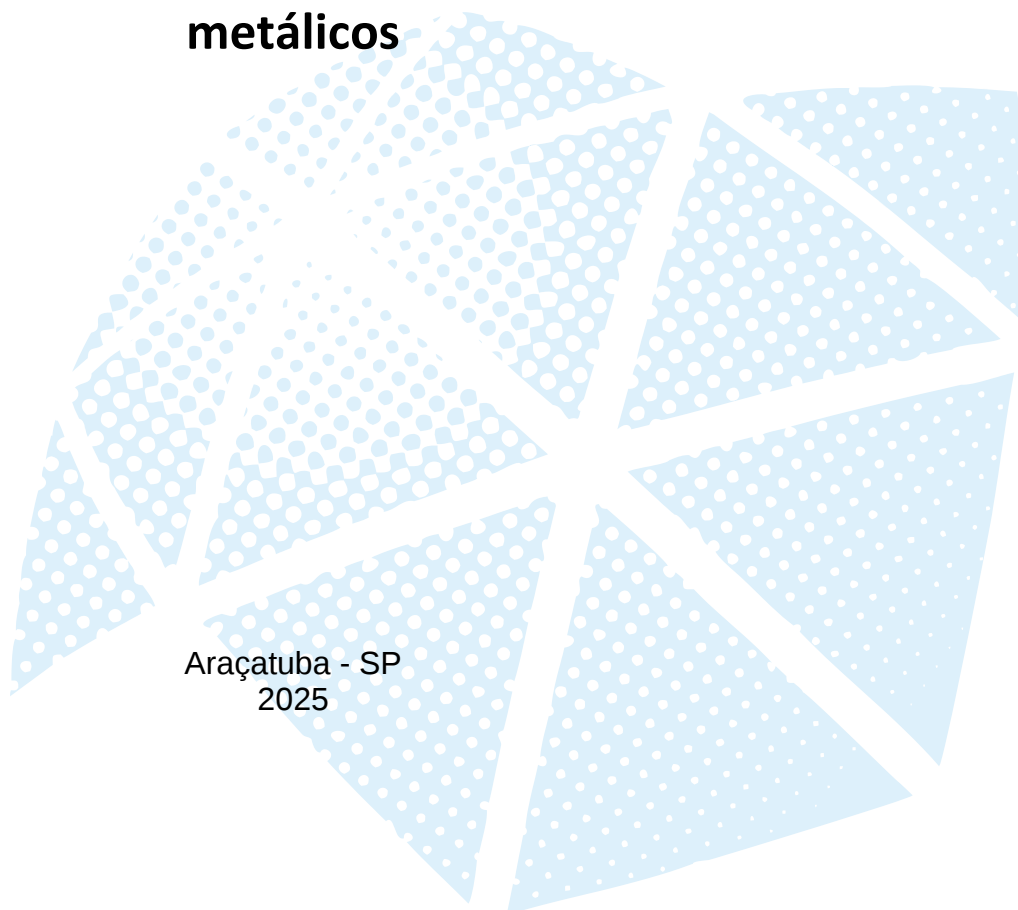




Laura Giovana Martins Pereira

**Avaliação in vivo da bioatividade de biotintas de
gelatina metacrilada funcionalizada com óxidos
metálicos**

Araçatuba - SP
2025



Laura Giovana Martins Pereira

**Avaliação in vivo da bioatividade de biotintas de
gelatina metacrilada funcionalizada com óxidos
metálicos. Um estudo experimental.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista "Júlio Mesquita Filho – UNESP",
como parte dos requisitos para a
graduação no curso de Odontologia.

Orientador: Profº. Titular Juliano Milanezi
de Almeida.

Araçatuba - SP
2025

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento que quero deixar registrado aqui é a minha mãe, Maria da Conceição Martins Novaes, você é a minha vida, tudo que me tornei devo a você. Também quero deixar registrado meus agradecimentos ao meu pai, Douglas Wilians Pereira, que apesar de tudo, fez o impossível para que eu pudesse realizar meu sonho. E não poderia deixar de agradecer a minha irmã, Bruna Eduarda Martins Pereira, você sempre foi minha referência, sempre quis me tornar tão inteligente como você, um dia eu chego lá. E gostaria de deixar meus agradecimentos as minhas avós, Carmelina Novaes Martins e Lucília Pereira, que me apoiaram e acreditaram em mim durante todo esse processo. Amo vocês família, com todo o meu coração.

Meu primeiro agradecimento acadêmico não poderia ser outro, Ruan Henrique Delmonica Barra, obrigada por me ajudar tanto, Deus sabe que se eu consegui, foi você que me ajudou a todo momento, muito obrigada pela oportunidade e por ser uma pessoa excepcional, agradeço muito por ser você a pessoa que me acolheu no departamento, obrigada por tudo!

Não posso deixar de agradecer as amigas que estiveram ao meu lado, Maria Eduarda Asman Gonçalves, você foi a melhor pessoa que eu tive o prazer de me tornar amiga durante a faculdade, eu já te disse isso, mas quero deixar registrado aqui, obrigada pelo apoio e pela amizade, que vou levar para o resto da vida. Também quero deixar registrado meu agradecimento a Gabrielli Lopes Batturi, que apesar de ter me aproximado mais para o fim da graduação, se tornou uma pessoa muito importante na minha vida, obrigada por dividir a loucura e a alegria da faculdade comigo.

Gostaria também de deixar meus agradecimentos a Leda Maria Pescinini Salzedas, você foi uma grande professora para mim, referência em todos os aspectos, se um dia eu me tornar 10% da profissional que a senhora é, me sentirei realizada.

Não posso deixar de agradecer meu orientador, Juliano Milanezi de Almeida, o senhor sempre fala que a odontologia te deu tudo, mas acredito que pessoas excepcionais como você, mostram que o esforço e a dedicação sempre dão resultados. Obrigada pela oportunidade e por me mostrar que a Odontologia é o caminho.

E por fim, gostaria de agradecer a instituição de fomento dessa pesquisa, a FAPESP, que tornou possível a materialização desse projeto através da aprovação da bolsa de iniciação científica.

PEREIRA, L. G. M. **Avaliação in vivo da bioatividade de biotintas de gelatina metacrilada funcionalizada com óxidos metálicos. Um estudo experimental** 2025.

Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

RESUMO

A pesquisa com scaffolds tem se mostrado fundamental para o avanço da engenharia tecidual, pois fornecem um ambiente propício para o crescimento celular, imitando as características da matriz extracelular natural, e facilitam a regeneração de tecidos danificados ou ausentes. A capacidade dos scaffolds de sustentar e direcionar a diferenciação celular é crucial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes, tanto para tratamentos de lesões complexas quanto para doenças degenerativas. Além disso, a personalização desses scaffolds, levando em consideração fatores como biocompatibilidade, biodegradabilidade e integração com os tecidos hospedeiros, é um dos maiores desafios da pesquisa atual. Assim, o presente projeto buscou realizar a avaliação biológica in vivo de scaffolds porosos e bioativos obtidos a partir da formulação de biotintas à base de gelatina metacrilada (GelMA) associada a óxidos metálicos. Hidrogéis de GelMA foram formulados contendo concentrações citocompatíveis e bioativas dos óxidos de silício e magnésio, as quais foram selecionadas pelo grupo de pesquisa em um estudo in vitro. Amostras padronizadas foram produzidas a partir de moldes ou por meio da bioimpressão por extrusão, e implantadas em defeitos críticos realizados em calvárias de ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar). As amostras foram coletadas em 42 dias, após eutanásia dos animais, e submetidas à análise histopatológica para avaliação da quimiotaxia, angiogênese e bioatividade. Os resultados evidenciaram que as biotintas de GelMA funcionalizadas com os óxidos apresentaram maior formação de tecido ósseo e melhor integração tecidual, especialmente nos grupos bioimpressos, sugerindo boa osteocondução quando comparadas aos demais grupos testados.

.

Palavras-chave: Bioimpressão, GelMa, regeneração óssea.

PEREIRA, L. G. M. **In vivo evaluation of the bioactivity of methacrylated gelatin bioinks functionalized with metal oxides. An experimental study** 2025.

Course completion work – Araçatuba School of Dentistry, São Paulo State University, Araçatuba.

ABSTRACT

Research on scaffolds has proven fundamental to the advancement of tissue engineering, as they provide a favorable environment for cell growth, mimicking the characteristics of the natural extracellular matrix, and facilitate the regeneration of damaged or absent tissues. The ability of scaffolds to support and direct cell differentiation is crucial for the development of more effective therapies, both for the treatment of complex injuries and degenerative diseases. Furthermore, the customization of these scaffolds, considering factors such as biocompatibility, biodegradability, and integration with host tissues, is one of the greatest challenges in current research. Thus, this project aimed to perform the in vivo biological evaluation of porous and bioactive scaffolds obtained from the formulation of methacrylated gelatin (GelMA)-based bioinks associated with metal oxides. GelMA hydrogels were formulated containing cytocompatible and bioactive concentrations of silicon and magnesium oxides, which were selected by the research group in an in vitro study. Standardized samples were produced from molds or by extrusion bioprinting and implanted into critical defects in the calvaria of male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar). Samples were collected 42 days after euthanasia and subjected to histopathological analysis to evaluate chemotaxis, angiogenesis, and bioactivity. The results showed that GelMA bioinks functionalized with oxides exhibited greater bone tissue formation and better tissue integration, especially in the bioprinted groups, suggesting good osteoconduction when compared to the other groups tested.

Keywords: Alveolar Bone Loss; Beta-Tricalcium Phosphate; Bone Substitute; Bone Regeneration.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos materiais a serem avaliados in vivo	20
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Resultado do ensaio de viabilidade celular. 17
- Figura 2 – Análise histológica do subcutâneo de ratos após implantação dos scaffolds, evidenciando o padrão de reabsorção do material e ausência de infiltrado inflamatório ou sinais de rejeição. 24
- Figura 3 – Análise histológica do subcutâneo de ratos após implantação dos scaffolds, evidenciando o padrão de reabsorção do material e ausência de infiltrado inflamatório ou sinais de rejeição. 25
- Figura 4 – Fotomicrografias de cada grupo experimental na coloração de H&E. 29
- Figura 5 – Fotomicrografias das calotas após processamento histológico mostrando as características de formação óssea em cada grupo experimental. 31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico de barras representativo dos valores médios de deposição de matriz mineralizada 17

Gráfico 2 – Gráfico de barras com as médias, desvio padrão e distribuição dos espécimes em cada grupo experimental. 27

LISTA DE ABREVIATURAS

APL – Fosfatase alcalina

ANOVA – análise de variância

ATM – Articulação temporomandibular

β -TCP – Beta-tricálcio fosfato

CAD – Desenho assistido por computador

CAM – Manufatura assistida por computador

DLP – Digital Light Processing (processamento de luz digital)

GelMA - Gelatina metacrilada

GelMAb – Gelatina metacrilada bioimpressa

H&E – Hematoxilina e eosina

LAP – Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase (proteína quinase ativada por mitógeno)

MEC – Matriz extracelular

MgO – Óxido de magnésio

PBS – Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato salino)

PDLSCs – Células-tronco do ligamento periodontal

PON – Porcentagem de osso neoformado

RGD – Arginina-Glicina-Ácido Aspártico

RTM – Resolution/Time for Manufacturing ratio (resolução/tempo de manufatura)

SiO – Óxido de silício

SLA – Estereolitografia

TC – Tecido conjuntivo

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Wnt – Via de sinalização Wntless

LISTA DE SIMBOLOS

% – Porcentagem

°C – Grau Celsius

α – Nível de significância estatística / identificação em gráfico

β – Identificação estatística em gráfico

ϕ – Identificação estatística em gráfico

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

$\times$ – Vezes (aumento de microscopia)

