



“UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Hélida Gomes de Oliveira Barud

**BIOMATERIAIS MULTIFUNCIONAIS APLICADOS EM
REPARO ÓSSEO NA ODONTOLOGIA**

ARARAQUARA

2017



**“UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Hélida Gomes de Oliveira Barud

**BIOMATERIAIS MULTIFUNCIONAIS APLICADOS EM
REPARO ÓSSEO NA ODONTOLOGIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Dentística Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutora em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Hermes Pretel

ARARAQUARA

2017

Barud, Héli da Gomes de Oliveira

Biomateriais multifuncionais aplicados em reparo ósseo na Odontologia / Héli da Gomes de Oliveira Barud.-- Araraquara: [s.n.], 2017
108f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Dentística Restauradora) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

Co- orientador: Prof. Dr. Hermes Pretel

1. Regeneração óssea 2. Materiais biocompatíveis 3. Engenharia tecidual 4. Impressão tridimensional 5. Microtomografia por Raio-X I.
Título

BIOMATERIAIS MULTIFUNCIONAIS APLICADOS EM REPARO ÓSSEO NA ODONTOLOGIA

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORAMENTO

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

2º Examinador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantônio

3º Examinador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

4º Examinador: Prof. Dr. Rodrigo Alvarenga Rezende

5º Examinador: Prof. Dr. Hewerson Santos Tavares

Araraquara, 20 de setembro de 2017.

DADOS CURRICULARES

Hélida Gomes de Oliveira Barud

Nascimento 23/02/1979, Paranavaí, PR.

Filiação Absalão José de Oliveira e Célida Gomes de Oliveira

1998 a 2001 Graduação em Odontologia. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- FOAr - UNESP – Araraquara/SP.

2001 a 2001 Aperfeiçoamento em Atualização de Procedimentos Clínicos Integrados. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- FOAr - UNESP – Araraquara/SP.

2002 a 2002 Aperfeiçoamento em Atualização em Endodontia. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- FOAr - UNESP – Araraquara/SP.

2006 a 2007 Curso de Pós-Graduação em Odontologia em Saúde Coletiva, nível Especialização. Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic - SLMANDIC– Campinas/SP.

2009 a 2010 Aperfeiçoamento em Ortodontia Corretiva. Grupo de Estudos Ortodônticos e Serviços – GESTOS – Araraquara/SP

2010 a 2012 Aperfeiçoamento em Ortodontia Corretiva. Centro de Pós-Graduação em Ortodontia – Ribeirão Preto/SP.

2012 a 2014 Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Dentística Restauradora, nível Mestrado. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - FOAr - UNESP – Araraquara/SP.

2016 a 2017 Curso de Doutorado sanduíche no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em Coimbra, Portugal, sob a supervisão do Professor Antônio José Ribeiro.

2014 a 2017 Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Dentística Restauradora, nível Doutorado. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - FOAr - UNESP – Araraquara/SP.

A **DEUS**, obrigada pela oportunidade de conseguir realizar mais este sonho, que era intangível, mas agora tornou-se real. Obrigada por cuidar de cada detalhe! Pois eu sei que é o Senhor quem opera o querer e o efetuar no nosso coração, quem capacita e dirige os nossos passos, dando sabedoria, paciência e virtude no caminhar! A Ti, toda a honra e glória!

Ao meu querido esposo **HERNANE**,
Obrigada por ser tão companheiro, compreensivo e amoroso!
Por todo apoio em tudo, Parceiro em todo o tempo!

Amo muito você!

Ao meu filho **SAMUEL**,
um presente de Deus querido e companheiro. Obrigada por me acompanhar nesta jornada e por muito me ajudar com a **Ellen**.

A minha pequena princesa **ELLEN**,
tesouro do Papai do céu, cheia de doçura e meiguice...
Aos meus amados Pais **ABSALÃO** e **CÉLIDA** e irmão **LYSIAS EDUARDO**
pelo eterno exemplo de luta e determinação baseados no amor.
Mesmo distantes fisicamente, sei que estão torcendo por mim!

Obrigado por me ensinarem os valores desta vida

Amo vocês para sempre!

A todos os meus familiares queridos e amigos que me apoiaram e vibram
pelo meu sucesso.

Ofereço esta conquista a vocês, a qual sem o apoio de cada um, não teria
o mesmo sentido.

Muito obrigada!

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior.

Muito obrigada pela amizade, confiança motivação e otimismo em tudo!

*Conhecimentos e aprendizado técnico, um bom livro pode oferecer.
Agradeço a Deus por sua vida, por ter tido a oportunidade de aprender
muito mais nesta nova fase.*

*Aprender com sua
dedicação não apenas no trabalho clínico e acadêmico na Odontologia,
mas com o cuidado paternal de família, de lições de vida.
Para sempre minha amizade, gratidão e admiração.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hermes Pretel, por sua co-orientação em todos os passos. Por agregar qualidade a este trabalho, pelo belo estudo histológico realizado. Muito obrigada, por tudo!

Ao Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade e Profa. Dra. Marisa Aparecida C. Gabrielli, por terem participado dos meus exames de pré-qualificação e também qualificação, por todas as sugestões e contribuições feitas enriquecendo o trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Renan Barroso e Priscila Carvalho, e à querida Morgana, por todos os momentos descontraídos e também delicados no cuidado com os ratinhos da pesquisa, nossos filhinhos.

A Luana, que ajudou na aquisição das imagens de micro-ct.

A empresa DMC, na pessoa do Dr. Marcos Aurélio Napolitano que cedeu as amostras para o estudo.

Ao funcionário Pedro da histologia, por todo o cuidado necessário para o processamento histológico para o estudo.

A Diretoria, Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Odontológicas e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial aos professores da Disciplina de Dentística da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr pela convivência e ensinamentos.

Ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP e Laboratório de Materiais Fotônicos por permitir a caracterização dos materiais usados neste estudo.

Aos funcionários da Secretaria de Pós – Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, obrigada pela atenção, paciência e dedicação.

A todos os funcionários da Biblioteca da FOAr – UNESP pela disposição de sempre.

A todos os queridos amigos que dedicaram atenção e cuidado ao meu filho nos momentos de minha ausência. Muitíssimo obrigada pelo apoio sempre! A toda família do coração conquistada aqui em Araraquara, que tornou minha vida muito mais alegre nesta fase tão intensa. Não tenho palavras para agradecer todo carinho.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo para realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Muito Obrigada!!

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
E a vida é muito para ser insignificante”.*

Charles Chaplin

“Educar é ser um artesão da personalidade, um poeta da inteligência, um semeador de ideias”.

Augusto Cury

Barud HGO. Biomateriais multifuncionais aplicados em reparo ósseo na odontologia [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia UNESP; 2017.

RESUMO

A regeneração óssea caracteriza-se por ser um processo fisiológico complexo que envolve a participação coordenada entre angiogênese e osteogênese. Envolve um processo de múltiplas etapas que inclui migração, proliferação e diferenciação de vários tipos de células, como células endoteliais, fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos. Sabe-se que os biomateriais sintéticos têm demonstrado ser uma excelente alternativa ao reparo ósseo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do Biosilicato de sódio (BS) e dos compósitos 3D de 30% de hidroxiapatita e ácido poliláctico (3D 30% HA / PLA) e 30% hidroxiapatita e ácido poli(ácido láctico-co-glicólico) (30% HA / PLGA), e em defeitos críticos na calvária de ratos. Cento e vinte ratos machos de 90 dias com 350g de massa corporal em média foram aleatoriamente divididos em grupos de acordo com materiais de enxerto e tempo de análise, apresentando 6 animais em cada um. Os defeitos de tamanho crítico foram criados empregando-se uma trefina de 8 mm de diâmetro interno e preenchidos com os materiais mencionados ou apenas o coágulo sanguíneo como controle. Após 14 (T1), 30 (T2), 60 (T3), 90 (T4) e 120 dias (T5) dias do procedimento cirúrgico, a regeneração óssea foi avaliada por radiografia, microtomografia computadorizada (μ -CT) e histologia. A avaliação macroscópica mostrou biocompatibilidade em torno da área de interesse entre os biomateriais e ossos adjacentes. As imagens de μ -CT e de raios-x revelaram uma considerável formação óssea em relação ao PLGA e ao scaffold 3D, sendo que este último demonstrou uma maior extensão do tecido ósseo neoformado, mesmo dentro dos poros do scaffold. Por outro lado, os compósitos 3D 30%HA/PLA e 30% HA/PLGA não foram totalmente degradados permanecendo um remanescente do biomaterial em torno do reparo ósseo. Quanto ao BS, este apresentou formação óssea similar ao grupo controle.

Palavras Chave: Regeneração óssea. Materiais biocompatíveis. Engenharia tecidual. Impressão tridimensional. Microtomografia por Raio-X.

ABSTRACT

The process of bone regeneration requires a coordinated coupling between osteogenesis and angiogenesis involving a multistep process that includes migration, proliferation, and differentiation of several types of cells such as endothelial, fibroblasts, osteoblasts and osteoclasts. It is known that synthetic biomaterials have been proven to be an excellent alternative to bone repair. Thus, the aim of this study is to evaluate the effect of calcium and sodium Biosilicate (BS), a 3D scaffold of hydroxyapatite and polylactic acid (30% HA / PLA) and a hydroxyapatite and poly (lactic-co-glycolic acid) (30% HA / PLGA) composites in critical-sized calvarial defects. One hundred and twenty 90 days old male rats with 350g of body mass on average were randomly divided into groups (n = 6) according to graft materials and analysis time. Critical-size defects were created by means of a 8 mm inner diameter trephine bur and were filled with a 3D 30% HA/PLGA scaffold, 30% HA/PLA, BS or blood clot as control. After 15 (T1), 30 (T2), 60 (T3), 90 (T4) and 120 (T5) days of the surgical procedure, bone regeneration was evaluated by histology, x-ray and micro-computed tomography (μ -CT). Macroscopic evaluation showed no significant inflammation around the interest area. μ -CT results indicates that 30% HA/PLA and 3D 30% HA/PLGA composites were not fully degraded and images revealed considerable bone formation in 90 days and 120 days in relation to these materials. On the other hand, BS presented a bone formation similar to control groups.

Key words: Bone regeneration. Biocompatible materials. Tissue engineering. Printing, three-dimensional. X-Ray microtomography.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Biosilicato (BS)	18
1.2 Ácido Polilático (PLA)	19
1.3 Poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA)	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Biosilicato	23
2.2 Ácido Polilático (PLA)	27
2.3 Poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA)	30
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 Materiais	35
4.2 Caracterização Físico-Química	36
4.3 Avaliação In Vivo: Metodologia	37
4.4 Avaliação da Taxa de Reparo Ósseo	41
4.4.1 Imagens de raios-X	41
4.4.2 Microtomografia computadorizada (Micro-CT)	43
4.5 Análise Histológica	44
4.6 Análise Estatística	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Caracterização Físico-Química	46
5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
5.1.2 Espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDS)	50
5.1.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR)	52
5.2 Avaliação da Taxa de Reparo Ósseo	54
5.2.1 Imagens de raios-X	54
5.2.2 Micro-CT	58
5.3 Análise Histológica	62
5.3.1 Tempo: 7 dias	63
5.3.2 Tempo: 14 dias	68
5.3.3 Tempo 30 dias	73
5.3.4 Tempo 60 dias	78
5.3.5 Tempo 120 dias	83
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	97
ANEXO	107

1 INTRODUÇÃO

O processo de reparação tecidual compreende dois mecanismos: a regeneração e a cicatrização. A regeneração ocorre através da reposição tecidual “original”. A cicatrização abrange uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, e representa o esforço do corpo para restaurar a função e a estrutura natural de um tecido injuriado (Santos⁸⁵, 2000), o que resulta no fechamento do defeito por um tecido diferente do original.

Em relação ao tratamento de injúrias ou defeitos no tecido ósseo, este pode variar de acordo com a localização, tamanho e função do osso lesionado. Em defeitos pouco extensos, o próprio coágulo de sangue resultante da hemorragia local pode ser suficiente para promover a reparação. No entanto, a regeneração de defeitos ou fraturas mais extensas, exige técnicas específicas de enxertia, para preencher o espaço entre os fragmentos de osso, garantindo o suprimento sanguíneo, viabilizando e conduzindo os diferentes processos do reparo tecidual.

Os enxertos podem ser realizados com ósseos autógenos (Misch et al.⁶⁵, 2011; Rana et al.⁷⁸, 2011; Rogers et al.⁸¹, 2011), alógenos (Barone et al.⁶, 2009) e xenógenos (Hatano et al.³³, 2004; Santis et al.⁸³, 2011; Hallman et al.³¹, 2001), ou biomateriais sintéticos (Araújo et al.³, 2010; Xu et al.¹¹², 2011; Kohgo et al.⁵⁰, 2010).

O enxerto ósseo autógeno ainda é considerado o padrão-ouro para a reconstrução óssea, pois apresenta algumas vantagens em relação aos demais: é o único osteoindutor, osteocondutor e osteoprogenitor. (Block, Kent⁸, 1997; Crespi et al.¹⁵, 2006; Gerressen et al.²⁶, 2009; Sbordone et al.⁸⁶, 2009). Contudo, é de pleno conhecimento que os autoenxertos apresentam algumas limitações, como: hematoma, ruptura dos tecidos moles, dor, quantidade e áreas doadoras limitadas; potencial de morbidade da área doadora; considerável reabsorção; viabilidade limitada por causa da escassez de vascularização (enxertos não vascularizados) e tempo cirúrgico adicional (Bucharth¹¹, 1983). Além disso, cada área anatômica oferece desafios específicos para reconstrução óssea em relação à forma e função, sendo que alguns

sítios de doação de enxertia (como fíbula, escápula, rádio e crista ilíaca) podem levar a uma maior morbidade da área doadora (Ayub et al.⁵, 2011; Hench³⁷, 2006).

Deste modo, o desafio das pesquisas mais recentes está voltado para o desenvolvimento de substitutos ósseos (sintéticos) que reproduzam as muitas funções das matrizes extracelulares naturais, uma vez que elas regulam as respostas do hospedeiro. Esta propriedade é denominada biomimetismo (Barrere et al.⁷, 2008).

Outra questão importante no desenvolvimento dos enxertos biomiméticos é o controle da biodegradabilidade, já que o material não deve deteriorar antes da recuperação da região onde foi implantado, mas deve ser substituído gradativamente à medida que o processo ocorre (Freyman et al.²³, 2001).

A aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo como uma alternativa aos enxertos é relevante, pois eles não causam dano aos tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas e, por serem disponibilizados comercialmente, são padronizados e regulamentados por órgãos competentes para tais fins. Adicionalmente, de forma geral, apresentam fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que permitem e estimulam a formação óssea (Wan et al.¹⁰¹, 2006; Chen et al.¹², 2009).

Os biomateriais a serem utilizados para reconstrução óssea devem obedecer aos princípios biológicos que norteiam a cicatrização óssea, uma vez que o tecido ósseo não lesionado está em constante remodelação e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (Silva et al.⁹⁴, 2007). Neste ponto, vale a pena ressaltar que a consolidação do reparo neste tecido está relacionada a alguns fatores, tais como: amplo suprimento sanguíneo, possibilidade de migração celular, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional, além de se considerar o tamanho do sítio lesionado. Em situações em que a morfologia e a dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo pode tornar-se limitado resultando em uma cicatriz fibrosa (Kim et al.⁴⁹, 2006). Por conseguinte, os biomateriais a serem utilizados como substitutos do tecido

ósseo precisam ser dotados de características peculiares como biocompatibilidade, biodegradabilidade e osteocondutibilidade, para serem capazes de proporcionar a condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesado e de fatores regulatórios que promovam esse recrutamento, assim como o crescimento celular neste sítio (Liu, Ma³⁴, 2004; Wan et al.¹⁰², 2006; Chen et al.¹², 2009).

Ademais, outro ponto relevante que atuará como suporte para neoformação óssea é a configuração morfológica do enxerto de biomaterial (Precheur⁷⁶, 2007). Estes devem possuir função imediata após a implantação, apresentar habilidade de se integrar ao organismo, para sustentar e proteger o reparo das forças fisiológicas que incidem sobre a área danificada (Vunjak-Novakovic, Kaplan¹⁰¹, 2006).

De forma geral, os estudos *in vitro* contribuem significativamente para avaliar a resposta celular direta ao biomaterial, suas propriedades mecânicas e de degradação, contudo não dispensam a necessidade dos testes *in vivo*, que representam um passo intermediário e fundamental no desenvolvimento para viabilizar a aplicação em humanos (Li et al.⁵⁹, 2015).

O modelo de experimentação animal, então, apresenta-se como extremamente relevante neste processo para compreender as propriedades biológicas, físico-químicas bem como a degradação dos materiais, observando a interação destes com os tecidos circundantes ao implante (Li et al.⁵⁹, 2015).

Uma grande variedade de espécies diferentes de mamíferos já foi usada em estudos relacionados ao reparo do tecido ósseo. Os roedores são animais pequenos, de baixo custo e fáceis de manusear, o que os torna ideais para os estudos pré-clínicos. Apesar de existirem algumas limitações relacionadas ao tamanho reduzido dos ossos longos e a cortical muito fina e frágil estas características não são impeditivas para que os roedores sejam aplicados com sucesso como modelo animal de reparo ósseo (Gomes, Fernandes²⁷, 2011).

Para testes de viabilidade e performance de enxertos para grandes lesões ósseas, o modelo de defeito crítico (DC) na região da calvária de ratos tem sido frequentemente

aplicado, pois mimetiza "a menor ferida óssea que não pode ser reparada espontaneamente pelo organismo" segundo Schmitz e Hollinger⁸⁹, em 1986.

Este modelo tem se demonstrado muito adequado e popular entre os pesquisadores devido às seguintes razões: a estrutura óssea da calvária permite que seja realizado um defeito crítico uniforme, padronizado e reprodutível que pode ser facilmente avaliado pela técnica de raios-x e pela histologia. Sua localização anatômica oferece um acesso cirúrgico adequado para manuseio; a dura-máter e a cobertura da meninge oferecem um suporte adequado para os materiais a serem implantados sem a necessidade de fixação adicional tanto externa como interna. Além disso, por ser um modelo extensivamente utilizado e estudado, favorece a comparação de resultados e o desenvolvimento de materiais e técnicas (Hollinger, Kleinschmidt³⁸, 1990; An, Friedman², 1999).

No que tange a substituição de tecido ósseo, substâncias contendo cálcio/fosfato são preferíveis, tais como a hidroxiapatita (HA), cerâmicas e vidros bioativos (Matsumoto et al.⁶³, 2012).

Vidros bioativos têm sido amplamente utilizados como material de substituição óssea, principalmente devido à sua capacidade única de se ligar ao tecido vivo, e a sua biocompatibilidade e propriedades osteocondutoras. Apesar dos seus efeitos estimulantes bem conhecidos na osteogênese, a utilização de vidro bioativo monolítico para aplicações de engenharia tecidual óssea tem sido limitada, devido ao baixo desempenho das propriedades mecânicas (Hench³⁷, 2006; Hollinger et al.³⁹, 2008).

O biosilicato (BS) foi desenvolvido no intuito de melhorar as propriedades mecânicas dos vidros bioativos. Moura et al.⁶⁸ (2007) e Granito et al.^{28,29} (2009, 2011) reportaram que o BS apresenta satisfatória atividade osteogênica induzindo com eficiência a neoformação óssea.

Compostos de fosfato de cálcio, tais como hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico (TCP) também têm sido largamente utilizados como substitutos ósseos devido às suas

excelentes propriedades de biocompatibilidade, osteocondutividade, e bioafinidade ao tecido em questão. No entanto, estes compostos também são mecanicamente deficientes, mostrando-se frágeis e propensos a fraturas, não oferecendo o suporte mecânico necessário para os grandes defeitos ósseos. (Hayakawa et al.³⁴, 2010).

Poliésteres biodegradáveis, tais como o ácido polilático (PLA), Ácido poliglicólico (PGA) e os seus copolímeros de poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA), têm boa biocompatibilidade, boa resistência mecânica, bom módulo de elasticidade e podem ser conformados termicamente, de modo a satisfazer os requisitos básicos de materiais de transporte/condutores em engenharia tecidual óssea e cartilaginosa (Villalobos et al.⁹⁹, 2007; Weng et al.¹⁰⁹, 2001)

Compósitos que associem nanopartículas de HA com PLA ou PLGA têm atraído considerável atenção como substitutos de osso por apresentarem boa osteocondutividade, e biodegradabilidade, associada a alta resistência mecânica (Shikinami et al.⁹¹, 1999; Petricca et al.⁷⁴, 2006; Kim et al.⁴⁹, 2006; Wei et al.¹⁰⁷, 2004; Watanabe et al.¹⁰⁶, 2004; Hasegawa et al.³², 2005; Shikinami et al.⁹⁰, 2005). Adicionalmente, matrizes de PGA e PLGA têm apresentado similaridade no suporte de crescimento de tecidos dentários altamente organizados (Duailibi¹⁸, 2004). Este fato indica que os materiais que apresentam aplicações em reparo de tecido ósseo, provavelmente tem potencial para também serem utilizados no reparo dos tecidos dentários.

1.1 Biosilicato (BS)

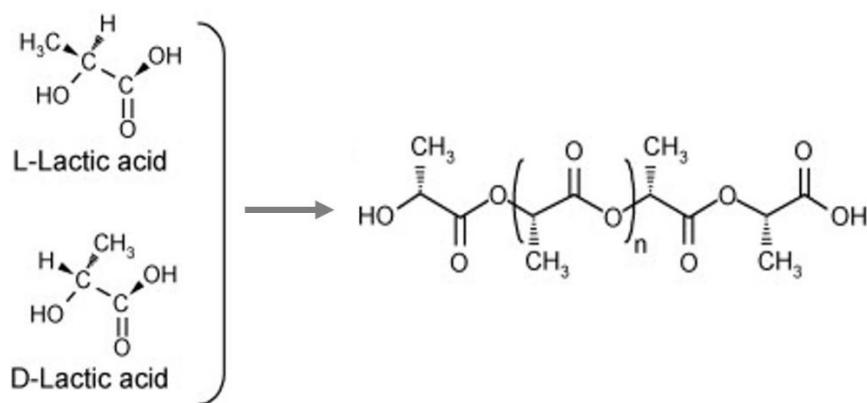
A mais recente vitrocerâmica bioativa disponível foi desenvolvida por Ravagnani e colaboradores, do Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos, Brasil (Ravagnani⁷⁹, 2003), cuja composição baseia-se no sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$. Esta vitro-cerâmica foi patenteada e registrada como Biosilicate® em 2003 e apresenta bioatividade muito similar ao Bioglass® 45S5, ainda considerado o padrão ouro de materiais bioativos (Hench³⁷, 2006; Jones⁴³, 2013).

O Biosilicate® (BS) caracteriza-se por ser um vidro cerâmico cristalino cujas propriedades osteogênicas, osteoindutivas e biomecânicas são consideradas satisfatórias. O BS não é citotóxico ou genotóxico e possui propriedades antibacterianas (Moura et al.⁶⁸, 2007; Granito et al.^{28,29}, 2009, 2011). Estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos, testaram o desempenho do BS para aplicações médicas e odontológicas (Zanotto et al.¹¹⁵, 2006; Zanotto¹¹⁶, 2010; Tirapelli et al.⁹⁸, 2011; Granito et al.^{28,29}, 2009, 2011; Renno et al.⁸⁰, 2010; Boccaccini, Gough⁹, 2007; Williams¹¹⁰, 2009; Kokubo⁵¹, 2008).

1.2 Ácido Polilático (PLA)

O ácido polilático (PLA) caracteriza-se por ser um poliéster derivado do ácido láctico configurando o principal polímero biodegradável utilizado em aplicações biomédicas nas últimas cinco décadas. Suas ligações éster podem ser hidrolisadas em fragmentos bem menores cuja metabolização é segura sendo facilmente degradados pelo organismo humano (Lasprilla et al.⁵⁴, 2012). Adicionalmente, estes polímeros são hidrofóbicos, semi cristalinos, com propriedades mecânicas e térmicas apreciáveis, sendo considerados materiais de base ideais para a fabricação de biomateriais, cuja obtenção industrial ocorre através da polimerização do ácido láctico ou da polimerização de abertura do anel (Cheng et al.¹³, 2009; Lim et al.⁶⁰, 2008), cuja unidade estrutural está representada na Figura 1.

Figura 1- Representação da síntese do PLA. Araraquara, 2017.



Fonte: Adaptado de Lim et al.⁶⁰, 2008.

Dentre as vias de obtenção do PLA, este pode ser produzido a partir de materiais não fósseis e/ou recursos naturais renováveis a partir da fermentação de polissacarídeos extraídos da cana de açúcar, milho, batata, melão da cana e beterraba açucareira. Outras fontes alternativas bio-baseadas de açúcares fermentáveis, tais como: biomassa celulósica não alimentar, resíduos agrícolas, culturas não-alimentares e gramíneas também podem ser consideradas na obtenção de PLA (Vink, Davies¹⁰⁰, 2015).

Atualmente, novas formulações do PLA e de seus copolímeros, produzidos por "bioengenharia verde" de baixo custo e de alto valor agregado, tem atraído grande atenção de pesquisadores, devido às excelentes possibilidades de desenvolvimento de soluções inovadoras na biomedicina, pois são biodegradáveis, bioreabsorvíveis e não tóxicos (Pawar et al.⁷³, 2014; Lasprilla et al.⁵⁴, 2012).

Em aplicações ortopédicas e dentárias, materiais baseados em PLA têm sido utilizados como dispositivos de fixação em cirurgias reconstrutivas, incluindo as da articulação mandibular, torácica, mão, perna, dedo e fraturas dos dedos do pé; em procedimentos de reconstrução do ligamento; em fixações de tecidos moles e duros; no alinhamento de osteocondral e fragmentos ósseos; em reparo do menisco; fixação de cartilagem hialina e até em aplicações estéticas de preenchimento facial (Middleton, Tipton⁶⁴, 2000).

Devido às propriedades térmicas, o PLA pode ser facilmente moldado em diferentes conformações, resultando em muitos tipos de matrizes para suporte e crescimento de tecidos. Essa propriedades permitem que enxertos ou scaffolds de PLA possam ser construídos por manufatura aditiva, conhecida popularmente por impressão 3D associada a sistemas de fabricação assistida por computador (CAD /CAM), favorecendo de modo único a obtenção de dispositivos personalizados que apresentem uma geometria adequada e estável, possibilitando o desenvolvimento de estruturas de PLA altamente complexas com a incorporação de

diversos tipos de fatores de crescimentos, alguns tipos de células e fármacos para liberação controlada (Xiong et al.¹¹¹, 2002; Yan et al.^{113,114}, 2003, 2005; Farahani et al.²⁰, 2014).

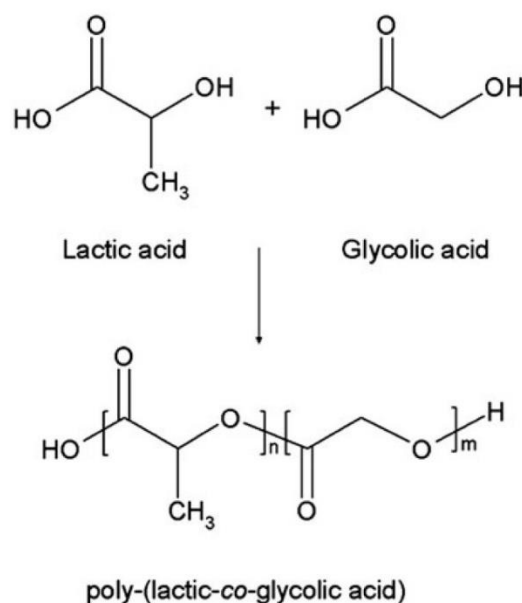
As desvantagens do PLA estão relacionadas a propriedades mecânicas ainda deficientes, que podem ser melhoradas pela associação com outros materiais e fibras de reforço.

Dentre as diversas possibilidades de combinações de materiais que podem ser associados ao PLA, tem crescido o interesse nos compósitos baseados em HA/PLA.

1.3 Poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA)

O ácido polilático quando copolimerizado com ácido glicólico resulta em um polímero amorfo denominado poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA), dotado de diferentes propriedades físicas e mecânicas bem como diferentes taxas de degradação, dependendo da proporção entre as unidades glicólicas e láticas, da organização do copolímero e peso molecular quando comparado ao PLA (Zhou et al.¹¹⁸, 2004; Wang et al.¹⁰⁵, 2006). A Figura 2 ilustra a estrutura deste polímero.

Figura 2- Esquema representativo da estrutura química do PLGA. N representa o número de unidades de ácido lático e M, as unidades de ácido glicólico. Araraquara, 2017.



Devido à semelhança em composição e por ser derivado do PLA, o biopolímero PLGA apresenta propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes, com a vantagem de maior controle da degradação, ao se variar as proporções de monômeros, pois apresenta melhor equilíbrio entre os constituintes hidrofóbicos / hidrofílicos e na cristalinidade (Lanao et al.⁵³, 2013).

A aplicação do biopolímero PLGA na forma pura é dificultada pela baixa osteocondutividade, exibindo propriedades mecânicas insatisfatórias no que tange o suporte de carga, sendo frequentemente utilizado em combinação com outros materiais, tais como cerâmica, vidro bioativo, ou outras modificações estruturais para torná-lo mais biomimético (Pan, Ding⁷¹, 2012). Adicionalmente, a superfície ligeiramente hidrofóbica do PLGA é tida como inadequada para a adesão e proliferação celular, de acordo com alguns pesquisadores (Chun et al.¹⁴, 2004; Park et al.⁷², 2007).

Compostos de HA/PLGA também têm sido propostos como forma de melhorar o desempenho mecânico do enxerto. Neste composto o PLGA atuaria como um suporte para que a HA seja depositada, reduzindo a fragilidade mecânica e controlando a taxa de reabsorção enxerto (Kim, Kim⁴⁸, 2008; Asti et al.⁴, 2010; Zhang et al.¹¹⁷, 2011).

Apesar de os estudos mostrarem que BS, HA/PLA e HA/PLGA apresentam isoladamente potencial para serem utilizados como enxertos/scaffolds para reparação óssea e de outros tecidos humanos, ainda não existem estudos comparando a performance destas três formulações em defeitos críticos de calvária de ratos.

Da mesma forma, não se sabe se a impressão aditiva de biomateriais termicamente fundidos (3D), na formulação proposta pelo estudo, apresentaria vantagens em relação às técnicas tradicionais de produção utilizadas nos demais materiais do estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo visa demonstrar pela literatura a evolução biotecnológica relacionada ao reparo do tecido ósseo, reportando o uso de novas tecnologias no desenvolvimento das matrizes de suporte até o fabrico dos materiais bioativos e bioengenharia tecidual com a aplicação de scaffolds mais elaborados com células, drogas e fatores de crescimento, bem como a atual tecnologia 3D.

No que tange os materiais e suas propriedades, a literatura apresenta-se muito vasta sobre a aplicação de BIOSILICATO e dos polímeros PLA, PLGA. Assim, alguns estudos referentes aos últimos cinco anos foram levantados.

2.1 Biosilicato

O Biosilicato® (BS) mostrou ser um biomaterial polivalente muito versátil. Este material foi testado com sucesso em vários estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos, em várias aplicações médicas e dentárias (Zanotto et al.¹¹⁵, 2006; Zanotto¹¹⁶, 2010; Tirapelli et al.⁹⁸, 2011; Granito et al.^{28,29}, 2009, 2011; Renno et al.⁸⁰, 2010), apresentando inclusive propriedades antimicrobianas (Martins et al.⁶², 2011).

A literatura apresenta alguns artigos de revisão relacionados à caracterização físico-química bem como o desempenho do BS, tanto *in vitro* como *in vivo* (Kido et al.⁴⁵, 2013;

Em 2013, Pinto et al.⁷⁵ testaram o efeito do BS associado a terapia de laser de baixa intensidade (LLLT), comparando com o grupo controle, sem tratamento, em defeitos em tíbias de ratos. Após 15, 30 e 45 dias, os animais foram sacrificados e avaliados histologicamente, bem como a expressão de cicloxigenase-2 (COX-2) e proteína morfogenética óssea (BMP-9). Aos 15 dias todos os grupos apresentaram um grande infiltrado inflamatório, e aos 30 e 45 dias os grupos BS e BS com LLLT apresentaram neoformação óssea. Os autores concluíram que O BS apresenta atividade osteogênica acelerando o reparo ósseo. Contudo, observou-se que a terapia a laser não foi capaz de

aumentar ou influenciar positivamente a bioatividade do BS, pois não foram encontradas diferenças estatísticas significantes.

Kido et al.⁴⁵, (2013) reportaram o estudo da biocompatibilidade de scaffolds de BS in vitro e in vivo, através de testes de citotoxicidade (por meio de MTT) e genotoxicidade (ensaio cometa) e de análises histopatológicas. Os scaffolds foram produzidos por meio de uma técnica que emprega agentes químicos para criar porosidades, resultando em amostras com 8mm de diâmetro e 2mm de profundidade. Os resultados demonstraram que o material induziu a viabilidade e proliferação das linhagens celulares testados, sem causar dano no DNA das mesmas, confirmando a não genotoxicidade do material. Adicionalmente, o BS foi implantado no tecido subcutâneo de 65 ratos Wistar para observar seu comportamento nos tempos: 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os resultados demonstraram a formação de um tecido de granulação ao redor dos implantes, após 7 dias. Aos 15 dias, observou-se a presença de células multinucleadas gigantes, e o início de um processo inflamatório crônico, bem como uma fina cápsula de fibrose em volta dos implantes. Nos períodos mais longos subsequentes observou-se uma maior presença de células multinucleadas gigantes e um processo inflamatório crônico instalado apresentando uma capsula fibrosa mais densa. Os pesquisadores concluíram que os scaffolds implantados apresentaram biocompatibilidade tanto in vitro como in vivo, sendo promissor na regeneração de tecidos.

