

Incorporação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) em matriz de polímero biodegradável

Recombinant human growth hormone (rhGH) incorporated into biodegradable polymer scaffolds

Ricardo Fernandes GARCIA^{a*}, Aline Adelaide Paz da Silva DUARTE^a, Fernanda BOING^a,
Rosane Angélica LIGABUE^b, Rogério Miranda PAGNONCELLI^a

^aFaculdade de Odontologia, PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brasil

^bFaculdade de Química, PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brasil

Resumo

Objetivo: Incorporar o hormônio de crescimento recombinante humano em um polímero biodegradável (PLGA).

Material e método: As matrizes foram confeccionadas através da técnica de evaporação de solventes. Foi feita uma mistura do polímero (poli ácido glicólico láctico) e do hormônio do crescimento humano recombinante (Saizen[®] Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça). Essa mistura foi vertida em moldes de silicone circulares de 1 cm de diâmetro e aproximadamente 2 mm de espessura, e levada para secagem em uma câmara de evaporação de solvente por 48 horas. Após esse período, as matrizes foram imersas em PBS e passaram por um banho termostático (ensaio de degradação hidrolítica), *in vitro*, à temperatura de 37°C. As amostras foram retiradas do banho no intervalo de 1, 2, 3, 4, 7, 10 e 14 dias. Foram aferidas a perda de massa, a variação do pH e a concentração do hormônio liberado em função do tempo. **Resultado:** A concentração do hormônio liberado em função do tempo foi aumentando até o terceiro dia. No quarto dia, houve uma queda e, no sétimo, ocorreu um aumento do hormônio liberado, estendendo-se até o décimo dia; no 14º dia, houve queda novamente. O pH teve uma queda brusca de 7,4 para 3,2 no primeiro dia, mantendo uma pequena queda até o 14º dia. A perda de massa foi gradual em relação ao tempo, como já era esperado.

Conclusão: O PLGA é um bom biomaterial para confecção de matrizes com hormônio do crescimento. Revelou-se possível incorporar o rhGH nessa matriz, de modo a, então, desenvolver-se um substituto ósseo.

Descritores: Polímeros; hormônio do crescimento; biodegradação.

Abstract

Objective: Incorporate recombinant human growth hormone in a biodegradable polymer (PLGA). **Material and method:** The arrays were fabricated by solvent evaporation technique. A mixture of polymer (poly lactic glycolic acid) and recombinant human growth (Saizen[®] Merck Serono SA Aubonne, Switzerland) was performed hormone. This mixture was poured into circular molds silicone 01cm in diameter and about 02mm thick, and carried into a drying chamber for evaporation of solvent for 48 hours. After this period, the matrices were immersed in PBS and passed through a constant temperature bath (test for hydrolytic degradation) *in vitro*, at a temperature of 37°C. The samples were removed from the bath in the range of 01, 02, 03, 04, 07, 10, 14 days. Mass loss, pH and concentration of hormone released as a function of time was measured. **Result:** The concentration of hormone released versus time was increased until the third day. On the fourth day had a fall and on the seventh day there have been increased hormone released by the tenth day, the fourteenth day was falling again. The pH had a sharp drop from 7.4 to 3.2 on the first day and keeping a small drop until the fourteenth day. The mass loss was a gradual loss in relation to time as was to be expected. **Conclusion:** PLGA is a good biomaterial for making breeders of growth hormone. It has proved possible to incorporate the rhGH in the array so as to then develop a bone substitute.

Descriptors: Polymers; growth hormone; biodegradation.

INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas vêm surgindo estudos com biomateriais com o objetivo de levar medicações a algum sítio específico do organismo humano ou objetivando ajudar na regeneração tecidual.

Os principais materiais hoje utilizados para esses objetivos são os polímeros biodegradáveis, como o PLA (poli ácido láctico) e o PLGA (poli ácido glicólico láctico). Para incorporação de tais drogas, são

utilizados alguns métodos, como a formulação de microesferas, o sistema de liofilização, o *electrospinning* ou eletrofiação, e a evaporação de solvente, todos empregando os polímeros biodegradáveis como estrutura. Diversas drogas são utilizadas para serem liberadas nesses sistemas, como antibióticos, anticoncepcionais e proteínas, incluindo o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH)¹.

Esses polímeros são escolhidos pelas áreas farmacêutica e médica por serem materiais absorvíveis, serem hidroliticamente instáveis e possuírem características de biodegradação que os tornam capazes de ser totalmente eliminados pelo metabolismo corpóreo até certo tempo após o implante. O PLA e o PLGA são polímeros relativamente hidrofóbicos, instáveis em condições de umidade, biodegradáveis, sofrendo hidrólise para produzir monômeros de ácido lático e glicólico, que são degradados pelas mitocôndrias das células pelo Ciclo de Krebs. O PLGA é o polímero mais comumente usado e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). É um material biocompatível e pode ser utilizado como um dispositivo de liberação controlada de drogas^{1,2}.

