



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MARINA SANTOS FERNANDES

**ANÁLISE COMPARATIVA DE NOVOS COMPÓSITOS A BASE
DE POLÍMERO ASSOCIADO A DIFERENTES VIDROS
BIOATIVOS: estudo *in vitro* e *in vivo***

2023

MARINA SANTOS FERNANDES

**ANÁLISE COMPARATIVA DE NOVOS COMPÓSITOS A BASE DE
POLÍMERO ASSOCIADO A DIFERENTES VIDROS BIOATIVOS:
*estudo in vitro e in vivo***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Biomateriais. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de biomateriais em saúde bucal.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Fernandes, Marina Santos

Análise comparativa de novos compósitos a base de polímero associado a diferentes vidros bioativos: estudo in vitro e in vivo / Marina Santos Fernandes. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.

93 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientadora: Luana Marotta Reis De Vasconcellos.

1. Engenharia tecidual. 2. Osteogênese. 3. Regeneração óssea. 4. Pcl. 5. Vidro bioativo. I. De Vasconcellos, Luana Marotta Reis, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A regeneração óssea é um desafio clínico em casos de lesões ou doenças ósseas, e com o avanço da tecnologia e dos tratamentos existentes, os biomateriais vêm se mostrando um aliado no tratamento destas injúrias, oferecendo suporte estrutural e melhores condições para a regeneração do tecido acometido. Nesta pesquisa, foi avaliada a produção de novos compósitos, bem como seu comportamento *in vitro* e *in vivo* visando a otimização do reparo ósseo. A metodologia segue o Nível de Maturidade Tecnológica (TRL/MRL) e os resultados obtidos evidenciam o sucesso na produção desses novos biomateriais, bem como informações relevantes quanto à biocompatibilidade e potencial osteogênico/reparador desses *scaffolds*. Esta investigação contribui para a expansão do conhecimento científico, e permite futuras investigações a nível clínico dos biomateriais estudados.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Bone regeneration poses a clinical challenge in cases of bone injuries or diseases. With advancements in technology and existing treatments, biomaterials have emerged as allies in the treatment of these injuries by providing structural support and improving conditions for tissue regeneration. This research aimed to evaluate the production of new composites and their behavior in vitro and in vivo to optimize bone repair. The methodology follows the Technology Readiness Level (TRL/MRL), and the results obtained demonstrate the successful production of these new scaffolds, as well as relevant information regarding their biocompatibility and osteogenic/repair potential. This investigation contributes to the expansion of scientific knowledge and enables future clinical investigations of the studied biomaterials.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Profa. Assoc. Roberta Okamoto

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP

Araçatuba

Profa. Assoc. Andrea Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

São José dos Campos, 28 de agosto de 2023.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me sustentar a todo momento, iluminar minha jornada e sempre guiar meu caminho.

À minha família, por todo apoio e incentivo à minha educação, essa é a herança mais preciosa que podemos deixar.

Ao meu irmão, Carlos, que sempre cuidou de mim com muito carinho, mas que durante esse período não mediu esforços para me ver bem. Você é minha maior inspiração!

À minha orientadora, Prof^a. Luana, você sempre foi muito mais que uma orientadora. Obrigada por acompanhar meu crescimento profissional e pessoal ao longo desses anos, e sempre torcer por mim.

À Prof^a Andrea Carvalho de Marco e Prof^a Roberta Okamoto, pelo aceite na banca de defesa, e por tirarem esse momento para contribuir na minha formação.

Ao meu namorado, Luccas, que com muita paciência e amor, me motiva e me incentiva a correr atrás dos meus sonhos. A caminhada fica mais leve ao seu lado.

Às minhas amigas Beatriz e Elisa. O tempo passa, a distância muda, a vida muda, e a nossa amizade só se fortalece. Obrigada por tanto!

Às minhas amigas da vida: Mariana, Tainá, Jacqueline e Rafaela. Eu amo compartilhar a vida com vocês!

À Gabriele, Isabela e Isadora, por transformar nossa casa em um lar, e trazer riso até nos dias mais cinzas.

Às amigas que o mestrado me deu, Gabriela, Letícia e Sarah. Vocês foram meu braço direito e trouxeram leveza quando tudo estava dando errado. Sou muito grata pela amizade que construímos.

Aos meus colegas de laboratório e biotério: Hugo, Ju Lupp, Juliani, Leo, Mari, Vini, Thays, Bia, Júlia, Elisa e Joyce, pela ótima convivência, parceria e responsabilidade durante todos os momentos, torço muito por todos vocês!

Ao Prof. Tiago Campos e Prof. Gilmar Thim, por abrir as portas do ITA e pela imensa parceria ao desenvolver esse trabalho.

Aos docentes do ICT UNESP, em especial ao Prof. Alexandre Borges, pela parceria nesse trabalho, por acreditar no meu potencial e ter plantado a semente do intercâmbio em mim. E à Profa. Renata Falchete, que conseguiu simplificar

conceitos e compartilhou comigo sua maneira de ver a ciência, admiro muito sua paixão pela pesquisa!

À Lais Morandini, Prof. Rene e todo o grupo do Olivares-Navarrete Lab por me receberem de braços abertos em outro laboratório e outro país, vocês não mediram esforços para que eu aprendesse. Essa experiência foi extremamente enriquecedora para o meu crescimento.

Aos funcionários do ICT UNESP, e ao programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB) que me acompanharam e me auxiliaram durante todo esse período. Especialmente à Carla, Carlos Guedes, Carol, Sandra, Sérgio, Domingos, Valéria e Rafa, obrigada pelo suporte durante o desenvolvimento da minha pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas de Mestrado Acadêmico e Estágio de Pesquisa no Exterior (Processo 2021/09544-0 e 2022/09045-6).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa durante o período de abril/2021 - abril/2022 (Processo: 130596/2021-3).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos animais que foram utilizados nesta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

“Uma criança, um professor, um livro e uma caneta podem mudar o mundo.”

Malala Yousafzai

RESUMO

Fernandes MS. Análise comparativa de novos compósitos a base de polímero associado a diferentes vidros bioativos: estudo *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

O avanço no campo da engenharia tecidual e biomateriais conduz ao aprimoramento dos tratamentos e tecnologias já existentes, visando otimizar a resolução de injúrias e permitir tratamentos cada vez mais eficientes para a população. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar *scaffolds* de policaprolactona (PCL) incorporadas com três formulações diferentes de vidro bioativo, bem como avaliar a influência destas na osteogênese *in vitro* e na neoformação óssea *in vivo*. Para isso, foram obtidos quatro grupos experimentais: PCL (P), PCL incorporado com o vidro bioativo 45S5 (P45), PCL incorporado com o vidro bioativo S53P4 (P53) e PCL incorporado com o vidro bioativo 58S (P58). A síntese de todos os vidros foi realizada pela rota Sol-Gel, os quais foram incorporados à solução de PCL previamente à produção dos *scaffolds* por meio do processo de eletrofiação. Posteriormente à caracterização morfológica e físico-química, os *scaffolds* foram submetidas aos testes biológicos *in vitro* e *in vivo*. Na etapa *in vitro*, células da medula óssea obtidas de fêmures de ratos foram isoladas e plaqueadas com os *scaffolds*, visando avaliar a influência destas na atividade e diferenciação celular na osteogênese. Para o ensaio *in vivo*, 30 ratos Wistar foram submetidos ao procedimento cirúrgico para confecção de um defeito crítico de 3,0 mm nas tíbias direita e esquerda para avaliação dos *scaffolds*. A eutanásia dos animais foi realizada após 4 semanas do procedimento cirúrgico, e as peças foram submetidas à análise histológica, imuno-histoquímica (IHC), histomorfométrica e ao teste biomecânico de flexão de três pontos. Os dados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste ANOVA um fator, com nível de significância adotado de 5%. A caracterização morfológica e físico-química evidenciou o sucesso da referida metodologia em confeccionar o novo biomaterial. Na análise *in vitro*, observou-se que os *scaffolds* não foram citotóxicos, e permitiram atividade e diferenciação celular, sendo que o grupo P exibiu maior conteúdo de proteína total ($p < 0,05$) em ambos os períodos analisados, e os grupos P53 e P58 exibiram maior atividade de fosfatase alcalina (ALP), não diferindo entre si ($p > 0,0001$) enquanto P exibiu menor atividade, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). Todos os grupos permitiram a formação de nódulos de mineralização, e foi observado maior quantificação de Alizarina nos grupos P45, P53 e P58 quando comparados ao grupo P ($p < 0,05$). Na análise histológica foi observada a presença de neoformação óssea na região do defeito crítico em todos os grupos. A IHC evidenciou a imunomarcagem por osteocalcina (OC) e TRAP. Na análise histomorfométrica foi observada maior formação nos grupos P45 e P53, os quais não diferiram entre si ($p > 0,0001$). O teste

biomecânico evidenciou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$) ao avaliar a força de ruptura das tíbias. Os resultados evidenciaram o sucesso na produção do novo compósito, sendo que os grupos contendo vidro bioativo, em especial o grupo P53, se mostraram mais osteoativos e osteocondutores quando comparado ao grupo P, e evidenciam o potencial uso na engenharia tecidual.

Palavras-chave: biomateriais; engenharia tecidual; nanofibras; osteogênese; regeneração óssea; vidro bioativo.

ABSTRACT

Fernandes MS. Comparative analysis of novel polymer-based composites associated with different bioactive glasses: *in vitro* and *in vivo* study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

Advancements in the field of tissue engineering and biomaterials lead to the enhancement of existing treatments and technologies, aiming to optimize injury resolution and enable increasingly efficient treatments for the population. Thus, the objective of this study was to produce and characterize polycaprolactone (PCL) scaffolds incorporated with three different formulations of bioactive glass, as well as to evaluate their influence on *in vitro* osteogenesis and *in vivo* bone neoformation. To achieve this, four experimental groups were established: PCL (P), PCL incorporated with 45S5 bioactive glass (P45), PCL incorporated with S53P4 bioactive glass (P53), and PCL incorporated with 58S bioactive glass (P58). The synthesis of all glasses was carried out via the Sol-Gel route, and they were subsequently integrated into the PCL solution prior to scaffold production through the electrospinning process. Following morphological and physicochemical characterization, the scaffolds underwent *in vitro* and *in vivo* biological testing. In the *in vitro* phase, bone marrow cells obtained from rat femurs were isolated and plated with the scaffolds to assess their influence on cellular activity and differentiation in osteogenesis. For the *in vivo* assay, 30 Wistar rats underwent a surgical procedure to create a 3.0 mm critical defect in the right and left tibias for the evaluation of the scaffolds. Euthanasia of the animals was performed after 4 weeks of the surgical procedure, and the specimens were subjected to histological analysis, immunohistochemistry (IHC), histomorphometric analysis, and a three-point bending biomechanical test. The data obtained were statistically analyzed using a one-way ANOVA with a significance level set at 5%. Morphological and physicochemical characterization confirmed the success of the aforementioned methodology in fabricating the new biomaterial. In the *in vitro* analysis, it was observed that the scaffolds were not cytotoxic and allowed for cellular activity and differentiation. Group P exhibited a higher total protein content ($p < 0.05$) in both analyzed periods, and groups P53 and P58 displayed greater alkaline phosphatase (ALP) activity, with no significant difference between them ($p > 0.0001$), while P exhibited lower activity, differing statistically ($p < 0.05$). All groups supported the formation of mineralization nodules, with a higher quantification of Alizarin observed in the P45, P53, and P58 groups compared to the P group ($p < 0.05$). Histological analysis revealed the presence of bone neoformation in the critical defect region in all groups. IHC showed immunolabeling for osteocalcin (OC) and TRAP. Histomorphometric analysis revealed greater formation in the P45 and P53 groups, which did not differ from each other ($p > 0.0001$). The biomechanical test indicated no statistically significant difference between the groups ($p > 0.05$) when evaluating tibial rupture strength. The results demonstrated the success in producing the new composite, with the bioactive glass-containing groups, especially the P53 group, showing greater osteoactivity and osteoconductivity compared to the P group, highlighting their potential for use in tissue engineering.

Keywords: biomaterials; bioactive glass; bone regeneration; nanofibers; osteogenesis; tissue engineering.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Aspectos éticos	24
4.2 Síntese dos compósitos	24
4.2.1 Síntese dos vidros bioativos 45S5, S53P4 e 58S.....	24
4.2.2 Síntese da solução de PCL.....	25
4.2.3 Síntese da solução de PCL com os vidros bioativos	25
4.2.4 Eletrofiação das mantas	26
4.3 Caracterização morfológica das amostras.....	28
4.3.1 Análise da topografia superficial das amostras (MEV-FEG).....	28
4.3.2 Análise do diâmetro médio das fibras poliméricas	29
4.3.3 Análise da molhabilidade.....	30
4.4 Caracterização físico-química.....	31
4.4.1 Espectroscopia Raman	31
4.4.2 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	31
4.4.3 Análise termogravimétrica (TGA).....	31
4.5 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	32
4.5.1 Isolamento e cultura celular	32
4.5.2 Determinação da viabilidade celular	35
4.5.3 Análise do conteúdo de proteína total.....	35
4.5.4 Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)	35
4.5.5 Formação e quantificação de Alizarina nos nódulos de mineralização	36
4.5.6 Análise da morfologia celular por imunofluorescência	36
4.5.7 Interação celular	37
4.6 Ensaios <i>in vivo</i>	37
4.6.1 Procedimento cirúrgico	38
4.6.2 Teste de flexão de três pontos	40
4.6.3 Análise histológica e histomorfométrica.....	42

4.6.4 Análise imuno-histoquímica (IHC)	43
5 RESULTADO	45
5.1 Caracterização morfológica das amostras.....	45
5.1.1 Análise da topografia superficial das amostras	45
5.1.2 Análise do diâmetro médio das fibras	47
5.1.3 Análise da molhabilidade.....	48
5.2 Caracterização físico-química das amostras	50
5.2.1 Espectroscopia Raman	50
5.2.2 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	51
5.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA).....	54
5.3 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	55
5.3.1 Determinação da viabilidade celular.....	55
5.3.2 Análise do conteúdo de proteína total.....	56
5.3.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)	57
5.3.4 Formação e quantificação de Alizarina nos nódulos de mineralização....	58
5.3.5 Análise da morfologia celular por imunofluorescência	60
5.3.6 Interação celular	61
5.4 Ensaios <i>in vivo</i>	63
5.4.1 Avaliação biomecânica	63
5.4.2 Análise histológica.....	64
5.4.3 Análise histomorfométrica	67
5.4.4 Análise imuno-histoquímica.....	68
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO A	92

1 INTRODUÇÃO

Injúrias ósseas podem levar à incapacidade e diminuição na qualidade de vida dos pacientes devido à ocorrência de fraturas e doenças de comportamento agudo ou crônico (laquinta et al., 2019). Associado a isso, novos tratamentos e o aprimoramento daqueles já existentes para sanar estas ocorrências têm permitido o controle de diversas doenças e emergências, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, e a expectativa de vida da população (Codrea et al., 2021). Esses tratamentos podem ser realizados por meio de enxertia óssea e terapia celular, em associação com biomateriais biocompatíveis e com propriedades de osteoindução e osteocondução (Martin, Bettencourt, 2018). Dentro da enxertia óssea, os enxertos autógenos apresentam-se como primeira opção nestes procedimentos devido ao transplante de células vivas com capacidade osteogênica, ausência de resposta imunológica, menor grau de inflamação e infecção, e ausência de risco de transmissão de doenças infectocontagiosa (Loyola et al., 2018). Contudo, devido a limitação da disponibilidade óssea, necessidade de dupla abordagem devido a intervenção na área doadora, faz-se necessário o aprimoramento de novas técnicas e biomateriais que auxiliem, aliado ao desenvolvimento de biomateriais que auxiliem no reparo ósseo.

Dessa forma, o estudo de biomateriais para substituição óssea visa não apenas a recuperação de um tecido previamente perdido, mas também o aprimoramento de biomateriais que permitam a formação de ligações bioativas entre o sítio acometido e os tecidos duros e moles adjacentes (Cottrill et al., 2020; Drago et al., 2018; Turnbull et al., 2018).

O vidro, cuja composição faz parte do sistema $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5$ é classificado como um vidro soda-cal, e tem recebido destaque por ter originado o conceito de bioatividade, devido sua capacidade de promover uma ligação química estável entre a interface osso/biomaterial (Hench, 1972) e formar cristais de hidroxiapatita que irão se incorporar aos constituintes orgânicos do tecido ósseo (Hench, West, 1996). Contudo, por apresentar baixas propriedades

mecânicas, ele deve ser associado a outros materiais que atuem como esqueleto temporário para fixação, proliferação e diferenciação de células, além de ser capaz de ser absorvido permitindo o crescimento de novos tecidos (Bellucci et al., 2012). Os vidros bioativos já apresentam uso consolidado como soluções de muitos casos na medicina regenerativa, como na regeneração óssea guiada, enxertos ósseos, substituição e reconstrução de outros órgãos (Krishnan, 2016). Na odontologia também podem ser utilizados no tratamento de hipersensibilidade dentinária por meio da remineralização dos túbulos dentinários (Davari AR., et al. 2013), no tratamento endodôntico são usados como cimentos endodônticos e medicação intracanal (Gubler et al., 2008), na cirurgia são aplicados para preenchimento de defeitos ósseos em cirurgias periodontais (Profeta, Prucher, 2015; Sohrabi, 2012) e em implantodontia, bem como na fabricação de implantes dentários com revestimento bioativo (Gomez-Vega et al., 2000).

A literatura evidencia diferentes composições e formas de fabricação dos vidros bioativos (Rahaman et al., 2011). Em relação à composição, o que irá diferenciá-los é a proporção de silício, cálcio, fósforo e sódio presentes, sendo que alterações nestas proporções modificam o tempo de dissolução de cada um e a liberação dos íons. A primeira formulação de vidro bioativo foi o 45S5, comercializado sob o nome Bioglass®, cuja formulação é 45% SiO_2 – 24,5% Na_2O -24,5% CaO - 6% P_2O_5 . Este vidro foi produzido por Larry Hench (1969), com propriedade de biocompatibilidade e bioatividade, e é considerada a formulação com maior efeito osteogênico devido a ligação química da interface osso/material. O vidro bioativo S53P4 foi desenvolvido com 53% de SiO_2 em massa e fórmula final 53% SiO_2 - 23% Na_2O - 20% CaO - 4% P_2O_5 (Forsback et al., 2004). Estudos têm demonstrado que em contato com os fluídos corpóreos, esta formulação promove aumento do pH tecidual, que subsequentemente exibe efeito osmótico causado pela dissolução do vidro no meio fisiológico promovendo efeitos antibacteriano e angiogênico (Allan et al., 2001, Aurégan et al., 2015, Godoy-Santos et al., 2019). Posteriormente foi desenvolvido o vidro bioativo 58S, com 58% de SiO_2 em massa e fórmula final 58% SiO_2 - 23% CaO : 9% P_2O_5 (Joughehdoust, Manafi, 2012), que apresenta menor tamanho de partícula, solubilização mais rápida, levando à formação de hidroxiapatita em sua superfície

e tendência a neutralizar o pH ácido proveniente de degradações (Luo et al., 2017), sendo que para compósitos esta formulação promove soluções mais homogêneas (Polymeris et al., 2017).

O entendimento da composição e estrutura dos vidros bioativos são essenciais para definir suas propriedades, e principalmente, sua aplicação (Brauer, 2015). Além da proporção dos elementos na composição, atualmente também tem sido estudado a substituição de íons na formulação dos vidros bioativos, de maneira a melhorar suas propriedades físico-químicas. Uma substituição já bem estabelecida na literatura é a do óxido de cálcio (CaO) pelo fluoreto de cálcio (CaF₂), essa irá promover a formação de fluorapatita, menos solúvel em ambiente ácido do que a hidroxiapatita. Contudo, atualmente tem sido avaliada a substituição do óxido de cálcio (CaO) pelo cloreto de cálcio (CaCl), nessa formulação o cloreto de cálcio reage, entrando na estrutura formando silício, oxigênio, cálcio e cloro. O interesse no cloro, também da família dos halogênios, se dá pelo fato que este pode gerar uma estrutura de vidro mais aberta e menos compacta, isso irá promover uma dissolução mais rápida, e formação de apatita em menor tempo (Chen et al., 2015; Chen et al., 2017; Ribas et al., 2020).

Todas as composições desses vidros permitem associação com matrizes poliméricas (Gomes et al., 2015; da Fonseca et al., 2020), as quais têm despertado interesse no campo de engenharia tecidual devido a facilidade de fabricação, variação na composição (podendo ser de polímeros sintéticos ou naturais) e estrutura do *scaffold* – resultando em fibras com diâmetros que variam de dezenas de nanômetros à alguns micrômetros. Entre os polímeros mais utilizados destaca-se a policaprolactona (PCL) devido a característica de ser biodegradável, biocompatível, e apresentar-se como alternativa para mimetização da matriz extra-celular (Park et al., 2019; Calori et al., 2020).

Faz-se necessário um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e a arquitetura do biomaterial, que deve exibir adequada porosidade para permitir neovascularização, proliferação celular e crescimento tecidual. Diversos estudos têm demonstrado vantagens na fabricação de *scaffolds* de polímeros pela técnica de eletrofiação, sendo que estas permitem reproduções das matrizes de nanofibras poliméricas para diferentes tecidos. Analisando a regeneração óssea,

Marra et al. (1999) relataram que o *scaffold* de PCL como matriz de apoio para migração e diferenciação celular pode ser comparável ao substrato celular presente na osteogênese. Recentemente, Rajzer et al. (2019) avaliaram *in vitro* o uso de *scaffolds* de PCL dopada com vidro bioativo e o íon terapêutico Zinco (Zn) como possíveis componentes de implantes para reconstruções ósseas e cartilaginosas do nariz, mostrando resultados positivos tanto na fabricação do biomaterial quanto na atividade e diferenciação osteoblástica.

Apesar do uso consolidado no mercado, não há um consenso quanto à composição e formulação dos vidros na regeneração óssea, desse modo, a avaliação de *scaffolds* de PCL incorporadas com diferentes vidros bioativos, 45S5, 58S e S53P4, produzidas no mesmo momento, pela mesma técnica é inédita e se faz necessária para determinar as propriedades de cada vidro e seu potencial regenerativo quando incorporado em *scaffolds* poliméricos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O avanço tecnológico tem permitido o melhor entendimento no campo da medicina e biotecnologia, levando ao conhecimento da fisiologia humana a nível molecular e estudos em dimensões nanométricas. Esse padrão resulta no aprimoramento de tratamentos já existentes, e nesse contexto encontra-se o conceito de medicina regenerativa e engenharia tecidual.

A medicina regenerativa surgiu há cerca de 30 anos com o intuito de substituir, manter ou regenerar tecidos humanos (Langer, Vacanti, 1993). Apresentando um caráter multidisciplinar, ela visa integrar conhecimentos da engenharia – para construir diferentes arcabouços -, da física e química – para controlar as interações de superfície e matéria - e da medicina – para entender como esses novos dispositivos e biomateriais podem ser implantados e aceitos pelo organismo humano.

Para um biomaterial ser considerado adequado para uso médico-odontológico, ele deve apresentar algumas características, como: fácil disponibilidade; adequado custo-benefício; não toxicidade; facilidade de manuseio e modelagem durante o ato cirúrgico; abordagem cirúrgica única; não comprometimento de procedimentos pós-operatórios - como tomografias computadorizadas, ressonância magnética e coleta de sangue, por exemplo. Além disso, é imprescindível que o biomaterial seja biocompatível com o sítio no qual será implantado (Cannio et al., 2021).

O dinamismo e potencial regenerativo do tecido ósseo, associado a biomateriais, permite a osteocondução (Florencio-Silva et al., 2015). Dessa maneira, diversos materiais têm sido avaliados no campo da medicina e odontologia com a finalidade de substituir ou regenerar o tecido ósseo (Marin et al., 2020).

Contudo, tendo como finalidade a regeneração, e não apenas a substituição do osso por um material inerte, é imprescindível que o biomaterial seja bioativo. O conceito de bioatividade surgiu na década de 60, com a hipótese de Hench em descobrir um material apto a formar uma camada de hidroxiapatita na interface com o osso, resultando na descoberta do Bioglass®. A descoberta da propriedade de bioatividade e o vidro revolucionaram o campo da medicina regenerativa ao

entender que os materiais podem promover uma ligação química estável e, conseqüentemente, mimetizar cada vez mais o tecido ou órgão alvo (Henkel et al., 2013).

Hench et al. (1972) descreveram que quando a proporção dos componentes minerais é alterada, as propriedades do vidro também mudam, o que pode ser adequado para diferentes aplicações em diferentes regiões do corpo. Diversos estudos trabalham com diferentes composições de vidros bioativos visando avaliar a variação da dissolução de cada um e a liberação dos íons na regeneração óssea (Sun et al., 2007).

A formulação original do Bioglass® contém 45% SiO₂-24,5% Na₂O-24,5% CaO-6% P₂O₅, contudo, com o passar dos anos outras formulações bioativas foram sendo estudadas, entre elas, os vidros S53P4 (Eriksson et al., 2021; Forsback et al., 2004) e o 58S (Gong et al., 2012; Joughehdoust, Manafi, 2012). Hoje já se sabe que combinando ou alterando os componentes citados acima, diferentes vidros bioativos podem ser desenvolvidos, mostrando propriedades promissoras dependentes da composição – como propriedades antibacterianas, de degradabilidade em meio fisiológico, bem como regeneração de tecidos moles, e cicatrizante de feridas (Ali et al., 2014; Miguez-Pacheco et al., 2015).

