



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA POLITÉCNICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE E DA ATIVIDADE
OSTEOINDUTORA DO BIOCOMPÓSITO L2F EM DEFEITO PARIETAL DE
CAMUNDONGOS SWISS**

LETÍCIA MOURA MATUCHESKI

CURITIBA

2024

LETÍCIA MOURA MATUCHESKI

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE E DA ATIVIDADE
OSTEOINDUTORA DO BIOCOMPÓSITO L2F EM DEFEITO PARIETAL DE
CAMUNDONGOS SWISS**

TESE DE DOUTORADO
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO PARANÁ, COMO REQUISITO PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA SOB
ORIENTAÇÃO DA PROFA. DRA. BEATRIZ
LUCI FERNANDES.

**CURITIBA
2024**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Gisele Alves – CRB 9/1578

M445a
2024 Matucheski, Letícia Moura
Avaliação in vivo da biocompatibilidade e da atividade osteoindutora do biocompósito L2F em defeito parietal de camundongos Swiss / Letícia Moura Matucheski ; orientadora : Beatriz Luci Fernandes. – 2024.
138 f. ; il. : 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2024
Bibliografia: f. 76-87

1. Materiais biomédicos. 2. Biocompatibilidade. 3. Camundongo como animal de laboratório. I. Fernandes, Beatriz Luci. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Administração. III. Título.

CDD. 20. ed. – 610.28



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Politécnica
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde

TERMO DE APROVAÇÃO DE TESE Nº 041

A Tese de Doutorado intitulada “**AVALIAÇÃO IN VIVO DA BIOCOMPATIBILIDADE E DA ATIVIDADE OSTEOINDUTORA DO BIOCOMPÓSITO L2F EM DEFEITOS DE CALVÁRIA DE CAMUNDONGOS SWISS**”, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Leticia Moura Matucheski**, no dia **27 de setembro de 2024**, foi julgada para a obtenção do título de Doutora em Tecnologia em Saúde, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Beatriz Luci Fernandes – PUCPR
Prof. Dr. Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle – UFPR
Profa. Dra. Maria Fernanda Pioli Torres – UFPR
Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii – PUCPR
Profa. Dra. Mauren Abreu de Souza – PUCPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 27 de novembro de 2024.

Prof. Dr. Percy Nohama
Coordenador do Curso de Tecnologia em Saúde
Pós-Graduação Stricto Sensu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da minha vida e por fomentar em mim a paixão por pesquisar, desenvolver e descobrir.

À minha orientadora Dra. Beatriz Luci Fernandes, por ser minha grande inspiração e trilhar o caminho das pedras comigo, por tantas vezes me fazer acreditar que eu conseguiria, mesmo diante das dificuldades impostas pela pandemia e os problemas de infraestrutura ao longo do processo.

Ao professor Dr. Carlos, que abriu as portas da UFPR e fez esse trabalho ser possível. Pela sua grande generosidade, paciência em ensinar e por toda compreensão durante o processo, serei eternamente grata!

Ao Thiago Matsunaga, aluno que já se mostra um grande profissional, por toda dedicação e auxílio em todo processo de pesquisa.

À minha família que sempre foi minha base e sem ela, não conseguiria escrever mais esse capítulo da minha jornada. De maneira muito especial, agradeço aos meus pais, Vinícius e Rita por sempre serem meus maiores incentivadores desde meus primeiros passos tanto na vida, quanto na ciência.

Ao meu irmão, Thiago por todos os ensinamentos, paciência e apoio diário.

Ao meu companheiro de vida e desafios, meu marido Jonas, por apoiar e incentivar minha dedicação, pela presteza em me auxiliar nessa caminhada e compreender minha ausência.

Ao meu filho, Mathias que é minha maior inspiração, minha alavanca, o maior motivo da minha busca por ser melhor a cada dia, minha força diária e minha melhor obra!

Ao programa de pós-graduação de tecnologia em saúde.

A CAPES pelo incentivo financeiro

E a todos, que de alguma forma me ajudaram a tornar possível esse sonho.

RESUMO

Introdução: A engenharia de tecidos visa solucionar barreiras impostas à medicina, veterinária e odontologia surgindo como esperança para a medicina regenerativa por seu potencial de desenvolvimento de biomateriais inovadores que potencializam o processo de reparo tecidual. Uma das estratégias é o desenvolvimento de biotintas especializadas que permitem extrusão por bioimpressoras e aplicação injetável, além de permitir carreamento de células, e aprimoramento das suas propriedades pela formação de biocompósitos a base de vitrocerâmicos que promovem a osteoindução, se tornando uma alternativa promissora para regeneração óssea. **Objetivo:** Nesse sentido, o presente trabalho teve por intuito, a avaliação *in vivo* da biocompatibilidade e da atividade osteoindutora da biotinta biocompósita L2F. **Metodologia:** Para padronização das amostras, foram provocados defeitos ósseos de 2mm em osso parietal de 24 camundongos Swiss aleatoriamente separados em três grupos de tratamento: controle, goma gelana e L2F, compostos por 8 animais cada, com cicatrização avaliada nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias após cirurgia por análise de microCT e histologia dos parietais e histologia dos rins, seguida de análise estatística por ANOVA, pós-hoc e teste de Tukey. **Resultados:** A análise das imagens de microCT e as medidas da área de cicatrização demonstraram importante atividade osteocondutora e osteoindutora do biomaterial L2F com diferença significativa em relação aos demais grupos, evidenciando um melhor desempenho e diminuição do tempo de cicatrização. O estudo histológico comprovou a maior deposição de tecido ósseo neoformado nas lâminas de L2F com viabilidade celular e rins com integridade tecidual, livres de sinais inflamatórios. **Conclusão:** O biocompósito L2F demonstrou ser um promissor substituto ósseo e uma alternativa promissora para a medicina regenerativa do tecido ósseo.

Palavras chave: Biocompósitos; ensaio *in vivo*; osteoindução; hidrogéis

ABSTRACT

Introduction: Tissue engineering aims to solve barriers imposed on medicine, veterinary and dentistry, emerging as hope for regenerative medicine due to its potential for developing innovative biomaterials that enhance the technical repair process. One of the strategies is the development of specialized bioinks that allow extrusion through bioprinters and injectable application, in addition to allowing the loading of cells, and the improvement of their properties through the formation of biocomposites based on vitroceraamics that promote osteoinduction, becoming a promising alternative for bone regeneration. **Objective:** In this sense, the present work aimed to evaluate *in vivo* the biocompatibility and osteoinductive activity of L2F biocomposite bioink. **Methodology:** To standardize the samples, 2mm bone defects were created in the parietal bone of 24 Swiss mice randomly separated into three treatment groups: control, gellan gum and L2F, composed of 8 animals each, with correction evaluated in periods of 7, 14, 21 and 28 days after surgery by microCT analysis and parietal histology and kidney histology, followed by statistical analysis by ANOVA, post-hoc and Tukey test. **Results:** The analysis of the microCT images and the measurements of the healed healing area showed an important osteoconductive and osteoinductive activity of the L2F biomaterial with a significant difference in relation to the other groups, showing better performance and a reduction in healing time. The histological study confirmed the greater deposition of newly formed bone tissue in the L2F sheets with cellular projections and rinses with tissue integrity, free of inflamed signs. **Conclusion:** The L2F biocomposite demonstrated to be an excellent bone substitute and a promising alternative for bone tissue regenerative medicine.

Keywords: Biocomposites; *in vivo* test; osteoinduction; hydrogels

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reconstrução óssea de estrutura trabecular em uma amostra de osso temporal: (a) injeção do L2F em defeito do processo mastoide, (b) L2F solidificado após irrigação com soro fisiológico (seta). Fonte: (MATUCHESKI, 2020).....	28
Figura 2. Teste de coloração DAPI - 4', 6-diamidino-2-fenilindol para visualização dos núcleos das células aderidas às amostras (coradas em azul). Fonte: (MATUCHESKI, 2020).	29
Figura 3. Ensaio de mineralização Osteoimage TM (LOPA1503 Lonza, Basileia, Suíça), com ligação específica aos fosfatos de cálcio dos nódulos ósseos depositados pelas células na coloração verde fluorescente. Fonte: (MATUCHESKI, 2020).	29
Figura 4. Procedimento experimental: (a) fixação de camundongo em estereotático, após tricotomia do local de incisão e exposição do osso calvarial; (b) Trepanação com broca odontológica cilíndrica diamantada na porção lateral direita do parietal do camundongo; (c) perfuração de 2 mm.	32
Figura 5. Tratamento grupo L2F: (a) Aplicação do L2F com agulha de 0,45 mm sobre a perfuração; (b) perfuração preenchida com L2F.	33
Figura 6. (a) Camundongos em recuperação anestésica após procedimento cirúrgico sendo aquecidos em contato com tubo Falcon contendo água a 35 °C revestido com papel toalha; (b) camundongo em gaiola no acompanhamento pós-cirúrgico.	33
Figura 7. Procedimento de dissecação e coleta das amostras de calvária: (a) corte lateral com tesoura ao longo da superfície interna do crânio; (b) corte completo do crânio; (c) exposição do cérebro. Fonte: (KIPKE et al 2012).	34
Figura 8. Preparo para a perfusão, da esquerda para a direita: corte abaixo da caixa torácica; cortes laterais ao longo da caixa torácica; exposição do coração; incisão no átrio direito; inserção da agulha na aorta ascendente. Fonte: KIPKE et al., 2012.	35
Figura 9. Procedimento de perfusão em camundongo com solução tampão e solução fixadora. Fonte: (KIPKE et al 2012).....	36
Figura 10. Amostras posicionadas em equipamento de Micro CT com detalhe à direita.	37
Figura 11. Imagens MEV da superfície de amostras liofilizadas do L2F: (a) aumento de 100 x, setas - regiões de acúmulo de revestimento (flash de ouro); (b) aumento de 2000 x, seta – partícula não cristalizada (vidro); (c) aumento de 5000 x mostrando o diâmetro de duas das partículas: 3770 µm e 2580 µm.	42

Figura 12. Espécime calvarial de camundongo coletada.	46
Figura 13. Um dos camundongos em procedimento de perfusão, 28 dias do pós-cirúrgico.	47
Figura 14. Reconstrução 3D da calvária de camundongo com parietal perfurado com broca esférica e tratado com biomaterial L2F (círculo vermelho), 28 dias de pós-cirúrgico.	48
Figura 15. Método usado no dimensionamento dos defeitos parietais dos camundongos: medição realizada no software 3Dslicer em triplicata utilizando três feixes microtomográficos com maior distância entre bordas em sequência.	48
Figura 16. Reconstrução 3D (de A a D) e 2D (de E a H) das imagens microtomográficas de dos defeitos parietais dos animais em cicatrização pertencentes ao grupo controle nos períodos analisados (de 7 a 28 dias).	49
Figura 17. Reconstrução 3D (de A a D) e 2D (de E a H) das imagens microtomográficas de dos defeitos parietais dos animais em cicatrização pertencentes ao grupo GG nos períodos analisados (de 7 a 28 dias).	51
Figura 18. Reconstrução 3D (de A a D) e 2D (de E a H) das imagens microtomográficas de dos defeitos parietais dos animais em cicatrização pertencentes ao grupo L2F nos períodos analisados (de 7 a 28 dias).	53
Figura 19. Fotomicrografia do grupo controle contemplando a área completa da lesão após 28 dias do pós-cirúrgico: à esquerda, aumento de 2,5x; à direita, ampliação da borda do defeito com aumento de 10x. (OB = OA) Osso Antigo, (NB = ON) Osso Neoformado, (DM) Dura Mater, (CT) Tecido Conjuntivo, (*) área cementante.	55
Figura 20. Fotomicrografia do grupo GG contemplando a área completa da lesão após 28 dias do pós-cirúrgico: à esquerda, aumento de 2,5x; à direita, ampliação da borda do defeito com aumento de 10x. (OA) Osso Antigo, (ON) Osso Neoformado, (DM) Dura Mater, (TC) Tecido Conjuntivo, (*) área cementante.	56
Figura 21. Fotomicrografia do grupo L2F contemplando a área completa da lesão após 28 dias do pós-cirúrgico: à esquerda, aumento de 2,5x; à direita, ampliação da borda do defeito com aumento de 10x. (OB) Osso Antigo, (NB) Osso Neoformado, (DM) Dura Mater, (CT + B) Tecido Conjuntivo + Biomaterial, (B) Biomaterial, (RB) Biomaterial Residual, (*) área cementante.	58
Figura 22. Fotomicrografia obtida da região de borda do defeito após 28 dias do grupo L2F com aumento de 20x. (OA) Osso Antigo, (ON) Osso Neoformado, (RD) Recente Deposição óssea, (v) vaso sanguíneo, células osteoprogenitoras (cabeças de seta), osteócitos (setas pretas), osteoblastos recém incorporados à matriz óssea (setas vermelhas), biomaterial em interação com células do tecido conjuntivo (setas brancas), (*) área cementante.	59

Figura 23. Fotomicrografias da região cortical na porção esquerda e medular em porção direita inferior de rins dos camundongos 28 dias do pós-cirúrgico, corado com eosina e hematoxilina, em campo ampliado (esquerda) e região detalhada (direita): (a) grupo controle; (b) grupo GG; (c) grupo L2F. Todos apresentando corpúsculo renal, glomérulo, cápsula de Bowman e espaço subcapsular preservados (círculos) e túbulos contorcidos (setas vermelhas).	62
Figura 24. Variabilidade das medições do diâmetro da lesão óssea em camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos, por camundongo (duplicata).	64
Figura 25. Variabilidade entre as medições em triplicata do diâmetro de cada lesão óssea em calvária de camundongos Swiss submetidos aos diferentes tratamentos. ...	67
Figura 26. Comparação das médias nas medidas de cicatrização óssea entre grupos de tratamento em diferentes dias de avaliação.	68
Figura 27. Comparação das diferenças médias nas medidas de cicatrização óssea entre os grupos de tratamento por teste de Tukey.	71
Figura 28. Análise de regressão da tendência das medições ao longo do tempo por grupo de tratamento, destacando a redução diária média em milímetros.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variabilidade das medições de cicatrização óssea em camundongos Swiss submetidos aos tratamentos, distribuído por camundongo avaliados.	63
Tabela 2. Variabilidade das medições de cicatrização óssea em camundongos Swiss submetidos aos tratamentos, distribuído por diferentes medições.	66
Tabela 3. Análise de dados da atividade regenerativa dos diferentes tratamentos em defeitos provocados em parietal de camundongos swiss.....	68
Tabela 4. Diferenças médias nas medidas de cicatrização óssea entre grupos de tratamento em diferentes dias de avaliação pelo teste de Tukey.	70
Tabela 5. Redução diária do diâmetro da lesão circular em milímetros por tratamento obtida por análise de regressão linear.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D - tridimensionais

CAD – Desenho Assistido por Computador

FBS - soro fetal bovino

FTIR - Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier

GG - goma gelana

M - Molar

UV - ultravioleta

°C – graus célsius

MEV – microscopia eletrônica de varredura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo geral	16
2.1.1 Objetivos específicos.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 TECIDO ÓSSEO.....	17
2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS TRANSPLANTES ÓSSEOS.....	20
2.3 DEMANDA DE SUBSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO	21
2.4 REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	23
2.5 BIOMATERIAIS APLICÁVEIS AO TECIDO ÓSSEOS.....	24
2.6 RESULTADOS DE ENSAIO <i>IN VITRO</i> DO L2F.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 OBTENÇÃO DO BIOCOMPÓSITO.....	30
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	30
3.3 PROTOCOLO ENSAIO <i>IN VIVO</i>	31
3.4 ANÁLISE POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA.....	36
3.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS HISTOLÓGICAS	37
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	39
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (mev)	41
4.2 ENSAIO <i>IN VIVO</i>	45
4.3 ANÁLISE POR MICRO CT	47
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA	54
4.5 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA	63
5. CONCLUSÕES.....	73
6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO 1.....	73

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos inúmeros avanços conquistados pela medicina até o momento, grandes ainda, são os desafios enfrentados na manutenção da saúde. Fato que impulsiona o constante desenvolvimento de tecnologias inovadoras e a permanente busca por novas soluções para a prática clínica. A demanda cirúrgica envolvendo reparo ou substituição do tecido ósseo é crescente, mas, frequentemente limitado pela falta de suprimentos e de matérias primas adequadas. Sendo assim, uma lacuna importante pode ser preenchida pelo desenvolvimento de materiais inteligentes, que ofereçam praticidade e propriedades personalizáveis ao cirurgião, assim como, segurança e conforto para o paciente. À essa perspectiva, convergem os esforços das pesquisas da bioengenharia de tecidos e mais especificamente, no desenvolvimento de novos biomateriais, com o intuito de oferecer ao mercado, possibilidades mais adequadas e bem definidas, de fácil acesso e com maior versatilidade (LAFUENTE-MERCHAN et al., 2022).

A substituição do tecido ósseo representa a segunda maior demanda dos transplantes realizados, ficando atrás apenas do transplante de sangue (ABTO, 2024). O índice elevado de falhas ósseas decorrentes de traumas, neoplasias no tecido ósseo, e complicações pós operatórias, configuram esse quadro frequente na rotina clínica. Em casos como de fraturas cominutivas (fragmentação óssea) ou de remoção de massa neoplásica com ressecção do segmento ósseo, uma alternativa de substituto ósseo é necessária, além de alternativas terapêuticas que apresentem maior eficiência durante o processo cirúrgico e no período de cicatrização tecidual (NIDAGUNDI; PUDAKALKATTI; VARSHITHA, 2023).

Nesse sentido, a bioengenharia de tecidos emerge com o potencial de auxiliar de maneira rápida, eficaz e personalizada a medicina regenerativa, possibilitando a união das tecnologias de captação e processamento de imagens médicas à biofabricação tridimensional de peças biomimetizadas, além de extrusão conjunta com células específicas e selecionadas. A bioimpressão tem se mostrado capaz de produzir modelos biológicos robustos e com funcionalidade semelhante aos naturais. Por essa razão, nos últimos anos tem se evidenciado pelos resultados satisfatórios, com grande potencial de auxílio no

cenário dos enxertos, implantes e transplantes. No entanto, essa tecnologia precisa ser atendida constantemente com materiais cada vez mais especializados, versáteis, acessíveis, que garantam aplicação segura, com características terapêuticas específicas para cada aplicação pretendida. Essa demanda criou uma forte tendência na pesquisa direcionada à análise e desenvolvimento de biomateriais com potencial de aplicação na fabricação de tecidos complexos (STOCCO, 2024).

Uma classe de biomateriais com potencial significativo na contribuição para o desenvolvimento de tecidos são os hidrogéis de polímeros naturais por demonstrarem capacidade reparadora de tecidos. A vantagem da sua aplicação em relação aos outros biomateriais, é a sua excelente biocompatibilidade, grande semelhança com a matriz extracelular, biodegradabilidade e baixa rejeição imunológica (NIDAGUNDI; PUDAKALKATTI; VARSHITHA, 2023). Os hidrogéis são ideais como biotintas para a bioimpressão, pela facilidade de extrusão proporcionada por sua estrutura maleável, mesmo em temperaturas amenas.

Por essa perspectiva, o biocompósito L2F (BR 10 2019 014592 7), foi criado à base de goma gelana, um polissacarídeo emergente pela versatilidade de aplicação, aliado ao biovitrocerâmico BIOVIT (BR102016003703-4) com propriedades específicas, sendo a principal delas, o potencial osteoindutor (SOUSA et al., 2012). Essa união formou uma biotinta apropriada para biofabricação com característica de injeção *in situ* por aplicação direta através de seringa comum, biocompatibilidade satisfatória em testes com células tronco mesenquimais e osteoindução em ensaio *in vitro*, característica que o classifica como um biocompósito bioativo (MATUCHESKI, 2022). Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo, a continuidade da pesquisa da aplicabilidade clínica do L2F por meio da verificação experimental em modelo animal da biocompatibilidade, potencial de ação osteoindutora e sua possibilidade de ser aplicado em fraturas ósseas de forma minimamente invasiva como acelerador da regeneração do tecido.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* e a capacidade osteoindutora do biocompósito L2F.

2.1.1 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo proposto, será necessário alcançar os seguintes objetivos específicos:

1. Produzir o biocompósito L2F;
2. Elaborar protocolo de ensaio *in vivo*;
3. Analisar a biocompatibilidade do L2F;
4. Analisar resposta osteoindutora do L2F.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo e o elemento estrutural primário do corpo dos animais vertebrados. É responsável por oferecer proteção aos órgãos internos, alojar e proteger a medula óssea, formadora das células sanguíneas, dá suporte aos músculos que permitem o movimento do corpo humano e é responsável pelo fornecimento de cálcio e fosfato, que mantêm a homeostasia mineral em níveis adequados. É um tecido complexo e dinâmico, dada sua diversidade de funções e falhas na sua integridade, podem além de comprometer seu funcionamento, ocasionar lesões circulatórias sérias (WANG, 2017) (GRASSIE, 2022).

Sua constituição é dada em maior proporção, por tecido conjuntivo formado de matriz extracelular mineralizada que constitui um depósito de fosfatos de cálcio, colágeno, medula óssea, o endóstio, o perióstio, além de tecido nervoso, vascular e cartilaginoso. A matriz extracelular forma a parte metabolicamente ativa, do tecido ósseo, é uma região mineralizada e onde se encontram as células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e as células hematopoiéticas da medula óssea responsáveis pela constante remodelação deste órgão (GRASSIE, 2022).

Ao contrário de outros tecidos, o osso tem a capacidade de autoreparação e autorenovação. Esse processo ocorre sem a formação de cicatrizes e está diretamente associada a capacidade de consolidação de fraturas (GUERRERO, 2019). No entanto, a carga mecânica aplicada na área fraturada, o suprimento sanguíneo e oferta de minerais no local, são determinantes para o bom resultado de consolidação tecidual e são fatores essenciais para a estabilização, fixação e redução da fratura, fazendo com que o reparo tecidual ocorra de maneira gradual e eficaz, restabelecendo assim, sua funcionalidade. À nível celular, a remodelação óssea é dependente de duas linhagens, os osteoblastos, responsáveis por formar tecido mineralizado e os osteoclastos que fazem a reabsorção mineral e o comprometimento de qualquer destes fatores poderá resultar em consolidação retardada da fratura e formação de um falso calo ósseo propenso a novas fraturas (GUERRERO, 2019).

O osso é constituído por grupos especializados de células que fazem o arranjo sincrónico para o cumprimento do papel de sustentação do corpo, de forma que, a manutenção no processo de remodelação, reconstrução e reparo de falhas desse tecido é dependente da harmonia e funcionamento correto de cada um desses grupos celulares amplamente distribuídas ao longo do tecido (COWAN, 2023).

Esse processo de neoformação do tecido ósseo se dá por atividade de duas linhagens celulares, as osteoblásticas e as osteoclásticas. A primeira linhagem é composta por osteoblastos, osteócitos e células osteoprogenitoras, já a linhagem osteoclástica é formada pelos osteoclastos. O conjunto dessas quatro células é chamado de unidade multicelular básica (BMU) (ANSARI, 2020).

As células do tecido ósseo são classificadas como:

- Osteoblastos

Responsáveis pela síntetização da matriz orgânica composta por colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas. Se localizam na parte periférica e possuem forma variável, dependente da intensidade da atividade desempenhada, se tornando cubóides em atividade intensa e pavimentosos quando estão em baixa atividade e nessa conformação, passa a ser chamado de osteócito. A matriz óssea recém-formada, é depositada ao redor da célula e dos seus prolongamentos formando lacunas e canalículos. Antes da mineralização, a matriz é chamada de osteóide e é composta essencialmente por osteocalcina e sulfato de condroitina. Em análise histológica se apresenta com coloração menos intensa que a matriz mineralizada (GUERRERO, 2019).