São várias as substâncias testadas para serem carregadas por esses polímeros, sendo uma delas o hormônio do crescimento humano, também chamado de hormônio somatotrópico ou somatotropina. É um polipeptídeo de 191 aminoácidos, com peso molecular de 22 KDa, secretado pela glândula pituitária, promovendo o crescimento³. 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 teórica para o seu possível efeito de anabolismo no esqueleto^{4,5}. Seus efeitos são mediados diretamente via receptores de GH na membrana celular ou indiretamente via um 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 velhice⁶.

Estudos demonstram que o uso tópico do hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) tem acelerado o processo de osteointegração, estimulando a osteogênese e também acelerando o processo de remodelação óssea e maturação em volta dos implantes⁷. Gomez-Moreno et al.⁸ demonstraram que a administração local de rhGH mostrou diferenças histomorfométricas extremamente significantes entre os implantes tratados com o hormônio e o controle. Em geral, observou-se maior densidade óssea ao redor do implante com rhGH em relação aos não tratados com rhGH, após 14 dias.

Nesse contexto, busca-se, através deste estudo, elaborar juntamente com o Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Faculdade de Química da PUCRS um biomaterial que possa ser utilizado como um enxerto na área de Cirurgia Bucomaxilofacial, que estimulará a formação óssea em um local específico, realizando uma regeneração óssea guiada. Para isso, será utilizado como arcabouço um polímero biodegradável e biocompatível como o PLGA, e será feita a incorporação do rhGH, que fará o papel de um indutor de cicatrização e formação e óssea.

MATERIAL E MÉTODO

PLGA: as nanopartículas foram obtidas a partir do polímero biodegradável PLGA de massa molar de 7.000 na proporção 50:50 de ácido glicólico e ácido lático, sintetizado através de uma reação de policondensação direta no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Faculdade de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), conforme a técnica já descrita na literatura⁹.

Hormônio do Crescimento Humano Recombinante (rhGH)

Foi utilizado, neste estudo, o hormônio do crescimento humano recombinante (Saizen[®], Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça), sob forma de pó liofilizado (frasco-ampola) em que, conforme informações na bula do fármaco, cada frasco-ampola contém 1,33 mg (4 UI) de rhGH e excipientes de manitol 20,0 mg, fosfato dissódico di-hidratado 2,0-2,4 mg e fosfato monossódico mono-hidratado 0,30-0,40 mg. O hormônio do crescimento Saizen[®] (Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça) é um polipeptídeo de 191 aminoácidos, idêntico ao hormônio do crescimento pituitário humano. O hormônio do crescimento é sintetizado em uma linhagem celular murina transformada, que foi modificada pela adição do hormônio do crescimento humano¹⁰. Foram utilizadas neste estudo sete caixas do Saizen[®] de 04UI (1,33 mg), totalizando 9,31 mg de rhGH.

PREPARAÇÃO DA MATRIZ DE PLGA E INCORPORAÇÃO DO RHGH

As matrizes de PLGA com rhGH foram preparadas pelo método de evaporação de solvente^{11,12}. O PLGA foi dissolvido em uma mistura de solvente de metanol com diclorometano, ficando em agitação magnética. Outra mistura foi preparada com rhGH com acetado de zinco, que tem a finalidade de estabilizar o rhGH, para que este não seja liberado da matriz em tempo único e para que mantenha suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Essa mistura foi solubilizada em aproximadamente 10 mL de água deionizada e permaneceu sob agitação magnética. Em seguida, essas duas misturas – a de PLGA e solvente com a de rhGH e acetado – foram misturadas, ficando sob agitação magnética. Após agitação, o composto foi vertido em moldes circulares de silicone (2 mm de espessura por 1 cm de diâmetro). Os moldes foram então colocados na câmara de evaporação de solvente. Junto com os moldes, foi colocado dentro da câmara um Becker com a mesma concentração de solvente, para saturar o ambiente. Foi acoplada no orifício de entrada da câmara uma mangueira de saída de nitrogênio (N₂). O nitrogênio tem a função de fazer o arraste do solvente em evaporação para fora da câmara. Os moldes foram deixados na câmara para secagem por 48 horas, sendo as primeiras 24 horas com N₂ e as últimas 24 horas sem o N₂. Ao final, as matrizes foram removidas da câmara, conseguindo um formato de comprimidos, com as dimensões aproximadas de 1 cm de diâmetro por 2 mm de espessura, conforme Figura 1.

DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA

Foi realizada a pesagem de cada matriz para então iniciar o processo de degradação hidrolítica em banho termostático, a uma temperatura de 37°C. Foram feitas triplicatas para os dias 1°, 2°, 3°, 4°, 7°, 10° e 14°, totalizando 21 matrizes com rhGH incorporado mais sete matrizes sem incorporação do rhGH; note-se que apenas a matriz com PLGA se tornou nosso controle. Os tempos foram estipulados com objetivo de observar a liberação do rhGH, baseando-se nos objetivos biológicos de reparação tecidual inicial, que ocorre logo nas primeiras 24, 48 e 72 horas após algum trauma. É um período crítico para cicatrização, em que queremos observar se haverá liberação do rhGH nessa fase e também nos baseamos nas normas do teste de degradação ASTM F1635¹³. Ao final de cada dia, a matriz remanescente foi removida para secagem em dessecador a vácuo por, no mínimo, 4 horas, até obter massa constante. Os testes de degradação hidrolítica destes materiais foram realizados baseados na norma ASTM F1635¹³, que determina: dentro de tubos de ensaio, as matrizes de PLGA e rhGH foram imersas em solução tampão fosfato salino, PBS, (pH 7,4). Em seguida, os tubos foram expostos a um banho termostático a 37°C durante um tempo pré-determinado (1 a 14 dias). Após cada período de tempo (1, 2, 3, 4, 7, 10 e 14 dias), os remanescentes das matrizes foram retirados do banho e secos a vácuo em dessecador, até obterem massa constante; a parte líquida com PBS mais rhGH liberado foi levada para o aparelho de espectrofotômetro UV visível.

ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV-VISÍVEL E LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO

A capacidade que as diversas substâncias químicas têm de absorverem luz em determinados comprimentos de onda pode ser utilizada para a sua determinação quantitativa e qualitativa, uma vez que o espectro de absorção é característico para uma determinada substância e a quantidade de absorção (intensidade) é dependente da concentração do composto.

Uma solução de rhGH de concentração conhecida foi primeiramente submetida à espectrofotometria, para montar uma curva de calibração. Sabe-se que, de acordo com a literatura, a absorção máxima do hormônio puro é entre 214 e 286 nm¹⁴. Foi realizada uma concentração-mãe e, em seguida, foram realizadas várias diluições, obtendo-se várias concentrações diferentes. Essas soluções com concentrações diferentes foram então passadas no espectrofotômetro UV, no comprimento de onda de 280 nm. Foi então conhecida a absorbância das soluções nas diversas concentrações e montada, assim, a curva de calibração.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após espectrofotometria, as amostras sólidas, então secas até massa constante, foram submetidas ao MEV no Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM) da PUCRS através do equipamento Phillips XL 30, para análise qualitativa do material de PLGA e hormônio. As imagens foram adquiridas no modo de espalhamento elétrico, usando uma onda elétrica com 20 KeV. As amostras foram colocadas

nos *stubs* para metalização com ouro. No MEV, com os aumentos de 500×, 2000× e 4.000×, observamos a característica topográfica da matriz nos respectivos dias de degradação hidrolítica.

RESULTADO

Liberação do Hormônio (Rhgh)

As concentrações do hormônio liberado na degradação hidrolítica foram calculadas segundo a relação da absorbância (A) com a concentração da substância compreendida pelas Leis de Lambert-Beer.

Para cálculo da concentração, foi utilizada a média de absorbância das triplicatas de cada dia diminuída da média da absorbância do controle (matriz de PLGA sem rhGH). Após acharmos as absorbâncias das triplicatas de cada dia, foi calculada a concentração das soluções, através da equação da reta obtida na curva de calibração, sendo então realizada a média de cada dia e obtendo-se uma relação: a concentração *versus* o tempo.

O que observamos na Figura 2, o gráfico de dispersão de dados, foi que, durante essa degradação, houve a liberação do hormônio crescente até o sétimo dia. A partir do sétimo dia, já observamos uma tendência de estabilização em relação à concentração de rhGH liberado da matriz. Provável explicação é que o rhGH nesse período já foi quase que completamente liberado e, principalmente, que o rhGH provavelmente está em sua maior parte incorporado na superfície da matriz e não em seu interior; por isso, essa liberação maior nos primeiros dias, dada pela ocorrência da degradação da superfície da matriz inicialmente.



Figura 1. Matrizes após 48 h na câmara de evaporação de solventes.

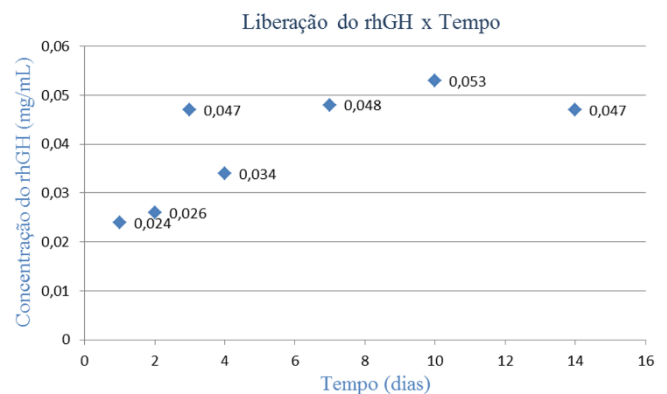


Figura 2. Variação da concentração da liberação do hormônio × tempo (dias).