Empregando-se a mesma técnica acima mencionada, scaffolds de elevada porosidade foram produzidos pelo mesmo grupo de pesquisadores (Kido et al.⁴⁶, 2015) e aplicados para reparar defeitos ósseos em tíbias de 80 ratos Wistar, que foram aleatoriamente divididos em 2 grupos de estudo (controle e BS), nos tempos 3, 7, 14 e 21 dias. Análises histopatológicas, ensaios imuno-histoquímicos e imunoenzimáticos foram conduzidos. Aos 3 e 7 dias, os resultados demonstraram nenhuma diferença estatística entre os grupos analisados. Durante os 21 dias, observou-se leve degradação do material iniciando-se pelas margens, sendo substituído por tecido ósseo neoformado. A análise imuno-histoquímica demonstrou que o BS

estimulou a ciclooxygenase-2 (COX-2), o fator de crescimento endotelial vascular e a expressão do fator 2 de transcrição. Em relação ao ensaio imunoenzimático, o BS não apresentou diferença no nível de fator de necrose tumoral alfa em todos os períodos experimentais. Ainda assim, os scaffolds demonstraram um nível mais alto de interleucina-4 após 14 dias de implantação e um nível mais baixo de interleucina-10 em 21 dias após a cirurgia. Os resultados demonstraram que os scaffolds de Biosilicato aplicados no presente estudo contribuíram para neoformação de osso por meio de uma arquitetura adequada o que também estimulou a síntese de marcadores relacionados ao reparo de tecido ósseo.

Em um protocolo de estudo semelhante, Kido et al.⁴⁷, 2017, avaliaram a aplicação do compósito baseado em BS/PLGA para reparar defeitos criados em tíbias de 80 ratos Wistar machos, nos tempos 3, 7, 14 e 21 dias. Análises histopatológicas, ensaios imunohistoquímicos e imunoenzimáticos foram conduzidos. Os principais achados mostraram que a incorporação de PLGA em BS teve um efeito significativo na estrutura morfológica do material, diminuindo o pH e aumentando a liberação de cálcio. Além disso, a análise histológica revelou que o BS / PLGA mostrou aumento da degradação do material, acompanhado de maior formação óssea em comparação com BS puro, após 21 dias de implantação. Além disso, a análise de PCR mostrou que BS / PLGA induziu uma regulação positiva dos genes osteogênicos relacionados a BMP-4, ALP e OC. Estes resultados mostram que o presente composto BS / PLGA pode ser usado como enxerto ósseo para induzir o reparo ósseo.

Fernandes et al.²² (2017b) prepararam e caracterizaram compósitos baseados em BS/PLGA, nas proporções 80:20; 70:30 e 60:40, respectivamente. A viabilidade celular foi testada utilizando-se células osteoblásticas da calvária de ratos (Osteo-1lineage) e fibroblásticas (L929), cujo desempenho apresentou superioridade quando os compósitos foram comparados ao BS puro. Os materiais foram implantados em defeitos criados na tíbia de 80 ratos wistar machos e após 2 e 6 semanas os achados histopatológicos revelaram que o

compósito degrada lentamente ao longo do tempo, iniciando pela periferia. Observou-se também a formação de tecido de granulação e formação óssea bem como a expressão de alguns fatores imunogênicos que foram avaliados. Os resultados permitiram concluir que o compósito PLGA/BS desenvolvido apresentou adequadas características físico-químicas, estimulou a viabilidade celular e foi capaz de promover a neoformação óssea nos animais empregados no estudo.

Os mesmos pesquisadores, ainda em 2017, reportaram o uso de LLLT e scaffolds baseados em BS/PLGA no reparo de defeitos em tíbias de 80 ratos, divididos aleatoriamente em 4 grupos de estudo: BS; BS+LLLT; BS/PLGA e BS/PLGA + LLLT, nos tempos 2 e 4 semanas de período experimental. Primeiramente os scaffolds foram caracterizados e, observou-se que o PLGA foi inserido com sucesso na matriz de BS, sendo que as micropartículas degradaram ao longo do tempo. Quanto à viabilidade celular, esta foi conduzida empregando os scaffolds em contato com osteoblastos e fibroblastos irradiados ou não com LLLT, por 24, 48 e 72h. Os achados *in vitro* demonstraram maior viabilidade de fibroblastos nos grupos BS / PLGA após 24h e maior viabilidade de osteoblastos em BS / PLGA + LLLT em todos os períodos. Como conclusão, os animais tratados com BS / PLGA + LLLT demonstraram uma degradação do material melhorada e uma quantidade aumentada de tecido de granulação bem como de tecido ósseo neoformado (Fernandes et al.²¹, 2017a).

Gabbai-Armelin et al.²⁴ (2017) produziram pastas na forma de cimento, com diferentes formulações, baseadas em cerâmicas de fosfato de cálcio (CaP) ou BS associados à carboximetilcelulose para serem aplicados como preenchedores no reparo ósseo. Após caracterização físico-química, observou-se a formação de uma certa camada de hidroxiapatita quando em cultura em fluido corporal simulado (SBF). Adicionalmente, testes de viabilidade celular demonstraram que nenhuma das formulações foi citotóxica, induzindo a um aumento na proliferação celular. Os autores concluíram que a combinação de carboximetilcelulose

cerâmicas de CaP ou BS permitiram o fabrico de cimentos moldáveis, melhorando as propriedades de manuseio e agregando uma maior bioatividades aos materiais resultantes.

2.2 Ácido Polilático (PLA)

As propriedades osteocondutoras e osteoindutoras da hidroxiapatita combinadas à bioarbsorção e facilidade de manipulação do PLA e seus copolímeros, têm originado interessantes compósitos. A literatura demonstra diversos estudos que intencionam demonstrar melhoras nas propriedades mecânicas e estruturais do compósito HA/PLA, bem como a bioatividade e biodegradabilidade dos mesmos (Nazhat et al.⁶⁹, 2001; Shen et al.⁸⁸, 2009; Li et al.⁵⁷, 2008; Talal et al.⁹⁵, 2009).

Em relação às aplicações, Ding et al.¹⁷(2013) fabricaram um scaffold bifásico contendo ácido polilático e poliglicólico (PGA/PLA) e poli-ε-caprolactona com hidroxiapatita (PCL/HA) por meio da tecnologia CAD/CAM associada à impressão 3D empregando a técnica de manufatura aditiva, na forma anatômica da cabeça do fêmur de uma cabra. Células tronco da medula óssea e condrócitos foram semeados no scaffold, que foi implantado no dorso subcutâneo de um camundongo. Após 10 semanas de implantação, observou-se que as cabeças femorais regeneradas apresentaram semelhança em forma e tamanho quando comparadas às cabeças femorais naturais de cabra, apresentando uma camada de cartilagem lisa, contínua, avascular e homogênea na superfície bem como tecido ósseo rígido nos microcanais do scaffold. Adicionalmente, observou-se estruturas histológicas típicas e propriedades biofísicas semelhantes às nativas com deposição específica da matriz e uma interface osteocondral bem integrada.

Uma outra técnica de impressão 3D, a estereolitografia (técnica de fotossolidificação), permitiu a fabricação de scaffolds baseados em HA/PLA dotados de porosidades variadas e proporções de HA em diferentes concentrações. Células pré-osteoblásticas do tipo MC3T3-E1 foram semeadas nos scaffolds para se observar a adesão, proliferação e diferenciação das mesmas. A atividade osteoblástica foi avaliada por meio da

fosfatase alcalina (ALP) e quantidade de cálcio. Os pesquisadores observaram que a concentração de HA e o tamanho do poro influenciam diferenças estatísticas significantes apenas nos estágios iniciais da diferenciação osteoblástica. Nos períodos mais longos de cultura (os grupos de 21 dias), todos os scaffolds demonstraram semelhança nos parâmetros avaliados (Tanodekaew et al.⁹⁶, 2013).

Pesquisadores produziram um conjunto anatômico de 15 vértebras dotadas de uma alta precisão dimensional empregando a impressão 3D utilizando-se a técnica de manufatura aditiva que possibilitou a deposição filamentos de PLA puro em camadas. Este processo reforça a grande aplicabilidade desta técnica na regeneração de tecidos de alta complexidade (Ogden et al.⁷⁰, 2014).

Danoux et al.¹⁶(2014) observaram que apesar de compósitos fabricados por um processo de extrusão contendo PLA e PLA/nano-hidroxiapatita (nHA) apresentarem uma estrutura densa e sólida, demonstraram proliferação de células tronco hematopoiéticas em um modelo canino in vitro e in vivo. Além disso, observou-se a elevação da expressão da ALP em nos compósitos com nHA, resultando em formação de osso heterotópico.

Ainda no ano de 2014, pesquisadores (Fang et al.¹⁹, 2014) reportaram o uso de HA modificada com silano para aumentar a interação desta biocerâmica com o PLA, o que melhorou as propriedades mecânicas do scaffold.

Akagi et al.¹ (2014) realizaram um estudo acompanhando durante 84 meses cães Beagle que foram submetidos a implantes com PLA puro (fêmur esquerdo) ou HA/PLA (fêmur direito). A análise histológica e radiográfica mostrou que os compósitos HA/PLA induziram o fechamento completo do buraco de buraco aos 60 meses, enquanto que o PLA puro não apresentou o mesmo resultado. Além disso, o PLA induziu a formação de um tecido mais fibroso e uma grave infiltração de histiócitos. Além de promoverem o reparo do tecido, os scaffolds de HA/PLA apresentaram biocompatibilidade superior em relação aos scaffolds de PLA puro.

No ano de 2015, Thanh et al.⁹⁷ fabricaram nanocompósitos baseados em HA/PLA sob a forma de scaffolds porosos para a regeneração óssea. O processo de fabricação foi baseado em uma mistura em fusão em que o óxido de polietileno (PEO) foi adicionado ao nanocompósito para melhorar a compatibilidade de HA na matriz PLA. A porosidade foi obtida por lixiviação de partículas de Cloreto de sódio (NaCl). A porosidade e a influência no peso da HA bem como as propriedades mecânicas foram avaliadas por MEV e testes de tração. Os resultados indicaram que o compósito contendo 20% de HA e 5% de PEO apresentaram um módulo de elasticidade semelhante ao do osso. Testes *invitro* em fluidos corporais simulados (SBF) foram realizados e, em seguida, o pH da solução de SBF, a variação da massa de material (Δm) e a morfologia e estrutura de fase do nanocompósito também foram estimados. Os resultados mostraram diminuição no pH e Δm variável, apresentando valores positivos ou negativos, dependendo da composição e superfície do material formado por cristais de HA e da hidrólise de PLA durante o tempo de imersão.

Morelli et al.⁶⁷ (2015) relataram que o tanto o PLA puro e os scaffolds de PLA-nanohidroxiapatita produzidos por eletrofição demonstraram igual eficiência na diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas (MSCs) em diferenciação osteogênica e osteoclastrogênica.

Senatov et al.⁸⁷ (2016) desenvolveram estruturas dimensionalmente estáveis baseadas em 15% HA/PLA por meio da impressão 3D que apresentaram uma memória de forma efetiva ao serem submetidas a vários ciclos de compressão-compactação sob aquecimento.

Através de uma nova metodologia de processamento, Santos et al.⁸⁴ (2017) obteve membranas de PLA com a presença de micropartículas de hidroxiapatita reforçada com vidro (Bonelike®) entre as fibras, que foram avaliadas quanto a viabilidade e proliferação celular utilizando-se células osteoblásticas. Os resultados evidenciaram que a presença de

hidroxiapatita reforçada com vidro (Bonelike®) induziu uma maior proliferação das células em relação às membranas puras de PLA.

Sánchez-Arévalo et al.⁸², 2017 produziram scaffolds empregando a técnica de eletrofiação em diferentes concentrações de partículas de HA (2%, 4% e 6%) ao PLA. Associando-se medições de tensão de correlação de imagem digital 3D acopladas a um teste de tração axial foi possível observar em tempo real o comportamento mecânico no âmbito macro e em micro escala dos scaffolds. Observaram que a adição de 2%HA afetou as propriedades mecânicas avaliadas e a adição de 4 e 6% de HA foi positiva, resultando em alterações nos módulos de elasticidade o que permitiu um melhor desempenho micromecânico dos scaffolds produzidos pela técnica de eletrofiação.

2.3 Poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA)

Shirakata et al.⁹², em 2013, desenvolveram scaffolds baseados em HA/PLGA e avaliaram o comportamento dos mesmos quanto a biocompatibilidade e osteocondutividade in vitro e in vivo. O compósito foi empregado em defeitos críticos de 5 mm em ratos na forma pura e com células indiferenciadas do tecido adiposo de ratos (DFATs). Os resultados demonstraram que o dispositivo apresenta-se como um scaffold promissor para melhorar a regeneração óssea, sendo que a presença das células DFATs foi significativa, aumentando a formação de tecido ósseo inicial, quando comparado apenas ao material sem a presença de células.

Em 2013, Shuai⁹³ relatou o preparo de scaffolds de PLGA/nano-HA que apresentaram porosidade controlada e arquitetura eficiente evidenciando uma maior exposição de biocerâmicas ativas em sua superfície, empregando a técnica de sinterização a laser.

Wang et al.¹⁰³(2013) fabricaram scaffolds contendo nHA/PLGA para comparar o desempenho com scaffolds de PLGA puros em termos de reparo ósseo em defeitos em ossos longos de coelhos. Previamente à implantação, células tronco estromais autógenas (provenientes do mesmo animal que receberá o scaffold a ser implantado) foram semeadas

nos scaffolds. Estes foram mantidos em cultura e após a proliferação e diferenciação em células osteoblásticas, foram implantados nos animais. Os resultados indicaram que após 12 semanas, os defeitos que receberam os scaffolds produzidos foram completamente regenerados demonstrando superior formação de tecido ósseo em comparação com o PLGA puro, após avaliação radiográfica, micro-ct e histologia.

Haider et al.³⁰, 2014 modificaram nanopartículas de HA com insulina (nHA-I) para produzir scaffolds 3D baseados em PLGA/nHA-I por meio de eletrospinning. Após a caracterização físico química, os scaffolds foram submetidos a testes de adesão celular, e ensaios aplicando a alizarina vermelha e Von Kossa. Os resultados sugeriram que o compósito PLGA / nHA-I aumentou o crescimento celular osteoblástico, à medida que proliferaram e diferenciavam mais células. Os autores concluíram que este aumento na proliferação de células osteoblásticas na presença de insulina abrirá novas possibilidades para o desenvolvimento de scaffolds com características específicas para a regeneração do tecido ósseo.

A técnica de eletrofiação também possibilitou que um grupo de pesquisadores (Li et al.⁵⁶, 2014) fabricassem scaffolds baseados em PLGA/Gelatina/ nanohidroxiapatita (nHA). A citocompatibilidade foi avaliada in vitro utilizando-se a microscopia confocal a laser e ensaio de MTT. Adicionalmente, a reação de PCR em cadeia e os ensaios com alizarina vermelha (ARS) foram aplicados para se observar a osteocondutividade. Ao se comparar o desempenho do referido compósito com PLGA puro, os scaffolds PLGA/Gelatina/nHA apresentaram um melhor desempenho em suportar adesão e proliferação osteoblástica, demonstrando melhor citocompatibilidade celular. Além disso, as análises de PCR e ARS mostraram que o compósito apresentou maior atividade osteoindutiva devido à maior expressão fenotípica de genes osteogênicos e deposição de cálcio. A avaliação histológica indicou que a incorporação de gelatina / nHA poderia reduzir significativamente a inflamação local.

Ainda em relação à técnica de eletrospinning, Kwak et al.⁵²(2016) fabricaram scaffolds em multicamadas alternando micro e nano fibras de colágeno e PLGA com partículas de nHA. Células MC3T3-E1 foram semeadas nos scaffolds e observou-se que a adesão, proliferação e diferenciação osteoblástica ocorreu de maneira mais ordenada. Os ensaios MTT, fosfatase alcalina, Alizarina Vermelha, von Kossa e F-actina, para se observar a osteogênese, também foram aplicados. Observou-se que o scaffold produzido demonstrou se altamente bioativo quando comparado a scaffolds puros de colágeno e PLGA.

De maneira semelhante He et al.³⁵(2016) desenvolveram scaffolds baseados em nHA/PLGA, nas proporções 20:80 e 50:50, respectivamente. As propriedades mecânicas, a molhabilidade e degradação dos scaffolds foram analisadas, e, posteriormente, avaliados quanto à biocompatibilidade e osteocondutividade. Os resultados demonstraram que a adesão, proliferação e diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea dos scaffolds nHA/PLGA na proporção 50:50 foram superiores em relação ao scaffold de proporção 20:80. Após 4 semanas de implantação de ambos os dispositivos in vivo, em coelhos, a avaliação histológica bem como o micro-ct não demonstraram diferenças estatísticas significantes. Contudo, após 8 e 12 semanas, o scaffold de proporção 20:80 demonstrou um melhor desempenho em relação à neoformação óssea.

Em 2017, pesquisadores (Li et al.⁵⁸, 2017) relataram um novo método para preparar scaffolds baseados em PCL / PLGA / HA (w / w = 6/4/2) através da mistura por fusão e lixiviação de partículas. As propriedades ultraestruturais e físico-químicas dos andaimes foram estudadas por SEM, FTIR, XRD e TGA. A porosidade e o tamanho de poros encontrados em média, foram $75,74 \pm 1,21\%$ e $179,07 \pm 0,75 \mu\text{m}$, respectivamente. A resistência à tração e resistência à compressão foram $147 \pm 5\text{MPa}$ e $47 \pm 2\text{MPa}$. A taxa de degradação relacionada ao período de de 24 semanas foi de $32,31 \pm 1,93\%$. Células estaminais mesenquimais humanas foram cultivadas nos dispositivos durante 14 e 21 dias in vitro e observou-se que os scaffolds promoveram a adesão e proliferação celular, aumentando

a expressão de ALP bem como de outros genes relacionados ao tecido ósseo (osteocalcina, colágeno I, integrina a1, integrina b1). Posteriormente, os scaffolds foram implantados em um modelo de defeito do crânio de coelhos. As análises de micro-ct, histologia e a imunohistoquímica revelaram que os scaffolds produzidos, baseados em PCL / PLGA / HA são biodegradáveis, apresentando excelente biocompatibilidade e capacidade de induzir a regeneração óssea.

3 PROPOSIÇÃO

Caracterizar e avaliar a resposta tecidual e a taxa de reparo ósseo induzida pelos tratamentos com BS, HA/PLA e HA/PLGA em defeitos críticos de calvária de ratos.

A hipótese nula (H_0) testada foi que não existe diferença na resposta tecidual e na taxa de reparo ósseo promovida pelos tratamentos com BS, HA/PLA e HA/PLGA.

4 MATERIAL E MÉTODO

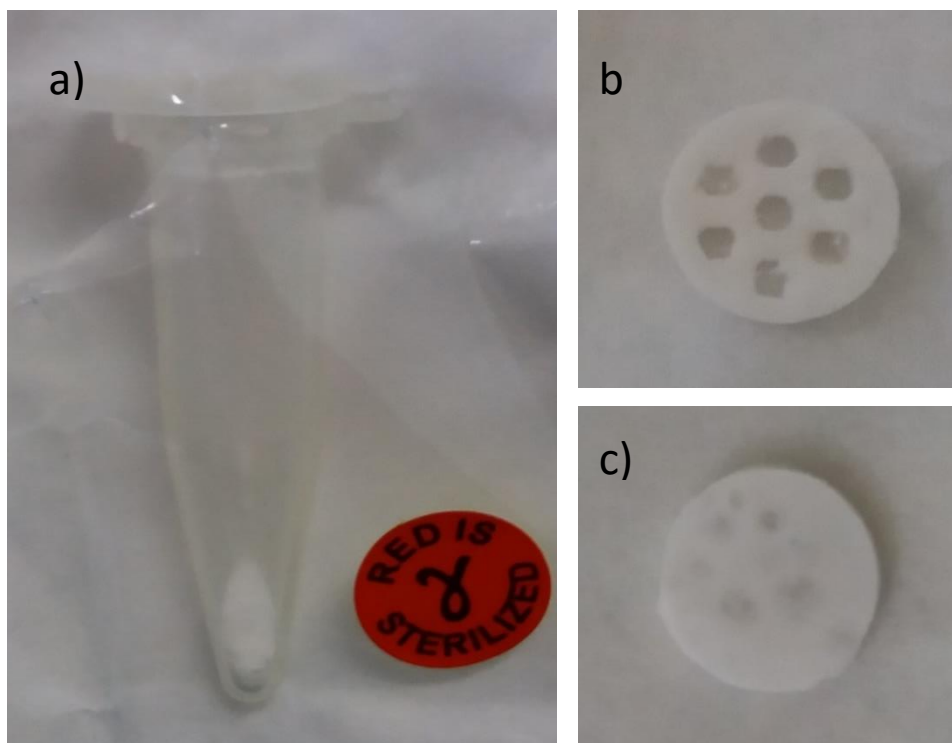
4.1 Materiais

Nesse estudo foram utilizados três tipos de enxertos o primeiro enxerto foi constituído por Biosilicate® em pó (BS), uma vez que não foi possível desenvolver um disco de BS com resistência mínima necessária para este experimento, e dois scaffolds experimentais, sendo um constituído por um disco obtido por impressão aditiva do compósito de HA/PLA (3D 30%HA/PLA) e o outro disco por compósito de HA/PLGA prensado (30%HA/PLGA). A proporção das fases desses dois compósitos foi de 30:70 (m/v).

Os discos de compósitos foram preparados e fornecidos pela empresa DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA, São Carlos sob a supervisão do químico responsável Dr. Marcos Aurélio Napolitano, enquanto o Biosilicate® (BS), foi obtido da empresa Vitrovita (Glass-Ceramic Innovation Institute, São Carlos, SP, Brasil). Todos os materiais foram fornecidos embalados individualmente e já esterilizados por meio de raios gama.

O grupo controle foi constituído por ratos que não receberam nenhum enxerto no defeito crítico realizado nas calvárias. A Figura 3 apresenta os materiais utilizados neste estudo.

Figura 3 – Apresentação dos materiais empregados no estudo: a) BS; b) 3D 30%HA/PLA e c) 30%HA/PLGA. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

4.2 Caracterização Físico-Química

A caracterização morfológica e química dos compósitos foi realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada à Espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDS). A caracterização estrutural foi feita por meio da Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR).

As imagens resultantes relacionadas ao MEV foram obtidas com o uso de um Microscópio JEOL JSM - 7500F, realizadas no Instituto de Química-IQ (Araraquara, SP). Esta técnica permite a aquisição de imagens de alta resolução da superfície amostra (em até 300.000 x de aumento), favorecendo a observação e análise das características estruturais da substância analisada. As amostras foram cuidadosamente seccionadas verticalmente ao meio

com uma lâmina de bisturi nº12, montadas com fita adesiva condutora em porta-amostras de cobre e revestidas com uma camada de carbono depositada por evaporação.

Em termos de comparação, foram feitas imagens dos materiais (BS, 3D 30%HA/PLA e 30%HA/PLGA) nos aumentos de 100, 5.000 e 15000x.

Utilizou-se o detector de EDS 6742A/Thermo Scientific acoplado ao MEV para realização de análises pontuais nas mesmas amostras previamente preparadas para o MEV, a fim de se determinar sua composição química.

A análise por FT-IR teve como objetivo observar a estrutura da substância, pois a técnica evidencia grupos de átomos que dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência independente da estrutura da molécula. Assim, examinando o espectro e comparando-o com tabelas, foi possível realizar a identificação das estruturas presentes na substância analisada.

Os espectros de infravermelhos foram registados no equipamento FT-IR 2000 de Perkin Elmer, utilizando as amostras preparadas como pastilhas de KBr. Os espectros foram obtidos na faixa de $4.000-700\text{ cm}^{-1}$, com 32 varreduras, resolução de 2 cm^{-1} e intervalo de $0,5\text{ cm}^{-1}$. Os espectros de FT-IR dos scaffolds 3D 30%HA/PLA e 30%HA/PLGA e do BS foram registados.

4.3 Avaliação In Vivo: Metodologia

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP sob processo número 21/2015 (Anexo). Este estudo seguiu as diretrizes do ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments). O protocolo experimental foi realizado no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP sob supervisão do Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior. Foram utilizados 120 ratos Holtzmann, machos, com aproximadamente 90 dias de vida e, em média, 350g de massa corpórea. Os animais foram alojados em ambiente

com umidade, luz e temperatura controladas, mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração sólida e acesso a água ad libitum durante todo o período experimental. As gaiolas foram identificadas pelo nome do pesquisador responsável, massa corporal dos animais, data da cirurgia e do sacrifício, grupo a que pertencem e período de análise. Os animais receberam monitoramento a cada 2 dias, observando-se seu consumo de água, alimentação, comportamento e a regularidade da urina e fezes.

Os animais foram codificados e aleatoriamente divididos nos 6 grupos experimentais em função de material e tempo de análise, utilizando os serviços de randomização do site www.random.org. A sigla dos grupos, materiais que serão testados, tempos de análise, tipo de análise, quantidade de animais por grupo e total de animais necessários estão descritos na Figura 4.

Figura 4 - Grupos, composição dos materiais, tempos de análise, tipo de análise e distribuição dos animais de acordo com o desenho de estudo. Araraquara, 2017.

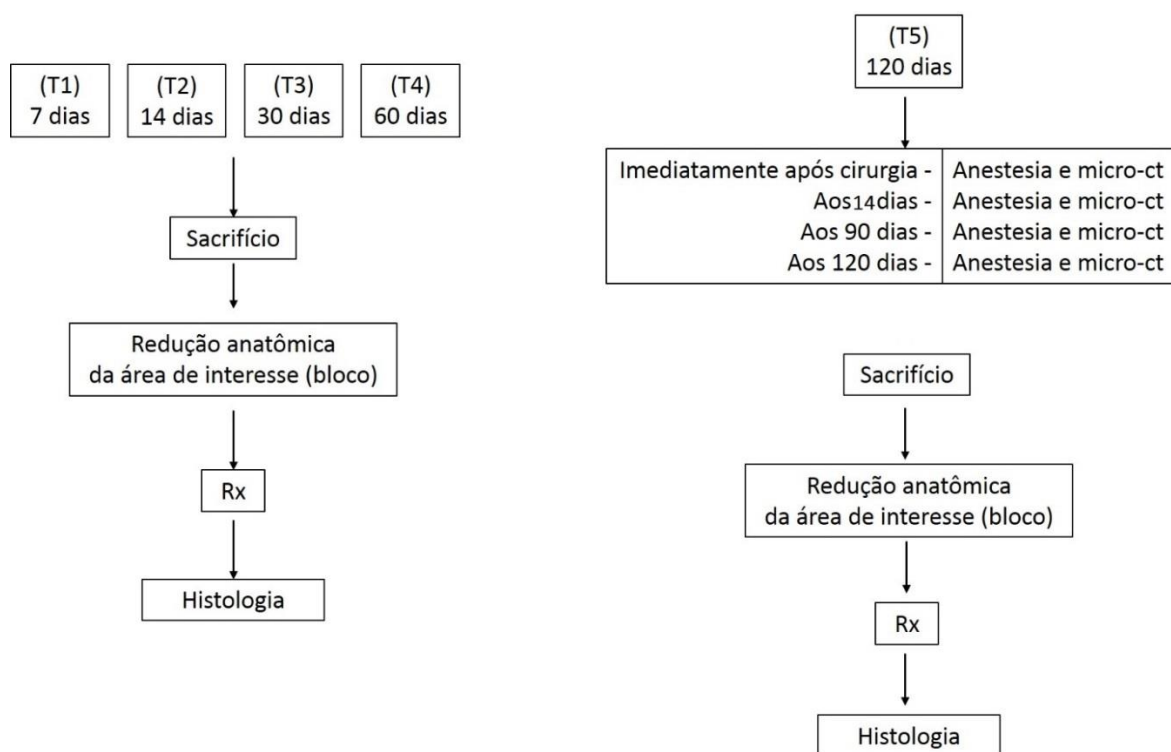
	T1 (7dias)	T2 (14dias)	T3 (30 dias)	T4 (60 dias)	T5 (120 dias)	
Testes realizados	Histologia RX	Histologia RX	Histologia RX	Histologia RX	Histologia RX MicroCT*	Total
C	6	6	6	6	6	30
3D 30%HA/PLA	6	6	6	6	6	30
30%HA/PLGA	6	6	6	6	6	30
BS	6	6	6	6	6	30
Total	24	24	24	24	24	120

* Os animais do grupoT5, respectivo aos 120 dias, foram acompanhados ao longo do período experimental por meio de Micro CT, sendo que o mesmo animal foi escaneado imediatamente após a cirurgia, aos 14, 90 e 120 dias.

Fonte: Elaboração própria.

Para um melhor entendimento, a continuação da metodologia será descrita na ordem de execução dos procedimentos, conforme esquema a seguir (Figura 5).

Figura 5 - Esquema representativo da sequência metodológica do estudo. Araraquara, 2017.



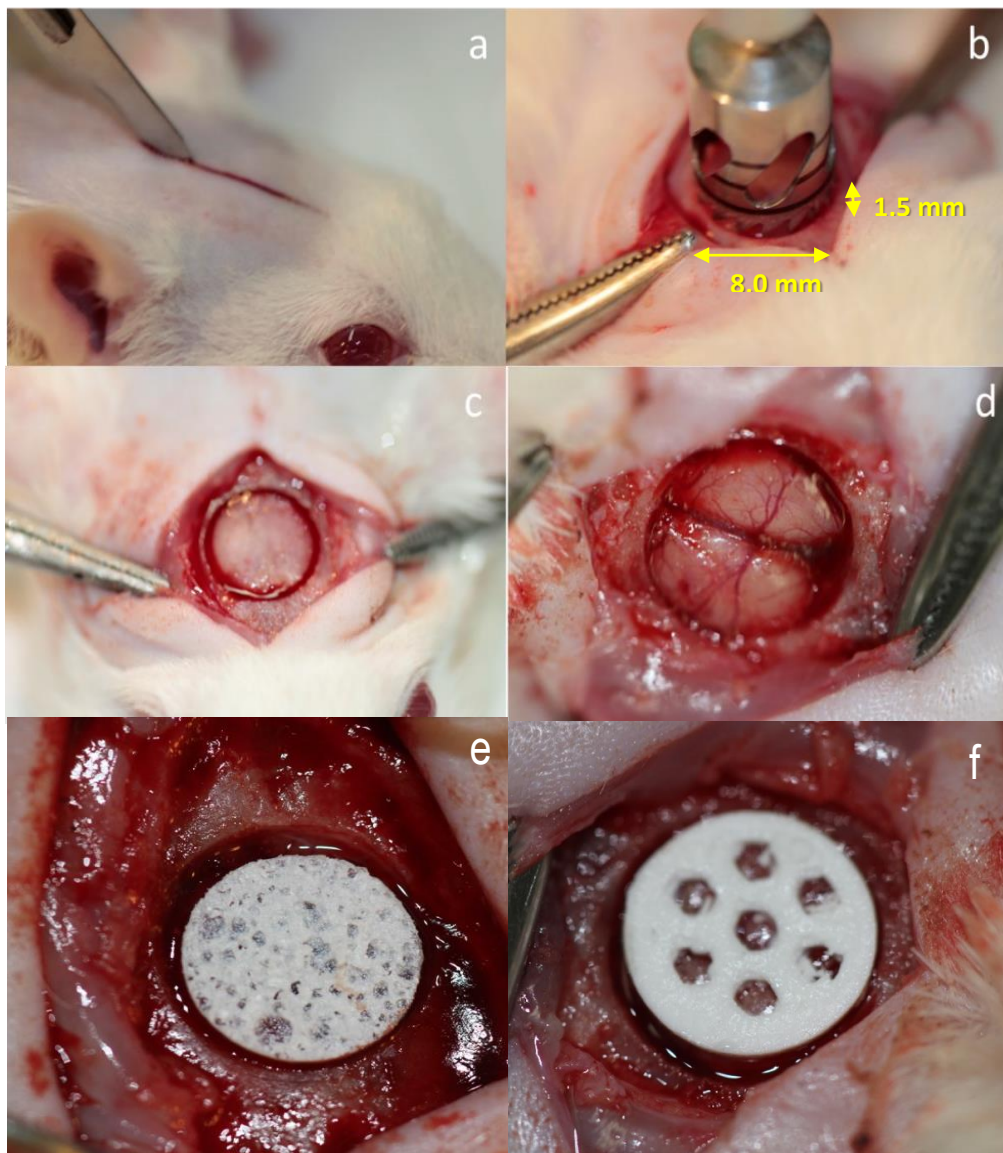
Fonte: Elaboração própria.

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,04 ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.), respectivamente. Posteriormente, os animais foram submetidos à tricotomia na região da calvária e foi realizada anti-sepsia do campo cirúrgico com gaze estéril, embebida em solução de clorexidina 2%, com o animal posicionado em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica.

O acesso cirúrgico à porção posterior da calvária foi obtido com uma incisão bicoronal cutânea e muscular, de aproximadamente 3cm de extensão (Figura 6a), permitindo a exposição do tecido ósseo, utilizando-se cabo para bisturi com lâmina intercambiável nº 15. Em seguida, os tecidos foram divulsionados com o auxílio de uma tesoura pequena de extremidade romba e uma pinça de dissecação, até a exposição do periósteo, sendo este incisado e removido com o mesmo tipo de lâmina até a exposição do tecido ósseo.