- Osteócitos

São responsáveis pela manutenção da matriz óssea. São células ósseas maduras e se localizam no interior das lacunas formadas por elas, anteriormente na forma de osteoblastos. Possuem citoplasma perinuclear, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi reduzidos e cromatina do núcleo condensada indicando pouca atividade celular, no entanto sua ação de reabsorção da matriz é de fundamental importância para a homeostase do cálcio no sangue de forma que a morte do osteócito promove a reabsorção da matriz por osteoclastos e posteriormente acontece o reparo ou remodelação do tecido ósseo pelos osteoblastos. A comunicação entre essas células ocorre por meio

dos canalículos que possibilitam nutrição dos osteócitos por passagem de moléculas entre os capilares sanguíneos e os osteócitos (AMIRAZAD, 2022).

- Células osteoprogenitoras

São células mesenquimatosas (origem mesenquimal) com capacidade de diferenciação em osteoblastos e, portanto, adquirem a função de formação de matriz óssea. São consideradas células de reserva ou de repouso sendo, portanto, precursoras no crescimento do tecido ósseo e na reparação de fraturas. São encontradas nas superfícies inativas do osso, camada interna do periósteo, trabéculas de cartilagem calcificada, endósteo que reveste as cavidades medulares e nos canais de Havers e de Volkmann (AMIRAZAD, 2022).

- Osteoclastos

Células de superfície, móveis, grandes, multinucleadas, que apresentam ramificações irregulares e com função de reabsorver o tecido ósseo. Se acumulam durante a remodelação óssea em depressões, chamadas de lacunas de Howship. Sua atividade é regulada de maneira antagônica por calcitonina e paratormônio de forma que o paratormônio ativa a atividade de reabsorção óssea enquanto a calcitonina, a reduz.

A matriz óssea é composta por uma porção orgânica e uma inorgânica em proporção de 35% e 65%, respectivamente. A constituição orgânica inclui fibras de colágeno do tipo I em proporção de 90%; proteoglicanos, ácido hialurônico; e proteínas não colagenosas, incluindo osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína. A parte inorgânica é formada por fosfatos de cálcio que formam a estrutura conhecida por hidroxiapatita, o material cerâmico mais abundante na matriz inorgânica. Além dos fosfatos de cálcio são encontrados bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A estrutura rígida do tecido ósseo se deve à associação das fibras colágenas com a hidroxiapatita e quando passam por processo de descalcificação, processo utilizado para confecção de lâminas histológicas, por exemplo, torna o tecido flexível (AMIRAZAD, 2022).

O tecido ósseo pode ser classificado em primário e secundário. O primário, se caracteriza por ser a primeira formação óssea, tanto no embrião, quanto no processo de reparação tecidual pós fratura e é transitório, sendo substituído posteriormente, pelo tecido secundário. No tecido ósseo primário as fibras colágenas se dispõem de maneira irregular, enquanto no secundário são lamelares (JUNQUEIRA, 2013).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS TRANSPLANTES ÓSSEOS

Os transplantes ósseos podem ser classificados como autólogos, alógenos, xenógenos ou aloplásticos.

O transplante autólogo é a substituição de um tecido danificado por enxerto proveniente do próprio receptor. É frequentemente utilizado em transplantes de fragmentos ósseos para reconstruções de pequenas áreas. Esse modelo de transplante tem como maior vantagem a diminuição do risco de rejeição, pela total compatibilidade genética, mas se limita à reparos de pequena extensão devido à pouca disponibilidade (HAUGEN, 2019). Além disso, tem-se as desvantagens da morbididade do local de extração, dor na recuperação pós-cirúrgica, longo tempo cirúrgico, e excesso de anestésico (NIDAGUNDI, 2023.).

Os transplantes alogênicos acontecem entre doador e receptor geneticamente distintos, mas pertencentes à mesma espécie, sendo a prática mais frequente. O aloenxerto pode ser doado por indivíduo vivo ou, com mais frequência, por indivíduo falecido em decorrência de morte encefálica. Como os aloenxertos ocorrem entre indivíduos geneticamente distintos, a maior barreira imposta por essa intervenção é uma compatibilidade genética satisfatória, que está intimamente relacionada à sobrevida do enxerto ou órgão. É, portanto, o maior desafio do cenário dos transplantes e mais frequente causa de insucesso das cirurgias de substituição de tecidos (HAUGEN, 2019).

O transplante xenogênico acontece entre doador e receptor de espécies distintas. Essa alternativa é utilizada como meio de facilitar o acesso ao enxerto ou evitar cirurgias adicionais como ocorre na implantodontia que evita em muitos casos o autoenxerto e o substitui pelo enxerto ósseo bovino liofilizado. Os xenoenxertos, são submetidos a processos e tratamento de desproteínização e decelularização para eliminação da imunogenicidade e diminuição do potencial infeccioso. No entanto, o processo de tratamento minimiza, mas não é capaz de eliminar completamente esses potenciais (ZIROLOMETA, 2022).

Os aloplásticos são os implantes produzidos com materiais sintéticos. Nas últimas décadas, têm sido o maior alvo de estudo da engenharia de tecidos por se sobressaírem em relação aos grupos citados anteriormente, pela versatilidade. Existe uma grande variedade de materiais com potencial para servirem como enxertos aloplásticos e permitem processamentos e adequações

específicas, a depender da aplicação desejada. Além disso, rompem a barreira imposta pelos outros grupos quanto à necessidade de compatibilidade genética, infecções provenientes do doador e disponibilidade (PASQUALI, 2022).

Importante elucidar o significado dos termos “transplante” e “implante”. Transplante se refere a transferência de material contendo tecido vivo, como órgãos inteiros, infusão de células, ou fragmentos. Implante destina-se ao material biológico ausente de fração celular viável, como os liofilizados de osso cortical bovino destinados à odontologia. O termo implante também se destina aos materiais sintéticos metálicos, poliméricos, cerâmicos, ou de qualquer origem que não seja a biológica (CUNHA, 2009).

2.3 DEMANDA DE SUBSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

As falhas ósseas decorrentes de traumas, complicações pós-operatórias e cirurgias associadas a remoção de tumores, fazem parte da rotina clínica. A cranioplastia, por exemplo, com a utilização do enxerto ósseo autólogo, é um procedimento realizado há milhares de anos para reparação do crânio, recuperação da sua função estrutural, proteger o encéfalo e manter a estética facial após intervenção cirúrgica ou lesão acidental. Apesar do vasto conhecimento da técnica cirúrgica e compreensão da biologia do tecido ósseo, é um procedimento que ainda decorre em altas taxas de complicação, variando entre 16% e 40%, com taxa de reoperação de 25% (LE et al., 2018; SOUZA, 2022).

As cirurgias de correção de fraturas ósseas são comumente realizadas pela utilização de material metálico inserido por meio de cirurgia invasiva, que apresenta grande eficácia na aderência de ossos grandes e pouca na aderência de pequenos fragmentos ósseos em fraturas cominutivas que apresentam a alta complexidade cirúrgica (MORAES, 2021.). Um dos tratamentos mais utilizados neste tipo de fratura envolve a substituição de um segmento ou o preenchimento da falha óssea. No entanto, o grande desafio se dá pela permanência de partículas ósseas no organismo trazendo consequências para o paciente como a recuperação mais lenta e possível desencadeamento de processos inflamatórios sistêmicos (AUGAT E RÜDEN, 2018).

Outra demanda recorrente na prática clínica é na área oncológica. Em casos de acometimento de fragmentos no tecido ósseo, o procedimento padrão é a substituição da área por fragmento ósseo sadio. No entanto, esse procedimento pode ser inviabilizado por escassez de material decorrente da dificuldade na estocagem do material coletado, além de altos índices de contaminação e consequente descarte. Essa problemática é potencializada pelo desconhecimento da população quanto à necessidade e possibilidade de doação de ossos (tecido ósseo). Fatos que aumentam a espera por uma viabilização de transplante e pode gerar agravamento do quadro clínico do paciente (POPEU, 2014).

Os enxertos ósseos para defeitos maxilofaciais são em sua maioria, autógenos ou autólogos e têm como principais características o fornecimento de células viáveis e a imunocompatibilidade, fatores primordiais para primeira fase da osteogênese. Entretanto, como já abordado anteriormente, essa via de doação tem como desvantagem a debilidade do sítio doador, desconforto maior ao paciente e maiores riscos cirúrgicos. Em estudo realizado por MOURA et al., 2016, 873 pacientes receberam enxerto autógenos em cirurgia de correção bucomaxilofacial e foram avaliados quanto às complicações. Destes pacientes, 290 apresentaram alguma complicação tendo, alguns deles, mais de uma complicação registrada: 45,9% decorrentes de infecções; 25,9% por perda do enxerto; 10,3% por deiscência; 4,5% remoção da fixação; 2,8% falha da fixação; 2,4% margem recidivada; e 8,3% de outras complicações. Os autores concluíram que o enxerto ósseo não vascularizado é indicada apenas em defeitos menores do que 6 mm, devido à maior taxa de reabsorção em enxertos maiores.

Outra especialidade com importante demanda de substituição óssea, é a implantodontia que, por meio da reabilitação protética implantossuportada, restabelece condições estéticas, fonéticas e fisiológicas do indivíduo que apresente edentulismo parcial ou total. O edentulismo, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), gera comprometimentos psicológicos e funcionais, tais como baixa autoestima e diminuição da eficiência mastigatória. Para que seja possível a reabilitação dentária, é necessária a presença de um nível adequado de remanescente basal ósseo para suportar e ancorar a implantação da prótese, estrutura essa que, por vezes, se apresenta em níveis

insatisfatórios pela reabsorção óssea decorrente da perda dentária. Esta reabsorção acontece, em média, 25% no primeiro ano e, aproximadamente, 0,2 mm por ano, nos anos subsequentes. Por isso, não é possível a realização de cirurgias implantodônticas sem antes ser feita a correção da maxila ou mandíbula atrófica por meio de implantação de enxertos ósseos autógenos, xenógenos ou sintéticos (PASQUALI, 2022).

2.4 REGENERAÇÃO ÓSSEA

A regeneração do tecido ósseo se dá por meio de ativação de diversos mecanismos de indução e condução óssea, pelo conjunto de células especializadas nesse processo, no intuito de restabelecer a função esquelética. Dois dos principais eventos biológicos que permitem a consolidação de fraturas, a manutenção do tecido e a neoformação óssea são a osteocondução e a osteoindução (CHEN, 2021).

Os substitutos ósseos devem apresentar propriedades químicas e biológicas similares às do osso, biocompatibilidade, biodegradação e facilidade de obtenção. Tem se desenvolvido, nas últimas décadas, uma variedade de materiais aplicáveis ao tecido ósseo visando melhorar a sua regeneração com menor impacto na qualidade de vida do paciente.

A aplicabilidade de cada substituto ósseo é dependente do êxito do material na mimetização das principais características intrínsecas do tecido. Sendo assim, é desejável que os biomateriais aplicados à regeneração óssea apresentem algum grau de atividade osteocondutora e osteoindutora, para que promova a osteogênese no local aplicado e resulte em uma regeneração rápida e satisfatória do tecido (CHEN, 2021).

O potencial osteogênico define a regeneração primária do tecido ósseo pelo fornecimento de células viáveis, podendo ser transplantadas através de enxerto ósseo convencional. A osteogênese é, então, induzida por células de revestimento quiescentes e por osteoblastos ativos capazes de induzir a neoformação. Essa aplicação tem sua eficácia diminuída, pela senescência celular durante o processo cirúrgico, tendo uma oferta média de apenas 10% de células viáveis ao tecido lesionado e, apesar da interação dos osteoblastos do receptor com o enxerto, a osteogênese acontece de forma limitada (DIAS, 2013).

A osteocondução é caracterizada pela presença de interação entre o tecido ósseo e o substituto após a implantação de forma que ocorra uma condução tridimensional do crescimento celular específico e resulte em neoformação tecidual. A interação é dada pela aderência celular ao aporte mecânico do biomaterial implantado ou do tecido enxertado e consequente crescimento celular de forma padronizada em toda extensão prevista pelo cirurgião no planejamento cirúrgico. O suporte mecânico oferecido pelo substituto ósseo é de fundamental importância, principalmente em correções de fraturas que exijam rápida união de fragmentos e formação de calo ósseo (CHEN, 2021).

O potencial de osteoindução de um material se refere à sua capacidade de estimular biologicamente o tecido receptor, especialmente pela indução da diferenciação celular de células tronco mesenquimais multipotentes em células de linhagem específica como as condrogênicas e osteogênicas. Essa bioestimulação ocorre pelo contato das células originárias do tecido a ser reparado, com agentes bioativos do biomaterial (WANG e YEUNG, 2017).

Os enxertos ósseos de origem autóloga apresentam osteoindução e osteocondução, mas com potencial de osteogênese frágil pela perda significativa de células, como já mencionado. Os enxertos de origem alogênica e os xenoenxertos, demonstram a capacidade de osteocondução e osteoindução, porém, pelo processamento pré transplante, o potencial de osteogênese é eliminado (decelularização do enxerto) (KUMAR et al., 2017).

Os implantes aloplásticos podem ser fabricados de forma a serem osteoindutores e osteocondutores, ou seja, possuem a vantagem em relação aos demais da possibilidade de personalização das propriedades dos materiais que os compõem, direcionadas à aplicação.

2.5 BIOMATERIAIS APLICÁVEIS AO TECIDO ÓSSEOS

Os biomateriais possuem protagonismo na perspectiva de aplicação como implantes ósseos pela sua facilidade de obtenção, capacidade de customização das propriedades pretendidas, personalização das dimensões e facilidade de aplicação cirúrgica (KUMAR et al., 2017). Os biomateriais com potencial de aplicação destinada ao tecido ósseo, são principalmente os cerâmicos, os

poliméricos e os compósitos (WANG e YEUNG, 2017), especialmente os naturais.

Os poliméricos (biopolímeros) naturais são materiais produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis como milho, celulose e quitina podendo ser extraídos de plantas, microrganismos, algas e animais. Esse grupo tem sido o mais utilizado para produção de arcabouços na engenharia de tecidos pelas suas características mecânicas e biodegradabilidade (PARK et al., 2017).

Os polímeros de origem biológica, apresentam-se como produtos não-tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, características que os tornam potencialmente mais seguros para utilização na engenharia de tecidos. Muitos biopolímeros com propriedade termoplástica apresentam, ainda, a capacidade de formar hidrogéis que os tornam particularmente úteis para aplicações biomédicas por meio da bioimpressão (WILLEMS, 2021).

Um grupo especial de biomateriais são os hidrogéis a base de polissacarídeos que são passíveis de extrusão em bioimpressoras e podem ser aplicados diretamente no local desejado por injeção de forma pura ou em conjunto com células viáveis (DWIVEDIA, 2020).

Uma estratégia promissora no emprego dos hidrogéis, portanto, é a sua utilização na construção de arcabouços biomaterial-células com expectativa de degradação progressiva da estrutura polimérica. Dessa forma, à medida que as células adquirirem confluência e tomam o espaço do biomaterial estrutural, um tecido novo é formado com função celular restabelecida (DWIVEDIA, 2020). Por essas características, os hidrogéis têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de pele *in vitro*, tecido cardíaco, adiposo, cartilaginoso e ósseo e na construção de tecidos híbridos com redes vascularizadas (NOH et al., 2019).

Os hidrogéis apresentam como maior limitação, sua fragilidade mecânica, principalmente se pensado no emprego como substituto ósseo, visto que, a função base de um substituto ósseo é a promoção de uma estrutura estável. Em contrapartida, um substituto ósseo rígido que forneça a sustentação mecânica, apresenta desvantagens principalmente pela impossibilidade de migração celular e lenta degradação fornecendo proteção óssea, o que dificulta a regeneração. Um meio solucionar o problema é pela união das de hidrogéis com

um material cerâmico (rígido), formando um biocompósito com as propriedades desejáveis (DWIVEDIA, 2020).

Os biocerâmicos são compostos inorgânicos que, dependendo da sua composição, podem favorecer a osteoindução e a osteocondução. Por essa razão, tem sua aplicabilidade estabelecida na área médica destinado aos implantes dentários e aplicação ortopédica. Os vitrocerâmicos são formados por cristais cerâmicos dispersos em uma matriz vítrea, com propriedades intermediárias entre os vidros e os cerâmicos. Esses materiais podem ser fabricados de forma a serem bioativos no ambiente ósseo, devido à concentração de fosfatos de cálcio na sua composição. Neste caso, a osteoindução é estimulada pela formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada quando o vitrocerâmico entra em contato com o tecido ósseo (WANG e YEUNG, 2017).

Os materiais à base de vitrocerâmicos possuem, como maior limitação, a rigidez que dificulta a conformação de implantes. Além disso, sua aplicação como sólido compacto é limitada pela possibilidade de ocorrência de microtrincas no material, comprometendo a sua resistência estrutural, principalmente quando sujeito a cargas cíclicas como as sofridas pelos ossos (DWIVEDI, 2020). Uma solução é o uso deste material em combinação com um hidrogel, formando um biocompósito bioativo com facilidade de aplicação.

Dentre as vantagens do biocompósito hidrogel-cerâmico, está a possibilidade de ser injetado no local da fratura. Muitos esforços têm sido empreendidos no sentido de minimizar o impacto cirúrgico, buscando produtos que viabilizem cirurgias menos invasivas, sem que seja comprometida a eficácia dos resultados (TARCHALA, 2016).

A aplicação injetável do biomaterial diminui consideravelmente a área de intervenção cirúrgica minimizando, dessa forma, o risco de infecções pela menor exposição, a chance de comprometimento dos tecidos circundantes à área tratada, e tendo impacto direto na melhor resposta pós cirúrgica com menor desconforto do paciente e custo da recuperação (TOMAS, 2021). Além disso, os biomateriais injetáveis se assemelham à matriz extracelular, possibilitando a migração celular no momento da aplicação.

Os substitutos ósseos injetáveis, portanto, se mostram uma forma promissora para geração de matriz osteocondutora e osteoindutora com

utilização na regeneração óssea por meio da aplicação direta na fratura ou por meio da construção de arcabouços por bioimpressão (WU et al., 2021).

2.6 RESULTADOS DE ENSAIO *IN VITRO* DO L2F

Os biocompósitos apresentam uma fase contínua denominada matriz e uma dispersa. A união dos dois componentes confere propriedades específicas ao novo composto. O bicomposto formado apresenta maior versatilidade e possibilita personalização com ajustes entre a proporção de cada componente, permitindo várias aplicações distintas de uma mesma mistura de biomateriais (BHARADWAZA E JAYASURIYA, 2020). O material de estudo do presente trabalho (L2F) é fruto dessa estratégia, formado pela união do biopolímero goma gelana (GG) como matriz e do vitrocerâmico biovit como material cerâmico de dispersão. A hipótese de aplicação do L2F, é embasada na perspectiva de funcionamento como aderente ósseo instantâneo, pela sua conformação de sol-gel. Essa conformação, possibilita aplicação injetável em estado de gel no local desejado ou de forma a produzir implantes personalizados por meio de bioimpressão (MATUCHESKI, 2020).

O vitrocerâmico Biovit (BR 10 2016 003703 4), é considerado um material inteligente por ter a tendência de sofrer degradação em meio ácido e manter suas propriedades em meio alcalino ou neutro. Este material possui, em sua composição, elementos reconhecidamente biocompatíveis (FERNANDES et al., 2008; SOUSA et al., 2012).

A GG é formada por polissacarídeo linear aniônico composto de unidades repetidas do tetrassacarídeo (sub-divisão do grupo de carboidratos) formado por: 1,3- β -D-glicose; 1,4- β -D-ácido glucurônico; 1,4- β -D-glicose; 1,4- α -L-ramnose; contendo um radical carboxila. Este material, em forma de gel transparente fabricado por processo de fermentação controlada, é amplamente usado na indústria alimentícia e em aplicações biomédicas devido à sua resistência ao calor (BLENCOWE, 2019). Existe uma forte tendência de aplicação da GG para liberação controlada de fármacos, moléculas e células aos tecidos. Apresenta ainda, uma peculiaridade favorável à aplicação na regeneração de tecido cartilaginoso pela semelhança estrutural com os glicosaminoglicanos nativos da cartilagem, devido à presença dos resíduos de ácido glicurônico em sua unidade de repetição (MOUSER et al., 2016).

A GG com dissolução controlada e em proporções definidas forma a matriz do biocompósito L2F. Em estudos anteriores da análise *in vitro* do biocompósito L2F com duas concentrações de BioVit (1% e 2% em massa) (MATUCHESKI, 2020), algumas propriedades importantes para avaliação da sua aplicabilidade foram evidenciadas. Em teste de solidificação, o L2F (em ambas as concentrações de BioVit) apresentou transformação instantânea do estado de gel para sólido em contato com solução simuladora de fluido corpóreo pela formação de ligações cruzadas com íons divalentes, e foi capaz de produzir arcabouços com aspecto semirrígido e homogêneo.

O L2F permitiu a injeção em temperatura ambiente sobre um osso temporal contendo perfurações como as frequentemente encontradas na prática cirúrgica da especialidade de otorrinolaringologia. A injeção foi realizada com facilidade e, ambas as concentrações, mostram a mesma aplicabilidade por via injetável (Figura 1).

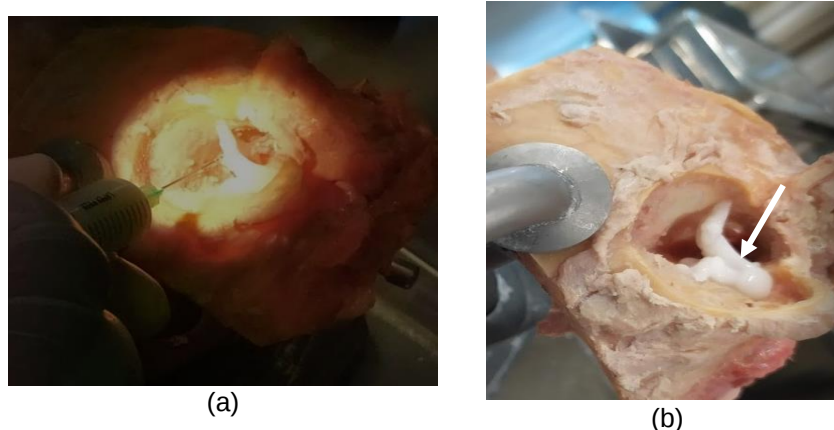


Figura 1. Reconstrução óssea de estrutura trabecular em uma amostra de osso temporal: (a) injeção do L2F em defeito do processo mastoide, (b) L2F solidificado após irrigação com soro fisiológico (seta). Fonte: (MATUCHESKI, 2020).

Outras características apresentadas pelo biocomposito L2F em análise *in vitro*, foram a osteocondução e a osteoindução, sendo o aporte físico evidenciado pela distribuição de células tronco por toda extensão do arcabouço (Figura 2) e a indução de diferenciação celular demonstrada pela presença de osteoblastos nas amostras após cultivo celular de 12 dias, apresentado na Figura 3 (MATUCHESKI, 2020).