Perda da Massa

Para cálculo da perda de massa da matriz no decorrer da degradação, foram realizadas as pesagens das matrizes antes da degradação e logo após a sua remoção do banho e a sua secagem num dissecador a vácuo até massa constante. Foi realizada a média das massas iniciais e finais de cada triplicata. Foi realizada curva de tendência no *software* SPSS para verificar se existe significância de perda da massa com o decorrer do tempo, com nível de significância menor que 5%. Observamos uma queda de aproximadamente 10% de perda de massa no decorrer dos dias.

Observamos nos primeiros dias uma perda de massa. Essa perda vai crescendo ao longo do tempo, conforme Figura 3. Essa perda da

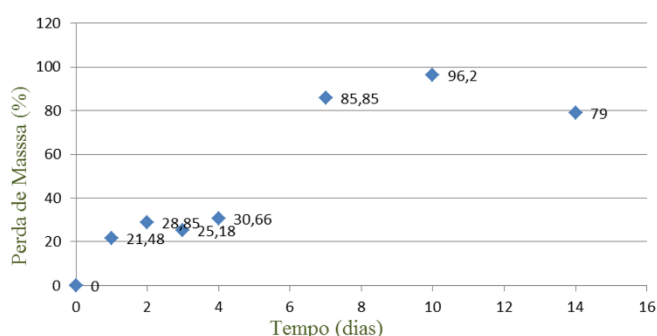


Figura 3. Variação da porcentagem da perda de massa × tempo (dias).

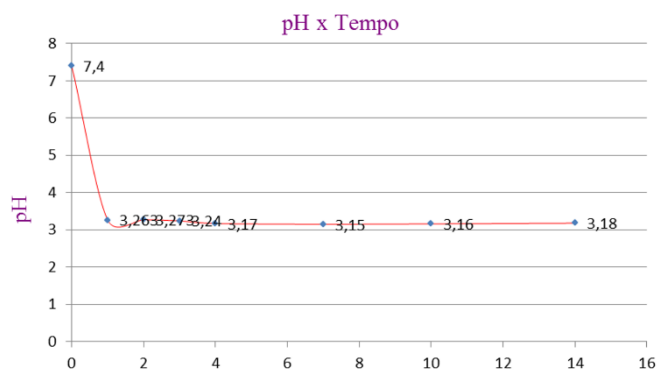


Figura 4. Variação do pH × tempo (dias).

massa esta implicada com a queda do pH, a concentração de láctico e glicólico da matriz de PLGA usado, e com o peso molecular do PLGA. Quanto mais baixo o pH, mais rápida é a degradação, ou seja, a perda de massa aumenta.

Variação do Ph

O pH foi medido também após cada retirada do banho termostatzado. A maior queda ocorre logo no primeiro dia, de 7,4 para 3,26, como observado na Figura 4. Observa-se um pH baixo, porém sem muitas variações ao longo do tempo. Foi realizada no SPSS uma curva de regressão linear, na qual se pode observar uma tendência de queda do pH de aproximadamente 2,2% ao dia, com nível de significância menor que 5%. Observamos a queda não acentuada do pH depois do primeiro dia.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Através do MEV, podemos observar as características topográficas das matrizes nos vários períodos de degradação. Na Figura 5, observamos a superfície da matriz incorporada com rhGH íntegra sem sofrer degradação, em um aumento de 500× (a) e 4.000× (b). As setas mostram estruturas que não fazem parte da matriz de PLGA; provavelmente, são estruturas do rhGH e ou do sulfato de Zn. Pela micrografia com aumento de 2.000× do rhGH (Figura 6) puro, as estruturas da Figura 6b apontadas com a seta são similares às estruturas do rhGH.

A Figura 7 permite observar a topografia da matriz controle (apenas PLGA) em dois aumentos, 500× (a) e 4.000× (b). Notamos, na Figura 5b, a presença de uma maior quantidade de estruturas diferentes em relação à superfície da matriz controle (Figura 7b). Nota-se na superfície maior grau de rugosidades. Na Figura 7b, temos uma superfície mais regular. Observamos nas duas superfícies a presença de interconectividades, representada pelas setas na Figura 7b, que constitui uma característica importante para matriz que servirá como enxerto ósseo.