Para a confecção do defeito crítico ósseo circular, posicionado na porção mediana da calvária, imediatamente após o vértice da sutura posterior craniana do animal, de 8 mm de diâmetro e aproximadamente 1,5 mm de espessura (dada pela remoção total do tecido ósseo) foi utilizada uma fresa trefina de 8 mm de diâmetro externo (3i – 3i implantes do Brasil), montada em contra ângulo acoplado em motor para implante com 1500 rpm, sob irrigação constante com solução salina (Figuras 6 b, c). Todos os cuidados foram mantidos para evitar qualquer lesão à dura máter (Figura 6d).

Figura 6- Procedimento cirúrgico para a confecção dos defeitos críticos de 8mm na calvária dos ratos. a) incisão; b) trefina em posição; c) o defeito final de 8mm realizado; d) preservação da dura-máter; e) Scaffold de 30% HA/PLGA posicionado no defeito criado; f) scaffold 3D de 30% HA/PLA. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os grupos experimentais estabelecidos, os defeitos foram preenchidos pelo biomaterial BS e pelos scaffolds 3D 30%HA/PLA e 30%HA/PLGA, também, acomodados sobre a dura máter, com espátula nº 7 e pinça, preenchendo completamente o defeito, sem extravasamento. Nenhum material foi empregado no grupo controle (C) onde haverá apenas a permanência do coágulo sanguíneo. Após a obtenção de adequada hemostasia, a incisão foi fechada com fio de poliglactina reabsorvível 4-0 (Vicryl Ethicon, Johnson & Johnson) e procedeu-se com nova anti-sepsia com clorexidina 2%.

Apesar de possíveis efeitos adversos estarem previstos (edema, prurido, desconforto, calor), a monitoração constante e o ambiente controlado são medidas que visam diminuir o estresse dos animais, promover maior conforto e evitar sofrimento desnecessário do animal. Indicativos de anormalidade e/ou dor também foram observados.

Assim, ao final dos períodos correspondentes (T1, T2, T3, T4, T5) os animais foram eutanasiados por meio da aplicação de Thiopentax (tiopental, 0,16ml/100gramas de peso corporal; Cristália) por via intraperitoneal. As carcaças foram dispostas de acordo com as leis e normas vigentes.

4.4 Avaliação da Taxa de Reparo Ósseo

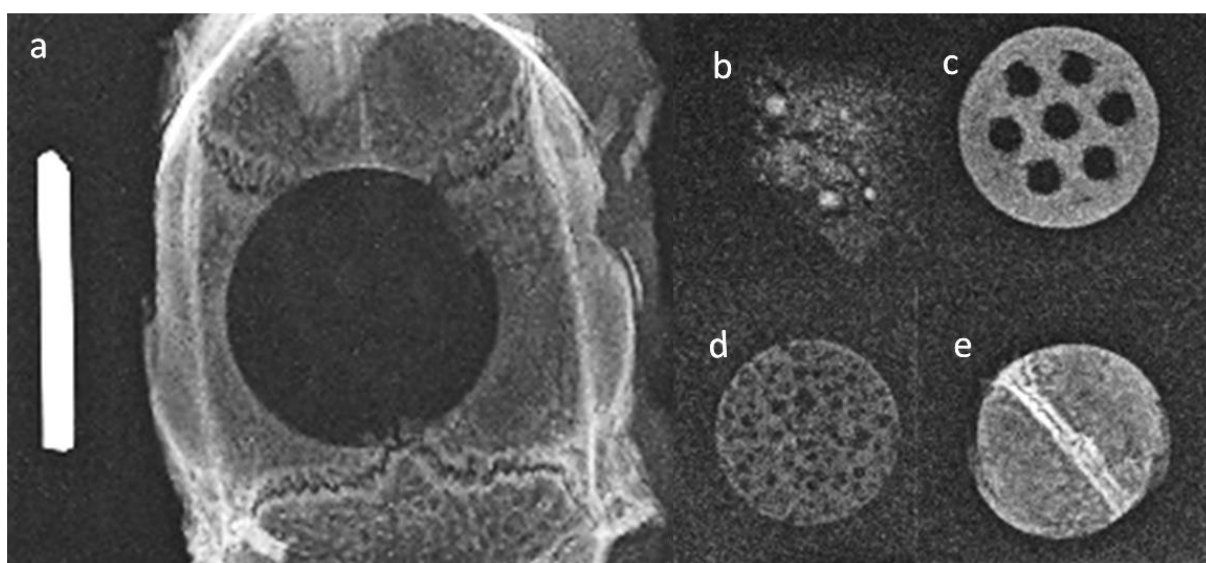
A taxa de reparo ósseo foi avaliada por duas metodologias independentes: redução da área do defeito mensurada a partir de radiografias (RX) e porcentagem de volume ósseo neoformado avaliada por microtomografia computadorizada com medidas repetidas (Micro CT).

4.4.1 Imagens de raios-X

Após a eutanásia dos animais, blocos da calvária contendo os enxertos foram removidos com margem de segurança de aproximadamente 2,0 cm. Estes blocos foram imediatamente radiografados e posteriormente processados para a análise histopatológica. Radiografias dos enxertos isoladas também foram obtidas para servir de referência durante a

seleção das áreas de interesse na mensuração do reparo. Todas as radiografias foram tomadas com um contraste metálico de 10 mm de comprimento para calibração das dimensões das imagens obtidas. A Figura 7 mostra as imagens do bloco ósseo com o defeito crítico (a), do BS (b), 30%HA/PLGA (c) 3D 30%HA/PLA (d) e osso da calvária (e).

Figura 7 – Imagens radiográficas dos a) defeito crítico confeccionado vazio, com a referência (10 mm) para padronização das medidas; b) BS; c) 3D 30% HA/PLA; d) 30% HA/PLGA e e) Fragmento ósseo circular removido. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

Para mensurar o fechamento do defeito, as imagens foram analisadas por meio do software Image J, em ambiente escuro, com calibração prévia de escala a cada imagem, de acordo com a referência presente na radiografia de 10 mm de comprimento (Figura 7a). Foram realizadas 3 medidas para cada imagem, circundando-se manualmente os defeitos com a ferramenta de seleção da área de interesse poligonal. Esta ferramenta permite a criação de formas livres, através de vários pontos. Além disso, buscou-se trabalhar com o contraste e o brilho da imagem alterados, para favorecer a visualização da radiopacidade das áreas que o osso foi realmente formado, evitando-se considerar áreas de fibrose como neoformação óssea. Assim, foi possível marcar de forma minuciosa a área relativa à formação óssea em cada tempo experimental expressa em mm^2 .

4.4.2 Microtomografia computadorizada (Micro-CT)

O emprego da microtomografia computadorizada de alta resolução (micro-CT) para avaliar o osso cortical e trabecular cresceu imensamente. Existem diversos sistemas comerciais disponíveis para tanto, e cada um utiliza diferentes dispositivos para a aquisição das imagens, avaliação e exposição dos dados. Desta maneira, numa tentativa de estabelecer um padrão os relatos de Bouxsein et al.¹⁰ (2010) foram usados como referência neste estudo, como um guideline para a padronização de terminologias, parâmetros e análise, para possibilitar posteriores comparações.

Para tal, os animais deste subgrupo T5 foram anestesiados e levados para escaneamento em microtomógrafo de alta resolução (SkyScan 1176 - SkyScan N.V., Kontich, Bélgica) imediatamente após a cirurgia (T0) e em cada um dos tempos estabelecidos (T14, T90 e T120 dias). Neste ponto vale a pena ressaltar que os mesmos animais foram escaneados ao longo do tempo, permitindo assim o acompanhamento real do desempenho de cada material implantado e a progressão do reparo do tecido ósseo lesionado cirurgicamente.

Antes de escanear os espécimes, uma verificação de calibração foi realizada utilizando osso sintético, água, ar e amostras. Os parâmetros de exposição foram de 70 kV e 140 mA. As imagens escaneadas foram analisadas e reconstruídas utilizando Software CT-Analyser (CTan, version 1.9.1.0. © SkyScan) e um algoritmo de feixe de cone modificado com 0,027 mm X 0,027 mm X 0,027 mm de espaçamento de voxel isotrópico (Feldkamp et al., 1984). A região de interesse de cada amostra (ROI) foi selecionada com a espessura de 30 camadas e com um diâmetro total de 8,54mm (pois deve-se considerar a espessura da trefina empregada que apresenta diâmetro interno de 8mm). Então, o conjunto de imagens e camadas selecionados, na forma cilíndrica permitiu a quantificação do tecido ósseo neoformado de acordo com a área de interesse, segundo os seguintes parâmetros: volume tecidual (VT), volume ósseo (VO), fração de volume ósseo (FVO) obtida pela razão VO/VT. A imagem

reconstruída em três dimensões (3D) foi, em seguida, traçada circundando as margens do defeito original, sendo os modelos melhor observados no software CT-Volume (CTVol).

Cada dado foi obtido em triplicata, de acordo com os parâmetros acima mencionados, organizados em tabelas no software Excel (Microsoft, 2010) para permitir a análise estatística.

4.5 Análise Histológica

Após a confirmação da morte do animal, uma incisão bi coronal foi realizada para remover em bloco a porção superior da calvária, incluindo os tecidos conjuntivo e ósseo, utilizando tesouras e alicates de corte. O processamento histológico deu-se conforme descrito na normativa ISO 10993:6⁴¹, que padroniza as análises para os efeitos locais após implantação.

Os blocos obtidos foram identificados e fixados em formol a 10%, por aproximadamente 10 dias, para posterior processamento laboratorial padronizado. Foi realizada a microtomia semi-seriada de 6µm de espessura para a obtenção dos cortes, sendo estes corados pelas técnicas: a) Hematoxilina-Eosina (H&E), que permitiu a observação da morfologia celular; b) Tricrômico de Masson (TM), para verificar a rede de colágeno e c) Picro-Sirius Red (PS), para evidenciar a maturação óssea.

Cada lâmina foi confeccionada com cinco cortes e aderida em estufa à 64°C por 2 horas. Os cortes foram analisados histologicamente e fotomicrografados por microscópio de luz Jenaval (Carl Zeiss – Jena). A análise histológica deu-se de maneira descritiva sendo que pesquisadores previamente calibrados observaram os seguintes aspectos da reação tecidual:

- **TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO:** presença de tecido jovem neoformado na área do defeito, principalmente nas margens;
- **REMANESCENTE DE BIOMATERIAL:** presença de partículas de biomaterial no interior do defeito denotando a taxa de reabsorção;

- **NEOVASCULARIZAÇÃO:** presença de capilares sanguíneos ao redor do biomaterial e no interior do defeito;
- **TECIDO CONJUNTIVO:** presença de tecido conjuntivo no interior do defeito
- **CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS:** presença de células formadoras de tecido ósseo como osteoblastos, osteócitos e de células remodeladoras, como os osteoclastos.

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas serão realizadas utilizando-se o software SPSS V19.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA), considerando-se uma probabilidade de erro tipo I (α) de 0,05.

No que tange a avaliação por meio de raios-x, o efeito do material utilizado e o tempo de cicatrização do defeito ósseo foram analisados por ANOVA two-way, abrangendo tanto o efeito destas variáveis principais como também o efeito da interação material*tempo, uma vez que o processo de reparo/cicatrização é dependente dessas duas variáveis.

Inicialmente, os dados foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade das variâncias, para que a ANOVA pudesse ser aplicada. Os testes de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e Levene ($p > 0,05$) confirmaram estes pressupostos. Essa avaliação foi complementada por testes de comparações múltiplas com correção de Bonferroni.

Os dados de micro-CT foram analisados por ANOVA de medidas repetidas após confirmação dos pressupostos. Essa avaliação foi complementada por testes de comparações múltiplas com correção de Bonferroni.

5 RESULTADOS

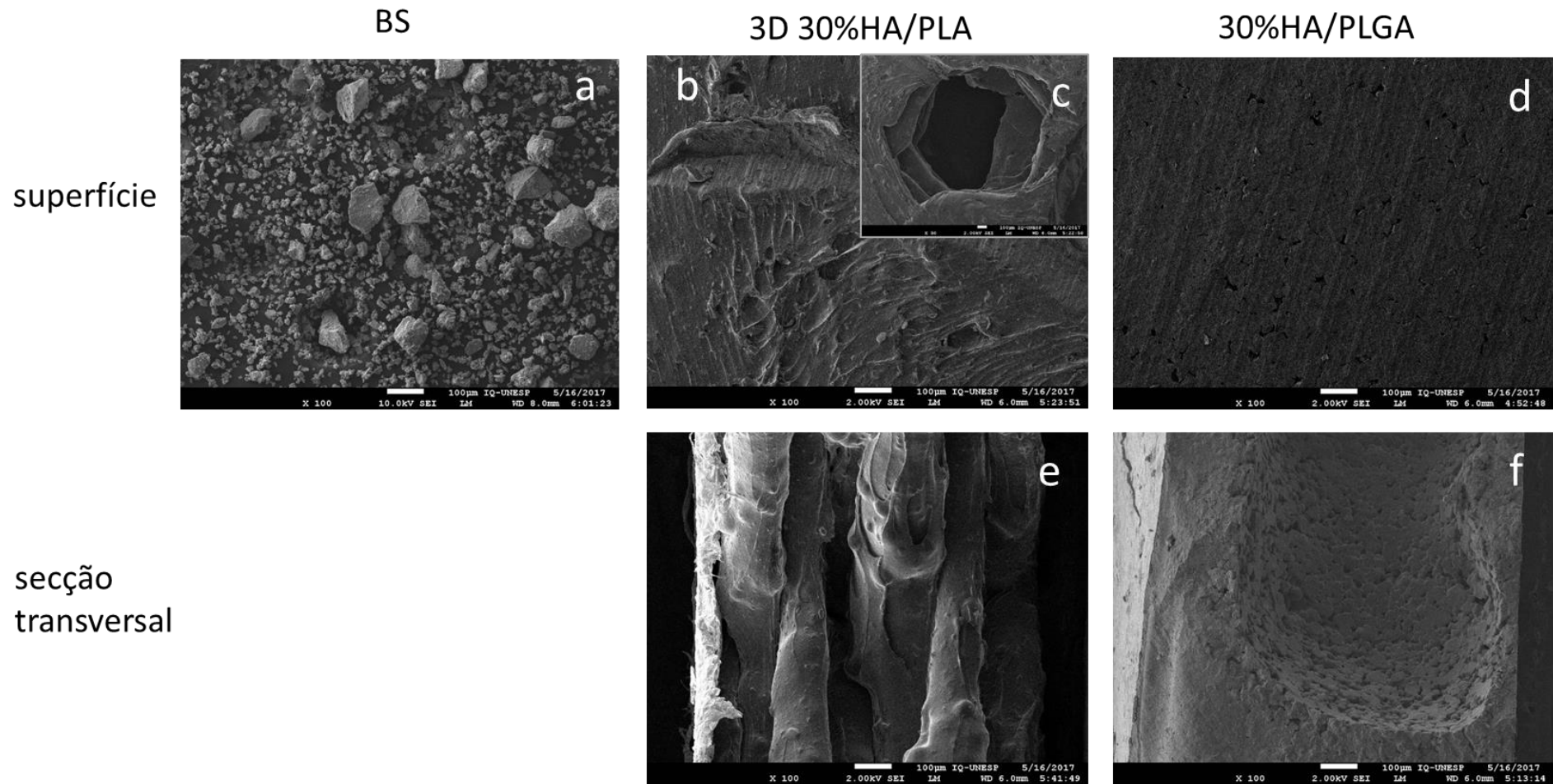
5.1 Caracterização Físico-Química

5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação empregando a técnica de MEV evidencia a arquitetura dos diferentes materiais empregados neste estudo. As imagens resultantes da avaliação morfológica dos biomateriais feitas por MEV estão apresentadas nas Figuras 8, 9 e 10.

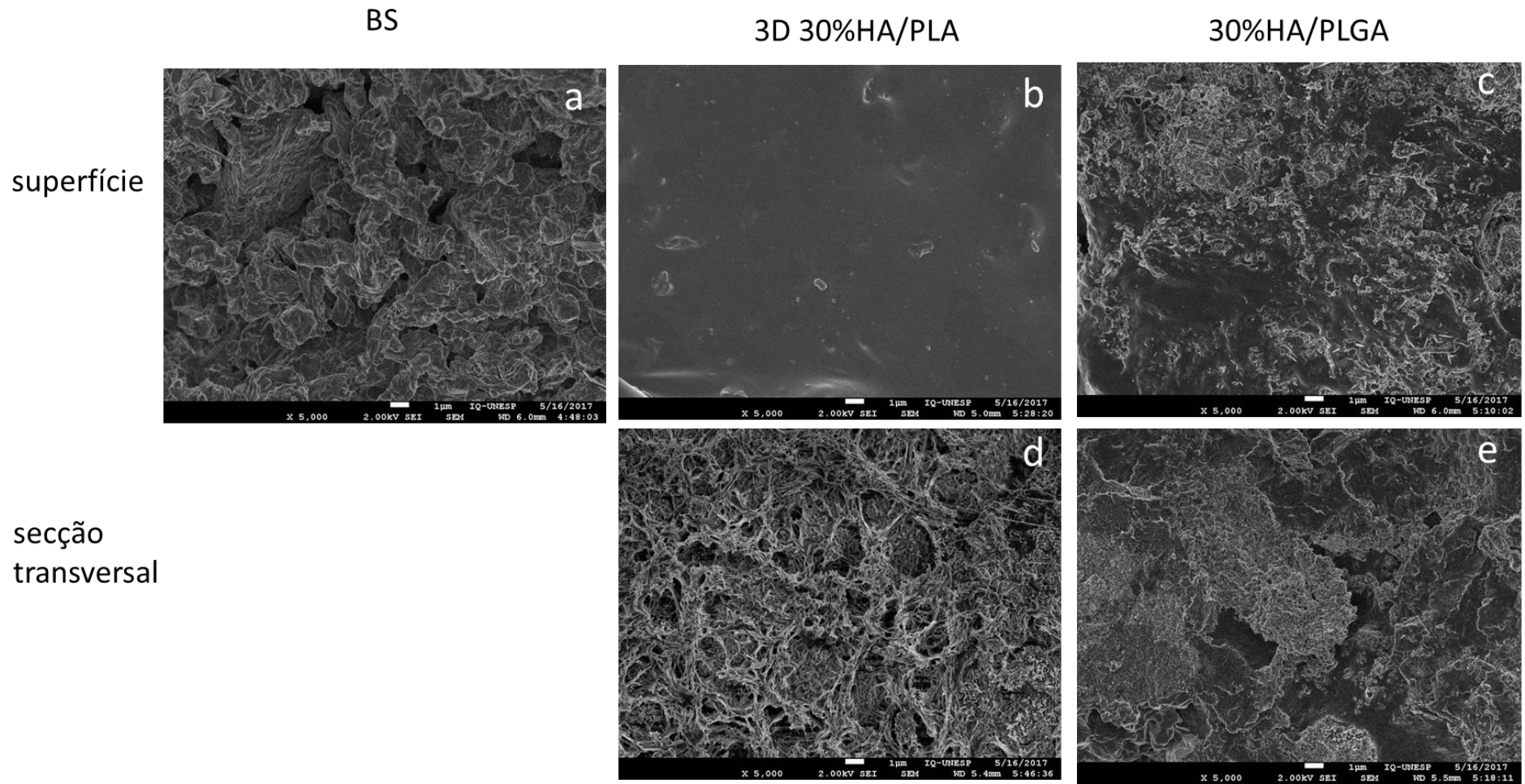
Na Figura 8a no aumento de 100x, podemos observar em relação ao biomaterial BS, partículas não homogêneas, de diversos tamanhos. A imagem do compósito 3D 30%HA/PLA, tanto da superfície quanto da secção transversal (Figura 8 b, c e e) evidenciaram a deposição de camadas característica do processo de fabricação da manufatura aditiva. Em relação ao compósito 30% HA/PLGA, este apresentou uma superfície e secção transversal mais regular (Figura 8 d e f).

Figura 8 – Apresentação das imagens obtidas por meio de MEV no aumento 100x, relativos a cada material, agrupados em superfície e secção transversal. A letra c, no detalhe, está no aumento de 50x para melhor visualizar a imagem do poro do scaffold 3D 30%HA/PLA. Araraquara, 2017.



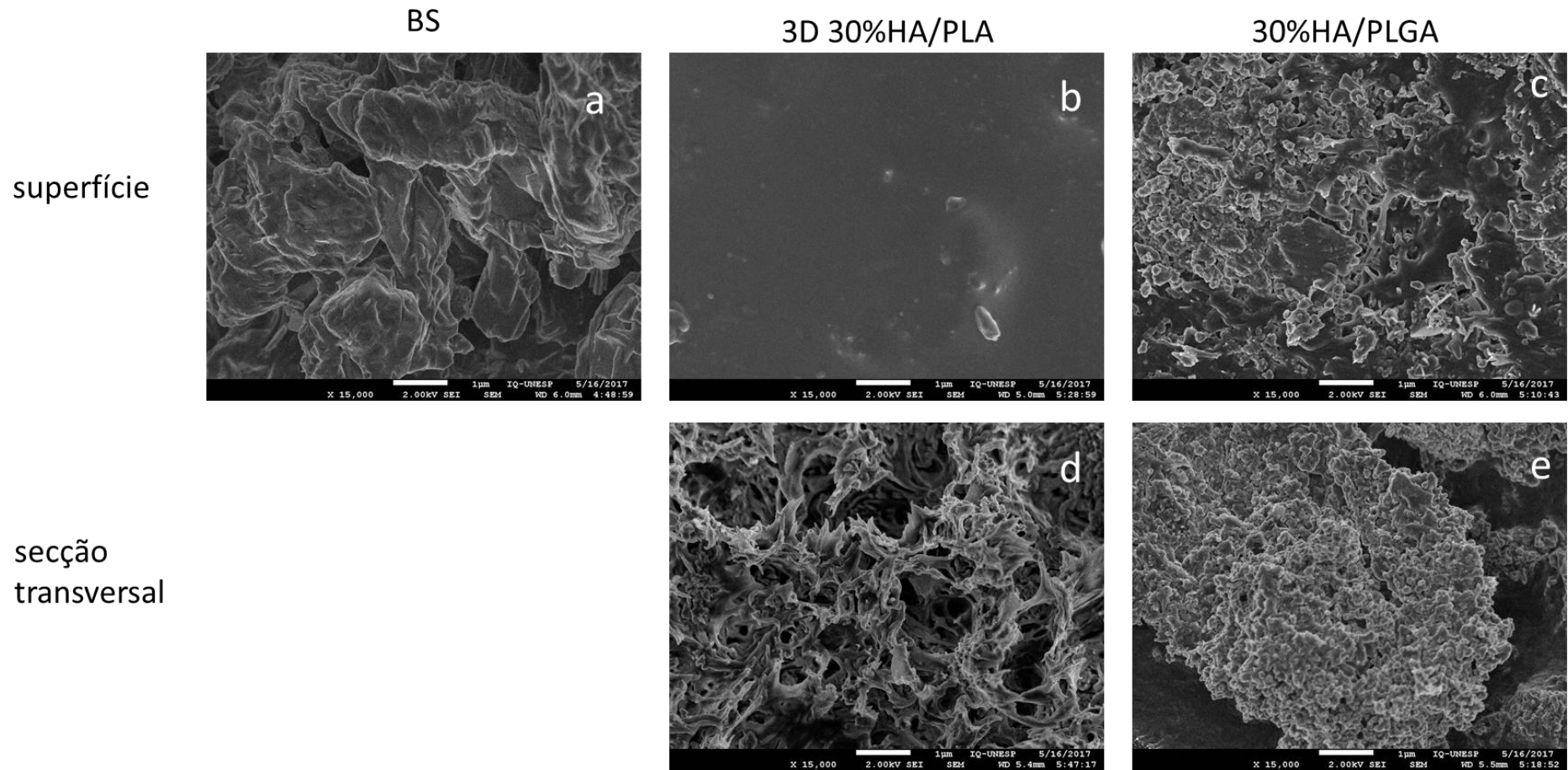
Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Apresentação das imagens obtidas por meio de MEV no aumento 5000x, relativos a cada material, agrupados em superfície e secção transversal. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 – Apresentação das imagens obtidas por meio de MEV no aumento 15000x, relativos a cada material, agrupados em superfície e secção transversal. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

Em maiores aumentos (Figuras 9 e 10), podemos observar em relação ao BS uma arquitetura bem irregular, na forma de ângulos com arestas bem pronunciadas.

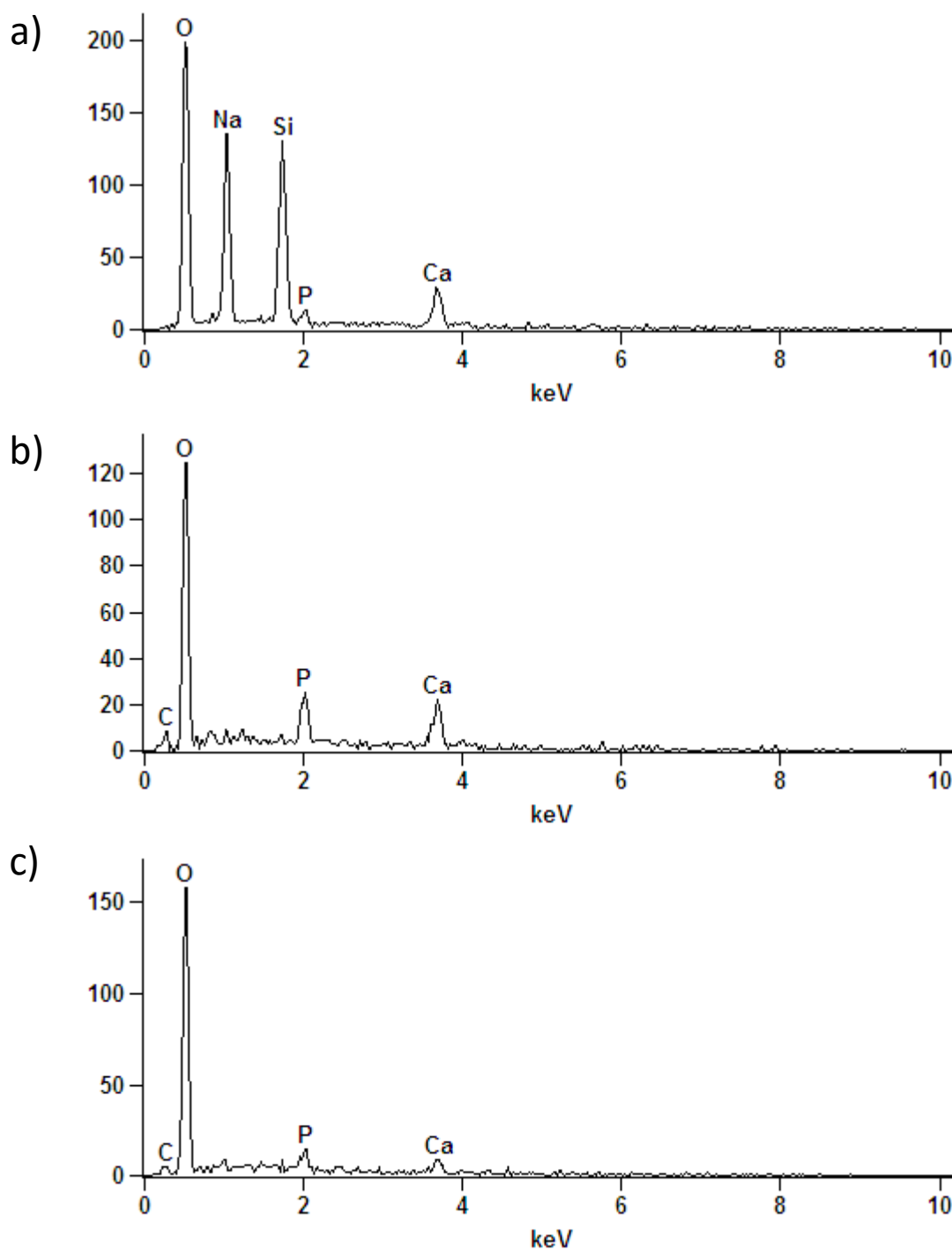
O compósito 3D 30% HA/PLA apresentou uma superfície mais lisa e homogênea, cuja característica pode ter sido influenciada pelo processo de extrusão em altas temperaturas o que pode favorecer a formação de uma camada de aspecto vítreo, também chamada de “glass melting” (Figuras 9 b e 10b). Por outro lado, as imagens da secção transversal mostram a arquitetura interna do scaffold, sendo esta mais porosa, bem diferente da morfologia da superfície do material (Figuras 9d e 10d).

Em relação ao scaffold 30%HA/PLGA, os maiores aumentos possibilitaram a visualização da fase orgânica e inorgânica apresentando a forma de grumos, ou “clusters”, dificultando a característica de porosidade. Geralmente, a fase inorgânica possui um brilho mais intenso, o que permite discernir entre a fase orgânica.

5.1.2 Espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDS)

Os resultados estão demonstrados abaixo, na Figura 11.

Figura 11 - Avaliação da técnica de caracterização por Espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDS): (a) BS, (b) 3D 30% HA/PLA e (c) 30% HA/PLGA.



Fonte: Elaboração própria.

É possível observar nas Figura 11 (b e c) a composição dos materiais, de forma simplificada, onde o Carbono (C) e o oxigênio (O) representam os principais constituintes presentes nos compósitos PLGA e PLA, em concordância com a fórmula dos polímeros apresentada na introdução. A presença de cálcio (Ca) e fósforo (P), confirmam a incorporação de hidroxiapatita (HA) nos compósitos.

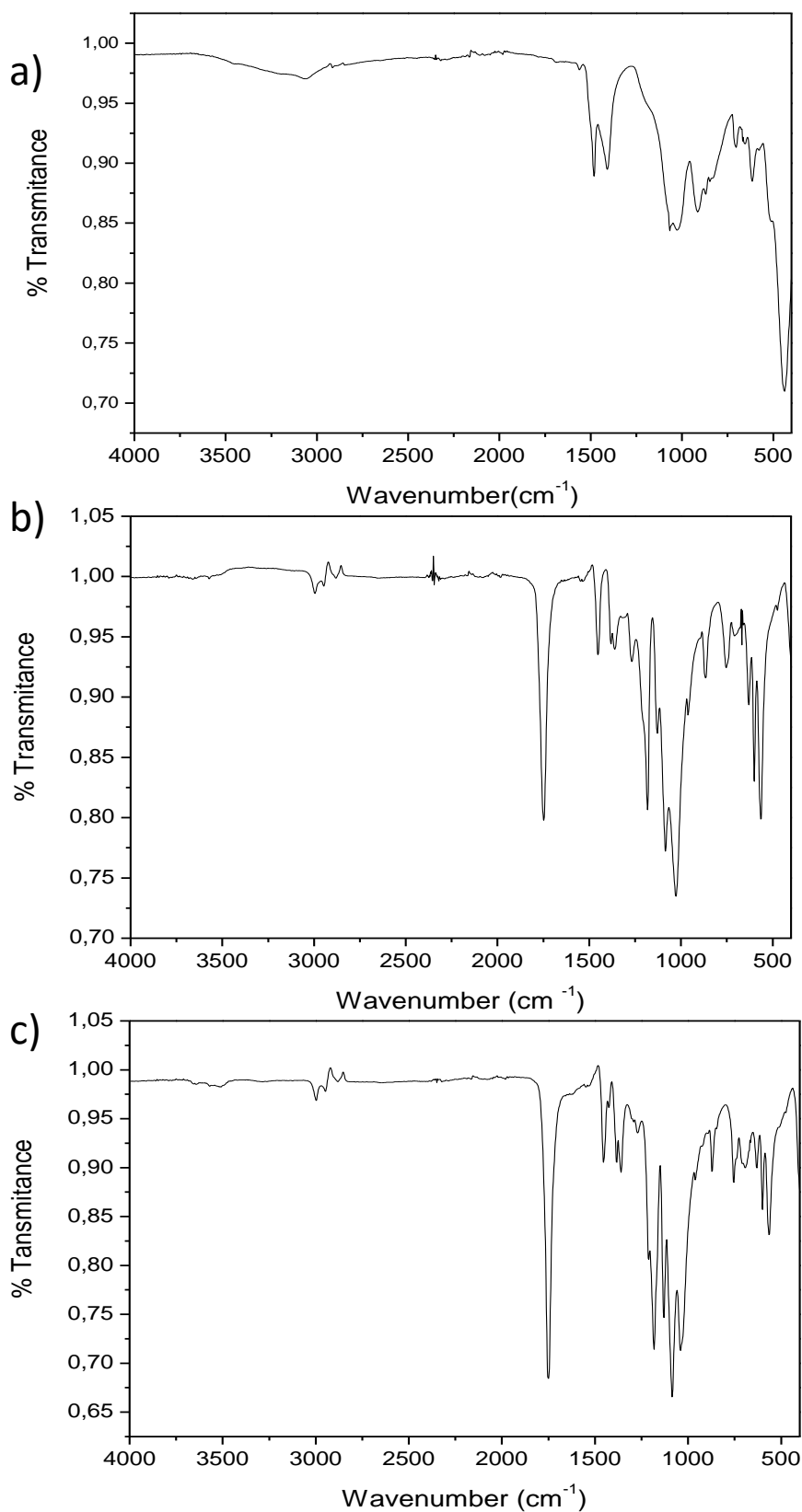
Em relação ao BS (Figura 11a) também é possível notar a presença de cálcio (Ca) e fósforo (P) e adicionalmente, sódio (Na) e sílica (Si), o que corrobora com o perfil da composição da vitrocerâmica no sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, conforme descrito em Ravagnani⁷⁹, 2003.

