

**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**

Ricardo Fernandes Garcia

**Avaliação do Biomaterial de PLGA com Hormônio de
Crescimento Recombinante (rhGH) em modelo animal.**

Porto Alegre
2017

**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 do Biomaterial de PLGA com Hormônio de Crescimento Recombinante (rhGH) em modelo animal.

**Autor: Ricardo Fernandes Garcia
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 RioGrande do Sul.

Porto Alegre
2017

Resumo.

Cada vez mais estudos estão focando a combinação de matrizes que possuam características osteocondutora com proteínas osteoindutivas. Essas proteínas podem estimular a diferenciação de células mesenquimais e osteoprogenitoras em osteoblastos e assim aumentar a migração de células relacionadas à formação óssea dentro do sítio do defeito. Os principais materiais utilizados para esses objetivos são os polímeros biodegradáveis, como o PLA (poli ácido láctico) e o PLGA (poli ácido glicólico láctico). Diversas drogas são utilizadas para serem liberadas nesses sistemas, como antibióticos, anticoncepcionais e proteínas, incluindo o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH). O rhGH no tecido ósseo, promove a deposição aumentada de proteínas pelos condrócitos e osteoblastos, aumento do número de mitoses e a conversão de condrócitos em osteoblastos.

Desta forma se faz necessário a avaliação desse biomaterial (PLGA\rhGH) como dispositivo de liberação controlada. Conseguindo com isso a presença do rhGH intimamente no local da cicatrização óssea.

Para este estudo foi utilizado como modelo animal, ratos wistar. O estudo foi todo realizado de acordo com a Lei N^o 11.794, de 8 de outubro de 2008 bem como seguindo a diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBPA do CONCEA. Projeto aprovado pelo CEUA da PUCRS sob número 15/00461.

Foram utilizados trinta ratos wistar adultos, nos quais foram submetidos a defeitos ósseos nos fêmures com broca, os defeitos tinham todos mais ou

menos 05mm de diâmetro. Os ratos foram submetidos ao mesmo tratamento, porém divididos em três grupos de acordo com o tempo das eutanásia :Grupo 01 eutanásia em 07dias , Grupo 02 eutanásia em 15 dias e Grupo 03 eutanásia em 20 dias. Os fêmures dos ratos foram radiografados no intervalo entre 07, 15, e 20 dias para aferir a densidade óptica. Em seguida foram produzidas lâminas para análises histológicas, com cortes de aproximadamente 5µm de espessura e corados com hematoxilina/eosina (HE). Foram escolhidas três cortes mais representativos de cada lâmina. A repercussão sistêmica do rhGH foi avaliada através dos níveis de IGFI através da coleta de sangue que foi realizada antes de cada eutanásia, no grupo-controle e no grupo experimental. O sangue coletado foi centrifugado (2500 rotações por minuto por 10 min) e o soro obtido armazenado em freezer a -20°C para posterior determinação dos níveis plasmáticos de IGFI usando o método que se baseia em um ensaio enzimaticamente amplificado do tipo “sanduíche”, realizado no laboratório Senhor dos Passos em Porto Alegre,RS. Para análise estatística foi aplicado o Teste Tukey, nível de 5% de significância e análise de variância ANOVA. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação as densidades minerais ósseas, porém numericamente os enxertos com PLGA\rhGH tiveram sempre uma quantidade maior de tons de cinza. Conclui-se que os defeitos com enxerto de PLGA\rhGH apresentaram uma maior densidade óptica e uma maior densidade mineral em comparação ao enxerto autógeno. Nas análises histológicas também não houve diferença estatisticamente significativa entre os enxertos autógeno e de PLGA\rhGH. Porém pelas analises numéricas observamos um desempenho melhor e/ou igual entre o enxerto de PLGA\rhGH e enxerto autógeno. Os defeitos com enxerto de PLGA\rhGH, de acordo com a

metodologia empregada, densidade mineral óptica e pelas lâminas histológicas, observamos uma cicatrização e maturação mais rápida do que os enxerto autógenos.

Palavras Chaves (DeCS): hormônio do crescimento, remodelação óssea, PLGA, enxerto autógeno

Abstract.

More and more studies are focusing on the combination of matrices that have osteoconductive characteristics with osteoinductive proteins. These proteins can stimulate the differentiation of mesenchymal and osteoprogenitor cells into osteoblasts and thereby increase the migration of cells related to bone formation within the defect site. The main materials used for these purposes are biodegradable polymers, such as PLA (poly lactic acid) and PLGA (poly lactic glycolic acid). Several drugs are used to be released in these systems, such as antibiotics, contraceptives and proteins, including human growth hormone (GH). RhGH in bone tissue promotes the increased deposition of proteins by chondrocytes and osteoblasts, an increase in the number of mitoses and the conversion of chondrocytes into osteoblasts.