Podemos observar, nas sequências da Figura 8, as superfícies das matrizes degradadas em quatro períodos diferentes, nos aumentos 500× e 4.000×. Na Figura 8 (1°), observamos as superfícies no primeiro dia, uma superfície mais íntegra com presença de poros e

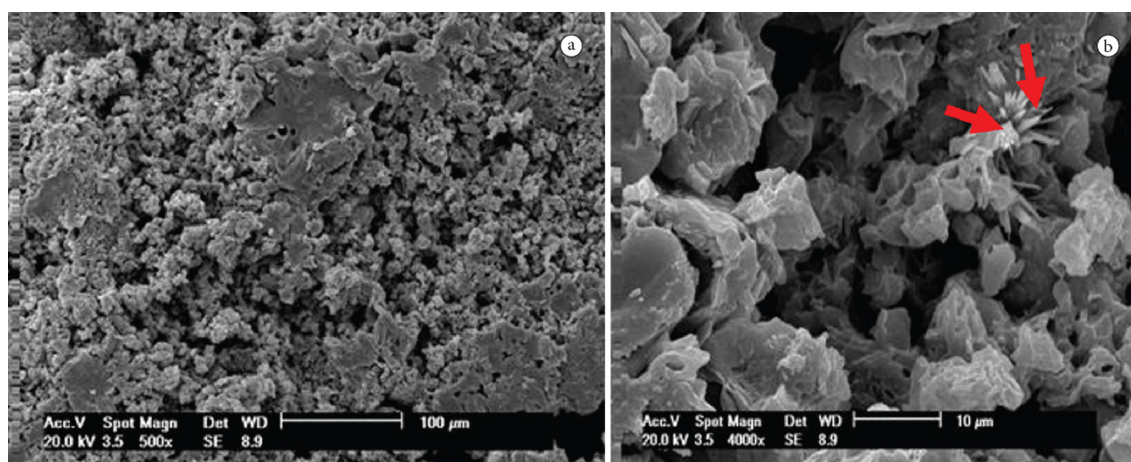


Figura 5. Micrografia da superfície das matrizes íntegras sem degradação: (a) aumento de 500×; (b) aumento de 4.000×.

aberturas na estrutura. Na Figura 8 (2°), observamos a superfície no quarto dia, já verificamos o menor número de interconectividades, uma estrutura com uma característica mais inchada. Na Figura 8 (3°) e (4°), sétimo e décimo dia, respectivamente, observamos superfície mais degradada, estrutura com diminuição do aspecto de inchaço e a maior presença de interconectividades em relação ao quarto dia. Nota-se no sétimo dia a superfície da estrutura de PLGA com uma grande quantidade de rugosidade, enquanto que, no décimo dia, já temos uma superfície mais lisa.

DISCUSSÃO

O uso da matriz de PLGA no estudo tem como objetivo servir de arcabouço, no qual ocorram, na área de cicatrização óssea, adesão e proliferação celular, assim como ocorreu no trabalho de Li et al.¹⁵, que demonstrou sucesso na adesão e na proliferação de células embrionárias mesenquimais de pré-osteoblastos. Nur-E-kamal et al.¹⁶ relataram que as nanofibras promovem proliferação celular melhor do que em outros materiais, não autógenos, utilizados como enxertos. Woo et al.¹⁷ relatam que essas características estão ligadas ao maior poder de adsorção de proteínas e ao aumento da expressão das interleucinas, o que altera significativamente os caminhos. A grande

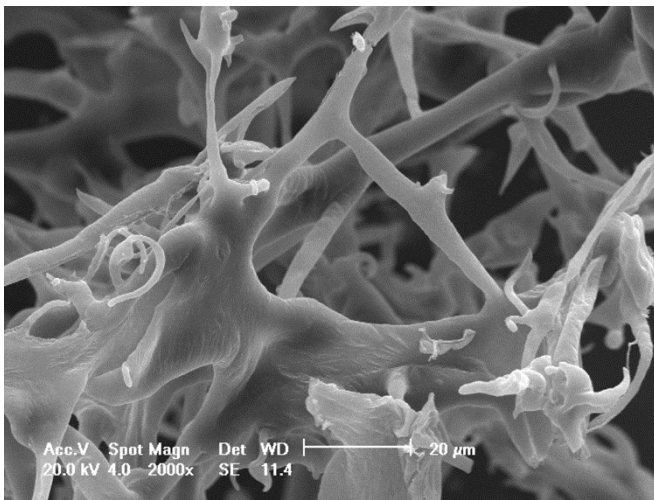


Figura 6. Micrografia da estrutura do rhGH puro.

vantagem do uso dos polímeros biodegradáveis, como PLGA, como estrutura 3D na região bucofacial, é seu arcabouço que mimetiza a matriz de colágeno tipo I, com poros grandes e interconectados, facilitando a angiogênese e o crescimento do tecido ósseo¹⁷.

O uso do rhGH sistemicamente em fraturas ósseas já vem sendo estudado, como no trabalho de Raschke et al.¹⁸, que utilizaram o rhGH sistemicamente em pacientes com fraturas de tibia. Seus resultados mostraram a eficiência do rhGH na cicatrização óssea no grupo de pacientes que receberam um tratamento conservador, não cirúrgico. Nosso trabalho tem o intuito de utilizar o rhGH localmente, a partir de um dispositivo de liberação controlada, a matriz de PLGA. Assim, teremos a presença do rhGH intimamente no local da cicatrização óssea, como nos trabalhos de Calvo-Guirado et al.⁷, que utilizaram o rhGH topicamente ao redor do implante em mandíbula de cães, bem como no trabalho de Gómez-Moreno et al.⁸ e Tresguerres et al.¹⁹. Todos tiveram como resultados uma maior atividade celular e mitótica na fase de cicatrização, acelerando o processo cicatricial, a osteointegração. Com base nesses trabalhos, o objetivo do estudo do nosso biomaterial é a sua utilização como veículo para rhGH em áreas de reparo ósseo em pacientes de traumas, patologias ósseas e implantes bucomaxilofaciais.