5.1.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR)

Os resultados relacionados aos espectros FT-IR para os materiais estão demonstrados na Figura 12.

Pode-se observar os picos de HA (Figura 12 b, c), que estão presentes nas regiões das bandas 3450 cm^{-1} (OH^-), 1995 cm^{-1} (Ca^{2+}), 1397 cm^{-1} (CO_3^{2-}) e $1035, 969$ e 599 cm^{-1} para (PO_4^{3-}), o que evidencia a formação dos compósitos (3D 30% HA/ PLA e 30% HA/ PLGA). Em relação ao BS (Figura 12a), as bandas $1035, 969$ e 599 cm^{-1} para (PO_4^{3-}) e 1995 cm^{-1} (Ca^{2+}) estão presentes, caracterizando o composto como uma biocerâmica.

Figura 12 - Espectro FT-IR: (a) BS; (b) 3D 30%HA/PLA e (c) 30% HA/PLGA. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria

5.2 Avaliação da Taxa de Reparo Ósseo

5.2.1 Imagens de raios-X

Os resultados relativos à técnica de avaliação de imagem por meio de raios-x estão apresentadas na Figura 13. Apenas uma imagem por material foi eleita para representar o período, apesar de terem sido realizadas mensurações em todas as imagens, em triplicata, de acordo com o mencionado na seção 4.4 do tópico material e método.

Observando as imagens, foi possível notar que houve um fechamento do defeito progressivo em relação a todos os materiais usados, sendo que este fechamento deu-se das bordas para o centro, de uma forma geral. Por outro lado, o BS apresentou um padrão diferente no fechamento, mas com vários pontos dispersos de calcificações, não necessariamente das bordas para o centro. Adicionalmente, em relação ao 3D 30% HA/PLA, este apresentou núcleos de calcificação dentro dos poros dos scaffolds, como é possível identificar na Figura 13, a partir dos 30 dias. Além disso, as imagens evidenciaram um certo grau de degradação do material, ao se comparar as iniciais de referência (7 dias) e ao final do período de observação (120 dias).

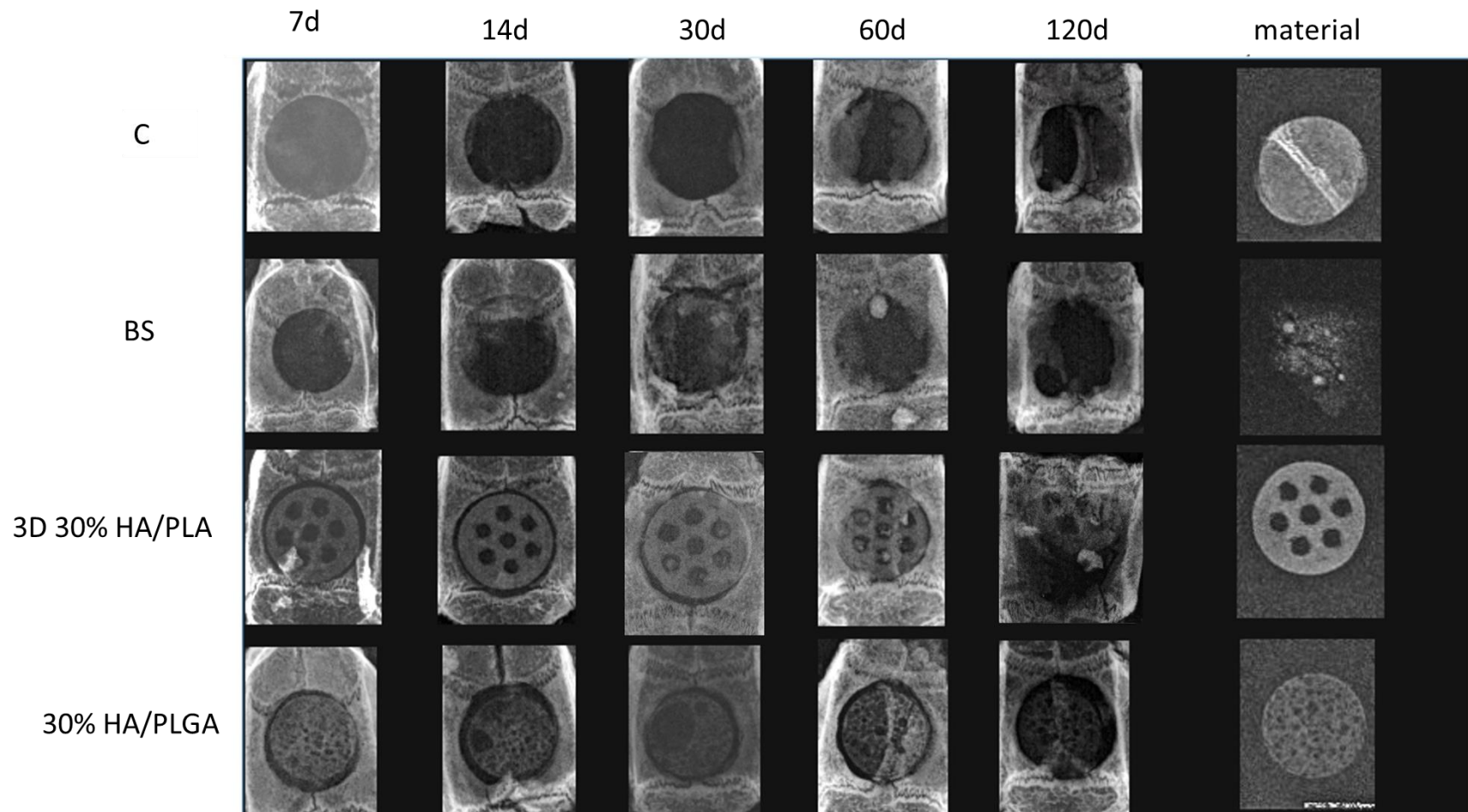
Os valores das médias de redução da área do defeito crítico e os desvios padrão (dp) para as interações material e tempo estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Média e dp da redução da área do defeito crítico em função de materiais e tempo de reparo/cicatrização, segundo a análise das imagens de Raios – X, em mm². Araraquara, 2017.

Tempo	C		BS		3D 30% HA/PLA		30% HA/PLGA	
	Média	dp	Média	dp	Média	dp	Média	dp
T7	67.00	1.53	68.89	2.44	67.82	3.34	68.56	4.61
T14	70.31	3.44	65.67	4.19	66.40	3.14	64.32	2.79
T30	58.36	4.32	62.57	3.51	49.62	3.89	56.84	2.48
T60	54.72	7.27	60.84	4.20	43.44	6.26	57.21	3.43
T120	53.70	4.37	48.96	4.28	35.80	5.38	46.85	4.20

Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 – Apresentação das imagens obtidas pela técnica de raios-x, representando a evolução do fechamento do defeito de acordo com os períodos de estudo. A radiopacidade de cada material está representada como referência bem como a imagem do fragmento ósseo removido na cirurgia. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria

Inicialmente, os dados foram testados para confirmar se atendiam aos pré requisitos para aplicação do teste de ANOVA, ou seja, se tinham distribuição normal e homocedasticidade de variâncias. O resultado dos testes de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e Levene ($p > 0,05$) confirmaram estes pressupostos.

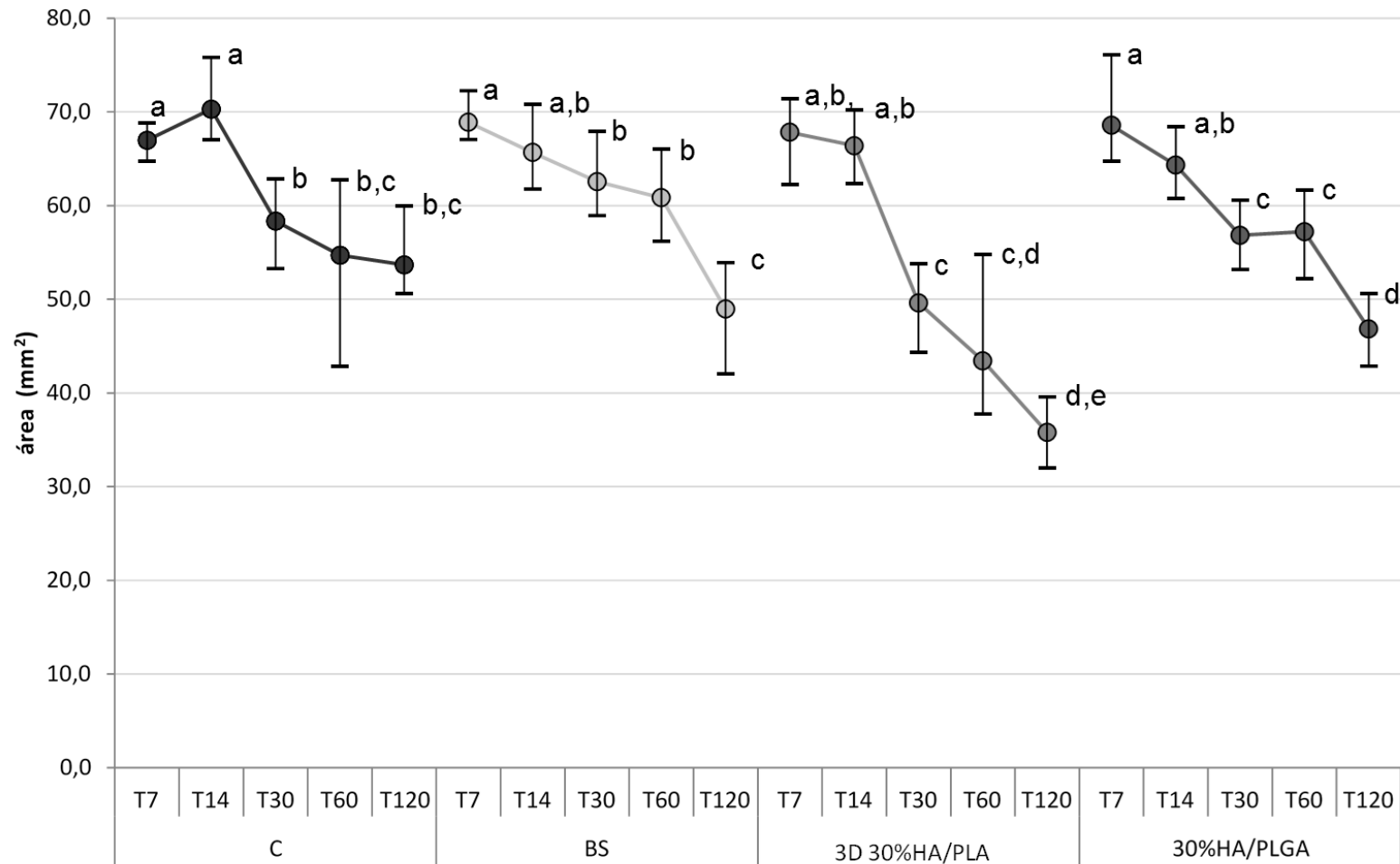
O teste de ANOVA two-way demonstrou diferença estatisticamente significativas entre a interação material*tempo ($p = 0,000$; $\eta^2_p = 0,42$ e $\pi = 1,00$). A análise das variáveis principais também indicou diferenças estatisticamente significativas entre os materiais ($p = 0,000$; $\eta^2_p = 0,43$ e $\pi = 1,00$) e tempos ($p = 0,000$; $\eta^2_p = 0,80$ e $\pi = 1,00$).

De acordo com o valor de eta quadrado parcial (η^2_p), os efeitos da interação e dos materiais podem ser considerados de dimensão elevada ($\geq 0,25$ a $0,50$), enquanto o tempo de reparo tem dimensão muito elevada ($> 0,5$) sobre os resultados.

Como o efeito da interação foi estatisticamente significativo e o efeito sobre o reparo ósseo não pode ser explicado totalmente por nenhuma das variáveis principais isoladamente, decidiu-se por reorganizar os dados associando os materiais aos tempos de reparo. Os vinte pares de material/tempo assim organizados foram submetidos ao teste de ANOVA one way seguido pelo teste de comparações múltiplas com correção de Bonferroni, a fim de identificar quais condições efetivamente influenciaram o reparo tecidual. O resultado desta análise pode ser visto na Figura 14.

De modo geral, todos os materiais apresentaram uma redução da área do defeito. O BS parece se comportar de maneira semelhante ao grupo C, apresentando uma área final de $48,96 \text{ mm}^2$. O compósito 30%HA/PLGA apresentou um comportamento diferente do grupo C, mas semelhante ao tratamento BS e 3D 30%HA/PLA, sendo que este demonstrou ser estatisticamente diferente dos demais, apresentando a maior redução da área do defeito (de $67,82$ para $35,80 \text{ mm}^2$).

Figura 14 - Efeito de materiais e tempo de reparo, expresso pela média e intervalo de confiança (IC 95%) da redução da área de defeito crítico realizada em cárvia de ratos, mensurada a partir de dados obtidos pela avaliação de radiografias (RX). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de comparações múltiplas com correção de Bonferroni para $p < 0,05$. Araraquara, 2017.

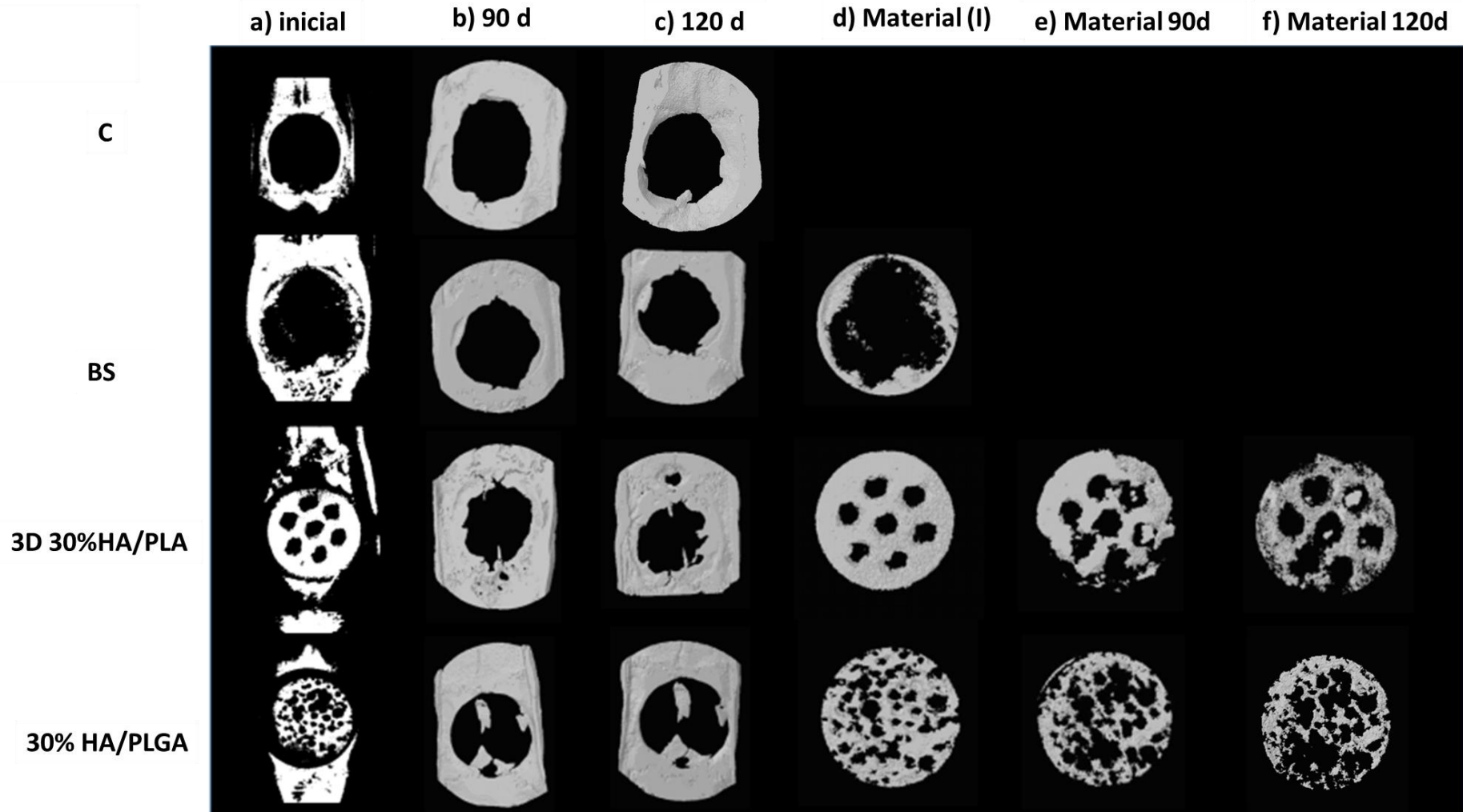


Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Micro-CT

O uso de micro-ct, no entanto, permite a realização de imagens in vivo, o que leva a uma maior precisão na determinação do tamanho do defeito, na quantificação (volume) e na qualidade (densidade, micromorfologia) do osso neoformado. Tais medidas quantificáveis permitem que cada pesquisador crie um modelo de defeito cirúrgico que se assemelhe mais à sua área de interesse clínico. As imagens resultantes da avaliação dos animais por meio de micro-ct estão resumidas na Figura 15. As imagens são relativas ao acompanhamento do mesmo animal para ilustrar a progressão do crescimento ósseo, por material e período avaliativo.

Figura 15 - Imagens reconstruídas em 3D através do software CTvol, demonstrando a) imediatamente após a cirurgia, sendo a referência inicial; b) progressão do crescimento ósseo em 90 dias; c) em 120 dias. A progressão da degradação do material está representada por d) referência inicial do material logo após ser implantado; e) após 90 dias de implantação e f) após 120 dias. Não foram representadas as imagens referentes aos 14 dias por haver pouca diferença visível na imagem em relação ao período inicial.



Fonte: Elaboração própria

Em relação ao volume de osso neoformado (FVO), os resultados estão demonstrados na Tabela 2 e Figura 16.

Tabela 2 – Apresentação da média e desvio padrão (dp) do FVO, registrados nas medidas repetidas de micro-ct em função da interação tratamento*tempo de avaliação, expressos em porcentagem (%). Araraquara, 2017.

Tratamento	T0		T14		T90		T120	
	Média	dp	Média	dp	Média	dp	Média	dp
C	0.38	0.28	3.39	1.28	5.30	2.48	5.46	1.50
BS	1.71	0.42	4.71	1.56	5.40	2.29	6.08	2.80
3D 30%HA/PLA	0.24	0.20	8.63	0.89	13.75	0.72	15.83	1.21
30% HA/PLGA	0.51	0.27	11.04	2.03	11.52	2.00	13.71	2.70

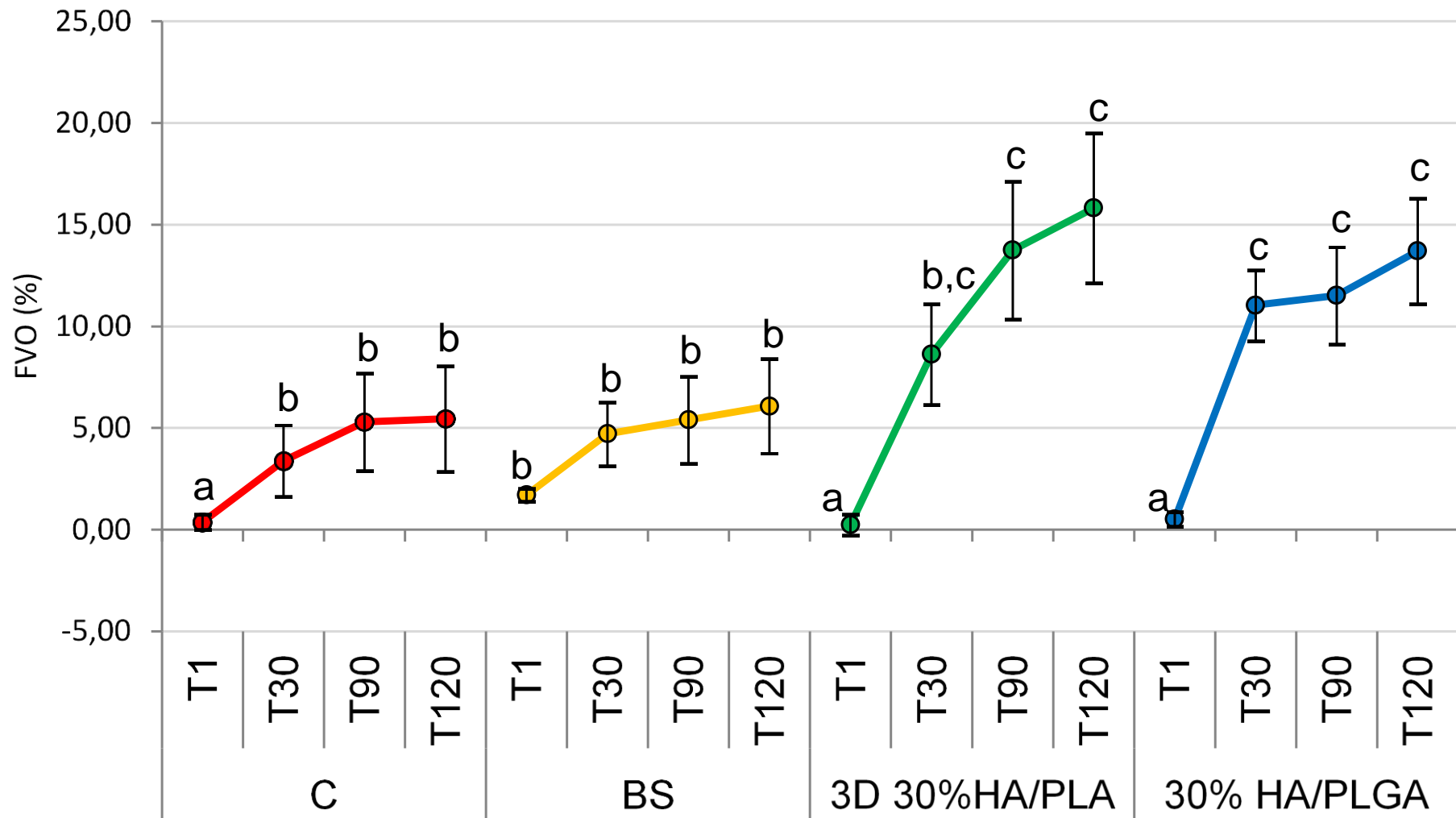
Fonte: Elaboração própria.

Segundo a análise estatística, os dados apresentaram normalidade e homocedasticidade, o que permitiu a aplicação da ANOVA de medidas repetidas.

O teste de ANOVA de medidas repetidas evidenciou diferenças estatisticamente significativas para a interação tratamento*tempo de avaliação ($p=0,000$; $\eta^2_p = 0,73$; $\pi = 1,00$), e para os fatores principais tratamento ($p=0,000$; $\eta^2_p = 0,85$; $\pi = 1,00$) e tempo ($p=0,000$; $\eta^2_p = 0,91$; $\pi = 1,00$). Sendo que, todos apresentaram efeitos de dimensões muito elevadas ($\eta^2_p > 0,5$), ou seja, tanto o fator tempo quanto o tratamento influenciaram no reparo do tecido.

Como o efeito da interação foi estatisticamente significativo e o efeito sobre o reparo ósseo não pode ser explicado totalmente por nenhuma das variáveis principais isoladamente, decidiu-se por reorganizar os dados associando os materiais aos tempos de reparo. Os vinte pares de material/tempo assim organizados foram submetidos ao teste de ANOVA one way seguido pelo teste de comparações múltiplas com correção de Bonferroni, a fim de identificar quais condições efetivamente influenciaram o reparo tecidual. O resultado desta análise pode ser visto na Figura 16.

Figura 16 – Efeito de materiais e tempo de reparo expresso pela média e dp da Fração de Volume Ósseo (FVO %), de acordo com os períodos experimentais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de comparações múltiplas com correção de Bonferroni para $\alpha=0,05$. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria

A Figura 16 evidencia que os tratamentos 3D 30%HA/PLA e 30%HA/PLGA aos 120 dias atingiram um índice FVO em 15,83% e 13,71%, respectivamente, apresentando comportamento bem semelhante entre si, sendo estatisticamente superiores ao BS, que se comportou semelhante ao grupo C, cujos valores de FVO foram 5,46% e 6,08%.

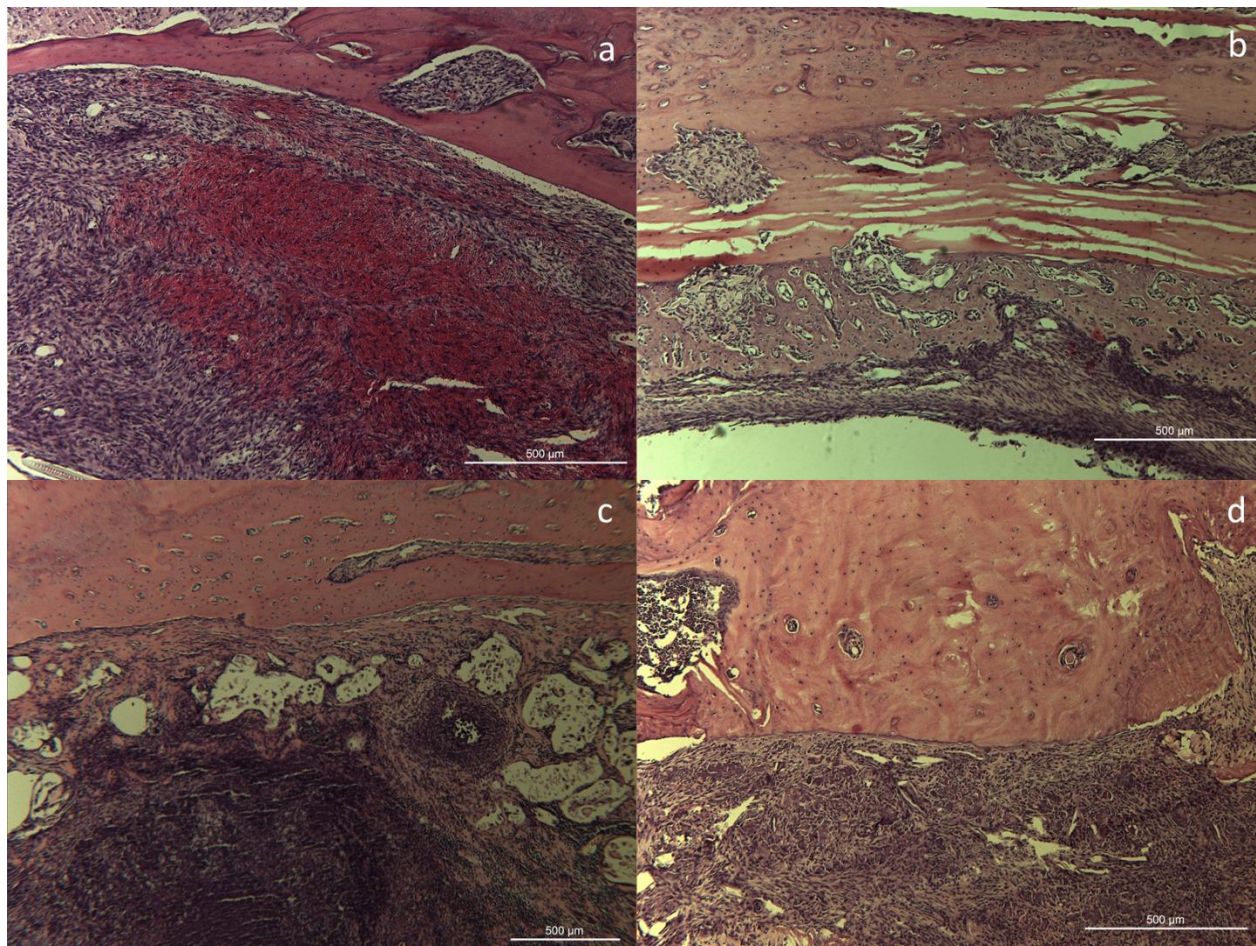
5.3 Análise Histológica

Os achados histológicos evidenciaram o reparo gradual dos tecidos na aplicação dos diferentes biomateriais, bem como a redução do processo inflamatório em todas as análises, em detrimento do período de avaliação. Um processo parcial de mineralização é observado em todos os defeitos ósseos relativo a todos os materiais utilizados.

Os resultados histológicos foram divididos pelos períodos de análise para facilitar o entendimento dos achados. Assim, será inicialmente apresentado um comparativo dos diferentes materiais, agrupados pelo período experimental em questão. Em seguida, cada material será detalhado por diferentes cortes histológicos, nas colorações mencionadas na seção 4.5 do Material e Método.

5.3.1 Tempo: 7 dias

Figura 17 – Imagens ilustrativas comparando-se o aspecto tecidual relativo ao período de 7 dias para os grupos: a) C; b) BS; c) 3D 30% HA/PLA e d) e 30%HA/PLGA. Coloração H&E. Araraquara, 2017.

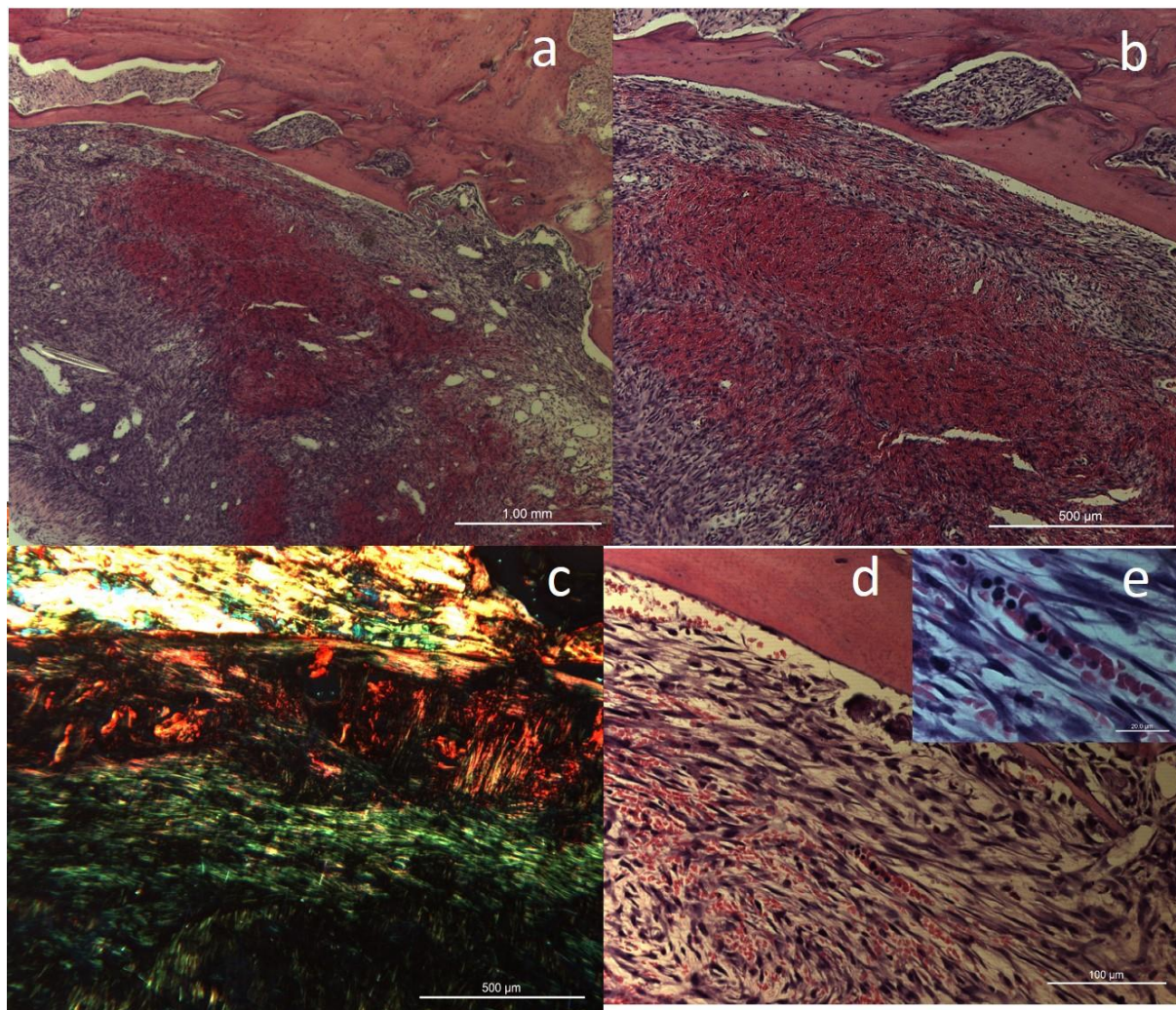


Fonte: Elaboração própria.

A Figura 17 permite comparar os resultados relativos ao período de análise 7 dias, para cada material. Observa-se a presença de um grande infiltrado inflamatório no grupo C cujo padrão inflamatório não foi evidenciado nos demais grupos, sendo apenas possível identificar um tecido de granulação sendo formado, inicialmente.

I) 7 dias grupo C

Figura 18 - Cortes histológicos relativos aos 7 dias. Em a, b e d, coloração H&E; c) coloração PS e e) coloração TM. Araraquara, 2017.