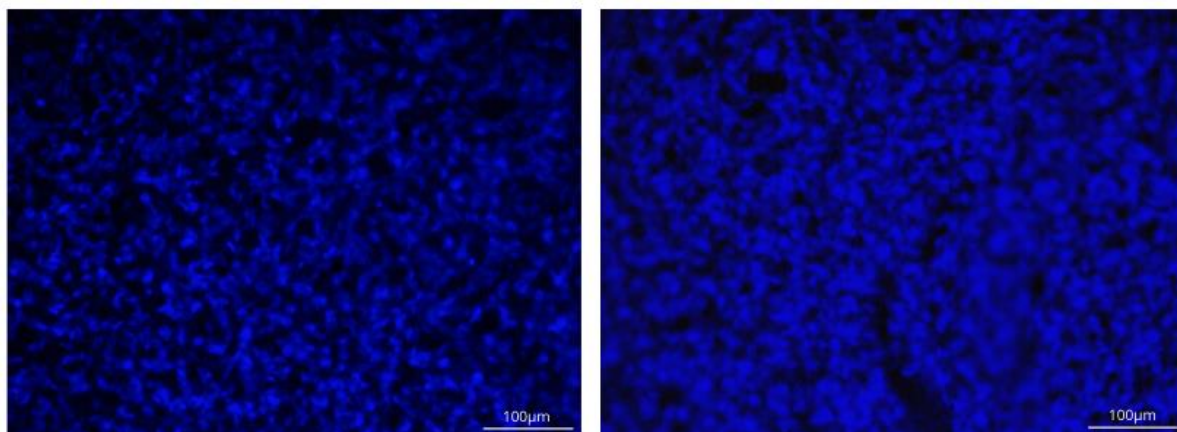


Figura 2. Teste de coloração DAPI - 4', 6-diamidino-2-fenilindol para visualização dos núcleos das células aderidas às amostras (coradas em azul). Fonte: (MATUCHESKI, 2020).

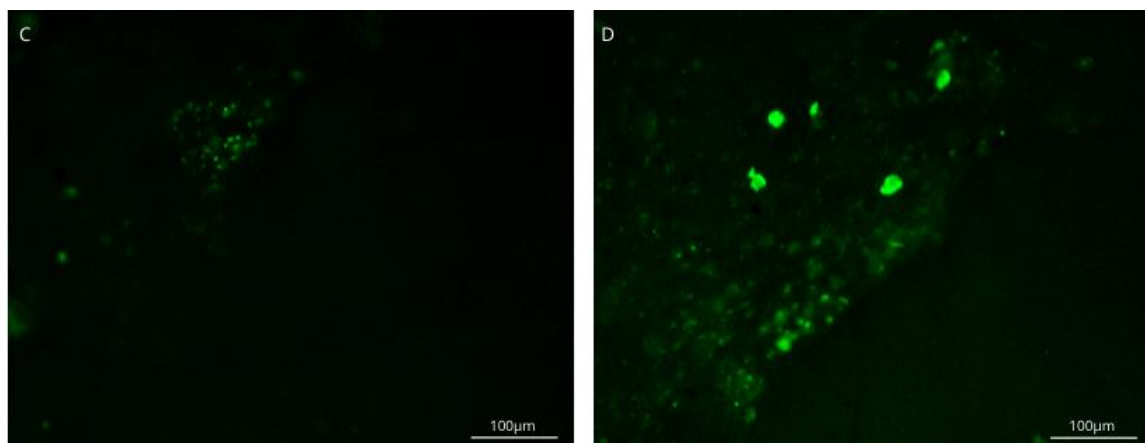


Figura 3. Ensaio de mineralização Osteoimage TM (LOPA1503 Lonza, Basileia, Suíça), com ligação específica aos fosfatos de cálcio dos nódulos ósseos depositados pelas células na coloração verde fluorescente. Fonte: (MATUCHESKI, 2020).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO BIOCOMPÓSITO

O Biovit (vitrocerâmico) foi fabricado de acordo com o processo constante na patente registrada (BR 10 2016 003703 4). Em linhas gerais: mistura de pós cerâmicos em proporções definidas, elevação até a temperatura de fusão dos pós em forno tipo mufla, vazamento do material vítreo em molde de aço, cristalização do vidro em forno programável, moagem do vitrocerâmico formado em moinho de bolas, e peneiramento para a determinação da gramatura. O vitrocerâmico foi utilizado na forma de pó fino como carga no polímero.

A goma gelana foi obtida diretamente do fabricante (CINOCEL INC) com certificação do fabricante e em forma de pó.

Para a produção do biocompósito, o pó de goma gelana foi primeiramente misturado em água deionizada em proporção de 5% de goma gelana em massa com agitação constante e em temperatura ambiente (20 a 25 °C), após mistura inicial, a solução foi aquecida a 90 °C até obtenção da dispersão total do pó. O pó do vitrocerâmico foi, então, acrescentado em proporção de 10% em massa. A solução foi deixada em repouso entre 10 e 15 minutos até alcançar 30°C.

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras do biocompósito foram produzidas conforme descrito no tópico 3.1 e ao chegar na temperatura ambiente, depositadas em poços de placa de cultivo celular de 96 poços e mantidas nessa temperatura por 24 horas. Foram, então, retiradas dos poços e levadas para secagem em liofilizador.

Após esse processo, as amostras foram seccionadas ao meio com lâmina de bisturi e submetidas ao processo de metalização com flash de ouro. A metalização e a visualização foram realizadas em equipamentos disponíveis no Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais (CMCM) da UTFPR - Metalizador (Quorum, Modelo SC7620) e Tescan, Modelo Vega3.

3.3 PROTOCOLO ENSAIO IN VIVO

O ensaio *in vivo* foi realizado em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR), no Departamento de Anatomia e tiveram início após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPR (CEUA/BIO-UFPR) aprovado em 24/10/2023 (Anexo 1).

Foram utilizados 24 camundongos Swiss fêmeas de 10 semanas de idade e massa corporal entre 300 e 350 g provenientes do biotério da universidade. Os animais foram aleatoriamente divididos entre os 3 grupos experimentais com 8 animais por grupo:

- Grupo controle (CTL): defeito parietal não tratado
- Grupo GG: defeito preenchido com Goma gelana 5% (massa)
- Grupo L2F: defeito preenchido com Goma Gelana 5% (massa) + vitrocerâmico 10% (massa)

Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixa plástica contendo 4 animais por caixa, tratados com ração comercial *ad libitum*, oferta hídrica constante. A temperatura da sala onde foram mantidos era controlada e mantida em 21°C, sob um ciclo claro/escuro de 12h. Os camundongos de cada grupo foram marcados nas caudas com caneta para identificação.

A GG e o L2F foram reservados em seringas de 1mL com agulha de 0,45 mm para aplicação na calvária dos camundongos do estudo.

Os camundongos foram levados do biotério para a sala de experimentos e mantidos em aclimação por 30 min. Passado esse período, foram retirados da caixa, gentilmente segurados pela base da cauda, posicionados na grade da gaiola e imobilizados de maneira que os membros torácicos estivessem pressionados entre o polegar e a lateral do indicador do pesquisador. A anestesia foi realizada por aplicação intraperitoneal em quadrante inferior esquerdo com seringa de insulina de 1 ml contendo solução de Xilazina 5 mg/kg + Cetamina 100 mg/kg. Durante a aplicação, o animal foi mantido com o ventre para cima e com a cabeça ligeiramente inclinada para baixo e a introdução da agulha respeitou um ângulo de 45° com a parede abdominal. Depois de anestesiado, o animal foi devolvido à gaiola até percepção de sedação completa.

Sob efeito anestésico, o animal foi fixado em estereotáxico (David-Kopf Instruments, EUA), e foi realizada a tricotomia da região dorsal da cabeça e

incisão com lâmina de bisturi nº 15 sobre o osso parietal seguida de afastamento e rebatimento dos tecidos epidérmico, muscular e o periósteo, até a exposição do osso parietal (Figura 4a). A trepanação (perfuração do osso), Figura 4b, foi realizada com broca odontológica cilíndrica de 2 mm de diâmetro com perfuração total do osso parietal, mantendo-se a integridade da dura-mater (Figura 4c).



(a)



(b)



(c)

Figura 4. Procedimento experimental: (a) fixação de camundongo em estereotáxico, após tricotomia do local de incisão e exposição do osso parietal; (b) Trepanação com broca odontológica cilíndrica diamantada na porção lateral direita do parietal do camundongo; (c) perfuração de 2 mm.

Os oito animais destinados ao grupo CTL tiveram o defeito parietal provocado e em seguida a sutura foi realizada por meio de pontos contínuos com Mononylon 3-0 (Ethicon, Johnson&Johnson). Os oito animais do grupo GG receberam aplicação por meio de gotejamento do gel na lesão até o

preenchimento completo e suturados. O grupo L2F, após trepanação, recebeu o biocompósito por gotejamento com seringa de 0,5 mL até preenchimento da área perfurada, Figura 5, seguida de sutura em pontos contínuos.

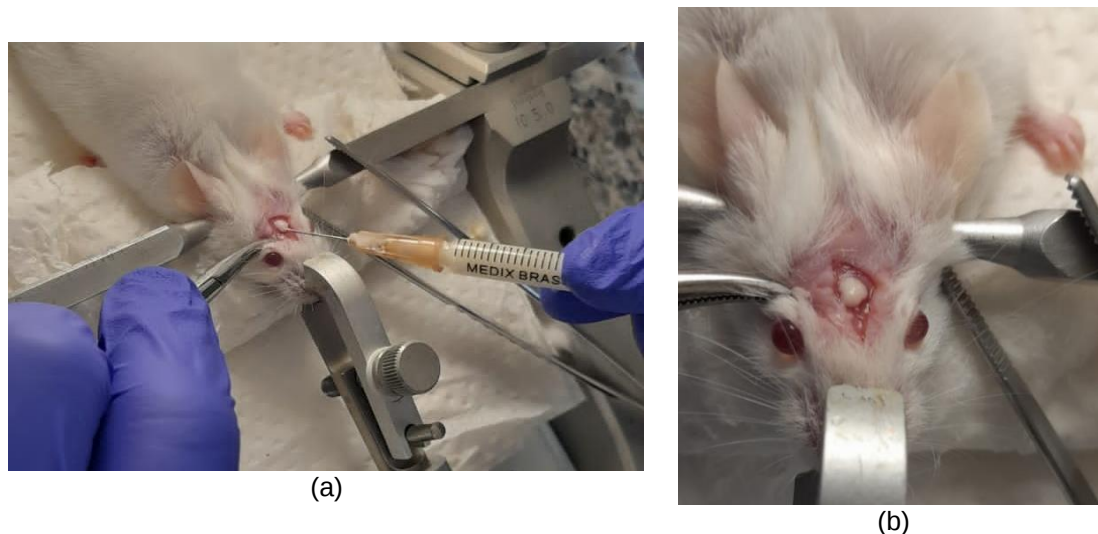


Figura 5. Tratamento grupo L2F: (a) Aplicação do L2F com agulha de 0,45 mm sobre a perfuração; (b) perfuração preenchida com L2F.

A recuperação anestésica foi realizada em gaiola contendo tubo plástico com água aquecida em temperatura de 35 °C para evitar hipotermia, Figura 6a, até que o animal estivesse com atividade motora plenamente restabelecida. Cada grupo foi então devolvido ao biotério e mantido sob analgesia durante três dias seguintes de pós-cirúrgico com administração de paracetamol diluído em água na proporção de 3,5 mg/ml em oferta contínua, e com alimentação abundante, Figura 6b.

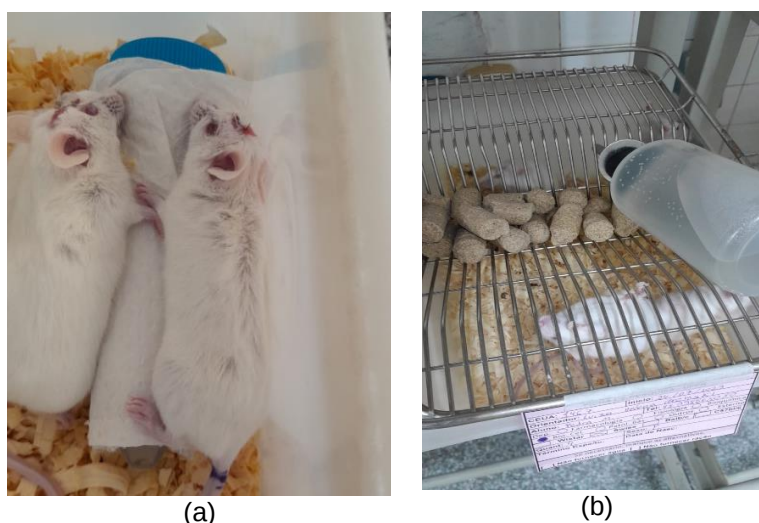


Figura 6. (a) Camundongos em recuperação anestésica após procedimento cirúrgico sendo aquecidos em contato com tubo Falcon contendo água a 35 °C revestido com papel toalha; (b) camundongo em gaiola no acompanhamento pós-cirúrgico.

Ao completar 7 dias do pós-cirúrgico foi realizada eutanásia de dois animais de cada grupo para retirada da calota craniana. Este procedimento se repetiu depois de 14 e 21 dias do pós-cirúrgico. Os dois últimos animais de cada grupo foram eutanasiados aos 28 dias do pós-cirúrgico com perfusão seguida de coleta do crânio e rins para avaliação de eventos adversos sistêmicos.

O processo de eutanásia se deu pela administração de dose letal segundo o Guia de eutanásia do CEUA – UNIFESP 2019, com associação das drogas anestésicas Cetamina e Xilazina na proporção 300 mg/kg e 30mg/kg por via intraperitoneal, seguindo o mesmo procedimento de captura e injeção do procedimento anestésico.

O osso parietal dos animais foi retirado logo após a confirmação do óbito por meio de observação dos sinais vitais. O procedimento ocorreu por meio de decapitação seguida de incisão na pele ao longo da linha média do pescoço para o nariz para exposição do crânio como ilustra a Figura 7.

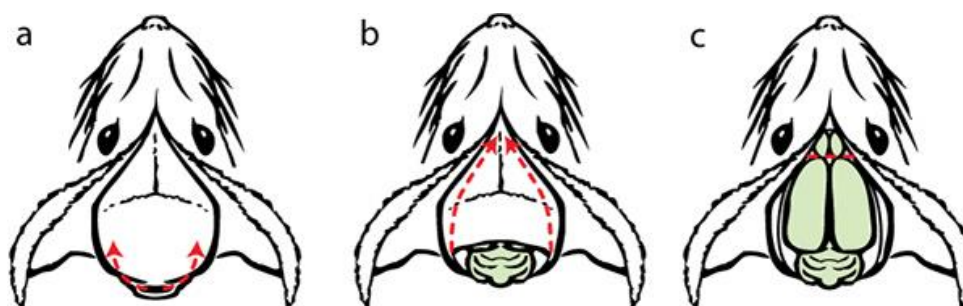


Figura 7. Procedimento de dissecação e coleta das amostras de calvária: (a) corte lateral com tesoura ao longo da superfície interna do crânio; (b) corte completo do crânio; (c) exposição do cérebro. Fonte: (KIPKE et al 2012).

Com a cabeça segura entre os dedos, iniciou-se o corte do crânio com tesoura afiada, cuidadosamente para não danificar a área de interesse da amostra (perfuração no parietal). Após a coleta, o osso foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, por 72 h e, posteriormente, armazenadas em álcool 70% para serem destinadas às aquisições de imagens por micro CT por histologia.

O procedimento de perfusão nos 2 animais por grupo nos 28 dias do pós-cirúrgico, teve início com a administração de dose letal conforme descrito anteriormente no procedimento de eutanásia. Imediatamente após a perda de

percepção de dor do animal, confirmada por método de resposta de pinça, foi realizada a fixação do mesmo em decúbito lateral em base de isopor prendendo as patas com agulhas contra o apoio. A Figura 8 ilustra a sequência do procedimento.

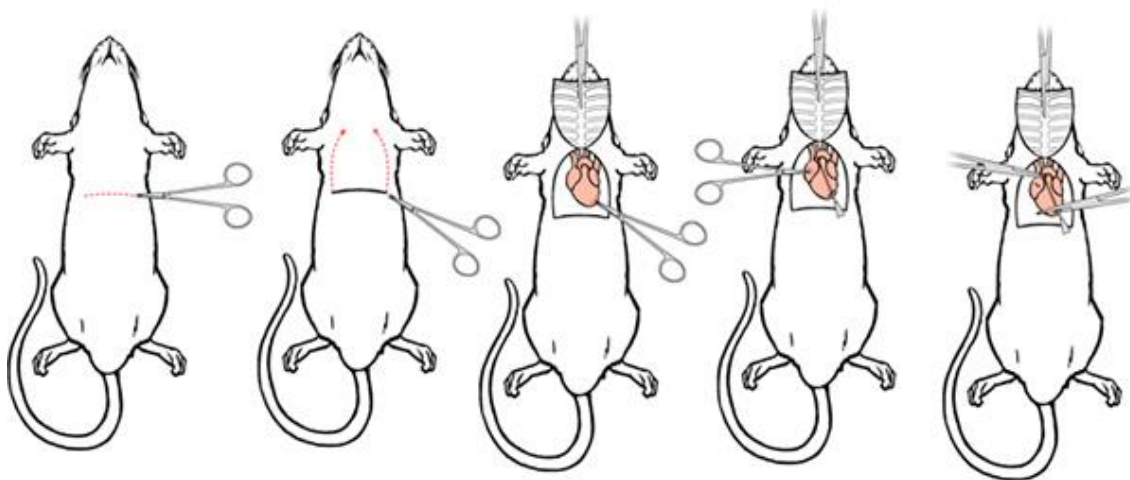


Figura 8. Preparo para a perfusão, da esquerda para a direita: corte abaixo da caixa torácica; cortes laterais ao longo da caixa torácica; exposição do coração; incisão no átrio direito; inserção da agulha na aorta ascendente. Fonte: KIPKE et al., 2012.

Com o animal preso à base, faz-se uma incisão laterolateral através do tegumento e da parede abdominal logo abaixo da caixa torácica, posteriormente, a incisão é prolongada cranialmente e bilateralmente até as clavículas.

Então, faz-se uma incisão cuidadosa no átrio direito do animal usando uma tesoura de íris para criar uma saída para o sangue e para os líquidos injetados para perfusão, com cuidado para não danificar a aorta descendente. Em seguida, insere-se uma agulha de calibre 15 através da aorta ascendente, finalizando o processo de preparo para perfusão.

Antes da perfusão, a cânula que carregou a solução foi lavada com solução salina para retirada completa do ar. Em seguida foi encaixada na agulha que estava inserida no animal. A bomba de infusão foi ligada até a pressão de 80 mmHg para a injeção de 30 mL de solução tampão. Quando 30 mL do tampão foi injetado, a bomba foi desligada e a cânula foi trocada para a solução fixadora de paraformaldeído 4%. A bomba foi ligada novamente para a passagem do fixador. Um indicativo de que o procedimento de perfusão está correto é o clareamento do fígado passando de um vermelho escuro a marrom claro durante a passagem do tampão, assim como a observação de espasmos musculares

com clareamento de extremidades durante a passagem da solução fixadora. Finalizada a passagem do líquido fixador, a bomba foi desligada e a agulha retirada. Nesta etapa o animal estava rígido. A Figura 9 ilustra a sequencia de perfusão.

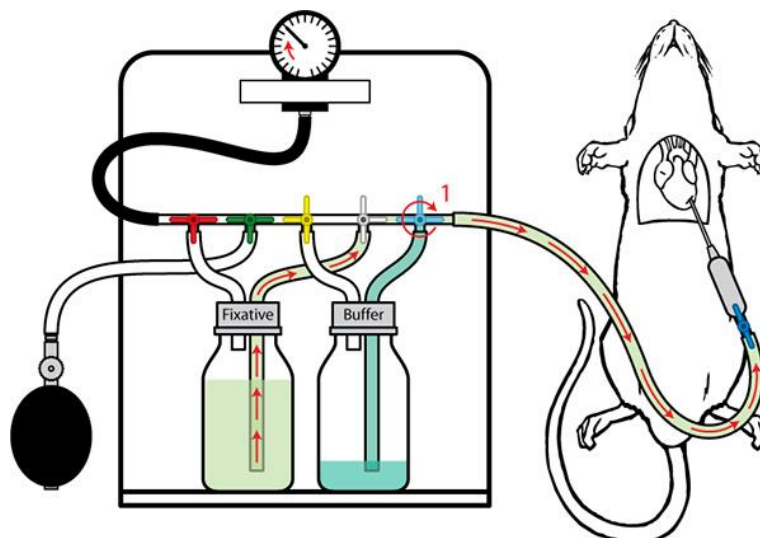


Figura 9. Procedimento de perfusão em camundongo com solução tampão e solução fixadora. Fonte: (KIPKE et al 2012).

Terminada a perfusão, foi realizada a coleta dos rins e do osso parietal. Os rins foram acondicionados em tubos Falcon de 50 mL contendo solução de Paraformaldeído (PFA) 4% por 72 h. Em seguida foram imersas em álcool 70% para serem destinadas às análises de micro CT e histologia.

3.4 ANÁLISE POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

A aquisição das imagens dos ossos parietais foi feita em equipamento Micro CT Bruker Skyscan disponível no LAMIR- UFPR (resolução 35 μ m, 100 kV, 100 mA), em três planos, possibilitando a reconstrução tridimensional das estruturas. Foi possível o posicionamento de quatro amostras por vez, como pode ser visto na Figura 10. Os defeitos reconstruídos e a extensão da cicatrização óssea puderam ser visualizados por meio do software do fabricante (Dataviewer-v1.5.4.0, CTAn v1.14.11.0).

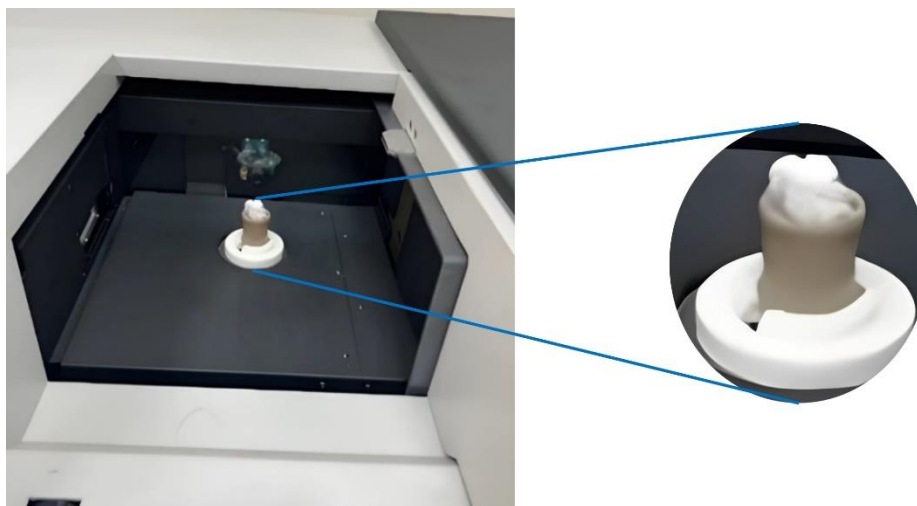


Figura 10. Amostras posicionadas em equipamento de Micro CT com detalhe à direita.

Para realizar a análise morfométrica das imagens obtidas pelo Micro CT, foram avaliadas com o software 3D Slicer® (Brigham and Women's Hospital) versão 5.6.1.

Na primeira etapa, as imagens foram convertidas em arquivos de volume escalar (.NRRD) utilizando a extensão "Slicer Morph", disponível gratuitamente no próprio software. Esta etapa permitiu que todas as imagens adquiridas no micro CT fossem trabalhadas como um único arquivo, além de converter a escala de pixels para milímetros, possibilitando medições precisas. Nesta fase foi realizada a separação das imagens de cada amostra em um arquivo individual.

