sockets: an experimental study. *Implant Dent*. 2011 Feb;20(1):47-55.
49. Kim SJ, Hahn SK, Kim MJ, Kim DH, Lee YP. Development of a novel sustained release formulation of recombinant human growth hormone using sodium hyaluronate microparticles. *J Control Release*. 2005 May 18;104(2):323-35.
50. Guicheux J, Grimandi G, Trécant M, Faivre A, Takahashi S, Daculsi G. Apatite as carrier for growth hormone: in vitro characterization of loading and release. *J Biomed Mater Res*. 1997 Feb;34(2):165-70.
51. Guicheux J, Heymann D, Trécant M, Gautier H, Faivre A, Daculsi G. Association of human growth hormone and calcium phosphate by dynamic compaction: in vitro biocompatibility and bioactivity. *J Biomed Mater Res*. 1997 Aug;36(2):258-64.
52. Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Heymann D, Pilet P, Couillaud S, Faivre A, Daculsi G. Growth hormone-loaded macroporous calcium phosphate ceramic: in vitro biopharmaceutical characterization and preliminary in vivo study. *J Biomed Mater Res*. 1998 Jun 15;40(4):560-6.
53. Guicheux J1, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, Daculsi G, Heymann D. 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 Apr;13(4):739-48.

54. Johnson OL, Cleland JL, Lee HJ, Charnis M, Duenas E, Jaworowicz W, Shepard D, Shahzamani A, Jones AJ, Putney SD. A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. *Nat Med.* 1996 Jul;2(7):795-9.
55. Kim HK, Park TG. Microencapsulation of human growth hormone within biodegradable polyester microspheres: protein aggregation stability and incomplete release mechanism. *Biotechnol Bioeng.* 1999 Dec 20;65(6):659-67.
56. Kim HK, Park TG. Microencapsulation of dissociable human growth hormone aggregates within poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for sustained release. *Int J Pharm.* 2001 Oct 23;229(1-2):107-16.
57. Santoveña A, García JT, Oliva A, Llabrés M, Fariña JB. A mathematical model for interpreting *in vitro* rhGH release from laminar implants. *Int J Pharm.* 2006 Feb 17;309(1-2):38-43.
58. Yamagata Y, Misaki M, Kurokawa T, Taira K, Takada S. Preparation of a copoly (dl-lactic/glycolic acid)-zinc oxide complex and its utilization to microcapsules containing recombinant human growth hormone. *Int J Pharm.* 2003 Jan 30;251(1-2):133-41.
59. Somatropina Humana Recombinante 4 UI. Saizen (pó líofilo injetável): Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça; Dezembro 2009. Bula. N1281212B.
60. PDLG 5010 (grânulos). Purasorb®– PURAC, Gorinchem, Holanda; Outubro, 2012. Folha de dados do produto.
61. American Society For Testing And Materials. Standard Test Method for *in vitro* Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants, ASTM F1635. 2010.
62. Ye M, Kim S, Park K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *J Control Release.* 2010 Sep 1;146(2):241-60.

63. Garcia RF. Incorporação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhgh) em matriz de polímero biodegradável. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
64. Duarte AAPS. Avaliação da degradação de matrizes poliméricas biodegradáveis (PLGA) associadas com hormônio do crescimento humano recombinante (RHGH) : estudo in vitro. 2014. 44f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
65. Hu J, Ma PX. Nano-fibrous tissue engineering scaffolds capable of growth factor delivery. *Pharm Res.* 2011 Jun;28(6):1273-81.
66. Hupp JR: Reparação das feridas. In: Hupp JR, Ellis III E, Tucker MR (Eds). *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*. Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda, 2009. 49-60.