Ademais, algumas formulações já são comercialmente disponíveis e utilizadas no campo médico-odontológico. Os dois principais vidros bioativos comercializados baseados na formulação do Bioglass® são o PerioGlas® (NovaBone Products LLC_Alachua FL, EUA) e o BioGran® (BIOMET 3i™). Outras formulações também já são comercializadas e altamente utilizadas, entre elas o próprio S53P4, comercializado sob o nome Bonalive® e amplamente utilizado no tratamento de osteomielite e tratamentos infecciosos (Aurégan et al., 2022; Kastrin et al., 2021; Steinhäusen et al., 2021).

Drago et al. (2013) avaliaram a atividade antibacteriana do vidro S53P4 *in vitro* e relataram uma série de casos clínicos para avaliar o tratamento da osteomielite com desbridamento cirúrgico e aplicação local do vidro S53P4 em pacientes. Os resultados *in vitro* e *in vivo* confirmaram os efeitos positivos desse biomaterial, principalmente por estudos passados já terem correlacionado essa composição de vidro bioativo com alterações no meio fisiológico que tornam o

ambiente hostil à adesão bacteriana e proliferação subsequente de microrganismos que causam infecção.

Vogel et al. (2001) avaliaram os vidros 45S5, 52S e 55S *in vivo*, por meio de defeitos ósseos na epífise distal femoral de coelhos e observaram que o vidro 45S5 mostrou a maior cinética de ligação óssea e as maiores taxas de degradação, estudos anteriores já evidenciam o maior efeito osteogênico dessa formulação (Jones et al., 2016, Oonishi et al., 1997).

Wheeler et al. (2000) compararam os vidros bioativos 45S5, 58S e 77S em defeitos ósseos femorais distais de tamanho crítico em coelhos e observaram que todos os defeitos enxertados exibiram mais osso dentro da área do defeito do que o grupo controle sem preenchimento. Além disso, o grupo 45S5 exibiu maior crescimento ósseo inicial no período de 4 e 8 semanas, porém em 12 semanas, o crescimento ósseo nos defeitos preenchidos foi equivalente entre si e ao osso normal. Ressalta-se ainda que os vidros 58S e 77S foram reabsorvidos mais rapidamente e exibiram neoformação óssea equivalente ao grupo com vidro 45S5 ao final das 12 semanas.

Engler et al. (2006) demonstraram como a matriz extracelular influencia na diferenciação de diferentes linhagens celulares, indicando que as células-tronco mesenquimais apresentam alta sensibilidade à sua especificidade e fenótipo quando em contato com diferentes superfícies. Assim, o biomaterial adequado para a regeneração óssea deve apresentar um arcabouço que promova a adesão e espraiamento celular, reproduzindo um ambiente específico que leve à osteogênese e crescimento ósseo. Nesse ponto, a engenharia tecidual vem tentando otimizar o uso dos vidros bioativos, que se apresentam em formato de pó, de maneira a torná-los mais moldáveis e acessíveis a diversas situações clínicas. Diferentes estratégias de fabricação vêm sendo estudadas, bem como um melhor entendimento no uso de compósitos e suas diferentes aplicações (Agarwal, García, 2015).

Dentro dos inúmeros métodos de fabricação dos vidros bioativos e seu uso associado a polímeros, destaca-se a eletrofiação, devido a sua eficácia na produção de nanofibras poliméricas e compósitos para uso em diversos tecidos (Roseti et al., 2017; Zhang et al., 2022). Em 2017, foi demonstrado por Xue et al., que células-tronco mesenquimais humanas obtidas do cordão umbilical, da medula óssea e do

tecido adiposo apresentaram uma diferenciação osteogênica aumentada quando cultivadas em um *scaffold* de PCL.

Gao et al. (2017) desenvolveram pela técnica de eletrofiação um compósito a base de colágeno, PCL e nanopartículas de vidro bioativo com 60% em peso de SiO₂ e avaliaram seu potencial angiogênico em linhagem de células endoteliais *in vitro* e ratos diabéticos *in vivo*, os resultados evidenciaram que o biomaterial é adequado para processos de reparação e regeneração de tecidos relacionados a vasos sanguíneos.

No campo da regeneração óssea, essa técnica tem ganhado especial atenção por mimetizar fielmente a matriz extracelular óssea (Banimohamad-Shotorbani et al., 2021; Ding et al., 2021), permitindo assim a adesão e proliferação celular no sítio de implantação, bem como a osteoindução, vascularização e integração com o tecido adjacente (Amini et al., 2012).

O uso de compósitos se faz de grande interesse por melhorar e equilibrar as propriedades dos materiais quando usados em conjunto. Em 2010, Francis et al. realizaram a eletrofiação simultânea de gelatina (Gel) – um polímero obtido pela hidrólise parcial de colágeno - e eletropulverização de nano-hidroxiapatita (nHA) e analisaram o comportamento do material em osteoblastos fetais humanos (hFoB). Os resultados obtidos permitiram identificar que o material gerou uma estrutura semelhante à matriz óssea extracelular, além disso, o compósito exibiu atividade de ALP aumentada, mineralização aprimorada e melhor proliferação celular quando comparado ao *scaffold* de Gel puro.

Além do comportamento *in vitro*, a análise *in vivo* desses compósitos também vem se mostrando promissora na literatura (Basal et al., 2022; Liang et al., 2021). Como exemplo, Yin et al., (2018) compararam *scaffolds* de PCL com vidro 45S5, PCL com hidroxiapatita e PCL puro em defeitos críticos em calvária de coelhos, após 6 e 12 semanas eles evidenciaram por meio de análise histológica e micro-CT um maior volume ósseo no grupo contendo vidro, quando comparado aos outros grupos experimentais.

Em um estudo mais recente, Yu et al., (2022) desenvolveram por impressão 3D um *scaffold* de PCL com o vidro S53P4 carregado com a proteína morfogenética óssea (BMP-2), proteína esta envolvida na quimiotaxia, mitose e diferenciação de células mesenquimais no tecido ósseo, com a finalidade utilizá-lo para a obliteração

do mastóide e reconstrução do conduto auditivo externo em coelhos. Os experimentos *in vivo* comprovaram que o material apresentou biocompatibilidade e atividade osteogênica, evidenciando seu potencial reparador e de reconstrução de defeitos específicos. Além disso, os grupos carregados com BMP-2 apresentaram maior ação osteogênica.

Anindyajati et al. (2019) avaliaram as propriedades mecânicas e biológicas de um compósito a base de PCL, 45S5 Bioglass® e polietileno de ultra-alto peso molecular (UHMWPE), visando sua utilização na reconstrução do labrum acetabular. Os resultados mostraram que o biomaterial é promissor na área de engenharia e regeneração tecidual, sendo que as camadas de nanofibras de PCL produzidas por eletrofiação aumentaram a ligação, morfologia e proliferação celular, e a adição de partículas de vidro bioativo promoveram crescimento celular.

Li et al. (2012) avaliaram a osseointegração do compósito de politereftalato de etileno (PET) com vidro bioativo 58S em coelhos e observaram que a adição de vidro na composição é segura e promove maior estimulação da angiogênese local, mecanismo necessário na neoformação óssea.

Recentemente, Park et al. (2021) avaliaram o efeito *in vivo* do vidro bioativo S53P4 por meio da produção de *scaffolds* de colágeno em camundongos C57bl6. Foi confirmado o potencial osteoestimulador do biomaterial após 8 semanas, devido a formação de matriz óssea mineralizadas e vascularizadas com atividade celular osteoblástica e arquitetura trabecular na análise por micro-CT.

Ding et al. (2022) desenvolveram um *scaffold* por impressão 3D a base de ácido polilático/vidro bioativo e cimento ósseo, para suporte e preenchimento, respectivamente. Os resultados *in vitro* evidenciaram que a biodegradação do vidro bioativo promoveu osteogênese, induziu a polarização M2 dos macrófagos e apresentou um perfil anti-inflamatório. Os resultados *in vivo* revelaram que o *scaffold* promoveu a regeneração óssea na área do defeito ósseo em fêmures de coelhos New Zealand White, com alta estabilidade óssea a longo prazo, obtida pela natureza de preenchimento do *scaffold*. Esses dados refletem o atual cenário da área: muitos avanços - principalmente no entendimento dos biomateriais, como eles se relacionam entre si e em contato com o meio fisiológico -, novas abordagens e novas dúvidas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar *scaffolds* de PCL incorporadas com três tipos de vidro bioativo: 45S5, 58S e S53P4, avaliar a influência destas na atividade e diferenciação celular na osteogênese *in vitro*, bem como na regeneração óssea *in vivo*.

Os objetivos específicos foram avaliar os *scaffolds* quanto:

- a) ao processo de síntese e caracterização;
- b) a influência na atividade e diferenciação celular;
- c) a regeneração óssea na interface com os biomateriais;
- d) a resistência do reparo ósseo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) aprovado sob o número 06/2021 (ANEXO A).

4.2 Síntese dos compósitos

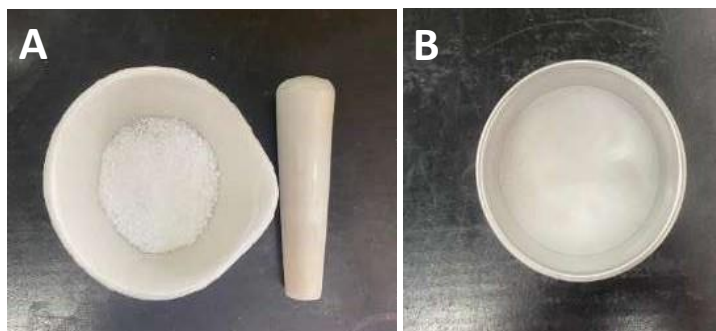
4.2.1 Síntese dos vidros bioativos 45S5, S53P4 e 58S

Para a preparação dos vidros bioativos (Bv) pela rota Sol-Gel seguindo a metodologia descrita por Spirandeli et al. (2020), primeiramente foi produzida a solução de metassilicato de sódio (Na_2SiO_3 – Dinâmica), que foi adicionada à resina de troca iônica (IR120 – Rohm, Haas), na qual ocorre a troca entre os íons H^+ e Na^+ , para obtenção final do ácido silícico, precursor dos vidros silicatos. Com base na solução aquosa do ácido silícico foi realizada a mistura com os diferentes vidros, para posterior síntese pela rota sol-gel seguida de fusão/resfriamento.

Foram utilizadas as proporções de 45% SiO_2 - 24,5% CaCl_2 - 24,5% Na_2O - 6,0% P_2O_5 em massa para o vidro 45S5; 53% SiO_2 - 23% Na_2O_2 - 20% CaCl_2 - 4% P_2O em massa para o vidro S53P4; e 60% SiO_2 - 36% CaCl_2 - 4% P_2O_5 em massa para o vidro 58S.

As soluções foram colocadas em estufa por 5 dias a uma temperatura de 100°C e calcinadas à 500°C por 5h. Após, o vidro foi macerado e peneirado em peneira de 200 mesh (Figura 1).

Figura 1 – Aspecto dos vidros preparados pela rota Sol-Gel



Legenda: A) após o processo de calcinação B) Após maceração.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Síntese da solução de PCL

A solução foi preparada a partir da dissolução de 1g de PCL (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) e aferida em balança de precisão em 10 mL de acetona (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) e ficou sob agitação constante em agitador magnético (IKARH Basic, Staufen, Alemanha) por 24h.

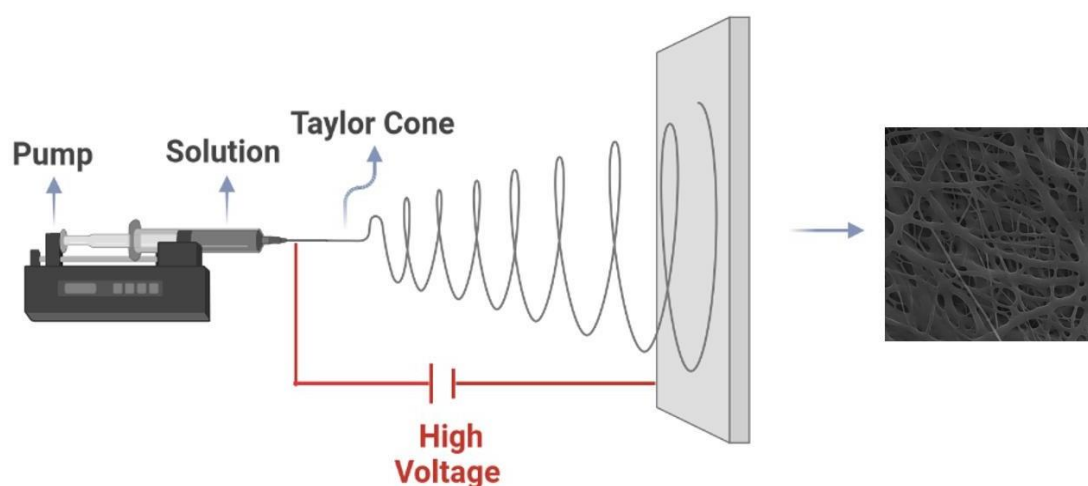
4.2.3 Síntese da solução de PCL com os vidros bioativos

Para produzir a solução de PCL incorporado com cada vidro, foi adicionado 1g do pó de cada vidro ao respectivo recipiente. Foram obtidas soluções com 1g de PCL, 1g de vidro e 10 mL do solvente acetona, seguindo a metodologia descrita em Guimarães et al. (2023). Estes preparados foram levados ao agitador magnético (IKARH Basic, Staufen, Alemanha) onde permaneceram até total dissolução.

4.2.4 Eletrofiação das mantas

Após a produção das soluções, foi iniciada a síntese das mantas por meio da técnica de eletrofiação (Figura 2), sendo sua estrutura composta por uma fonte de alta tensão, uma seringa plástica de 5 mL com agulha de ponta reta e diâmetro do orifício de 0,7mm.

Figura 2 – Desenho esquemático do processo de eletrofiação



Legenda: No processo de eletrofiação, uma solução polimérica é preparada em um solvente volátil que irá promover dissolução dos componentes. Essa solução será transferida para uma seringa com agulha de ponta reta e acoplada em uma bomba infusora com velocidade de fluxo determinada. Por meio de uma fonte de alta tensão com eletrodos acoplados na agulha e no aparato coletor, determina-se a tensão e a distância. Assim, um campo elétrico é aplicado ao sistema, e à medida que a força do campo elétrico aumenta, a microesfera da solução formada na extremidade da agulha da seringa se alonga e forma o chamado “cone de Taylor”. A força eletrostática dentro do cone de Taylor supera a tensão superficial, gerando assim um jato líquido. Esse jato sofre instabilidades de flexão, levando ao espalhamento das fibras pelo coletor metálico, resultado em um tapete fibroso com orientação aleatória.

Fonte: Dziemidowicz et al., 2021.

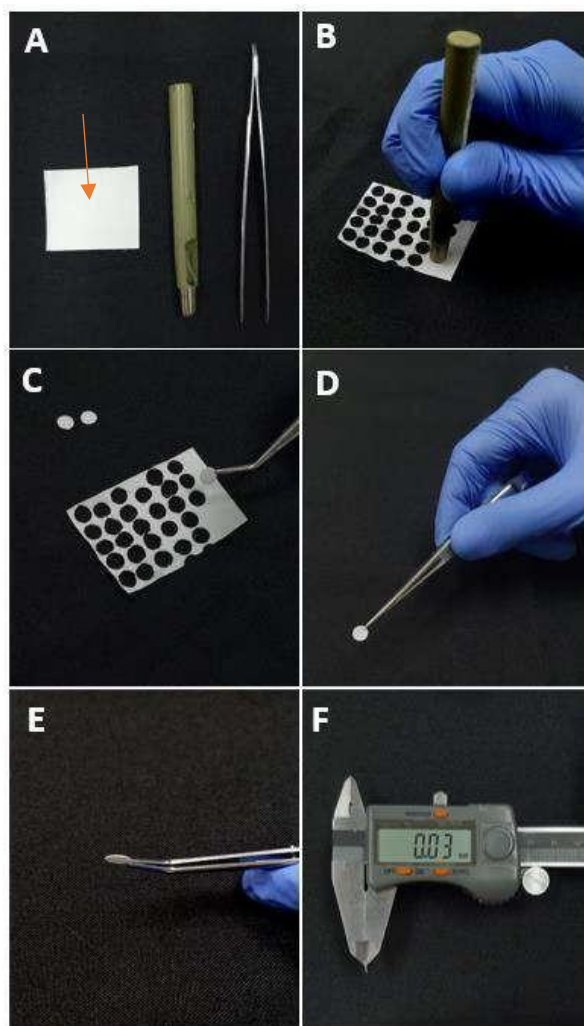
Para a produção da manta de PCL, a solução descrita acima foi colocada em uma seringa de plástico com agulha de 0,7mm Ø e submetida ao processo de eletrofiação sob três parâmetros fixos: 1 mLh⁻¹ de razão de fluxo, 10kV de voltagem e 12cm de distância. Foram eletrofiados 8mL da solução e uma manta foi obtida, do qual os *scaffolds* foram recortados (Figura 3).

Para a produção das mantas de PCL incorporadas com cada vidro, a

solução descrita acima foi colocada em uma seringa de plástico com agulha de 0,7mm Ø e submetida ao processo de eletrofiação sob três parâmetros fixos: 2 mLh⁻¹ de razão de fluxo, 10kV de voltagem e 12cm de distância. Foram eletrofiados 8mL da solução e foram obtidas três mantas, dos quais os *scaffolds* referente a cada grupo de vidro, utilizados nos ensaios foram recortadas com *punch* no diâmetro de 6 mm e espessura de 0,03 mm.

Ao final, foram obtidos quatro grupos experimentais: grupo P (PCL sem incorporação de vidro); grupo P45 (compósito PCL + vidro bioativo 45S5); grupo P53 (compósito PCL + vidro bioativo S53P4); grupo P58 (compósito PCL + vidro bioativo 58S). O grupo P foi definido como grupo controle deste estudo.

Figura 3 – Sequência do preparo dos *scaffolds*



Legenda: A) Materiais utilizados para realizar a confecção dos espécimes (recortador circular e pinça). Manta de nanofibras indicadas pela seta. B) Perfuração da manta produzida com o recortador circular. C) Remoção dos espécimes da manta com o auxílio de uma pinça. D) Visão do espécime por vista frontal. E) Visão do espécime por vista lateral. F) Espessura do espécime aferida por paquímetro.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Caracterização morfológica das amostras

4.3.1 Análise da topografia superficial das amostras (MEV-FEG)

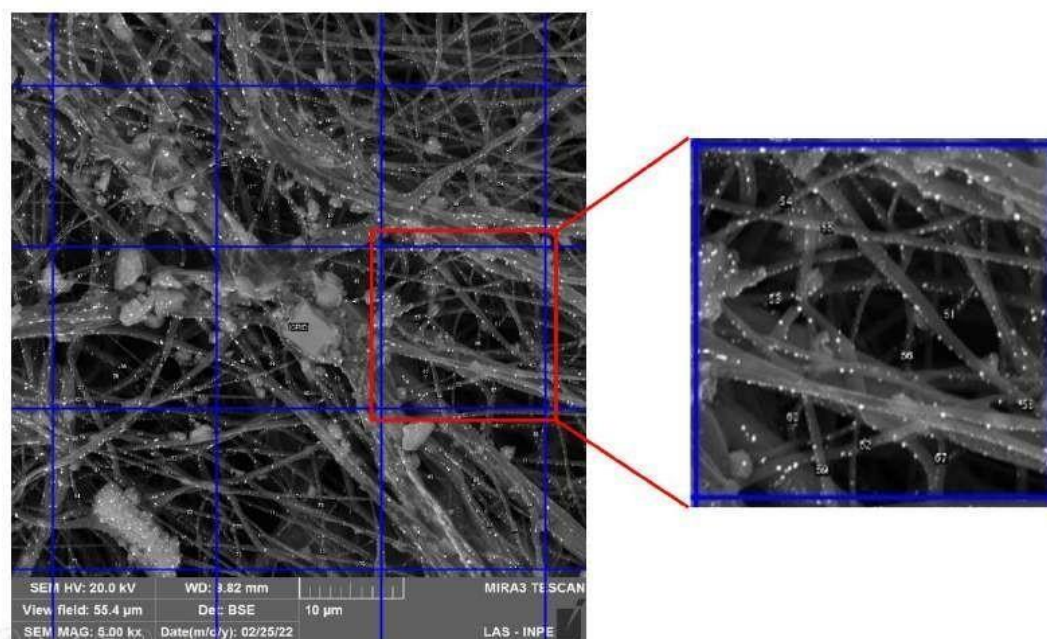
A morfologia estrutural dos *scaffolds* foi avaliada utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL/JSM- 5310, Tóquio, Japão) com canhão de

emissão de campo “Field Emission Gun” (FEG) (Tescan/Vega 3, Brno, República Tcheca) instalados no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE). Para isso, as amostras foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (*stub*), auxiliado por uma fita dupla face de carbono (3M, Sumaré SP, Brasil) e metalizadas com uma camada fina de ouro (80 Å), que foi depositado por meio de vaporização iônica (sputtering) na máquina metalizadora (Emitech SC 7620, Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, Reino Unido) por 130 s com uma corrente de 10-15 miliâmpères (mA) em vácuo de 130 mTorr e à uma taxa de metalização de 3.5 nm/min. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES), projetados sobre a superfície da amostra.

4.3.2 Análise do diâmetro médio das fibras poliméricas

O diâmetro médio das fibras foi analisado por meio do *software* de análise de imagem *ImageJ* (Versão 1.44o, National Public of Health) a partir das micrografias obtidas do MEV. Foram realizadas 10 mensurações de diâmetro em 9 regiões distintas, sendo 90 análises para cada imagem (Figura 4). Os resultados do diâmetro médio das fibras para cada grupo foram apresentados em estatística descritiva (média e desvio- padrão) com nível de significância de 5%.

Figura 4 – Imagem representativa do método de análise do diâmetro das fibras em *software* de análise de imagem



Legenda: Micrografia obtida em MEV dividida em 9 quadrantes para mensuração do diâmetro das fibras, com aumento indicando dez marcações nas fibras do quadrante.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3 Análise da molhabilidade

A análise da molhabilidade foi realizada por meio da técnica do ângulo de contato, para isto foram preparadas 3 amostras secas de cada grupo de nanofibras. A medição do ângulo de contato médio foi realizada por meio de um goniômetro (Ramé Hart-Inc, 100-00-115, Montain Lakes, Nova Jersey, EUA) com a técnica de gota séssil utilizando a água destilada. Previamente à análise, cada amostra foi manuseada com luvas cuidadosamente para evitar contaminação. Uma seringa graduada para dispersão gradual (série 100-10-12-22, calibre 22) com agulha hidrofóbica depositou a gota e o ângulo de contato médio direito e esquerdo foi calculado pelo programa computacional (DROPimage Advanced Software). Os ângulos de contato médios da água foram calculados pelo próprio programa.

4.4 Caracterização físico-química

4.4.1 Espectroscopia Raman

Uma amostra de cada grupo de vidro (45S5, S53P4, 58S) foi submetida à espectroscopia de Raman para análise da composição estrutural do vidro. As medições da espectroscopia Raman foram realizadas usando um modelo do sistema Renishaw 2000 (Horiba Scientific, Palaiseau France - Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA, São José dos Campos), equipado com um laser de íons de ar (514,5 nm).

4.4.2 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para realização de análise qualitativa da composição química dos elementos químicos das nanofibras, foi utilizado um espectrômetro por dispersão de energia (EDS) (Bruker Nano GmbH 410, Berlin, Alemanha) associado ao *software* *Espirit* 1.9 (Bruker, Berlin, Alemanha) no MEV (Inspect S50, FEI Company, Brno, República Tcheca) instalado no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE, São José dos Campos.

4.4.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) (STA 449 F3 Jupiter) foi utilizada para obter os parâmetros térmicos da temperatura de transição vítrea à temperatura de cristalização dos grupos experimentais. As amostras foram submetidas a uma faixa de temperatura de 30°C a 1200°C e com taxa de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

4.5 Ensaios biológicos *in vitro*

Todos os procedimentos biológicos *in vitro* foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC), localizado no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da Univ. Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Campus de São José dos Campos.

4.5.1 Isolamento e cultura celular

Fêmures de ratos *Wistar* adultos foram utilizados para o isolamento de células da medula óssea. Os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico utilizando uma solução intramuscular de cloridrato de xilazina 2% 2 g/100 mL (Xilazin® - Syntec do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba/SP – Brasil), substância sedativa e relaxante muscular, e cloridrato de cetamina 10% 10 g/100 mL (Cetamin® - Syntec do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba/SP – Brasil).