Em uma segunda etapa software 3D Slicer foi utilizado para a morfometria das amostras pela reconstrução tridimensional no módulo "VolumeRendering". Foram realizadas medições lineares, de diâmetro e profundidade em cada amostra. Cada medida foi efetuada três vezes pelo mesmo avaliador, sendo utilizada a maior medida obtida.

3.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS HISTOLÓGICAS

Depois da aquisição de imagens no Micro CT, as amostras de osso parietal foram submetidas ao processo de descalcificação em solução de EDTA 7% por trinta dias antes de seguirem para os protocolos padrão de preparo histológico.

As amostras de rim foram posicionadas em cassetes e desidratadas por meio de imersão subsequente em frascos contendo as seguintes soluções: álcool absoluto diluído com formalina a 4% (solução 80%), álcool absoluto diluído com formalina a 4% (solução 90%), álcool absoluto (99%); álcool absoluto (99%); e álcool absoluto (99%). Este processo garantiu a retirada de água dos tecidos permitindo a adequada impregnação da parafina.

As amostras passaram, então, pelo processo de diafanização com três banhos consecutivos de xilol. Em seguida, foram imersas em parafina líquida em 60 °C, em dois banhos consecutivos com cerca de 30 min cada e mantidas em estufa para total penetração no tecido. Ao serem retiradas da estufa, cada amostra foi transferida para formas retangulares refrigeradas com água amoniacal 10%, onde foi despejada a parafina líquida. Depois de solidificado, o bloco foi retirado para os cortes em micrótomo.

As fitas resultantes do corte no micrótomo foram transferidas com uma pinça para um banho-maria com água aquecida em 56 °C, abaixo do ponto de fusão da parafina, para serem distendidas e transferidas para lâminas de vidro limpas e secas. Posteriormente, foram estocadas em 70°C por 25 min para secagem e retirada da parafina impregnada. A retirada da parafina em excesso se deu por uma sequência de banhos: um em xilol quente (5 min), um em xilol frio (2 min), um em álcool 100% (1 min), um em álcool 95% (1 min), um em álcool 70% (1 min), e uma lavagem em água corrente durante 2 min.

Os cortes preparados foram então corados para a visualização de suas estruturas. Os corantes utilizados foram a Hematoxilina, uma base que cora componentes ácidos das células, tornando o DNA, RNA e o núcleo das células azulados, e a Eosina, um ácido que torna rosadas as substâncias presentes no citoplasma das células (TIMM, 2005). A sequência de coloração respeitou as seguintes etapas: imersão em Hematoxilina por 1 min e 30 s, lavagem em água corrente, imersão em Eosina por 1 min, lavagem em água corrente, desidratação com imersão em álcool absoluto e lavagem com xilol. As lâminas coradas seguiram para a análise histológica.

3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para evitar uma análise condicionada, todos os cortes histológicos foram examinados sem o conhecimento do grupo ao qual pertenciam. Após a identificação das lesões nos tecidos, as identificações das lâminas foram descobertas para a análise dos resultados. As imagens foram obtidas em microscópio ótico Nikon modelo Alphaphot -2 YS 2, com aumento de 40x para avaliação do campo total e, posteriormente, digitalizadas. As análises das imagens foram realizadas no software ZEN para verificação da interação do biomaterial com o tecido ósseo, identificação celular e comparação entre os grupos analisados.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva e a caracterização da amostra foram realizadas a partir do cálculo de média, desvio padrão, mediana e interquartis, mínima e máxima. A análise da variabilidade das medições foi realizada utilizando a média das três medições (triplicata) e a média das medições realizadas em dois camundongos por período (duplicata). Esta etapa teve como objetivo avaliar a consistência e a precisão das medições dentro de cada grupo ao longo do tempo.

A variabilidade entre os camundongos foi analisada por meio do desvio padrão (SD) e do coeficiente de variação (CV). Esses indicadores estatísticos foram utilizados para determinar a dispersão das medições e a estabilidade dos resultados e precisão das medidas em cada período de avaliação.

Para avaliar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Este teste foi essencial para verificar se os dados seguiam uma distribuição normal, condição importante para a validade de outras análises estatísticas subsequentes.

Para investigar as diferenças significativas nas medições das áreas de cicatrização óssea entre os grupos de tratamento ao longo dos diferentes períodos de avaliação, foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguidas por testes post-hoc de Tukey.

A ANOVA foi utilizada para determinar se havia diferenças estatisticamente significativas nas médias das medições entre os grupos nos

diferentes dias de avaliação. Após a identificação de diferenças significativas pela ANOVA, os testes post-hoc de Tukey foram aplicados para realizar comparações múltiplas entre os grupos. O objetivo do teste de Tukey foi determinar especificamente quais grupos diferem entre si, fornecendo uma análise detalhada das diferenças médias entre cada par de grupos de tratamento.

Para analisar a tendência de cicatrização óssea ao longo do tempo nos grupos, foi ajustado um modelo de regressão linear simples para cada grupo. Este modelo permitiu entender a relação entre o tempo (em dias) e a medida de cicatrização (em milímetros), oferecendo uma visão clara sobre a eficácia e a consistência dos tratamentos ao longo do período de estudo. Inicialmente, os dados foram organizados para facilitar a análise. Cada medida de cicatrização foi associada ao dia da avaliação e ao grupo de tratamento correspondente. A variável dependente no modelo de regressão foi o valor da cicatrização óssea (em milímetros), enquanto a variável independente foi o tempo (em dias).

Cada modelo foi avaliado pela significância estatística dos coeficientes, utilizando testes t para determinar a significância dos coeficientes. Os valores de p foram utilizados para verificar a significância dos coeficientes, com um valor de $p < 0,05$ indicando uma relação estatisticamente significativa entre o tempo e a medida de cicatrização. Os resultados foram apresentados graficamente, mostrando as tendências de cicatrização ao longo do tempo para cada grupo, com as respectivas linhas de regressão e intervalos de confiança.

Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 0,05. A análise estatística foi realizada utilizando o software R (versão 4.4.0) e a interface RStudio. O pacote ggplot2 foi utilizado para o desenvolvimento dos diagramas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O L2F foi produzido como descrito no item 3.1 deste documento. O material é viscoso, homogêneo, de coloração esbranquiçada e passível de aplicação por injeção.

O biocompósito L2F foi idealizado em 2018 com o intuito de aprimorar as características do vitrocerâmico BioVit, um osteoindutor biocompatível, que apresentava limitada aplicação pela sua estrutura rígida (SOUSA, 2010). O L2F demonstrou, em análise *in vitro*, perspectiva promissora de utilização na medicina regenerativa por sua apresentação como hidrogel com facilidade de aplicação *in situ*, osteoindução (estudo com células tronco), injetabilidade e printabilidade podendo ser empregado em biotintas na engenharia de tecidos para confecção de peças personalizadas por bioimpressão (MATUCHESKI, 2020).

No entanto, para sua utilização segura e eficaz na medicina regenerativa, se fez necessária investigação quanto às respostas fisiológicas deste material quando aplicado *in vivo*, motivo que objetivou o presente estudo.

4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise da amostra do biocompósito L2F em microscopia eletrônica de varredura permitiu avaliar o comportamento de distribuição superficial das partículas de vitrocerâmico em dispersão na matriz de GG, como mostra a Figura 11.

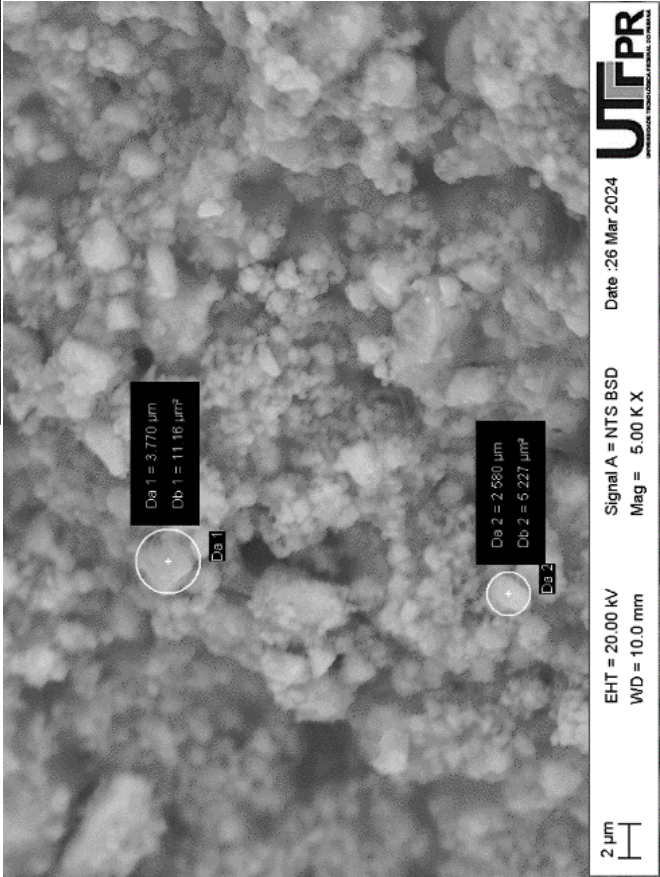
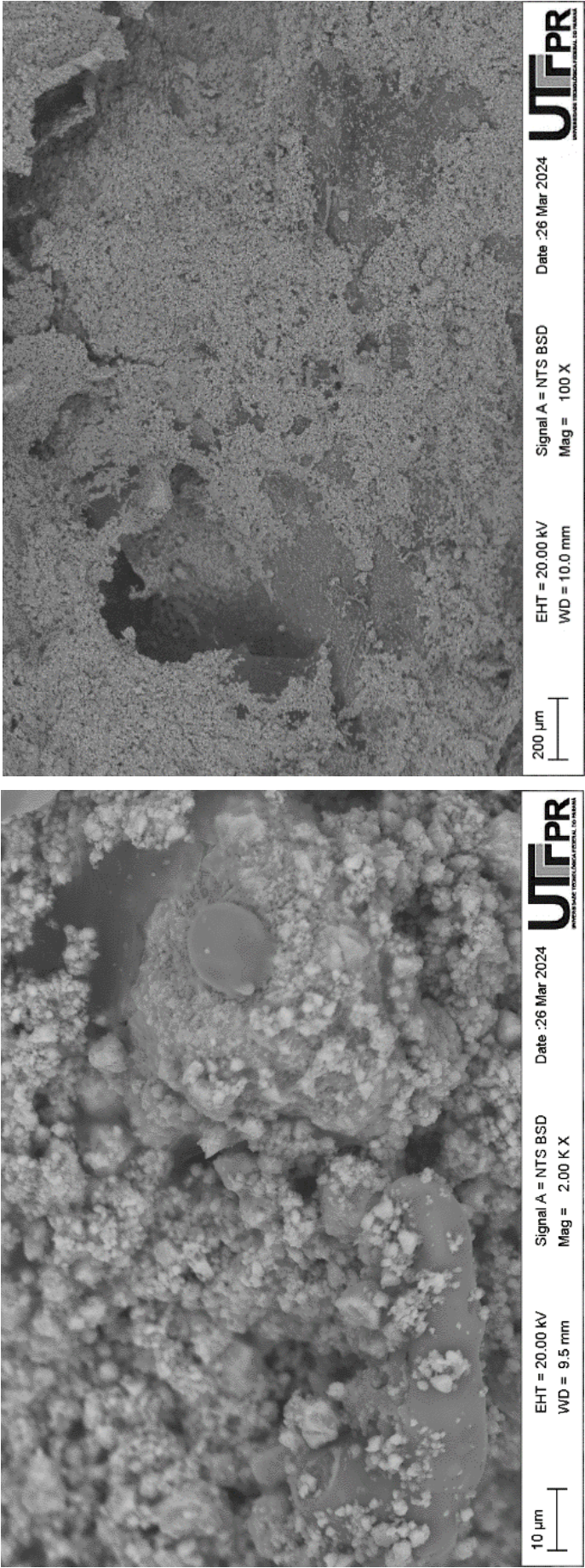


Figura 11. Imagens MEV da superfície de amostras liofilizadas do L2F: (a) aumento de 100 x, setas - regiões de acúmulo de revestimento (flash de ouro); (b) aumento de 2000 x, seta – partícula não cristalizada (vidro); (c) aumento de 5000 x mostrando o diâmetro de duas das partículas: 3.770 μm e 2.580 μm .

É possível observar uma superfície com partículas com formas irregulares de várias dimensões, formando uma superfície com alta rugosidade. Na Figura 11b, percebe-se a formação de alguns poros. Embora esta estrutura sólida não seja reproduzida *in vivo*, devido à grande quantidade de líquidos presentes no organismo, fornece informações sobre a característica superficial que, provavelmente, se reproduz internamente.

Conforme sugere NIKOLOVA e CHAVALI, 2019, a estrutura superficial irregular apresenta grande potencial de osteocondução pelo efeito de ancoramento da matriz osteoide neoformada. Com base nesta observação, seria possível supor que o L2F apresentaria, quando em contato com o organismo, características desejáveis à osteocondução, com a cinética de dissolução de partículas favorecida pela grande superfície de contato com os fluidos e pela liberação de material osteoindutor (BioVit).

Coathup et al., 2013, desenvolveram um estudo que correlacionou a atividade osteoindutora de grânulos com diferentes dimensões em tratamento de defeitos de côndilo femoral ovino, concluindo que os defeitos preenchidos com partículas entre 250 e 500 μm de diâmetro, demonstraram maior atividade osteoindutora em comparação com as partículas maiores, entre 1000 e 2000 μm , assim como em comparação com as menores, entre 90 e 125 μm . Jung, 2020 define como a média de diâmetros de 500 μm como ideal.

Como pode-se notar, principalmente pela Figura 11c, muitas das partículas do BioVit estão fora dos diâmetros registrados na literatura como ideais para a atividade osteocondutora (COATHUP, 2013 e JUNG, 2020). Apesar de, como mencionado, não haver consenso sobre as dimensões ideais, nota-se que um melhor controle no processo de moagem e peneiramento do BioVit poderá proporcionar maior uniformidade no tamanho das partículas, sendo possível o atingimento das dimensões preconizadas pela literatura. Vale notar, no entanto, que a uniformidade de tamanho pode não ser adequada para a ativação da osteoindução, pois a variação em dimensões das partículas garante a degradação diferenciada, favorecendo o suprimento contínuo do material osteoindutor no local da lesão.

Em relação à forma das partículas destinadas a reconstruções ósseas, foram realizados diferentes estudos com hidroxiapatita em forma de microesferas por Barletta, 2020 e Rolim, 2010, que demonstraram bioatividade e boa resposta na reconstrução óssea de calvária de ratos. Esta atividade foi também confirmada por Silva, 2014. Ainda segundo Marcacci et al., cerâmicas microesféricas favorecem a neoformação óssea por gerar espaços triangulares entre elas por onde ocorre migração celular, neovascularização, e passagem de nutrientes essenciais às atividades celulares. Em contrapartida, estudo realizado por Carvalho, 2010, demonstrou que hidroxiapatita em forma microesférica foi ineficiente e pouco biocompatível em tratamento de defeito calvarial de ratos, por desencadear reações inflamatórias exacerbadas com formação de tecido fibroso ao redor das partículas, sugerindo uma rejeição do biomaterial aplicado.

Em análise mais recente Shiu et al., 2021, avaliaram a atividade osteoindutora de dois biomateriais sendo um o Bio-Oss comercial e o outro, enxerto de fosfato de cálcio, ambos em contato com células tronco. A atividade com maior osteoindução foi observada em amostra do Bio-Oss em uma área específica com estrutura de partículas amorfas, nessa região foi identificada maior indução de sinais de calceína e integrina responsáveis por desencadear a formação óssea. Em outro estudo realizado por Godoi em 2022, demonstrou que o formato das partículas cerâmicas irregulares não interferiu na bioatividade do biomaterial testado uma vez que, nos primeiros 7 dias de cultivo com células tronco, foi verificado arredondamento de superfícies anteriormente pontiagudas.

Portanto, diante do exposto, o L2F apresentando partículas irregulares (amofas e cubóides) de BioVit, parece ter a tendência de favorecer a osteoindução. Isso foi demonstrado no ensaio *in vitro* descrito no item 3.10.

A Figura 11b mostra uma partícula esférica não cristalizada do BioVit. O processo de cristalização do BioVit tem a função de criar partículas menos pontiagudas do que as vítreas e com degradação mais lenta, oferecendo ambiente mais favorável às células e favorecendo a osteoindução. Embora a presença desta partícula não cristalizada não seja um fator impeditivo para o L2F atuar como material regenerador ósseo, pois se trata do mesmo material (BioVit), sugeriu que o processo de cristalização deve ser aprimorado.

4.2 ENSAIO *IN VIVO*

O modelo experimental de análise da atividade desempenhada por biomateriais aplicados à engenharia de tecido ósseo pela reconstrução de defeitos em calvária de roedores é amplamente utilizado, por esse motivo, a escolha da metodologia do presente trabalho seguiu essa técnica de análise por se tratar de uma avaliação de novo biomaterial com intuito de aplicação na medicina regenerativa do tecido ósseo.

A escolha do modelo animal foi feita pela maior disponibilidade no biotério da UFPR e facilidade de manuseio dos camundongos Swiss com vasta bibliografia, que permitiu embasamento da metodologia cirúrgica. A utilização de camundongos fêmea não foi uma solicitação específica de modelo experimental, no entanto, havia animais disponíveis para doação que atendiam aos critérios de idade e peso ideais para execução dos ensaios previstos. Por ser um ensaio de biocompatibilidade, o entendimento é que o sexo não afetaria os resultados, mesmo havendo possíveis oscilações hormonais pelo ciclo estral.

Todas as etapas de preparação, cirurgia e recuperação foram realizados de acordo com as diretrizes do manual de boas práticas de manuseio animal, após realização de capacitação de manipulação animal da UFPR e aprovação do CEUA. A cirurgia aconteceu com um único animal em sala de procedimento para evitar possível estresse por liberação de odores do anestésico, de sangue durante o processo cirúrgico, da iluminação e dos ruídos da broca.

O procedimento cirúrgico teve êxito em todos os 24 animais. Cada grupo foi destinado ao processo cirúrgico em um dia, sendo o primeiro, o controle com trepanação e sutura, segundo o GG e no terceiro dia, o L2F.

A lesão fabricada nos modelos animais foi realizada com sucesso com 1 mm de profundidade, preservando a integridade da dura mater para a diminuição do risco de lesão cerebral. Uma lesão cerebral acarretaria o aumento da chance de perda do animal durante o procedimento cirúrgico.

Todos os animais tiveram excelente recuperação, comportamento típico com atividade intensa logo após o retorno da anestesia. Todos se alimentaram e hidrataram normalmente desde o primeiro dia do pós-cirúrgico. Nenhum animal desenvolveu processo inflamatório ou infeccioso aparente no local da incisão e

a sutura permaneceu funcional até a eutanásia em todos os animais. Não foi necessária a intervenção com antibiótico.

Nenhum dos animais demonstrou sinal de dor (apertamento dos olhos, grunhidos ou hipoatividade) durante os 28 dias após procedimento cirúrgico. Dessa forma, não foi necessária a administração de analgésicos para nenhum dos grupos analisados.

Ao atingirem 7, 14 e 21 dias de pós cirúrgico dois animais de cada grupo foram eutanasiados e o osso calvarial retirado para microtomografia computadorizada e posteriores análises histológicas. A eutanásia ocorreu com um único animal na sala de procedimento no momento de aplicação. A retirada da amostra (Figura 12) com a área de interesse se deu sem maiores dificuldades com a separação do osso calvarial dos demais tecidos próximos e afastamento do cérebro.



Figura 12. Espécime calvarial de camundongo coletada.

Os animais que completaram 28 dias após tratamento, foram também eutanasiados e passaram pelo processo de perfusão para coleta dos ossos calvariais e rins. Todos os animais perfundidos tiveram a passagem das soluções com confirmação de êxito do processo com mudança da cor do fígado de vermelho escuro para marrom claro durante a passagem do tampão, e espasmos musculares com clareamento de extremidades durante a passagem da solução fixadora. A Figura 13 mostra uma perfusão em um dos camundongos.



Figura 13. Um dos camundongos em procedimento de perfusão, 28 dias do pós-cirúrgico.

4.3 ANÁLISE POR MICRO CT

A análise em Micro CT foi a base principal de análise comparativa para geração dos resultados do presente trabalho de forma que, a reconstrução de cada defeito parietal fabricado pudesse ser dimensionada por período para análise quantitativa da cicatrização.

A avaliação por meio do dimensionamento do diâmetro da lesão como base para a análise comparativa entre os grupos se deu para geração de resultados com maior consistência e menor grau de erro, visto que dimensões como a profundidade da lesão e mensuração da reconstrução tecidual da base em direção ao topo é suscetível a variabilidade de espessura do osso plano do crânio, e, por se tratar de análise quantitativa com pequenas medidas (com variações em milímetros e micrômetros) essa variação poderia gerar resultados imprecisos. Portanto, para evitar essa influência na análise, foi feita a medição considerando-se a atividade de neoformação apenas das laterais. Além disso, trabalhos como os de Wang et al., 2023, e Le, 2019, que avaliaram reconstrução de defeito em parietal, concluíram que a neoformação óssea em defeitos circulares de calvária acontece de forma mais expressiva nas bordas da lesão.

As imagens obtidas pelo Micro CT foram bem definidas em formato .png. Uma das reconstruções 3D realizadas com o software livre 3Dslicer é apresentada na Figura 14.

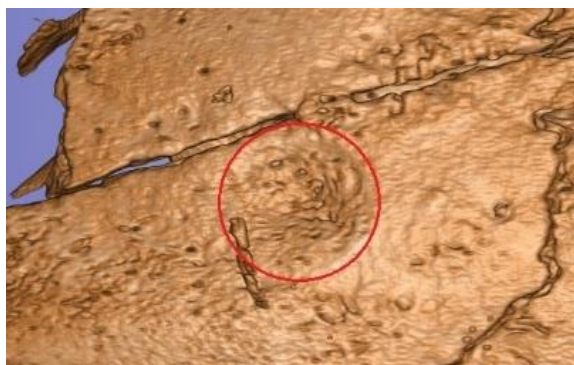


Figura 14. Reconstrução 3D da calvária de camundongo com parietal perfurado com broca esférica e tratado com biomaterial L2F (círculo vermelho), 28 dias de pós-cirúrgico.

A Figura 15 mostra o método usado para dimensionamento do defeito em parietal do camundongo, usando o software 3Dslicer.

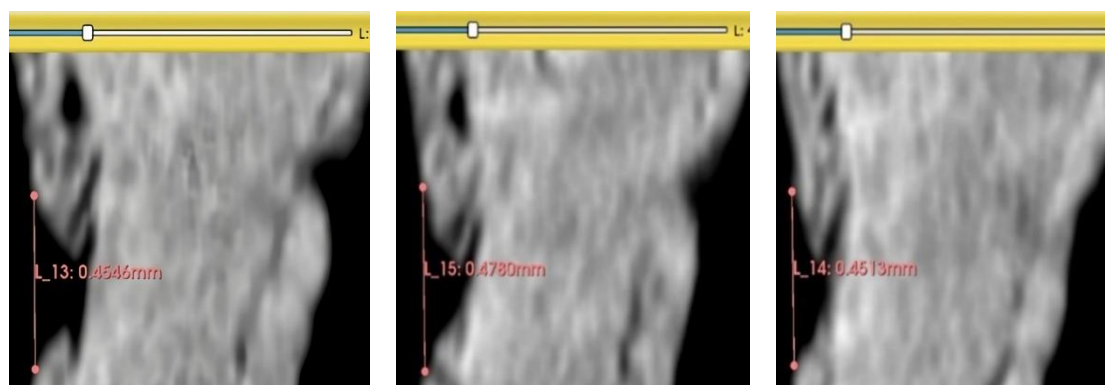


Figura 15. Método usado no dimensionamento dos defeitos parietais dos camundongos: medição realizada no software 3Dslicer em triplicata utilizando três feixes microtomográficos com maior distância entre bordas em sequência.