$\leq$ – Menor ou igual

$\geq$ – Maior ou igual

$\pm$ – Mais ou menos

β -catenina – Proteína da via de sinalização Wnt

p – Valor de significância estatística

rpm – Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Preparo dos óxidos metálicos e incorporação do GelMA	18
3.2 Obtenção das amostras de hidrogel	20
3.3 Obtenção das amostras de hidrogel bioimpresso.....	21
3.4 Avaliação biológica in vivo	21
3.4 Anestesia	22
3.5 Preparo dos materiais	22
3.6 Procedimento cirúrgico de implantação dos scaffolds	23
3.7 Medicações e procedimentos pós cirúrgicos	24
3.8 Eutanásia e processamento histológico	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Análise Estatística.....	25
4.2 Análise Histopatológica do Subcutâneo.....	25
4.3 Análise da Porcentagem de Osso Neoformado (PON).....	27
4.4 Análise Histopatológica da Ferida Crítica em Calvária	28
5 DISCUSSÃO	32
5.1. Comparação geral da formação óssea entre os grupos.....	32
5.2. Efeito da funcionalização com óxido de magnésio (MgO).....	32
5.3. Efeito da funcionalização com óxido de silício (SiO)	33
5.4. Influência da técnica de bioimpressão em relação à forma injetável.....	35
5.5 Comparação da cinética de reabsorção e impacto na regeneração óssea	35
5.6 Mecanismos de ação e integração tecidual	36
5.7 Limitações do estudo	37
6 CONCLUSÃO	38

1 INTRODUÇÃO

A impressão 3D abrange a combinação de tecnologias, cuja proposta é a geração direta de objetos, os quais são construídos camada por camada, através de desenho assistido por computador (CAD) e manufatura assistida por computador (CAM). Essas tecnologias permitem que objetos altamente complexos sejam construídos rapidamente (Kačarević et al., 2018). A aplicação técnica destas estratégias na Engenharia Tecidual é baseada na bioimpressão 3D de estruturas biológicas, empregando-se para isso biotintas, as quais são caracterizadas como hidrogéis similares à matriz extracelular (MEC) do tecido perdido. Por meio desta técnica, o biomaterial é impresso com o objetivo de mimetizar a forma específica do tecido perdido, com geometrias internas precisas capazes de orientar a função das células aderentes (Saska et al., 2021). Essa estratégia contemporânea tem sido empregada no desenvolvimento de scaffolds acelulares para estratégias cell-homing, bem como em associação com células vivas para transplante celular, sendo que este procedimento depende do tipo de bioimpressora e polímero usados (Ma et al., 2019; Yu et al., 2019; Oberoi et al., 2018; Nesic et al., 2020; Unagolla et al., 2020; Tao et al., 2019).

Dentro das propostas de Engenharia Tecidual, a estratégia cell-homing tem ganhado destaque devido ao menor custo operacional e facilidade de translação clínica. No entanto, o desenvolvimento de scaffolds bioimpressos que sejam capazes de acelerar a regeneração tecidual via modulação das células presentes no local da implantação necessita de uma arquitetura macro-porosa interconectada, que permita a infiltração, adesão, comunicação e diferenciação celular, como também a vascularização, transporte de nutrientes e eliminação de resíduos celulares (Baolin; Ma, 2014; Reed et al., 2016; Soares et al., 2018a; Soares et al., 2020). Além disso, uma composição química biocompatível e bioativa que favoreça e module a integração com o tecido adjacente, assim como a quimiotaxia, adesão, proliferação e diferenciação celular, é essencial (França et al., 2019; Lee et al., 2019; Thrivikraman et al., 2019). As lesões no tecido ósseo são geradas por várias causas, dentre elas traumas acidentais, perda óssea grave decorrente de doença periodontal, doenças sistêmicas, como osteoporose, anomalias congênitas, como fissura labiopalatal, craniossinostose e microssomia hemifacial, além de outras causas como câncer e

distúrbios graves na articulação temporomandibular (ATM) (Han et al., 2014; Zhao et al., 2015; Zhai et al., 2019; Lee et al., 2023; Karanth et al., 2023). Atualmente, os materiais empregados nas reconstruções ósseas possuem origem autógena, alógena ou xenógena, porém apresentam limitações clínicas, biológicas, estruturais e éticas. O tratamento considerado como “padrão-ouro” são os enxertos autólogos (Karanth et al., 2023; Shen et al., 2022). Como principal vantagem, é necessário destacar a riqueza de vascularização nos enxertos autógenos, o que beneficia a neogênese óssea durante a etapa de regeneração (Shen et al., 2022). No entanto, esse método apresenta certas inconveniências, como a alta taxa de morbidade da região no qual o enxerto foi retirado, a disponibilidade limitada, dor pós-operatória exacerbada e prolongamento do tempo cirúrgico (Tao et al., 2022; Karanth et al., 2023). A fim de superar estes gargalos, substitutos xenógenos são cada vez mais explorados; contudo, os métodos de produção tradicionalmente empregados não são capazes de prover um controle preciso sobre a microestrutura, porosidade e reprodutibilidade destes produtos (Lee et al. 2016). De outra parte, os xenoenxertos apresentam a possibilidade de transmissão de patógenos como principal fator de risco ao paciente (Tao et al., 2022). Adicionalmente, as técnicas de enxertia muitas vezes trazem preocupações, uma vez que são necessários múltiplos procedimentos cirúrgicos, taxa considerável de morbidade e possíveis complicações como a infecção na região operada. Ademais, há um grau de dificuldade em modelar e formatar enxertos ósseos naturais e sintéticos na arquitetura da lesão (Aytac et al., 2023).

Dentro deste contexto, a bioimpressão 3D tem sido apontada como uma solução para se obter o alto controle arquitetônico necessário nos enxertos ósseos, permitindo a criação de scaffolds personalizados com uma rede hierárquica de poros interconectados e com geometria otimizada para a regeneração tecidual (El-Sherbiny et al., 2013; Woodard et al., 2007; Stuani et al., 2021). Com isto, é possível favorecer importantes eventos biológicos ao se proporcionar uma área adequada para o crescimento celular e a produção da matriz extracelular, estimular a migração e atividade celular, permitir uma melhor difusão de nutrientes e contribuir para a adesão e adsorção de proteínas (Fini et al., 2003; Sato et al., 2006). Como resultado, observa-se uma melhor distribuição celular nestes cenários do que quando comparado a arquiteturas aleatórias obtidas por outros métodos de produção, mesmo apresentando poros, porosidade ou área de superfície semelhantes (Nyberg et al., 2017). Além

disso, a personalização dos scaffolds impressos em 3D garante um ajuste preciso do enxerto sobre o defeito, proporcionando uma maior estabilidade, ao mesmo tempo que dispensa os ajustes dos enxertos em bloco ou pré-fabricados tradicionais (Asa'ad et al., 2016; Smith et al., 2007). Podemos destacar o estudo de Thattaruparambil Raveendran et al. (2019), que foram os primeiros a descrever o uso da bioimpressão de células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs), onde observaram a proliferação celular in vitro em construtos de gelatina metacrilada (GelMa) após 14 dias de cultura, sem o desenvolvimento de um núcleo necrótico. Outro exemplo é o estudo de Anderson et al. (2022), que desenvolveram uma tecnologia de impressão 3D de scaffolds biocerâmicos à base de fosfato de cálcio, e estabeleceram uma estratégia de fluxo digital a partir de imagens obtidas por tomografia computadorizada para gerar o design 3D e imprimir scaffolds biocerâmicos defeito-específico.

Dentre as várias modalidades de bioimpressão aplicadas na engenharia de tecidos, é possível destacar as tecnologias de inkjet, extrusão, estereolitografia (SLA), e processamento de luz digital (DLP) (França et al., 2019). Segundo Moroni et al. (2018), a eficiência de biofabricação das tecnologias de bioimpressão pode ser avaliada pela razão entre resolução e tempo de manufatura (RTM - resolution/time for manufacturing ratio), sendo a tecnologia DLP (RTM ~ 2) aquela que apresenta razão mais elevada, seguida pela tecnologia SLA (RTM ~ 0.5) e de extrusão (RTM ~ 0.5), e por último a tecnologia inkjet (RTM ~ 0.1). A tecnologia de extrusão é aquela mais empregada nos estudos das áreas médica e odontológica, por permitir criar scaffolds 3D carregados de células, apresentando alta reprodutibilidade, arquitetura porosa controlada, geometria complexa e organização estrutural bem definida (Ozbolat et al., 2016; Sarker et al., 2018 Cernencu et al., 2023; Samadi et al., 2023; Karanth et al., 2023).

Os polímeros de escolha para serem submetidos ao processo de bioimpressão são os hidrogéis, que permitem a modulação das propriedades físico-químicas relacionadas com a viscosidade, plasticidade e elasticidade dos materiais, a fim de criar um microambiente similar ao da matriz extracelular do tecido alvo, promovendo alta biocompatibilidade para as interações celulares, favorecendo seu crescimento (Annabi et al., 2014; Obregon et al., 2015; Mendes et al., 2020). O GelMa (gelatina metacrilada) tem sido o hidrogel mais utilizado como biotinta estudada para impressoras de extrusão e do tipo SLA/MSLA/DLP, desde que é possível modificar o

processo de biofabricação de forma que a transição sol-gel em temperatura ambiente seja retardada, permitindo a bioimpressão de scaffolds altamente sofisticados (Kumar et al., 2021). Isto ocorre devido ao fato de que: 1) cada camada impressa é submetida à polimerização por luz, evitando o colapso da arquitetura 3D, e 2) as propriedades mecânica e reológica dos objetos podem ser facilmente ajustadas variando-se a concentração do GelMA (Lee et al., 2020). Pelo fato do GelMA conter menos de 5% de anidrido metacrílico, deixando os sítios RGD e MMP disponíveis para a interação celular, este hidrogel apresenta estrutura similar a MEC por ser constituído em grande parte por colágeno desnaturado (gelatina), sendo, portanto, considerado como um hidrogel biomimético. Por este motivo, o GelMA tem sido a biotinta mais estudada nos processos de regeneração tecidual, incluindo do osso, cartilagem, músculo, vasos sanguíneos, entre outros, com capacidades de ser processada por deposição ou polimerização em um tanque de bioimpressão (Xiao et al., 2019; Lee et al., 2020; Liu et al., 2020). Com o intuito de aumentar as propriedades bioativas de biotintas, moléculas bioativas podem ser adicionadas às biotintas para modularem o processo de reparo (Chen et al., 2019).

As partículas de óxidos têm sido consideradas como sinais inorgânicos promissores para neogênese de tecidos mineralizados e conjuntivos, tais como zinco, estrôncio, cério, magnésio e silício. O óxido de estrôncio ao se degradar promove a liberação de íons que possuem efeitos pleiotrópicos sobre a atividade celular, sendo responsáveis por regular os mecanismos de proliferação e diferenciação, estando envolvidos nos estágios iniciais de mineralização (Bose et al., 2013; Chen et al., 2019; Anesi et al., 2020; Sergi et al., 2020). Já os óxidos de magnésio e silício apresentam efeitos positivos na formação tecidual mediada por células tronco mesenquimais, com aumento da atividade de ALP, maior diferenciação osteo/odontoblástica e potencialização do processo de angiogênese e vasculogênese, por meio do mesmo mecanismo de ação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em que estimula a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais (Braux et al., 2011; Fielding et al., 2012; Bose et al., 2013; Zhang et al., 2016).

Além disso, estudos mostraram que a presença de silício ativa vias de sinalização Wnt/ β -catenina e MAPK (Han P, Wu C, Xiao Y., 2013), que exercem papéis fundamentais na regeneração tecidual e óssea, pois regulam diretamente os processos de proliferação, diferenciação e maturação das células osteogênicas. A

ativação da via Wnt/ β -catenina estimula a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos e aumenta a produção de proteínas essenciais, como colágeno tipo I e fosfatase alcalina, que participam da mineralização da matriz óssea (ZHOU et al., 2023). De forma complementar, a via MAPK atua na resposta celular a estímulos externos, promovendo a expressão de genes relacionados à formação e reparo do tecido ósseo (LI et al., 2021). Estudos mostram que a ativação simultânea dessas duas vias potencializa a regeneração óssea, uma vez que a sinalização MAPK pode reforçar os efeitos osteogênicos induzidos pela Wnt/ β -catenina, resultando em maior deposição de matriz e aceleração do processo de cicatrização (LEE et al., 2007).

A vantagem do uso dos óxidos visando a regeneração óssea em comparação às fases minerais tradicionais, como hidroxiapatita, beta-tricalcio fosfato, dentre outros, é a maior taxa de dispersão na biotinta, permitindo a formulação de hidrogéis com baixa viscosidade, requisito essencial para a bioimpressão (Pu et al., 2022; Yi et al., 2022). Diante do exposto, neste projeto de pesquisa, buscamos desenvolver biotintas à base de GelMA funcionalizadas com óxidos de silício (SiO) e magnésio (MgO), que sejam atrativas para o desenvolvimento de scaffolds bioimpressos para regeneração óssea em uma estratégia cell-homing.