Após a limpeza dos fêmures, no fluxo laminar, as células da medula óssea foram isoladas e inseridas em frascos para cultura celular de 250 mL e 75 cm² (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) com meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (500 µg/mL) (Gibco) e incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado após 24 horas, com a finalidade de remover células não aderidas, e a cada três dias até atingir a confluência celular. A progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). Após a confluência (aproximadamente sete dias) (Figura 5) as células foram liberadas enzimaticamente (Rosa et al., 2003) e plaqueadas na densidade de 1x10⁴ células viáveis em cada poço da microplaca de 96 poços (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Visando a diferenciação celular, foi utilizado um meio osteogênico para cultura celular das placas, ao qual, além da suplementação, foram adicionados 5 mg/mL de ácido ascórbico (Neon) e 2,16 mL de

betaglicerofosfato (Sigma-Aldrich).

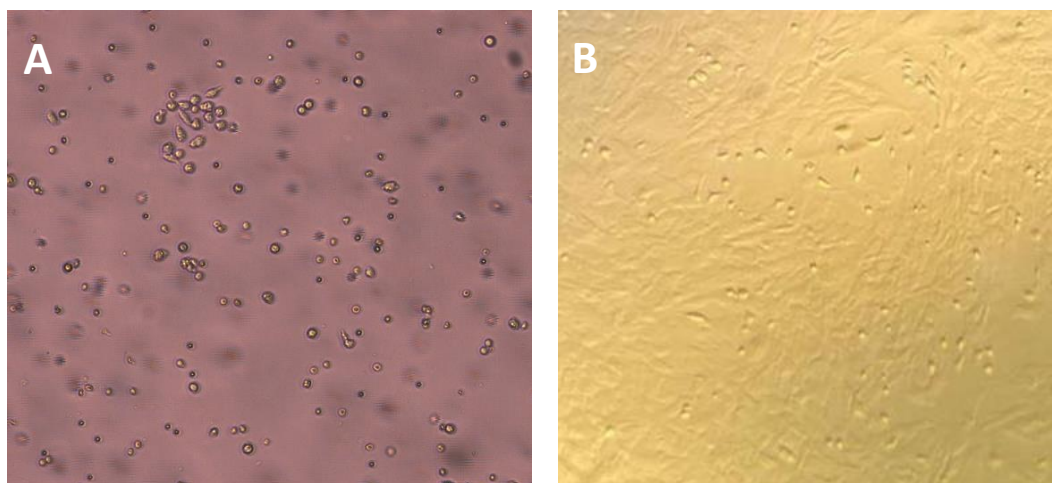
Previamente ao plaqueamento celular, os *scaffolds* foram inseridas nos poços (n=5 para cada grupo experimental) e submetidas a um protocolo de desinfecção com etanol 70% durante 15 minutos sob agitação constante. Em seguida foi realizada a lavagem com PBS e, por fim, as amostras ficaram expostas a luz UV no fluxo laminar durante 30 minutos.

Todas as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e mantidas até o momento de cada teste. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993 –5 e em triplicada, sendo que cada triplicata foi obtida por meio de um *pool* de células provenientes do fêmur de três animais.

As placas tiveram um desenho pré-definido para que houvesse padrão na realização dos testes evitando qualquer conflito na análise dos grupos (Figura 6). O grupo C (controle celular) foi usado para controle da cultura celular até o período de cada teste, enquanto o grupo P (PCL) foi usado como controle do presente estudo.

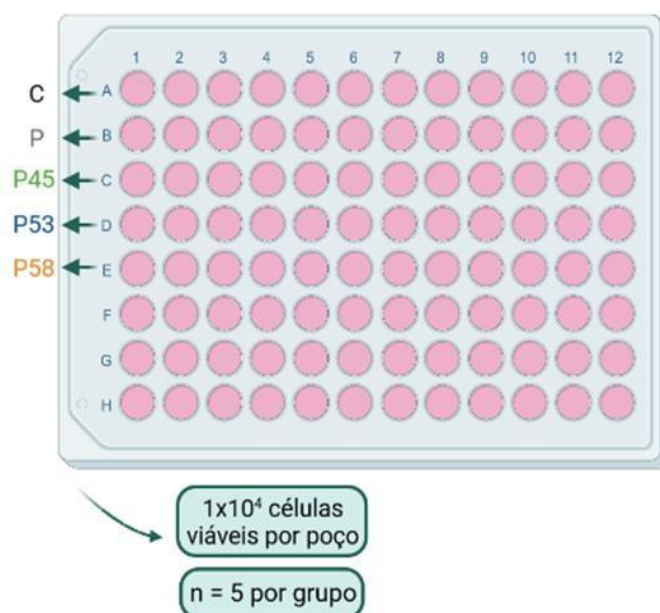
Os procedimentos para as análises *in vitro* estão descritos detalhadamente em do Prado et al. (2018).

Figura 5 – Garrafa após isolamento celular



Legenda: A) Aparência inicial. B) Após confluência celular.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6 – Desenho de placa de 96 poços utilizada nas análises *in vitro* com cultura celular



Legenda: C: controle celular; P: PCL ; P45: PCL + vidro 45S5; P53: PCL + vidro S53P4; P58: PCL + vidro 58S.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.2 Determinação da viabilidade celular

Foi realizada a avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição e incubação com o corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazolium] (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) utilizando análise espectrofotométrica do corante incorporado. Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas após o período de 03 e 07 dias, utilizando medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU). Os dados foram aferidos como absorbância e expressos como porcentagem, sendo o grupo P considerado 100% de viabilidade celular.

4.5.3 Análise do conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi calculado após 07 e 10 dias de cultura celular, de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). Após a finalização do teste, a absorbância foi aferida espectrofotometricamente a 680 nm, e o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em $\mu\text{g/mL}$.

4.5.4 Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica), utilizando os mesmos lisados do teste da proteína total após o período de 07 e 10 dias. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm, e o conteúdo de fosfatase alcalina foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e

expresso em $\mu\text{g/mL}$.

4.5.5 Formação e quantificação de Alizarina nos nódulos de mineralização

Exclusivamente para este teste as amostras foram inseridas no interior de placas *transwell*, e posteriormente foi realizado o plaqueamento com células, as quais foram incubadas a 37°C/5% de CO₂ por 10 dias. O *transwell* é necessário para que o vidro bioativo não seja corado no momento do teste. Após o período determinado foi verificada a formação de nódulos de mineralização utilizando a coloração por vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) e observação ao microscópio (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany).

Para a quantificação do cálcio impregnado na matriz mineralizada o método utilizado foi o de Gregory et al. (2004). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900), sob o comprimento de onda de 405 nm e os valores foram obtidos em absorbância.

4.5.6 Análise da morfologia celular por imunofluorescência

Para análise da morfologia celular do citoesqueleto de actina e dos núcleos de células aderidas à superfície, as culturas cultivadas por 10 dias foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (Synth, Brasil) em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,2, por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram rotineiramente processadas para imunofluorescência direta, como descrito por Andrade et al. (2015), utilizando Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen Eugene, USA) e DAPI (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA). Os espécimes foram examinados no microscópio de fluorescência (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany), sob epifluorescência. As imagens digitais foram analisadas com software Axio Vision 7.0.

4.5.7 Interação celular

Após 07 dias de cultivo, a interação celular com o biomaterial foi avaliada por microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL/JSM-5310, Tóquio, Japão) com canhão de emissão de campo “Field Emission Gun” (FEG) (Tescan/Vega 3, Brno, República Tcheca) instalados no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE). As amostras foram lavadas três vezes com PBS para remover as células não aderentes e, em seguida, fixadas quimicamente com metanol à temperatura ambiente durante 20 min. A seguir as amostras foram desidratadas por meio de uma série ascendente de etanol e antes da análise foram revestidas com uma fina camada de ouro usando um sistema *sputter*-revestimento.

4.6 Ensaios *in vivo*

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) aprovado sob o número 06/2021 (ANEXO A). O trabalho seguiu as diretrizes preconizadas pelo ARRIVE (*Animal Research Reporting of In Vivo Experiments*) (Percie Du Sert et al., 2020).

Os procedimentos foram realizados no Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) – UNESP São José dos Campos – SP. Os ratos foram mantidos em ambiente climatizado, em mini-isoladores com rack ventilado, com ciclos claro/escuro a cada 12 horas e receberam água *ad libitum*.

4.6.1 Procedimento cirúrgico

Trinta ratos com 90 dias e pesando cerca de 300g foram usados para o estudo *in vivo*. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Unesp, situado em Botucatu e permaneceram durante o experimento no Biotério do ICT / Unesp em gaiolas (n=6) onde receberam água e ração *ad libitum*. O ambiente foi cuidadosamente monitorado para manter a temperatura em torno de 20 °C e a umidade em 55%.

Após 30 dias de adaptação ao ambiente foi iniciado o experimento. Nas tíbias direita e esquerda dos 30 animais foram realizados defeitos ósseos críticos monocorticais de 3,0 mm, os quais foram preenchidos com os quatro materiais experimentais e com o coágulo considerado grupo controle, sendo n=6 para cada grupo experimental, o mesmo material foi inserido em ambas as tíbias.

Previamente à cirurgia, os animais foram pesados e anestesiados. Os fármacos utilizados nos procedimentos anestésicos e suas respectivas concentrações foram: cloridrato de xilazina 2% 2,0 g / 100 mL (Xilazin® - Syntec do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba/SP – Brasil), substância sedativa e relaxante muscular; e cloridrato de cetamina 10% 10 g / 100 mL (Cetamin® - Syntec do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba/SP – Brasil), um anestésico geral. Inicialmente, foi preparada uma solução contendo a mistura de 5 mg / kg de cloridrato de xilazina e 75 a 95 mg / kg de cloridrato de cetamina. Em seguida, para promover uma anestesia geral, cada animal recebeu, por via intramuscular a solução previamente preparada, de forma que um animal pesando 300 g recebeu 0,38 mL de cloridrato de cetamina e 0,1 mL de cloridrato de xilazina. Após a anestesia dos animais, os locais cirúrgicos das tíbias direita e esquerda foram submetidos à tricotomia e à antissepsia com clorexidina 0,12%.

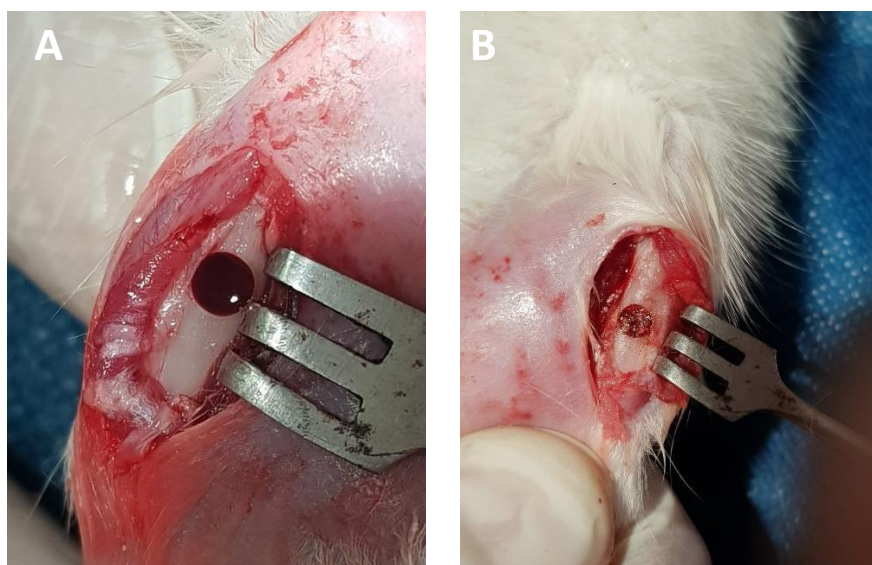
A incisão foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região correspondente a face medial das tíbias. Os músculos e periósteo foram divulsionados para expor a cortical onde foi realizado o defeito crítico com broca cilíndrica de 3,0 mm sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, visando evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso. Posteriormente, as amostras foram adicionadas, como ilustrado na figura 7 e os

tecidos foram reposicionados e a camada muscular e a pele foram suturadas com fio de seda nº 4 (Ethicon / Johnson & Johnson).

Após 4 semanas, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico utilizando uma solução intramuscular de Xilazin® / Cetamin®, e após os testes de sensibilidade, os animais foram decapitados em guilhotina.

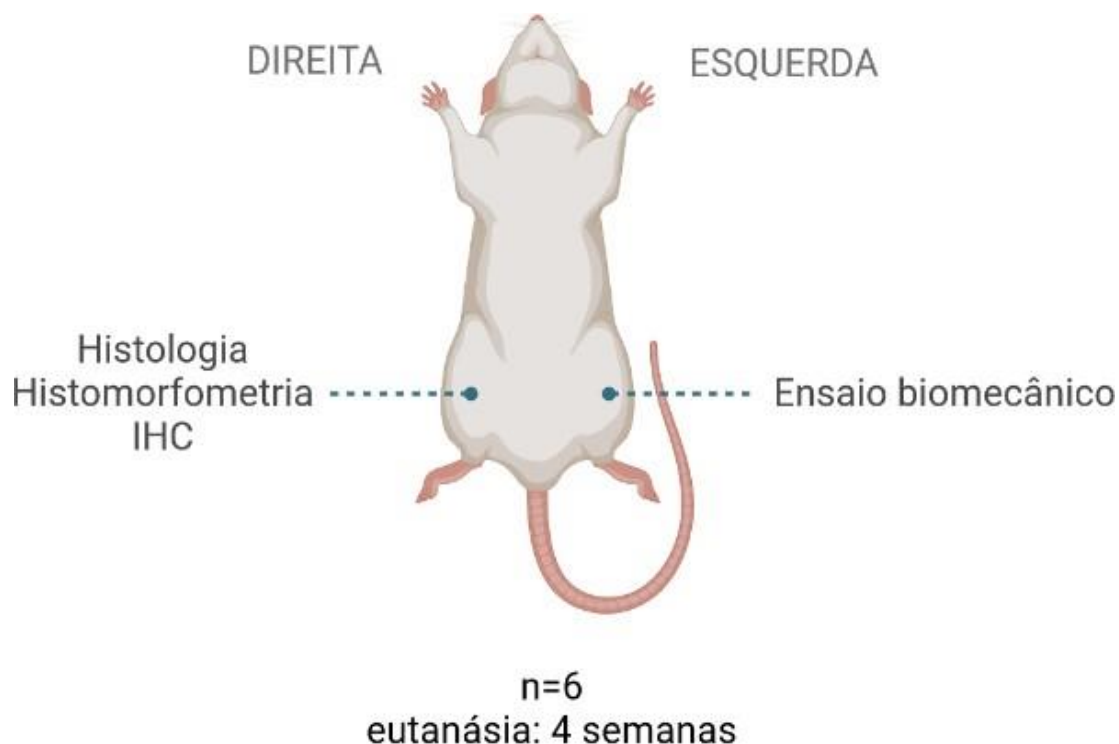
As tíbias esquerdas (n=6) foram mantidas em solução de Ringer a -20°C para o teste biomecânico, enquanto as tíbias direitas foram mantidas em ácido fórmico a 20% (n=5) e EDTA (n=1) para avaliação histológica/histomorfométrica e imuno-histoquímica, respectivamente (Figura 8).

Figura 7 – Procedimento cirúrgico



Legenda: A) realização do defeito ósseo B) preenchimento com o *scaffold*.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8 – Esquema representativo da metodologia e análises *in vivo*



Fonte: Elaborada pela autora.

4.6.2 Teste de flexão de três pontos

Após a eutanásia, as tíbias foram mantidas em solução de Ringer, refrigerado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento das análises que foi realizado no laboratório de Pesquisa em Materiais Odontológicos e Prótese do ICT/Unesp. Para a manutenção dos espécimes em equilíbrio térmico com o meio ambiente, previamente a realização dos ensaios, as tíbias foram retiradas do freezer para que pudessem descongelar de forma gradativa, evitando assim microfraturas. Com auxílio de um paquímetro digital (Starret 727, Itu, São Paulo) foi realizada a mensuração do comprimento, espessura médio-lateral e largura antero-posterior da região mediana da diáfise de cada tíbia para determinar os valores que compõem as propriedades extrínsecas das mesmas. As características teciduais (osso

neoformado) foram determinadas por meio do teste de resistência à flexão por três pontos.

Cada tíbia foi colocada centralizada, ao longo de seu comprimento, sobre um suporte contendo dois apoios (distantes 15 mm um do outro), com sua face anterior voltada para baixo, como ilustrado na figura 9. A carga foi aplicada transversalmente ao longo eixo da tíbia sobre sua face posterior em um ponto médio entre os dois apoios. O suporte de aplicação da carga e os apoios utilizados apresentaram forma cilíndrica com um diâmetro de 3mm. O ensaio foi conduzido em uma máquina universal de ensaios (Emic® - modelo DL 200 MF. Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais - Brasil), que proporcionou uma força de 50 kgf com uma velocidade constante de aplicação de 5.00mm/minuto até a falha do espécime. Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente, sendo os espécimes mantidos úmidos em solução de Ringer.

Para determinar a força de ruptura dos espécimes, empregou-se a seguinte fórmula:

$$\sigma_R = \frac{3FI}{2bd_2}$$

Na qual F é o valor de força em Newton obtido no teste, I é a largura média das tíbias em mm, b representa a base de distância entre os pontos (mm) e d o diâmetro da tíbia (mm).

Figura 9 – Teste de flexão de três pontos



Legenda: A) máquina universal de ensaios (Emic®), com a tíbia posicionada; B) Tíbia em posição para o teste.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6.3 Análise histológica e histomorfométrica

Após o período de 48 horas em formaldeído a 10%, as peças foram submetidas à técnica histológica de desmineralização com ácido fórmico a 20% (Synth, Diadema, SP) pelo período de 6 semanas seguido de desidratação em álcool e diafanização em xilol no laboratório de Tecido Ósseo do ICT/Unesp. A seguir, os fragmentos ósseos contendo os defeitos foram cortados ao meio, criando duas amostras do mesmo fragmento, os quais foram incluídos em dois blocos de parafina e submetidos à técnica laboratorial de rotina para o preparo das lâminas histológicas. As lâminas foram preparadas obtendo-se cortes semi-seriados de 5,0µm, que foram corados por hematoxilina e eosina (HE - Merck & Co, Inc).

Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, avaliando-se a formação do tecido de granulação, a neoformação óssea, o arranjo de trabéculas ósseas imaturas e a maturação óssea. Os cortes foram fotografados com microscópio de luz Zeiss

Axioskop 40 (Carl Zeiss, Brasil), no aumento 10x, com câmera digital acoplada Canon, modelo Power Shot A640.

Para a análise histomorfométrica, três cortes de cada defeito foram selecionados em microscópio de luz Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Brasil), e avaliados quanto a área de neoformação óssea. Em cada um dos três cortes, toda a área do defeito foi digitalizada, no aumento de 4x. As imagens foram transferidas para um computador no formato JPEG para análise morfológica das estruturas selecionadas. A taxa de neoformação óssea foi quantificada por meio do programa software Image J (Image Processing and Analysis in Java, NIH, EUA). O parâmetro histomorfométrico calculado foi a área de neoformação óssea por campo em μm^2 . Em seguida os valores obtidos foram submetidos à análise estatística pelo *software* GraphPad Prisma 7.01.

4.6.4 Análise imuno-histoquímica (IHC)

Após a eutanásia e desmineralização das peças em EDTA, cortes histológicos de 3,5 μm foram realizados em lâminas silanizadas e submetidas ao procedimento imunohistoquímico de rotina. Os marcadores imunohistoquímicos utilizados para analisar a atividade celular foram anti-TRAP (Affinity Biosciences, Cincinnati, OH, USA) e osteocalcina (OC) (Affinity Biosciences, Cincinnati, OH, USA). A diluição, temperatura/tempo de incubação e recuperação antigênica estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1- Diluição, incubação e recuperação antigênica

Anticorpo primário	Recuperação antigênica	Diluição	Incubação
OC	Ácido cítrico	1:100	<i>overnight</i>
Anti-TRAP	Ácido cítrico	1:100	<i>overnight</i>

Fonte: Elaborada pela autora.

O teste ocorreu mediante a realização dos seguintes procedimentos:

- a) desparafinação e hidratação com sequência decrescente de xilol e etanol;
- b) eliminação de pigmentos formólicos pelo tratamento com hidróxido de amônia a 10% em etanol 85%;
- c) recuperação antigênica: ácido cítrico a 10 mMph pH 6,0 em micro-ondas (700w) por 20 minutos, divididos em 4 ciclos de 5 minutos para OC, e ácido cítrico em banho-maria a 93°C por 20 minutos para TRAP;
- d) bloqueio da peroxidase endógena tecidual por meio de incubação com peróxido de hidrogênio e metanol 1:1;
- e) incubação dos anticorpos primários de acordo com a descrição do Quadro 1;
- f) incubação com o anticorpo secundário (*Dako EnVision+Dual Link System – HRP*, Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente;
- g) incubação com solução de diaminobenzidina (*Dako Liquid DAB*) por 5 minutos, para coloração da reação Ag-Ac;
- h) contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Harris, desidratação em etanol, clareamento em xilol e montagem das lâminas. Os controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por soro-albumina bovina e os controles positivos foram realizados com lâminas previamente marcadas pelos respectivos anticorpos.

Foram realizadas fotos padronizadas de cada lâmina, da região do osso neoformado na extremidade do defeito ósseo, para observação da expressão dos marcadores OC e TRAP. Para todos os biomarcadores foram realizadas avaliações qualitativas nos defeitos a partir da imunomarcação.

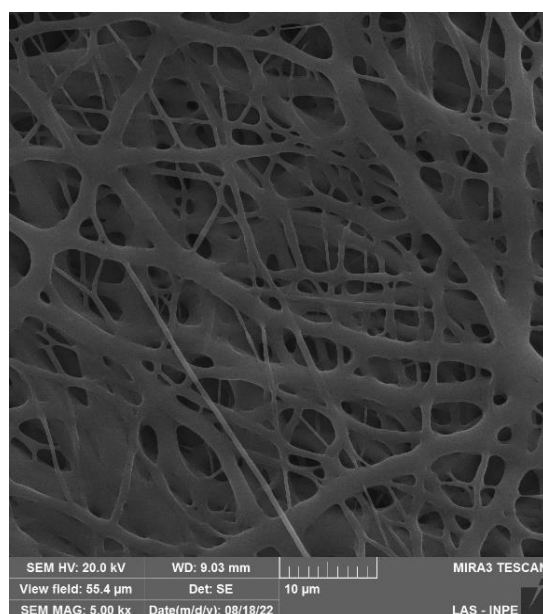
5 RESULTADO

5.1 Caracterização morfológica das amostras

5.1.1 Análise da topografia superficial das amostras

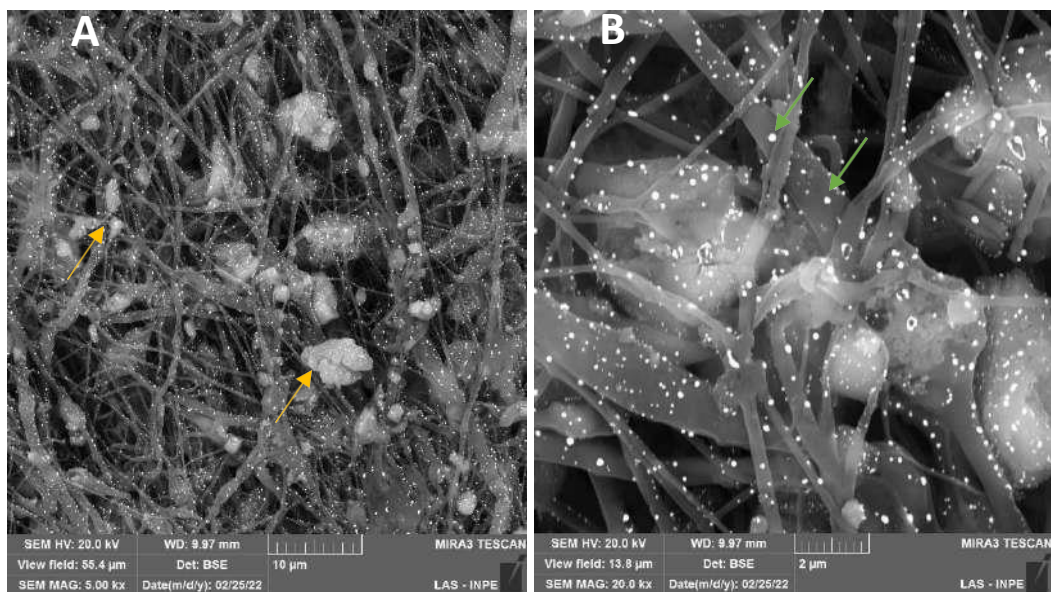
A partir da análise por MEV-FEG para os diferentes grupos de nanofibras foi possível comprovar que mesmo havendo diferença morfológica entre os grupos, todos apresentaram uma satisfatória produção de nanofibras com ausência de defeitos (*beads*). O grupo P apresentou adequado emaranhado de nanofibras (Figura 10). Já nos grupos contendo vidro foi possível observar sua incorporação tanto no interior quanto na superfície das nanofibras, além disso, foi observado que cada composição de vidro apresentou características estruturais e morfológicas próprias (Figuras 11, 12 e 13).

Figura 10 – Micrografia por MEV-FEG das nanofibras do grupo P, aumento de 1000x



Fonte: Elaborada pela autora.