As Figuras 16, 17 e 18 apresentam os defeitos em visualização tridimensional e bidimensional em todos os períodos analisados.

A Figura 16 mostra as reconstruções dos defeitos do grupo controle. Aos 7 dias de cicatrização percebe-se discreta deposição de matriz óssea nas bordas do defeito, tanto laterais quanto na parte inferior em ambas as amostras. A amostra do quinto animal (E2) apresentou uma fratura com liberação de fragmento na sua base. Aos 14 dias, a intensidade de neoformação óssea se mostrou pouco aumentada, mantendo o aspecto circular bem delimitado nos dois defeitos.

Grupo Controle

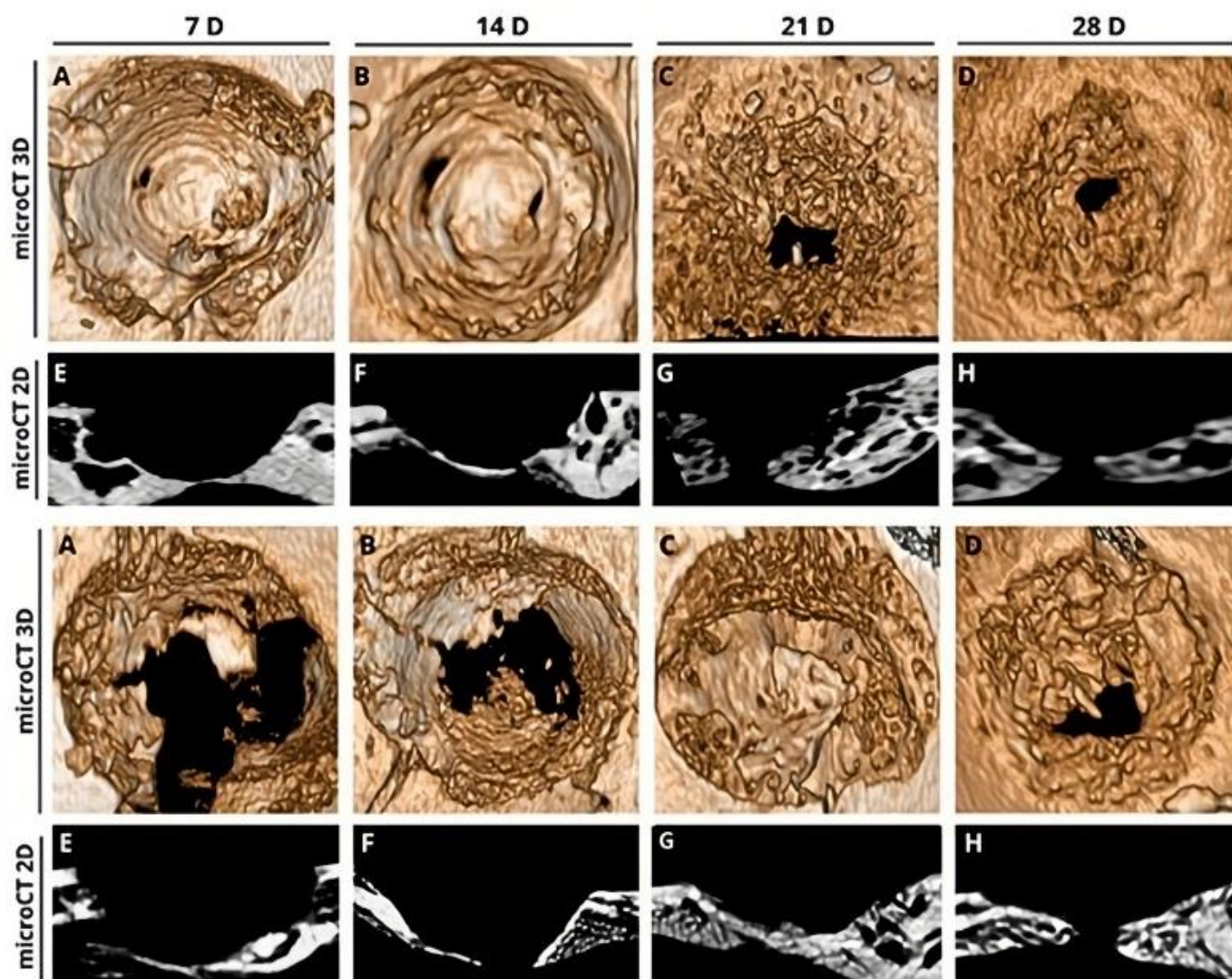


Figura 16. Reconstrução 3D (de A a D) e 2D (de E a H) das imagens microtomográficas de dos defeitos parietais dos animais em cicatrização pertencentes ao grupo controle nos períodos analisados (de 7 a 28 dias).

O aspecto de cicatrização aos 21 dias se mostrou mais intenso, com perceptível aumento de atividade de formação óssea nas bordas laterais do defeito e diminuição da profundidade da lesão (Figuras 16G). A atividade cicatricial na sequência dos quatro primeiros animais é mais visível com a perda de definição das bordas da lesão circular, no entanto, a atividade no centro do defeito se mostra ainda limitada. No segundo grupo (duplicata) é possível observar o contorno bem definido do defeito sinalizando pouca deposição de matriz neoformada nas bordas laterais nesse período. Aos 28 dias, a limitação de cicatrização no centro do defeito se mantém, no entanto, nas bordas é

percebida uma intensificação do reparo ósseo com aumento da densidade óssea em toda extensão.

Nas imagens 2D, aos 21 dias, fica evidente o aumento da extensão da cicatrização sendo projetada para o centro do defeito, com perceptível diminuição do diâmetro da abertura. Nota-se a neoformação óssea ramificada com base fixada nas bordas do defeito. Esse aspecto se deve ao aporte nutritivo concentrado nas laterais da lesão fabricada.

As etapas de cicatrização do grupo controle evidenciam reconstrução tecidual progressiva com atividade gradual da deposição óssea entre os períodos. Nota-se o início de atividade reconstrutora mais intensa entre os dias 21 e 28 com maior deposição percebida nas bordas do defeito. Esse padrão de atividade osteoreparadora é relatado por outros autores que observaram aumento da deposição de matriz óssea nas bordas de defeitos não tratados apenas após a segunda semana de recuperação (MONÇÃO, 2019; ROLIM, 2010; LEO, 2023).

Foi ainda possível observar que, neste grupo, embora tenha sido percebido aumento de atividade, o período analisado não foi suficiente para atingir o reparo total da lesão. Em estudo realizado por Benvindo, 2019, foi constatado que defeitos em calvária possuem cicatrização lenta sendo um mês de reparo insuficiente, independente do diâmetro da lesão fabricada, por se tratar de uma região com pouca vascularização.

A Figura 17 apresenta as reconstruções dos defeitos do grupo GG.

Tratamento GG

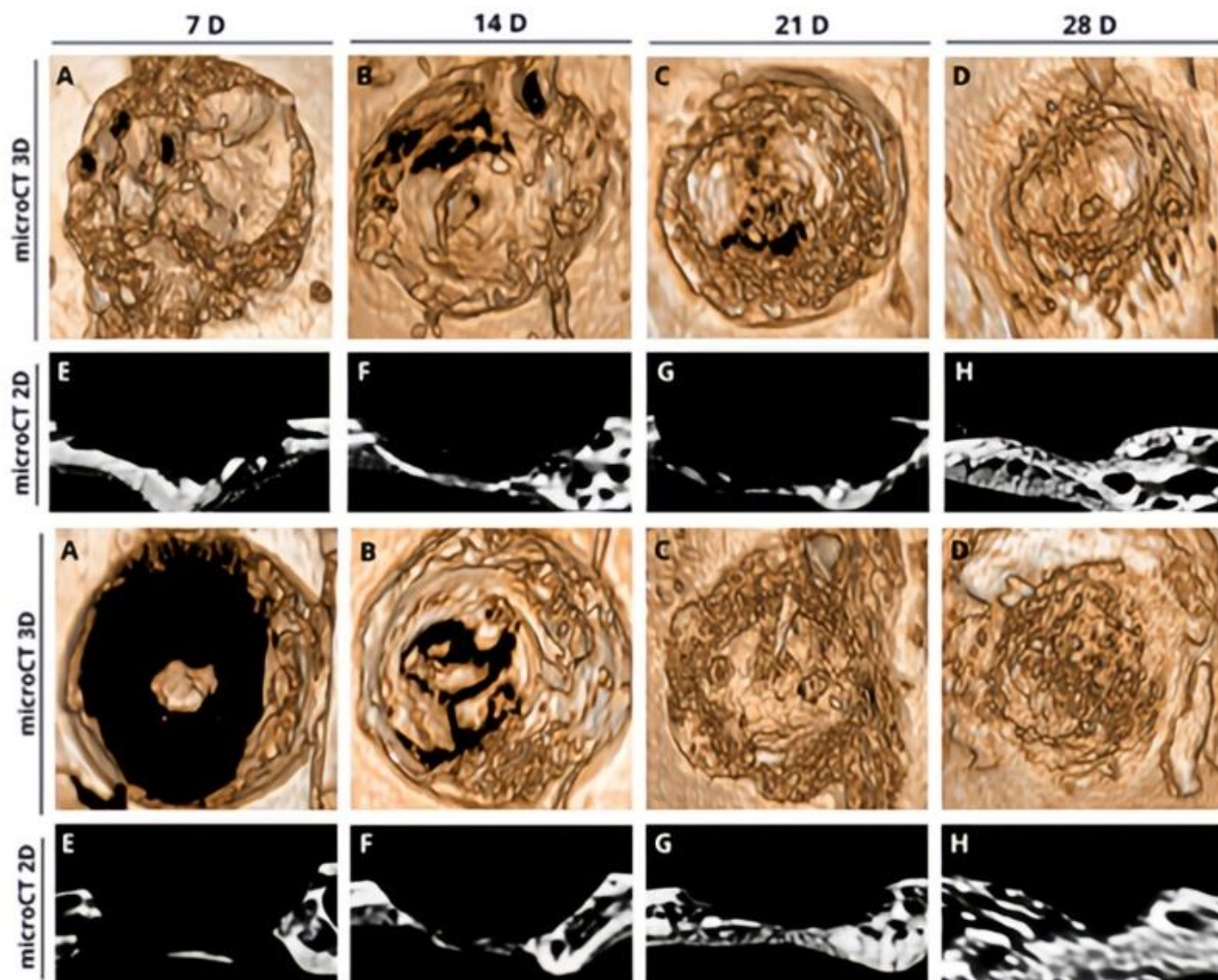


Figura 17. Reconstrução 3D (de A a D) e 2D (de E a H) das imagens microtomográficas de dos defeitos parietais dos animais em cicatrização pertencentes ao grupo GG nos períodos analisados (de 7 a 28 dias).

Aos 7 dias de cicatrização já é percebida uma atividade de deposição de matriz óssea nas bordas do defeito mais acentuada do que no grupo controle. Na duplicata (segundo grupo), é percebido um defeito com maior dano inferior e retirada do tecido ósseo mais expressiva. No entanto, é possível visualizar, já no primeiro período de análise cicatricial, uma ramificação na borda superior da imagem, padrão observado com maior evidência apenas na terceira semana de reparo do grupo controle.

Aos 14 dias, percebe-se aumento da intensidade de neoformação óssea com deposição de matriz óssea em regiões mais distantes da borda, por meio

de pontes ósseas formadas no interior do suporte de gel de GG, evidenciando ação osteocondutora do hidrogel, apesar de o aspecto circular da borda dos defeitos permanecer evidente.

Aos 21 dias do pós-cirúrgico o defeito, mostrou significativa regeneração tecidual, com evidente deposição nas bordas. É possível observar um sequestro ósseo (fragmento da matriz óssea original) que pode ter se soltado durante a fabricação do defeito e se instalado na parte interna após injeção da GG.

Aos 28 dias, houve uma expressiva cicatrização, com perda de definição da borda do defeito por intensa deposição de tecido ósseo em toda extensão da lesão e significativo preenchimento desde a base do defeito com perceptível diminuição da profundidade, como visto nas imagens 2D.

A comparação macroscópica dos diferentes períodos de cicatrização do grupo GG permite identificar uma progressiva reparação óssea com aumento gradual na deposição tecidual. É possível ainda observar atividade osteocondutora exercida pelo hidrogel por permitir aumento da área de cicatrização das bordas para o centro da lesão. No entanto, assim como no grupo controle, os 28 dias de cicatrização não foram suficientes para completa reparação do defeito, o que pode ser melhor visualizado pelas imagens 2D (Figuras 17H). Nessas imagens, observa-se canais de deposição unidos à borda evidenciando o suporte estrutural fornecido pela GG. O crescimento ósseo com ramificações mais distantes da borda sugere que a GG permitiu a neovascularização e migração celular em seu interior para que fosse possível a deposição de tecido ósseo distante da base nutritiva (JUNG et al., 2020).

A Figura 18 mostra as imagens dos defeitos do grupo L2F.

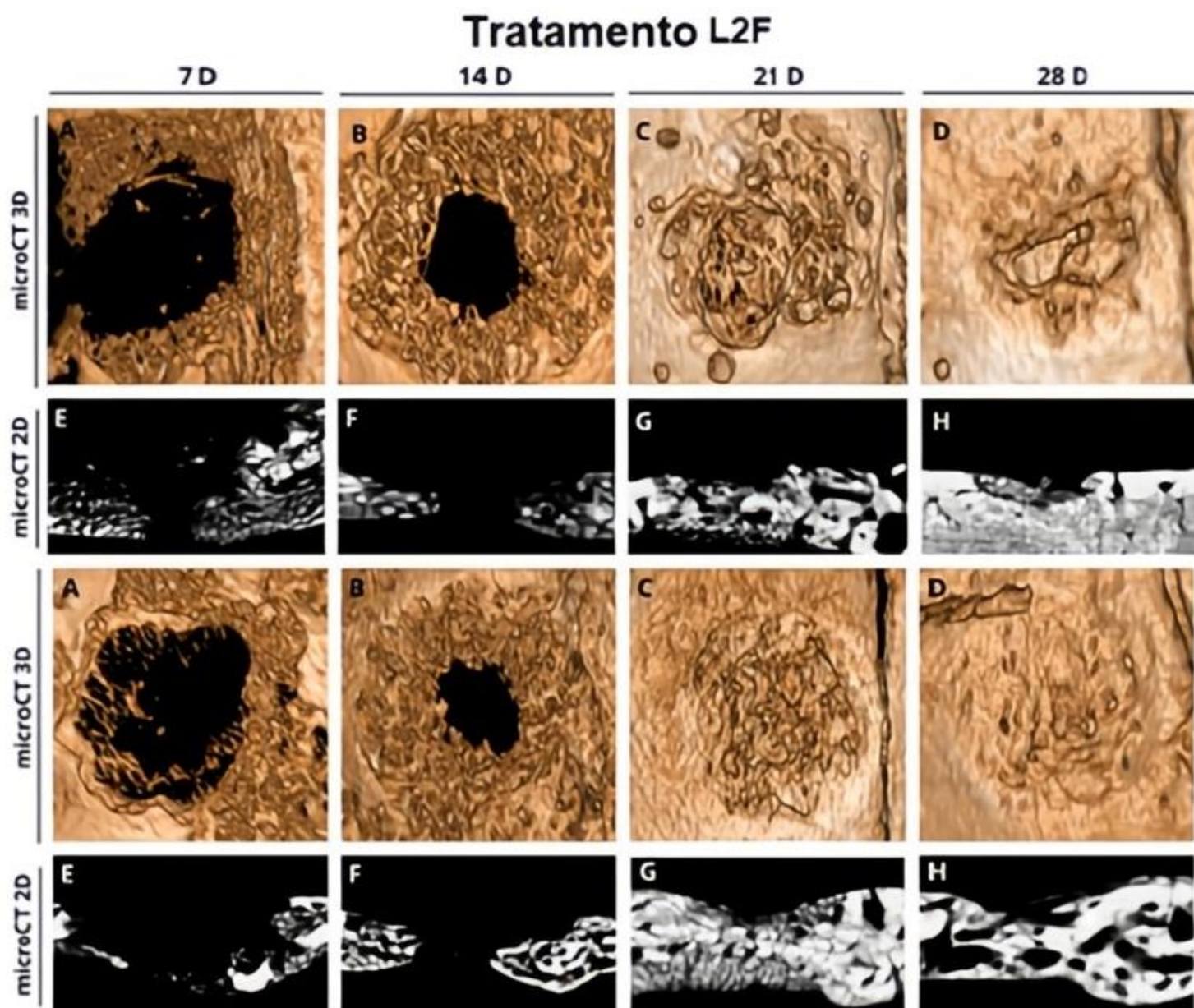


Figura 18. Reconstrução 3D (de A a D) e 2D (de E a H) das imagens microtomográficas de dos defeitos parietais dos animais em cicatrização pertencentes ao grupo L2F nos períodos analisados (de 7 a 28 dias).

Aos 7 dias do pós-cirúrgico observa-se a formação de ramificações de reconstrução óssea projetadas da lateral do defeito em direção ao centro. Se comparado aos outros grupos, a extensão alcançada por essas ramificações é consideravelmente maior.

Aos 14 dias percebe-se uma expressiva neoformação óssea formando redes de ossificação com base na borda do defeito. Atividade semelhante ocorreu apenas aos 21 dias dos grupos controle e GG. Essa característica de neoformação é condizente com um aporte estrutural e aceleração de deposição

de matriz óssea o que confirma as propriedades de osteoindução e osteocondução do biomaterial L2F observadas nos ensaios *in vitro* (MATUCHESKI, 2020).

Pelas imagens da Figura 18, observa-se cicatrização consistente e aumento da densidade óssea neoformada já aos 21 dias com diminuição tanto do diâmetro da lesão, quanto da sua profundidade (Figuras 18G), demonstrando aceleração do processo de reparação tecidual em relação aos outros dois grupos. Vale notar que os grupos controle e GG não apresentaram resultados semelhantes no fechamento do defeito ou no quase total preenchimento da profundidade, nem mesmo nos 28 dias do pós-cirúrgico.

Ao completar os 28 dias de tratamento com L2F, os defeitos apresentaram alto grau de cicatrização com diminuição significativa da delimitação das bordas do defeito, tornando-as quase imperceptíveis devido à consistente neoformação óssea. Fica evidenciado também, pelas imagens 2D, o aumento da densidade do tecido confirmando, dessa forma, a atividade osteocondutora e osteoindutora do L2F.

De forma geral, o processo de cicatrização do grupo L2F demonstrou maior desempenho do que os demais grupos em todos os períodos analisados. Com base nestes resultados, é possível sugerir que o L2F é um biomaterial que mimetiza a matriz extra celular, permitindo o fluxo de células, nutrientes e de fatores de crescimento, característica essencial para um biomaterial candidato a fabricação de enxertos (NIDAGUNDI, 2023).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os ossos parietais e os rins dos animais perfundidos (após o período de 28 dias de cicatrização) seguiram para análise histológica por coloração com Eosina e Hematoxilina. Em todos os grupos foi possível observar uma reatividade da borda dos defeitos assim como na base próxima à dura mater. Esse processo reacional resultou na deposição de matriz osteóide próxima ao osso lamelar íntegro.

As Figuras 19, 20 e 21 mostram a fotomicrografia do osso parietal do grupo CTRL, grupo GG e grupo, L2F, respectivamente. Na Figura 20, observa-se o preenchimento da área lesionada com tecido de granulação no topo,

indicando área de reparo tecidual, com infiltrado inflamatório moderado, neoformação de capilares e células mesenquimais imaturas. Ao centro do defeito e nas bordas laterais, percebe-se tecido conjuntivo (CT) frouxo com presença de fibras colágenas e fibroblastos. Na porção lateral direita, é percebida uma neoformação óssea mais acentuada. Na área ampliada, pode se identificar a presença de osso neoformado na porção inferior, com atividade de osteoblastos depositando matriz óssea e se transformando em osteócitos.

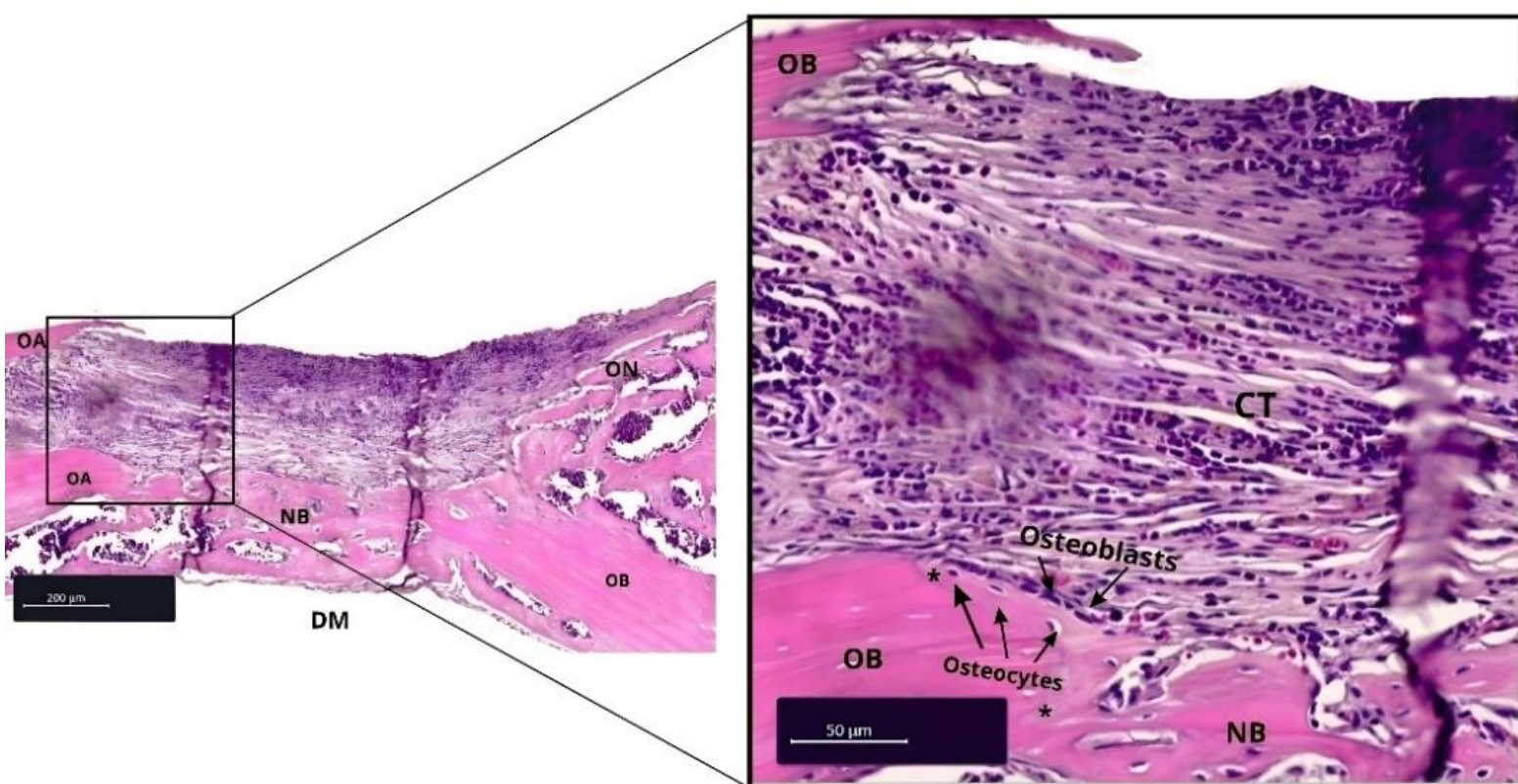


Figura 19. Fotomicrografia do grupo controle contemplando a área completa da lesão após 28 dias do pós-cirúrgico: à esquerda, aumento de 2,5x; à direita, ampliação da borda do defeito com aumento de 10x. (OB = OA) Osso Antigo, (NB = ON) Osso Neoformado, (DM) Dura Mater, (CT) Tecido Conjuntivo, (*) área cementante.