2 OBJETIVOS

O estudo visou realizar uma análise biológica do potencial quimiotático, de bioatividade e de angiogênese em um modelo in vivo de implantação em defeitos críticos criados em calvária de ratos, mediado por hidrogéis de GelMA com arquitetura porosa desenvolvida pela técnica de bioimpressão, funcionalizados com concentrações bioativas de MgO e SiO. Dentro desse escopo, este projeto buscou desenvolver biomateriais para regeneração óssea em uma estratégia cell- homing, atuando em dois pilares: 1) estruturação de um scaffold com uma rede porosa interconectada por meio da bioimpressão, empregando-se duas tecnologias atuais, e 2) desenvolvimento de uma biotinta funcionalizada com óxidos bioativos para guiar a regeneração tecidual por células residentes

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A formulação dos biomateriais foi feita em parceria com a Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB – USP, através da pessoa da Prof^a Dr^a Diana Gabriela Soares dos Passos, Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos. Todos os ensaios in vitro foram realizados pela equipe da Prof^a Diana na FOB e os biomateriais foram enviados e recebidos pelo orientador deste trabalho para realização da pesquisa in vivo.

3.1 Preparo dos óxidos metálicos e incorporação do GelMA

Os hidrogéis à base de GelMA foram preparados por meio da dissolução de gelatina tipo A obtida da pele de porco em PBS sob agitação magnética a 50°C até a dissolução completa do polímero, seguido de incorporação de anidrido metacrílico até completa emulsificação. A solução final foi transferida a membranas de diálise, as quais foram imersas em água deionizada por um período de 5 dias. Foram realizadas duas trocas diárias da água deionizada, a fim de remover o ácido metacrílico e o anidrido metacrílico não reagido com a solução de gelatina. Após, a solução foi filtrada a 0,22 µm e submetida ao congelamento -80 °C por 2 dias, seguido por liofilização a vácuo (150×10^{-3} Mbar) a -52°C por 5 dias. Para o preparo das soluções dos hidrogéis, o PBS foi aquecido à 50°C e o fotoiniciador Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP) foi adicionado na proporção de 0,075% em peso e filtrado a 0,22µm. O GelMA liofilizado foi dissolvido na solução PBS+LAP em uma concentração de 15%, esta solução foi agitada em vórtex até sua completa homogeneização e, por fim, centrifugada por 5 min a 12000 rpm para remoção de bolhas.

- Estudo preliminar in vitro: Amostras dos hidrogéis de GelMA incorporados com 0,025 e 0,5% de MgO ou SiO foram preparadas injetando 100 µL do hidrogel de cada grupo nos poços de placas de 96 poços, seguida pela fotoativação durante 30 segundos em aparelho LED a 365 nm (Bluephase N, Ivoclar-Vivadente). Dessa forma, os espécimes apresentaram 6 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura. Como grupo controle, foi empregado o GelMA puro. A linhagem celular MC3T3 (ATCC® CRL-2593™) foi semeada em gota única sobre os hidrogéis (1x 10⁵ células), sendo em seguida os

conjuntos células/hidrogéis incubados a 37 °C e 5% CO₂ por 30 min para permitir a adesão inicial sobre os biomateriais. Após este período, o meio de cultura completo foi adicionado aos construtos, sendo cultivados por até 14 dias. Decorridos 1, 3, 7 e 14 dias do cultivo (n=3) foi realizado o ensaio de viabilidade celular. Os hidrogéis foram lavados em PBS e incubados com meio de cultura suplementado com Calcein AM (marcador de células vivas – fluorescência em verde) e Etil Homodímero-1 (marcador de células mortas – fluorescência em vermelho) (Live/Dead cell viability/cytotoxicity kit; Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) na concentração de 1:1000 durante 45 min. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS, e acondicionadas sobre uma lâmina de vidro para análise das células viáveis e mortas em microscópio de fluorescência (FLoid®, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após 7 dias de cultivo, também foi realizado o ensaio de mineralização in vitro, para selecionar a concentração bioativa. As amostras foram fixadas com etanol 70% a 4 °C por 1 h, seguido de lavagem com água deionizada, e incubação com solução de Alizarin Red (40 mM, pH 4.2; Sigma Chemical, Sigma-Aldrich) por 15 min sob agitação. Após este período, os hidrogéis foram lavados 5 vezes com água deionizada, e em seguida foi aplicada solução de cloreto de cetilpiridíneo (10 mM, pH 7.0; Sigma Chemical; Sigma-Aldrich) por 15 min para dissolução dos nódulos, sendo a absorbância da solução resultante avaliada a 560 nm. Amostras dos hidrogéis sem células foram empregadas para controle do background (n=6).

- Resultados preliminares: Conforme o painel apresentado na Figura 1, observa-se que todas as células permaneceram viáveis em todos os períodos de análise em contato direto com a estrutura dos hidrogéis, demonstrando a citocompatibilidade para todas as formulações testadas. Na Figura 2 nota-se que o GelMa incorporado com MgO e SiO na concentração de 0,05% apresentou maior bioatividade, com valores de deposição de matriz mineralizada significativamente superiores em comparação ao GelMa puro. Diante

destes resultados, estas formulações foram selecionadas para o estudo in vivo.

Figura 1.

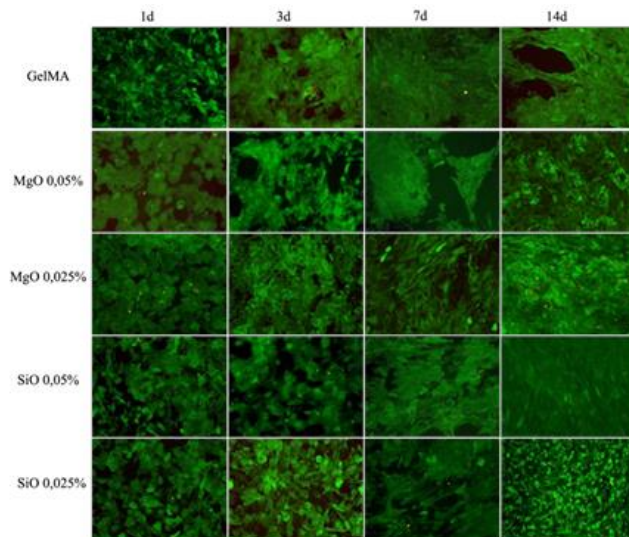


Figura 1. Resultado do ensaio de viabilidade celular. Em verde, observa-se as células viáveis e marcações pontuais em vermelho demonstram as células mortas. Aumento de 20x. Fonte: elaborado pelo autor, 2025

Gráfico 1.

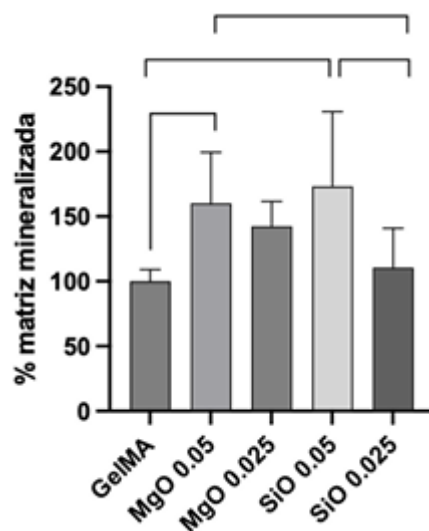


Gráfico 1. Gráfico de barras representativo dos valores médios de deposição de matriz mineralizada. “[*]”: indicam diferenças estatisticamente significante (Anova 1 critério/ Teste de Tukey. N=6; $p < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor, 2025

3.2 Obtenção das amostras de hidrogel

As amostras foram confeccionadas injetando 200 μ L do hidrogel de cada grupo em moldes de silicone com 8 mm de diâmetro e 3 mm de espessura, seguida pela fotoativação durante 30 segundos em aparelho LED a 365 nm (Bluephase N, IvoclarVivadente). Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos:

- GelMa – hidrogel puro;
- GelMa-MgO – hidrogel incorporado com 0,05% de MgO;
- GelMa-SiO - hidrogel incorporado com 0,05% de SiO.

3.3 Obtenção das amostras de hidrogel bioimpresso

Os hidrogéis formulados foram inseridos em seringas de 10 mL e posicionados na bioimpressora de extrusão 3DBS (3D Biotechnology Solutions, Campinas, SP, Brasil). A seringa será acoplada a uma cânula de 27 gauges, que apresenta diâmetro interno referente a 380 μ m, sendo que o processo de bioimpressão foi realizado a temperatura ambiente em 22 °C, com hidrogel em temperatura de 25 °C, fluxo de impressão de 150 μ L/min e uma velocidade de impressão de 70 mm/seg. A bioimpressão foi realizada em formato grid com infill de 80%. Amostras com 8 mm de diâmetro de 3 mm de espessura foram confeccionadas. Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos:

- GelMAb – hidrogel puro bioimpresso;
- GelMAb-MgO – hidrogel incorporado com 0,05% de MgO bioimpresso;
- GelMAb-SiO - hidrogel incorporado com 0,05% de SiO bioimpresso.

3.4 Avaliação biológica in vivo

Os hidrogéis injetáveis e bioimpressos foram avaliados em um único sítio cirúrgico sob orientação do Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA, UNESP. Assim, os materiais apresentados na Tabela 1 foram implantados em defeitos críticos em calvária de ratos, conforme descrito em detalhes a seguir. Um total de 6 animais por grupo foi empregado, totalizando 42 animais para realização dos experimentos. Após aprovação pelo comitê de ética da Instituição (CEUA), foram utilizados ratos do sexo masculino, com 3 meses de idade (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), pesando 350-400 g (UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unidade de Cuidado Animal). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água ad libitum, em uma sala

com ciclo de 12 horas claro / 12 horas escuro e temperatura entre 22°C e 24°C. Os animais foram então distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais (n = 6): grupos experimentais descritos anteriormente de acordo com o biomaterial (6 grupos) e animais que mantiveram o coágulo no lugar do defeito na calvária (COAG).

Tabela 1.

Grupo experimental	Descrição do material
GelMa Injetável	Hidrogel de GelMA
GelMa-MgO Injetável	Hidrogel de GelMA funcionalizado com 0,05% de MgO
GelMa-SiO Injetável	Hidrogel de GelMA funcionalizado com 0,05% de SiO
GelMa Bioimpresso	Hidrogel de GelMA bioimpresso
GelMa-MgO Bioimpresso	Hidrogel de GelMA bioimpresso funcionalizado com 0,05% de MgO
GelMa-SiO Bioimpresso	Hidrogel de GelMA bioimpresso funcionalizado com 0,05% de SiO
Coágulo	Grupo controle para modelo de defeito crítico em calvária

Tabela 1. Descrição dos materiais a serem avaliados in vivo. Fonte: elaborado pelo autor, 2025

3.4 Anestesia

Para a cirurgia experimental, os animais foram submetidos à anestesia geral intraperitoneal no quadrante abdominal inferior esquerdo, por meio da associação do sedativo cloridrato de ketamina (100 mg/Kg; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil) e o relaxante muscular cloridrato de xilazina (20 mg/Kg; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil), com rigoroso monitoramento.

3.5 Preparo dos materiais

Os materiais foram preparados e mantidos de forma totalmente asséptica, e em um período de 24 horas anteriormente aos procedimentos cirúrgicos.

3.6 Procedimento cirúrgico de implantação dos scaffolds

Os 42 animais foram submetidos à implantação dos materiais no subcutâneo. Os scaffolds bioimpressos foram implantados diretamente no subcutâneo dos animais, enquanto os injetáveis foram alocados dentro de tubos de dentina fabricados a partir de dentes bovinos, com aproximadamente 2,0 mm de diâmetro interno e 5,0 mm de comprimento, os quais foram esterilizados previamente. Para anestesia dos animais, foi utilizado, via intramuscular, um sedativo à base de xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e um anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 80mg/Kg). Após a anestesia, foi feita a tricotomia da região dorsal e a lavagem da área e antissepsia com solução de iodo 5%. Em seguida, foi feita uma incisão com lâmina de bisturi número 15C no dorso do animal (tendo a coluna vertebral como linha média de marcação), seguido pela divulsão do tecido subcutâneo para o lado esquerdo e direito da porção cranial e caudal. Cada animal recebeu na bolsa cirúrgica, com auxílio de pinça reta, um scaffold. O tecido foi suturado com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, SP, Brazil) não reabsorvível e a antissepsia final foi realizada com solução de iodo 5%. Os animais foram acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de retornarem ao biotério.