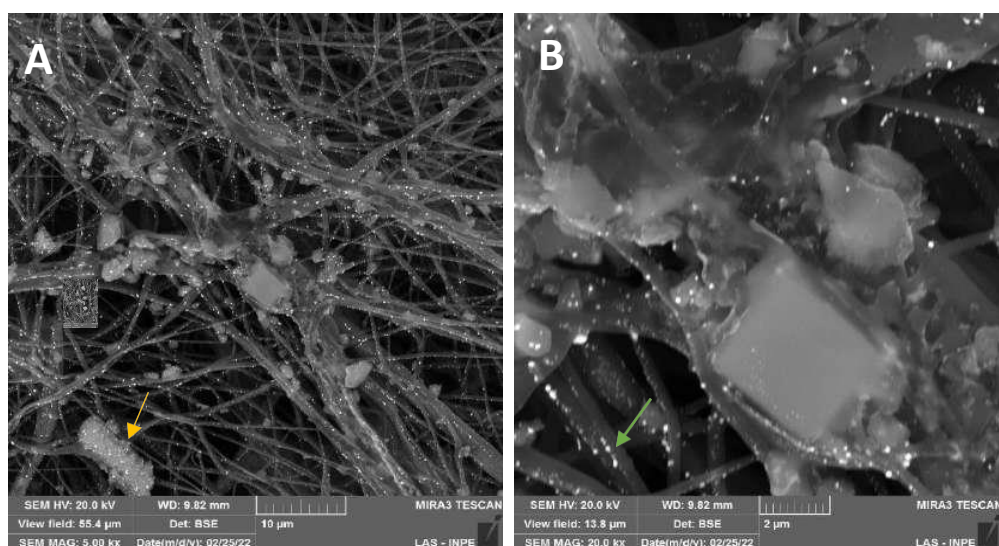
Figura 11 – Micrografias por MEV-FEG dos *scaffolds* do grupo P45



Legenda: Grupo P45 A) aumento de 5.000x, a seta amarela indica as nanopartículas de vidro incorporado na superfície da nanofibra B) aumento de 20.000x, a seta verde indica as nanopartículas de vidro presente no interior da nanofibra.

Fonte: Elaborada pela autora.

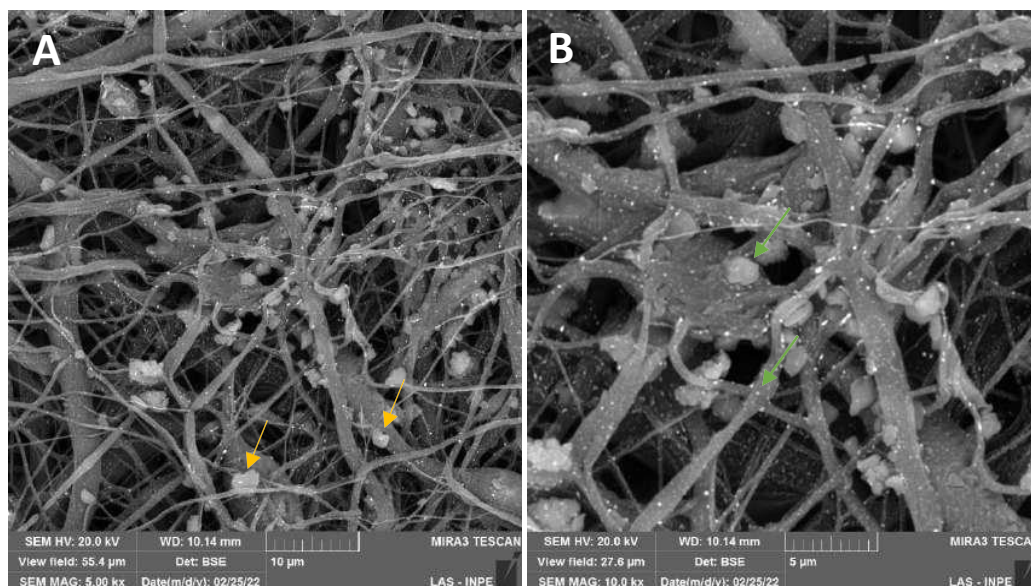
Figura 12 – Micrografias por MEV-FEG dos *scaffolds* do grupo P53



Legenda: Grupo P53 A) aumento de 5.000x, a seta amarela indica as nanopartículas de vidro incorporado na superfície da nanofibra B) aumento de 20.000x, a seta verde indica as nanopartículas de vidro presente no interior da nanofibra.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 – Micrografias por MEV-FEG dos *scaffolds* do grupo P58



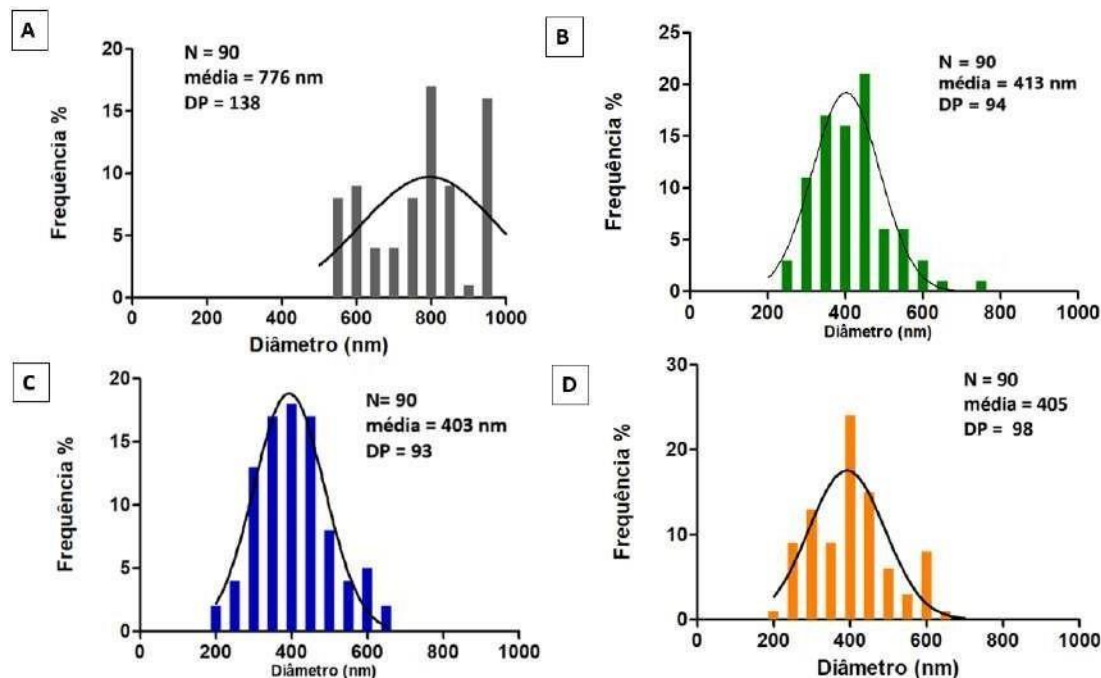
Legenda: Grupo P58 A) aumento de 5.000x, a seta amarela indica as nanopartículas de vidro incorporado na superfície da nanofibra B) aumento de 10.000x, a seta verde indica as nanopartículas de vidro presente no interior da nanofibra.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2 Análise do diâmetro médio das fibras

Foi realizada estatística descritiva apresentando a média e desvio padrão (DP) do diâmetro das nanofibras (Figura 14). A estatística descritiva mostrou que o grupo P apresentou um diâmetro médio de 776 nm, o grupo P45 de 413 nm, o grupo P53 de 403 nm e o grupo P58 de 405 nm.

Figura 14 - Distribuição estatística dos diâmetros das nanofibras dos grupos experimentais

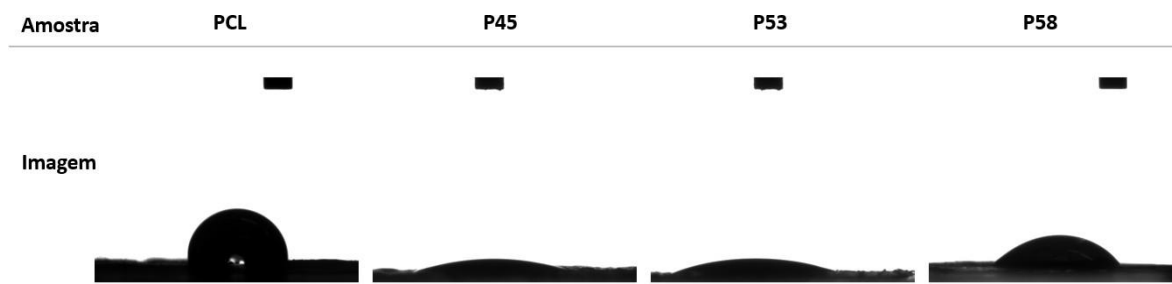


Legenda: A) P B) P45 C) P53 D) P58.
Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 Análise da molhabilidade

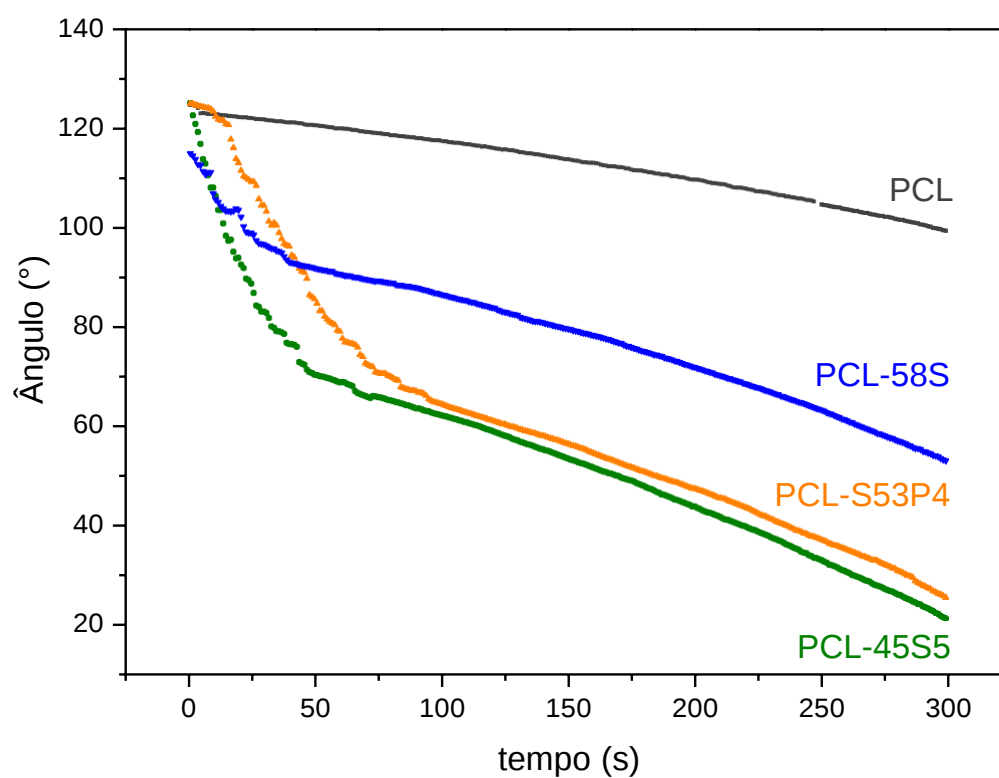
Nas figuras 15 e 16 é possível observar a análise da molhabilidade pela técnica do ângulo de contato, os resultados permitem identificar que todos os grupos apresentaram um perfil hidrofílico ao longo do tempo (s). Foi observado um pico na queda do ângulo de contato nos primeiros 20 segundos nos grupos contendo vidro, seguido de uma queda mais linear, semelhante ao grupo PCL. Os grupos contendo vidro apresentaram redução do ângulo em um período menor quando comparados ao PCL, e os grupos P53 e P45 apresentaram um perfil hidrofílico semelhante, com redução do ângulo em menor tempo (s), quando comparados ao grupo P58.

Figura 15 – Análise do ângulo de contato aos 3600 segundos



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 – Gráfico da análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato nos grupos experimentais



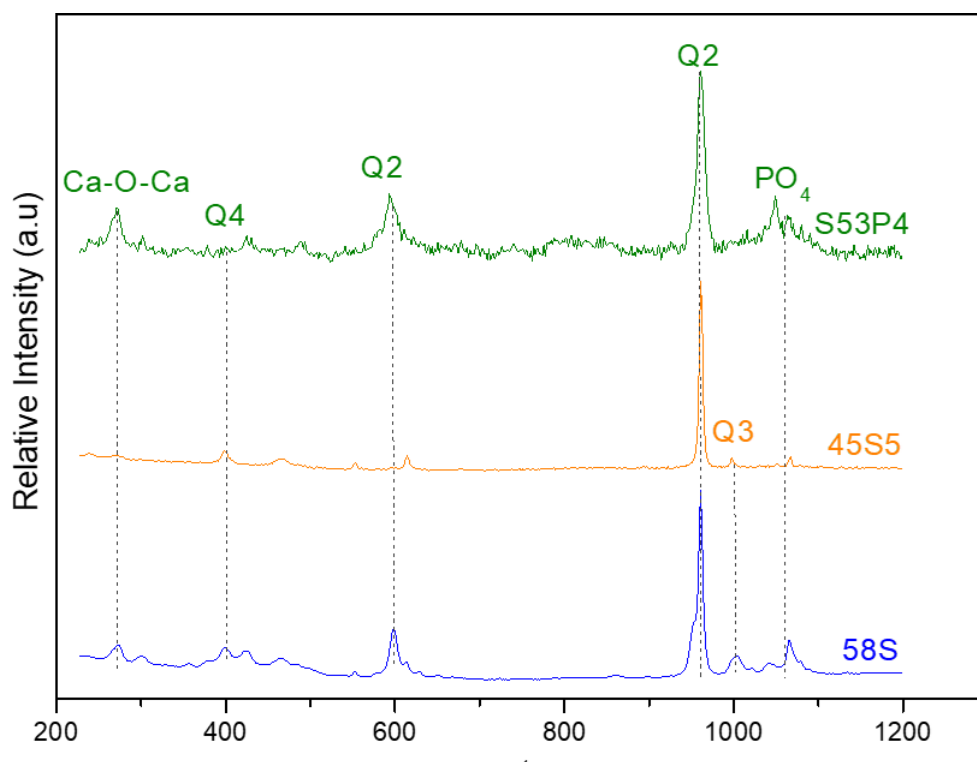
Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Caracterização físico-química das amostras

5.2.1 Espectroscopia Raman

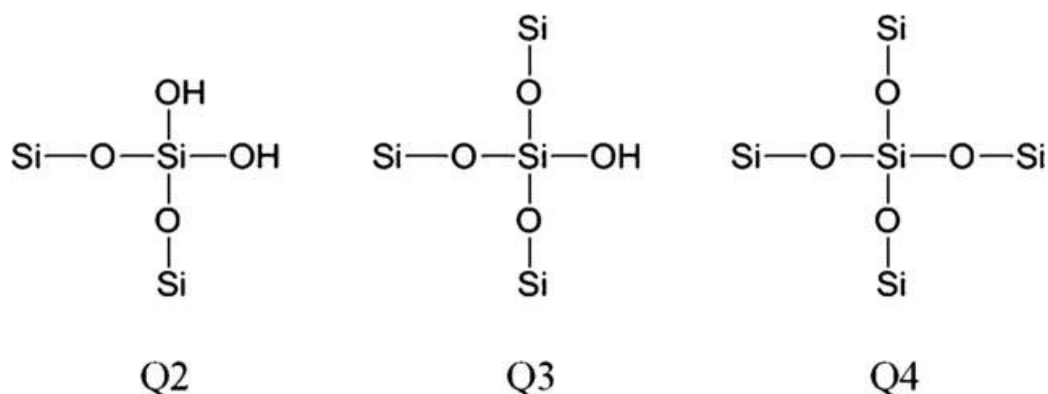
A espectroscopia Raman permitiu analisar a composição estrutural dos vidros a partir da posição das bandas. Na figura 17 é possível observar que todos os vidros apresentaram majoritariamente a banda Q2, correspondente ao grupo funcional siloxano com dois heteroátomos (Figura 18), sendo a principal ligação bioativa que o material poderá apresentar. Também foram observadas bandas de óxido de cálcio, PO_4 , Q3 e Q4, decorrentes da composição do vidro.

Figura 17 – Espectroscopia Raman dos vidros S53P4, 45S5 e 58S



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18 – Representação ilustrativa das ligações de silanol e siloxano



Legenda: A partir de um átomo de Si central as ligações, e o número de heteroátomos (Si) configuram as bandas Q2, Q3 e Q4.

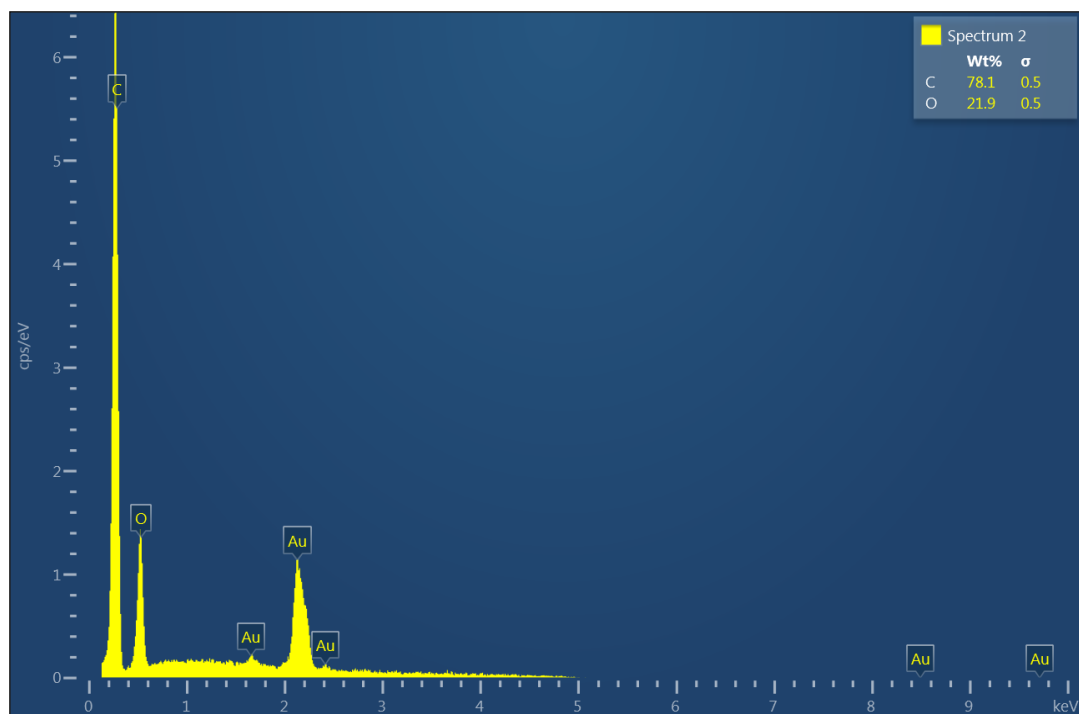
Fonte: La Vars et al., 2013.

5.2.2 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A análise qualitativa e identificação da composição química dos grupos experimentais foi realizada por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). A figura 19 evidencia a presença dos elementos químicos C e O, que compõem o polímero utilizado neste trabalho (grupo PCL). Na figura 20 é possível observar a presença de C e O referente ao polímero, bem como a presença dos elementos químicos Si, Ca, Cl, Na, comprovando a formulação e presença dos vidros bioativos nos compósitos.

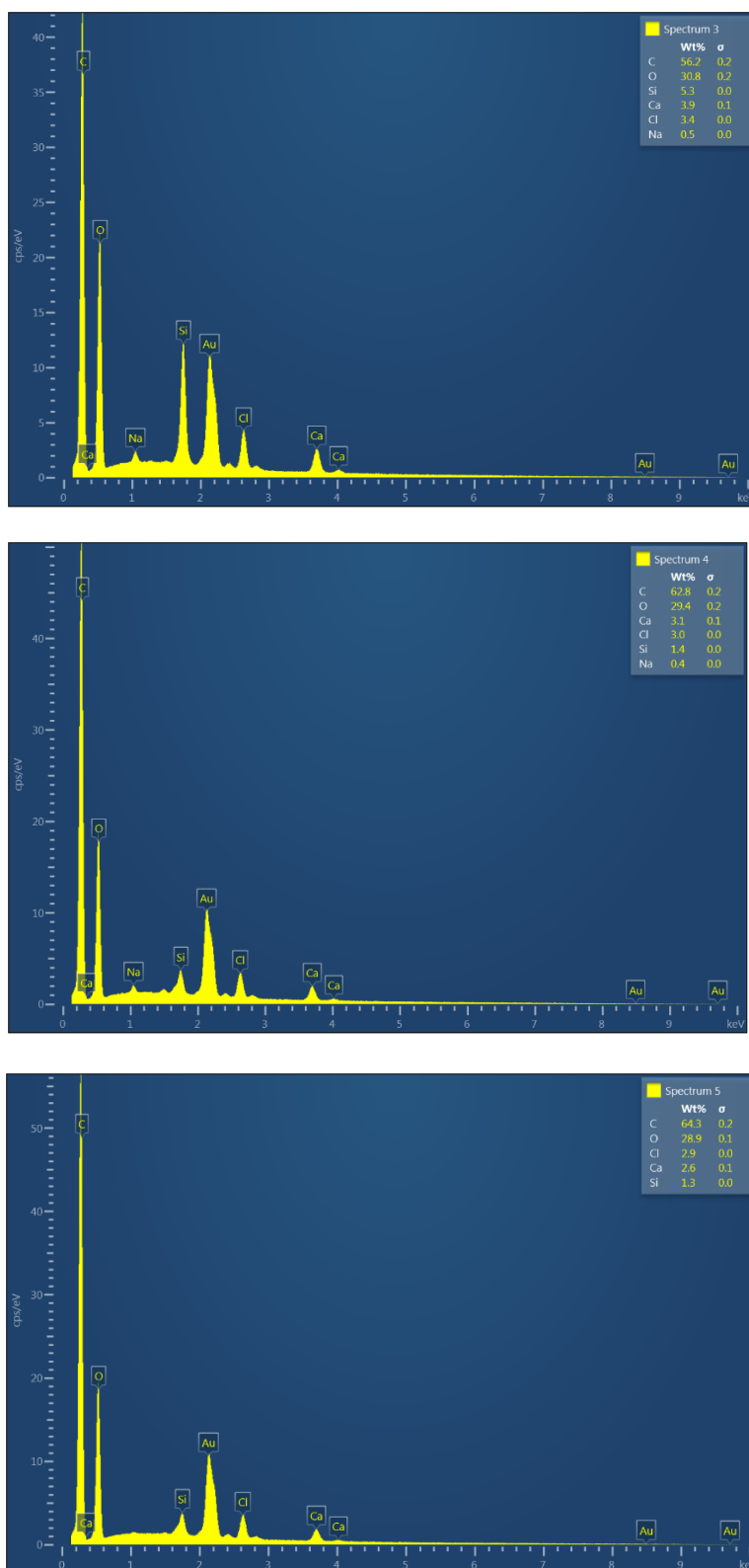
A presença de Au em todas as análises ocorreu devido ao recobrimento das amostras com uma camada de ouro para análise no MEV-FEG.

Figura 19 - Análise qualitativa da composição química da amostra do grupo P por EDS



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 - Análise qualitativa da composição química da amostra dos grupos contendo vidro



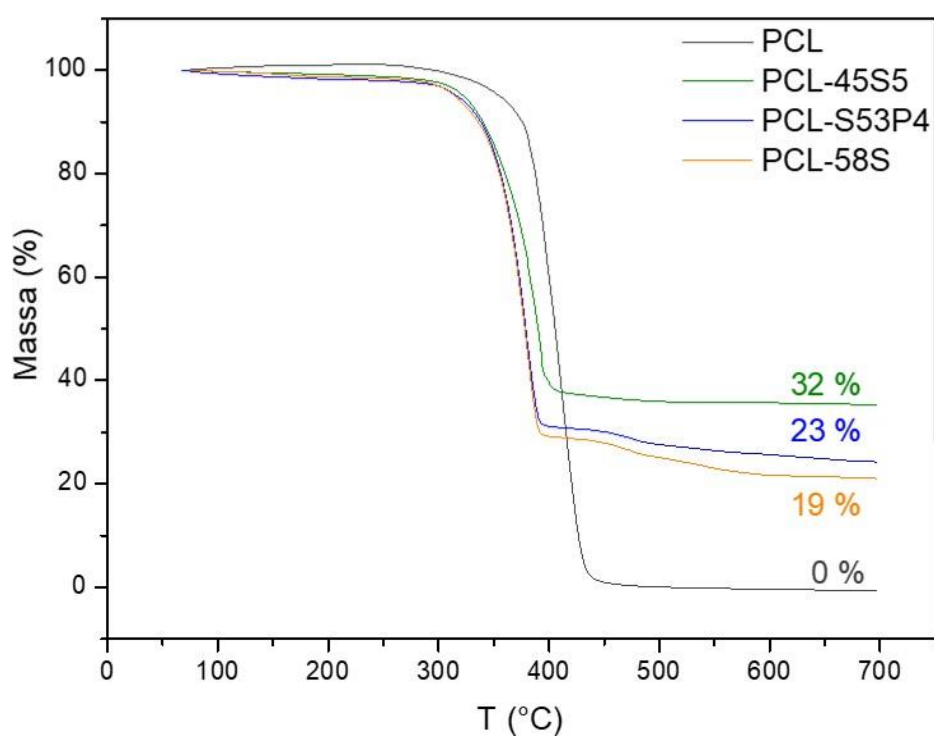
Legenda: A) P45 B) P53 C) P58.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) (STA 449 F3 Jupiter) permitiu identificar a eficácia da incorporação dos vidros à solução de PCL. As porcentagens de fases encontradas nos materiais foram avaliadas e foi observado incorporação em massa, de 32% do vidro 45S5, 23% do vidro S53P4 e 19% do vidro 58S às respectivas soluções de PCL (Figura 21).