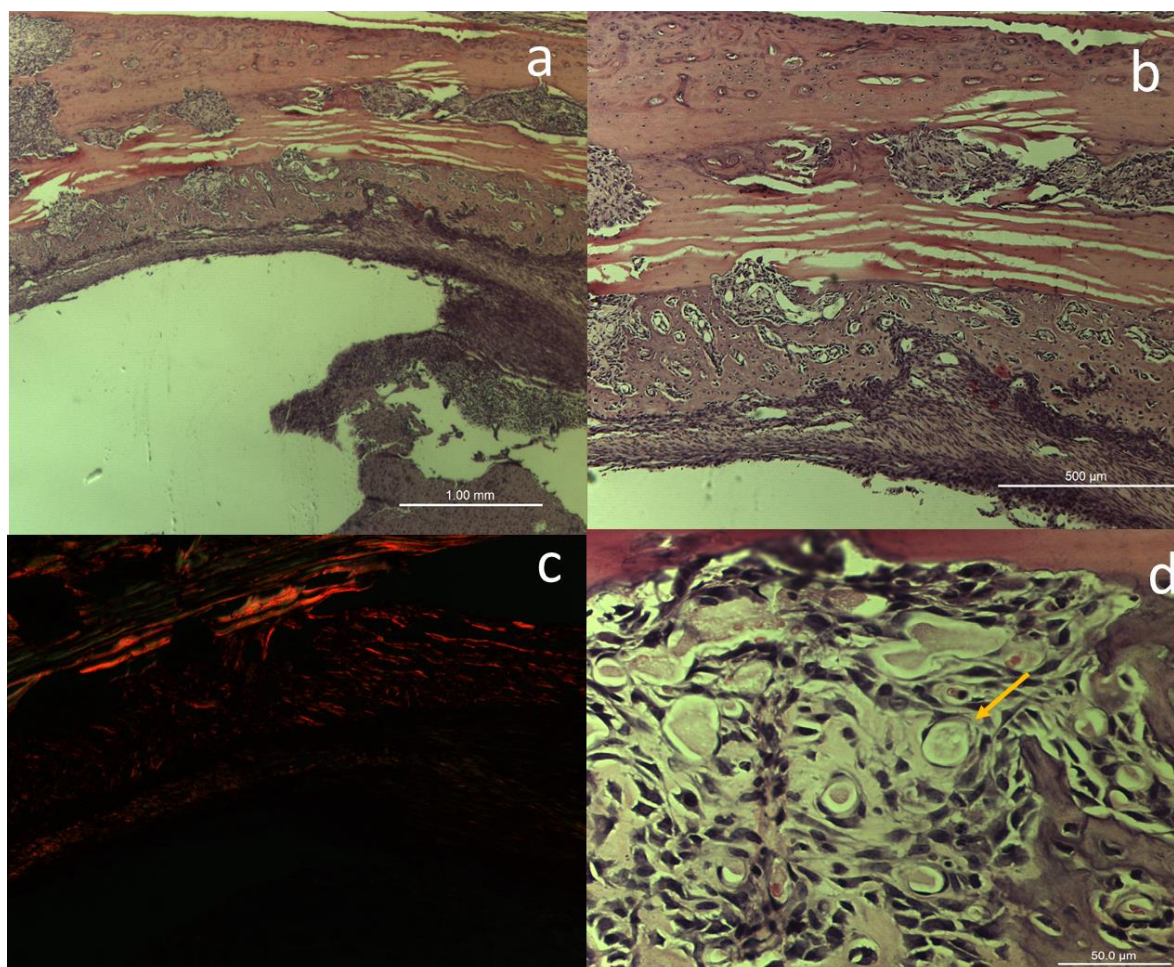


Fonte: Elaboração própria.

Os cortes longitudinais ilustram um grande exudato inflamatório com presença de hemorragia, e grande infiltrado inflamatório. Na Figura 18c percebe-se nitidamente a interface entre o leito cirúrgico com grande anisotropia do colágeno, a porção intermediária com fibras desorganizadas representado pela coloração vermelha, e a camada mais central evidenciando o exudato com ausência de anisotropia.

II) 7 dias grupo BS

Figura 19 - Cortes histológicos relativos aos 7 dias BS. Em a), b) e d) coloração H&E; c) coloração PS. Araraquara, 2017.

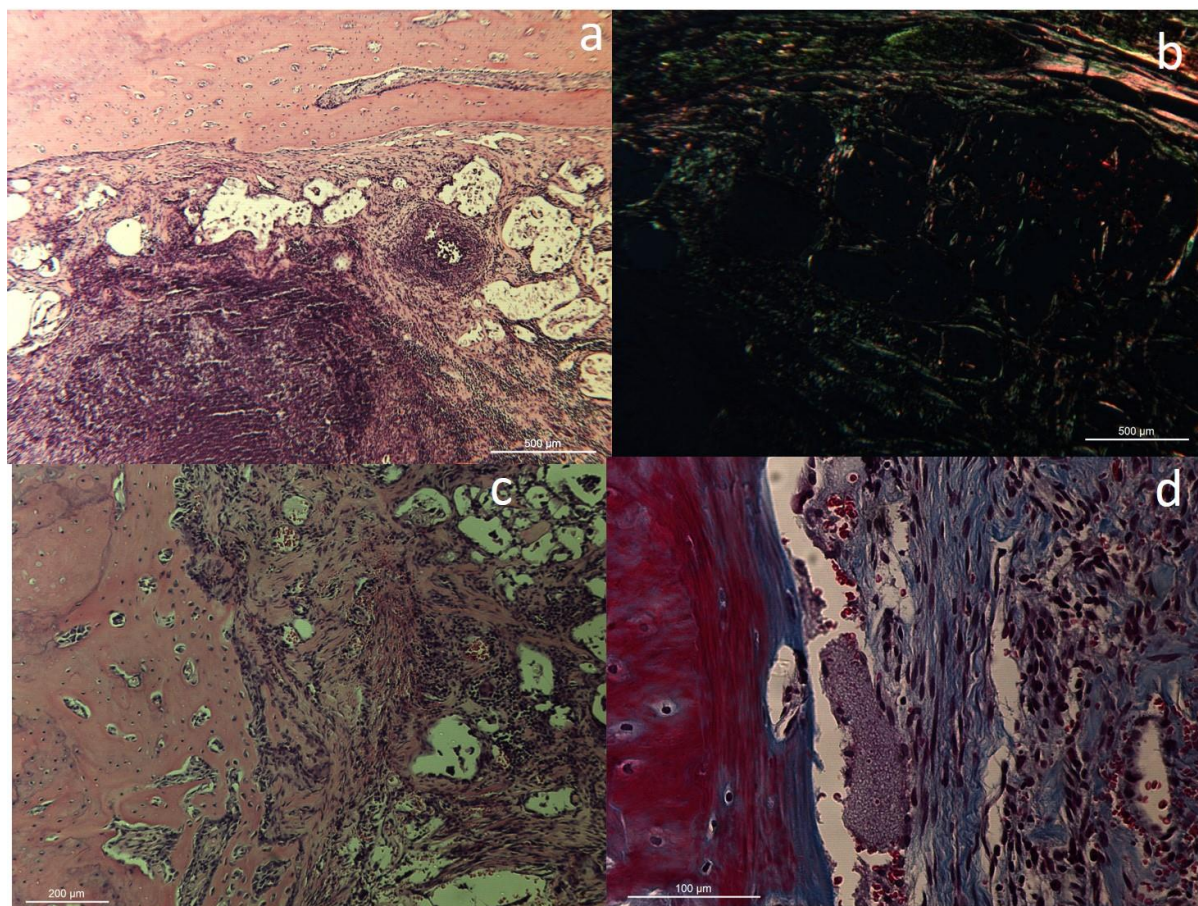


Fonte: Elaboração Própria.

Nas figuras pode-se visualizar a borda da lesão juntamente com o centro apresentando um menor infiltrado inflamatório, e um início de reparação tecidual. Na Figura 19 d, em maior aumento, a seta indica angiogênese com congestão vascular. É possível também verificar nessa imagem resquícios do BS permeado no tecido conjuntivo.

III) 7 dias grupo 3D 30%HA/PLA

Figura 20 - Cortes histológicos relativos aos 7 dias 3D. Em a) e c) coloração H&E; b) coloração PS e d) coloração TM. Araraquara, 2017.

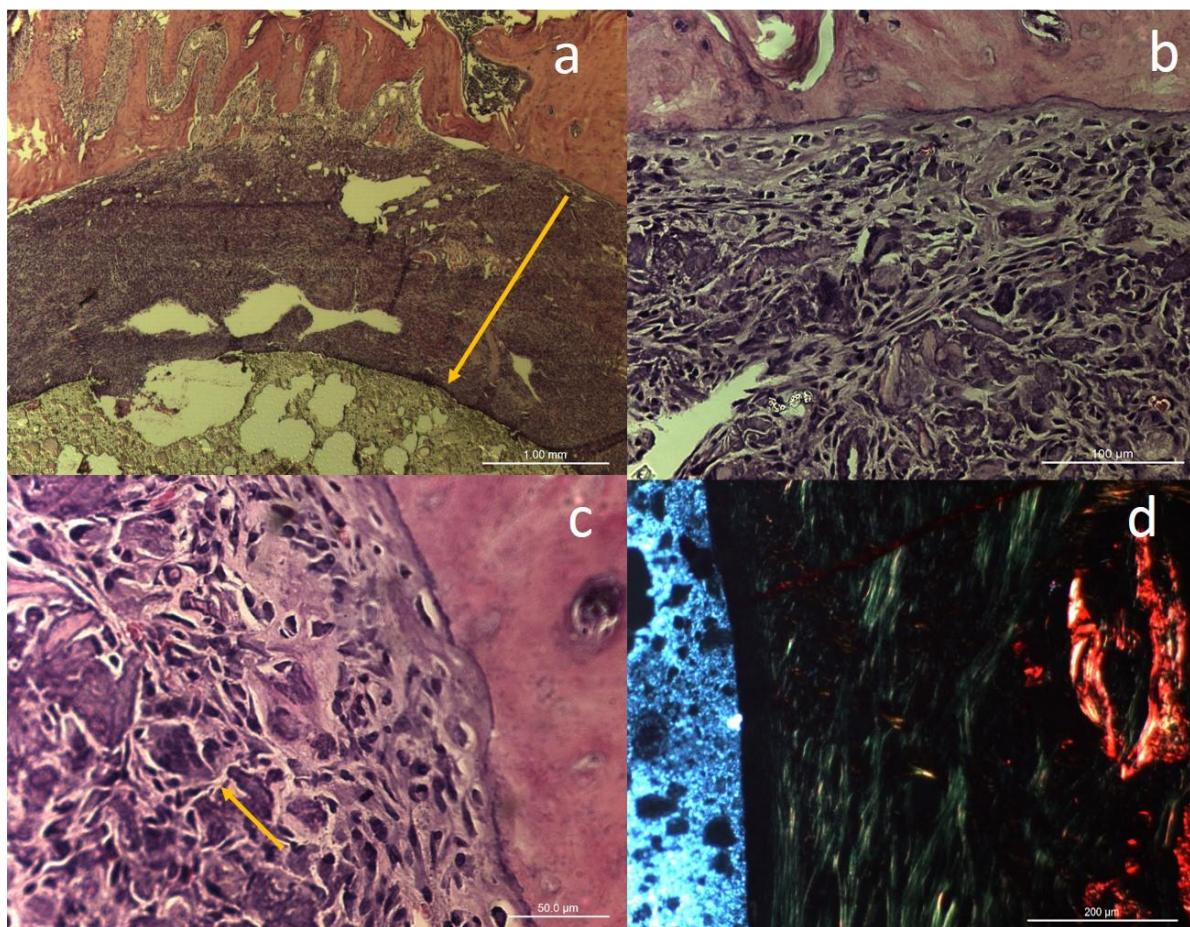


Fonte: Elaboração própria.

Pode se verificar nesse grupo o arcabouço gerado pelo biomaterial na condução da reparação óssea. Verificamos um intenso infiltrado inflamatório com células ao redor do biomaterial. Na Figura 20 b, a coloração PS evidencia a organização trabeculada do início de reparação óssea.

IV) 7 dias grupo 30% HA/PLGA

Figura 21 - Cortes histológicos relativos aos 7 dias PLGA. Em a), b) e c) coloração H&E e d) coloração PS. Araraquara, 2017.

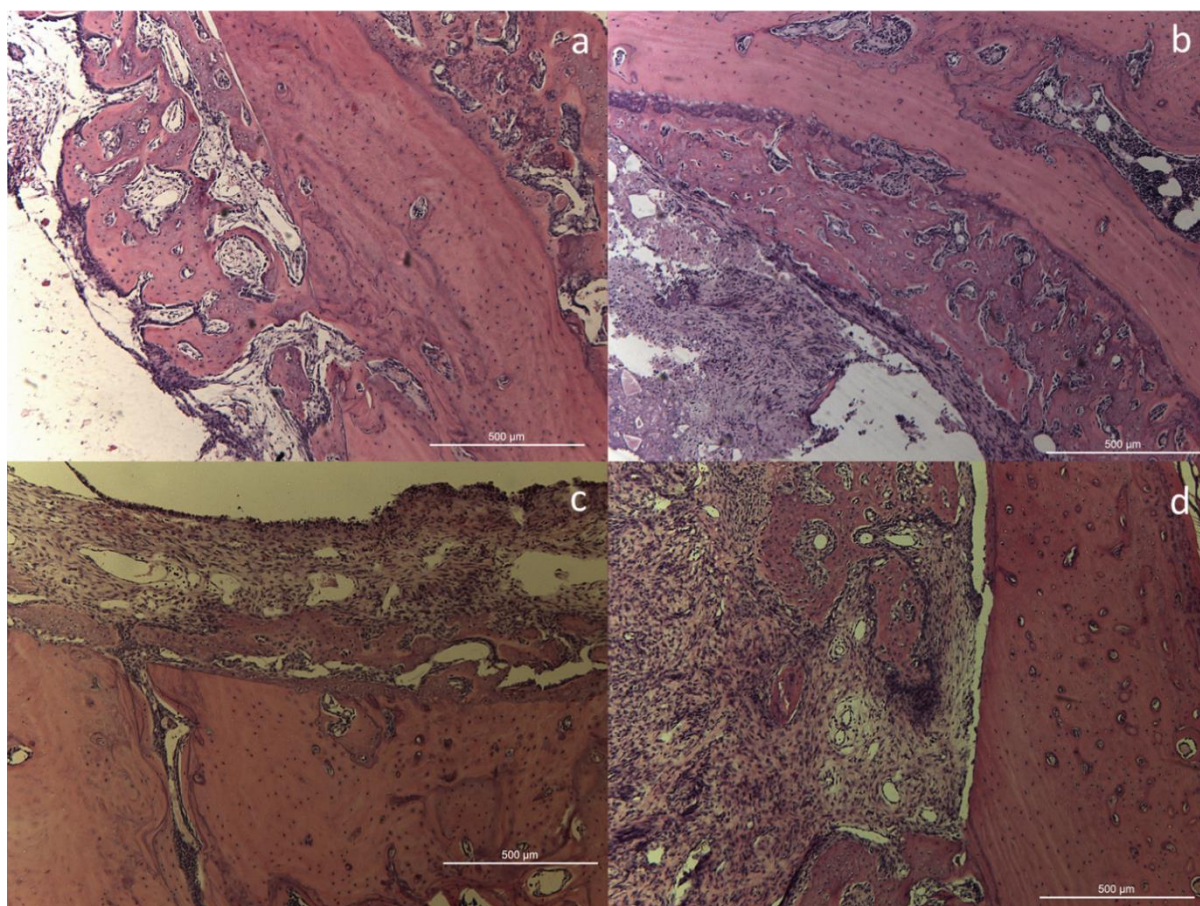


Fonte: Elaboração própria.

Nesse grupo vemos um "gap" de interface entre o leito cirúrgico e o biomaterial, representado pela seta amarela. Em um maior aumento evidencia-se células gigantes marcado pela seta amarela na Figura 21c. Na coloração PS (Figura 21d), nota-se o leito cirúrgico com alta birrefringência um intervalo com tecido conjuntivo, e o biomaterial.

5.3.2 Tempo: 14 dias

Figura 22 - Imagens ilustrativas da margem da lesão, na coloração H&E, visando-se comparar o aspecto tecidual relativo ao período de 14 dias, para os grupos: a) C; b) BS; c) 3D 30% HA/PLA e d) e 30%HA/PLGA. Araraquara, 2017.

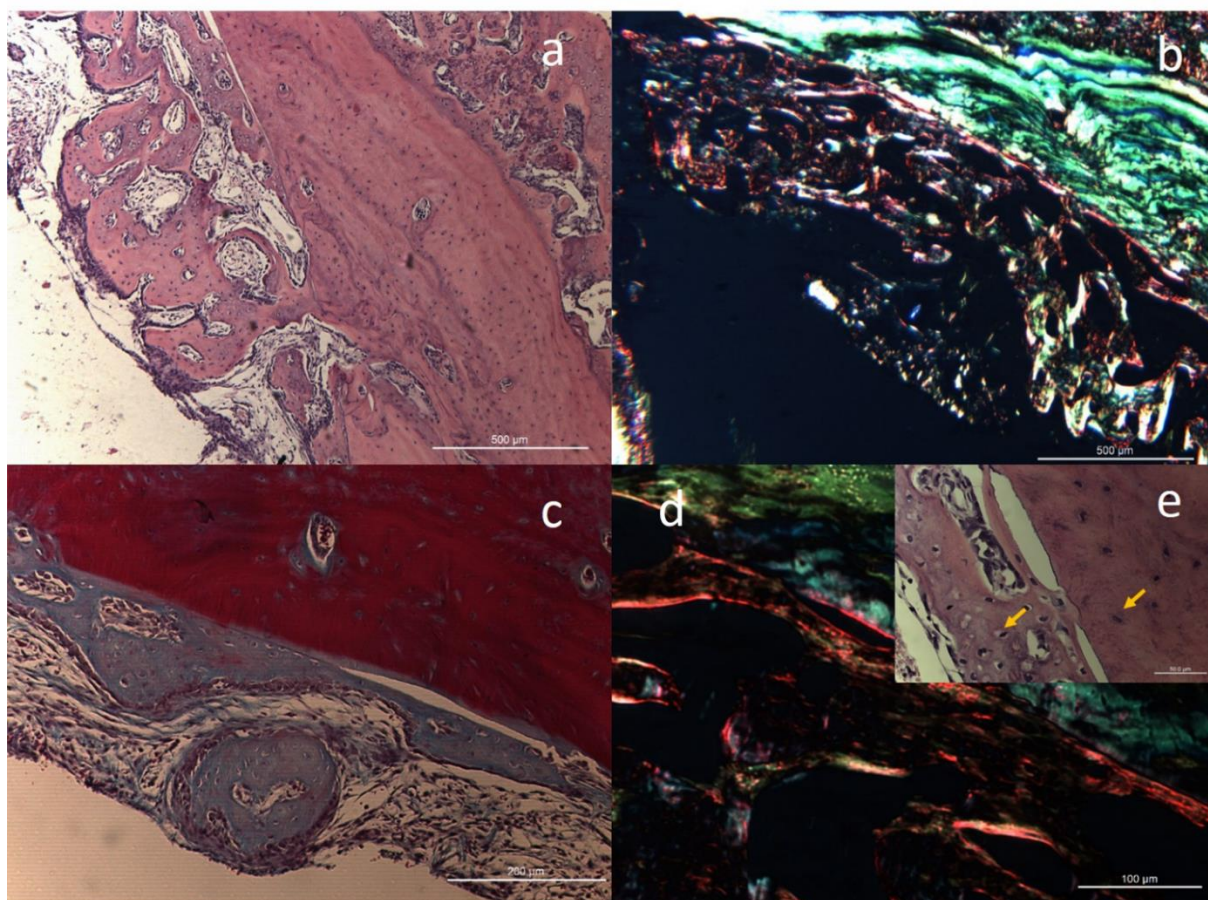


Fonte: Elaboração própria.

A Figura 22 permitiu observar que comparativamente, os grupos com biomateriais apresentaram um arcabouço de substituição óssea no qual favoreceu a formação de um tecido conjuntivo mais extenso, e pequenos nichos de mineralização comparados com o grupo C, o que visualiza-se nitidamente a interface leito cirúrgico tecido neoformado.

I) 14 dias grupo C

Figura 23 - Cortes histológicos relativos aos 14 dias do grupo C. Em a) e e) coloração H&E; b) e d) coloração PS c) coloração TM, 250x. Araraquara, 2017.

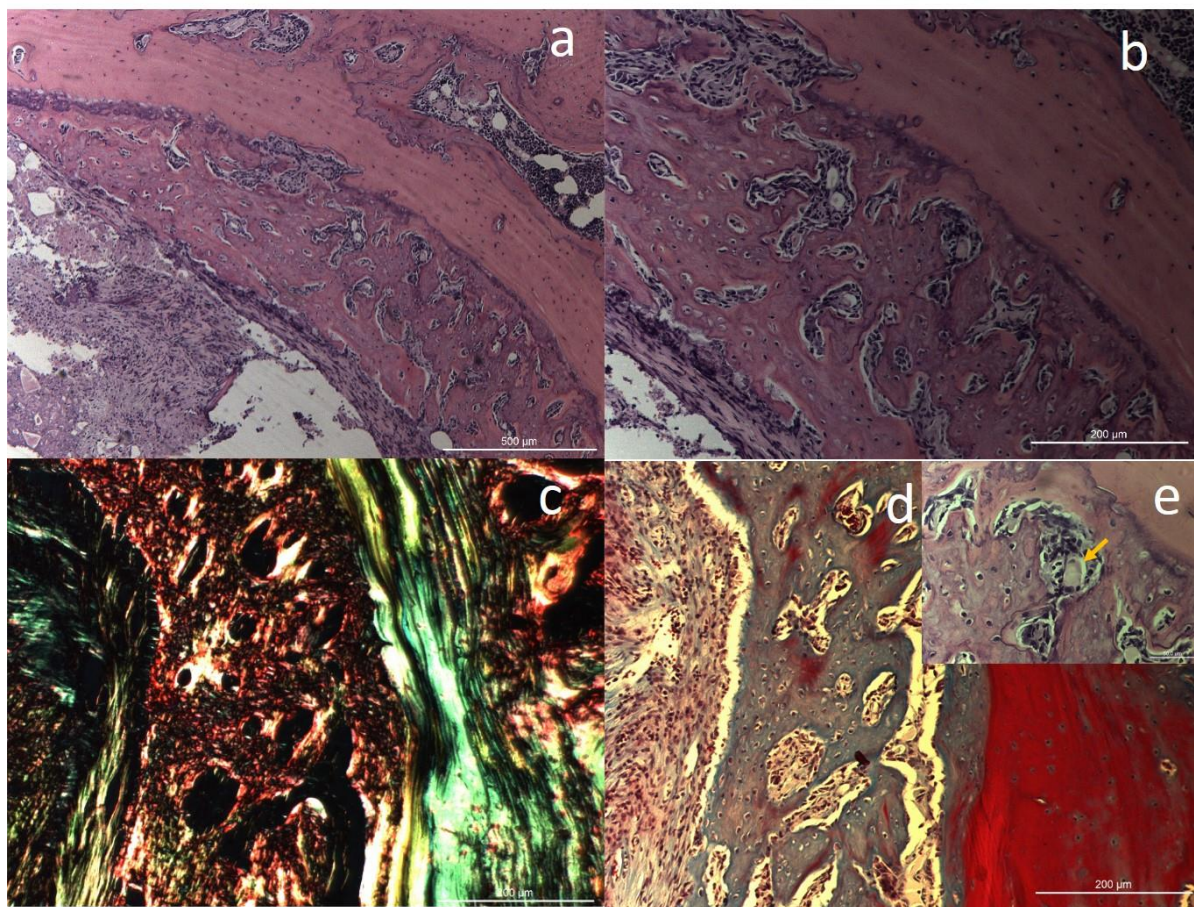


Fonte: Elaboração própria.

Nas imagens é nítida a interface entre leito cirúrgico e tecido neoformado. Visualiza-se na Figura 23c uma matriz óssea sendo formada, porém, ainda sem maturação de colágeno e pouca mineralização, que pode ser confirmada pelas imagens em PS (Figura 23b e d). Evidencia-se na Figura 23 e, em maior aumento, osteoblastos indicados pelas setas presentes no leito cirúrgico, com citoplasma pequeno, sugerindo pequena atividade, e em plena atividade de síntese na região neoformada, com o citoplasma aparente.

II) 14 dias grupo BS

Figura 24 - Cortes histológicos relativos aos 14 dias do grupo BS. Em a), b) e e) coloração H&E; c) coloração PS e d) coloração TM 125x. Araraquara, 2017.

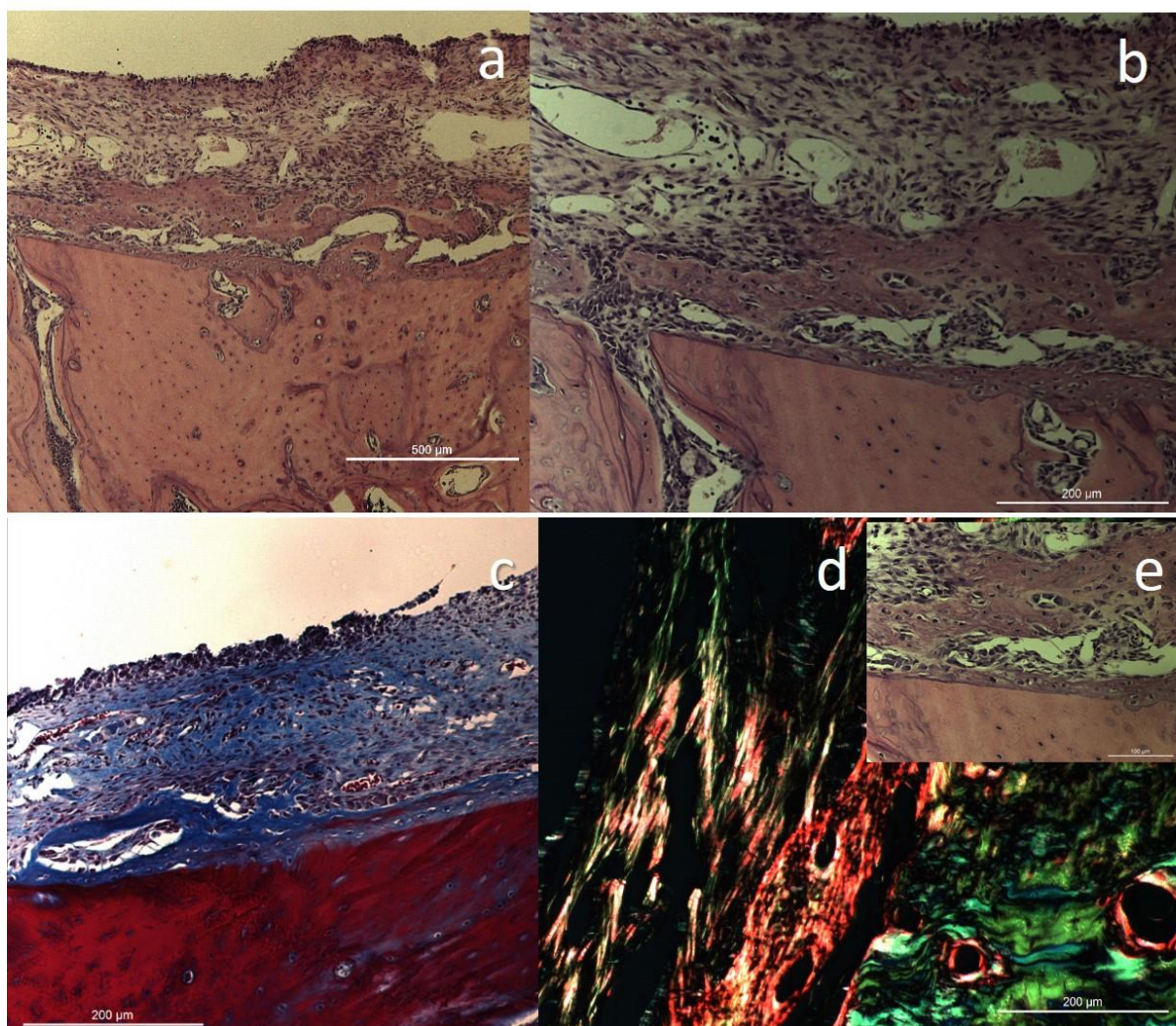


Fonte: Elaboração própria.

A Figura 24a e b ilustra o tecido neoformado contornando a margem da lesão confeccionada com a trefina. Em 24e, é possível verificar remanescente de material BS em contato com células inflamatórias (marcado com a seta). A figura 24c evidencia a diferença de maturação óssea do leito com maior anisotropia que o tecido neoformado. Por outro lado, a coloração TM (Figura 24d) demonstra esparsos nichos de mineralização marcados no meio do tecido neoformado. É possível visualizar a interface entre o leito cirúrgico e a matriz neoformada óssea, e o meio da lesão ainda com exudato e células inflamatórias, ficando claro que a reparação ocorre no sentido centrípeto da borda para o meio da lesão.

III) 14 dias grupo 3D 30%HA/PLA

Figura 25 - Cortes histológicos relativos aos 14 dias 3D 30% HA/PLA. Em a), b) e e) coloração H&E; TM e d) coloração PS. Araraquara, 2017.

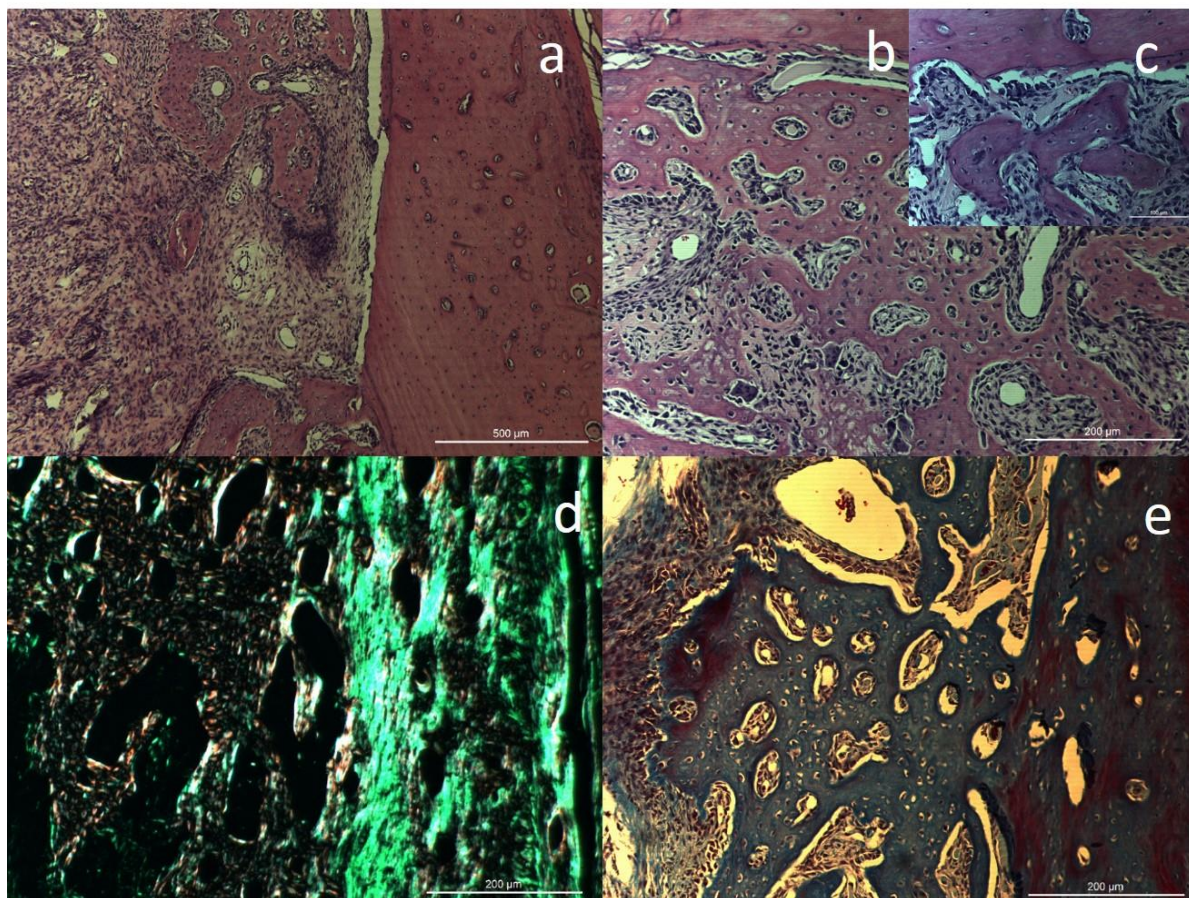


Fonte: Elaboração própria.

As Figuras 25a e b ilustram o processo inicial de reparação tecidual com presença de exudato, hemorragia, e grande quantidade de células inflamatórias promovendo a formação de uma malha de tecido de granulação, iniciando sua diferenciação para uma suave matriz óssea de colágeno. Em c) interface com vasos em congestão e êxtase e diminuição de fluxo na coloração TM. No corte d) observa-se o leito cirúrgico na porção avermelhada, maior anisotropia e consequente maturação de colágeno, e em verde matriz ainda não mineralizada.

IV) 14 dias 30%HA/PLGA

Figura 26 - Cortes histológicos relativos aos 14 dias 30% HA/PLGA. Em a), b) e c) coloração H&E; d) coloração PS e e) coloração TM. Araraquara, 2017.