Já para a implantação dos scaffolds nas calvárias, após anestesia, foi feita a tricotomia e desinfecção da região frontal, e em seguida uma incisão semilunar no centro da calvária, expondo o osso parietal. O defeito ósseo foi feito por uma broca de trefina com diâmetro externo de 5 mm (Neodent®; Curitiba, PR, Brasil) com um motor elétrico (Driller, BLM 600 Plus®; Carapicuíba, SP, Brasil) sob irrigação salina estéril contínua. Foi tomado extremo cuidado para não danificar a dura-máter durante a criação do defeito. No grupo coágulo, a cavidade óssea foi preenchida somente com coágulo sanguíneo. Já nos grupos experimentais, os defeitos foram preenchidos com os materiais descritos na Tabela 1 previamente fabricados em laboratório. Os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados, de modo a obter fechamento primário da ferida (Seda 4.0, Ethicon, São Paulo, SP, Brasil). A

antisepsia final foi realizada com solução de iodo 5%. Os animais foram acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de retornarem ao isolamento no biotério.

3.7 Medicações e procedimentos pós cirúrgicos

Os animais foram colocados na posição de decúbito lateral em gaiolas e expostos à luz incandescente para completa recuperação anestésica. Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos os animais receberam antibiótico em dose única Flotril® 2,5% (Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil), na dose de 0,2 ml/kg em aplicação intramuscular. A aplicação do analgésico foi mantida por 5 dias com dipirona na dose de 500 mg/Kg (medicamento Genérico, Medley, SP, Brasil), além da continuidade com o analgésico acetaminofeno (Paracetamol, medicamento Genérico, Medley, SP, Brasil) na dose de 200 mg/Kg, dissolvidos na água disponível no bebedouro até o período da eutanásia. Os animais foram mantidos em micro-isoladores individualmente (1 animal por micro-isolador) por 42 dias, sendo realizada a eutanásia para coleta das amostras. Durante toda a experimentação, os animais foram monitorados com relação à expressão de dor, por meio de observação se o animal está apático, deprimido, agressivo ou hiper excitado, principalmente devido a tais traços que são variáveis de seu comportamento habitual. Portanto será observado se ocorreram alterações no andar, na postura ou expressão facial. Além disso, foi averiguada a aparência, consumo de água e alimento, sintomas clínicos e comportamento.

3.8 Eutanásia e processamento histológico

A eutanásia foi realizada pelo método dose letal de anestésico, sendo utilizado tiopental de sódio na dosagem de 150 mg / kg (Cristália, Ltd., Itapira, SP, Brasil). Imediatamente após as eutanásias, os crânios foram removidos e fixados em solução de formalina 10% em tampão fosfato pH 7,2. Em seguida, as amostras foram desmineralizadas em uma solução de 10% de EDTA. Após a descalcificação completa, as amostras foram processadas e embebidas em parafina. Cortes seriados de 6 µm de espessura foram realizados na direção longitudinal. Por fim, as amostras foram avaliadas por meio das colorações H&E e Tricrômico de Masson. A análise dos cortes histológicos foi realizada descritivamente, adotando os seguintes parâmetros:

natureza e extensão do processo inflamatório local; estado da rede vascular; padrão de celularidade e de estruturação da matriz extracelular dos tecidos conjuntivo e ósseo neoformado; padrão de estruturação dos remanescentes dos scaffolds.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Estatística

A normalidade e a homoscedasticidade dos dados foram analisadas pelo teste de Shapiro-Wilk, constatando que eram paramétricos, foram submetidos ao teste estatístico ANOVA One-way. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4.2 Análise Histopatológica do Subcutâneo

Para a avaliação da biocompatibilidade dos scaffolds, os materiais foram implantados no subcutâneo de ratos e, ao término do período experimental, analisados histologicamente por meio das colorações de H&E e Tricrômico de Masson (Figuras 2 e 3, respectivamente). As observações microscópicas evidenciaram adequada interação entre os scaffolds e o tecido hospedeiro, sem presença de infiltrado inflamatório, necrose ou sinais de rejeição.

Em relação a análise de H&E, observou-se a reabsorção completa no grupo GelMaMgO, independente se o biomaterial havia sido bioimpresso ou injetado na dentina bovina. Já nos grupos GelMa e GelMaSiO havia remanescente dos scaffolds em ambas as formas de fabricação do biomaterial. Por fim, no grupo COAG, foi colocado a dentina bovina sem nenhum biomaterial, e assim como nos demais grupos, não houve sinal de inflamação ao redor do material.

Figura 2.

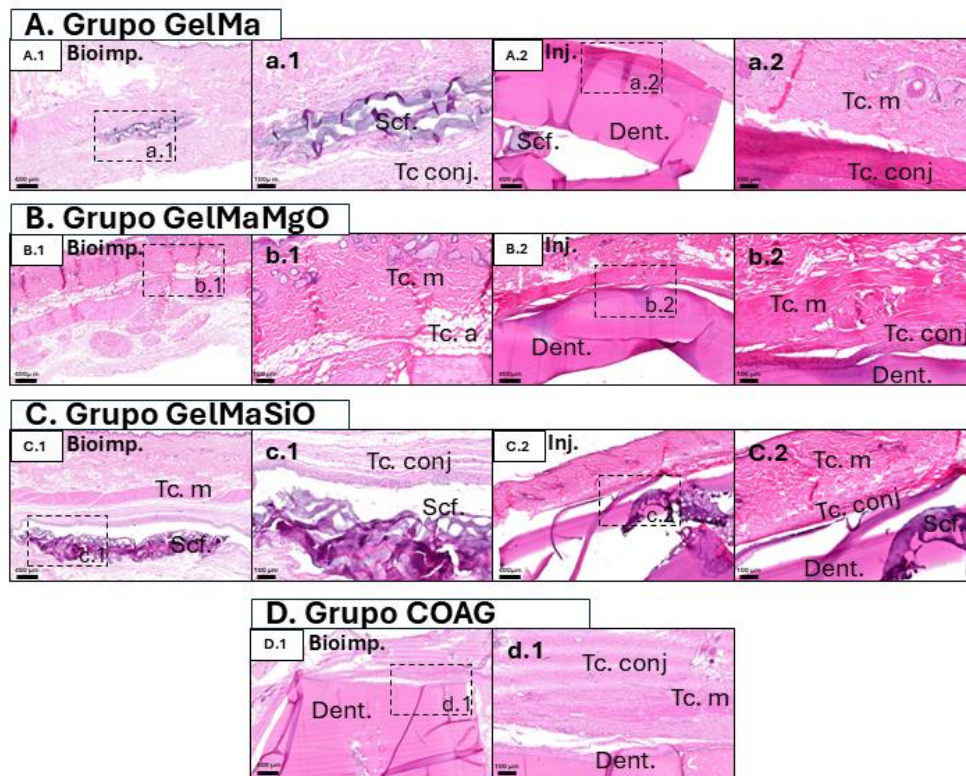


Figura 2. Análise histológica do subcutâneo de ratos após implantação dos scaffolds, evidenciando o padrão de reabsorção do material e ausência de infiltrado inflamatório ou sinais de rejeição. (a, b, c e d) mostram os detalhes histológicos em maior aumento (10x). Scf- scaffold; Tc conj.- Tecido conjuntivo; Dent.- dentina bovina; Tc m.- tecido muscular; Tc a.- tecido adiposo. Coloração H&E. Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

A análise pelo Tricrômico de Masson demonstrou preservação da arquitetura tecidual adjacente, com predomínio de tecido conjuntivo bem organizado e ausência de resposta imune exacerbada, indicando integração biológica satisfatória entre os biomateriais e os tecidos circundantes.

Figura 3.

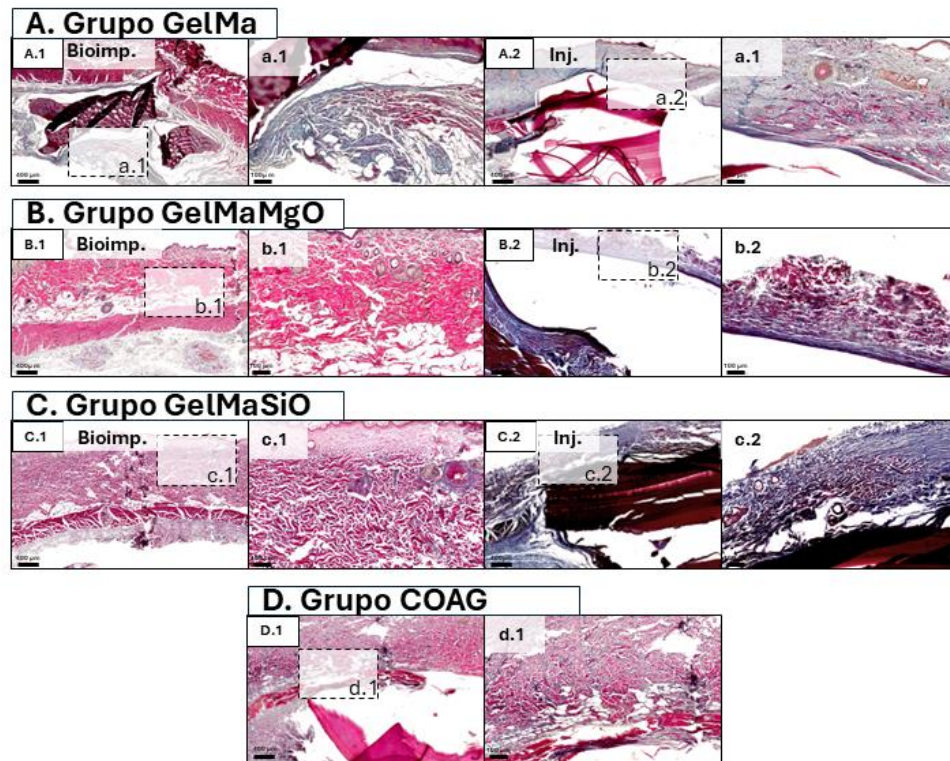


Figura 3. Análise histológica do subcutâneo de ratos após implantação dos scaffolds, evidenciando o padrão de reabsorção do material e ausência de infiltrado inflamatório ou sinais de rejeição. (a, b, c e d) mostram os detalhes histológicos em maior aumento (10x). Coloração: Tricrômico de Masson. Fonte: elaborada pelo autor, 2025.

4.3 Análise da Porcentagem de Osso Neoformado (PON)

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas no grupo COAG quando comparado com os demais grupos, sendo que este foi o que apresentou menor formação óssea. Os grupos bioimpressos apresentaram maior PON que os grupos injetáveis, exceto nos grupos que receberam o scaffolds funcionalizados com SiO (grupo GelMaSiO), em que não houve diferença estatística. Por fim, o grupo GelMaMgO bioimpresso foi o que apresentou maior porcentagem de osso neoformado em comparação com o restante dos grupos (Figura 4).

Gráfico 2.