Os achados da Figura 19 são coerentes com o comportamento visto nas imagens de micro CT, com neoformação óssea mais lenta do que os demais grupos e com o previsto na literatura para uma reparação natural (sem tratamento) ao período analisado (LEAO, 2023). Aos 28 dias, foi identificado um infiltrado inflamatório em porção superior central, sendo esse, o vestígio da fase inflamatória aguda gerada nos primeiros dias pelo rompimento dos vasos e formação de coágulo sanguíneo que preencheu a lesão. Esse processo leva ao

recrutamento de neutrófilos e macrófagos (núcleos corados em roxo mais escuro) à região pela liberação de citocinas e quimiocinas e segue para fase reparadora observada pela presença de fibras colágenas, e neoformação vascular. Nesse período, foi possível observar intensa atividade de osteoblastos com deposição de matriz osteóide limitada às bordas, formação de linhas cementantes e elevada concentração de osteócitos recém depositados à matriz.

A análise histológica do grupo GG, Figura 20, assim como observado nas imagens do Micro CT, apresenta maior volume de neoformação óssea do que o grupo controle. É percebida a presença de trabéculas ósseas no interior do defeito em áreas mais distantes da base óssea (OA). Pode-se observar a delimitação entre a matriz óssea mantida após a perfuração e a nova formação óssea por meio de linhas cementantes, pela identificação de maior concentração de osteócitos nas áreas neoformadas e pela ausência de lamelas nessa região.

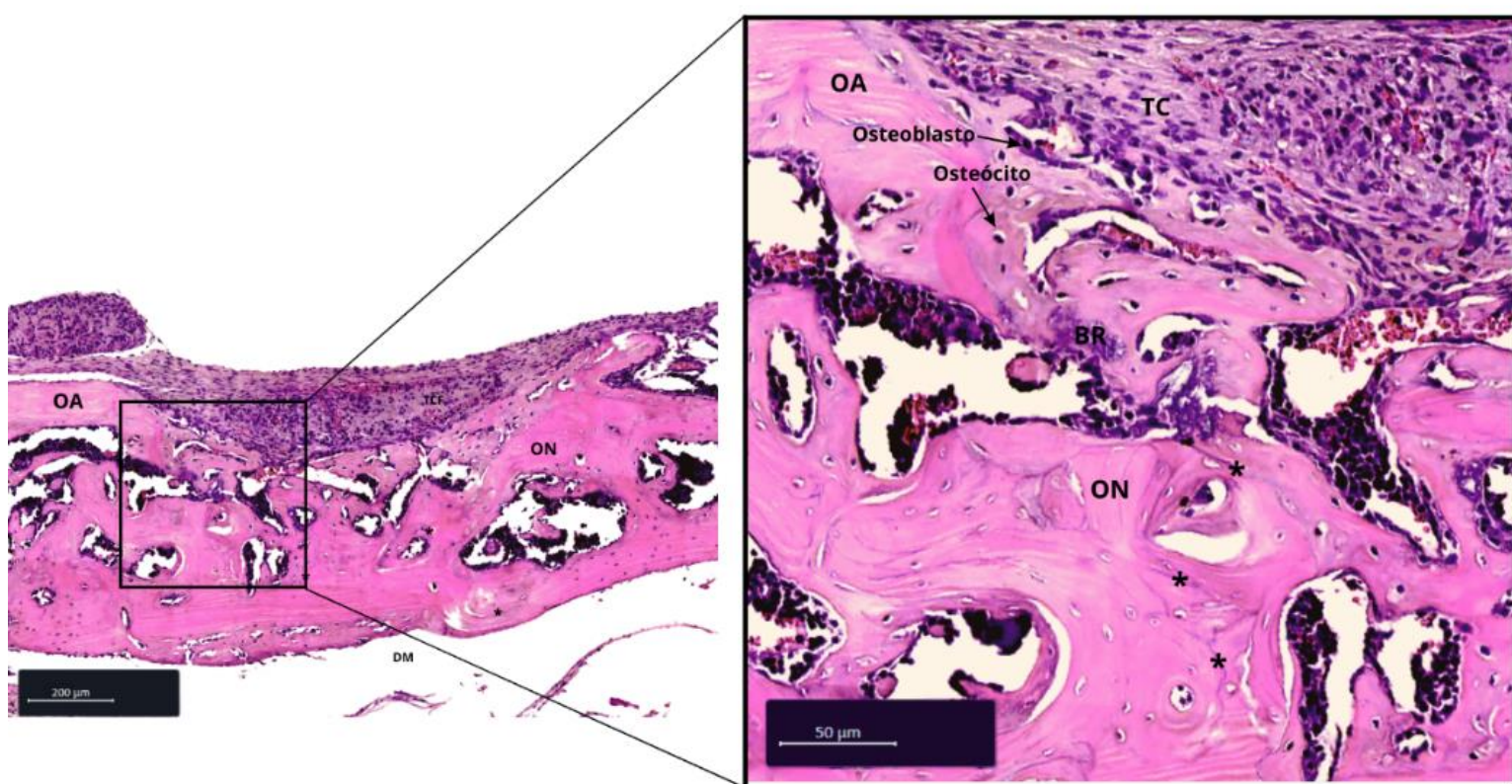


Figura 20. Fotomicrografia do grupo GG contemplando a área completa da lesão após 28 dias do pós-cirúrgico: à esquerda, aumento de 2,5x; à direita, ampliação da borda do defeito com aumento de 10x. (OA) Osso Antigo, (ON) Osso Neoformado, (DM) Dura Mater, (TC) Tecido Conjuntivo, (*) área cementante.

Na imagem da Figura 20 observa-se um acúmulo central de coágulo com presença de células inflamatórias e hemácias na parte superior do defeito, sinalizando um processo inflamatório anterior gerado logo após a fabricação da lesão, como o achado no processo de reparação tecidual do grupo controle. Porém, comparado ao grupo controle, a neoformação óssea se mostrou mais intensa, com maior volume de deposição de matriz osteóide percebida por linha cementante e osteócitos com recente acoplamento. Como previsão de biocompatibilidade, pode-se classificar a GG, neste aspecto, como biocompatível por ausência de necrose tecidual, assim como a ausência de processo inflamatório crônico ou encapsulamento (tecido fibroso) ao redor do material. Ao contrário, se observa tecido viável neoformado com preservação da vascularização e osteocondução demonstrada pela extensão da área neoformada. Esses resultados são coerentes com os encontrados pela análise de dados e reconstruções de imagens de micro CT.

A Figura 21, grupo L2F, mostra que, assim como no grupo GG, ocorreu crescimento tecidual com extensão para além das bordas lesionadas, sendo evidenciado pela presença de trabéculas ósseas mais centrais, sendo nutridas pelas bases através de projeções de tecido neoformado. As áreas cementantes são numerosas, identificando uma atividade de deposição de matriz óssea intensa.

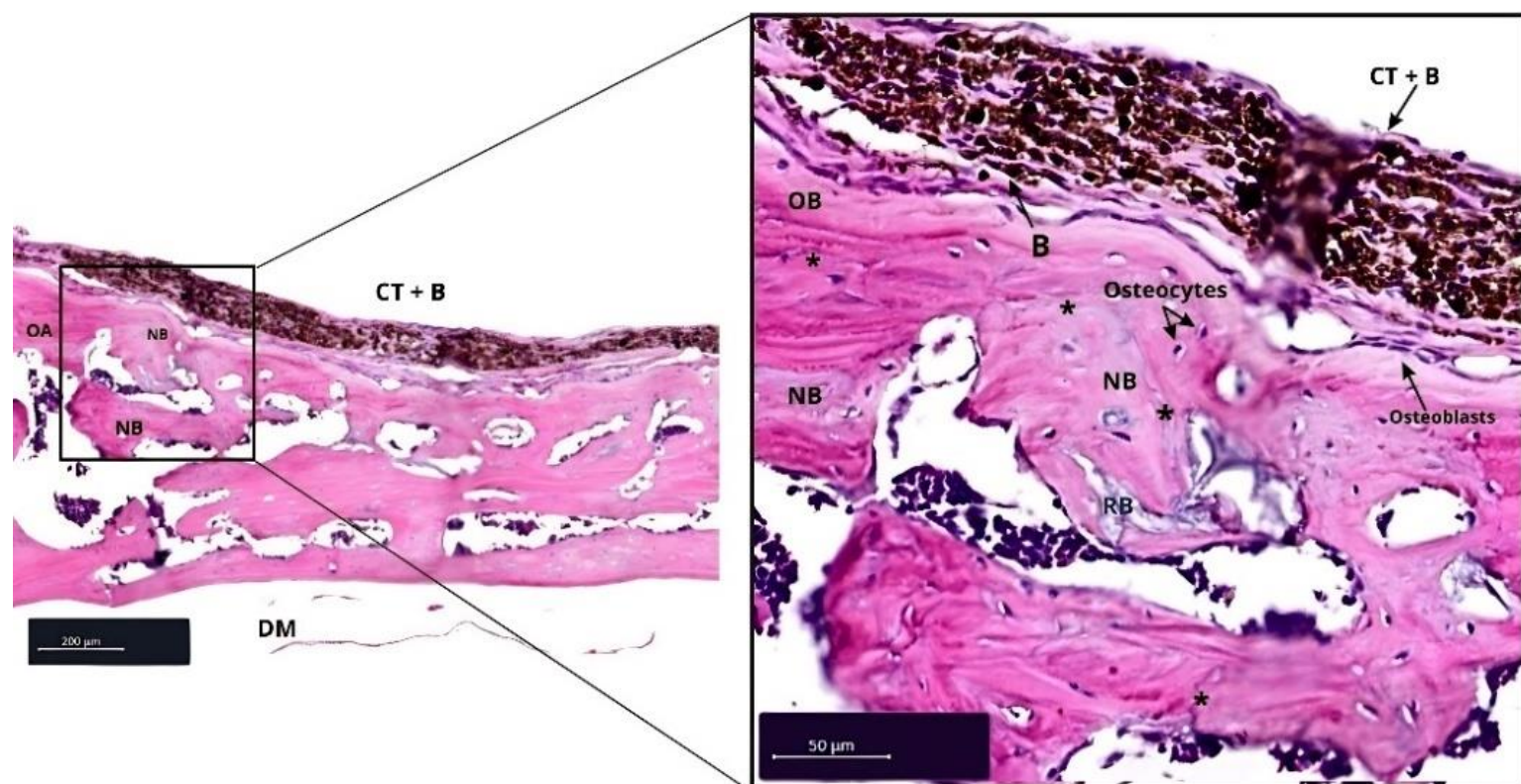


Figura 21. Fotomicrografia do grupo L2F contemplando a área completa da lesão após 28 dias do pós-cirúrgico: à esquerda, aumento de 2,5x; à direita, ampliação da borda do defeito com aumento de 10x. (OB) Osso Antigo, (NB) Osso Neoformado, (DM) Dura Mater, (CT + B) Tecido Conjuntivo + Biomaterial, (B) Biomaterial, (RB) Biomaterial Residual, (*) área cimentante.

Percebe-se uma matriz gelatinosa remanescente do L2F, aparentemente sem as partículas do BioVit, sugerindo a sua degradação e utilização na deposição de matriz osteoide, justificando a aceleração na formação de tecido ósseo. Na parte superior do defeito, nota-se concentração mais acentuada de partículas vitrocerâmicas de diferentes dimensões em interação com células do tecido conjuntivo. Na base da figura ampliada, observa-se neoformação óssea com mineralização mais adiantada, evidenciada por uma coloração rosa mais acentuada e formação de osteócitos.

A Figura 22 mostra uma ampliação da borda superior para melhor visualização das estruturas. É possível observar a preservação da vascularização por meio de neoformação de capilares, deposições de matriz osteoide e osteoblastos sendo incorporados à trabécula óssea recém-formada e partículas dispersas do BioVit.

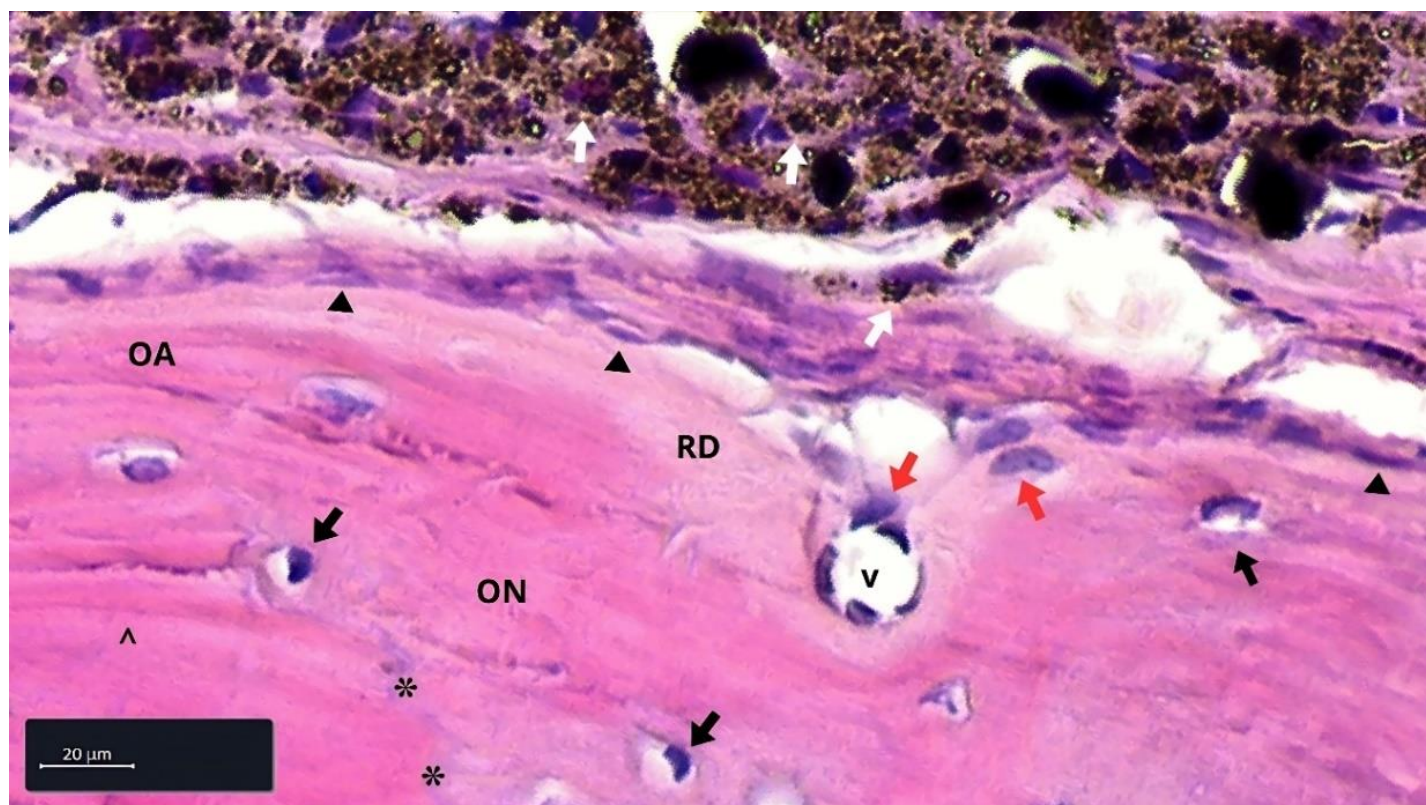


Figura 22. Fotomicrografia obtida da região de borda do defeito após 28 dias do grupo L2F com aumento de 20x. (OA) Osso Antigo, (ON) Osso Neoformado, (RD) Recente Deposição óssea, (v) vaso sanguíneo, células osteoprogenitoras (cabeças de seta), osteócitos (setas pretas), osteoblastos recém incorporados à matriz óssea (setas vermelhas), biomaterial em interação com células do tecido conjuntivo (setas brancas), (*) área cementante.

As Figuras 21 e 22 confirmam intensa atividade de deposição de matriz osteóide com formação de trabéculas ósseas em grande parte da extensão do defeito. Em comparação com as lâminas dos grupos controle e GG, existe uma menor concentração de células inflamatórias aos 28 dias, resultado que corrobora com estudo de Akbari et al., 2022, que demonstraram diminuição da concentração de células inflamatórias em períodos mais avançados de reparação tecidual. Esse comportamento sugere uma aceleração das etapas de consolidação de fratura promovida pelo L2F comparadas aos estágios apresentados no mesmo tempo biológico pelos outros grupos analisados.

Diante do observado e em correlação com os resultados dos ensaios *in vitro* (MATUCHESKI, 2020), sugere-se uma potente atividade osteoindutora do L2F como resultado de múltiplas, paralelas e sequenciais reações influenciadas

e potencializadas pelo biocompósito. Em fase inicial da cicatrização é esperada uma maior reatividade inerente ao processo de implantação com processo inflamatório desencadeado pelo reconhecimento de corpo estranho, o que pode ter sido responsável por gerar uma maior resposta de sinalização de fatores de crescimento e liberação de substâncias quimiotáticas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras ao local, explicando assim, a precoce atividade de osteogênese observada pelas imagens de micro CT. Como descrito por Akbari et al., 2022, o processo de reação inflamatória é crucial para o restabelecimento do tecido ósseo e esse mecanismo de resposta biológica é diretamente proporcional a taxa de reconstrução óssea (HERNANDEZ, 2021).

É percebido no entorno das partículas remanescentes do BioVit, uma fina camada de tecido com aspecto mais denso o que sugere uma branda reação à corpo estranho, sem gravidade e sinais de resposta de rejeição. Em um robusto trabalho de comparação entre respostas inflamatórias induzidas por vários biomateriais realizado por um grupo americano, foi ressaltada uma resposta típica de corpo estranho caracterizada por encapsulamento fibroso e isolamento do implante em todos os grupos analisados, entretanto, uma relação entre espessura da capsula fibrosa com nível de rejeição foi percebida, sendo que quanto maior a espessura capsular, maior também a chance de rejeição (WHITAKER, 2021).

Sendo assim, uma camada com pouca espessura e pouca atividade de células inflamatórias aparente, caracterizam o L2F por essa análise, como um biomaterial com baixo nível de rejeição. No entanto, estratégias que visem melhorar a efetividade imunomodulatória desse biomaterial por diminuição da reatividade de monócitos e macrófagos, que parecem estar intimamente relacionados ao encapsulamento, podem ser desenvolvidas (THORSON, 2019). Uma estratégia eficaz, tem sido o aumento da integração entre biomaterial e o tecido. Nesse sentido, os levantamentos já realizados quanto à otimização estrutural do L2F se reafirmam, já que é demonstrado em vários estudos que uma alta e uniforme porosidade, assim como partículas microestruturadas de gel e de cerâmicos geram maior integração com o tecido e por consequência, um encapsulamento pouco pronunciado aprimorando ainda mais sua biocompatibilidade (WHITAKER, 2021). É ressaltado portanto que, embora seja possível um aprimoramento estrutural, a atividade apresentada pelo L2F em

relação a biocompatibilidade se mostrou favorável assim como sua efetividade superior quanto à neoformação óssea.

Concomitantemente ao processo de recrutamento de células osteoprogenitoras, as partículas de BioVit em contato com fluidos penetrantes ao gel de goma gelana, sofreram dissolução química com liberação de fósforo e cálcio, seguida de formação de moléculas de fosfato de cálcio (principal componente da matriz mineral) fornecidas aos osteoblastos presentes no local da lesão em aumentada concentração. Esse processo facilita, portanto, a formação de matriz óssea e mineralização por meio do fornecimento antecipado dessas moléculas à área de lesão, proporcionando deposição de matriz osteóide em maior volume e tempo biológico anterior ao observado por uma consolidação natural (DALLABRIDA, 2018).

Uma atividade importante do biomaterial L2F que fica então evidenciada, é a osteoindução aprimorada pela reatividade superficial da partícula do BioVit, atividade de dissolução que pode ser percebida na figura 22 com diminuição do tamanho das partículas sendo reabsorvidas pelo tecido em neoformação, classificando-o como um biocompósito bioativo e bioabsorvível. Essa característica tem grande impacto na adesão celular, na indução da diferenciação e mineralização das células ósseas e, conforme já discutido, a estrutura física das partículas e porosidade do biomaterial tem influência direta na dissolução e, conseqüentemente na atividade osteoindutora reforçando mais uma vez a eficiência química e estrutural demonstrada pelo L2F em análise qualitativa (NIKOLOVA E CHAVALI, 2019). Sendo assim, um equilíbrio modulatório eficiente entre processo inflamatório e osteogênese pôde ser observado na implantação do biomaterial L2F, por meio da identificação de tecido viável neoformado ao redor do implante, além de neoformação vascular, permeabilidade celular e fluxo de nutrientes permitidos por ele, ressaltando uma satisfatória biocompatibilidade (STIEVANI, 2021).

As atividades importantes do L2F que ficaram evidenciadas são a bioatividade, a degradação e a osteoindução, esta última pela presença das partículas do BioVit. Essas características têm grande impacto na adesão celular, na indução da diferenciação e na mineralização das células ósseas (NIKOLOVA E CHAVALI, 2019).

A Figura 23 apresenta as análises histológicas das amostras de rins dos camundongos que teve a intenção de avaliar se o L2F seria capaz de induzir alguma resposta inflamatória ou acúmulo de substratos no processo de excreção. Não foram identificados focos de infiltração inflamatória em nenhuma das amostras dos três grupos. A lâmina referente ao grupo L2F não mostrou acúmulo de BioVit ou GG, sugerindo a sua biocompatibilidade.