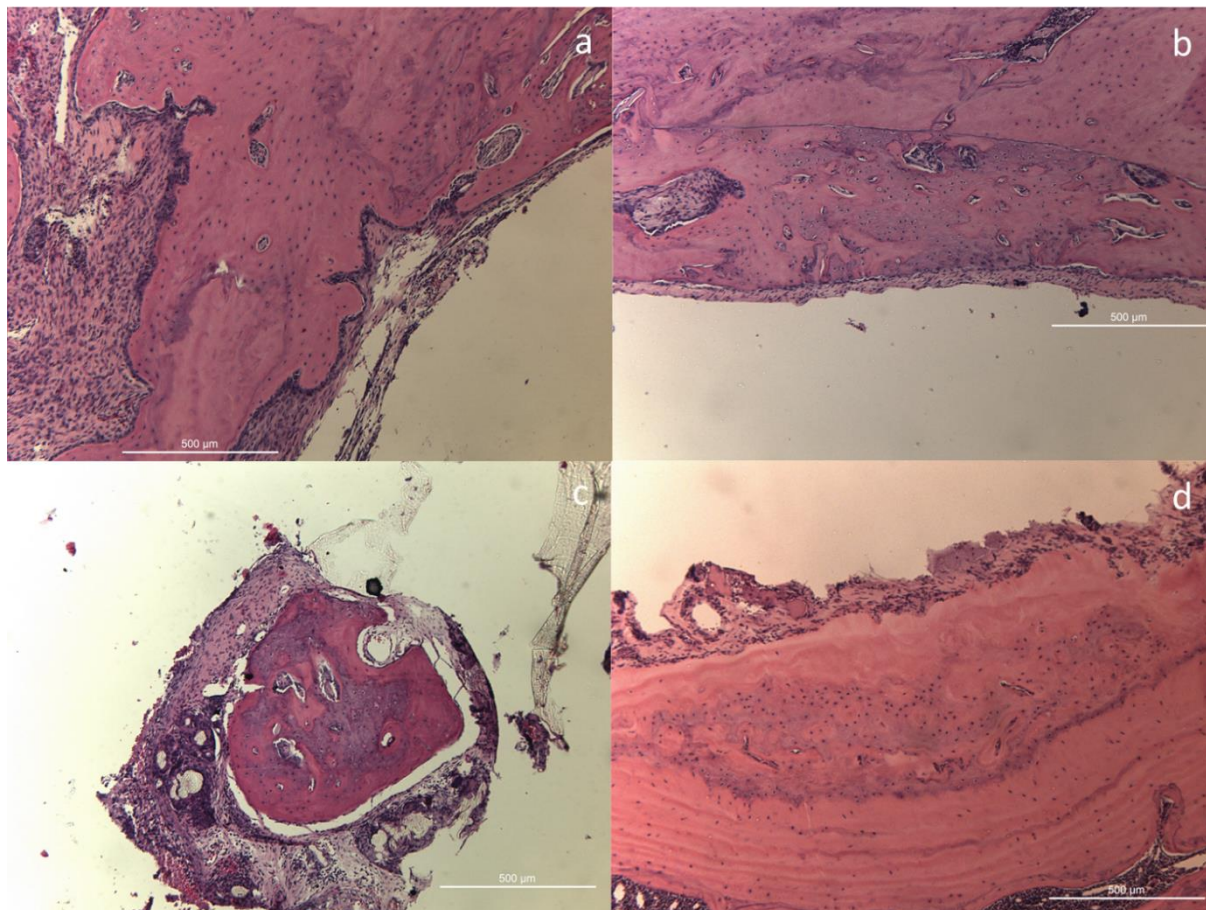


Fonte: Elaboração própria.

A Figura 26a ilustra um processo de reparação com inflamação aguda, porém com angiogênese evidente e grande quantidade de osteoblastos na matriz neoformada em b. A Figura 26d corrobora a grande neoformação capilar na matriz neoformada. Em e, observa-se o início da organização concêntrica da matriz evidenciando a neoformação de osso lamelar.

5.3.3 Tempo 30 dias

Figura 27 – Imagens na coloração H&E, visando-se comparar o aspecto tecidual relativo ao período de 30 dias, para os grupos: a) C; b) BS; c) 3D 30% HA/PLA e d) e 30%HA/PLGA. Araraquara, 2017.

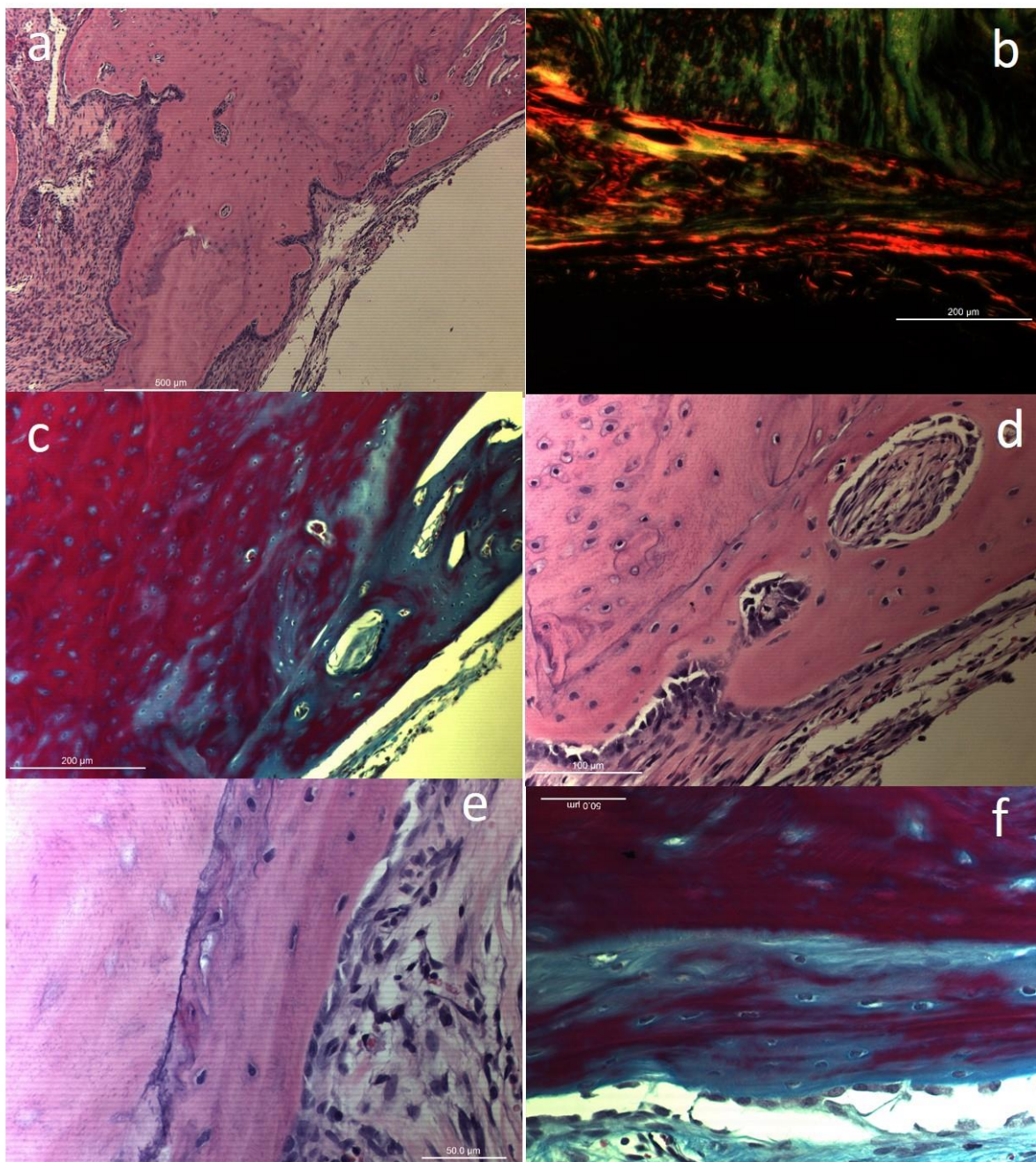


Fonte: Elaboração própria.

Nesse período já é nítida a formação de uma linha reversa de crescimento ósseo em praticamente todos os grupos. Porém, em 27a (grupo Controle) podemos ver uma delgada formação óssea ao se comparar aos outros grupos. Em c) a imagem ilustra o poro criado no material 3D, e no interior deste grande poro a formação de nicho de mineralização no centro da lesão formada com a trefina.

I) 30 dias grupo C

Figura 28 - Cortes histológicos relativos aos 30 dias C. Em a), d) e e) coloração H&E; b) coloração PS; c) e f) coloração TM. Araraquara, 2017.



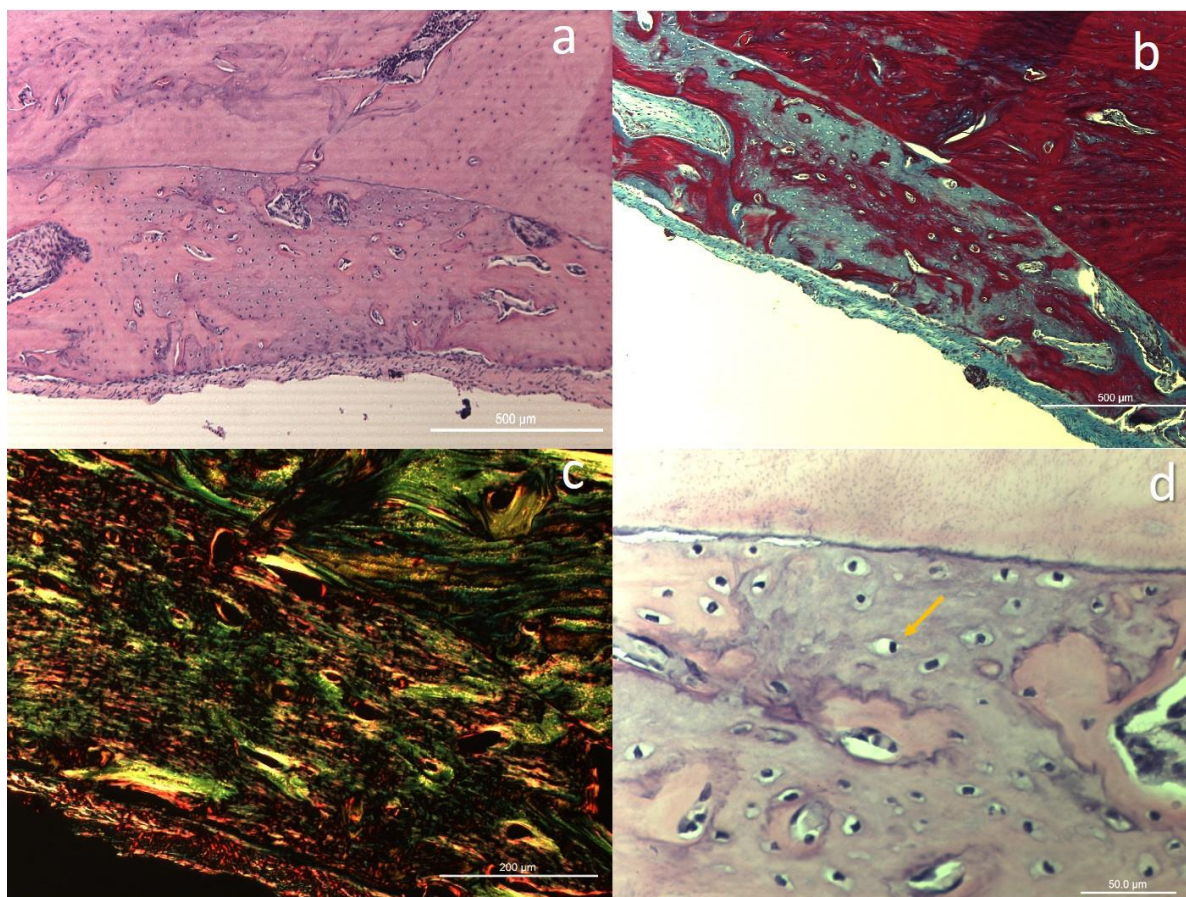
Fonte: Elaboração própria.

Visualiza-se nitidamente a interface do osso do leito com pouco osteócitos em comparação com a zona neoformada. E na interface mais intensa da lesão, um tecido ainda não mineralizado (Figura 28e). A zona mineralizada observada nas imagens apresenta um tamanho aproximado de 100 a 200 μm de largura. Em 30b observa-se uma interface mais

avermelhada no leito cirúrgico, e na porção superior, osso neoformado. Na imagens 30c e f, a interface corrobora com delgada formação de tecido ósseo.

II) 30 dias grupo BS

Figura 29 - Cortes histológicos relativos aos 30 dias BS. Em a) e d) coloração H&E; b) coloração TM e c) coloração PS. Araraquara, 2017.

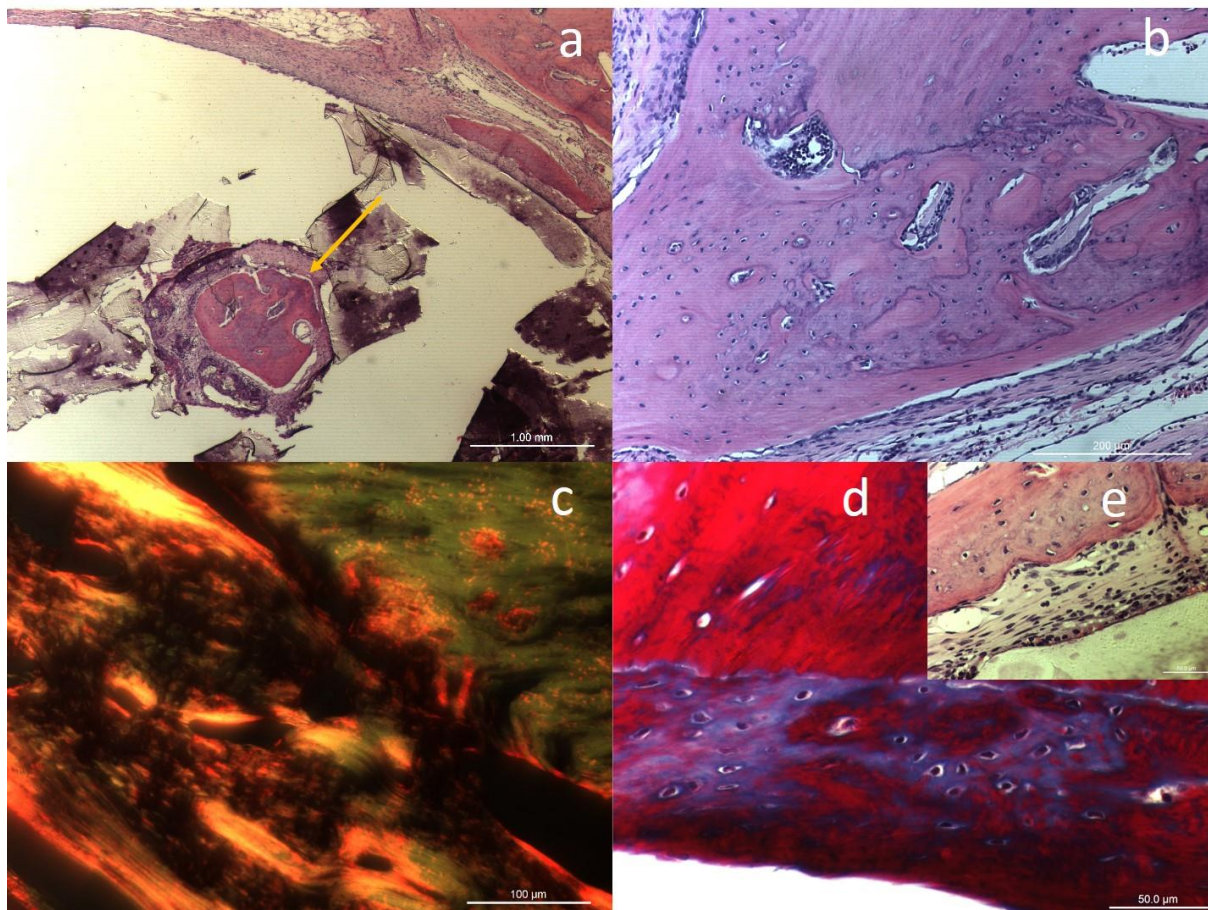


Fonte: Elaboração própria.

Observa-se na Figura 29 uma linha reversa de crescimento ósseo de aproximadamente 500 µm de largura. Quando comparado ao grupo C verifica-se uma maior formação óssea, com grande quantidade de osteoblastos em intensa síntese de matriz 29d (seta). Em b, evidencia-se maiores áreas de maturação e mineralização óssea comparando-se ao controle. E, por fim, a Figura 29c ilustra a anisotropia de fibras colágenas mineralizadas semelhantes ao leito cirúrgico.

III) 30 dias 3D 30% HA/PLA

Figura 30 - Cortes histológicos relativos aos 30 dias 3D 30% HA/PLA. Em a), b) e e) coloração H&E; d) coloração PS e d) coloração TM. O detalhe na seta representa o início da maturação de tecido ósseo dentro dos poros do scaffold 3D. Araraquara, 2017.

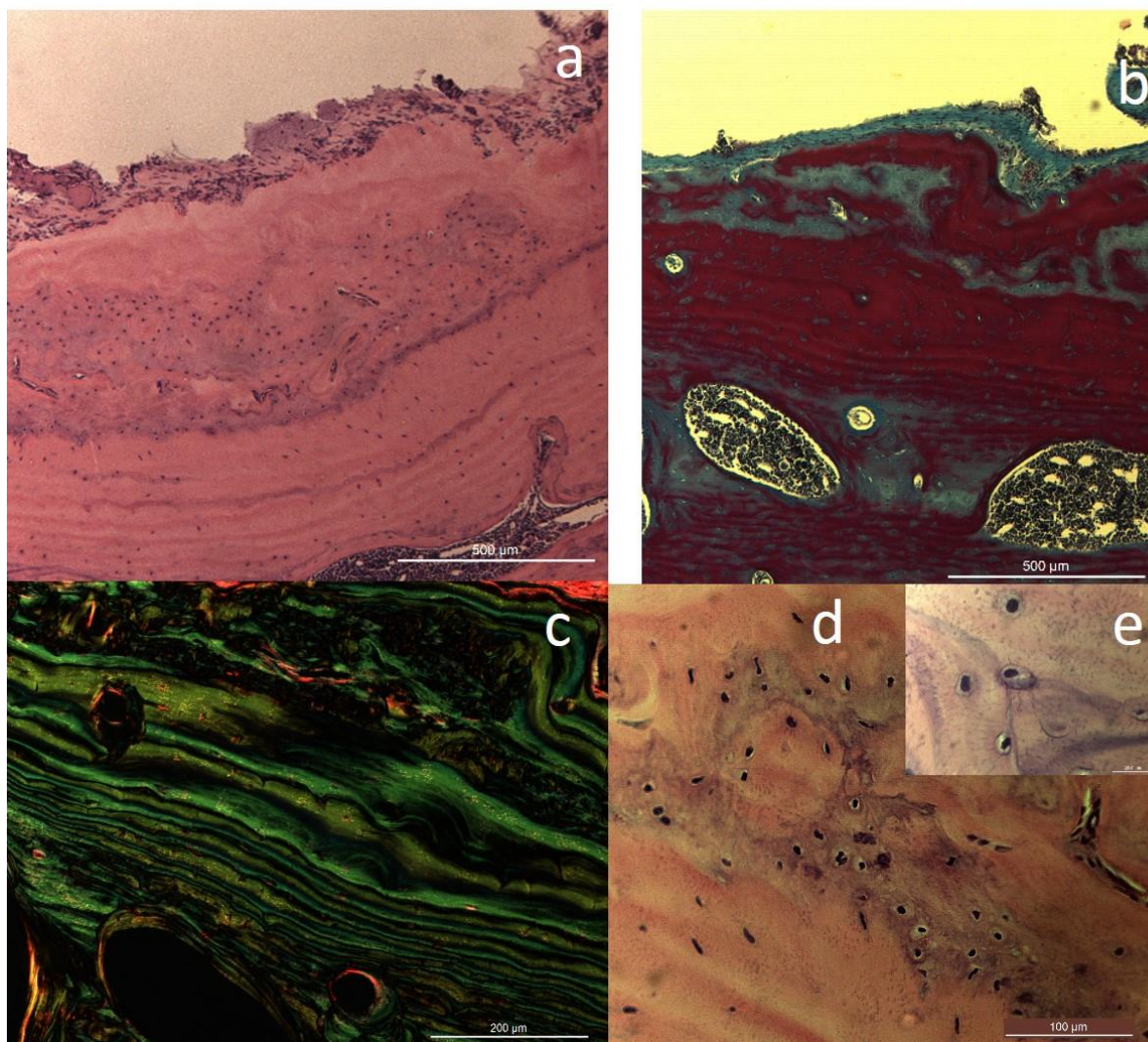


Fonte: Elaboração própria.

Nesse período a linha reversa de crescimento é nítida com grande quantidade de osteoblastos em plena atividade de síntese de matriz óssea. A seta (Figura 30a) ilustra posição do biomaterial e osso neoformado dentro do grande poro do *scaffold* fabricado pela impressão 3D. Em 30c, visualiza-se um "gap" entre o leito e neoformação tecidual. A imagem d) revela a interface com a diferente organização do colágeno da matriz em neoformação.

IV) 30 dias grupo 30% HA/PLGA

Figura 31 - Cortes histológicos relativos aos 30 dias 30%HA/PLGA. Em a), d) e e) coloração H&E; c) coloração PS e b) coloração TM. Araraquara, 2017.

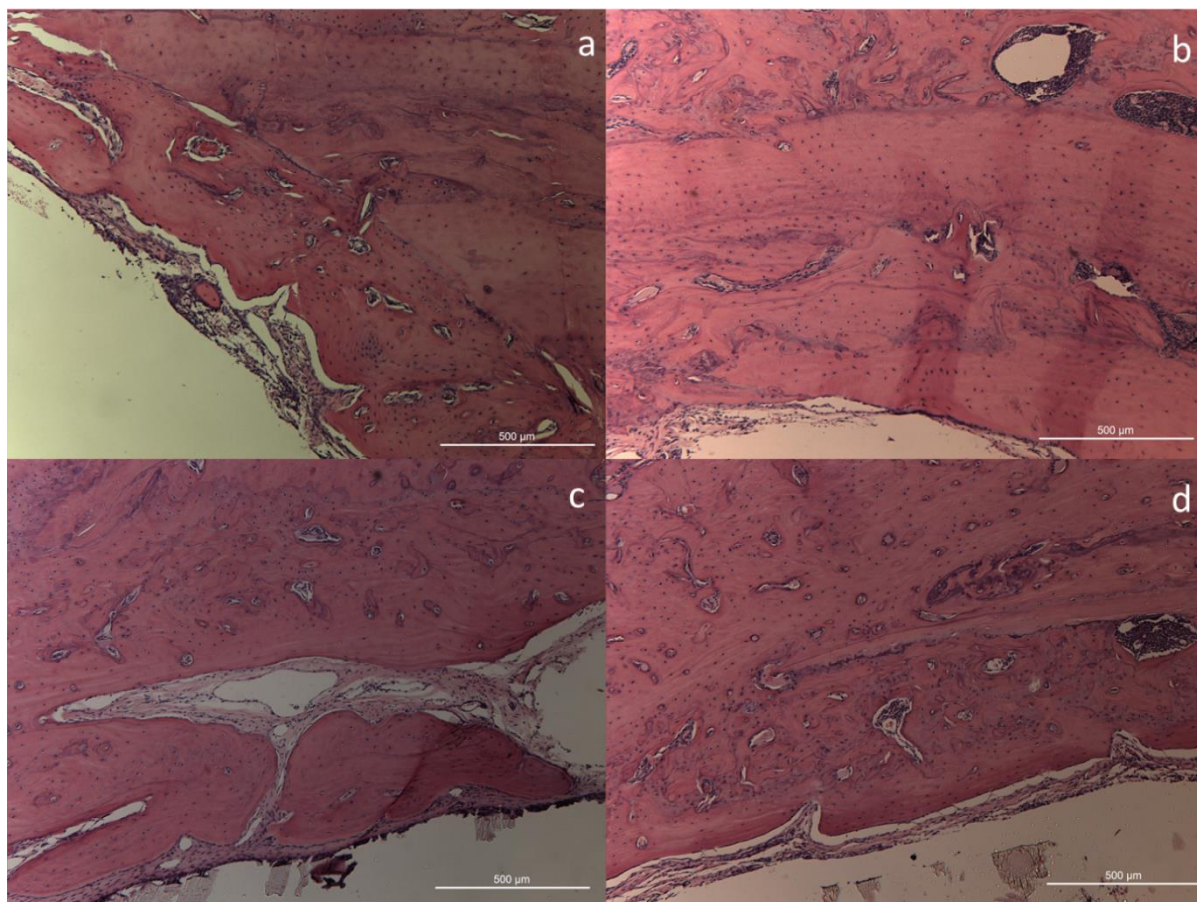


Fonte: Elaboração própria.

A Figura 31 revela de maneira bem evidente uma linha de formação óssea com grande quantidade de osteoblastos. Em b), observa-se a interface da matriz neoformada, e em c) a coloração PS demonstra as linhas de crescimento ósseo e semelhante anisotropia na região de neoformação óssea.

5.3.4 Tempo 60 dias

Figura 32 – Imagens na coloração H&E, visando-se comparar o aspecto tecidual relativo ao período de 60 dias, para os grupos: a) C; b) BS; c) 3D 30% HA/PLA e d) e 30%HA/PLGA. Araraquara, 2017.

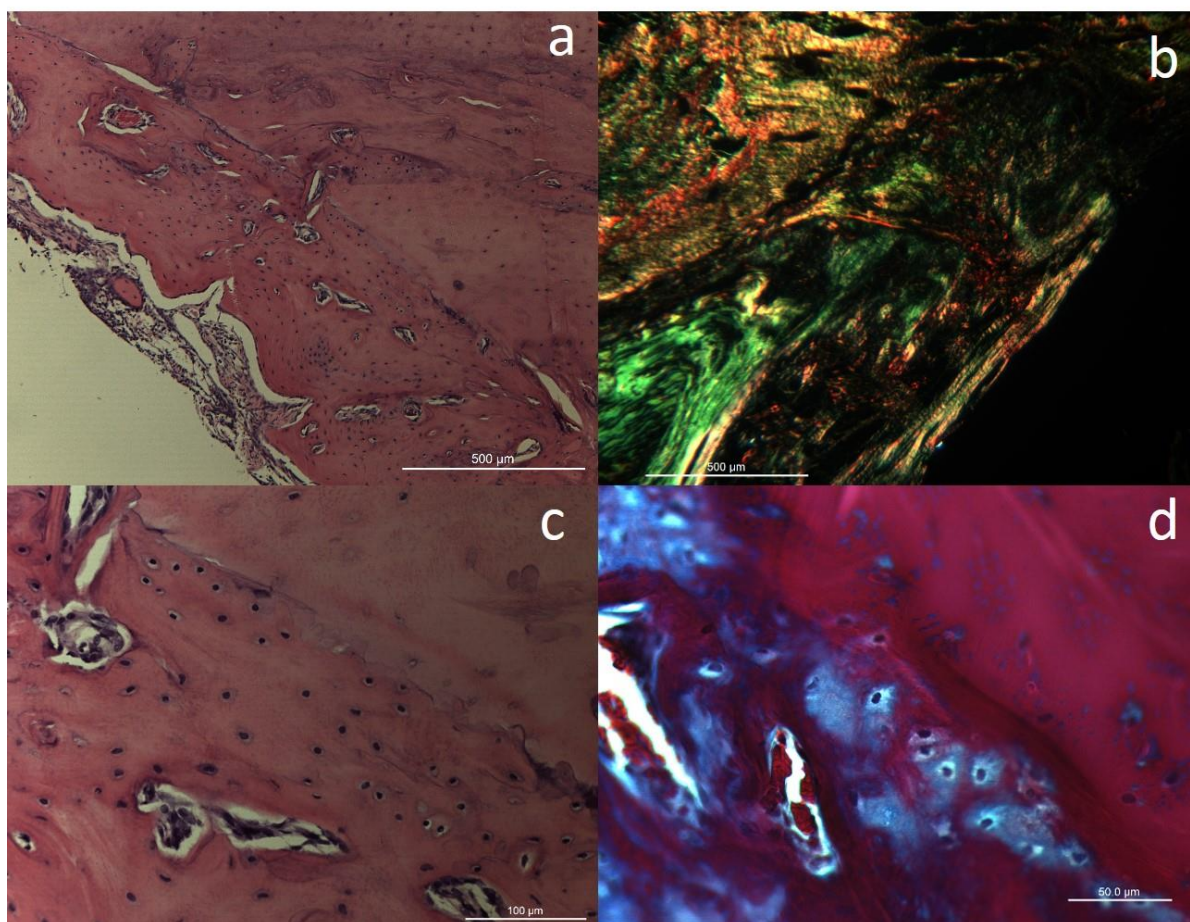


Fonte: Elaboração própria.

No período de 2 meses observa-se que praticamente todos os grupos apresentam tecido neoformado compatível com o leito cirúrgico (Figura 32). Quando comparamos o grupo controle (Figura 32a) com os demais, nota-se uma faixa de formação óssea menor, com a presença de um "gap" na interface.

I) 60 dias grupo C

Figura 33 - Cortes histológicos relativos aos 60 dias C. Em a) e c) coloração H&E; b) coloração OS; c) e d) coloração TM. Araraquara, 2017.

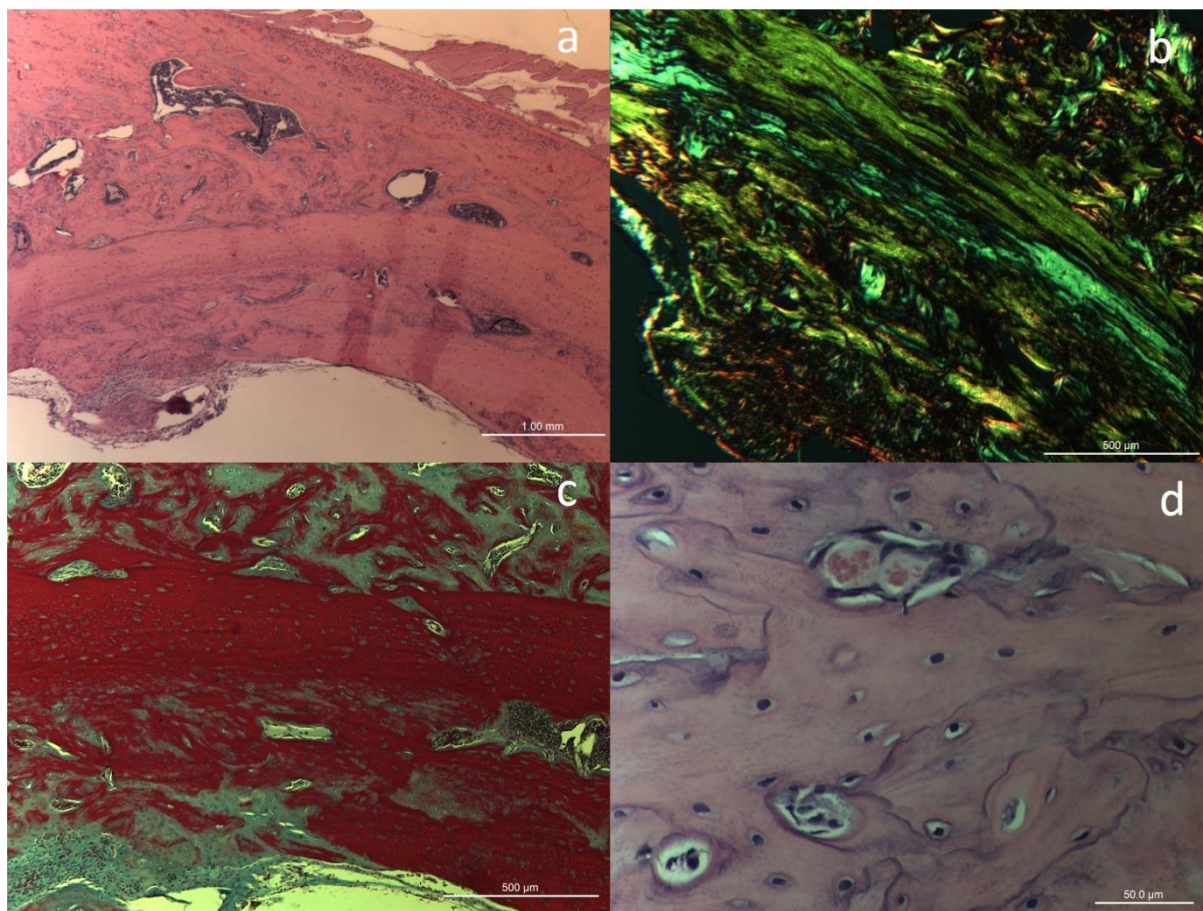


Fonte: Elaboração própria.

A figura 33 ilustra a zona de interface entre osso do leito e neoformado. É possível notar a diferença de quantidade de células nessas duas regiões. Em b), percebe-se ainda uma diferença na maturação óssea na região neoformada e em d), a coloração TM evidencia alta síntese de matriz óssea.

II) 60 dias grupo BS

Figura 34 - Cortes histológicos relativos aos 60 dias BS. Em a) e d) coloração H&E; b) coloração OS e c) coloração TM. Araraquara, 2017.