Falluco et al.²⁰, Jung et al.²¹ e Dickinson et al.²² utilizaram em seus trabalhos matrizes poliméricas carregadas com proteínas morfogenéticas humanas recombinantes (rhBMP). Obtiveram sucesso com uso dessas matrizes no aspecto da formação óssea em região dentoalveolar, quando comparadas aos enxertos autógenos.

A liberação do rhGH durante 14 dias, como verificada nos resultados deste trabalho, também está de acordo com os resultados de Kwak et al.¹⁴. Nesse trabalho, foi produzida uma matriz de PLGA carregada com rhGH. Foi utilizado como substância estabilizadora o zinco, como em nosso trabalho, porém na formulação de óxido de zinco. Foi comparado o efeito do rhGH no dispositivo de PLGA com as injeções diárias de rhGH. Os resultados mostraram que a concentração de rhGH e de IGF-I no plasma sanguíneo permaneceu elevada nos 14 dias em ratos e, em 28 dias, nos coelhos.

Cho et al.²³ demonstraram, em seu estudo com distração osteogênica em mandíbulas de cães, o efeito do rhGH, encapsulado em microesferas de quitosana, comparado com ácido hialurônico

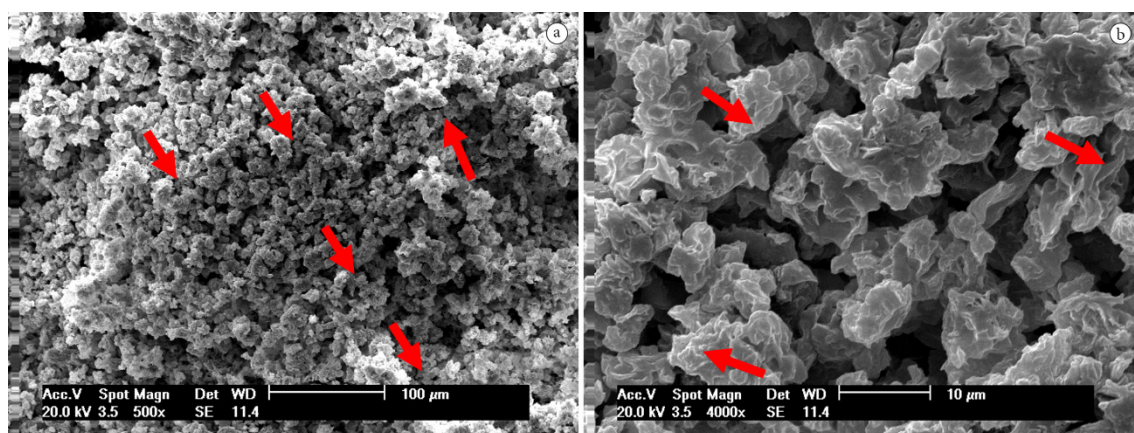


Figura 7. Micrografia da matriz de PLGA sem incorporação do rhGH nem sulfato de zinco. Superfície mais limpa: (a) aumento de 500x; (b) aumento de 4.000x. As setas indicam os microporos.