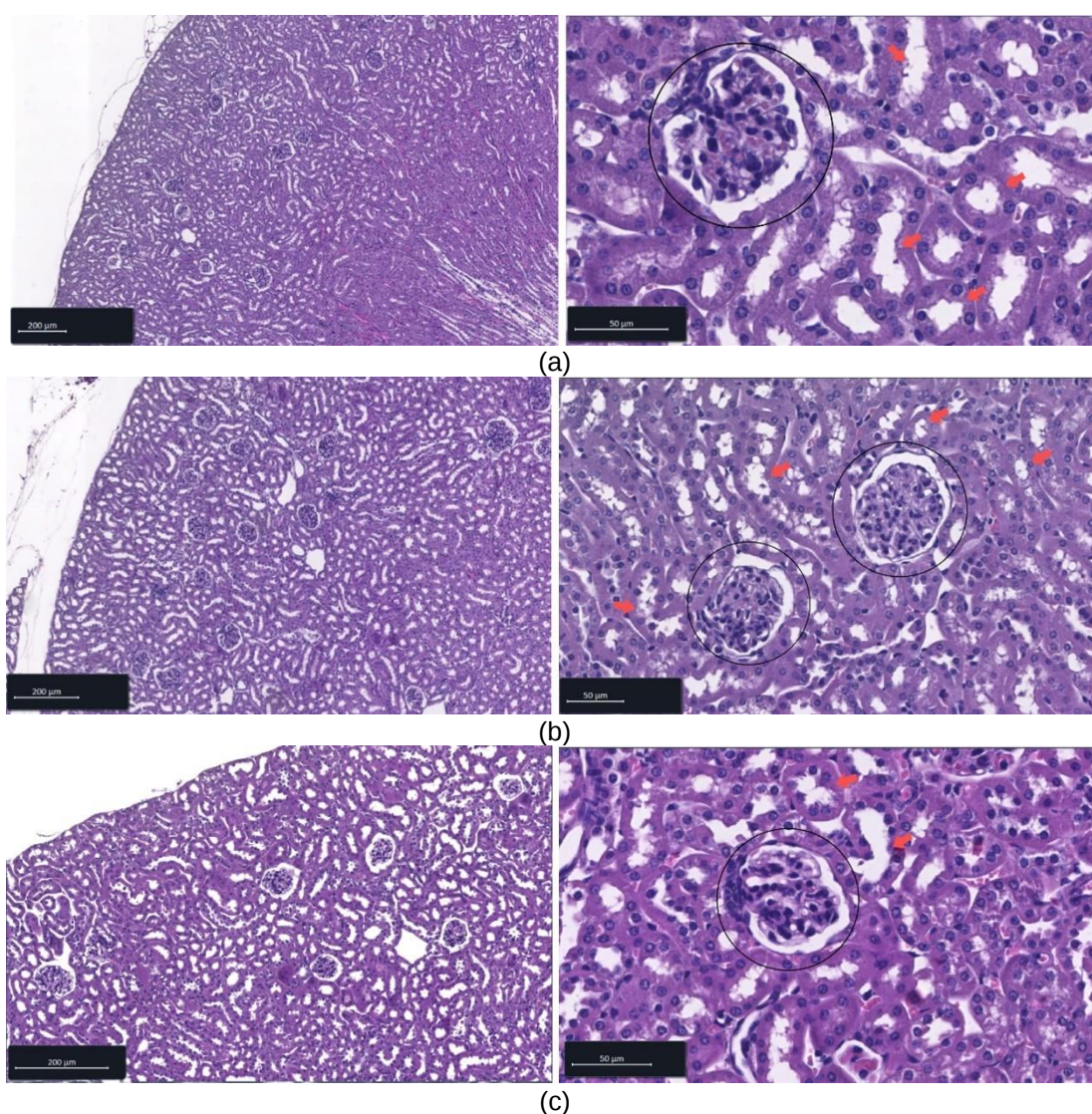


Figura 23. Fotomicrografias da região cortical na porção esquerda e medular em porção direita inferior de rins dos camundongos 28 dias do pós-cirúrgico, corado com eosina e hematoxilina, em campo ampliado (esquerda) e região detalhada (direita): (a) grupo controle; (b) grupo GG; (c) grupo L2F. Todos apresentando corpúsculo renal, glomérulo, cápsula de Bowman e espaço subcapsular preservados (círculos) e túbulos contorcidos (setas vermelhas).

A imagens das lâminas histológicas dos rins dos animais perfundidos dos três grupos, Figura 23, se mostraram dentro dos padrões normais, sem sinal de inflamação, acúmulo de partículas cristalizadas ou nefrotoxicidade evidente. Em todas as amostras houve preservação do corpúsculo renal, glomérulo, cápsula de Bowman, espaço subcapsular e dos túbulos contorcidos, fato que sugere a biocompatibilidade fisiológica tanto do L2F como da GG.

4.5 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA

Os dados apresentados na Tabela 1 representam de forma numérica a avaliação da ação osteoindutora do L2F, comparando-o com o grupo controle (CTRL) e o grupo GG, em diferentes períodos de mensuração (7, 14, 21 e 28 dias).

Tabela 1. Variabilidade das medições de cicatrização óssea em camundongos Swiss submetidos aos tratamentos, distribuído por camundongo avaliados.

Dia da medição	ID animal	Grupo	Média	SD	25th	Mediana	75th	CV	Teste de normalidade
7	1	L2F	2,32	0,02	2,32	2,33	2,34	0,82	0,10
7	13	L2F	2,32	0,00	2,32	2,32	2,33	0,20	0,64
7	5	GG	2,17	0,03	2,15	2,15	2,17	1,19	0,04
7	17	GG	2,32	0,01	2,32	2,32	2,33	0,46	0,36
7	9	CTRL	2,06	0,01	2,06	2,07	2,07	0,64	0,00
7	21	CTRL	2,16	0,03	2,15	2,16	2,18	1,32	0,83
14	2	L2F	1,88	0,06	1,85	1,88	1,91	3,41	0,98
14	14	L2F	1,97	0,02	1,96	1,98	1,98	1,20	0,28
14	6	GG	1,98	0,01	1,97	1,98	1,98	0,38	0,93
14	18	GG	1,97	0,03	1,95	1,96	1,98	1,36	0,22
14	10	CTRL	1,97	0,01	1,96	1,96	1,97	0,44	0,22
14	22	CTRL	2,04	0,03	2,03	2,05	2,06	1,45	0,83
21	3	L2F	1,08	0,09	1,04	1,10	1,13	8,62	0,55
21	15	L2F	1,20	0,09	1,16	1,19	1,25	7,37	0,74
21	7	GG	1,79	0,06	1,75	1,77	1,81	3,23	0,42
21	19	GG	1,83	0,01	1,83	1,83	1,84	0,63	0,17
21	11	CTRL	1,87	0,01	1,86	1,86	1,87	0,56	0,00
21	23	CTRL	1,94	0,03	1,93	1,95	1,96	1,51	0,16
28	4	L2F	0,59	0,16	0,51	0,56	0,66	26,90	0,73

28	16	L2F	0,72	0,01	0,72	0,73	0,73	1,69	0,56
28	8	GG	1,45	0,01	1,44	1,45	1,46	0,98	0,69
28	20	GG	1,68	0,03	1,66	1,68	1,70	1,87	0,72
28	12	CTRL	1,67	0,01	1,67	1,68	1,68	0,82	0,42
28	24	CTRL	1,66	0,04	1,65	1,68	1,69	2,34	0,25

Nota: Os dados obtidos a partir de medições em 24 camundongos Swiss. Cada grupo foi avaliado em quatro períodos (7, 14, 21 e 28 dias), com dois camundongos por tratamento em cada período. Três medições foram realizadas por camundongo. As variabilidades foram analisadas usando desvio padrão (SD), coeficiente de variação (CV) e testes de normalidade (Shapiro Wilk).

As medições foram realizadas em 24 camundongos, distribuídos de forma equitativa entre os grupos, com dois camundongos avaliados por tipo de tratamento em cada período, totalizando seis medições por período para cada grupo. Cada camundongo teve três medições consecutivas realizadas para garantir a precisão dos resultados. Em primeiro momento foi calculada a média das três medições por defeito, sendo selecionados os três maiores diâmetros de cada defeito em feixes em sequenciados, com o objetivo de analisar a variabilidade das medidas entre os animais, apresentada na Figura 24.

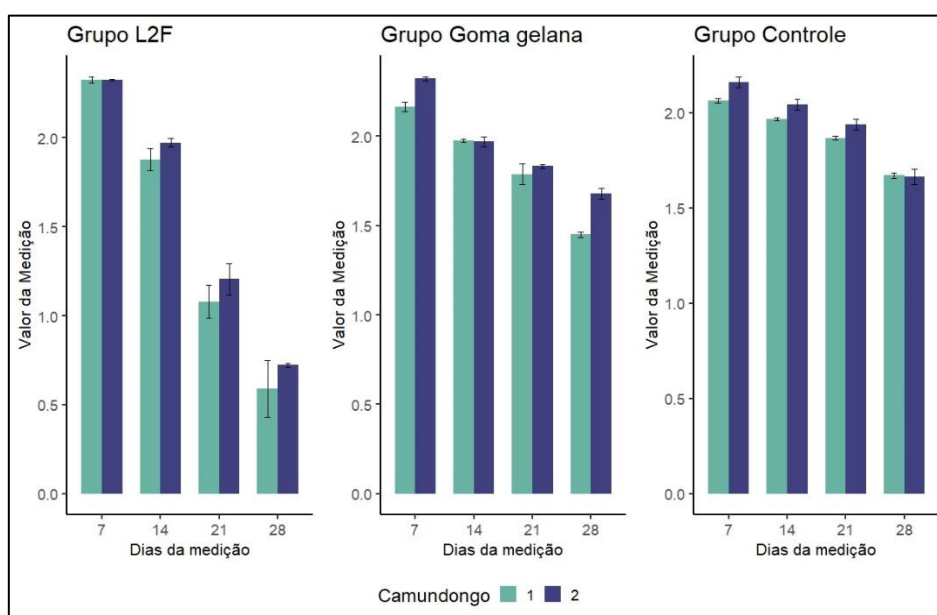


Figura 24. Variabilidade das medições do diâmetro da lesão óssea em camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos, por camundongo (duplicata).

No dia 7, os animais do grupo L2F apresentaram uma média de diâmetro do defeito de 2,32 mm, com uma baixa variabilidade entre as medições, como indicado pelo desvio padrão (SD) de 0,02 e 0,00, e coeficientes de variação (CV) de 0,82% e 0,20%, respectivamente. O teste de normalidade para este grupo

indicou valores de p de 0,10 e 0,64, sugerindo distribuição normal dos dados. O grupo GG mostrou uma média de 2,17 mm e 2,32 mm, com SD de 0,03 e 0,01, e CV de 1,19% e 0,46%, com valores de p de 0,04 e 0,36. O grupo controle apresentou médias de 2,06 mm e 2,16 mm, com SD de 0,01 e 0,03, e CV de 0,64% e 1,32%, com p-valores de 0,00 e 0,83. Esses resultados iniciais sugerem uma boa consistência nas medições para todos os grupos, o que é fundamental para a confiabilidade dos dados e para a comparação entre os diferentes tratamentos.

Aos 14 dias, as médias do grupo L2F foram 1,88 mm e 1,97 mm, com SD de 0,06 e 0,02, e CV de 3,41% e 1,20%, com valores de p de 0,98 e 0,28. O grupo GG apresentou médias de 1,98 mm e 1,97 mm, com SD de 0,01 e 0,03, e CV de 0,38% e 1,36%, com valores de p de 0,93 e 0,22. O grupo controle teve médias de 1,97 mm e 2,04 mm, com SD de 0,01 e 0,03, e CV de 0,44% e 1,45%, com p-valores de 0,22 e 0,83. Neste período, observa-se uma leve diminuição nas médias de diâmetro dos defeitos com baixa variabilidade dos dados indicando uma boa precisão nas medições e consistência dos resultados.

Aos 21 dias, os animais tratados com o L2F apresentaram médias de 1,08 mm e 1,20 mm, com SD de 0,09 e 0,09, e CV de 8,62% e 7,37%, com valores de p de 0,55 e 0,74. O grupo GG teve médias de 1,79 mm e 1,83 mm, com SD de 0,06 e 0,01, e CV de 3,23% e 0,63%, com valores de p de 0,42 e 0,17. O grupo controle mostrou médias de 1,87 mm e 1,94 mm, com SD de 0,01 e 0,03, e CV de 0,56% e 1,51%, com p-valores de 0,00 e 0,16. Nesta fase, as médias das duplicatas de L2F apresentaram variabilidade moderada, o que ainda reflete uma consistência aceitável nas medições.

Aos 28 dias, o grupo L2F apresentou médias de 0,59 mm e 0,72 mm, com SD de 0,16 e 0,01, e CV de 26,90% e 1,69%, com valores de p de 0,73 e 0,56. O grupo GG mostrou médias de 1,45 mm e 1,68 mm, com SD de 0,01 e 0,03, e CV de 0,98% e 1,87%, com valores de p de 0,69 e 0,72. O grupo controle apresentou médias de 1,67 mm e 1,66 mm, com SD de 0,01 e 0,04, e CV de 0,82% e 2,34%, com p-valores de 0,42 e 0,25. Os resultados aos 28 dias indicam uma significativa redução na média de cicatrização no grupo L2F, com variabilidade dentro de um intervalo aceitável, o que reforça a eficácia do biomaterial.

Em um segundo momento, foi analisada a variabilidade das três medições de cicatrização óssea nos camundongos (duplicata de animais) submetidos aos diferentes tratamentos nos seus respectivos períodos de medição (Tabela 2 e Figura 25).

Para o grupo L2F, a comparação das três medições realizadas nos dois camundongos mostra que no dia 7 não ocorreu variabilidade significativa dos resultados, com médias de 2,33 mm para Medições 1 e 2 (CV de 0,52% e 0,36%, respectivamente) e média de 2,32 mm para a Medição 3 (CV de 0,79%). Aos 14 dias, as médias das medições variaram entre 1,88 mm e 1,96 mm, com CV entre 1,44% e 4,93%, indicando um leve aumento na variabilidade. Aos 21 dias, observou-se uma maior variabilidade com médias entre 1,11 mm e 1,17 mm e CV entre 1,27% e 20,13%. No dia 28, a variabilidade aumentou de 0,58 mm a 0,75 mm e CV entre 2,59% e 32,15%, sugerindo uma variação entre as médias dos dois animais desse período.

Tabela 2. Variabilidade das medições de cicatrização óssea em camundongos Swiss submetidos aos tratamentos, distribuído por diferentes medições.

Grupo	Dia da medição	1ª medição			2ª medição			3ª medição		
		Média	SD	CV	Média	SD	CV	Média	SD	CV
L2F	7	2,33	0,01	0,52	2,33	0,01	0,36	2,32	0,02	0,79
L2F	14	1,88	0,09	4,93	1,93	0,08	4,02	1,96	0,03	1,44
L2F	21	1,14	0,23	20,13	1,11	0,01	1,27	1,17	0,02	2,05
L2F	28	0,65	0,11	17,71	0,58	0,19	32,15	0,75	0,02	2,59
GG	7	2,23	0,12	5,19	2,24	0,12	5,28	2,27	0,10	4,34
GG	14	1,99	0,01	0,60	1,96	0,01	0,61	1,97	0,01	0,65
GG	21	1,81	0,06	3,09	1,78	0,06	3,29	1,84	0,02	0,96
GG	28	1,56	0,17	11,20	1,55	0,14	9,06	1,59	0,17	10,79
CTRL	7	2,10	0,04	2,02	2,13	0,08	3,88	2,11	0,08	3,89
CTRL	14	2,02	0,08	3,82	2,00	0,06	3,04	1,99	0,03	1,28
CTRL	21	1,91	0,07	3,59	1,91	0,07	3,41	1,89	0,02	0,97
CTRL	28	1,64	0,03	1,55	1,69	0,01	0,42	1,68	0,00	0,25

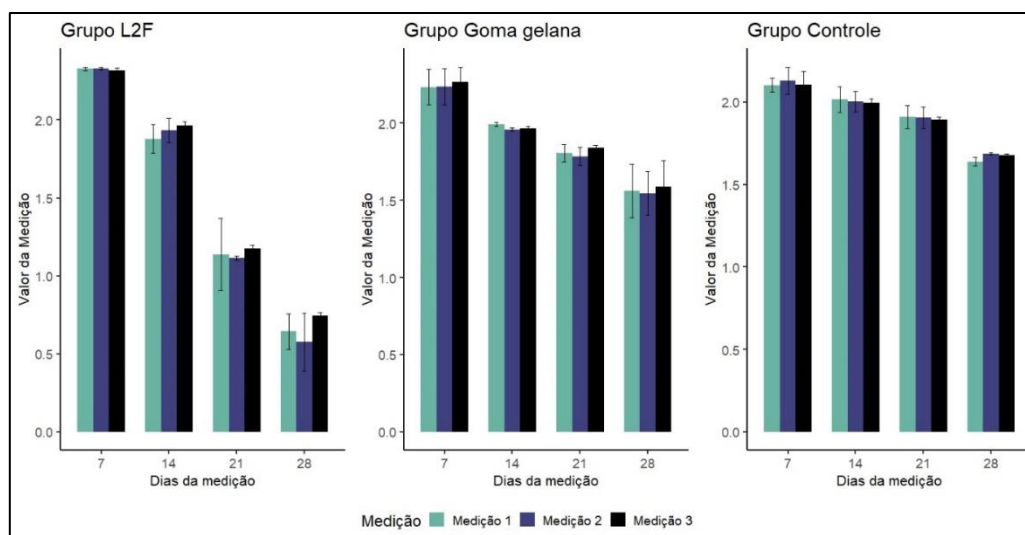


Figura 25. Variabilidade entre as medições em triplicata do diâmetro de cada lesão óssea em calvária de camundongos Swiss submetidos aos diferentes tratamentos.

No grupo GG as medições ao longo dos períodos mostraram menos variabilidade entre as médias, mas menor eficácia de cicatrização. No dia 7, as médias das medições variaram entre 2,23 mm e 2,27 mm, com CV entre 4,34% e 5,28%. Aos 14 dias, as médias variaram entre 1,96 mm e 1,99 mm, com CV muito baixos, entre 0,60% e 0,65%. Aos 21 dias, as médias das medições variaram de 1,78 mm a 1,84 mm, com CV entre 0,96% e 3,29%, e no dia 28, as médias variaram de 1,55 mm a 1,59 mm, com CV entre 9,06% e 11,20%, indicando uma variabilidade maior comparada aos períodos anteriores, mas ainda relativamente baixa.

O grupo controle também apresentou medições consistentes ao longo do tempo. No dia 7, as médias variaram entre 2,10 mm e 2,13 mm, com CV entre 2,02% e 3,89%. Aos 14 dias, as médias variaram entre 1,99 mm e 2,02 mm, com CV entre 1,28% e 3,82%. Aos 21 dias, as médias variaram de 1,89 mm a 1,91 mm, com CV entre 0,97% e 3,59%, e no dia 28, as médias variaram de 1,64 mm a 1,69 mm, com CV entre 0,25% e 1,55%. A baixa variabilidade nas medições do grupo controle sugere uma resposta estável ao longo do tempo.

A Tabela 3 e a Figura 26 apresentam a análise detalhada das avaliações realizadas nos dias 7, 14, 21 e 28 para os três grupos. Os dados incluem as médias, medianas, desvios padrão, valores mínimos e máximos, juntamente com os resultados do teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e a análise de variância (ANOVA) para comparar as médias dos grupos em cada dia de avaliação.

Tabela 3. Análise de dados da atividade regenerativa dos diferentes tratamentos em defeitos provocados em parietal de camundongos swiss.

Dia da avaliação	Grupo	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Teste de normalidade*	p-valor**
7	CTRL	2,112	2,101	0,057	2,048	2,188	0,401	<0,001
	GG	2,245	2,256	0,088	2,151	2,335	0,065	
	L2F	2,324	2,325	0,012	2,302	2,336	0,486	
14	CTRL	2,005	1,994	0,047	1,960	2,071	0,327	0.035
	GG	1,972	1,972	0,018	1,951	2,000	0,919	
	L2F	1,924	1,942	0,067	1,813	1,988	0,337	
21	CTRL	1,903	1,892	0,043	1,861	1,958	0,158	<0,001
	GG	1,810	1,826	0,045	1,742	1,852	0,198	
	L2F	1,142	1,14 1	0,107	0,976	1,300	0,929	
28	CTRL	1,668	1,679	0,026	1,620	1,692	0,135	<0,001
	GG	1,564	1,555	0,127	1,437	1,707	0,071	
	L2F	0,656	0,717	0,124	0,446	0,760	0,084	

*Shapiro Wilk; ** ANOVA

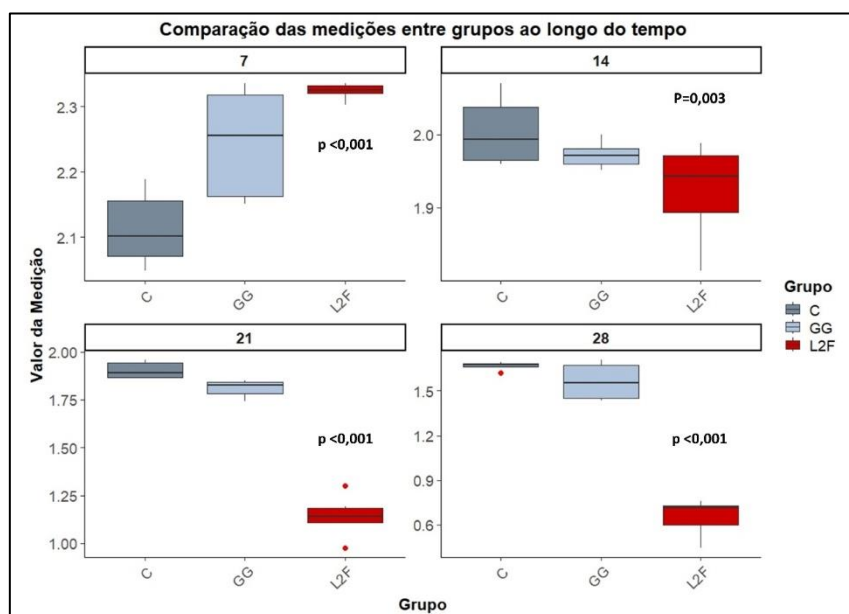


Figura 26. Comparação das médias nas medidas de cicatrização óssea entre grupos de tratamento em diferentes dias de avaliação.

No primeiro dia de avaliação, o grupo controle apresentou uma média de 2,112 e uma mediana de 2,101, com um desvio padrão de 0,057 e valores variando entre 2,048 e 2,188. O teste de normalidade indicou que os dados desse grupo seguiram uma distribuição normal ($p = 0,401$). O grupo GG teve uma média de 2,245 e uma mediana de 2,256, com um desvio padrão de 0,088 e valores variando entre 2,151 e 2,335. O teste de normalidade para o grupo GG

foi marginalmente significativo ($p = 0,0646$). O grupo L2F apresentou uma média de 2,324, mediana de 2,325, desvio padrão de 0,012, e valores variando entre 2,302 e 2,336, com dados seguindo uma distribuição normal ($p = 0,486$). A ANOVA revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos neste dia ($p < 0,001$).

No dia 14, o grupo controle teve uma média de 2,005 e uma mediana de 1,994, com um desvio padrão de 0,047 e valores entre 1,960 e 2,071. Os dados desse grupo seguiram uma distribuição normal ($p = 0,327$). O grupo GG registrou uma média de 1,972 e uma mediana de 1,972, com um desvio padrão de 0,018 e valores variando entre 1,951 e 2,000, com normalidade dos dados ($p = 0,919$). O grupo L2F apresentou uma média de 1,924, mediana de 1,942, desvio padrão de 0,067, e valores entre 1,813 e 1,988, com dados normais ($p = 0,337$). A ANOVA indicou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos neste dia ($p = 0,035$).

No dia 21, a média do grupo controle foi de 1,903, com uma mediana de 1,892, desvio padrão de 0,044, e valores entre 1,861 e 1,958. Os dados desse grupo foram normalmente distribuídos ($p = 0,158$). O grupo GG teve uma média de 1,810 e uma mediana de 1,826, com um desvio padrão de 0,045 e valores variando entre 1,742 e 1,852, também com normalidade ($p = 0,197$). O grupo L2F apresentou uma média de 1,142, mediana de 1,141, desvio padrão de 0,107, e valores entre 0,976 e 1,300, com normalidade ($p = 0,929$). A ANOVA demonstrou uma diferença significativa entre os grupos neste dia ($p < 0,001$).