Figura 21 – Análise termogravimétrica dos grupos experimentais



Fonte: Elaborada pela autora.

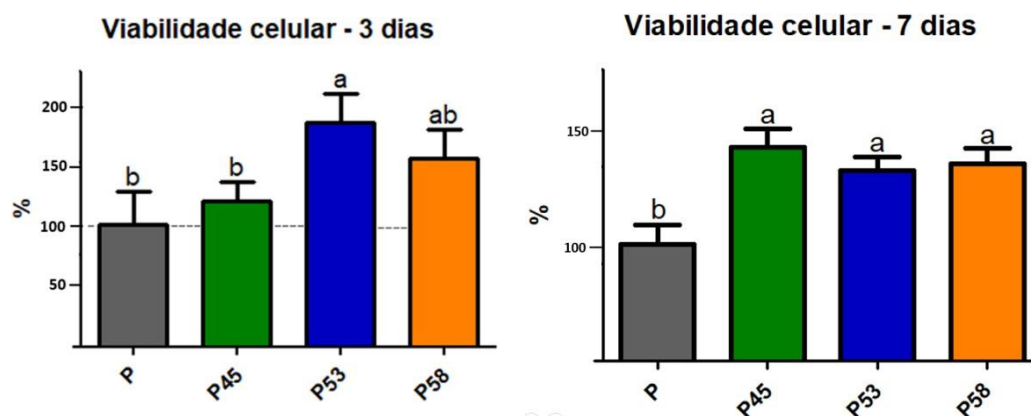
5.3 Ensaaios biológicos *in vitro*

Todos os dados obtidos nos testes *in vitro* foram analisados por meio do teste de normalidade, sendo que os resultados paramétricos foram submetidos ao teste de variância ANOVA um fator e complementado pelo teste de Tukey quando necessário a fim de verificar as diferenças estatísticas entre grupos. Para todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5%.

5.3.1 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada após 03 e 07 dias de cultivo celular. Os dados obtidos possibilitaram identificar que os quatro grupos experimentais não foram citotóxicos, ou seja, todos permitiram adequada viabilidade celular. A partir das absorbâncias obtidas, foi possível mensurar pela análise estatística descritiva, de forma proporcional ao grupo controle considerado 100%, que a viabilidade de todos os grupos experimentais foi superior a 70%. Na figura 22 é possível identificar que ao ser avaliado no período de 03 dias, os grupos P53 e P58 exibiram viabilidade celular acima dos grupos P e P45, porém apenas o grupo P53 exibiu diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Quando avaliado após o período de 07 dias, todos os grupos contendo vidro apresentaram viabilidade celular superior ao grupo P, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

Figura 22 – Viabilidade celular avaliada após os períodos de 03 e 07 dias

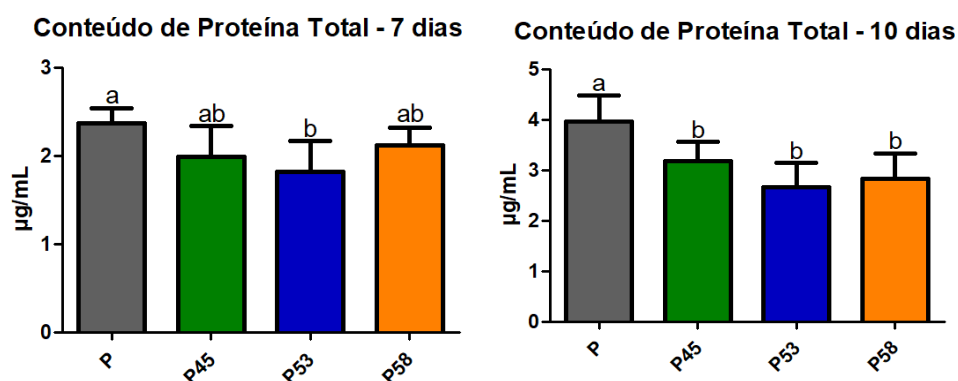


Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Análise do conteúdo de proteína total

A figura 23 ilustra os resultados obtidos na análise do conteúdo de proteína total após 07 e 10 dias. Os valores foram expressos em $\mu\text{g/mL}$, demonstrando a produção de proteína total pelas células cultivadas em contato com os grupos experimentais. Foi observado que após o período de 07 dias, o grupo P apresentou o maior valor de proteína total, contudo, diferiu estatisticamente apenas do grupo P53 ($p < 0,05$) que exibiu o menor valor de proteína total. Após o período de 10 dias, o grupo P manteve o maior valor diferindo estatisticamente dos grupos experimentais contendo vidro bioativo ($p < 0,05$).

Figura 23 – Conteúdo de proteína total avaliado após os períodos de 07 e 10 dias

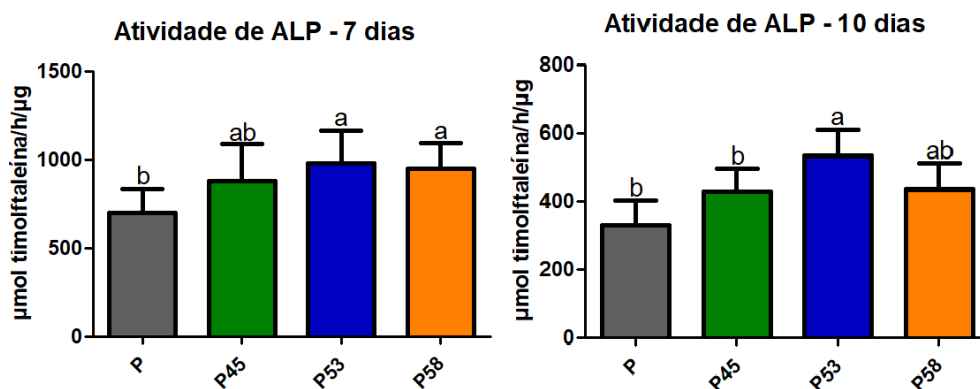


Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A partir dos mesmos lisados da análise do conteúdo de proteína total foi mensurada a atividade de ALP. Na figura 24 é possível observar que no período de 07 dias os grupos contendo vidro apresentaram os maiores valores e não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$), porém, os grupos P53 e P58 apresentaram diferença estatística com o grupo P ($p < 0,05$). No período de 10 dias foi observado que os grupos P53 e P58 mantiveram maior atividade e não diferiram entre si ($p < 0,0001$), porém o grupo P53 diferiu estatisticamente dos grupos P e P45 ($p < 0,05$).

Figura 24 – Atividade de fosfatase alcalina avaliada após os períodos de 07 e 10 dias

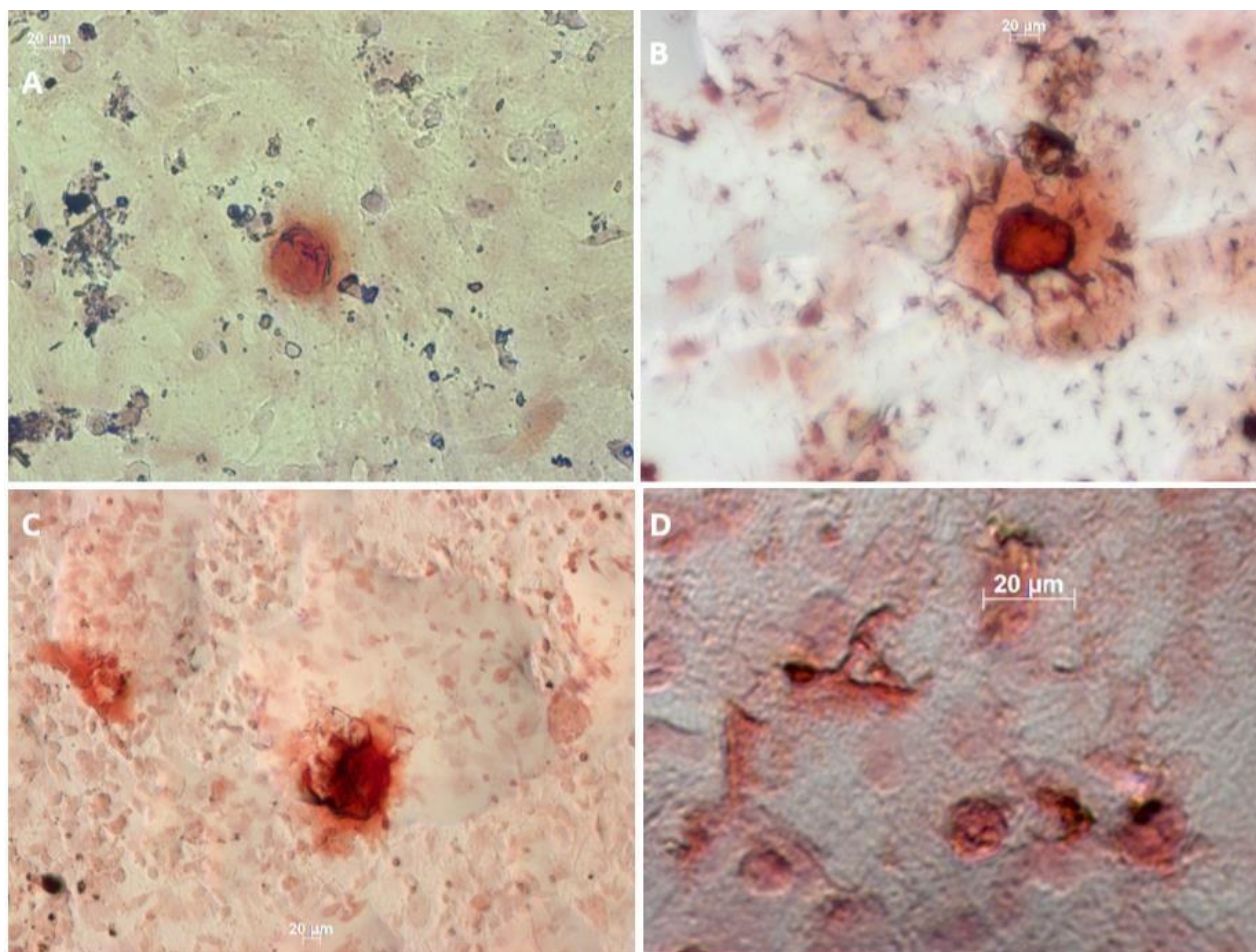


Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.4 Formação e quantificação de Alizarina nos nódulos de mineralização

Após 10 dias de cultura celular e por meio do corante de Alizarina S 2% foi possível observar a formação de nódulos de mineralização em todos os poços, confirmando a diferenciação celular das células originárias da medula óssea (Figura 25).

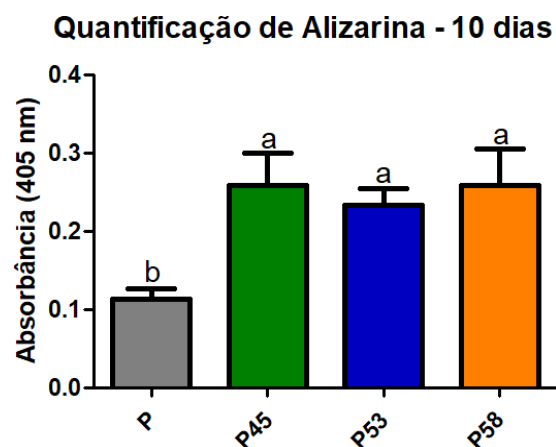
Figura 25 - Fotomicrografias representativas dos nódulos de mineralização



Legenda: Os nódulos de mineralização foram corados por Alizarina S 2% no fundo da placa A) grupo P B) grupo P45 C) grupo P53 D) grupo P58.
Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida, foi realizada a extração dos nódulos e quantificação da Alizarina. A figura 26 mostra os dados obtidos após a quantificação dos nódulos de mineralização, no qual pode ser observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos contendo vidro com o grupo P ($p < 0,05$).

Figura 26 - Quantificação de Alizarina nos nódulos de mineralização após o período de 10 dias

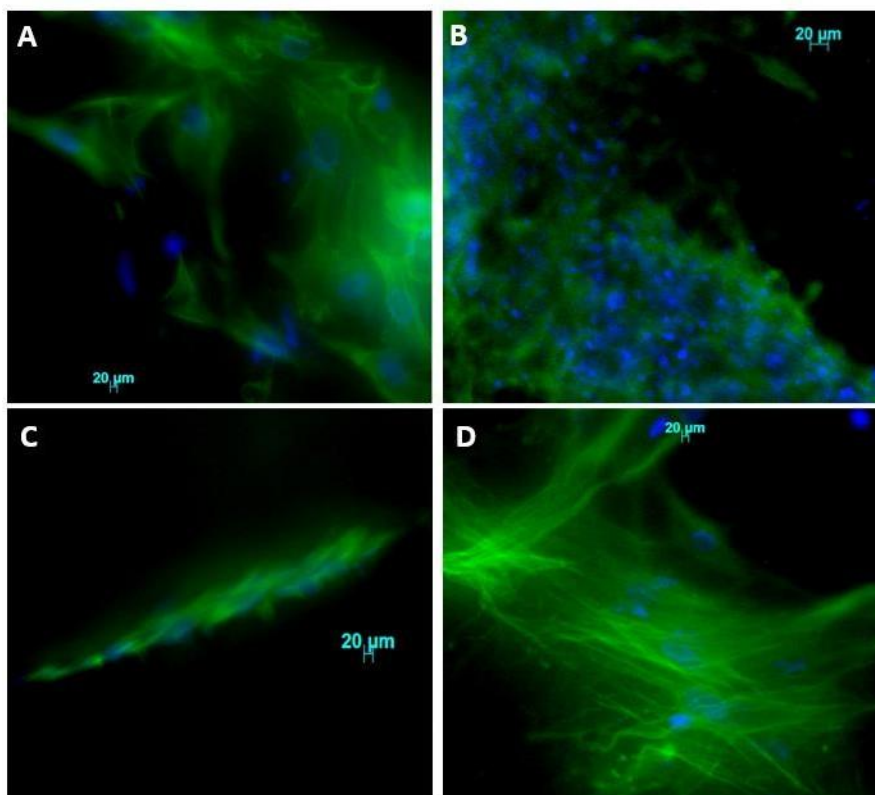


Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.5 Análise da morfologia celular por imunofluorescência

A análise da morfologia celular por imunofluorescência permitiu identificar que as células observadas nos poços exibiam, em sua maioria, morfologia poligonal de forma íntegra. Além disso, foi observado o citoesqueleto de actina distribuído pelo citoplasma, estendendo-se aos limites celulares corados com fluorocromo indicando o espreadimento celular. A distribuição das células evidenciou sua interação tanto na superfície quanto no emaranhado das nanofibras, podendo ser observado na figura 27.

Figura 27 – Micrografias em microscópio de fluorescência



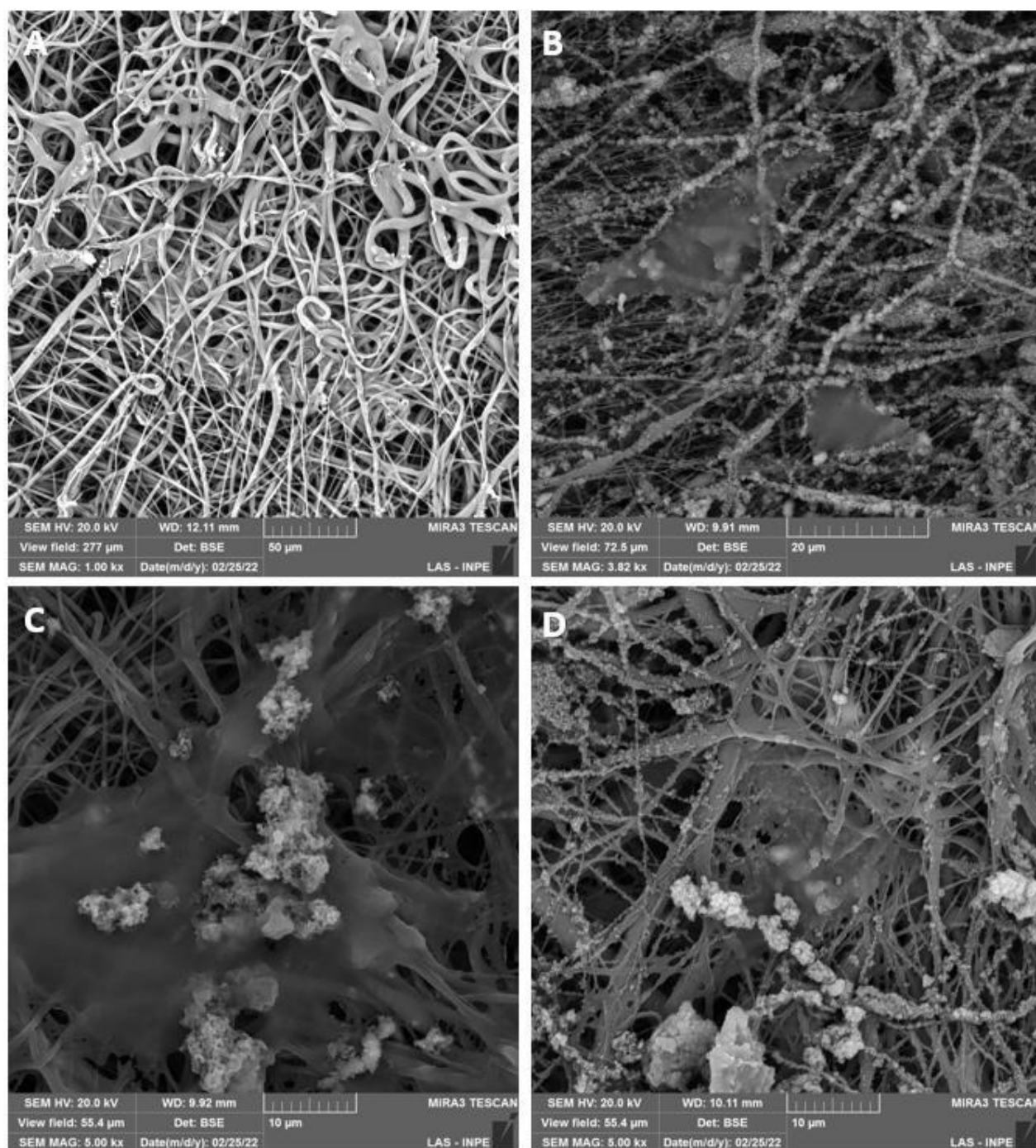
Legenda: As micrografias evidenciam a morfologia celular na superfície dos *scaffolds* de cada grupo experimental A) P B) P45 C) P53 D) P58.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.6 Interação celular

A análise da interação celular por MEV-FEG após 07 dias permitiu identificar que as células apresentaram adesão e espraio entre as nanofibras de todos os *scaffolds* (Figura 28). Nos grupos contendo vidro foi possível observar a formação de cristais na superfície das nanofibras, resultante da troca iônica de íons fosfato do meio de cultura utilizado com os vidros.

Figura 28 – Micrografia em MEV-FEG dos *scaffolds*, evidenciando a morfologia celular na superfície dos materiais após 7 dias em cultura



Legenda: Micrografia dos *scaffolds*, evidenciando a morfologia celular na superfície dos materiais após 7 dias em cultura A) grupo P, aumento de 1.000x B) grupo P45, aumento de 3.820x C) grupo P53, aumento de 5.000x D) grupo P58, aumento de 5.000x.

Fonte: Elaborada pela autora.

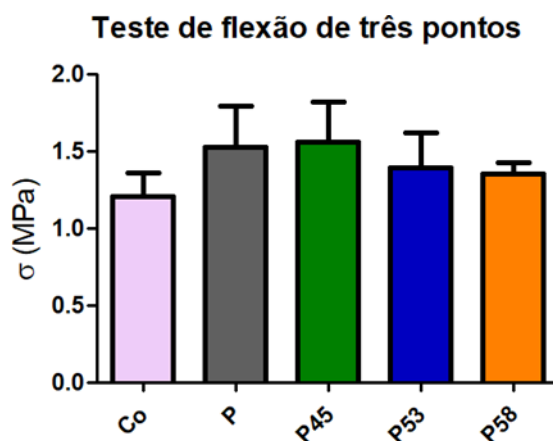
5.4 Ensaios *in vivo*

5.4.1 Avaliação biomecânica

A avaliação biomecânica foi realizada por meio do teste de flexão de três pontos, que permitiu avaliar a força de ruptura do tecido neoformado nas tíbias e as características teciduais do osso neoformado, sendo que os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico Anova 1 fator e ao teste de comparação múltipla de Tukey.

A figura 29 ilustra a relação em Mpa dos grupos experimentais com o grupo Co – grupo controle preenchido apenas com coágulo após realização do defeito ósseo - em Mpa, e é possível verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Figura 29 – Análise da força de ruptura das tíbias pelo teste de flexão de três pontos

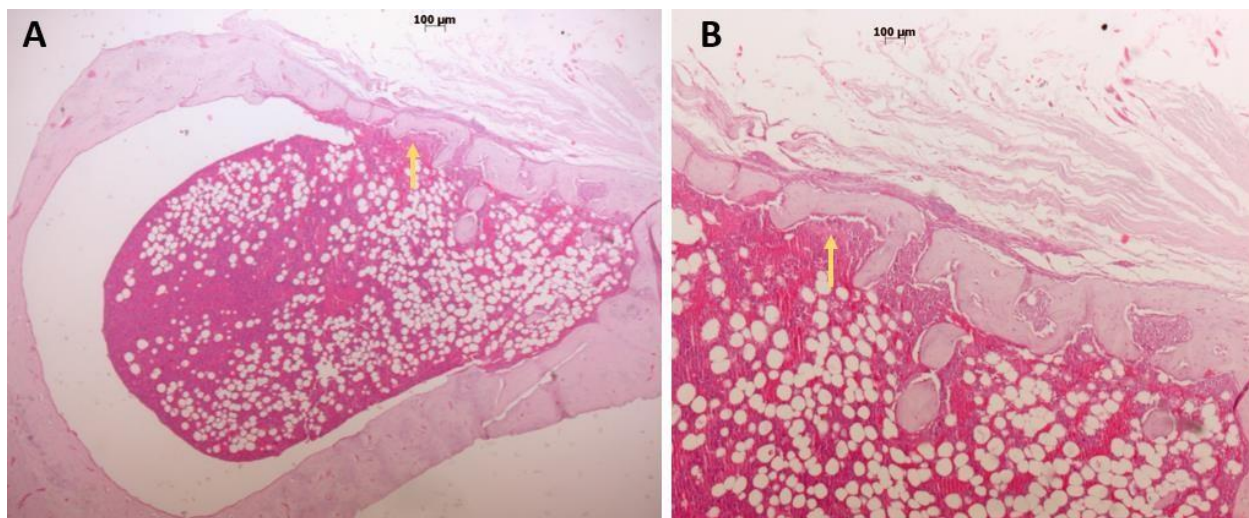


Fonte: Elaborada pela autora.

5.4.2 Análise histológica

A análise histológica foi realizada por microscópio óptico (MO), e foi verificada a remodelação óssea na região do defeito ósseo crítico preenchido com os biomateriais ou coágulo. Microscopicamente, foi possível observar aspecto de normalidade dos tecidos, sinais de remodelação do tecido ósseo com a proliferação de trabéculas ósseas neoformadas, osteócitos volumosos dentro de lacunas, osteoblastos arranjados em fileira contornando o tecido ósseo periférico e osteoclastos abrigados em lacunas de Howship, confirmando a atividade de reabsorção e aposição do tecido neoformado. As figuras 30, 31, 32, 33 e 34 confirmam a descrição histológica dos grupos experimentais.

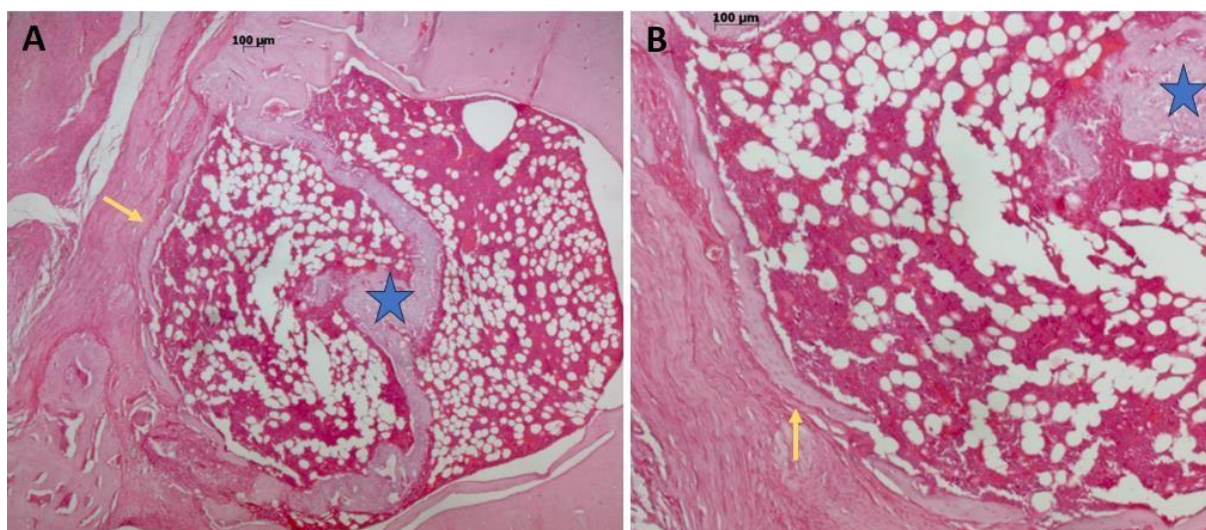
Figura 30 – Fotomicrografia em MO observada no grupo Coágulo



Legenda: Ponte óssea e tecido neoformado na região do defeito ósseo crítico (➡) A) Visão panorâmica, aumento de 4x B) aumento de 40x.