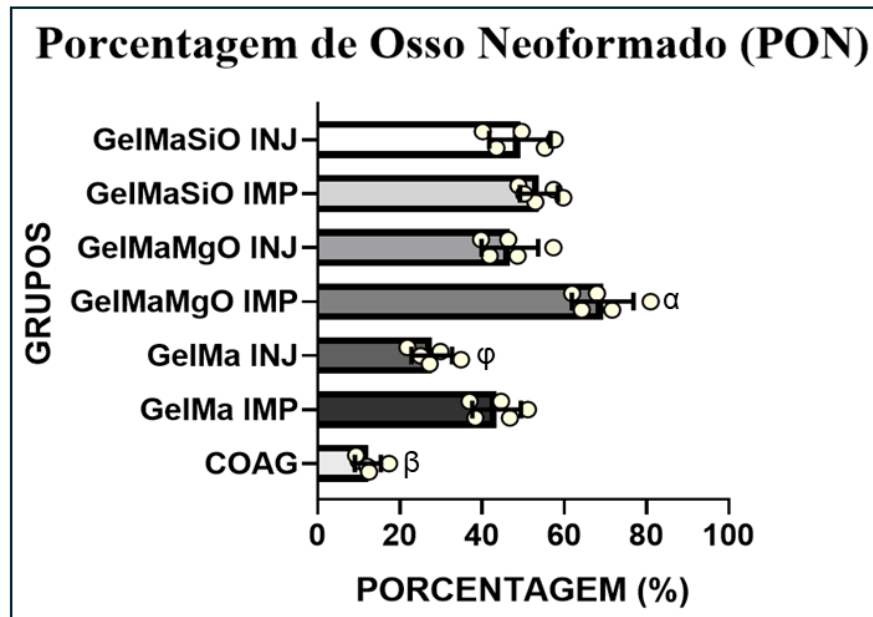


Gráfico 2. Gráfico de barras com as médias, desvio padrão e distribuição dos espécimes em cada grupo experimental. α - PON estatisticamente maior do que os demais grupos experimentais; φ – maior PON somente que o grupo COAG; β - PON estatisticamente menor do que os demais grupos experimentais. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; Teste estatístico: ANOVA One-way ($p \leq 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

4.4 Análise Histopatológica da Ferida Crítica em Calvária

Os grupos que receberam o material bioimpresso apresentaram maior formação óssea que os demais grupos. No grupo GelMaMgO a neoformação óssea no defeito crítico foi quase completa nos grupos que receberam essa composição bioimpressa, também podendo ser observada a ausência de inflamação, elevada formação de vasos sanguíneos (angiogênese) e tecido conjuntivo maduro. O scaffold desse grupo foi quase todo reabsorvido e foi possível observar algumas lacunas ósseas em que ainda havia presença do scaffold. Por outro lado, o GelMaMgO injetável se manteve presente por mais tempo, sendo possível observar o biomaterial na maioria das amostras. Semelhante a isso, o grupo GelMaSiO apresentou formação óssea elevada, com o novo osso se estendendo das bordas e parte inferior em direção ao centro de todo defeito, independente do modelo de fabricação (bioimpresso ou injetável). O scaffold foi quase todo reabsorvido e seus remanescentes apresentavam-se circundados por osso e/ou tecido conjuntivo. Havia presença de angiogênese, tecido conjuntivo maduro e organizado e baixa presença de infiltrado inflamatório. Quando comparado a estes dois grupos, o grupo GelMa puro apresentou menor formação óssea, porém foi possível observar áreas de neoformação no centro do

defeito, além das bordas no grupo bioimpresso. Este grupo apresentou a maior presença de scaffolds dentre os demais, havia presença de infiltrado inflamatório moderado, tecido conjuntivo organizado e angiogênese. Os grupos que receberam o biomaterial injetável não apresentaram grandes diferenças entre si. Em todos os grupos foi possível observar uma neoformação óssea que se estendia das bordas do defeito em direção ao centro pela parte inferior, a angiogênese foi elevada e o tecido conjuntivo bem-organizado. Em relação a presença de remanescente do scaffold, o grupo GelMa puro apresentou maior presença, enquanto uma reabsorção moderada foi observada nos demais grupos. Por fim, o grupo COAG foi o que menos apresentou formação óssea. Foi possível observar presença de infiltrado inflamatório, angiogênese moderada e o tecido conjuntivo ocupava a maior parte do defeito, sendo que estava mais organizado próximo ao osso. A formação óssea discreta foi restrita as bordas do defeito. As fotomicrografias histológicas coradas pela técnica de H&E, que mostram as características de cada grupo, podem ser observadas na Figura 5.

Figura 4.

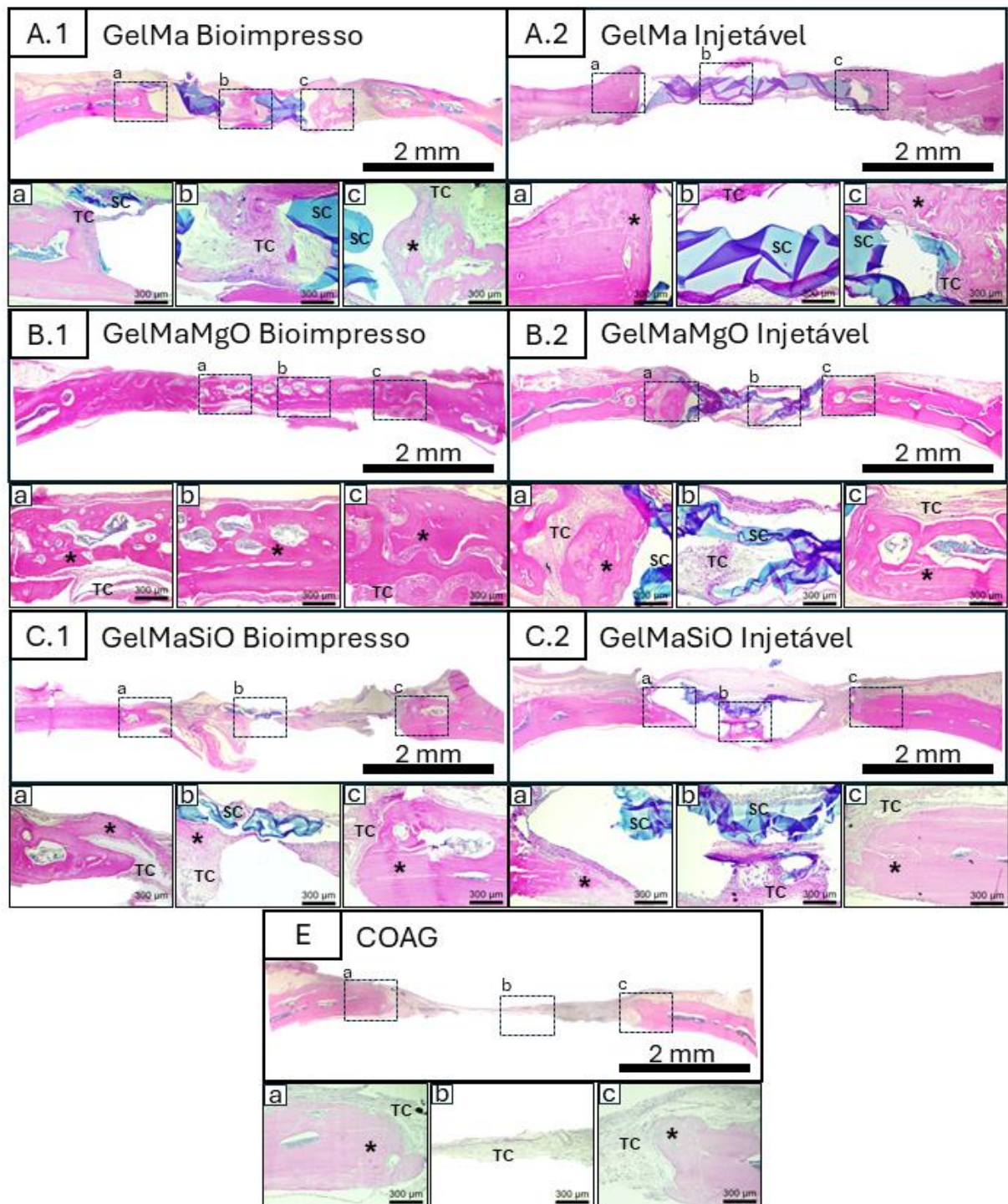


Figura 4. Fotomicrografias de cada grupo experimental na coloração de H&E. *- Osso neoformado; SC- remanescente do scaffold; TC- tecido conjuntivo. (a, b e c) mostram as regiões de interesse em maior aumento (10x). Coloração: H&E. Fonte: elaborada pelo autor, 2025.

A análise histológica sob coloração de Tricrômico de Masson revelou áreas distintas de neoformação óssea ao longo do defeito. As regiões coradas em azul-esverdeado indicaram a presença de osso imaturo, caracterizado por matriz colágena recém-depositada e trabéculas delgadas, em íntimo contato com o tecido conjuntivo

adjacente, sendo mais marcantes no grupo GelMaMgO bioimpresso, indicando a maior deposição óssea nesses grupos. Já as áreas em tonalidade rosa-avermelhada evidenciaram tecido ósseo mais maduro, com organização lamelar e matriz densamente mineralizada. No centro do defeito, observaram-se remanescentes dos scaffolds, ainda parcialmente integrados à matriz neoformada, atuando como arcabouço para deposição de matriz extracelular e migração celular. A interface entre o biomaterial e o tecido ósseo mostrou boa continuidade histológica, sem reação inflamatória perceptível, sugerindo um processo de remodelação progressiva e integração tecidual adequada.

Figura 5.

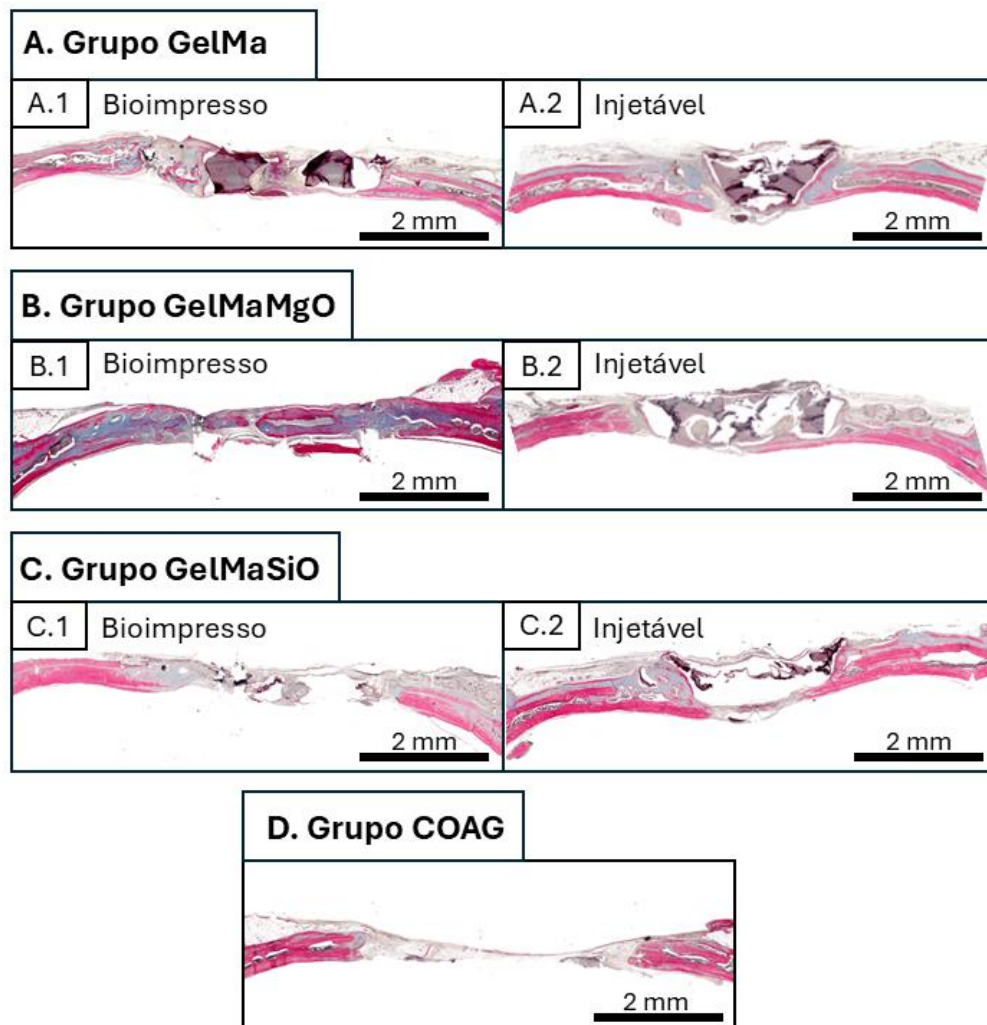


Figura 5. Fotomicrografias das calotas após processamento histológico mostrando as características de formação óssea em cada grupo experimental. O osso novo imaturo pode ser observado pela coloração azul-esverdeada, enquanto o osso maduro é observado pela coloração rosa-avermelhada. Os remanescentes dos scaffolds são observados no centro da lesão. Coloração: Tricrômico de Masson. Fonte: elaborada pelo autor, 2025.