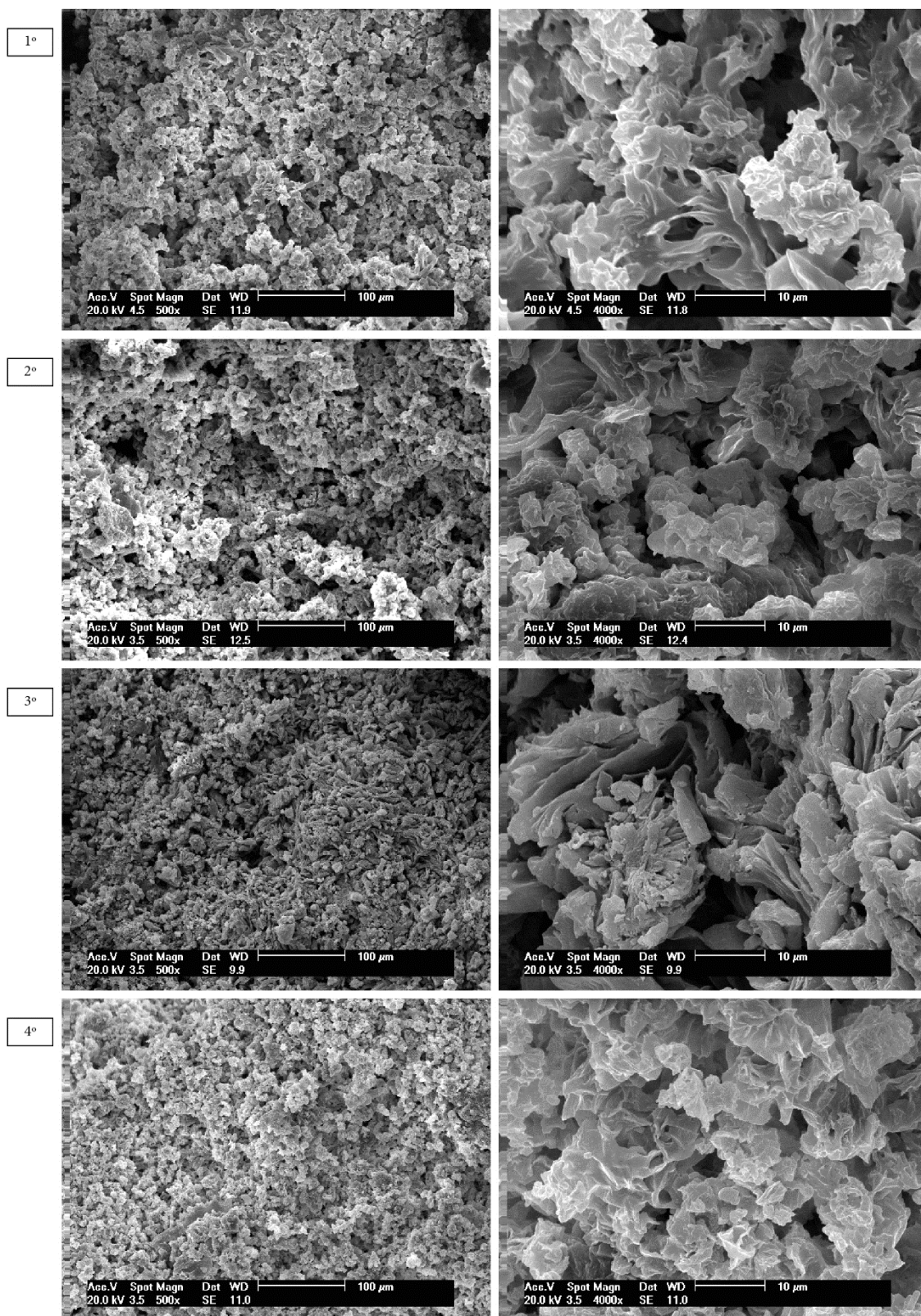


Figura 8. Micrografias da sequência das superfícies das matrizes com rhGH degradadas, com aumento de 4.000 \times , nos registros 1 $^{\circ}$) primeiro dia, 2 $^{\circ}$) quarto dia, 3 $^{\circ}$) sétimo dia, 4 $^{\circ}$) décimo dia.

e microsferas de quitosana apenas. Os resultados da liberação do rhGH tiveram o mesmo perfil que foi encontrado em nosso estudo. Nesse trabalho, eles tiveram uma grande liberação do rhGH nos primeiros 5 dias, enquanto nós tivemos essa liberação maior em 4 dias. Depois do sexto dia, eles verificaram uma liberação

crecente, porém menos acelerada até o vigésimo dia, enquanto em nossos resultados, obtivemos liberação até o décimo quarto dia, porém também menos pronunciada. No grupo com rhGH, após 6 semanas, observou-se o maior grau de radiolucência, sendo que a densidade mineral nos grupos foi alta quando comparada com

o controle. No grupo com rhGH, foi observada grande atividade mitótica, formando um tecido ósseo sem arestas e no centro da zona de distração. A maior formação de novo osso foi no grupo com rhGH.

CONCLUSÃO

No estudo clínico, pode-se verificar que houve incorporação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) na forma de pó liofilizado na matriz de PLGA. A incorporação foi confirmada através dos testes de degradação hidrolítica.

O método da fabricação da matriz de PLGA e a incorporação pelo método de evaporação de solvente mostraram-se capazes de incorporar e liberar o rhGH durante o teste de degradação.

Observou-se, neste estudo, que é possível incorporar o hormônio de crescimento humano recombinante em uma matriz de PLGA. Através deste dispositivo, conseguimos quantificar a liberação desse hormônio. Podemos observar que a melhor técnica de confecção de uma matriz com a finalidade de regeneração tecidual é aquela que crie estrutura a mais próxima possível à do tecido que esta irá ajudar regenerar. Esses são objetivos importantes para serem alcançados nas áreas de Cirurgia Bucomaxilofacial e Implantodontia.