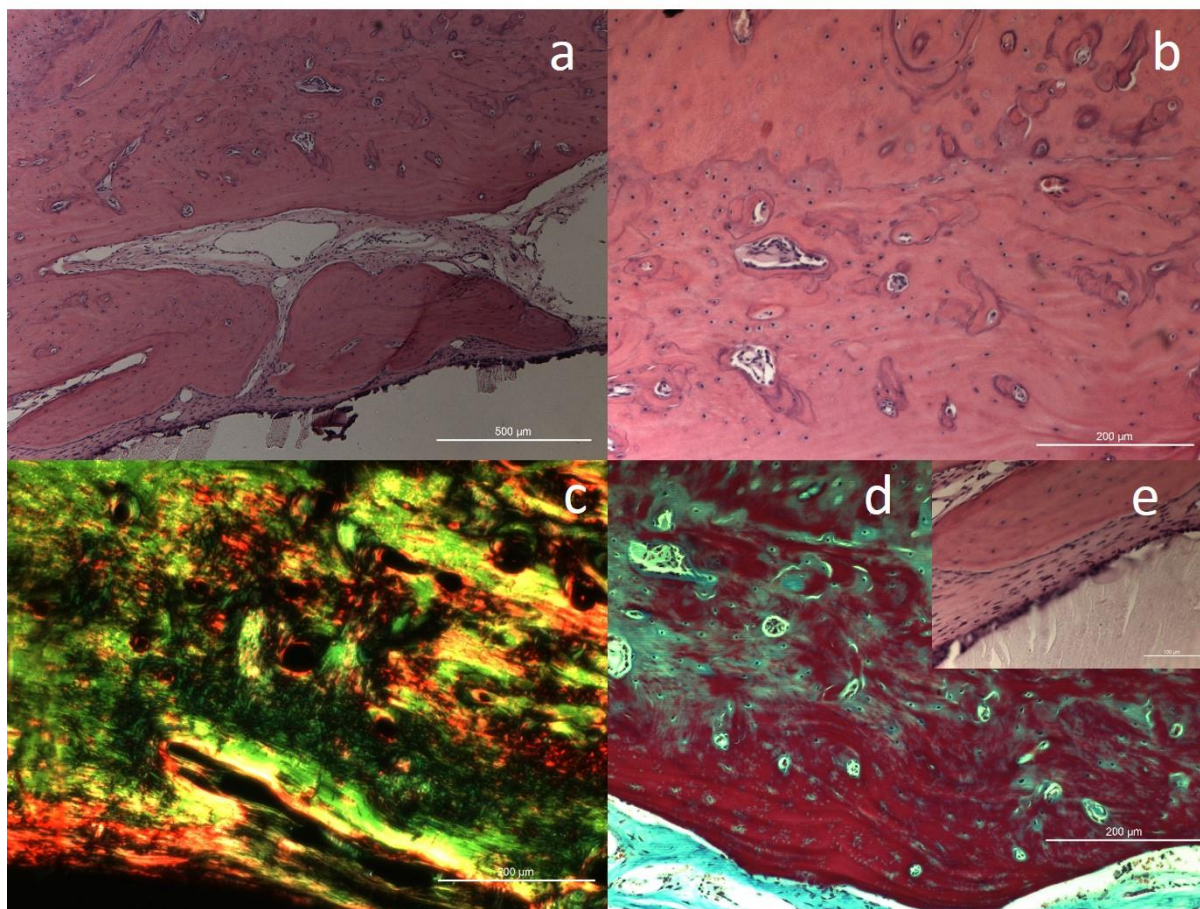


Fonte: Elaboração própria.

A visão longitudinal demonstrada na Figura 34 revela o osso neoformado com uma característica não lamelar ainda desorganizada. Na Figura 34b, a coloração PS corrobora com as imagens anteriores relativas às características lineares das fibras evidenciando osso imaturo. E em c) observa-se na interface entre o osso neoformado uma diferente característica em relação ao leito cirúrgico.

III) 60 dias grupo 3D 30% HA/PLA

Figura 35 - Cortes histológicos relativos aos 60 dias 3D 30% HA/PLA. Em a), b) e e) coloração H&E; c) coloração PS e d) coloração TM. Araraquara, 2017.

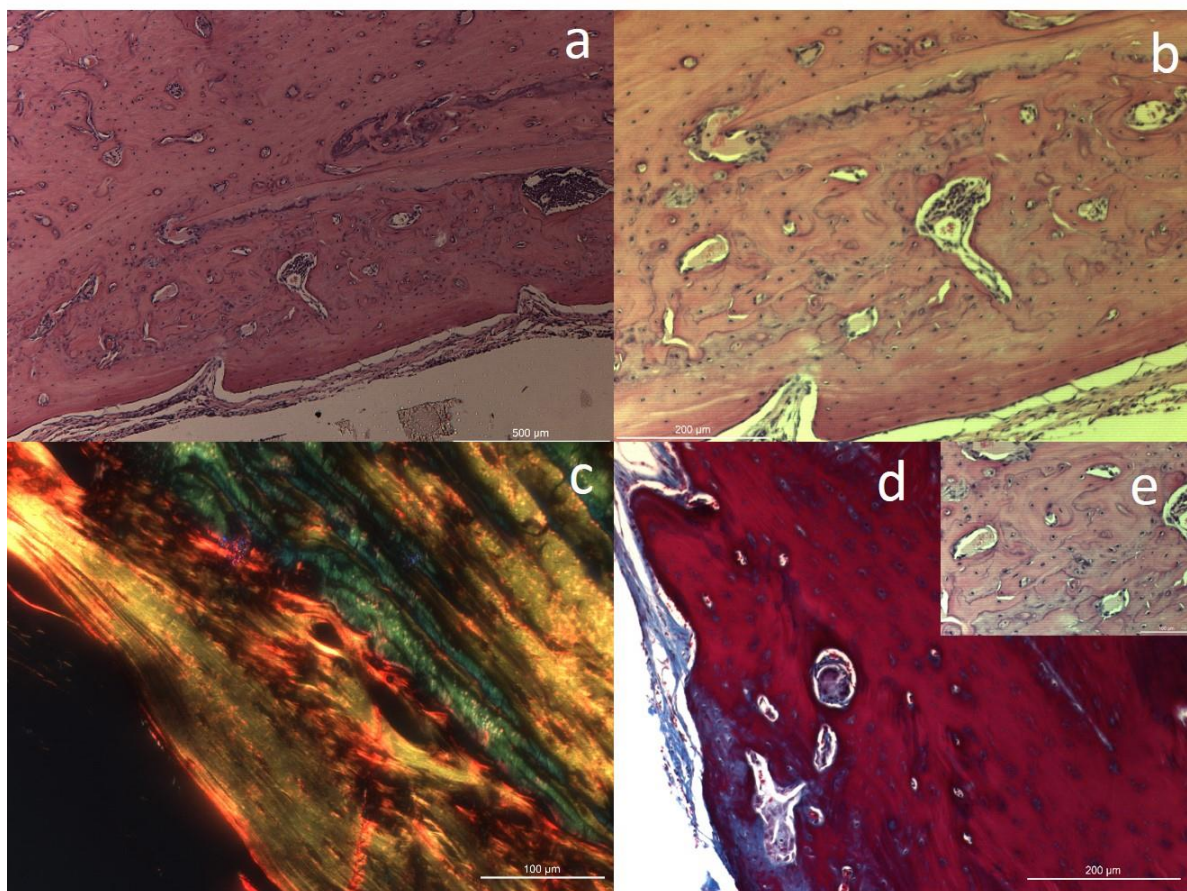


Fonte: Elaboração própria.

Nota-se na Figura 35 a presença de uma linha reversa de crescimento bem como a formação de lamelas óssea ao redor de capilares evidenciando organização das fibras colágenas e maior resistência da matriz. Na Figura 35e, em maior aumento, observa-se a interface entre o osso neoformado e o biomaterial com uma fina rede de colágeno entreposto. Nas Figuras 35c e d, não se nota diferença entre o osso do leito e o neoformado.

IV) 60 dias 30% HA/PLGA

Figura 36 - Cortes histológicos relativos aos 60 dias 30%HA/PLGA. Em a), b) e e) coloração H&E; c) coloração PS e b) coloração TM. Araraquara, 2017.

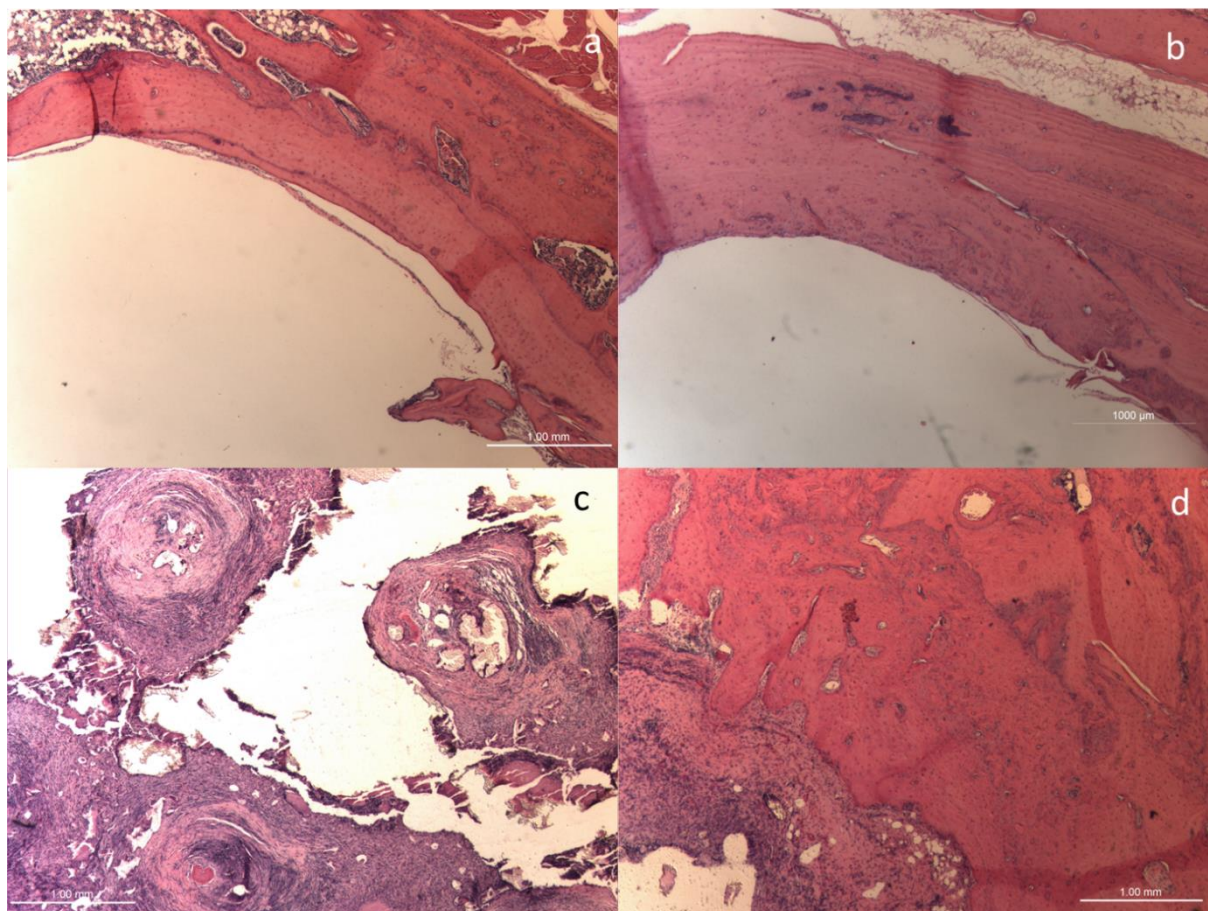


Fonte: Elaboração própria.

A coloração H&E (Figuras 36a, b e e) permite visualizar a borda da lesão com a interface osso neoformado e osso adjacente. Grande quantidade de capilares e início de maturação e organização lamelar das matriz óssea. Em c) coloração PS a matriz apresenta anisotropia das fibras colágenas evidenciando um alto grau de maturidade no qual as fibras colágenas já se apresentam emaranhadas em formato de hélice favorecendo a difração da luz polarizada. Na figura d) coloração TM.

5.3.5 Tempo 120 dias

Figura 37 – Imagens na coloração H&E, visando-se comparar o aspecto tecidual relativo ao período de 120 dias, para os grupos: a) C; b) BS; c) 3D 30% HA/PLA e d) e 30%HA/PLGA. Araraquara, 2017.



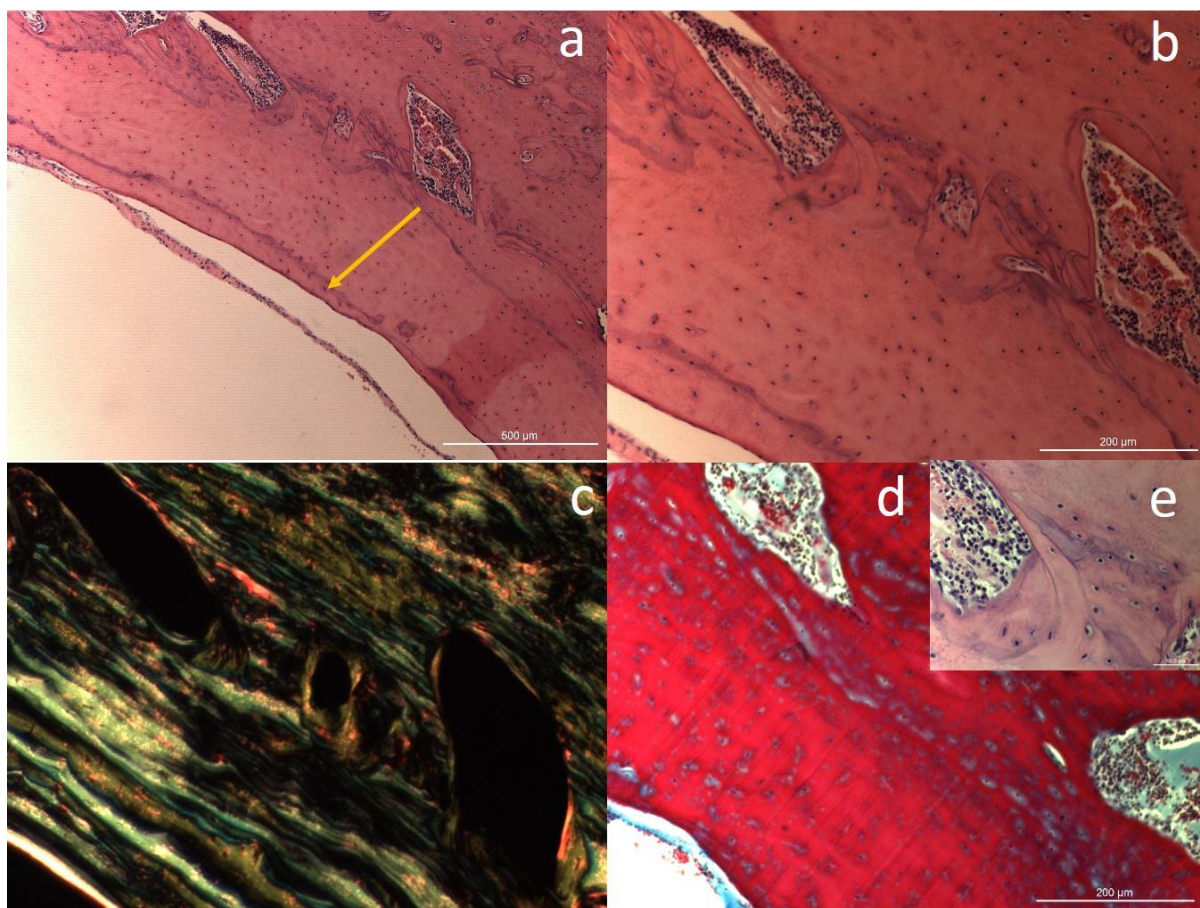
Fonte: Elaboração própria.

No período final de análise o grupo controle e o Biossilicato (Figuras 37a e b) apresentam-se de maneira muito semelhante, com uma reparação óssea estagnada devido ao defeito crítico confeccionado, apesar de se visualizar a interface melhor consolidada entre o osso neoformado e o adjacente. Por outro lado, nos grupos no qual foi inserido um arcabouço substituidor ósseo visualizamos nichos de mineralização sendo formados também no centro do defeito ósseo. Na Figura 37c, observa-se que no meio dos poros do biomaterial confeccionado com a tecnologia 3D, a matriz óssea apresenta áreas mineralizadas, evidenciando uma condução óssea para região crítica do defeito. A Figura 37d evidencia grande quantidade de tecido conjuntivo com inflamação crônica na margem do osso

neoformado em contato com o biomaterial. A reparação tecidual está em pleno processo de cicatrização.

I) 120 dias grupo C

Figura 38 - Cortes histológicos relativos aos 120 dias SEM. Em a), b) e e) coloração H&E; c) coloração OS e d) coloração TM. Araraquara, 2017.

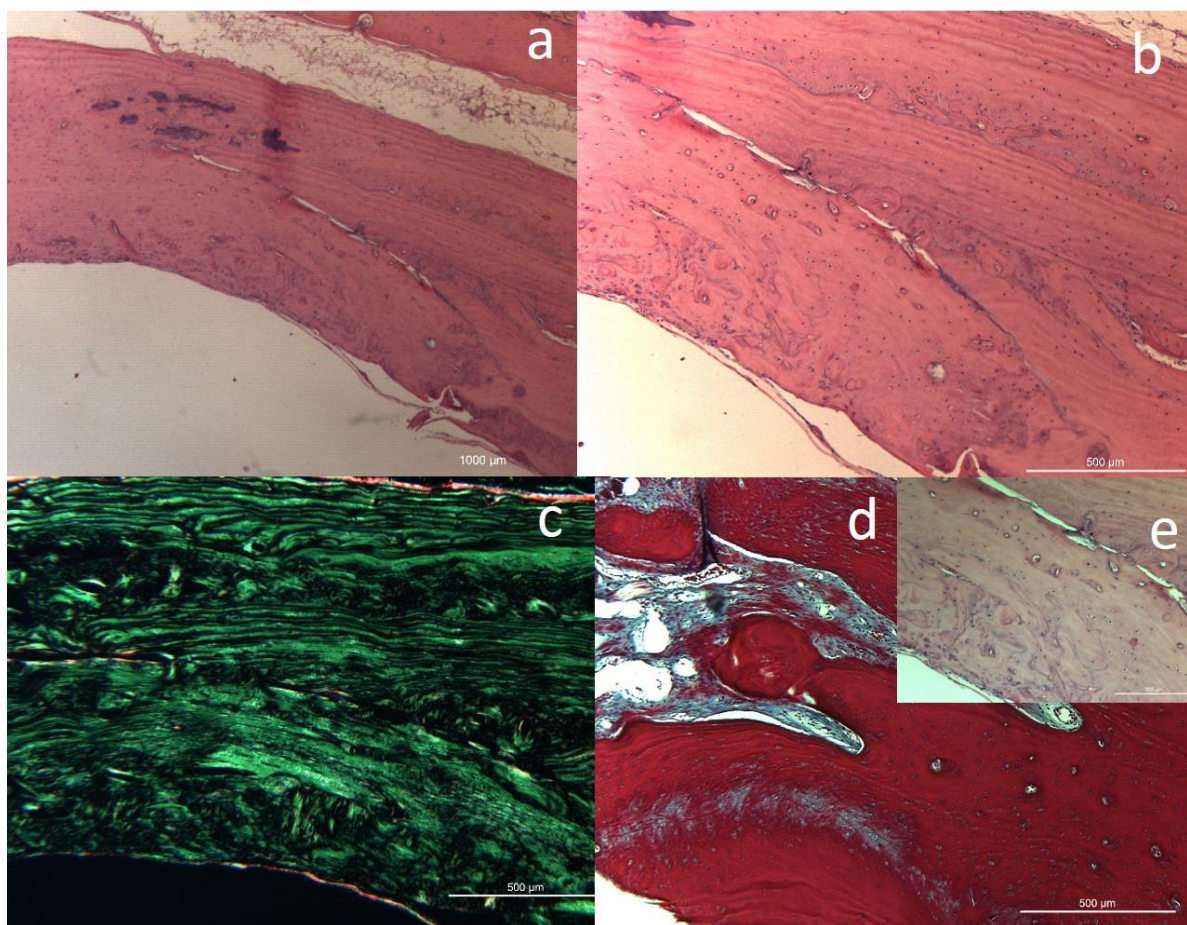


Fonte: Elaboração própria.

A Figura 38 revela a presença de vasos sanguíneos congestionados e grande quantidade de células inflamatórias. A seta em a), evidencia a curva de crescimento ósseo. Em c), a coloração PS revela a presença de canais medulares na matriz óssea, sendo que a interface entre osso neoformado e a do leito apresentam semelhança.

II) 120 dias BS

Figura 39 - Cortes histológicos relativos aos 120 dias BS. Em a), b) e e) coloração H&E; c) coloração PS e d) coloração TM. Araraquara, 2017.

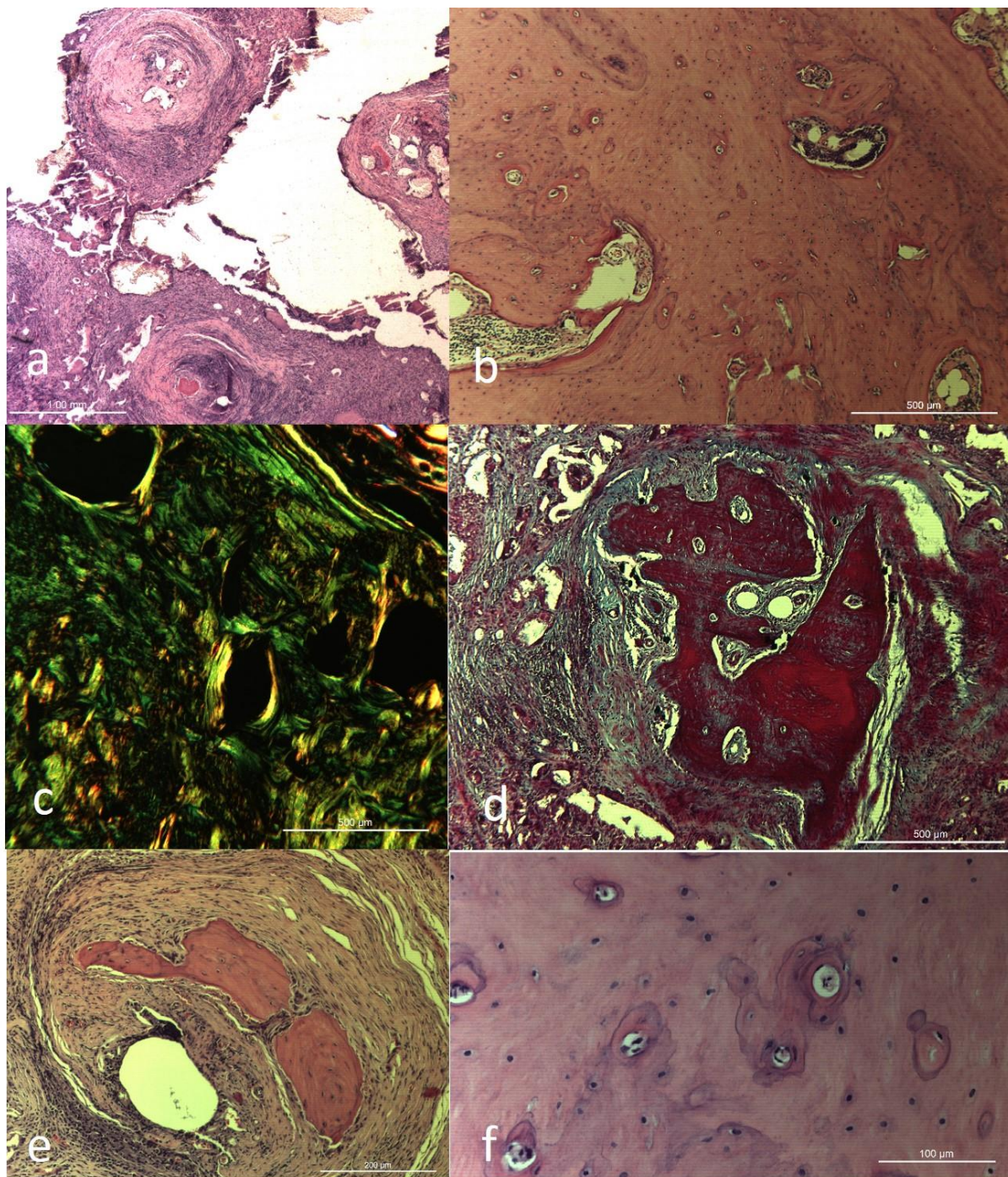


Fonte: Elaboração própria.

A interface entre o leito cirúrgico e osso neoformado (Figuras 39 a e b) revela ainda uma falha. Nesse período final de estudo, a Figura 39c mostra a anisotropia das fibras colágenas por luz polarizada aparentando semelhança entre osso adjacente e neoformado. E na figura d), a coloração TM evidencia um extenso canal medular.

III) 120 dias 3D 30% HA/PLA

Figura 40 - Cortes histológicos relativos aos 120 dias 3D 30% HA/PLA. Em a), b), e) e f) coloração H&E; c) coloração PS e d) coloração TM. Araraquara, 2017.



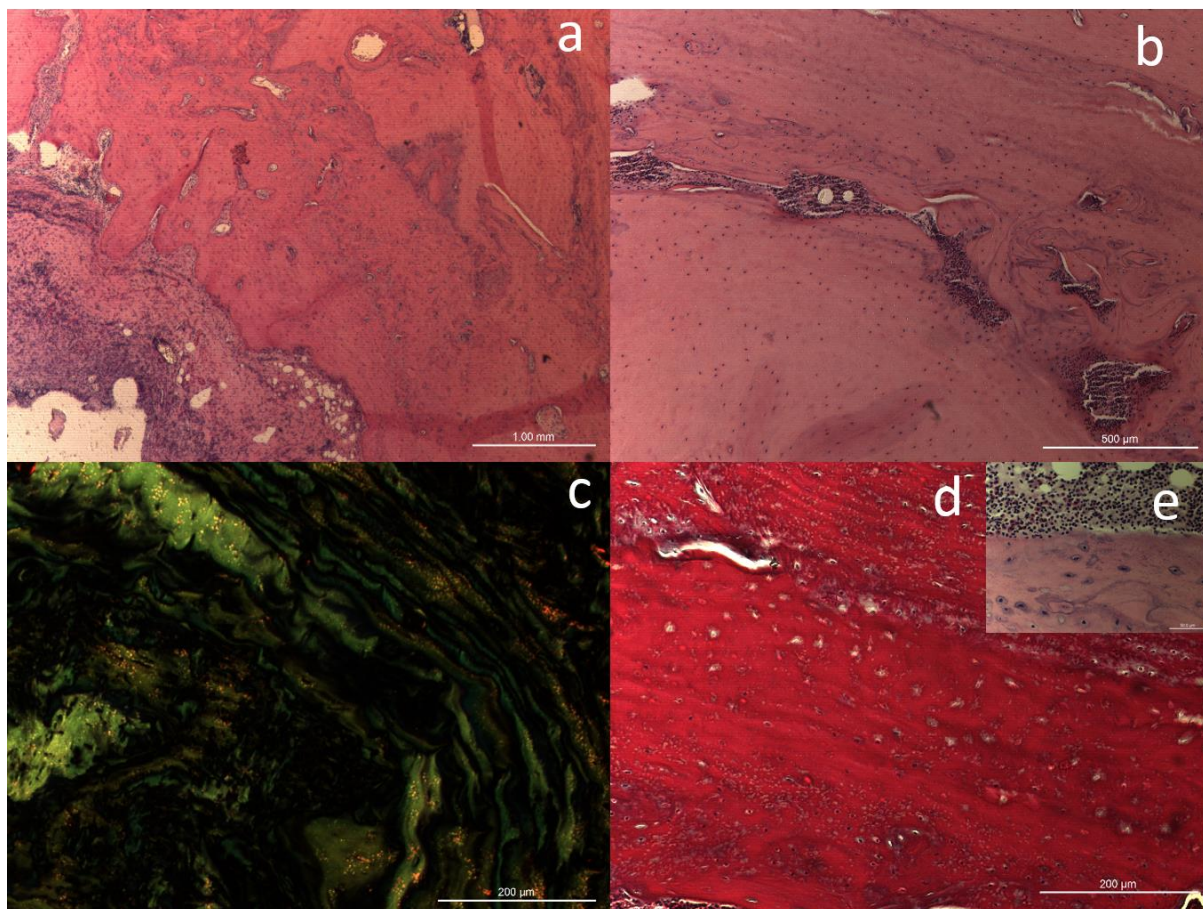
Fonte: Elaboração própria.

A coloração H&E evidencia no meio do defeito, dentro do poro criado pela impressora 3D do biomaterial, nichos de mineralização distantes da borda da lesão (Figuras 40a e e). Na Figura 40f, observa-se organização óssea lamelar ao redor de capilares sanguíneos e intensa síntese de matriz pelos osteócitos remanescentes. Em c), nota-se a

organização óssea em forma circular (lamelar) e anisotropia com característica de maturação óssea. E em d), no meio do poro, nichos de mineralização rodeados por tecido conjuntivo não mineralizado.

IV) 120 dias 30% HA/PLGA

Figura 41 - Cortes histológicos relativos aos 120 dias 30% HA/PLGA. Em a), b) e e) coloração H&E; c) coloração PS e b) coloração TM. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

Observa-se na Figura 41a com presença de linhas de crescimento e tecido conjuntivo entre o osso neoformado e o biomaterial. Na Figura 41e, nota-se um canal medular com células inflamatórias e grande presença de osteócitos na matriz óssea. Em c), a coloração PS evidencia a interface mostrando a maturação da matriz óssea. E em d), observa-se a presença de grande quantidade de osteócitos.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para avaliar o desempenho in vivo de diferentes tratamentos com potencial para uso em reparo de defeitos de ósseos críticos realizados em calvária de ratos (BS, 3D30%HA/PLA e 30%HA/PLGA). Observou-se que a tecnologia 3D 30%HA/PLA e o compósito 30%HA/PLGA tiveram desempenho estatisticamente superior aos demais tratamentos. Isso é especialmente relevante pois o BS é tido como um dos biomateriais mais promissores para enxertia óssea (Zanotto et al.¹¹⁵, 2006; Zanotto¹¹⁶, 2010; Fernandes et al.^{21,22}, 2017).

O desenvolvimento de enxertos biomiméticos eficazes pode contribuir significativamente para a recuperação e reintegração de milhares de pessoas que sofreram traumas ósseos extensos devido a acidentes automobilísticos, ferimentos por armas de fogo, explosivos ou mesmo neoplasias. A engenharia tecidual tem evoluído rapidamente nos últimos anos, mas, até o momento, ainda não há um material ideal para ser utilizado nos ferimentos de tamanho crítico.

A resolução destas deficiências pode depender do desenvolvimento de scaffolds baseados em novos biocompósitos ou novas combinações que apresentem um ajuste delicado de sua arquitetura. Apesar dos estudos mostrarem que o biovidro BS e os compósitos HA/PLA e HA/PLGA apresentarem isoladamente potencial para serem utilizados como enxertos/scaffolds no tocante a reparação óssea (Hench³⁷, 2006; Hollinger et al.³⁹, 2008; Zanotto et al.¹¹⁶, 2010; Shikinami et al.⁹¹, 1999; Petricca et al.⁷⁴, 2006; Kim et al.⁴⁹, 2006; Wei et al.¹⁰⁷, 2004; Watanabe et al.¹⁰⁶, 2004; Hasegawa et al.³², 2005; Shikinami et al.⁹⁰, 2005), ainda não existem estudos comparando a performance destas três formulações em defeitos críticos na calvária de ratos.

Em relação à HA, ela não oferece o suporte mecânico necessário para os grandes defeitos ósseos (Hayakawa et al.³⁴, 2010), devido à grande fragilidade mecânica do material.

Então, a associação dos polímeros PLA e PLGA à HA é vantajosa, visto que os mesmos podem atuar não apenas como um fator aglutinante para reduzir as deficiências da HA, mas também como uma matriz para manter a estrutura e poros para permitir a formação de um novo tecido ósseo.

Quanto à proporção entre HA presente nos compósitos, a concentração de 30% de HA foi eleita para fabricar os scaffolds de 30% HA/PLA e 30% HA/PLGA, visto que a literatura sugere que a concentração ideal de HA deve se manter até em 30% (He et al.³⁵, 2016). Os mesmos autores observaram em estudos in vivo que em faixas de concentrações superiores, o comportamento da biocompatibilidade, taxa de degradação e osteocondutividade pode ser prejudicado devido à uma elevação da alcalinidade do meio. Adicionalmente, em nenhum estudo já publicado na literatura a concentração de 30%HA foi empregada (Thanh et al.⁹⁷, 2015; Senatov et al.⁸⁷, 2016; Santos et al.⁸⁴, 2017; Zhang et al.¹¹⁷, 2011; Shirakata et al.⁹², 2014; He et al.³⁵, 2016), mostrando a importância da contribuição do presente estudo.

Além disso, nesse estudo, foram utilizadas duas formas de obtenção dos scaffolds: a manufatura aditiva (3D) e prensagem do biopolímero. A impressão 3D pode produzir scaffolds que atendam aos requisitos específicos relacionados a aplicações de engenharia de tecidos (Farahani et al.²⁰, 2014), com adequada geometria e uma maior acurácia dimensional para que as estruturas mais relevantes possam ser mimetizadas em detalhes (Xiong et al.¹¹¹, 2002, Yan et al.^{113,114}, 2003, 2005).