5 DISCUSSÃO

5.1. Comparação geral da formação óssea entre os grupos

A comparação entre os grupos avaliados revelou diferenças importantes na formação óssea, evidenciando que os materiais funcionalizados com óxidos metálicos apresentaram desempenho superior em relação aos não funcionalizados. Nos grupos que incluíram óxido de magnésio (MgO), entende-se que há uma maior ativação de marcadores osteogênicos, como ALP, osteocalcina e colágeno tipo I, que pode ser atribuída à liberação de íons Mg^{2+} que modulam positivamente vias de sinalização como Wnt/ β -catenina e BMP/SMAD, favorecendo a diferenciação de osteoblastos e a mineralização óssea (Zhang et al., 2024); em revisões recentes, materiais à base de magnésio são descritos como promotores de osteogênese e angiogênese em engenharia óssea (Pan, 2023); paralelamente, os grupos com óxido de silício (SiO) também demonstraram aumento da neoformação óssea, estudos mostraram que em função da liberação de íons silicato há estimulação da expressão de OPN, OCN e ALP via vias Wnt e SHH, melhorando a mineralização e maturação tecidual (Han, Wu & Xiao, 2013); essas evidências corroboram a superioridade dos scaffolds funcionalizados frente aos de GelMa puro, que apresentaram menor densidade óssea neoformada e integração menos eficaz. Assim, a análise comparativa sugere que a funcionalização com MgO ou SiO favoreceu significativamente a formação óssea, e que as diferenças entre os grupos podem estar intimamente ligadas ao tipo de íon liberado, à arquitetura do scaffold e à disponibilidade de suporte estrutural para migração e diferenciação celular.

5.2. Efeito da funcionalização com óxido de magnésio (MgO)

Os resultados observados neste estudo evidenciaram que os scaffolds de GelMA funcionalizados com óxido de magnésio (MgO) apresentaram desempenho superior no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos, com maior porcentagem de osso neoformado, intensa angiogênese e reabsorção quase completa do biomaterial. Esse comportamento indica uma atividade osteocondutora efetiva, na qual o crescimento ósseo ocorreu predominantemente a partir das bordas em direção ao centro do defeito, preenchendo a ferida quase que por completo,

favorecendo a integração tecidual e o remodelamento do arcabouço, conforme descrito por Albrektsson e Johansson (2001).

A osteocondução é caracterizada pela capacidade do biomaterial em atuar como arcabouço para adesão, migração e proliferação de células osteogênicas do tecido hospedeiro, enquanto a osteoindução envolve a indução da diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos, com formação de osso ectópico (Albrektsson & Johansson, 2001). No presente estudo, embora os resultados apontem para um efeito pró-osteogênico do MgO, não foram observados critérios formais de osteoindução, uma vez que não se utilizaram modelos ectópicos nem análises moleculares específicas.

A literatura destaca que íons Mg^{2+} liberados a partir de biomateriais são capazes de modular vias de sinalização envolvidas na osteogênese, como Wnt/ β -catenina e BMP/SMAD, além de estimular a angiogênese e a diferenciação osteoblástica (Hu, Wang & Guo, 2022; Zhou & Ma, 2023). Estudos prévios corroboram esses achados, demonstrando que compósitos contendo MgO promovem diferenciação osteogênica in vitro (Nasrollah, Tavakoli & Shokrollahi, 2021) e aceleram o reparo ósseo in vivo (He et al., 2021).

Apesar do desempenho promissor, a comprovação de um efeito verdadeiramente osteoindutivo do MgO requer investigações complementares. Experimentos com imunohistoquímica ou análises de expressão gênica (RUNX2, ALP, COL1A1, OCN) seriam necessários para confirmar a capacidade do material em induzir a diferenciação osteogênica independentemente de estímulos do hospedeiro. Dessa forma, conclui-se que os scaffolds de GelMA+MgO bioimpressos apresentaram uma atividade osteocondutora robusta e potencial efeito pró-osteogênico, reforçando a funcionalização com MgO como uma estratégia eficaz para aprimorar o desempenho bioativo de biotintas aplicadas à engenharia tecidual óssea.

5.3. Efeito da funcionalização com óxido de silício (SiO)

A funcionalização da GelMA com óxido de silício (SiO) resultou em desempenho expressivo quanto à formação óssea e integração tecidual, caracterizado pela presença de matriz mineralizada, tecido conjuntivo maduro e angiogênese nas regiões adjacentes ao biomaterial. O grupo GelMaSiO bioimpresso

apresentou neoformação óssea, com o novo osso se estendendo das bordas ao centro do defeito, além de reabsorção quase completa do scaffold, indicando uma resposta osteogênica consistente. Embora tenha demonstrado resultados inferiores apenas ao grupo GelMaMgO bioimpresso, o GelMaSiO destacou-se como o segundo grupo com maior potencial osteoindutor, evidenciando que a incorporação de SiO exerce papel relevante na estimulação da mineralização e na maturação do tecido ósseo. Estudos mostraram que os íons silicato liberados por compósitos bioativos estimulam a expressão de genes osteogênicos, como ALP, COL1A1 e OCN, além de favorecerem a deposição de matriz extracelular mineralizada (Wu et al., 2019; Hoppe, Güldal & Boccaccini, 2011).

O silício é amplamente reconhecido como um elemento essencial na regeneração óssea, participando ativamente da síntese de colágeno tipo I e da nucleação de cristais de hidroxiapatita (Hanna J. V. et al., 2016). Estudos afirmam, que o silício presente em biovidros e scaffolds bioativos forma ligações Si–OH, que funcionam como sítios de nucleação para o fosfato de cálcio, promovendo a mineralização e facilitando a integração entre o biomaterial e o tecido hospedeiro (Hench e Jones, 2015). Além disso, os íons silicato modulam as vias de sinalização intracelulares, como MAPK e Wnt/ β -catenina, estimulando a diferenciação osteoblástica e contribuindo para a maturação do tecido recém-formado (Han P, Wu C, Xiao Y., 2013)

Esses mecanismos explicam o desempenho superior do grupo GelMaSiO bioimpresso em relação ao GelMa puro e aos grupos injetáveis, confirmando que a presença de SiO potencializa a bioatividade, osteocondução e angiogênese do biomaterial. A bioimpressão tridimensional, por sua vez, aprimora a arquitetura e a porosidade do scaffold, permitindo maior difusão de nutrientes e migração celular, o que intensifica a resposta regenerativa (Fouad, D., et al., 2025)

Assim, os resultados obtidos demonstram que a funcionalização com SiO conferiu propriedades osteocondutoras e potencial osteoindutor significativo, sendo o segundo material mais eficaz no estímulo à formação óssea entre os grupos testados. Essa associação entre GelMA e óxido de silício representa uma abordagem promissora para o desenvolvimento de scaffolds bioativos aplicáveis à engenharia tecidual e à regeneração óssea em odontologia.

5.4. Influência da técnica de bioimpressão em relação à forma injetável

A técnica de bioimpressão 3D oferece um controle arquitetural preciso — incluindo porosidade, interconectividade e alinhamento de filamentos — que favorece a migração celular, a difusão de nutrientes e a vascularização, fatores críticos para a regeneração óssea que dificilmente são alcançados por hidrogéis injetáveis não estruturados (Fang et al., 2023). Além disso, a bioimpressão permite a criação de geometria personalizada e gradientes de propriedades mecânicas e bioquímicas, o que adequa o scaffold ao microambiente ósseo e melhora a deposição de matriz mineralizada e a integração em defeitos críticos (Wang et al., 2024).

Em contraste, as formas injetáveis mostram vantagens práticas — como adaptabilidade ao leito do defeito, menor invasividade e aplicabilidade clínica facilitada — mas tipicamente carecem de estabilidade dimensional e de uma microarquitetura uniforme, o que pode comprometer a condução óssea orientada e ocasionar distribuição heterogênea de células e matriz (Zhang et al., 2024). Estratégias recentes de hidrogéis injetáveis avançados (com crosslinking controlado ou sistemas híbridos orgânico-inorgânicos) melhoraram o desempenho, porém persistem desafios em relação à resistência mecânica e suporte estrutural em defeitos de grande porte (Gogoi et al., 2024).

Em resumo, enquanto os hidrogéis injetáveis oferecem praticidade clínica e conformação direta ao defeito, a bioimpressão 3D oferece vantagens estruturais e microambientais que frequentemente resultam em melhor suporte à osteogênese e integração em defeitos críticos. A escolha entre as abordagens deve considerar o tamanho e a geometria do defeito, os requisitos mecânicos imediatos e a necessidade de arquiteturas biomiméticas — e em muitos casos, a utilização de uma estratégia combinada (por exemplo, elementos impressos integrados a fases injetáveis) pode equilibrar funcionalidade e aplicabilidade clínica (Fang et al., 2023).

5.5 Comparação da cinética de reabsorção e impacto na regeneração óssea

A otimização da regeneração óssea mediada por scaffolds exige um equilíbrio delicado entre a taxa de degradação do biomaterial e a velocidade de neoformação tecidual (HUTMACHER, 2000). A análise comparativa entre os scaffolds de GelMA funcionalizados com óxido de magnésio (GelMaMgO) e óxido de silício (GelMaSiO)

revelou que a natureza do bioativo incorporado influencia diretamente a cinética de reabsorção, o que, por sua vez, impacta o potencial regenerativo final.

O grupo GelMaMgO demonstrou a reabsorção mais rápida, sendo o scaffold quase completamente reabsorvido em 42 dias, especialmente na forma bioimpressa. Essa rápida degradação, aliada à liberação de íons Mg^{2+} , resultou na maior Porcentagem de Osso Neoformado (PON) entre todos os grupos. Este achado sugere que a cinética de reabsorção do GelMaMgO foi idealmente sincronizada com a osteogênese, garantindo que o espaço ocupado pelo scaffold fosse rapidamente liberado para a deposição de nova matriz óssea (ZHANG et al., 2024). A liberação de Mg^{2+} é conhecida por estimular vias de sinalização como Wnt/ β -catenina e BMP/SMAD, além de promover a angiogênese, o que explica a intensa neoformação óssea e vascularização observadas (HU et al., 2022).

Em contraste, o grupo GelMaSiO apresentou uma reabsorção mais moderada, com remanescentes do material ainda presentes, embora circundados por tecido ósseo neoformado. Apesar da reabsorção mais lenta, o GelMaSiO alcançou a segunda melhor performance em PON, indicando que o potente efeito bioativo dos íons silicato foi capaz de compensar a cinética de degradação menos agressiva. Os íons silicato são amplamente reconhecidos por sua capacidade de estimular a expressão de genes osteogênicos e atuar como sítios de nucleação para a hidroxiapatita, facilitando a mineralização e a osteointegração (HAN et al., 2013). A observação de remanescentes do scaffold circundados por osso sugere que o GelMaSiO atuou como um centro de nucleação e osteocondução eficaz, integrando-se ao tecido sem atuar como uma barreira física.

5.6 Mecanismos de ação e integração tecidual

A regeneração óssea promovida pelas biotintas de GelMA funcionalizadas ocorre por meio de mecanismos biológicos integrados que envolvem interação celular, liberação iônica e remodelação tecidual. Logo após a implantação, há a adsorção de proteínas plasmáticas na superfície do material e a ativação de macrófagos com perfil anti-inflamatório (M2), o que contribui para um ambiente favorável à regeneração e à integração tecidual, fato compatível com a ausência de infiltrado inflamatório observada nos grupos funcionalizados. A modulação inicial da resposta imune é

essencial para a osteointegração, pois evita fibrose e permite a adesão celular eficiente (Dong, et al., 2019)

A arquitetura obtida pela bioimpressão 3D favorece a migração e a proliferação de células mesenquimais, além de otimizar o transporte de oxigênio e nutrientes por meio da porosidade interconectada do scaffold, o que intensifica a regeneração óssea (Jahangir. S, et al., 2023). Esse padrão foi evidente nos grupos bioimpressos do presente estudo, nos quais se observou maior formação de tecido ósseo e organização vascular.