No dia 28 o grupo controle registrou uma média de 1,668 e uma mediana de 1,679, com um desvio padrão de 0,0264 e valores variando entre 1,620 e 1,692, com dados normalmente distribuídos ($p = 0,135$). O grupo GG apresentou uma média de 1,564 e uma mediana de 1,555, com um desvio padrão de 0,127 e valores entre 1,437 e 1,707, com normalidade marginalmente significativa ($p = 0,071$). O grupo L2F teve uma média de 0,656, mediana de 0,717, desvio padrão de 0,124, e valores entre 0,446 e 0,760, também com normalidade marginalmente significativa ($p = 0,084$). A ANOVA indicou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos neste dia ($p < 0,001$).

A Tabela 4 apresenta as diferenças médias nas medidas de cicatrização óssea entre os grupos em diferentes dias de avaliação. Estas comparações foram realizadas utilizando o testes post-hoc de Tukey para identificar as

diferenças médias entre os grupos. A Figura 27 traz os valores em forma de gráfico para melhor visualização.

No dia 7 a diferença média entre o grupo L2F e o grupo controle foi de 0,211 mm, com um valor $p < 0,001$, indicando uma diferença estatisticamente significativa. A comparação entre os grupos L2F e GG mostrou uma diferença média de 0,079 mm, mas não foi estatisticamente significativa ($p = 0,095$). Aos 14 dias, a diferença média entre os grupos L2F e controle foi de 0,080 mm, com um valor p de 0,029, indicando uma diferença significativa. A diferença média entre os grupos L2F e GG foi de 0,048 mm, sem significância estatística ($p = 0,227$).

Tabela 4. Diferenças médias nas medidas de cicatrização óssea entre grupos de tratamento em diferentes dias de avaliação pelo teste de Tukey.

	Diferença média	Erro Padrão	t valor	p valor
Comparação aos 7 dias				
GG - CTRL	0,132	0,035	3,775	0,005
L2F - CTRL	0,211	0,035	6,021	< 0,001
L2F - GG	0,079	0,035	2,246	0,095
Comparação aos 14 dias				
GG - CTRL	0,032	0,028	1,156	0,496
L2F - CTRL	0,080	0,028	2,886	0,029
L2F - GG	0,048	0,028	1,730	0,227
Comparação aos 21 dias				
GG - CTRL	0,093	0,041	2,254	0,094
L2F - CTRL	0,761	0,041	18,442	< 0,001
L2F - GG	0,668	0,041	16,187	< 0,001
Comparação aos 28 dias				
GG - CTRL	0,104	0,059	1,734	0,225
L2F - CTRL	1,012	0,059	16,897	< 0,001
L2F - GG	0,908	0,059	15,163	< 0,001

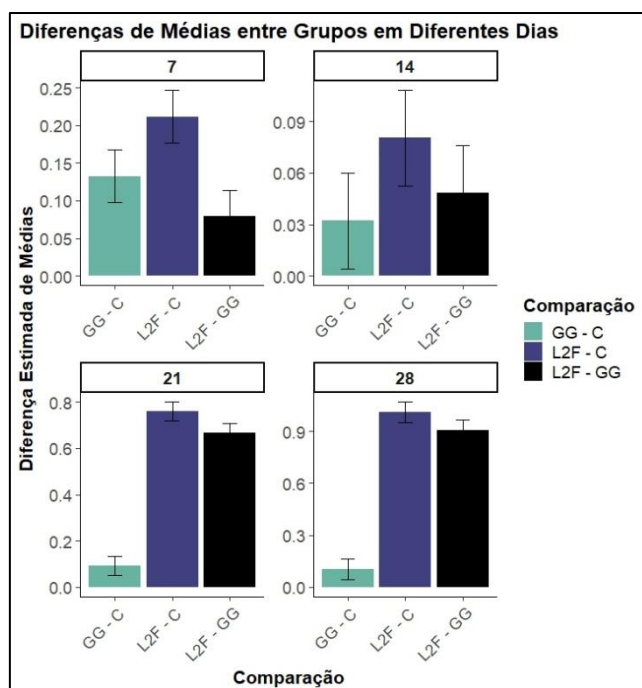


Figura 27. Comparação das diferenças médias nas medidas de cicatrização óssea entre os grupos de tratamento por teste de Tukey.

Aos 21 dias a diferença média entre os grupos L2F e controle foi de 0,761 mm, com um valor $p < 0,001$, indicando uma diferença altamente significativa. A diferença média entre os grupos L2F e GG foi de 0,668 mm, também com um valor $p < 0,001$, mostrando uma diferença altamente significativa. Neste período, a diferença média entre GG e controle foi de 0,093 mm e não significativa ($p = 0,094$). Aos 28 dias a diferença média entre os grupos L2F e controle foi de 1,012 mm, com um valor $p < 0,001$, indicando uma diferença altamente significativa. A diferença média entre os grupos L2F e GG foi de 0,908 mm, também com um valor $p < 0,001$, mostrando uma diferença altamente significativa. A diferença média entre GG e controle foi de 0,104 mm, não significativa ($p = 0,225$).

Esses resultados indicam que, em termos de cicatrização óssea, o grupo L2F apresentou diferenças significativas em comparação com os grupos controle e GG, especialmente em períodos mais avançados (21 e 28 dias), sugerindo uma eficácia superior do biomaterial L2F. A eficácia do L2F foi especialmente notável nos dias 21 e 28, onde as diferenças foram substancialmente maiores e altamente significativas. Estes achados destacam o potencial do L2F como um tratamento eficaz para promover a regeneração óssea em comparação aos outros tratamentos avaliados.

Os resultados da análise de regressão linear, apresentados na Tabela 5 e na Figura 28, mostram de forma clara e quantitativa a eficiência diferenciada dos tratamentos na redução diária da lesão óssea em camundongos Swiss.

Tabela 5. Redução diária do diâmetro da lesão circular em milímetros por tratamento obtida por análise de regressão linear.

Grupo	Coefficiente estimado Estimado (Redução em mm/dia)	Erro Padrão	Valor t	Valor p	R ² Ajustado
CTRL	-0,020	0,001	-13,9	< 0,001	0,89
GG	-0,031	0,002	-14,9	< 0,001	0,90
L2F	-0,083	0,003	-26,8	< 0,001	0,96

Nota: Coeficiente estimado (redução em mm/dia): taxa de redução do diâmetro da lesão por dia; erro padrão: medida da precisão do coeficiente estimado; valor t: testa a significância do coeficiente estimado; valor p: probabilidade associada ao valor t, indicando a significância estatística do coeficiente estimado; R² ajustado: proporção da variação da cicatrização explicada pelo modelo de regressão, ajustada pelo número de preditores no modelo.

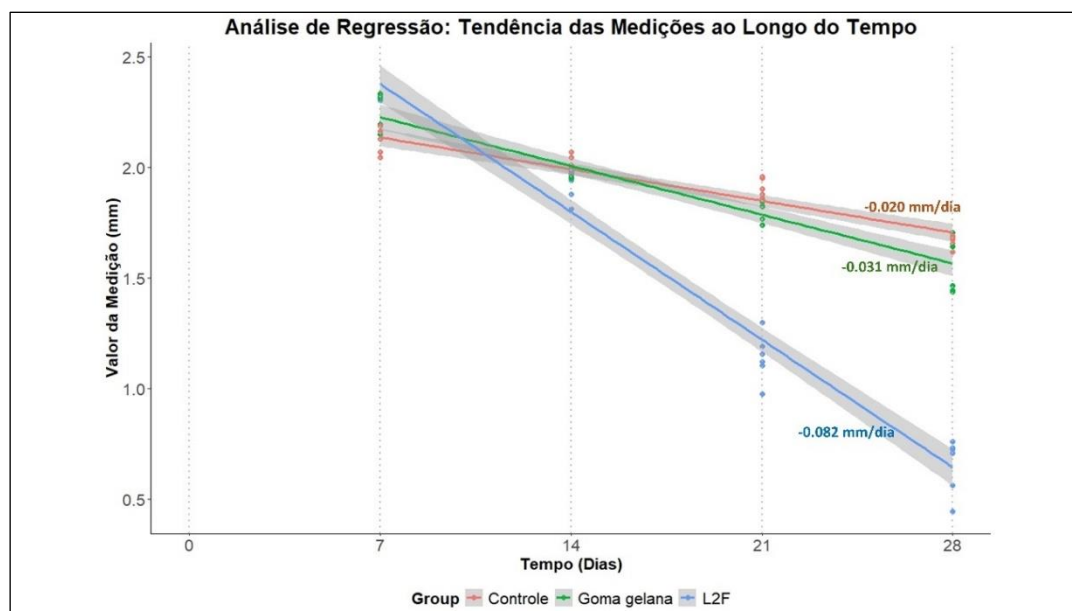


Figura 28. Análise de regressão da tendência das medições ao longo do tempo por grupo de tratamento, destacando a redução diária média em milímetros.

O grupo controle apresentou redução diária estimada de 0,020 mm, com um coeficiente de determinação ajustado (R²) de 0,89, indicando que o modelo

explica bem a variação observada. Ao longo dos 28 dias de estudo, essa redução diária resultaria, pela regressão linear, em uma cicatrização total de aproximadamente 0,57 mm, insuficiente para a cicatrização completa da fissura inicial.

O grupo GG teve redução diária maior, estimada em 0,031 mm, com um R^2 de 0,90, também mostrando uma boa adequação do modelo aos dados. Isso sugere uma cicatrização total de cerca de 0,87 mm em 28 dias, ainda insuficiente para a cicatrização completa da fissura inicial, mas significativamente melhor que o grupo controle.

O grupo L2F mostrou uma redução diária estimada de 0,083 mm, com um R^2 de 0,96, sugerindo uma precisão muito alta do modelo. Com essa taxa de redução, a cicatrização total ao longo dos 28 dias seria de, aproximadamente, 2,32 mm, indicando uma eficácia muito superior na promoção da cicatrização óssea em relação aos demais grupos, confirmando a eficácia do L2F na promoção da regeneração óssea.

5. CONCLUSÕES

O L2F é um biocompósito formado por um polímero natural a base de polissacarídeos e um vitrocerâmico a base de fosfatos, de fácil fabricação e baixo custo e que permite a sua aplicação por injeção sendo, portanto, candidato para utilização como biotinta em bioimpressões de tecidos.

O fornecimento de suporte adequado para as células osteoprogenitoras, combinado ao fornecimento de íons necessários para a mineralização da matriz óssea e estímulo da sua diferenciação celular em osteoblastos, demonstrou ser a razão da eficácia da atividade osteoreparadora do L2F. Diante dos resultados apresentados, é possível identificar um grande potencial de aplicação do novo biomaterial L2F na medicina regenerativa do tecido ósseo caracterizado por uma importante atividade osteoindutora, osteocondutora e biocompatibilidade, características desejáveis e essenciais para aplicação com eficácia e segurança de biomateriais dessa classe. O L2F pode, portanto, ser considerado um

potencial substituto ósseo, com aplicabilidade versátil e alto desempenho. No entanto, para efetiva implementação na prática médica, se faz ainda necessária análise por meio de pesquisa clínica, como futuros passos.

6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Tendo como objetivo a completa caracterização do L2F para aplicações na regeneração óssea e como biotinta, sugere-se como continuidade do trabalho:

1. Ensaios *in vivo* mais longos e com defeitos ou fraturas mais extensas;
2. Análise da hepatotoxicidade e neurotoxicidade, assim como avaliação de marcadores inflamatórios por análise de citometria de fluxo;
3. Análise histológica mais completa e detalhada de todos os pontos biológicos e colorações comparativas com eosina, hematoxilina e tricrômico de Masson;
4. Ensaios *in vivo* de regeneração óssea em animais de grande porte;
5. Ensaios de impressão do L2F para avaliar a printabilidade e resistência estrutural pós impressão;
6. Ensaios de impressão do L2F com células para avaliar a sua capacidade como biotinta.

REFERÊNCIAS

ABTO, Registro Brasileiro de Transplantes. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. 2019. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=552&c=1039&s=0&friendly=estatisticas>

AUGAT, Peter; VON RÜDEN, Christian. Evolution of fracture treatment with bone plates. **Injury**, v. 49, p. S2-S7, 2018.

AKBARI, Saba et al. Immediate to short-term inflammatory response to biomaterial implanted in calvarium of mice. **European Journal of Translational Myology**, v. 33, n. 1, 2023.

AMIRAZAD, Halimeh; DADASHPOUR, Mehdi; ZARGHAMI, Nosratollah. Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering. **Journal of biological engineering**, v. 16, n. 1, p. 1, 2022.

ANSARI, Niloufar; SIMS, Natalie A. The cells of bone and their interactions. **Bone Regulators and Osteoporosis Therapy**, p. 1-25, 2020.

BARLETTA, Pedro Henrique Andrade Araújo Salvatore et al. Initial repair of critical bone defect in rat calvary after the application of vibratory waves. 2020.

BENVINDO, Raphaella Karlla Machado Gonzaga. Avaliação da reparação óssea espontânea em calvária de ratos para determinação do defeito crítico de acordo com o tamanho e a localização anatômica. 2019.

BHARADWAZ, Angshuman; JAYASURIYA, Ambalangodage C. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 110, p. 110698, 2020.

CARVALHO, Ana Clara Alves de. Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina. 2010.

CHEN, Zheng-Yang et al. Antibacterial biomaterials in bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 11, p. 2594-2612, 2021.

COATHUP, Melanie J. et al. The effect of particle size on the osteointegration of injectable silicate-substituted calcium phosphate bone substitute materials. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101, n. 6, p. 902-910, 2013.

COTTRELL, Jessica A. et al. The biology of bone and ligament healing. **Foot and ankle clinics**, v. 21, n. 4, p. 739-761, 2016.

COWAN, Andrea C. et al. Bones of contention: Predicting and preventing fractures in patients receiving peritoneal dialysis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 43, n. 4, p. 286-291, 2023.

CUNHA, I. S., Desenvolvimento de substituto ósseo injectável para regeneração óssea. 2009.

DALLABRIDA, Ademar L. et al. Bioceramic characterization of calcium phosphates microstructured in different composition in sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1327-1336, 2018.

DIAS, Maria Isabel Ribeiro et al. Enxertos e substitutos ósseos em cirurgia ortopédica reconstrutiva nos animais de companhia-uma breve revisão. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 35, n. 4, p. 339-350, 2013.

DING, Zhaozhao et al. Silk biomaterials for bone tissue engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, n. 8, p. 2100153, 2021.

DWIVEDI, Ruby; MEHROTRA, Divya. 3D bioprinting and craniofacial regeneration. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 10, n. 4, p. 650-659, 2020.

FERNANDES, Beatriz Luci et al. Biocompatible glassceramic applied in drug release system. **Rev. bras. eng. biomed**, p. 33-37, 2008.

GUERRERO, J. A. P. Análise in vivo da osteocondutividade de biomateriais a base de colágeno, hidroxiapatita e queratina derivados de subprodutos da indústria avícola. 2019. -, Universidade Federal do Ceará, Sobral.

GODOI, Thallyson Pedro Medeiros. Efeito de biovidros na adesão, viabilidade e diferenciação osteogênica de células-tronco humanas. 2022.

GRASSIE, Kevin; KHAN, Yusuf. Bone tissue engineering. In: **Musculoskeletal Tissue Engineering**. Elsevier, 2022. p. 1-40.

GROLL, Juergen et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, v. 11, n. 1, p. 013001, 2018.

HAUGEN, Håvard Jostein et al. Bone grafts: which is the ideal biomaterial?. **Journal of clinical periodontology**, v. 46, p. 92-102, 2019.

HERNANDEZ, Jamie L. et al. Effect of tissue microenvironment on fibrous capsule formation to biomaterial-coated implants. **Biomaterials**, v. 273, p. 120806, 2021.

JI, S., GUVENDIREN, M. Recent advances in bioink design for 3D bioprinting of tissues and organs. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 5, p. 23, 2017.

JUNG, Yoona et al. Evaluation of new octacalcium phosphate-coated xenograft in rats calvarial defect model on bone regeneration. **Materials**, v. 13, n. 19, p. 4391, 2020.

JUNQUEIRA E CARNEIRO. Histologia básica. 12° ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.131-134; 2013.

KOSTAG, Marc; JEDVERT, Kerstin; EL SEOUD, Omar A. Engineering of sustainable biomaterial composites from cellulose and silk fibroin: Fundamentals and applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 167, p. 687-718, 2021.

KUMAR, V. et al. Long term results of impaction Bone grafting using a synthetic graft (Apapore) in revision hip surgery. **Journal of Orthopaedics**, v. 14, n. 2, p. 290-293, 2017.

LE, Bach Quang et al. A polycaprolactone- β -tricalcium phosphate–heparan sulphate device for cranioplasty. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 2, p. 341-348, 2019.

LEÃO, Daniel Marques et al. Efeitos de um biomaterial de origem vegetal (*Equisetum hyemale*) associado a hidrogel contendo ácido hialurônico na regeneração de defeito ósseo em maxila: um estudo preliminar. 2023.

MARIN, Elia; BOSCHETTO, Francesco; PEZZOTTI, Giuseppe. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 108, n. 8, p. 1617-1633, 2020.

MARCACCI, Maurilio et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6-to 7-year outcome of a pilot clinical study. **Tissue engineering**, v. 13, n. 5, p. 947-955, 2007.

MATUCHESKI, L. M., Desenvolvimento de novo biocompósito hidrogel e avaliação da sua aplicabilidade na medicina regenerativa e bioimpressão, 2020.

MONÇÃO, M. M.; ROSA, F. P. Study of the physical properties of a biomaterial with a new composition of wollastonite and beta-tricalcium phosphate for bone regeneration after implantation in vivo. 2019.

MOURA, L. B. et al. Autogenous non-vascularized bone graft in segmental mandibular reconstruction: a systematic review. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 45, n. 11, p. 1388-1394, 2016.

MOUSER, Vivian HM et al. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, p. 035003, 2016.

NIDAGUNDI, Naseema Begum; PUDAKALKATTI, Pushpa S.; VARSHITHA, K. V. 3D printed scaffolds in bone tissue engineering and their application in periodontology. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v. 18, n. 2, p. 1361-1371, 2023.

NIKOLOVA, Maria P.; CHAVALI, Murthy S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. **Bioactive materials**, v. 4, p. 271-292, 2019.

NYAME, Theodore T. et al. Tissue-engineered skin substitutes. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 136, n. 6, p. 1379-1388, 2015.

NYARY, Tamas; SCAMMELL, Brigitte E. Principles of bone and joint injuries and their healing. **Surgery (Oxford)**, v. 36, n. 1, p. 7-14, 2018.

NOH, Insup et al. 3D printable hyaluronic acid-based hydrogel for its potential application as a bioink in tissue engineering. **Biomaterials research**, v. 23, n. 1, p. 3, 2019.

PARK, Sung-Bin et al. Biopolymer-based functional composites for medical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 68, p. 77-105, 2017.

PASQUALI, Paulo et al. Análise comparativa entre técnicas cirúrgicas de enxertia óssea em reabilitação de maxila atrófica: transplante celular odontológico (tco) e técnica convencional de enxertia óssea: relato de caso clínico. **Revista Fluminense de Odontologia**, v. 2, n. 58, p. 115-134, 2022.

PESSOA, Martina Andrade Baião. Levantamento de seio maxilar e implante imediato com utilização de fibrina rica em plaquetas como único material de enxertia: relato de caso. Faculdade Sete Lagoas, Belo Horizonte, v. 1, n. 4564, p. 1-20, 2019.

POMPEU, Maria Helena et al. Factors involved in the refusal to donate bone tissue. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 27, p. 380-384, 2014.

RALSTON S.H. Bone structure and metabolism. **Medicine**, v. 45, n. 9, p. 560-564, 2017.

ROLIM, A.E.H. Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito crítico, em calvária de rato. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2010.

SADREARHAMI, Zahra et al. Antibiofilm nitric oxide-releasing polydopamine coatings. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 7, p. 7320-7329, 2019.

SHIU, Shiau-Ting et al. Effect of different bone grafting materials and mesenchymal stem cells on bone regeneration: A micro-computed tomography and histomorphometric study in a rabbit calvarial defect model. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, p. 8101, 2021.

SILVA-CORREIA, Joana et al. Biocompatibility evaluation of ionic-and photo-crosslinked methacrylated gellan gum hydrogels: In vitro and in vivo study. **Advanced healthcare materials**, v. 2, n. 4, p. 568-575, 2013.

SOUSA, J. Osteoinduction test of anorthite by human mesenchymal stem cell culture. **Materials Research**, v. 15, n. 2, p. 224-228, 2012.

SOUZA, Lucas Santos et al. Risco infeccioso do uso de biomateriais para cranioplastia: polimetilmetacrilato vs. osso autólogo. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e0511830483-e0511830483, 2022.

STOCCO, Thiago Domingues et al. Carbon nanomaterial-based hydrogels as scaffolds in tissue engineering: a comprehensive review. **International Journal of Nanomedicine**, p. 6153-6183, 2023.

STIEVANI, Fernanda de Castro. Biotinta de matriz extracelular equina para bioengenharia tendínea. 2021.

TARCHALA, Magdalena; HARVEY, Edward J.; BARRALET, Jake. Biomaterial-stabilized soft tissue healing for healing of critical-sized bone defects: the Masquelet technique. **Advanced healthcare materials**, v. 5, n. 6, p. 630-640, 2016.

TOMAS, Matej et al. Synthetic injectable biomaterials for alveolar bone regeneration in animal and human studies. **Materials**, v. 14, n. 11, p. 2858, 2021.

THORSON, Todd J. et al. Bijel-templated implantable biomaterials for enhancing tissue integration and vascularization. **Acta biomaterialia**, v. 94, p. 173-182, 2019.

VIVIAN, B. B. Reconstrução da articulação temporomandibular anquilosada com enxerto autógeno ou prótese aloplástica. 2017.

WANG, Wenhao; YEUNG, Kelvin WK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. **Bioactive materials**, v. 2, n. 4, p. 224-247, 2017.

WANG, Zhifa et al. Osteogenic and angiogenic lineage differentiated adipose-derived stem cells for bone regeneration of calvarial defects in rabbits. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 4, p. 538-550, 2021.

WANG, Yue et al. Determination of critical-sized defect of mandible in a rabbit model: Micro-computed tomography, and histological evaluation. **Heliyon**, v. 9, n. 7, 2023.

WEIGEL, J. P.; BOJRAB, M. J. Bone grafting. **Disease mechanisms in small animal surgery**, p. 678-685, 1993.

WHITAKER, Ricardo et al. Immunomodulatory biomaterials for tissue repair. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 18, p. 11305-11335, 2021.

WILLEMS, Christian et al. Hydrogels based on oxidized cellulose sulfates and carboxymethyl chitosan: studies on intrinsic gel properties, stability, and biocompatibility. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, n. 8, p. 2100098, 2021.

WU, Karl et al. In vitro and in vivo effectiveness of a novel injectable calcitonin-loaded collagen/ceramic bone substitute. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 35, n. 10, p. 1355-1365, 2021.

ZIROLOMETA, Eduarda Cavalli et al. Xenotransplante cardíaco: revisão de literatura. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 8, p. 740-746, 2022.

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1550

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.035219/2023-56

APROVADO/APPROVAL: 24/10/2023 – R.O. 09/2023

TÍTULO: Biocompatibilidade e potencial regenerativo ósseo do biocompósito hidrogel L2F em camundongos: estudo pré-clínico.

TITLE: Biocompatibility and bone regenerative potential of the biocomposite hydrogel L2F in mice: pre-clinical study.

AUTORES/AUTHORS: Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle e Leticia Moura Matucheski.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Anatomia.

Coordenador(a) da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ANGELA CRISTINA DA FONSECA DE OLIVEIRA, INSTITUCIONAL**, em 30/10/2023, às 08:59, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/10/2023, às 11:29, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **6119622** e o código CRC **BD45C25F**.