Thus, it is necessary to evaluate this biomaterial (PLGA \ rhGH) as a controlled release device. Thus achieving the presence of rhGH in the site of bone healing.

For this study was used as animal model, wistar rats. The study was carried out in accordance with Law No. 11,794 of October 8, 2008, as well as following the Brazilian Directive of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific and Educational Purposes - DBPA of CONCEA. Project approved by CEUA of PUCRS under number 15/00461.

Thirty adult wistar rats were used, in which they were submitted to bone defects with Carbide spherical drill number 704, the defect corresponded to the diameter of the drill. The rats were submitted to the same treatment but suffered

euthanasia at different times (07, 15 and 20 days). The femurs of the rats were radiographed in the range of 7, 15, and 20 days to gauge the optical density. Slides were then produced for histological analysis, with cuts of approximately 5 µm thick and stained with hematoxylin / eosin (HE). Three more representative cuts of each blade were chosen. The systemic repercussion of rhgh was assessed through IGF-1 levels through blood collection that was performed before each euthanasia, in the control group and in the experimental group. The blood collected was centrifuged (2500 revolutions per minute for 10 min) and serum obtained stored in a freezer at -20 ° C for further determination of IGF-1 plasma levels using the method based on an enzymatically amplified assay of the " Sandwich, "held at the Senhor dos Passos laboratory in Porto Alegre, RS. For statistical analysis, the Tukey test was applied, 5% significance level and ANOVA variance analysis. There were no statistically significant differences in bone mineral densities, however numerically the PLGA\RhGH grafts always had a greater amount of shades of gray. In conclusion, defects with PLGA\RhGH grafts showed a higher optical density. A higher mineral density compared to the autogenous graft In the histological analyzes there was also no statistically significant difference between the autogenous and PLGA\RhGH grafts. However, by numerical analysis we observed a better and equal performance between the PLGA\RhGH graft and autogenous graft. Defects with PLGA\RhGH grafting probably had faster healing and maturation than autogenous grafts.

Keys words (MeSCH): growth hormone, bone remodelling, PLGA, autogenous graf

SUMÁRIO

1. Introdução e Revisão da literatura	14
2. Justificativa do estudo	22
3. Objetivos	24
4. Hipótese	25
5. Artigo científico I: Comparação Radiográfica da Reparação Óssea em Fêmur de Ratos com Enxerto de PLGA e rhGH e Enxerto Autógeno: Densidade Óptica por Meio de Radiografia Digital	26
Resumo	
Abstract	
Introdução	
Material e métodos	
Resultados	
Discussão	
Conclusão	
Referências Bibliográficas	
6. Artigo científico II: Comparação da cicatrização óssea entre enxerto autógeno e enxerto de PLGA\rhGH e avaliação toxicológica do rhGH sistemicamente.	45
Resumo	
Abstract	
Introdução	
Material e métodos	
Resultados	
Discussão	
Conclusão	
Referências Bibliográficas	
7. Considerações finais	71
8. Referências Bibliográfica (Tese)	72

1. Introdução e Revisão da Literatura

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”.⁽¹⁾ Apesar de perder sua vitalidade celular, sofre revascularização e se incorpora ao sítio receptor, permitindo a instalação de implantes dentários.⁽²⁾

Neste contexto, a busca de materiais que substituam os enxertos autógenos estão cada vez mais avançadas. Um desses novos materiais a serem estudados é a combinação de matrizes que possuam características osteocondutora com proteínas osteoindutivas. Essas proteínas podem estimular a diferenciação de células mesenquimais e osteoprogenitoras em osteoblastos e assim aumentar a migração de células relacionadas à formação óssea dentro do sítio do defeito. Os principais materiais utilizados para esses objetivos são os polímeros biodegradáveis, como o PLA (poli ácido lático) e o PLGA (poli ácido glicólico lático) para confecção da matriz e diversos fatores de crescimento ósseo são utilizados para serem liberados nesses sistemas, como as proteínas morfogenéticas do osso 1 a 12 (BMPs1-12), fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento semelhantes a insulina I e II (IGFI e IGFI) e o hormônio do crescimento humano (GH).