A funcionalização com óxidos metálicos, por sua vez, potencializa a atividade biológica da GelMA, já que os íons liberados — como Mg^{2+} e SiO_4^{4-} — estimulam vias de sinalização osteogênicas, como Wnt/ β -catenina e BMP/SMAD, aumentando a expressão de marcadores como ALP, colágeno tipo I e osteocalcina (Zhu et al., 2024). Esses mecanismos explicam o aumento significativo da formação óssea e a maturação do tecido observados nos grupos GelMaMgO e GelMaSiO, que apresentaram intensa deposição de matriz mineralizada.

Além disso, a angiogênese observada histologicamente nos grupos funcionalizados é um fator determinante para a integração e a regeneração óssea bem-sucedida, pois o novo tecido mineralizado depende do suprimento sanguíneo para seu crescimento e remodelação. Estudos afirmam que os íons liberados por biomateriais bioativos estimulam a secreção de fatores proangiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o que pode sustentar a neoformação vascular observada (Rudranath, G., et al., 2023)

Em conjunto, esses processos — modulação imune inicial, migração celular, ativação de vias osteogênicas e angiogênese — explicam a formação óssea intensa e a integração tecidual eficiente encontradas nos grupos funcionalizados do estudo. Assim, a combinação entre o design estrutural obtido pela bioimpressão e a liberação controlada de íons bioativos demonstra ser a principal responsável pela resposta regenerativa superior das biotintas de GelMAMgO e GelMaSiO (Dong et al., 2019).

5.7 Limitações do estudo

Apesar dos resultados promissores obtidos com as biotintas de GelMA funcionalizadas com óxidos, algumas limitações devem ser consideradas.

Uma limitação relevante está relacionada à ausência de análises moleculares aprofundadas sobre os mecanismos de diferenciação osteoblástica induzidos pelos óxidos incorporados. A compreensão das vias de sinalização envolvidas — como a MAPK e Wnt/ β -catenina, associadas à osteogênese e à regeneração tecidual (Sun T, Wang M, Shao Y, Wang L, Zhu Y. et al., 2017) — permitiria estabelecer relações mais diretas entre a composição da biotinta e sua bioatividade. Portanto, estudos futuros poderiam abranger técnicas que evidenciem a expressão de marcadores biológicos da formação óssea, como Runx2, ALP e osteocalcina, complementando os achados morfológicos e de viabilidade celular (Ho MH et al., 2015).

Além disso, podem ser empregadas análises que avaliem a presença e liberação de fatores pró-angiogênicos, como VEGF e o PDGF, que desempenham papéis fundamentais na formação de novos vasos sanguíneos e na integração do tecido regenerado com o leito receptor (LI et al., 2022). A angiogênese é essencial para o sucesso da regeneração óssea, uma vez que o aporte sanguíneo adequado favorece a oxigenação, a chegada de nutrientes e a migração celular para o sítio de reparo (Subbiah R, et al., 2021).

Adicionalmente, embora os materiais testados tenham se mostrado bons osteocondutores, ainda carecem de características que os tornem osteoindutores. Para isso, pode ser avaliado a modificação da estrutura da GelMA ou a combinação com fatores bioativos que promovam o recrutamento e diferenciação de células-tronco mesenquimais (Miao G et al., 2023).

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os scaffolds de GelMA funcionalizados com óxidos, especialmente nas amostras bioimpressas, apresentaram maior potencial osteocondutor, favorecendo adesão, diferenciação celular e regeneração óssea. Os dois materiais contribuíram para aprimorar a bioatividade e a integração tecidual, entretanto, as amostras funcionalizadas com MgO apresentaram resultado expressivamente maior, principalmente na sua forma bioimpressa, quando comparado com as amostras funcionalizadas com SiO.

Embora os resultados sejam promissores, ainda se faz necessária a otimização de propriedades mecânicas, bem como estudos que avaliem a associação com outros materiais na tentativa de potencializar também o caráter osteindutor. Pesquisas futuras devem explorar técnicas que evidenciem marcadores biológicos da formação óssea, visando aprimorar a previsibilidade e eficácia desses biomateriais em aplicações clínicas.

7. REFERÊNCIAS

- 1- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, v. 10, supl. 2, p. S96–S101, 2001. DOI: 10.1007/s005860100282.
- 2- Anesi A, Malavasi G, Chiarini L, Salvatori R, Lusvardi G. Cell proliferation to evaluate preliminarily the presence of enduring self-regenerative antioxidant activity in cerium doped bioactive glasses. *Materials (Basel)*. 2020;13(10):2297. doi: 10.3390/ma13102297.
- 3- Annabi N, Tamayol A, Uquillas JA, Akbari M, Bertassoni LE, Cha C, Camci-Unal G, Dokmeci MR, Peppas NA, Khademhosseini A. 25th Anniversary article: rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater*. 2014;8;26(1):85-123. doi: 10.1002/adma.201303233.
- 4- Anderson M, Dubey N, Bogie K, Cao C, Li J, Lerchbacker J, Mendonça G, Kauffmann F, Bottino MC, Kaigler D. Three-dimensional printing of clinical scale and personalized calcium phosphate scaffolds for alveolar bone reconstruction. *Dent Mater*. 2022 Mar;38(3):529539. doi: 10.1016/j.dental.2021.12.141. Epub 2022 Jan 21. PMID: 35074166.
- 5- Asa'ad F, Pagni G, Pilipchuk SP, Gianni AB, Giannobile WV, Rasperini G. 3D-printed scaffolds and biomaterials: review of alveolar bone augmentation and periodontal regeneration applications. *Int. J. Dent*. 2016, 1239842 (2016).
- 6- Aytac Z, Dubey N, Daghrery A, Ferreira JA, de Souza Araújo IJ, Castilho M, Malda J, Bottino MC. Innovations in craniofacial bone and periodontal tissue engineering—from electrospinning to converged biofabrication. *Int Mater Rev*. 2022; 67(4): 347–384. doi:10.1080/09506608.2021.1946236.
- 7- BaoLin G, Ma PX. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Sci China Chem*. 2014 Apr 1;57(4):490-500. doi: 10.1007/s11426-014-5086-y.
- 8- BECK, G. R. et al. Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 8, n. 6, p. 793–803, 2012. DOI: 10.1016/j.nano.2011.11.003.
- 9- Blaeser A, Duarte Campos DF, Puster U, Richtering W, Stevens MM, Fischer H. Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(3):326-33. doi: 10.1002/adhm.201500677.
- 10-Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends Biotechnol*. 2013;31(10):594-605. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.06.005.
- 11-Braux J, Velard F, Guillaume C, Bouthors S, Jallot E, Nedelec J, LaurentMaquin D, Laquerrière P. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone

- resorption and formation *Acta Biomater.* 2011;7(6):2593-603. Doi: 10.1016/j.actbio.2011.02.013.
- 12-Cernencu AI, Ioniță M. The current state of the art in gellan-based printing inks in tissue engineering *Carbohydr Polym.* 2023;309:120676. Doi: 10.1016/j.carbpol.2023.120676.
 - 13-Chen Y, Zheng Z, Zhou R, Zhang H, Chen C, Xiong Z, Liu K, Wang X. Developing a strontium releasing graphene oxide-/collagen-based organic-inorganic nano biocomposite for large bone defect regeneration via mapk signaling pathway. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(17):15986-15997. doi: 10.1021/acsami.8b22606.
 - 14- Cristallini C, Barbani N, Bianchi S, Maltinti S, Baldassare A, Ishak R, Onor M, Ambrosio L, Castelvetro V, Cascone MG. Assessing two-way interactions between cells and inorganic nanoparticles. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;31(1):1. doi: 10.1007/s10856-019-6328-5.
 - 15- de Armentia SL, Fernández-Villamarín S, Ballesteros Y, Del Real JC, Dunne N, Paz E. 3D Printing of a Graphene-Modified Photopolymer Using Stereolithography for Biomedical Applications: A Study of the Polymerization Reaction. *Int J Bioprint.* 2022;8(1):503. doi: 10.18063/ijb.v8i1.503.
 - 16-DONG, Z.; YUAN, Q.; HUANG, K.; XU, W.; LIU, G.; GU, Z. Gelatin methacryloyl (GelMA)-based biomaterials for bone regeneration. *RSC Advances*, v. 9, p. 17737-17744, 2019. Doi: 10.1039/C9RA02695A
 - 17- El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013 Nov 1;2013(3):316-42. doi: 10.5339/gcsp.2013.38.
 - 18- Fielding GA, Bandyopadhyay A, Bose S. Effects of silica and zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds. *Dent Mater.* 2012;28(2):113-22. doi: 10.1016/j.dental.2011.09.010.
 - 19-Fini M, Giardino R, Borsari V et al. In vitro behaviour of osteoblasts cultured on orthopaedic biomaterials with different surface roughness, uncoated and fluorohydroxyapatite-coated, relative to the in vivo osteointegration rate. *Int. J. Artif. Organs* 26(6), 520–528 (2003).
 - 20-Fang W, Yang M, Wang L, Li W, Liu M, Jin Y, Wang Y, Yang R, Wang Y, Zhang K, Fu Q. Hydrogels for 3D bioprinting in tissue engineering and regenerative medicine: Current progress and challenges. *Int J Bioprint.* 2023 May 23;9(5):759. doi: 10.18063/ijb.759.
 - 21- França CM, Sercia A, Parthiban, Bertassoni LE. Current and Future Applications of 3D Bioprinting in Endodontic Regeneration - A Short Review. *CDA Journal.* 2019; 47(10):645-652.
 - 22-Fouad Damiri, Ahmed Fatimi, Yang Liu, Adina Magdalena Musuc, André R. Fajardo, B.H. Jaswanth Gowda, Lalitkumar K. Vora, Armin Shavandi, Oseweuba V. Okoro. Recent advances in 3D bioprinted polysaccharide hydrogels for biomedical applications: A comprehensive review, *Carbohydrate*

- Polymers, Volume 348, Part B, 2025,122845, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122845>.
- 23-GOGOI, D.; et al. A comprehensive review on hydrogel-based bio-ink: properties, design and applications. *Materials & Design/Elsevier, Printed Medicine*, Volume 15, 2024, 100159, ISSN 2666-9641, <https://doi.org/10.1016/j.stlm.2024.100159>.
 - 24-GÖTZ, W.; TOBIASCH, E.; WITZLEBEN, S.; SCHULZE, M. Effects of silicon compounds on biomineralization, osteogenesis, and hard tissue formation. *Pharmaceutics*, v. 11, n. 3, p. 117, 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030117.
 - 25- Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2014 Jun;59 Suppl 1:117-30. doi: 10.1111/adj.12100.
 - 26-HAN, P.; WU, C.; XIAO, Y. The effect of silicate ions on proliferation, osteogenic differentiation and cell signalling pathways (WNT and SHH) of bone marrow stromal cells. *Biomaterials Science*, v. 1, p. 379-392, 2013. DOI: 10.1039/C2BM00108J.
 - 27-HANNA, J. V. et al. Soluble silicon patterns and templates: calcium phosphate nanocrystal deposition in collagen type 1. *RSC Advances*, v. 6, n. 110, p. 108522-108533, 2016. DOI: 10.1039/C6RA19784A.
 - 28-HE, X.; ZHANG, W.; DING, L.; MA, N.; LIU, J. Artificial periosteum of PLGA/MgO/quercetin promotes bone repair by regulating osteogenesis, angiogenesis and remodeling. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 9, n. 6, p. 1593–1605, 2021. DOI: 10.1039/D0TB02158K.
 - 29-Ho MH, Yao CJ, Liao MH, Lin PI, Liu SH, Chen RM. Chitosan nanofiber scaffold improves bone healing via stimulating trabecular bone production due to upregulation of the Runx2/osteocalcin/alkaline phosphatase signaling pathway. *Int J Nanomedicine*. 2015 Sep 22;10:5941-54. doi: 10.2147/IJN.S90669.
 - 30- Hossain Rakin R, Kumar H, Rajeev A, Natale G, Menard F, Li ITS, Kim K. Tunable metacrylated hyaluronic acid-based hybrid bioinks for stereolithography 3D bioprinting. *Biofabrication*. 2021 Sep 27;13(4). doi: 10.1088/1758-5090/ac25cb.
 - 31-HU, J.; WANG, Z.; GUO, Y. In vitro and in vivo applications of magnesium-enriched biomaterials in bone repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, p. 866049, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.866049.
 - 32-Huh J, Moon YW, Park J, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Combinations of photoinitiator and UV absorber for cell- based digital light processing (DLP) bioprinting. *Biofabrication*. 2021;13(3). doi: 10.1088/1758- 5090/abfd7a.
 - 33-HU, X. et al. Magnesium-based biomaterials for bone regeneration: A review of the latest advances. *Journal of Orthopaedic Translation*, v. 34, p. 110-120, 2022. Doi:10.1016/j.jot.2022.08.002.
 - 34-HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v. 21, n. 24, p. 2529-2543, dez. 2000. Doi: 10.1016/s0142-9612(00)00121-6.