REFERÊNCIAS

1. Soares AQ, Oliveira LF, Rabelo D, Souza AR. Polímeros biodegradáveis: novas perspectivas para ciências farmacêuticas. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2005;2(2 Supl):202-5.
2. Houchin ML, Topp EM. Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms. *J Pharm Sci*. 2008 Jul;97(7):2395-404. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21176>. PMID:17828756.
3. Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao JX, Kissel T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm*. 2000 Jul;50(1):147-60. [http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00084-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00084-9). PMID:10840198.
4. Li X, Zhang Y, Yan R, Jia W, Yuan M, Deng X, et al. Influence of process parameters on the protein stability encapsulated in poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres. *J Control Release*. 2000 Jul;68(1):41-52. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00235-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00235-2). PMID:10884578.
5. Ohlsson C, Bengtsson B-Å, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev*. 1998 Feb;19(1):55-79. PMID:9494780.
6. Zhao L, He C, Gao Y, Cen L, Cui L, Cao Y. Preparation and cytocompatibility of PLGA scaffolds with controllable fiber morphology and diameter using electrospinning method. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Oct;87(1):26-34. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.31060>. PMID:18384158.
7. 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. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.02007.x>. PMID:21121954.
8. Gómez-Moreno G, Cutando A, Arana C, Worf CV, Guardia J, Muñoz F, et al. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Nov-Dec;24(6):1068-73. PMID:20162111.
9. Jahno VD, Ribeiro GB, Santos LA, Ligabue R, Einloft S, Ferreira MR, et al. Chemical synthesis and in vitro biocompatibility tests of poly (L-lactic acid). *J Biomed Mater Res A*. 2007 Oct;83(1):209-15. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31210>. PMID:17437300.
10. Somatropina humana recombinante 4 UI. Saizen (pó liófilo injetável). Responsável técnico: AJG Guimarães. Buenos Aires: Bio Sidus; 2009. Bula de remédio: N1281212B.
11. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*. 2011 Sep;3(3):1377-97.
12. Zhao J, Han W, Chen H, Tu M, Zeng R, Shi Y, et al. Preparation, structure and crystallinity of chitosan nano-fibers by a solid-liquid phase separation technique. *Carbohydr Polym*. 2011 Feb;83(4):1541-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.009>.
13. American Society for Testing and Materials – ASTM. Standard test method for in vitro degradation testing of hydrolytically degradable polymer resins and fabricated forms for surgical implants. Philadelphia: Standards Worldwide; 2010.
14. Kwak HH, Shim WS, Choi MK, Son MK, Kim YJ, Yang HC, et al. Development of a sustained-release recombinant human growth hormone formulation. *J Control Release*. 2009 Jul;137(2):160-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.03.014>. PMID:19332090.
15. Li W-J, Laurencin CT, Catterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2002 Jun;60(4):613-21. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.10167>. PMID:11948520.
16. Nur-E-Kamal A, Ahmed I, Kamal J, Schindler M, Meiners S. Three-dimensional nanofibrillar surfaces promote self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):426-33. <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0170>. PMID:16150921.
17. Woo KM, Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Nov;67(2):531-7. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.10098>. PMID:14566795.
18. Raschke M, Rasmussen MH, Govender S, Segal D, Sunyum M, Christiansen JS. Effects of growth hormone in patients with tibial fracture: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Endocrinol*. 2007 Mar;156(3):341-51. <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-06-0598>. PMID:17322494.

19. Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres JA. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 Nov-Dez;18(6):807-11. PMID:14696655.
20. Fallucco MA, Carstens MH. Primary reconstruction of alveolar clefts using recombinant human bone morphogenic protein-2: clinical and radiographic outcomes. *J Craniofac Surg*. 2009 Set;20(Supl 2):1759-64. <http://dx.doi.org/10.1097/SCS.0b013e3181b5d08e>. PMID:19816345.
21. Jung RE, Windisch SI, Eggenschwiler AM, Thoma DS, Weber FE, Hämmerle CHF. A randomized controlled critical trial evaluating clinical radiological outcomes after 3 and 5 years of dental placed in bone regenerated by means of GBR techniques with or without the of BMP-2. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Mar; 20(7):660-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01648.x>. PMID:19489935.
22. Dickinson BP, Ashley RK, Wasson KL, O'Hara C, Gabbay J, Heller JB, et al. Reduced morbidity and improved healing with bone morphogenic protein-2 in older patients with alveolar cleft defects. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Jan;121(1):209-17. <http://dx.doi.org/10.1097/01.prs.0000293870.64781.12>. PMID:18176223.
23. Cho BC, Kim JY, Lee JH, Chung HY, Park JW, Roh KH, et al. The bone regenerative effect of chitosan microsphere-encapsulated growth hormone on bony consolidation in mandibular distraction osteogenesis in a dog model. *J Craniofac Surg*. 2004 Mar;15(2):299-311, discussion 312-3. <http://dx.doi.org/10.1097/00001665-200403000-00028>. PMID:15167253.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

*AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Ricardo Fernandes Garcia, Secretaria de Pós-Graduação, PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Prédio 6, 2º andar, Av. Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900 Porto Alegre – RS, Brasil, e-mail: rickdent3@yahoo.com.br

Recebido: Março 31, 2014
Aprovado: Novembro 12, 2014