1.1 Matriz de PLGA

As estruturas produzidas nas confecções das matrizes de PLGA oferecem elevada área de superfície em relação ao volume produzido, sendo um aspecto favorável à adesão celular, além de também apresentarem elevado número de poros interconectados, proporcionando espaços para entrada de nutrientes e saída de metabólitos, bem como aumento de migração celular.²⁽³⁾

O arcabouço ideal para regeneração óssea deve ser poroso com uma relação superfície-volume alta, para permitir a fixação das células e do crescimento, bem como a troca de nutrientes no sitio onde a matriz estiver.⁴ Além disso, a natureza porosa da matriz pode permitir a angiogênese. A matriz atua como um suporte temporário para as células aderirem e proliferarem, a mesma deve imitar a matriz extracelular nativa tanto arquitetonicamente, como funcionalmente.⁽⁵⁾⁽³⁾ Ademais, deve ser biodegradável e não necessitar de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção.⁽⁶⁾ A taxa de degradação deverá coincidir, ou pelo menos ser controlável para mimetizar a taxa da nova formação do tecido.⁽⁷⁾⁽³⁾

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.⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

O PLGA é um copolímero de poli ácido láctico (PLA) e de poli ácido glicólico (PGA). É considerado um dos mais promissores polímeros 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.⁽³⁾⁽¹¹⁾ 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.⁽⁸⁾⁽¹¹⁾ É definido como um dos melhores biomateriais disponíveis para a entrega de biofármacos no que diz respeito ao seu desenho estrutural e desempenho.⁽¹¹⁾ 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.⁽¹²⁾

Neste trabalho foi utilizado para fabricação das matrizes o PLGA 50:50 da Corbion Purac (Corbion Biomateriais®). O processamento de fabricação e incorporação do rhGH foi realizado de acordo com o artigo de Garcia, et al 2015³. Estas matrizes apresentam poros interconectados que facilitam a

entrada e saída de nutrientes e a angiogênese. A degradação das matrizes esta na dependência de alguns fatores com proporção de PLA\PGA, pH do meio e a massa molar do PLGA e do meio onde for implantado.

1.2 Hormônio de Crescimento

Uma das proteínas a ser usada nesse tipo de veículo é o hormônio do crescimento recombinante (rhGH). É um polipeptídeo de 191 aminoácidos com peso molecular de 22KDa , secretado pela glândula pituitária, promovendo o crescimento ósseo pós-natal.⁽¹³⁾ O GH é um regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal, atuando no remodelamento ósseo, que é regulado pelo balanço entre a reabsorção e a formação óssea. Nesse processo, o GH desempenha um papel fundamental, exercendo efeito sobre os osteoclastos e, mais acentuadamente, sobre os osteoblastos, criando a base para o seu efeito de anabolismo no esqueleto.⁽¹⁴⁾ Seus efeitos são mediados diretamente via receptores de GH na membrana celular ou indiretamente, via aumento da síntese do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I).

O GH é secretado principalmente à noite, durante toda a vida; porém, seu pico de secreção ocorre durante a puberdade e há um decréscimo acentuado de sua produção a partir da sexta década de vida, sendo esse hormônio também conhecido como o hormônio da velhice.⁽¹⁵⁾

Dentre as principais ações metabólicas do GH 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 e

osteoblastos, aumento do número de mitoses e a conversão de condrócitos em osteoblastos.⁽¹⁶⁾

Uma vasta discussão versa sobre a ação do GH, onde se procura esclarecer se ele age diretamente nos tecidos ou se o seu efeito é mediado por um fator de crescimento derivado do fígado. Assim, há duas teorias para explicar sua ação: a mais antiga é a Teoria das Somatomedinas e a mais recente é chamada de Teoria Metabólica do Efeito Dual. A primeira propõe que o GH produzido na adenohipófise estimularia principalmente o fígado e o tecido ósseo a produzirem o fator semelhante a insulina (IGF-I), anteriormente chamado de somatomedina, e esse fator seria então lançado a circulação, atingindo tecidos alvos exercendo ações metabólicas. Na Teoria do Efeito Dual, o hormônio do crescimento induziria a diferenciação de células precursoras a um estado de sensibilidade ao IGF-I, e então essas células imaturas, quando em contato com o IGF-I liberado pela ação do GH no fígado, proliferariam e exerceriam suas funções. Entretanto, é ainda controverso o papel do IGF-I no metabolismo ósseo.⁽¹⁴⁾⁽¹⁶⁾

1.3 Ação do rhGH no Tecido Ósseo.

Logo após o trauma no tecido ósseo ocorre a formação do edema juntamente com uma reação inflamatória na região lesada, forma-se um coágulo, que é posteriormente reabsorvido. Surgem fibroblastos e células osteoprogenitoras, derivadas do periósteo e endósteo, que produzem colágeno e mucopolissacarídeos, este tecido é denominado calo ósseo e à medida que cresce, ocupa o espaço entre os fragmentos. As células osteoprogenitoras transformam-se em osteoblastos, que promovem a calcificação, resultando

num tecido ósseo, de aspecto esponjoso. À medida que o calo cresce as células movimentam-se para mais longe do seu suprimento vascular. Diminui o aporte de oxigênio e, conseqüentemente, estes níveis menores resultam na formação inicial do tecido cartilaginoso.⁽¹⁵⁾⁽¹⁴⁾