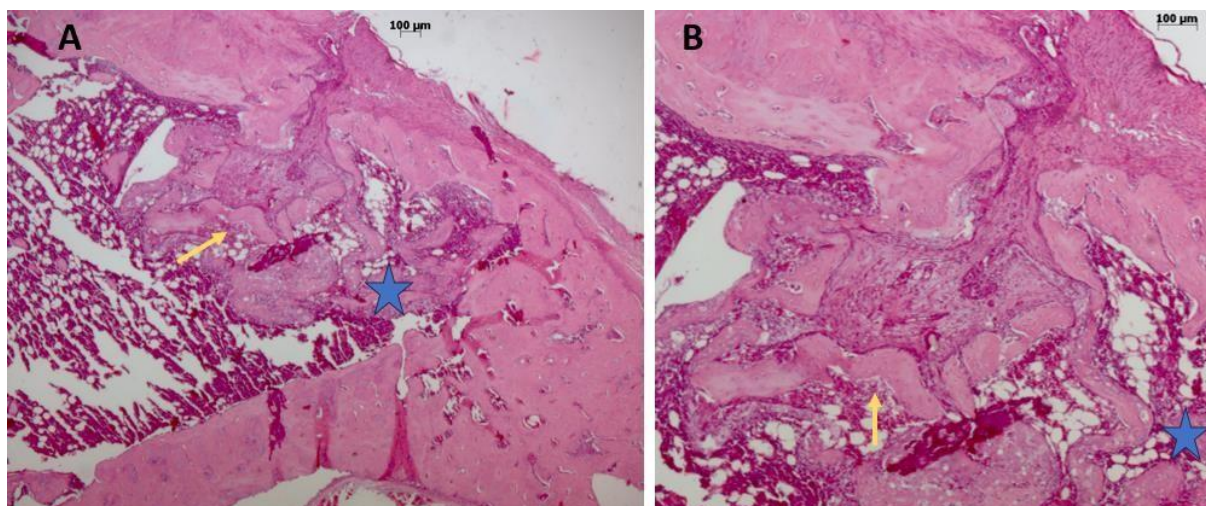
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31 – Fotomicrografia em MO observada no grupo P



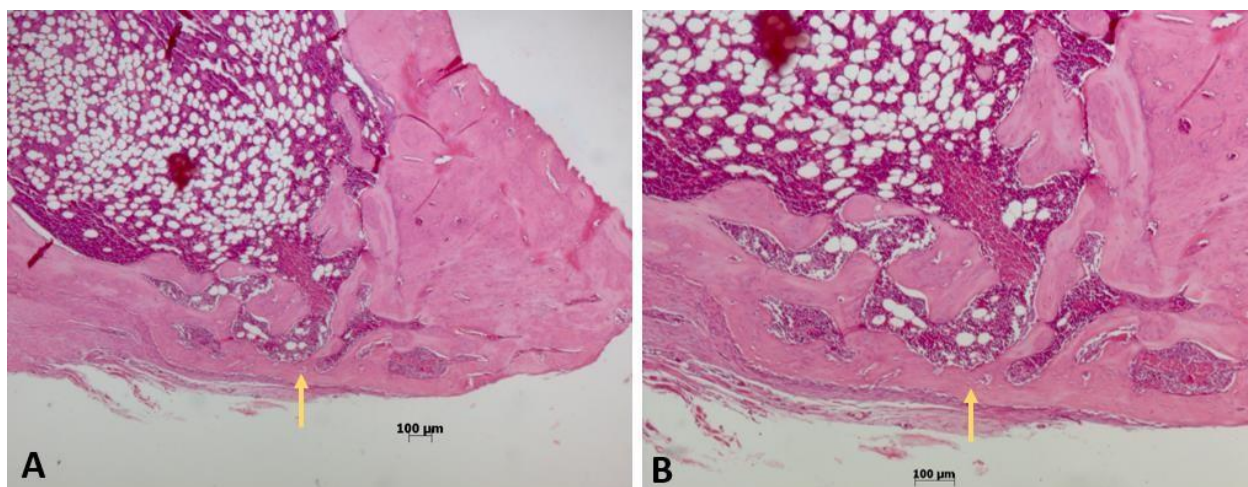
Legenda: Ponte óssea e tecido neoformado na região do defeito ósseo crítico (→), com presença do biomaterial (★) A) Visão panorâmica, aumento de 4x B) aumento de 20x.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 32 – Fotomicrografia em MO observada no grupo P45



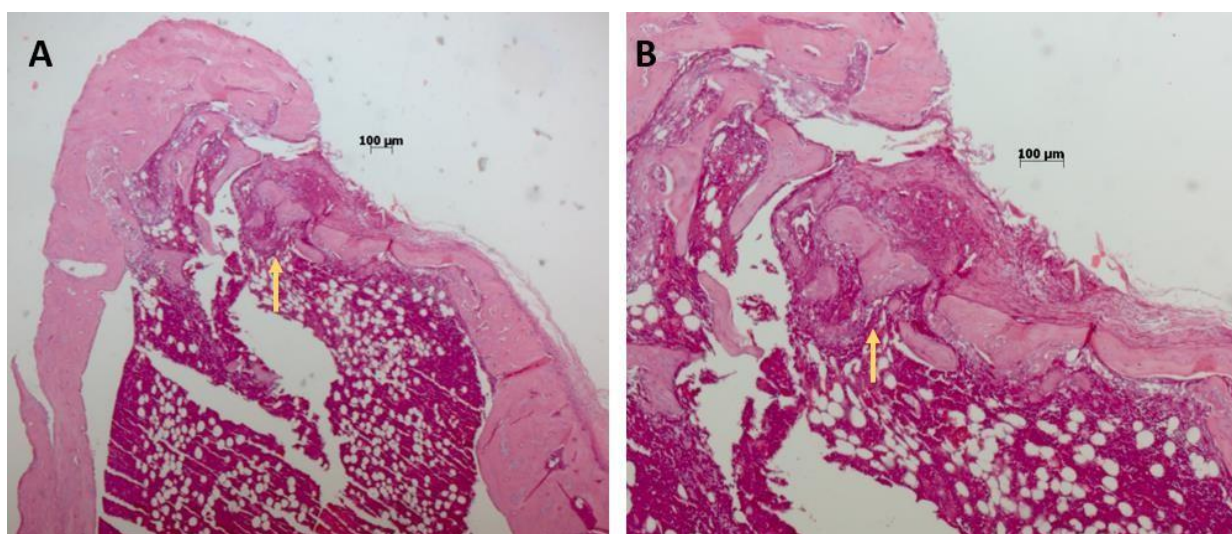
Legenda: Ponte óssea e tecido neoformado na região do defeito ósseo crítico (→), com presença do biomaterial (★) A) Visão panorâmica, aumento de 4x B) aumento de 20x.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 – Fotomicrografia em MO observada no grupo P53



Legenda: Ponte óssea e tecido neoformado na região do defeito ósseo crítico (→) A) Visão panorâmica, aumento de 4x B) aumento de 40x.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 34 – Fotomicrografia em MO observada no grupo P58



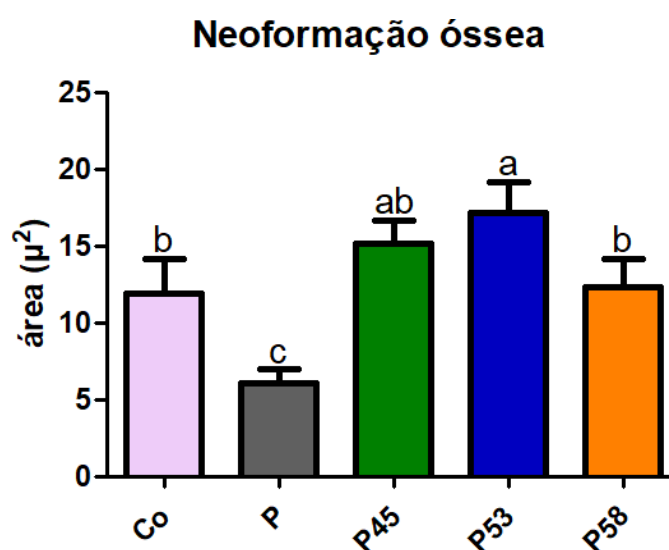
Legenda: Ponte óssea e tecido neoformado na região do defeito ósseo crítico (→) A) Visão panorâmica, aumento de 4x B) aumento de 20x.
Fonte: Elaborada pela autora.

5.4.3 Análise histomorfométrica

Após obtenção das imagens, a análise histomorfométrica foi realizada por um único examinador previamente calibrado, utilizando o programa computacional *Image J* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para Windows. A avaliação foi realizada no tecido neoformado na região do defeito ósseo (n=5), indicando a remodelação óssea em contato com os diferentes *scaffolds*. Todos os dados obtidos foram analisados por meio do teste de normalidade, sendo que os resultados paramétricos foram submetidos ao teste de variância ANOVA um fator e complementado pelo teste de Tukey quando necessário a fim de verificar as diferenças estatísticas entre grupos. Para todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5%.

Os dados estatísticos presentes na figura 35 demonstraram que o grupo P apresentou os menores valores de neoformação óssea, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos outros grupos experimentais. O grupo P53 apresentou a maior taxa de neoformação óssea, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) de todos os grupos analisados, exceto de P45.

Figura 35 - Gráfico quantitativo da neoformação óssea com os valores de média e desvio padrão ($\pm$)

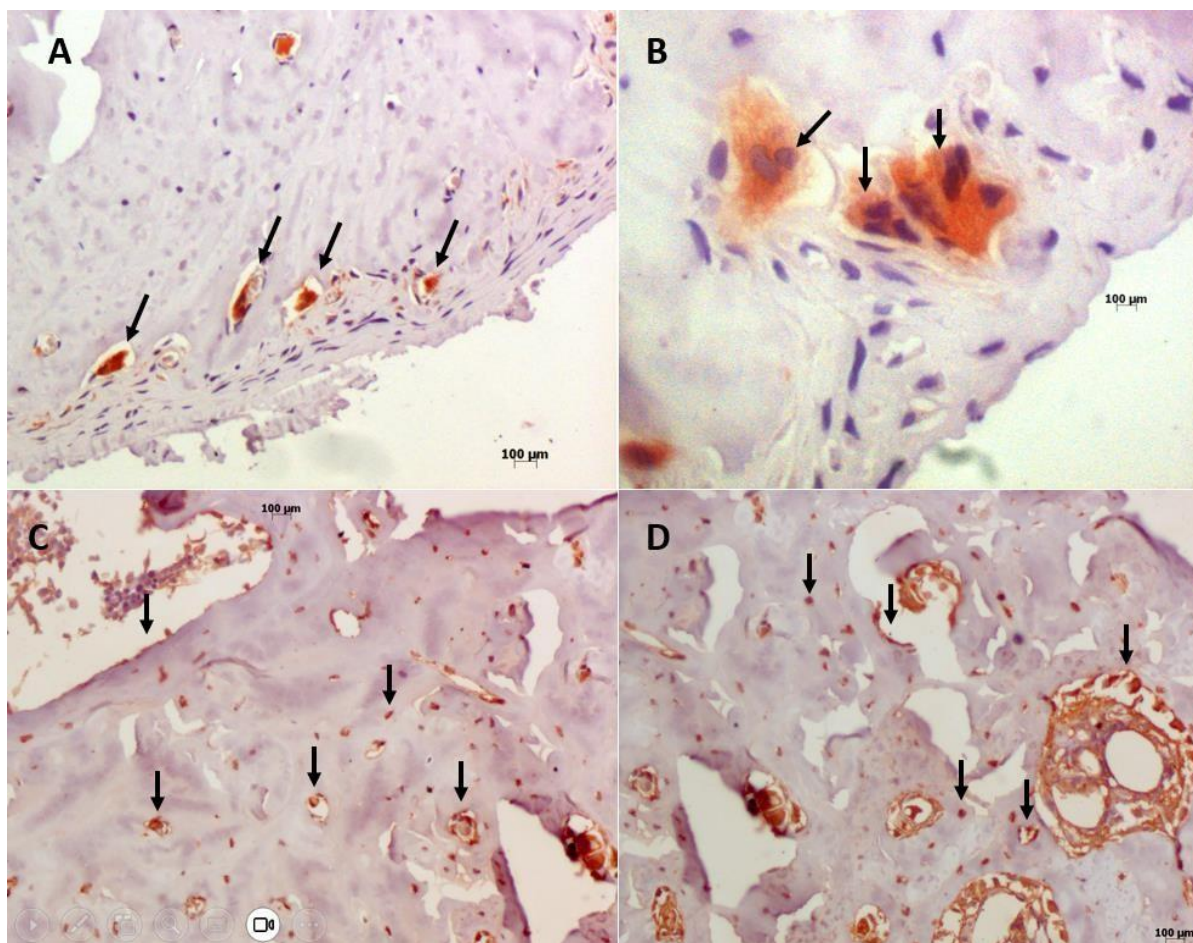


5.4.4 Análise imuno-histoquímica

O resultado da imuno-histoquímica foi baseado na avaliação qualitativa dos anticorpos TRAP e osteocalcina (OC). Para ambos os biomarcadores, foram realizadas avaliações na região de osso neoformado dos defeitos críticos após o período de 4 semanas. A análise foi realizada em microscópio óptico convencional por um único observador, previamente calibrado.

Nas figuras 36, 37, 38, 39 e 40 é possível observar as imunomarcações no grupo coágulo e grupos experimentais, respectivamente. Foi possível observar a osteocalcina principalmente na matriz óssea mineralizada, nas trabéculas ósseas neoformadas, osteócitos, osteoblastos e matriz extracelular. Já a incubação do TRAP foi utilizada como um marcador histoquímico da atividade osteoclástica, dessa forma, foi observada a imunomarcação de osteoclastos predominantemente no tecido ósseo neoformado periférico, e em áreas de remodelação, com presença de células grandes e multinucleadas, adaptadas em depressões conhecidas como lacunas de Howship.

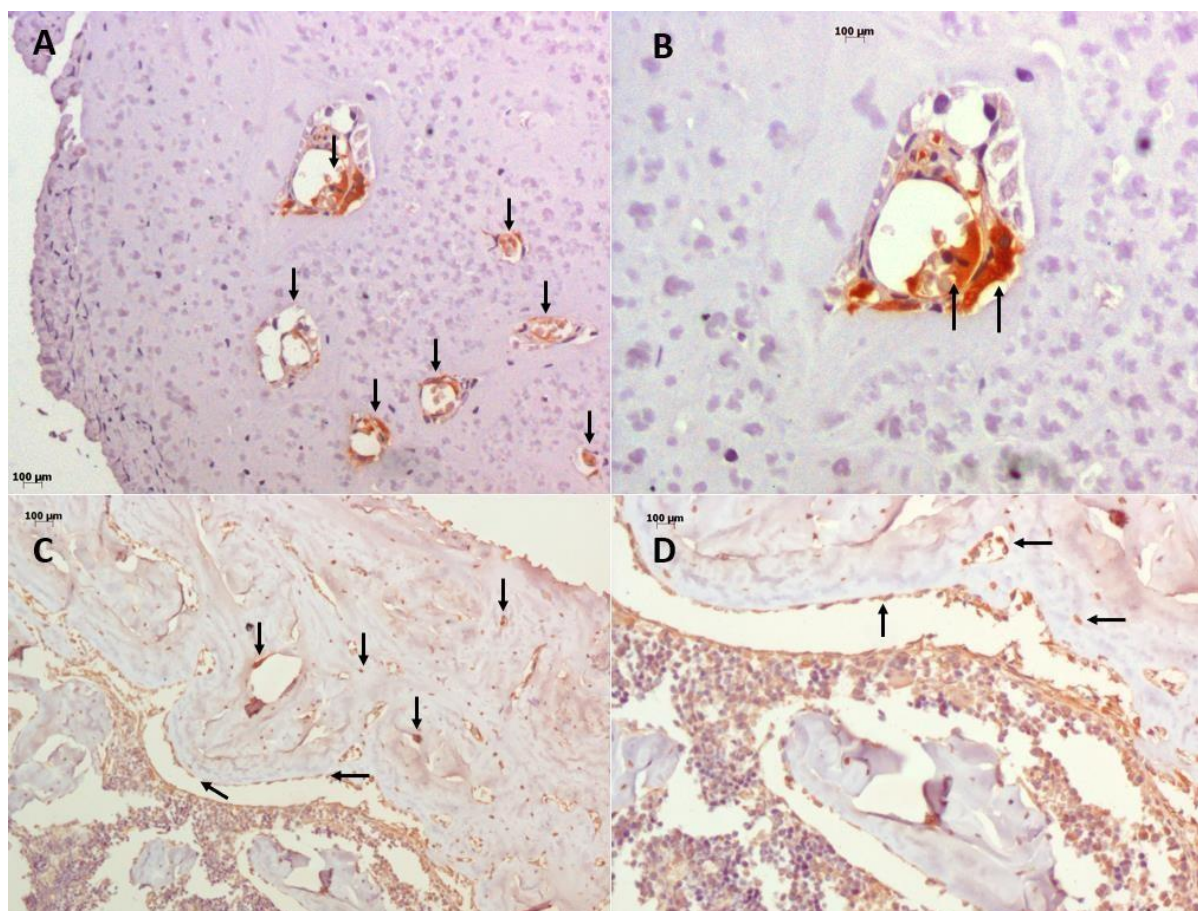
Figura 36 - Fotomicrografias dos cortes histológicos com imunomarcações positivas para TRAP e OC no grupo Coágulo



Legenda: A) imunomarcação de TRAP, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam os osteoclastos na periferia do osso neoformado, acomodadas nas lacunas de Howship B) imunomarcação de TRAP, aumento de 63x. As setas (→) evidenciam o aspecto gigante e multinucleado das células imunomarcadas C) imunomarcação de OC, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam a imunomarcação na matriz óssea, nos osteoblastos arranjados em fileira e nos osteócitos preenchendo as lacunas D) imunomarcação de OC, aumento de 40x.

Fonte: Elaborada pela autora.

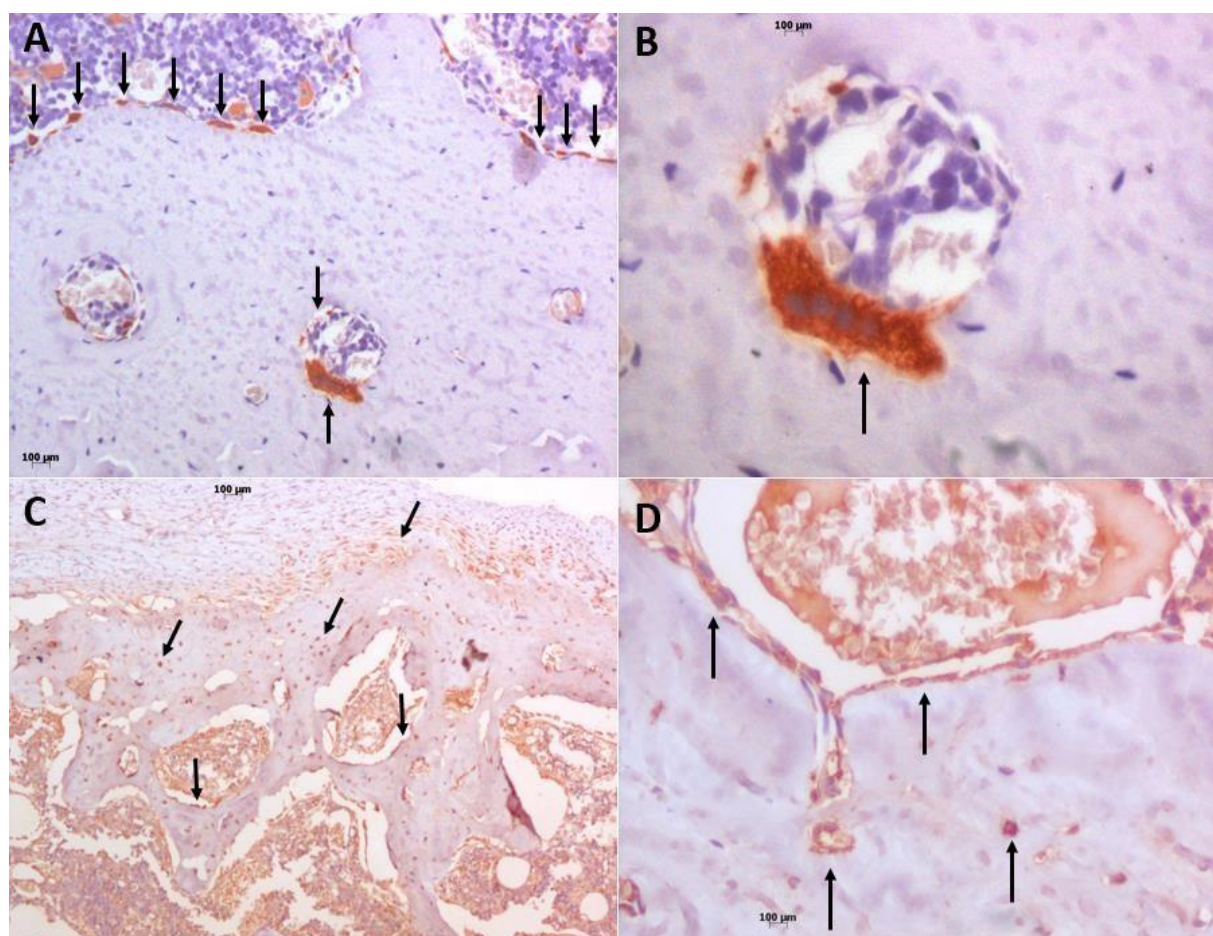
Figura 37 - Fotomicrografias dos cortes histológicos com imunomarcações positivas para TRAP e OC no grupo P



Legenda: A) imunomarcção de TRAP, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam os osteoclastos na periferia do osso neoformado, acomodados nas lacunas de Howship B) imunomarcção de TRAP, aumento de 63x. As setas (→) evidenciam o aspecto gigante e multinucleado das células imunomarcadas C) imunomarcção de OC, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam a imunomarcção na matriz óssea, nos osteoblastos arranjados em fileira e nos osteócitos preenchendo as lacunas D) imunomarcção de OC, aumento de 40x.

Fonte: Elaborada pela autora.