Autores ainda reportam as vantagens no processo de fabricação de scaffolds por meio da impressão 3D (Ishaug et al.⁴², 1994; Khan et al.⁴⁴, 2008; Wang et al.¹⁰⁴, 2016). Portanto, para acompanhar esta evolução tecnológica em termos de produção de scaffolds e observar se existe vantagem no fabrico de scaffolds 3D em relação às técnicas tradicionais de produção utilizadas nos demais materiais do estudo, optou-se em empregar a impressão 3D para fabricar os dispositivos através da extrusão de filamentos de 30% de HA/PLA, visando aplicações na regeneração do tecido ósseo. Segundo o fornecedor dos materiais avaliados

neste estudo, não foi possível confeccionar scaffolds 3D com o polímero PLGA, que apresentasse resistência mecânica adequada. Assim, os materiais fornecidos para este estudo foram: BS em pó, 30% HA/PLA impresso em 3D e scaffolds prensados de 30% HA/PLGA.

O compósito cerâmico-polimérico 3D 30% HA / PLA pode deter algumas vantagens ao ser comparado aos outros dois materiais empregados no estudo (30% HA/PLGA e BS) relacionadas ao tempo de degradação, biocompatibilidade e osteocondutividade. Os scaffolds poliméricos quando degradados resultam em monômeros ácidos que podem influenciar e causar maior inflamação na região implantada, contudo, devido à alcalinidade da HA ela pode atuar neutralizando a acidez local resultante da degradação dos monômeros do PLA e PLGA (Shen et al.⁸⁸, 2009; Huang et al.⁴⁰, 2009). A histologia demonstrou ausência de características inflamatórias significativas para ambos compósitos, corroborando com este fato.

Ainda em relação ao pH, no que tange o BS, sabe-se que uma liberação mais rápida de íons (Si, Ca, P e Na) ocorre imediatamente após o contato de BS com fluidos (Hench et al.³⁶, 2004), resultando em aumento de pH, tornando o meio mais alcalino. Isto explica que a longo prazo, o BS parece induzir uma formação óssea mais lenta e com taxas mais baixas que os grupos 30% HA/PLGA e 3D 30% HA/PLA, corroborando com os resultados histológicos bem como micro-ct e raios-x. Autores reportam que um pH mais fisiológico pode influenciar positivamente o comportamento celular e a formação óssea in vivo (Lu et al.⁶¹, 2005; Weizbauer et al.¹⁰⁸, 2016).

A caracterização dos materiais evidenciou a morfologia, estrutura e composição química dos scaffolds empregando MEV, EDS e FT-IR.

O MEV mostrou partículas não homogêneas, de diversos tamanhos em relação ao BS e a deposição das camadas características do processo de fabricação da manufatura aditiva do

compósito 3D 30%HA/PLA. Em relação ao compósito 30% HA/PLGA, este apresentou uma superfície e secção transversal mais regular (Figura 8).

Em maiores aumentos, as imagens obtidas pelo MEV demonstraram que o scaffold 3D 30% HA/PLA apresentou uma superfície mais lisa do que o 30%HA/PLGA (Figuras 9b e 10b), diferente do aspecto da secção transversal de ambos os scaffolds, que se mostrou mais porosa (Figuras 9c e 10c). Este aspecto de lisura pode ser explicado pelo processo de fabricação 3D empregado favorecendo o efeito de “glass melting” na superfície, como mencionado anteriormente.

Adicionalmente, o PLA e PLGA apresentam características hidrofóbicas. Estes dois fatores (lisura superficial e hidrofobicidade) combinados poderiam afetar a adesão e proliferação celular inicial (Lu et al.⁶¹, 2005; Weizbauer et al.¹⁰⁸, 2016). Entretanto, os achados histológicos demonstraram que os scaffold 3D 30%HA/PLA e 30%HA/PLA não impediram a regeneração e a neoformação óssea, comportando-se de maneira superior em relação ao grupo C e BS. Este resultado também está em concordância com a técnica de raios-x e micro-ct, sendo que a técnica de raios-x evidenciou um comportamento com diferença significativa em termos de reparo ósseo para o scaffold 3D 30%HA/PLA.

Quanto às demais técnicas de caracterização, a técnica EDX e FT-IR confirmaram a composição química e estrutural dos materiais aplicados no estudo, possibilitando a confirmação da presença de HA nos compósitos.

Após caracterizados, procedeu-se a implantação dos materiais nos animais de acordo com o desenho do estudo. Apesar de existir uma variedade de enxertos ósseos e implantes com utilidade na cirurgia oral e maxilofacial, avaliados em diversos tipos de protocolos experimentais, a literatura apresenta pouca consistência para que o investigador escolha um modelo animal apropriado para avaliação de reparo ósseo em defeitos críticos.

Existem vários modelos animais de defeitos críticos para avaliar o potencial de tratamentos para reparo de defeitos ósseos, dentre esses o modelo de DC em calvária de ratos apresenta maior facilidade de execução e condições que podem mostrar diferenças significativas entre os tratamentos por não necessitar fixação do implante, eliminando a presença de mais um material e passos clínicos adicionais (Gomes, Fernandes²⁷, 2011). Apesar de a literatura evidenciar ausência no consenso em termos do tamanho, o padrão relacionado aos roedores ainda é o defeito redondo de 8mm feito na calvária do rato (Mooney, Siegel⁶⁶, 2005; Lee et al.⁵⁵, 2001), utilizado no estudo.

A recuperação pós-operatória imediata foi sem intercorrências em todos os animais. Não foram observadas complicações visíveis, como exposição material, infecção ou supuração, nem no período pós operatório imediato bem como nos períodos de análise. Houve a perda de 9 animais relacionados ao grupo de 120 dias. Acreditamos que os motivos estão relacionados, principalmente, ao longo período de acompanhamento, uma vez que os animais foram submetidos a anestesia e expostos a radiações cumulativas resultantes dos escaneamentos do micro-ct, em cada sessão. Esta perda poderia, de certa forma influenciar a análise estatística. Contudo, devido ao fato de ser uma análise que acompanha o reparo no mesmo animal, ao longo do tempo, ela apresenta um grande poder de análise, que será discutida posteriormente.

Para avaliar o desempenho de reparo ósseo condicionado por cada tratamento foram utilizados 3 métodos: RX, micro CT e histologia. O fato de que o presente estudo emprega estas duas análises de imagens pode parecer redundante, contudo, o micro-ct apresenta vantagens em relação à técnica de raios-X. Além de uma maior acurácia, maior nitidez e qualidade da imagem, o micro-ct possibilita o acompanhamento da performance do biomaterial implantado no mesmo animal (Bouxsein et al.¹⁰, 2010) de maneira mais fácil, por não exigir técnicas específicas que seriam necessárias para realizar o mesmo acompanhamento por radiografias.

Esta vantagem que o micro-ct apresenta em relação ao Raio-x, permitiu uma avaliação mais precisa e real em relação à neoformação de tecido ósseo, sendo possível a realização de um estudo de medidas repetidas, de acordo com a estatística empregada. Um levantamento na literatura utilizando como estratégia de busca as palavras chaves “micro-ct” e “reparo ósseo” revelou que não há relatos de acompanhamento por micro-ct in vivo por um período tão longo quanto o estudado (120 dias), o que configura uma importante contribuição para a comunidade científica.

Em relação às análises de Raios-x e micro-ct, apesar de estarem baseadas em grandezas diferentes (área, em mm^2 e FVO, em %), foi possível observar uma coerência entre as mesmas. Ambas evidenciaram progresso em termos de reparo de tecido, seja por diminuição da área do defeito, que indica de maneira indireta a formação de novo tecido ósseo ou seja pelo cálculo da FVO de maneira direta, realizado pelo software CTan, cujos valores encontram-se em porcentagem. Assim, observa-se que ambas as análises demonstram que o BS parece se comportar de maneira semelhante ao grupo C, apresentando uma área final de 48.96 mm^2 e FVO de 6.08%. O compósito 30%HA/PLGA apresentou um comportamento diferente do grupo C, mas semelhante, ao 3D 30%HA/PLA, sendo que este demonstrou ser estatisticamente diferente dos demais apenas pela análise de raio-x, apresentando a maior redução da área do defeito (de $67,82$ para $35,80 \text{ mm}^2$), aos 120 dias.

E para corroborar com os resultados, a histologia estabeleceu o desempenho dos tratamentos e suportou aos achados do RX e micro-ct. Segundo Schmitz e Hollinger⁸⁹ (1986), o fechamento das feridas inicia-se pelas margens que se tornam irregulares pelo princípio da formação do osso lamelar e, o centro do defeito é geralmente preenchido com um tecido conjuntivo fibroso. A análise descritiva histológica permitiu observar para o BS vários pontos de calcificação e neoformação óssea dispersos no leito da ferida, provavelmente induzidos pelas partículas deste material espalhadas irregularmente por toda a ferida. A Figura 25 ainda

evidencia a presença de partículas remanescentes do BS em contato com as células inflamatórias.

De maneira geral, inicialmente observa-se a presença de um grande infiltrado inflamatório no grupo C cujo padrão não foi evidenciado nos demais grupos, sendo apenas possível identificar um tecido de granulação sendo formado. Adicionalmente, nota-se uma progressão da organização tecidual, deposição de matriz mineralizada e maturação das fibras colágenas. Aos 30 dias, nota-se nitidamente a formação de uma linha reversa com uma grande quantidade de osteoblastos em plena atividade de síntese de matriz óssea. Aos 60 dias, verifica-se que praticamente todos os grupos apresentam tecido neoformado compatível com o leito cirúrgico. Quando comparamos o grupo controle com os demais, nota-se uma faixa de formação óssea menor, com a presença de um "gap" na interface.

E por fim, aos 120 dias, observou-se uma estagnação no reparo dos tecidos em relação ao grupo C e BS. Quando comparados aos outros 2 materiais, eles aparentam uma maior consolidação, indicando que o reparo tecidual está em pleno processo de cicatrização.

Os biomateriais precisam resolver vários problemas, como a falta de compatibilidade entre a taxa de degradação do material e a taxa de crescimento ósseo, bem como uma falha de integração entre a rede óssea neoformada e vasos sanguíneos. O que pode ser observado em geral é que, apesar da diferença de composição e arquitetura entre os materiais, todos induziram uma certa regeneração tecidual quando comparada ao grupo controle.

Contudo, ao se relacionar os achados das análises raios-x e micro-ct, que acompanharam o fechamento da ferida, bem como o histológico, que avaliou a qualidade e maturação dos tecidos, os scaffolds 3D 30%HA/PLA e 30% HA/PLGA se comportaram de maneira superior aos demais tratamentos, sendo que o BS apresentou características de reparo muito semelhantes ao grupo C.

Assim, dentre os desafios futuros encontra-se a necessidade de se testar todos os materiais no mesmo formato, em scaffolds, sejam produzidos pela técnica 3D ou não.

Adicionalmente, melhorias quanto à arquitetura são necessárias para que os materiais possam ser potencialmente aplicados como opções na regeneração de outros tecidos, como polpa dentária, em cirurgias paraendodônticas e em outras áreas relacionadas com a engenharia de tecidos.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a hipótese nula deve ser rejeitada uma vez que existem diferenças significativas na composição e desempenho dos biomateriais testados. A caracterização química dos materiais realizada por EDS, FT-IR e morfológica por MEV mostrou diferenças relevantes em especial quando consideramos os scaffolds 3D 30% HA/PLA e 30% HA/PLGA, nos quais foi evidente uma superfície não porosa e pouco favorável ao reparo, enquanto o BS apresentou partículas irregulares dispersas.

Quanto à resposta histológica, nota-se uma progressão da organização tecidual, organização das fibras colágenas e deposição de matriz mineralizada, revelando a boa biocompatibilidade de todos os tratamentos, com a maior tendência de maturação de fibras colágenas e tecido ósseo para os scaffolds 3D 30% HA/PLA e 30% HA/PLGA.

Em relação à taxa de reparo ósseo, os materiais que apresentaram o desempenho estatisticamente superior foram o 3D 30% HA/PLA e 30% HA/PLGA quando analisados por radiografia e micro-ct. O conjunto destas análises indica que os tratamentos 3D 30% HA/PLA e 30% HA/PLGA configuram uma excelente opção em termos de reparo em defeitos ósseos críticos.

REFERÊNCIAS*

1. Akagi H, Iwata M, Ichinohe T, Amimoto H, Hayashi Y, Kannno N, et al. Hydroxyapatite/poly-L-lactide acid screws have better biocompatibility and femoral burr hole closure than does poly-L-lactide acid alone. *J Biomater Appl.* 2014; 28(6): 954-62.
2. An Y, Friedman R. Animal models of bone defect repair. In: An Y, Friedman R, eds. *Animal models in orthopaedic research*, Boca Raton: CRC Press; 1999. p. 241–60.
3. Araújo MG, Liljenberg B, Lindhe J. β -tricalcium phosphate in the early phase of socket healing: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21(4): 445-54.
4. Asti A, Gastaldi G, Dorati R, Saino E, Conti B, Visai L, et al. Stem cells grown in osteogenic medium on PLGA, PLGA/HA, and titanium scaffolds for surgical applications. *Bioinorg Chem Appl.* 2010; 83(1):1031-43.
5. Ayub LG, Novaes Júnior AB, Grisi MFM, Taba Junior M, Pallioto DB, Souza SLS. Regeneração óssea guiada e suas aplicações terapêuticas. *Braz J Periodontol.* 2011; 21(04): 39-45.
6. Barone A, Varanini P, Orlando B, Tonelli P, Covani U. Deep-frozen allogeneic onlay bone grafts for reconstruction of atrophic maxillary alveolar ridges: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67(6): 1300-6.
7. Barrere F, Mahmood TA, Groot K, Van Blitterswijk CA. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Mater Sci Eng.* 2008; 59(1): 38-71.
8. Block MS, Kent JN. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55(11):1281-6.
9. Boccaccini AR, Gough JE. *Tissue engineering using ceramics and polymers*. Cambridge, England: Woodhead Publishing; 2007. 624p.
10. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Mineral Res.* 2010; 25(7): 1468-6.
11. Buchardt H. The biology of bone repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983; (174): 28-42.
12. Chen KY, Shyu PC, Dong GC, Chen YS, Kuo WW, Yao CH. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. *Biomaterials.* 2009; 30(9): 1682-8.
13. Cheng Y, Deng S, Chen P, Ruan R. Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Front Chem Chin.* 2009; 4(3): 259-64.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

14. Chun KW, Yoo HS, Yoon JJ, Park TG. Biodegradable PLGA microcarriers for injectable delivery of chondrocytes: effect of surface modification on cell attachment and function. *Biotechnol Prog.* 2004; 20(6):1797-801.
15. Crespi R, Vinci R, Cappare P, Gherlone E, Romanos GE. Calvarial versus iliac crest for autologous bone graft material for a sinus lift procedure: a histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 22(4):527-32.
16. Danoux CB, Barbieri D, Yuan H, De Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Habibovic P. In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration. *Biomatter.* 2014; 4 (1): e27664.
17. Ding C, Qiao Z, Jiang W, Li H, Wei J, Zhou G, et al. Regeneration of a goat femoral head using a tissue-specific, biphasic scaffold fabricated with CAD/CAM technology. *Biomaterials.* 2013; 34 (28): 6706–16.
18. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 2004; 83(7): 523-8.
19. Fang Z, Feng QL. Improved mechanical properties of hydroxyapatite whisker reinforced poly(L-lactic acid) scaffold by surface modification of hydroxyapatite. *Mat Sci Eng C Mater.* 2014; 35: 190–4.
20. Farahani K, Chizary K, Therriault D. Three-dimensional printing of freeform helical microstructures: a review. *Nanoscale.* 2014; 6 (18): 10470-85.
21. Fernandes KR, Magri AMP, Kido HW, Parisi JR, Assis L, Fernandes KPS, et al. Biosilicate/PLGA osteogenic effects modulated by laser therapy: In vitro and in vivo studies. *J Photochem Photobiol B.* 2017; 173(2017): 258-65.
22. Fernandes KR, Magri AMP, Kido HW, Ueno F, Assis L, Fernandes KPS, et al. Characterization and biological evaluation of the introduction of PLGA into biosilicateVR. *J Biomed Mater Res Part B.* 2017; 105 (5):1063–74.
23. Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Prog Mater Sci.* 2001; 46(3): 273-82.
24. Gabbai-Armelin PR, Renno AC, Crovace MC, Magri AM, Zanotto ED, Peitl O, et al. Putty-like bone fillers based on CaP ceramics or Biosilicate® combined with carboxymethylcellulose: Characterization, optimization, and evaluation. *J Biomater Appl.* 2017; 32(2):276-88.
25. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(3): 3640-59.

26. Gerressen M, Hermanns - Sachweh B, Riediger D, Hilgers RD, Spiekermann H, Ghassemi A. Purely cancellous vs. corticocancellous bone in sinus floor augmentation with autogenous iliac crest: a prospective clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20(2): 109-15.
27. Gomes P, Fernandes M. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* 2011; 45(1): 14- 24.
28. Granito RN, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Mochiuti D, Jorgetti V, et al. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glassceramic (Biosilicate®): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;97(1):139-47.
29. Granito RN, Ribeiro DA, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Peitl-Filho O, et al. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J Mater Sci Mater Med.* 2009; 20(12): 2521-6.
30. Haider A, Gupta KC, Kang IK. PLGA/nHA hybrid nanofiber scaffold as a nanocargo carrier of insulin for accelerating bone tissue regeneration. *Nanoscale Res Lett.* 2014; 9(1): 314.
31. Hallman M, Lundgren S, Sennerby L. Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2001; 3(2): 87-96.
32. Hasegawa S, Tamura J, Neo M, Goto K, Shikinami Y, Saito M, et al. In vivo evaluation of a porous hydroxyapatite/poly-DL-lactide composite for use as a bone substitute. *J Biomed Mater Res A.* 2005; 75(3): 567-79.
33. Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2: 1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15(3): 339-45.
34. Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Yang F, Shen H, Wang S, et al. In vivo evaluation of composites of PLGA and apatite with two different levels of crystallinity. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21(1): 251-8.
35. He S, Lin K-F, Sun Z, Song Y, Zhao Y-N, Wang Z, et al. Effects of nano-hydroxyapatite/poly (DL-lactic-co-glycolic acid) microsphere-based composite scaffolds on repair of bone defects: evaluating the role of nano-hydroxyapatite content. *Artif Organs.* 2016; 40(7):E128–E135.
36. Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2004; 15(4):543–62.
37. Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci: Mater Med.* 2006; 17(11): 967-78.

38. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990; 1(1):60–8.
39. Hollinger JO, Onikepe AO, MacKrell J, Einhorn T, Bradica G, Lynch S, et al. Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-bb and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. *J Orthop Res.* 2008; 26(1): 83-90.
40. Huang M-N, Wang Y-L, Luo Y-F. Biodegradable and bioactive porous polyurethanes scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Sci Eng.* 2009; 2(1): 36-40.
41. International standard organization. ISO: 10993-6. Biological evaluation of medical devices- Part 5: tests for local effects after implantation. Switzerland: ISO; 2007.
42. Ishaug SL, Yaszemski MJ, Bizios R, Mikos AG. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res Part A.* 1994; 28(12): 1445-53.
43. Jones JR. Review of bioactive glass: from hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2013; 9(1): 4457–86.
44. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90(1):36-42.
45. Kido HW, Oliveira P, Parizotto NA, Crovace MC, Zanotto ED, Peitl-Filho O, et al. Histopathological, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of Biosilicate® glass–ceramic scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A.* 2013; 101(3): 667–73.
46. Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Parizotto NA, de Castro CA, Crovace MC, et al. Porous bioactive scaffolds: characterization and biological performance in a model of tibial bone defect in rats. *J Mater Sci: Mater Med.* 2015; 26(2): 74.
47. Kido HW, Brassolatti P, Tim CR, Gabbai-Armelin PR, Magri AMP, Fernandes KR, et al. Porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) acid/Biosilicate® composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B.* 2017;105(1):63–71.
48. Kim SS, Kim BS. Comparison of osteogenic potential between apatite-coated poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite particulates and Bio-Oss. *Dent Mater J.* 2008; 27(7): 368–75.
49. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim B-S. Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; 27(8): 1399-409.
50. Kohgo T, Yamada Y, Ito K, Yajima A, Yoshimi R, Okabe K, et al. Bone regeneration with self-assembling peptide nanofiber scaffolds in tissue engineering for osseointegration of dental implants. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2010; 31(4): e9-16.
51. Kokubo T. *Bioceramics and their clinical applications.* Boca Raton: CRC Press; 2008.

52. Kwak S, Haider A, Gupta KC, Kim S, Kang IK. Micro/nano multilayered scaffolds of PLGA and collagen by alternately electrospinning for bone tissue engineering. *Nanoscale Res Lett.* 2016; 11(1): 1-16.
53. Lanao RPF, Jonker AM, Wolke JGC, Jansen JA, Van Hest JCM, Leeuwenburgh SCG. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013; 19(4): 380–90.
54. Lasprilla AJR, Martinez GAR, Lunelli BH, Jardini AL, Filho RM. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. *Biotechnol Adv.* 2012; 30(1): 321-8.
55. Lee JY, Musgrave D, Pelinkovic D, Fukushima K, Cummins J, Usas A, et al. Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83(7): 1032–9.
56. Li D, Sun H, Jiang L, Zhang K, Liu W, Zhu Y et al. Enhanced biocompatibility of PLGA nanofibers with gelatin/nano-hydroxyapatite bone biomimetics incorporation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014; 6(12): 9402–10.
57. Li J, Lu XL, Zheng YF. Effect of surface modified hydroxyapatite on the tensile property improvement of HA/PLA composite. *Appl Surf Sci.* 2008; 255 (2): 494–7.
58. Li X, Zhang S, Zhang X, Xie S, Zhao G, Zhang L. Biocompatibility and physicochemical characteristics of poly (ϵ -caprolactone)/poly (lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Design.* 2017; 114(2017): 149-60.
59. Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat.* 2015; 3(3): 95-104.
60. Lim LT, Auras R, Rubino M. Processing technologies for poly(lactic acid). *Prog Polym Sci.* 2008; 33(8): 820–52.
61. Lu HH, Tang A, Oh SC, Spalazzi JP, Dionisio K. Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. *Biomaterials* 2005; 26(32): 6323–34.
62. Martins CHG, Carvalho TC, Souza MGM, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, et al. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. *J Mater Sci.* 2011; 22(6): 1439–46.
63. Matsumoto MA, Caviquioli G, Bigueti CC, de Andrade Holgado L, Saraiva PP, Rennó ACM, et al. A novel bioactive vitroc ceramic presents similar biological responses as autogenous bone grafts. *J Mater Sci: Mater Med* 2012; 23(6): 1447-56.
64. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 2000; 21(23): 2335-46.

65. Misch CM. Maxillary autogenous bone grafting. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2011; 23(2): 229-38.
66. Mooney MP, Siegel MI. Animal models for bone tissue engineering. In: Wnek G, Bowlin G, editors. *Encyclopedia of Biomaterials and biomedical engineering.* New York: Marcel Dekker; 2005. p. 1–19.
67. Morelli S, Salerno S, Holopainen J, Ritala M, De Bartolo L. Osteogenic and osteoclastogenic differentiation of co-cultured cells in Polylactic acid-nanohydroxyapatite fiber scaffolds. *J Biotechnol.* 2015; 204 (2015):53–62.
68. Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl-Filho O, Zanotto ED, Beloti MM, et al. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glassceramic (Biosilicate®). *J Biomed Mater Res A.* 2007; 82(3): 545-57.
69. Nazhat SN, Kellomäki M, Törmälä P, Tanner KE, Bonfield W. Dynamic mechanical characterization of biodegradable composites of hydroxyapatite and polylactides, *J. Biomed. Mater Res* 2001; 58 (4): 335–43.
70. Ogden K, Ordway N, Diallo D, Tillapaugh-Fay G, Aslan C. Dimensional accuracy of 3D printed vertebra. *Proc SPIE.* 2014; 9036: 903629. [acesso 2017 abr 25]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1117/12.2043489>.
71. Pan Z, Ding JD. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus.* 2012; 2(3). 366–77.
72. Park K, Ju YM, Son JS, Ahn KD, Han DK. Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2007; 18(4): 369–82.
73. Pawar RP, Tekale SU, Shisodia SU, Totre JT, Domb AJ. Biomedical applications of poly(lactic acid). *Recent Pat Regen Med.* 2014; 4(1): 40–51.
74. Petricca SE, Marra KG, Kumta PN. Chemical synthesis of poly (lactico- glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopaedic applications. *Acta Biomater.* 2006; 2(3): 277-86.
75. Pinto KNZ, Tim CR, Crovace MC, Matsumoto MA, Parizotto NA, Zanotto ED, et al. Effects of Biosilicate® scaffolds and low-level laser therapy on the process of bone healing. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31(6): 252-60.
76. Precheur HV. Bone graft materials. *Dent. Clin. North Am.* 2007; 51(3): 729-46.
77. Rakmae S, Ruksakulpiwat Y, Sutapun W, Suppakarn N. Effect of silane coupling agent treated bovine bone based carbonated hydroxyapatite on in vitro degradation behavior and bioactivity of PLA composites. *Mater Sci Eng C.* 2012; 32(6): 1428–36.

78. Rana M, Warraich R, Kokemüller H, Lemound J, Essig H, Tavassol F, et al. Reconstruction of mandibular defects—clinical retrospective research over a 10-year period. *Head Neck Oncol* 2011; 3(1): 23.
79. Ravagnani C. Biosilicate for oral health promotion [Masters dissertation]. São Carlos, Brazil: Federal University; 2003.
80. Renno ACM, McDonnell PA, Crovace MC, Zanotto ED, Laakso L. Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown in vitro on Biosilicate® scaffolds. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28 (1): 131–3.
81. Rogers GF, Greene AK, Mulliken JB, Proctor MR, Ridgway EB. Exchange cranioplasty using autologous calvarial particulate bone graft effectively repairs large cranial defects. *Plast Reconstr Surg*. 2011; 127(4): 1631-42.
82. Sánchez-Arévalo FM, Muñoz-Ramírez LD, Álvarez-Camacho M, Rivera-Torres F, Maciel-Cerda A, Montiel-Campos R, et al. Macro and micromechanical behaviors of poly(lactic acid)–hydroxyapatite electrospun composite scaffolds. *J Mater Sci*. 2017; 52 (6): 3353–67.
83. Santis ED, Botticelli D, Pantani F, Pereira FP, Beolchini M, Lang NP. Bone regeneration at implants placed into extraction sockets of maxillary incisors in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2011; 22(4): 430-7.
84. Santos D, Correia CO, Silva DM, Gomes PS, Fernandes MH, Santos JD, et al. Incorporation of glass-reinforced hydroxyapatite microparticles into poly(lactic acid) electrospun fibre mats for biomedical applications. *Mater Sci Eng C*. 2017; 75 (1): 1184–90.
85. Santos V. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte Y, editor. *Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico*. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 265-306.
86. Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris G, Sbordone C, Guidetti F. Implant success in sinus-lifted maxillae and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; 24(2): 316-24.
87. Senatov FS, Niaza KV, Zadorozhnyy MY, Maksimkin AV, Kaloshkin SD, Estrin YZ. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016; 57: 139–48.
88. Shen L, Yang H, Ying J, Qiao F, Peng M. Preparation and mechanical properties of carbon fiber reinforced hydroxyapatite/polylactide biocomposites. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20 (11): 2259–65.
89. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomaxillofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; (205): 299-308.

90. Shikinami Y, Matsusue Y, Nakamura T. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly L-lactide (Fu-HA/PLLA). *Biomaterials*. 2005; 26(27): 5542-51.
91. Shikinami Y, Okuno M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): part I. Basic characteristics. *Biomaterials*. 1999; 20(9): 859-77.
92. Shirakata Y, Nakamura T, Shinohara Y, Taniyama K, Sakoda K, Yoshimoto T, et al. An exploratory study on the efficacy of rat dedifferentiated fat cells (rDFATs) with a poly lactic-co-glycolic acid/hydroxylapatite (PLGA/HA) composite for bone formation in a rat calvarial defect model. *J Mater Sci Mater Med*. 2014; 25(3): 899–908.
93. Shuai CJ, Yang B, Peng SP, Li Z. Development of composite porous scaffolds based on poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite via selective laser sintering. *Int J Adv Manuf Technol*. 2013; 69(1-4): 51–7.
94. Silva ARDS, Ribeiro ACP, Salzedas LMP, Soubhia AMP, Sundefeld MLMM. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. *Rev Odonto Ciênc*. 2007; 22(55): 77-81.
95. Talal A, Waheed N, Al-Masri M, McKay IJ, Tanner KE, Hughes FJ. Absorption and release of protein from hydroxyapatite-polylactic acid (HA-PLA) membranes. *J Dent*. 2009; 37 (11): 820–6.
96. Tanodekaew S, Channasanon S, Kaewkong P, Uppanan P. PLA-HA scaffolds: preparation and bioactivity. *Procedia Eng*. 2013; 59 (2013): 144 – 9.
97. Thanh DTM, Trang PTT, Huong HT, Nam PT, Phuong NT, Trang NTT, et al. Fabrication of poly (lactic acid)/hydroxyapatite (PLA/HAp) porous nanocomposite for bone regeneration. *Int J Nanotechnol*. 2015; 12(5-7): 391–404.
98. Tirapelli C, Panzeri H, Lara EHG, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. *J Oral Rehabil*. 2011; 38(4): 253–62.
99. Villalobos CFE, Velasquillo MC, Martínez LV, Lecona BH, Reyes MB, Estrada VE, et al. Results of the experimental repair of osteochondral lesions in a pig model using tissue engineering. *Acta Ortop Mex*. 2007; 21(4): 217-23.
100. Vink ETH, Davies S. Life cycle inventory and impact assessment data for 2014 Ingeo™ Polylactide Production. *Ind Biotechnol*. 2015; 11(3): 167–80.
101. Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Tissue engineering: the next generation. *Tissue Eng*. 2006; 12(12): 3261-3.
102. Wan DC, Nacamuli RP, Longaker MT. Craniofacial bone tissue engineering. *Dent Clin North Am*. 2006; 50(2): 175-90.

103. Wang DX, He Y, Bi L, Qu Z-H, Zou J-W, Pan Z, et al. Enhancing the bioactivity of Poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold with a nanohydroxyapatite coating for the treatment of segmental bone defect in a rabbit model. *Int J Nanomed* 2013;8:1855–65.
104. Wang M, Favi P, Cheng X, Golshan NH, Ziemer KS, Keidar M, Webster TJ. Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2016; 46 (2016) 256–65.
105. Wang ZY, Zhao YM, Wang F, Wang J. Syntheses of poly(lactic acid-co-glycolic acid) serial biodegradable polymer materials via direct melt polycondensation and their characterization. *J Appl Polym Sci*. 2006; 99 (1): 244–52.
106. Watanabe T, Ban S, Ito T, Tsuruta S, Kawai T, Nakamura H. Biocompatibility of composite membrane consisting of oriented needle-like apatite and biodegradable copolymer with soft and hard tissues in rats. *Dent Mater J*. 2004; 23(4): 609-12.
107. Wei G, Ma PX. Structure and properties of nanohydroxyapatite/ polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2004; 25(19): 4749-57.
108. Weizbauer A, Kieke M, Rahim MI, Angrisani GL, Willbold E, Diekmann J, et al. Magnesium-containing layered double hydroxides as orthopaedic implant coating materials: an in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016;104(3):525-31.
109. Weng Y, Cao Y, Arevalo C, Vacanti MP, Vacanti CA. Tissueengineered composites of bone and cartilage for mandible condylar reconstruction. *J Oral Max Surg*. 2001; 59(2): 185-90.
110. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009; 30(30): 5897-909.
111. Xiong Z, Yan Y, Wang S, Zhang R, Zhang C. Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition. *Scr Mater*. 2002; 46 (11): 771–6.
112. Xu C, Su P, Chen X, Meng Y, Yu W, Xiang AP, et al. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32(4): 1051-8.
113. Yan Y, Wang X, Pan Y, Liu H, Cheng J, Xiong Z, et al. Fabrication of viable tissueengineered constructs with 3D cell-assembly technique. *Biomaterials*. 2005; 26 (29): 5864–71.
114. Yan Y, Xiong Z, Hu Y, Wang S, Zhang R, Zhang C. Layered manufacturing of tissue engineering scaffolds via multi-nozzle deposition. *Mater Lett*. 2003; 57 (18): 2623–8.
115. Zanotto ED, Ravagnani C, Peitl O, Panzeri H, Lara EHG, inventores; Fundação Universidade Federal de São Carlos, depositante. Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments. Unites Satets patent US 20060251737 A1, 2006 nov 9.
116. Zanotto ED. Bright future for glass-ceramics. *Am Ceram Soc Bull*. 2010; 89(8): 19–27.

117. Zhang P, Wu H, Lu Z, Deng C, Hong Z, Jing X, et al. Rgd-conjugated copolymer incorporated into composite of poly(lactide-co-glycolide) and poly(L-lactide)-grafted nanohydroxyapatite for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*. 2011; 12(7): 2667–80.
118. Zhou SB, Deng XM, Li XH, Jia WX, Liu L. Synthesis and characterization of biodegradable low molecular weight aliphatic polyesters and their use in protein-delivery systems. *J Appl Polym Sci*. 2004; 91(3): 1848–56.

ANEXO

Certificado do comitê de Ética.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado ***"EFEITO DE BIOSSILICATO, HIDROXIAPATITA/ ÁCIDO POLILÁCTICO, HIDROXIAPATITA/POLI(ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) E CELULOSE BACTERIANA/FIBROINA NA REGENERAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS CRÍTICOS. ESTUDO IN VIVO POR HISTOLOGIA E MICRO CT"***, protocolo nº 21/2015, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Osmir Batista de Oliveira Junior** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 08/12/2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/2016
Espécie/linhagem	Rato – Holtzmann
Nº de animais	120
Peso/Idade	350g – 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Não autorizo a reprodução deste trabalho até dia 20/09/2019

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 20 de setembro de 2017.

Hélida Gomes de Oliveira Barud