A reparação dos diferentes tecidos do corpo é mediada por diferentes fatores de crescimento, num processo que se inicia com a formação do coágulo sanguíneo e continua pela degranulação subsequente das plaquetas, a qual libera os fatores de crescimento.⁽¹⁷⁾ Vários fatores de crescimento tem sido relacionado ao processo reparativo do osso: fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento semelhantes a insulina I e II (IGFI e IGFI) e proteínas morfogenéticas do osso 1 a 12 (BMPs 1 -12).⁽¹⁸⁾ O GH pode induzir proliferação e diferenciação osteoblástica, os osteoblastos possuem receptores para esses hormônio.⁽¹⁹⁾ O GH promove a produção de outros polipeptídeos como IGFI, que estimula a atividade osteoblástica e a remodelação óssea.⁽²⁰⁾ Os IGF`s (IGFI, e IGFI) são fatores de crescimento peptídicos que apresentam elevado grau de homologia estrutural com a pró-insulina e têm atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular. Os IGF`s são produzidos na maioria dos órgãos e dos tecidos do organismo, visto que sua secreção ocorre a medida que são produzidos, não existindo um órgão de armazenamento. Sabe-se, atualmente, que para que o crescimento seja adequado tanto o IGF circulante, de origem principalmente hepática, quanto os IGF produzido nos tecidos são fundamentais. Este conceito reforça a importância das ações endócrinas, parácrinas e autócrinas dos IGFs.⁽²¹⁾

O GH é um dos principais promotores da produção de IGF-1 pós-natal. Os IGF1 e IGF2 são encontrados em grandes quantidades na matriz osteoide. Eles aumentam o número e a função dos osteoblastos e favorece a síntese de colágeno.⁽²²⁾

A aplicação local do rhGH, mostra aumento da velocidade do processo de remodelação óssea, estimulando a síntese do colágeno, da osteocalcina e da fosfatase alcalina.⁽²³⁾⁽²⁴⁾

O uso do rhGH sistemicamente em fraturas ósseas já vem sendo estudado como no trabalho de Raschke et al 2007⁽²⁵⁾, que utilizou o rhGH sistemicamente em pacientes com fraturas de tíbia. Seus resultados mostraram a eficiência do rhGH na cicatrização óssea no grupo de pacientes que receberam um tratamento conservador, não cirúrgico.

Este trabalho tem o intuito de utilizar o rhGH localmente a partir de um dispositivo de liberação controlada, a matriz de PLGA. Conseguindo com isso a presença do rhGH intimamente no local da cicatrização óssea. Como nos trabalhos de Guirado et al 2010⁽²⁶⁾, que utilizam o rhGH topicamente ao redor do implantes em mandíbula de cães, bem como nos trabalho de Moreno et al 2009⁽²⁷⁾ e Tresguerres et al 2003⁽²⁸⁾ ,que também utilizaram o rhGH localmente no sitio cirúrgico, porém, todos sem dispositivo de entrega. Todos tiveram como resultados uma maior atividade celular e mitótica na fase de cicatrização, acelerando o processo cicatricial, a osteointegração.

Yang et al 2012²⁹, em revisão sistemática do uso do hormônio do crescimento em fraturas de quadril, constataram que a utilização do GH pode

ser efetiva no tratamento destas fraturas, mas devido à baixa evidencia, sugeriu mais estudos a respeito do tema.

Com base nesses trabalhos, a relevância do estudo é utilizar o biomaterial como veículo para rhGH em áreas de reparo ósseo em pacientes com trauma de face, patologias ósseas, implantes bucomaxilofaciais e fissurados.

7. Considerações Finais

Os resultados do presente trabalho, a respeito da velocidade da cicatrização óssea, concordou em partes com a hipótese que a utilização de uma matriz de PLGA com rhGH, utilizada localmente, com liberação controlada do hormônio, obteve um resultado igual ao enxerto autógeno, porém numericamente e pelas observações das imagens digitais de radiografia e das lâminas histológicas, observamos uma neoformação óssea mais rápida que as vistas com enxerto autógeno.

A respeito do efeito ou não do rhGH utilizado localmente se haveria um efeito sistêmico, nosso trabalho concordou com hipótese que não há efeito sistêmico do rhGH utilizado localmente.