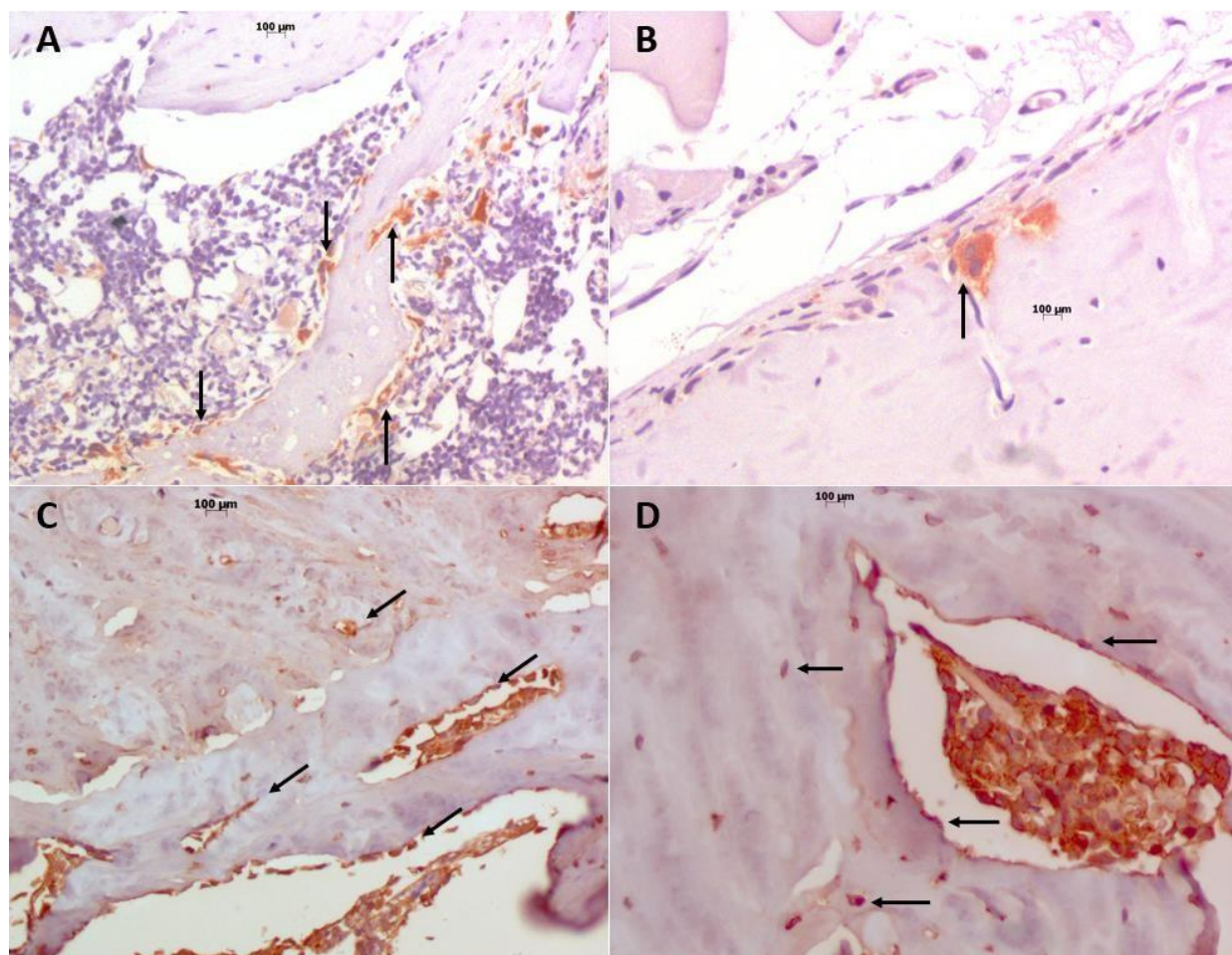
Figura 38 - Fotomicrografias dos cortes histológicos com imunomarcações positivas para TRAP e OC no grupo P45



Legenda: A) imunomarcção de TRAP, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam os osteoclastos na periferia do osso neoformado, acomodadas nas lacunas de Howship B) imunomarcção de TRAP, aumento de 63x. A seta (→) evidencia o aspecto gigante e multinucleado da célula imunomarcada C) imunomarcção de OC, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam a imunomarcção na matriz óssea, nos osteoblastos arranjados em fileira e nos osteócitos preenchendo as lacunas D) imunomarcção de OC, aumento de 40x.

Fonte: Elaborada pela autora.

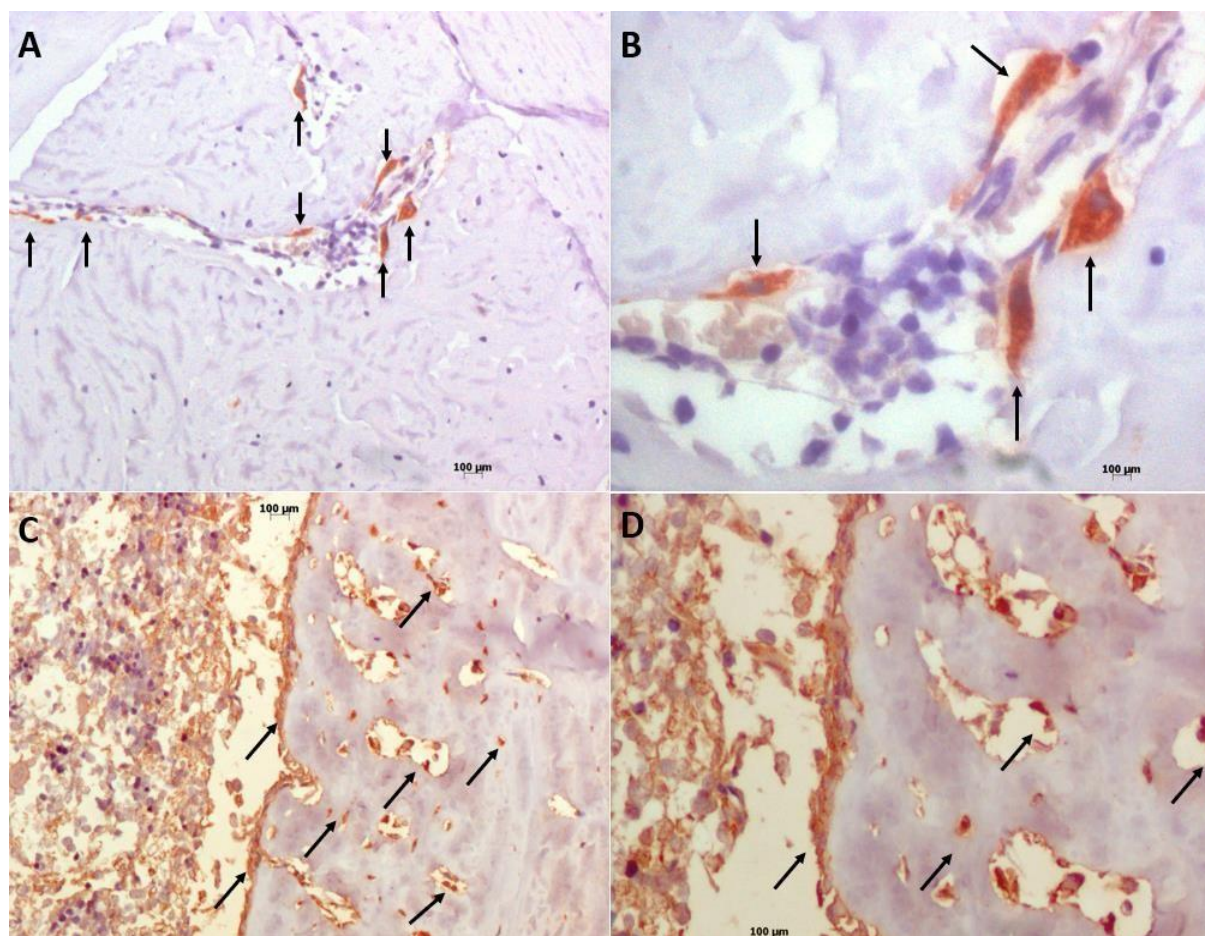
Figura 39 - Fotomicrografias dos cortes histológicos com imunomarcações positivas para TRAP e OC no grupo P53



Legenda: A) imunomarcação de TRAP, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam os osteoclastos na periferia do osso neoformado, acomodadas nas lacunas de Howship B) imunomarcação de TRAP, aumento de 40x. A seta (→) evidencia o aspecto gigante e multinucleado da célula imunomarcada C) imunomarcação de OC, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam a imunomarcação na matriz óssea, nos osteoblastos arranjados em fileira e nos osteócitos preenchendo as lacunas D) imunomarcação de OC, aumento de 63x.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 40 - Fotomicrografias dos cortes histológicos com imunomarcações positivas para TRAP e OC no grupo P58



Legenda: A) imunomarcação de TRAP, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam os osteoclastos na periferia do osso neoformado, acomodados nas lacunas de Howship B) imunomarcação de TRAP, aumento de 63x. As setas (→) evidenciam o aspecto gigante e multinucleado das células imunomarcadas C) imunomarcação de OC, aumento de 10x. As setas (→) evidenciam a imunomarcação na matriz óssea, nos osteoblastos arranjados em fileira e nos osteócitos preenchendo as lacunas D) imunomarcação de OC, aumento de 40x.

Fonte: Elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

Uma das primeiras definições de “biomaterial” surgiu em 1967 pelo Dr. Cohen, que definiu o termo como: “todos os materiais usados como implantes, com exceção de drogas e tecidos biológicos moles” (Cohen, 1967). Muitos estudos e avanços foram realizados neste campo, e hoje a definição mais amplamente aceita foi determinada em 1991 pela Sociedade Europeia de Biomateriais durante a 9ª conferência Europeia em Chester, Reino Unido. Nesta nova definição, um biomaterial é definido como “qualquer substância ou combinação de substâncias, exceto drogas, de origem sintética ou natural, que pode ser usada por qualquer período de tempo, que aumenta ou substitui parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo”. Essa nova definição se torna muito interessante pois evidencia que um biomaterial não deve apenas substituir uma perda do paciente, mas sim superar seus inconvenientes (Todros et al., 2021).

Os biomateriais apresentam uma ampla gama de uso dentro da medicina e da odontologia, e com isso se faz necessário uma variedade de materiais que se adequem a diferentes usos, bem como sua adaptação para cada caso clínico. Nesse quesito, compósitos a base de polímeros e vidros bioativos vêm se destacando para uso no ramo da ortopedia e da odontologia, pois além da sua arquitetura mimetizar o tecido endógeno, a alta capacidade regenerativa do tecido ósseo associada à bioatividade do biomaterial promovem uma regeneração tecidual eficaz (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2020).

Os vidros bioativos são comumente preparados por duas rotas: a sol-gel ou a *melt-quenching*. O processo de sol-gel foi desenvolvido para aprimorar a fácil cristalização da primeira formulação do biovidro 45S5, permitindo a síntese de vidros com alta pureza (Sepulveda et al., 2001). Embora seja uma técnica desenvolvida para o biovidro 45S5, ela também é usada para a síntese de outros vidros bioativos, como os descritos nesse presente trabalho. A escolha da rota deve ser norteadada pela porosidade e uniformidade desejada do material, bem como suas propriedades mecânicas e, especialmente, de bioatividade. Na fabricação de vidros pela rota sol-gel, os precursores orgânicos passam primeiramente por uma gelificação, seguido

de secagem para preparar o vidro amorfo. Essa rota se destaca pela formação de vidro com mesoporos, ou seja, apresentam em sua estrutura cristalina poros na faixa de 2-50 nm (Kaur et al., 2016), essenciais para a adesão e espraio celular, bem como o transporte de nutrientes pelo biomaterial (Langer et al., 2016).

Neste presente estudo, a produção do compósito após a confecção dos vidros bioativos foi realizada pela técnica de eletrospinning. Cada vidro bioativo foi misturado ao polímero e, após total dissolução dos componentes, a solução foi transferida à seringa e acoplada ao aparato da eletrospinning. Nesta técnica, um campo elétrico é aplicado ao sistema, e a medida que a força do campo elétrico aumenta, a microesfera da solução formada na extremidade da agulha da seringa se alonga e forma o chamado “cone de Taylor”. A força eletrostática dentro do cone de Taylor supera a tensão superficial, gerando assim um jato líquido. Esse jato sofre instabilidades de flexão, levando ao espalhamento das fibras pelo coletor metálico, resultado em um tapete fibroso com orientação aleatória (Yarin et al., 2001).

Nas imagens de MEV, foi possível identificar o emaranhado de fibras poliméricas orientado aleatoriamente, sem a presença de *beads*, bem como a adequada incorporação dos respectivos vidros na superfície e no interior das nanofibras, sendo que estes diferiram quando a sua estrutura e morfologia, o que indica o sucesso na produção dos vidros e incorporação das diferentes soluções, sem contaminação entre os grupos experimentais. Estes resultados ainda corroboram com a avaliação físico-química das amostras, na qual a composição estrutural dos vidros foi confirmada pela majoritária presença de bandas Q2, indicando a bioatividade do vidro silicato (González et al., 2003), a composição química foi confirmada por EDS e a eficácia da incorporação de cada vidro na manta do compósito eletrospinnado foi avaliada por TGA. Nesta última análise, fica evidente que o peso molecular e a estrutura do vidro afetam diretamente sua incorporação no PCL, mesmo com a metodologia padronizada de 1:1 na solução de polímero + vidro para todos os grupos, entretanto, os resultados *in vitro* e *in vivo* descritos abaixo revelam que a taxa de incorporação não é proporcional à atividade e diferenciação celular. Baseando-se nos resultados, sugerimos que o sucesso no uso deste *scaffold* não está vinculado a uma maior concentração de vidro bioativo, mas sim nas ligações químicas e propriedades biológicas que cada formulação terá quando em contato com o meio biológico.

Diversos estudos vêm avaliando o diâmetro médio das fibras poliméricas, e esta análise faz-se de suma importância para compreender o comportamento morfológico das fibras quando submetidas ao processo de eletrofiação (Murphy et al., 2020; Obukuro et al., 2008; Zonderland et al., 2020). Os resultados obtidos demonstraram que o grupo P apresentou maior média de fibras, enquanto os grupos contendo vidro bioativo apresentaram uma diminuição no tamanho da fibra. Pelipenko et al. (2014) demonstraram que a mobilidade celular diminui com um aumento entre 300 a 700 nm da espessura da fibra, enquanto aumenta a adesão celular. Correlacionando com o presente estudo, foi observado um melhor comportamento *in vitro* e *in vivo* dos grupos contendo vidro bioativo quando comparado ao grupo P, confirmando assim que o diâmetro da fibra é um parâmetro que influencia no sucesso da resposta celular. Contudo, ainda não está claro na literatura como o vidro age nessa alteração estrutural do compósito polimérico, sugerindo assim uma maior investigação a nível químico deste achado.

Na análise da molhabilidade, foi observado que nos primeiros segundos em contato com a gota, os grupos contendo vidro apresentaram menor ângulo, em seguida, apresentaram um comportamento de absorção da água mais linear, semelhante ao grupo P. Este achado sugere que o vidro realiza essa primeira absorção da água de maneira mais significativa, indicando que o mesmo aumenta a hidrofília do biomaterial, e corrobora com os achados de Maquet et al. (2003) e Misra et al. (2010).

Ao avaliarmos a citotoxicidade em contato com os grupos experimentais, foi observado aumento da viabilidade celular dos grupos contendo vidro do 3º para o 7º dia de avaliação. Isso pode ser explicado devido a degradação do vidro bioativo, pois quando em contato com o meio, o vidro bioativo aumenta a solubilidade das partículas e ocorre a liberação dos íons cálcio, fosfato e sílica, promovendo assim uma alteração no pH local, este efeito irá agir sobre a viabilidade celular em contato com o biomaterial (Hoppe et al., 2011). Assim, no contato inicial com o vidro bioativo, as células podem sofrer um período de estresse devido à essa interação com o material, que pode promover uma diminuição temporária na viabilidade, mas que é superada à medida que as células se adaptam à superfície do vidro e ao ambiente local. A literatura relata que essa alteração é geralmente transitória e as células podem se recuperar e readquirir sua viabilidade normal (Baino et al., 2016; Fiume et

al., 2018), como foi observado no presente estudo.

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima envolvida no metabolismo ósseo, com atuação na diferenciação celular de osteoblastos, bem como na osteogênese, formação e mineralização óssea. Estudos têm mostrado que a atividade de ALP intracelular é intensificada em contato com vidros bioativos (Ren et al., 2021; Yuan et al., 2001). Visando avaliar a diferenciação e o potencial osteogênico dos biomateriais, foi avaliado o conteúdo de proteína total e a atividade de ALP a partir dos mesmos lisados, e foi observado que em ambos os períodos analisados, o grupo P apresentou maiores valores de proteína total, porém menores valores de ALP. O comportamento inverso foi observado nos grupos contendo vidro bioativo, ou seja, em um menor conteúdo de proteína total ocorreu uma maior atividade de ALP. Esse dado foi confirmado na formação de nódulos de mineralização e na quantificação de Alizarina, no qual os grupos contendo vidro bioativo apresentaram uma maior quantificação, diferindo estatisticamente do grupo P. A confirmação se faz verdadeira porque mesmo sendo observada a formação de nódulos em todos os grupos, essa quantificação da Alizarina revela a mineralização e a formação de matriz óssea em cada grupo analisado.

A análise da morfologia e interação celular revelou a distribuição das células na superfície e no emaranhado das nanofibras, indicando o potencial do biomaterial de agir como um *scaffold* para adesão e proliferação celular (Hutmacher, 2006). A partir dos achados *in vitro* realizou-se a etapa *in vivo* para avaliar o potencial regenerativo dos biomateriais em defeitos ósseos realizados em tíbias de ratos.

O teste biomecânico de flexão de três pontos realizado na área do defeito ósseo evidenciou que não houve diferença estatística ao comparar a força de ruptura nas tíbias preenchidas pelos diferentes grupos com o grupo Co. Contudo, ao pensar na natureza regenerativa do biomaterial, e não de substituição óssea, deve-se ter em mente que a membrana será degradada pelo organismo, e assim, o principal desafio é avaliar se o material funciona como um bom arcabouço celular à medida que vai sendo reabsorvido pelo organismo. Tem sido descrito que o polímero e o vidro apresentam uma forte ligação covalente, e isso permite uma degradação simultânea do composto (Vukajlovic et al., 2019). Esses resultados condizem com os achados na literatura, no qual está bem estabelecido que as nanofibras se tornam atrativas devido ao aumento da área de superfície e maior porosidade, porém, quando as propriedades mecânicas do material são avaliadas, elas mostram-se baixas. Ou seja, embora o espreadimento celular ocorra nesse arcabouço das nanofibras, elas por si só não conseguem aumentar a propriedade mecânica do

tecido neoformado. (Ardeshirylajimi et al., 2015; Ren et al., 2014; Santocildes-Romero et al., 2016).

Esses dados podem ser correlacionados à análise histomorfométrica realizada no presente estudo, foi verificada maior neoformação óssea nos grupos contendo vidro bioativo quando comparados ao grupo P, sugerindo que a degradação dos compósitos ocorreu de maneira concomitante à remodelação óssea. No entanto, apenas o grupo P53 mostrou-se superior, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), ao grupo Co, que simula a reparação tecidual natural, sem intervenção de biomateriais.

A remodelação óssea também foi avaliada por imuno-histoquímica por meio da imunomarcagem dos anticorpos TRAP e osteocalcina. A utilização desses anticorpos em conjunto revela características específicas da reabsorção óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos, indicativo da remodelação óssea esperada. Visto que o TRAP é uma enzima encontrada em células envolvidas na reabsorção óssea, como os osteoclastos, a presença de osteoclastos ativos indica atividade de reabsorção óssea (Kiyoi, 2018). Já a osteocalcina é uma proteína produzida pelos osteoblastos, células responsáveis pela síntese e deposição de matriz óssea. A osteocalcina desempenha um papel importante na mineralização e maturação dos ossos, assim, seu uso se dá na detecção de osteoblastos e na produção de matriz óssea. A presença de osteocalcina é considerada um marcador específico de formação óssea (Koblenzer et al., 2022).

Fedchenko e Reifenrath (2014) discutiram as diferentes metodologias e análises imuno-histoquímicas existentes para estudo do tecido ósseo, e apontaram que a análise qualitativa por meio da descrição de parâmetros morfológicos pode ser aplicada em estudos pilotos, e em casos no qual a análise imuno-histoquímica não é a principal metodologia do trabalho. Neste caso, essa análise do estudo em questão não poderá ser comparada com outros estudos diretamente, porém, este método pode destacar detalhes que são mascarados no sistema de *score* normalmente utilizado. Outros estudos seguiram esse padrão para revelar se o tecido se comportou da maneira esperada, e não necessariamente com o objetivo de quantificar a presença desses componentes (Knabe et al., 2006; Recker et al.,

2011). Dado a natureza exploratória deste presente estudo, a IHC foi avaliada qualitativamente e de maneira concomitante à histologia e histomorfometria dos grupos experimentais. Ou seja, a análise histológica evidenciou aspectos da remodelação óssea, como trabéculas ósseas neoformadas, osteócitos volumosos e osteoblastos arranjados em fileira, além da presença de osteoclastos. Contudo, a imunomarcção dessas estruturas, por meio de marcadores bioquímicos comprovam o processo metabólico que ocorre no tecido (Banfi et al., 2010; Greenblatt et al., 2017). Por fim, esta análise reforça os achados da histomorfometria, visto que a remodelação óssea foi observada em todos os grupos experimentais, mesmo com influência dos *scaffolds* estudadas na neoformação óssea.

Apesar do grupo P53 ter apresentado resultados *in vitro* e *in vivo* mais promissores, faz-se necessário mais estudos para determinar a melhor aplicação de cada um dos vidros bioativos avaliados. Além disso, sugere-se mais estudos para determinar o perfil de biodegradação e bioatividade desses materiais, bem como a avaliação de suas propriedades mecânicas.

Todos os resultados acima descritos indicam o sucesso na produção e inserção deste biomaterial na pesquisa translacional, e seu potencial uso para estudos clínicos.

7 CONCLUSÃO

Por meio da metodologia e testes desenvolvidos, é possível afirmar que a hipótese foi bem formulada e respondida.

Em relação à síntese do biomaterial, foi observado o sucesso na produção dos *scaffolds* formado por um compósito de nanofibras de PCL com vidros bioativos, 45S5, S53P4 e 58S, pela técnica de eletrofiação, confirmado pela metodologia físico-química e morfológica.

Os resultados *in vitro* e *in vivo* revelaram que a incorporação dos vidros bioativos foi capaz de aumentar a biocompatibilidade e bioatividade do polímero base utilizado (PCL). Estes resultados revelaram ainda que os *scaffolds* não foram citotóxicos, e permitiram a atividade e diferenciação celular, bem como indicaram maior tendência a neoformação óssea, confirmada estatisticamente no grupo P53.

Sendo assim, os *scaffolds* de PCL incorporadas aos vidros bioativos 45S5, S53P4 e 58S se mostraram promissoras para a bioengenharia óssea, visando seu uso para regeneração tecidual.

REFERÊNCIAS

- Agarwal R, García AJ. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Nov 1;94:53-62. doi: 10.1016/j.addr.2015.03.013. Epub 2015 Apr 8. PMID: 25861724; PMCID: PMC4598264.
- Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials.* 2001 Jun;22(12):1683-7. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00330-6. PMID: 11374470.
- Ali S, Farooq I, Iqbal K. A review of the effect of various ions on the properties and the clinical applications of novel bioactive glasses in medicine and dentistry. *Saudi Dent J.* 2014 Jan;26(1):1-5. doi: 10.1016/j.sdentj.2013.12.001. Epub 2013 Dec 15. PMID: 24526822; PMCID: PMC3923171.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408. doi: 10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10. PMID: 23339648; PMCID: PMC3766369.
- Anindyajati A, Boughton P, Ruys AJ. Mechanical and Cytocompatibility Evaluation of UHMWPE/PCL/Bioglass® Fibrous Composite for Acetabular Labrum Implant. *Materials (Basel).* 2019 Mar 19;12(6):916. doi: 10.3390/ma12060916. PMID: 30893909; PMCID: PMC6470684.
- Ardeshirylajimi A, Farhadian S, Adegani FJ, Mirzaei S, Zomorrod MS, Langroudi L, et al. Enhanced osteoconductivity of polyethersulphone nanofibres loaded with bioactive glass nanoparticles in in vitro and in vivo models. *Cell Prolif.* 2015 Aug;48(4):455-64. doi: 10.1111/cpr.12198. Epub 2015 Jun 29. PMID: 26121911; PMCID: PMC6496773.
- Aurégan JC, Bégué T. Bioactive glass for long bone infection: a systematic review. *Injury.* 2015 Dec;46 Suppl 8:S3-7. doi: 10.1016/S0020-1383(15)30048-6. PMID: 26747915.
- Aurégan JC, Villain B, Glombitza M, Blokhuis T, Heinänen M, Bégué T. Utilization of bioactive glass S53P4 inside an induced membrane for severe bone defect with high risk of infection: a multi-center preliminary experience. *Injury.* 2022 Oct;53 Suppl 2:S13-S19. doi: 10.1016/j.injury.2022.07.027. Epub 2022 Jul 17. PMID: 35871084.
- Baino F, Fiorilli S, Vitale-Brovarone C. Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: Review of recent advances. *Acta Biomater.* 2016 Sep 15;42:18-32. doi: 10.1016/j.actbio.2016.06.033. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27370907.
- Banfi G, Lombardi G, Colombini A, Lippi G. Bone metabolism markers in sports medicine. *Sports Med.* 2010 Aug 1;40(8):697-714. doi: 10.2165/11533090-000000000-00000. PMID: 20632739.

Banimohamad-Shotorbani B, Rahmani Del Bakhshayesh A, Mehdipour A, Jarolmasjed S, Shafaei H. The efficiency of PCL/HAp electrospun nanofibers in bone regeneration: a review. *J Med Eng Technol*. 2021 Oct;45(7):511-531. doi: 10.1080/03091902.2021.1893396. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34251971.

Basal O, Ozmen O, Deliormanlı AM. Bone Healing in Rat Segmental Femur Defects with Graphene-PCL-Coated Borate-Based Bioactive Glass Scaffolds. *Polymers (Basel)*. 2022 Sep 18;14(18):3898. doi: 10.3390/polym14183898. PMID: 36146043; PMCID: PMC9500610.

Bellucci D, Chiellini F, Ciardelli G, Gazzarri M, Gentile P, Sola A, et al. Processing and characterization of innovative scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Jun;23(6):1397-409. doi: 10.1007/s10856-012-4622-6. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22441671.

Brauer DS. Bioactive glasses—structure and properties. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015 Mar 27;54(14):4160-81. doi: 10.1002/anie.201405310. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25765017.

Calori IR, Braga G, Carvalho de Jesus PC, Bi H, Tedesco AC. Polymer Scaffolds as Drug Delivery Systems. *Eur Polymer J*. 2020 March 19;109621. doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.109621

Chen X, Karpukhina N, Brauer DS, Hill RG. High chloride content calcium silicate glasses. *Phys Chem Chem Phys*. 2017 Mar 8;19(10):7078-7085. doi: 10.1039/c6cp07905a. PMID: 28225127.

Chen X, Karpukhina N, Brauer DS, Hill RG. Novel highly degradable chloride containing bioactive glasses. *Biomed Glas*. 2015;1:108-118. doi:10.1515/bglass-2015-001012.

Cannio M, Bellucci D, Roether JA, Boccaccini DN, Cannillo V. Bioactive Glass Applications: A Literature Review of Human Clinical Trials. *Materials (Basel)*. 2021 Sep 20;14(18):5440. doi: 10.3390/ma14185440. PMID: 34576662; PMCID: PMC8470635.

Cohen J. Biomaterials in orthopedic surgery. *Am J Surg*. 1967 Jul;114(1):31-41. doi: 10.1016/0002-9610(67)90037-2. PMID: 5338210.

Codrea CI, Croitoru AM, Baciuc CC, Melinescu A, Ficai D, Fruth V, et al. Advances in Osteoporotic Bone Tissue Engineering. *J Clin Med*. 2021 Jan 12;10(2):253. doi: 10.3390/jcm10020253. PMID: 33445513; PMCID: PMC7827332.

Cottrill E, Pennington Z, Lankipalle N, Ehresman J, Valencia C, Schilling A, et al. The effect of bioactive glasses on spinal fusion: A cross-disciplinary systematic review and meta-analysis of the preclinical and clinical data. *J Clin Neurosci*. 2020 Aug;78:34-46. doi: 10.1016/j.jocn.2020.04.035. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32331941.

Davari A, Ataei E, Assarzadeh H. Dentin hypersensitivity: etiology, diagnosis and treatment; a literature review. *J Dent (Shiraz)*. 2013 Sep;14(3):136-45. PMID: 24724135; PMCID: PMC3927677.

da Fonseca GF, Avelino SOM, Mello DCR, do Prado RF, Campos TMB, de Vasconcellos LMR, et al. Scaffolds of PCL combined to bioglass: synthesis, characterization and biological performance. *J Mater Sci Mater Med*. 2020 Apr 29;31(5):41. doi: 10.1007/s10856-020-06382-w. PMID: 32350625.

de Andrade DP, de Vasconcellos LM, Carvalho IC, Forte LF, de Souza Santos EL, Prado RF, et al. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015 Nov 1;56:538-44. doi: 10.1016/j.msec.2015.07.026. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26249625.

do Prado RF, Esteves GC, Santos ELS, Bueno DAG, Cairo CAA, Vasconcellos LGO, et al. In vitro and in vivo biological performance of porous Ti alloys prepared by powder metallurgy. *PLoS One*. 2018 May 17;13(5):e0196169. doi: 10.1371/journal.pone.0196169. PMID: 29771925; PMCID: PMC5957353.

Ding H, Cheng Y, Niu X, Hu Y. Application of electrospun nanofibers in bone, cartilage and osteochondral tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2021 Mar;32(4):536-561. doi: 10.1080/09205063.2020.1849922. Epub 2020 Dec 6. PMID: 33175667.

Ding Y, Liu X, Zhang J, Lv Z, Meng X, Yuan Z, Long T, Wang Y. 3D printing polylactic acid polymer-bioactive glass loaded with bone cement for bone defect in weight-bearing area. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Jul 25;10:947521. doi: 10.3389/fbioe.2022.947521. PMID: 35957643; PMCID: PMC9358041.

Drago L, Romanò D, De Vecchi E, Vassena C, Logoluso N, Mattina R, et al. Bioactive glass BAG-S53P4 for the adjunctive treatment of chronic osteomyelitis of the long bones: an in vitro and prospective clinical study. *BMC Infect Dis*. 2013 Dec 10;13:584. doi: 10.1186/1471-2334-13-584. PMID: 24325278; PMCID: PMC3878882.

Drago L, Toscano M, Bottagisio M. Recent Evidence on Bioactive Glass Antimicrobial and Antibiofilm Activity: A Mini-Review. *Materials (Basel)*. 2018 Feb 24;11(2):326. doi: 10.3390/ma11020326. PMID: 29495292; PMCID: PMC5849023.

Dziemidowicz K, Sang Q, Wu J, Zhang Z, Zhou F, Lagaron JM, et al. Electrospinning for healthcare: recent advancements. *J Mater Chem B*. 2021 Jan 28;9(4):939-951. doi: 10.1039/d0tb02124e. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33367446.

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):677-89. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044. PMID: 16923388.

Eriksson E, Björkenheim R, Strömberg G, Ainola M, Uppstu P, Aalto-Setälä L, et al. S53P4 bioactive glass scaffolds induce BMP expression and integrative bone

formation in a critical-sized diaphysis defect treated with a single-staged induced membrane technique. *Acta Biomater.* 2021 May;126:463-476. doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.035. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33774197.

Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol.* 2014 Nov 29;9:221. doi: 10.1186/s13000-014-0221-9. PMID: 25432701; PMCID: PMC4260254.

Fiume E, Barberi J, Verné E, Baino F. Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies. *J Funct Biomater.* 2018 Mar 16;9(1):24. doi: 10.3390/jfb9010024. PMID: 29547544; PMCID: PMC5872110.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746. Epub 2015 Jul 13. PMID: 26247020; PMCID: PMC4515490.

Forsback AP, Areva S, Salonen JI. Mineralization of dentin induced by treatment with bioactive glass S53P4 in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2004 Feb;62(1):14-20. doi: 10.1080/00016350310008012. PMID: 15124778.

Francis L, Venugopal J, Prabhakaran MP, Thavasi V, Marsano E, Ramakrishna S. Simultaneous electrospin-electrosprayed biocomposite nanofibrous scaffolds for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2010 Oct;6(10):4100-9. doi: 10.1016/j.actbio.2010.05.001. Epub 2010 May 11. PMID: 20466085.

Gao W , Jin W , Li Y , Wan L , Wang C , Lin C, et al. A highly bioactive bone extracellular matrix-biomimetic nanofibrous system with rapid angiogenesis promotes diabetic wound healing. *J Mater Chem B.* 2017 Sep 21;5(35):7285-7296. doi: 10.1039/c7tb01484h. Epub 2017 Aug 7. PMID: 32264178.

Godoy-Santos AL, Rosemberg LA, de Cesar-Netto C, Armstrong DG. The use of bioactive glass S53P4 in the treatment of an infected Charcot foot: a case report. *J Wound Care.* 2019 Jan 1;28(Sup1):S14-S17. doi: 10.12968/jowc.2019.28.Sup1.S14. PMID: 30724119.

Gomes SR, Rodrigues G, Martins GG, Roberto MA, Mafra M, Henriques CM, et al. Invitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: a comparative study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015 Jan;46:348-58. doi: 10.1016/j.msec.2014.10.051. Epub 2014 Oct 23. PMID: 25491997.

Gómez-Cerezo N, Casarrubios L, Saiz-Pardo M, Ortega L, de Pablo D, Díaz-Güemes I, et al. Mesoporous bioactive glass/*l*-polycaprolactone scaffolds promote bone regeneration in osteoporotic sheep. *Acta Biomater.* 2019 May;90:393-402. doi: 10.1016/j.actbio.2019.04.019. Epub 2019 Apr 6. PMID: 30965142; PMCID: PMC6726488.

Gomez-Vega JM, Saiz E, Tomsia AP, Marshall GW, Marshall SJ. Bioactive glass coatings with hydroxyapatite and Bioglass particles on Ti-based implants. 1. Processing. *Biomaterials*. 2000 Jan;21(2):105-11. doi: 10.1016/s0142-9612(99)00131-3. PMID: 10632392.

Gong WY, Dong YM, Chen XF, Karabucak B. Nano-sized 58S bioactive glass enhances proliferation and osteogenic genes expression of osteoblast-like cells. *Chin J Dent Res*. 2012;15(2):145-52. PMID: 23509836.

González P, Serra J, Liste S, Chiussi S, León B, Pérez-Amor M. Raman spectroscopic study of bioactive silica based glasses. *J of Non-Crystalline Solids*. 2003; 320(1-3), 92–99. doi:10.1016/s0022-3093(03)00013-9

Greenblatt MB, Tsai JN, Wein MN. Bone Turnover Markers in the Diagnosis and Monitoring of Metabolic Bone Disease. *Clin Chem*. 2017 Feb;63(2):464-474. doi: 10.1373/clinchem.2016.259085. Epub 2016 Dec 9. PMID: 27940448; PMCID: PMC5549920.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004 Jun 1;329(1):77-84. doi: 10.1016/j.ab.2004.02.002. PMID: 15136169.

Gubler M, Brunner TJ, Zehnder M, Waltimo T, Sener B, Stark WJ. Do bioactive glasses convey a disinfecting mechanism beyond a mere increase in pH? *Int Endod J*. 2008 Aug;41(8):670-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01413.x. Epub 2008 Jun 28. PMID: 18554188.

Guimarães CCL, de Souza JR, Campos TMB, Marques TO, Kito LT, Kukulka EC, et al. Chlorinated-based bioceramics incorporated in polycaprolactone membranes. *J Biomed Mater Res*. 2023; 1-11. doi:10.1002/jbm.b.35315

Hench LL, Clarck Jr AE, Schaafe HF. *Int Int. J. Non-Cryst. Sol.* 8–10 (1972) 837

Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(11):967-978. doi:10.1007/s10856-006-0432-z

Hench LL, West JK. Biological Applications of Bioactive Glasses. *Life Chemistry Reports*. 1996;13, 187-241

Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. *Bone Res*. 2013 Sep 25;1(3):216-48. doi: 10.4248/BR201303002. PMID: 26273505; PMCID: PMC4472104.

Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011

Apr;32(11):2757-74. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.004. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21292319.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(24):2529-43. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00121-6. PMID: 11071603.

Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater*. 2013 Jan;9(1):4457-86. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.023. Epub 2012 Aug 21. PMID: 22922331.

Jones JR, Brauer DS, Hupa L, Greenspan DC. Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare. *Int J Appl Glas Sci*. 2016;7(4):423–34. doi: 10.1111/ijag.12252

Joughehdoust S, Manafi S. Synthesis and in vitro investigation of sol-gel derived bioglass-58S nanopowders. *Materials Science-Poland*. 2012; 30(1), 45–52. doi:10.2478/s13536-012-0007-2

Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, et al. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 31;20(3):618. doi: 10.3390/ijms20030618. PMID: 30709008; PMCID: PMC6387157.

Kastrin M, Urbančič Rovar V, Frangež I. Possible Advantages of S53P4 Bioactive Glass in the Treatment of Septic Osteoarthritis of the First Metatarsophalangeal Joint in the Diabetic Foot. *J Clin Med*. 2021 Mar 15;10(6):1208. doi: 10.3390/jcm10061208. PMID: 33803930; PMCID: PMC8000728.

Kaur G, Pickrell G, Sriranganathan N, Kumar V, Homa D. Review and the state of the art: Sol-gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Aug;104(6):1248-75. doi: 10.1002/jbm.b.33443. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26060931.

Kiyoi T. Histological Analysis of Arthritic Joints. *Methods Mol Biol*. 2018;1868:29-39. doi: 10.1007/978-1-4939-8802-0_5. PMID: 30244452.

Knabe C, Kraska B, Koch C, Gross U, Zreiqat H, Stiller M. A method for immunohistochemical detection of osteogenic markers in undecalcified bone sections. *Biotech Histochem*. 2006 Jan-Feb;81(1):31-9. doi: 10.1080/10520290600725474. PMID: 16760125.

Koblenzer M, Weiler M, Fragoulis A, Rütten S, Pufe T, Jahr H. Physiological Mineralization during In Vitro Osteogenesis in a Biomimetic Spheroid Culture Model. *Cells*. 2022 Aug 30;11(17):2702. doi: 10.3390/cells11172702. PMID: 36078105; PMCID: PMC9454617.

Krishnan V, Lakshmi T. Bioglass: A novel biocompatible innovation. *J Adv Pharm Technol Res*. 2013 Apr;4(2):78-83. doi: 10.4103/2231-4040.111523. PMID: 23833747; PMCID: PMC3696226.

Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg*. 2016 Jan;51(1):8-12. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26711689; PMCID: PMC4733916.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529. PMID: 8493529.

La Vars SM, Johnston MR, Hayles J, Gascooke JR, Brown MH, Leterme SC, et al. $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ CP-MAS NMR comparison and ATR-FTIR spectroscopic analysis of the diatoms *Chaetoceros muelleri* and *Thalassiosira pseudonana* grown at different salinities. *Anal Bioanal Chem*. 2013 Apr;405(10):3359-65. doi: 10.1007/s00216-013-6746-z. Epub 2013 Jan 31. PMID: 23371532.

Li H, Chen S, Wu Y, Jiang J, Ge Y, Gao K, et al. Enhancement of the osseointegration of a polyethylene terephthalate artificial ligament graft in a bone tunnel using 58S bioglass. *Int Orthop*. 2012 Jan;36(1):191-7. doi: 10.1007/s00264-011-1275-x. Epub 2011 May 17. PMID: 21584642; PMCID: PMC3251679.

Liang W, Wu X, Dong Y, Shao R, Chen X, Zhou P, et al. In vivo behavior of bioactive glass-based composites in animal models for bone regeneration. *Biomater Sci*. 2021 Mar 21;9(6):1924-1944. doi: 10.1039/d0bm01663b. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33506819.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75. PMID: 14907713.

Loyola M, Ancoski T, Ramires MA, Mello F, Mello AMD. Enxertos ósseos autógenos e xenógenos como alternativa de manutenção do espaço alveolar. *RGS*. 2018;19(2):8-18.

Luo H, Zhang Y, Li G, Tu J, Yang Z, Xiong G, et al. Sacrificial template method for the synthesis of three-dimensional nanofibrous 58S bioglass scaffold and its in vitro bioactivity and cell responses. *J Biomater Appl*. 2017 Aug;32(2):265-275. doi: 10.1177/0885328217715784. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28618977.

Marra KG, Szem JW, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE. In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 1999 Dec 5;47(3):324-35. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19991205)47:3<324::aid-jbm6>3.0.co;2-y. PMID: 10487883.

Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J Biomed Mater Res A*. 2020 Aug 1;108(8):1617-1633. doi: 10.1002/jbm.a.36930. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32196949.

Maquet V, Boccaccini AR, Pravata L, Notingher I, Jérôme R. Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Aug 1;66(2):335-46. doi: 10.1002/jbm.a.10587. PMID: 12889004.

Martin V, Bettencourt A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018 Jan 1;82:363-371. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.038. Epub 2017 Apr 11. PMID: 29025670.

Miguez-Pacheco V, Hench LL, Boccaccini AR. Bioactive glasses beyond bone and teeth: emerging applications in contact with soft tissues. *Acta Biomater*. 2015 Feb;13:1-15. doi: 10.1016/j.actbio.2014.11.004. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25462853.

Misra SK, Ansari T, Mohn D, Valappil SP, Brunner TJ, Stark WJ, et al. Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites. *J R Soc Interface*. 2010 Mar 6;7(44):453-65. doi: 10.1098/rsif.2009.0255. Epub 2009 Jul 29. PMID: 19640877; PMCID: PMC2842795.

Murphy R, Turcott A, Banuelos L, Dowe E, Goodwin B, Cardinal KO. SIMPoly: A Matlab-Based Image Analysis Tool to Measure Electrospun Polymer Scaffold Fiber Diameter. *Tissue Eng Part C Methods*. 2020 Dec;26(12):628-636. doi: 10.1089/ten.TEC.2020.0304. PMID: 33256558; PMCID: PMC7768983.

Obukuro M, Takahashi Y, Shimizu H. Effect of diameter of glass fibers on flexural properties of fiber-reinforced composites. *Dent Mater J*. 2008 Jul;27(4):541-8. doi: 10.4012/dmj.27.541. PMID: 18833767.

Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop Relat Res*. 1997 Jan;(334):316-25. PMID: 9005929.

Park H, Collignon AM, Lepry WC, Ramirez-GarciaLuna JL, Rosenzweig DH, Chaussain C, et al. Acellular dense collagen-S53P4 bioactive glass hybrid gel scaffolds form more bone than stem cell delivered constructs. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 Jan;120:111743. doi: 10.1016/j.msec.2020.111743. Epub 2020 Nov 21. PMID: 33545885.

Park YJ, Cha JH, Bang SI, Kim SY. Clinical Application of Three-Dimensionally Printed Biomaterial Polycaprolactone (PCL) in Augmentation Rhinoplasty. *Aesthetic Plast Surg*. 2019 Apr;43(2):437-446. doi: 10.1007/s00266-018-1280-1. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30498936.

Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Nanofiber diameter as a critical parameter affecting skin cell response. *Eur J Pharm Sci*. 2015 Jan 23;66:29-35. doi: 10.1016/j.ejps.2014.09.022. Epub 2014 Oct 6. PMID: 25301202.

Polymeris GS, Giannoulatou V, Kyriakidou A, Sfampa IK, Theodorou GS, Şahiner E, et al. Bioactivity characterization of 45S5 bioglass using TL, OSL and EPR: Comparison with the case of 58S sol-gel bioactive glass. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Jan 1;70(Pt 1):673-680. doi: 10.1016/j.msec.2016.09.051. Epub 2016 Sep 25. PMID: 27770941.

Profeta AC, Prucher GM. Bioactive-glass in periodontal surgery and implant dentistry. *Dent Mater J*. 2015;34(5):559-71. doi: 10.4012/dmj.2014-233. PMID: 26438980.

Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, Tomsia AP. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011 Jun;7(6):2355-73. doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.016. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21421084; PMCID: PMC3085647.

Rajzer I, Dziadek M, Kurowska A, Cholewa-Kowalska K, Ziabka M, Menaszek E, et al. Electrospun polycaprolactone membranes with Zn-doped bioglass for nasal tissues treatment. *J Mater Sci Mater Med*. 2019 Jun 26;30(7):80. doi: 10.1007/s10856-019-6280-4. PMID: 31243558; PMCID: PMC6594984.

Recker RR, Kimmel DB, Dempster D, Weinstein RS, Wronski TJ, Burr DB. Issues in modern bone histomorphometry. *Bone*. 2011 Nov;49(5):955-64. doi: 10.1016/j.bone.2011.07.017. Epub 2011 Jul 23. PMID: 21810491; PMCID: PMC3274956.

Ren J, Blackwood KA, Doustgani A, Poh PP, Steck R, Stevens MM, et al. Melt-electrospun polycaprolactone strontium-substituted bioactive glass scaffolds for bone regeneration [published correction appears in *J Biomed Mater Res A*. 2016 Aug;104(8):2109]. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(9):3140-3153. doi:10.1002/jbm.a.34985

Ren L, Zhang Z, Deng C, Zhang N, Li D. Antibacterial and pro-osteogenic effects of β -Defensin-2-loaded mesoporous bioglass. *Dent Mater J*. 2021 Mar 31;40(2):464-471. doi: 10.4012/dmj.2020-105. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33361660.

Ribas RG, Campos TMB, Schatkoski VM, Menezes BRC, Montanheiro TL, Thim GP. α -Wollastonite crystallization at low temperature. *Ceram Int*. 2020;46(5):6575-80. doi: 10.1016/j.ceramint.2019.11.143

Rosa AL, Beloti MM, van Noort R. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. *Dent Mater*. 2003 Dec;19(8):768-72. doi: 10.1016/s0109-5641(03)00024-1. PMID: 14511735.

Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *MaterSci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Sep 1;78:1246-1262. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.017. Epub 2017 May 5. PMID: 28575964.

Santocildes-Romero M, Goodchild R, Hatton P, Crawford A, Reaney I, Miller CA. Preparation of Composite Electrospun Membranes Containing Strontium-Substituted Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration. *Macromol Mater Eng*. 2016; 301: 972-981. doi:10.1002/mame.201600018

Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses. *J Biomed Mater Res.* 2001;58(6):734-40. doi: 10.1002/jbm.10026. PMID: 11745528.

Sohrabi K, Saraiya V, Laage TA, Harris M, Blieden M, Karimbux N. An evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal defects: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J Periodontol.* 2012 Apr;83(4):453-64. doi: 10.1902/jop.2011.110347. Epub 2011 Aug 23. PMID: 21861641.

Spirandeli BR, Campos TMB, Ribas RG, Thim GP, Trichês ES. Evaluation of colloidal and polymeric routes in sol-gel synthesis of a bioactive glass-ceramic derived from 45S5 bioglass. *Ceram Int.* 2020;46(12):20264–71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.05.108>.

Steinhausen E, Lefering R, Glombitza M, Brinkmann N, Vogel C, Mester B, et al. Bioactive glass S53P4 vs. autologous bone graft for filling defects in patients with chronic osteomyelitis and infected non-unions - a single center experience. *J Bone Jt Infect.* 2021 Jan 12;6(4):73-83. doi: 10.5194/jbji-6-73-2021. PMID: 34084694; PMCID: PMC8132459.

Sun JY, Yang YS, Zhong J, Greenspan DC. The effect of the ionic products of Bioglass dissolution on human osteoblasts growth cycle in vitro. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 Jul-Aug;1(4):281-6. doi: 10.1002/term.34. PMID: 18038418.

Todros S, Todesco M, Bagno A. Biomaterials and Their Biomedical Applications: From Replacement to Regeneration. *Processes.* 2021;9(11):1949. doi: 10.3390/pr9111949.

Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact Mater.* 2017 Dec 1;3(3):278-314. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001. PMID: 29744467; PMCID: PMC5935790.

Vogel M, Voigt C, Gross UM, Müller-Mai CM. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials.* 2001 Feb;22(4):357-62. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00191-5. PMID: 11205439.

Vukajlovic D, Parker J, Bretcanu O, Novakovic K. Chitosan based polymer/bioglass composites for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Mar;96:955-967. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.026. Epub 2018 Dec 11. PMID: 30606607.

Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017 Jun 7;2(4):224-247. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007. PMID: 29744432; PMCID: PMC5935655.

Wheeler DL, Eschbach EJ, Hoellrich RG, Montfort MJ, Chamberland DL. Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects. *J Orthop Res*. 2000 Jan;18(1):140-8. doi: 10.1002/jor.1100180120. PMID: 10716290.

Xue R, Qian Y, Li L, Yao G, Yang L, Sun Y. Polycaprolactone nanofiber scaffold enhances the osteogenic differentiation potency of various human tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Jun 24;8(1):148. doi: 10.1186/s13287-017-0588-0. PMID: 28646917; PMCID: PMC5482966.

Yarin A, Koombhongse S, Reneker, D. Bending instability in electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Phys*. 2001; 89, 3018–3026

Yin HM, Li X, Wang P, Ren Y, Liu W, Xu JZ, et al. Role of HA and BG in engineering poly(ϵ -caprolactone) porous scaffolds for accelerating cranial bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2019 Mar;107(3):654-662. doi: 10.1002/jbm.a.36584. Epub 2018 Dec 9. PMID: 30474348.

Yu F, Fan X, Wu H, Ou Y, Zhao X, Chen T, et al. Mastoid obliteration and external auditory canal reconstruction using 3D printed bioactive glass S53P4 /polycaprolactone scaffold loaded with bone morphogenetic protein-2: A simulation clinical study in rabbits. *Regen Ther*. 2022 Oct 20;21:469-476. doi: 10.1016/j.reth.2022.09.010. PMID: 36313396; PMCID: PMC9588957.

Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5). *J Biomed Mater Res*. 2001 May 1;58(3):270-6. doi: 10.1002/1097-4636(2001)58:3<270::aid-jbm1016>3.0.co;2-2. PMID: 11319740.

Zhang LY, Bi Q, Zhao C, Chen JY, Cai MH, Chen XY. Recent Advances in Biomaterials for the Treatment of Bone Defects. *Organogenesis*. 2020 Oct 1;16(4):113-125. doi: 10.1080/15476278.2020.1808428. Epub 2020 Aug 16. PMID: 32799735; PMCID: PMC7714479.

Zhang X, Meng Y, Gong B, Wang T, Lu Y, Zhang L, Xue J. Electrospun nanofibers for manipulating soft tissue regeneration. *J Mater Chem B*. 2022 Sep 28;10(37):7281-7308. doi: 10.1039/d2tb00609j. PMID: 35688128.

Zonderland J, Rezzola S, Wieringa P, Moroni L. Fiber diameter, porosity and functional group gradients in electrospun scaffolds. *Biomed Mater*. 2020 Jun 26;15(4):045020. doi: 10.1088/1748-605X/ab7b3c. PMID: 32109896.

ANEXO A –Certificado do Comitê de Ética



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 06/2021, intitulado:- **SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE PCL INCORPORADAS COM BIOVIDROS 45S5, 58S ES53P4: ANÁLISE COMPARATIVA NA OSTEOGÊNESE IN VIVO E IN VITRO**, sob a responsabilidade de **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, tendo como colaboradores alunas da Graduação Marina Santos Fernandes e Vinicius Almeida Barros Lima; e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 30/08/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/09/2021 a 31/12/2022
Espécie/linhagem/raça	Ratos wistar
Nº de Animais	39 (trinta e nove)
Peso/Idade	300 gs / 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Compromisso/Relatório(s)	Envio para a CEUA:- Parcial:- 30/06/2022 Final:- 31/01/2023

São José dos Campos, 30 de agosto de 2021

Profa.Dra ANDREA CARVALHO DE MARCO
COORDENADORA/CEUA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
Fax (12) 3947-9028 / carlos.guedes@unesp.br/ andrea.marco@unesp.br