Muitas pesquisas a respeito de novas matérias para enxerto associados a fatores de crescimento ósseo estão hoje sendo cada vez mais estudados. Principalmente os materiais poliméricos que possibilitam a liberação controlada de várias substâncias. Nesse trabalho podemos observar nosso material polimérico com rhGH se comportando como um enxerto padrão ouro na literatura, o enxerto autógeno. Este foi o primeiro trabalho em modelo vivo, é necessário alguns ajustes como uma amostra maior para melhor padronização

dos dados estatísticos, bem como aperfeiçoar nossa matriz polimérica com rhGH. Ajustando uma dose padrão para cada matriz. Porém novos estudos serão feitos para alcançar tais objetivos.

8. Referências Bibliográficas

1. Rogers GF, Greene AK. Autogenous Bone Graft. J Craniofac Surg [Internet]. 2012;23(1):323–7. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001665-201201000-00076>
2. Braghirolli DI, Zamboni F, Acasigua GAX, Pranke P. Association of electrospinning with electrospraying: a strategy to produce 3D scaffolds with incorporated stem cells for use in tissue engineering. Int J Nanomedicine [Internet]. 2015;10:5159–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26316747>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4542624>
3. Garcia, Ricardo; DUARTE Aline Adelaide Paz da Silva; BOING F, LIGABUE, Rosane Angélica; PAGNONCELLI RM. Incorporação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) em matriz de polímero biodegradável. 2015;44(4):218–25.
4. Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. Ann Biomed Eng. 2004;32(1):148–59.
5. Dalton PD, Woodfi T. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Bone [Internet]. 2008;32(3):2004–5. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21246614>

6. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2005;203(3):465–70.
7. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;21(24):2529–43.
8. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros.* 2005;15:13–21.
9. 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 Trans Nanobioscience.* 2012;11(1):15–21.
10. 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(25):4409–18.
11. Bret UD, Lakshmi NS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci Part B Polym Phys.* 2011;3(49):832–64.
12. Soares AQ, Oliveira LF, Rabelo D, Souza AR. Polímeros biodegradáveis: novas perspectivas para as ciencias farmaceuticas. *Rev Eletrônica Farmácia.* 2005;2(2):202–5.
13. Eriksen EF, Kassem M, Langdahl B. Growth hormone, insulin-like growth

- factors and bone remodelling. Eur J Clin Invest [Internet]. 1996;26(7):525–34. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8864413
14. Raschke M, Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Flyvbjerg A, Lindner T, et al. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone*. 2001;29(4):368–73.
 15. Martinelli Jr. CE, Custódio RJ, Aguiar-Oliveira MH. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52(5):717–25.
 16. Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Alquiza M, Raun K, Kappelgard A, et al. Homologous growth hormone accelerates bone healing - A biomechanical and histological study. *Bone*. 2003;33(4):628–37.
 17. Reddi a H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol*. 1998;16(3):247–52.
 18. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. 1998;85(6):638–46. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210498900294>
 19. Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksen EF. Growth Hormone Stimulates Proliferation and Differentiation of Normal Human Osteoblast-Like Cells In Vitro. 1993;222–6.
 20. Chenu C, Valentin-Opran A, Chavassieux P, Saez S, Meunier PJ, Delmas PD. Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone

- and by 1,25(OH)₂D₃ and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone*. 1990;11(2):81–6.
21. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest*. 2002;110(6):771–81.
 22. Andreassen TROELST, Peter HJRGENSEN, Flyvbjerg A, Cnrskov H. Growth Hormone Stimulates Bone Formation and Strength of Cortical Bone in Aged Rats *. 1995;L(7).
 23. Swolin-eide D, Magnusson P, Albertsson-wikland K. Short-term changes in bone formation markers following growth hormone (GH) treatment in short prepubertal children with a broad range of GH secretion. 2015;91–9.
 24. 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* [Internet]. 1998;13(4):739–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9556073>
 25. Raschke M, H??jby Rasmussen M, Govender S, Segal D, Suntum M, Christiansen JS. Effects of growth hormone in patients with tibial fracture: A randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Endocrinol*. 2007;156(3):341–51.
 26. 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;22(6):587–93.
27. Gómez-Moreno G, Cutando A, Arana C, Worf C Vander, Guardia J, Muñoz F, et al. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 2009;24(6):1068–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121954>
28. Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres J a F. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 2003;18(6):807–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14696655>
29. Yang S, Cao L, Cai S, Yuan J, Wang J. A systematic review of growth hormone for hip fractures. *Growth Horm IGF Res* [Internet]. 2012;22(3–4):97–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22472350>