- 35- Jahangir S, Vecstaudza J, Augurio A, Canciani E, Stipniece L, Locs J, Alini M, Serra T. Cell-Laden 3D Printed GelMA/HAp and THA Hydrogel Bioinks: Development of Osteochondral Tissue-like Bioinks. *Materials (Basel)*. 2023 Nov 17;16(22):7214. doi: 10.3390/ma16227214.
- 36- Kačarević ŽP, Rider PM, Alkildani S, Retnasingh S, Smeets R, Jung O, Ivanišević Z, Barbeck M. An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. *Materials (Basel)*. 2018;11(11):2199. doi: 10.3390/ma11112199.
- 37- Kai Hu, Bjorn R. Olsen, The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration, *Bone*, Volume 91, 2016, Pages 30-38, ISSN 8756-3282, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.013>.
- 38- Karanth D, Song K, Martin ML, Meyer DR, Dolce C, Huang Y, Holliday LS. Towards resorbable 3D-printed scaffolds for craniofacial bone regeneration. *Orthod Craniofac Res*. 2023. doi: 10.1111/ocr.12645.
- 39- Kumar H, Kim K. Stereolithography 3D Bioprinting. *Methods Mol Biol*. 2020;2140:93-108. doi: 10.1007/978-1-0716-0520-2_6. PMID: 32207107.
- 40- Kumar H, Sakthivel K, Mohamed MGA, Boras E, Shin SR, Kim K. Designing Gelatin Methacryloyl (GelMA)- Based Bioinks for Visible Light Stereolithographic 3D Biofabrication. *Macromol Biosci*. 2021;21(1):e2000317. doi: 10.1002/mabi.202000317.
- 41- Lee SJ, Lee D, Yoon TR et al. Surface modification of 3D-printed porous scaffolds via mussel-inspired polydopamine and effective immobilization of rhBMP-2 to promote osteogenic differentiation for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 40, 182191 (2016).
- 42- Lee DJ, Kwon J, Kim YI, et al. Effect of pore size in bone regeneration using polydopamine-laced hydroxyapatite collagen calcium silicate scaffolds fabricated by 3D mould printing technology. *Orthod Craniofac Res*. 2019;22 Suppl 1(Suppl 1):127133. doi:10.1111/ocr.12261
- 43- Lee M, Rizzo R, Surman F, Zenobi-Wong M. Guiding Lights: Tissue Bioprinting Using Photoactivated Materials. *Chem Rev*. 2020;120(19):10950-11027. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00077.
- 44- Lee SH, Kang MS, Jeon S, Jo HJ, Hong SW, Kim B, Han DW. 3D bioprinting of human mesenchymal stem cells-laden hydrogels incorporating MXene for spontaneous osteodifferentiation. *Heliyon*. 2023;9(3):e14490. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14490.
- 45- Lim KS, Levato R, Costa PF, Castilho MD, Alcala-Orozco CR, van Dorenmalen KMA, Melchels FPW, Gawlitta D, Hooper GJ, Malda J, Woodfield TBF. Bio-resin for high resolution lithography-based biofabrication of complex cell-laden constructs. *Biofabrication*. 2018;10(3):034101. doi: 10.1088/1758-5090/aac00c.
- 46- Liu T, Weng W, Zhang Y, Sun X, Yang H. Applications of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels in Microfluidic Technique-Assisted Tissue Engineering. *Molecules*. 2020;25(22):5305. doi: 10.3390/molecules25225305.

- 47-LIU, Y. et al. Mesenchymal stem cells–hydrogel microspheres system for bone regeneration in calvarial defects. *Gels*, v. 8, n. 5, p. 275, 2022. DOI: 10.3390/gels8050275.
- 48- Ma Y, Xie L, Yang B, Tian W. Three-dimensional printing biotechnology for the regeneration of the tooth and tooth-supporting tissues. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116(2):452-468. doi: 10.1002/bit.26882.
- 49- Mendes BB, Daly AC, Reis RL, Domingues RMA, Gomes ME, Burdick JA. Injectable hyaluronic acid and platelet lysate-derived granular hydrogels for biomedical applications. *Acta Biomater*. 2020;29:S1742- 7061(20)30638-3. doi: 10.1016/j.actbio.2020.10.040.
- 50- Moroni L, Boland T, Burdick JA, De Maria C, Derby B, Forgacs G, Groll J, Li Q, Malda J, Mironov VA, Mota C, Nakamura M, Shu W, Takeuchi S, Woodfield TBF, Xu T, Yoo JJ, Vozzi G. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol*. 2018;36(4):384-402. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.10.015.
- 51-NASROLLAH, S. A. S.; TAVAKOLI, S.; SHOKROLLAHI, P. Injectable photoclick hydrogel containing magnesium oxide nanoparticles for bone tissue engineering: Evaluation of osteogenic differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 109, n. 6, p. 827–839, 2021. DOI: 10.1002/jbm.a.37098.
- 52- Nesic D, Schaefer BM, Sun Y, Saulacic N, Sailer I. 3D Printing Approach in Dentistry: The Future for Personalized Oral Soft Tissue Regeneration. *J Clin Med*. 2020;9(7):2238. doi: 10.3390/jcm9072238.
- 53- Nulty A. A comparison of trueness and precision of 12 3D printers used in dentistry. *BDJ Open*. 2022;8(1):14. doi: 10.1038/s41405-022-00108-6.
- 54- Nyberg EL, Farris AL, Hung BP, Dias M, Garcia JR, Dorafshar AH, Grayson WL. 3D-Printing Technologies for Craniofacial Rehabilitation, Reconstruction, and Regeneration. *Ann Biomed Eng*. 2017;45(1):45-57. doi: 10.1007/s10439-016-16685.
- 55- Oberoi G, Nitsch S, Edelmayer M, Janjić K, Müller AS, Agis H. 3D Printing- Encompassing the Facets of Dentistry. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:172. doi: 10.3389/fbioe.2018.00172.
- 56- Obregon F, Vaquette C, Ivanovski S, Hutmacher DW, Bertassoni LE. Three-dimensional bioprinting for regenerative dentistry and craniofacial tissue engineering. *J Dent Res*. 2015;94(9 Suppl):143S-52S. doi: 10.1177/0022034515588885.
- 57- Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*. 2016;76:321-43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.076.
- 58-PAN, S. In vitro and in vivo applications of magnesium-enriched biomaterials for vascularized osteogenesis in bone tissue engineering: a review of literature. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 14, n. 6, p. 326, 2023. DOI: 10.3390/jfb14060326.

- 59- Pu X, Tong L, Wang X, Liu Q, Chen M, Li X, Lu G, Lan W, Li Q, Liang J, Sun Y, Fan Y, Zhang X. Bioinspired Hydrogel Anchoring 3DP GelMA/HAp Scaffolds Accelerates Bone Reconstruction. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2022;14(18):2059120602. doi: 10.1021/acsami.1c25015.
- 60- Reed S, Lau G, Delattre B, Lopez DD, Tomsia AP, Wu BM. Macro- and micro-designed chitosan-alginate scaffold architecture by three-dimensional printing and directional freezing. *Biofabrication*. 2016;8(1):015003. doi:10.1088/1758-5090/8/1/015003.
- 61- Rudranath, G, et al., 3D Bioprinting of GelMA hydrogels for bone regeneration. *Materials Advances*, v. 4, p. 5496-5529, 2023. Doi: 10.1039/d3ma00715d.
- 62- Samadi A, Moammeri A, Pourmadadi M, Abbasi P, Hosseinpour Z, Farokh A, Shamsabadipour A, Heydari M, Mohammadi MR. Cell Encapsulation and 3D Bioprinting for Therapeutic Cell Transplantation. *ACS Biomater Sci Eng*. 2023. doi: 10.1021/acsbiomaterials.2c01183.
- 63- Sarker MD, Naghieh S, Sharma NK, Chen X. 3D biofabrication of vascular networks for tissue regeneration: A report on recent advances. *J Pharm Anal*. 2018;8(5):277-296. doi: 10.1016/j.jpha.2018.08.005.
- 64- Saska S, Pilatti L, Blay A, Shibli JA. Bioresorbable Polymers: Advanced Materials and 4D Printing for Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2021;13(4):563. doi: 10.3390/polym13040563.
- 65- Sato M, Webster TJ. Designing orthopedic implant surfaces: harmonization of nanotopographical and chemical aspects. *Nanomedicine (Lond)*. 1(3), 351–354 (2006).
- 66- Sergi R, Bellucci D, Salvatori R, Anesi A, Cannillo V. A novel bioactive glass containing therapeutic ions with enhanced biocompatibility. *Materials (Basel)*. 2020;13(20):4600. doi: 10.3390/ma13204600.
- 67- Shen M, Wang L, Gao Y, Feng L, Xu C, Li S, Wang X, Wu Y, Guo, Y, Pei G. 3D bioprinting of in situ vascularized tissue engineered bone for repairing large segmental bone defects. *Materials Today Bio*. 2022;16:100382. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100382.
- 68- Shopperly LK, Spinnen J, Krüger JP, Endres M, Sittlinger M, Lam T, Kloke L, Dehne T. Blends of gelatin and hyaluronic acid stratified by stereolithographic bioprinting approximate cartilaginous matrix gradients. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022;110(10):2310-2322. doi: 10.1002/jbm.b.35079.
- 69- Smith MH, Flanagan CL, Kemppainen JM et al. Computed tomographybased tissue-engineered scaffolds in craniomaxillofacial surgery. *Int. J. Med. Robot*. 3(3), 207–216 (2007).
- 70- Soares DG, Anovazzi G, Bordini EAF, Zuta UO, Silva Leite MLA, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Biological Analysis of Simvastatin-releasing Chitosan Scaffold as a Cell-free System for Pulp-dentin Regeneration. *J Endod* 2018a;44 (6):971-976 e971. doi:10.1016/j.joen.2018.02.014
- 71- Soares DG, Bordini EAF, Cassiano FB, Bronze-Uhle ES, Pacheco LE, Zabeo G, Hebling J, Lisboa-Filho PN, Bottino MC, de Souza Costa CA. Characterization of novel calcium hydroxide-mediated highly porous chitosan-

- calcium scaffolds for potential application in dentin tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(6):2546-2559. doi: 10.1002/jbm.b.34586.
- 72- Stuani VT, Manfredi GGP, Kondo VAM, Noritomi PY, Lisboa-Filho PN, Sant'Ana ACP. The use of additively manufactured scaffolds for treating gingival recession associated with interproximal defects. *Journal of 3D printing in medicine* 2021, 4 (3), 153-165. doi:10.2217/3dp-2020-0008.
 - 73- Sun T, Wang M, Shao Y, Wang L, Zhu Y. The Effect and Osteoblast Signaling Response of Trace Silicon Doping Hydroxyapatite. *Biol Trace Elem Res*. 2018 Jan;181(1):82-94. doi: 10.1007/s12011-017-1031-1.
 - 74- Tao O, Kort-Mascort J, Lin Y, Pham HM, Charbonneau AM, ElKashty OA, Kinsella JM, Tran SD. The Applications of 3D Printing for Craniofacial Tissue Engineering. *Micromachines* (Basel). 2019;10(7):480. doi: 10.3390/mi10070480.
 - 75- Tao J, Zhu S, Liao X, Wang Y, Zhou N, Li Z, Wan H, Tang Y, Yang S, Du T, Yang Y, Song J, Liu R. DLP-based bioprinting of void-forming hydrogels for enhanced stem-cell-mediated bone regeneration. *Materials Today Bio*. 2022;17:100487. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100487.
 - 76- Thattaruparambil Raveendran N, Vaquette C, Meinert C, Samuel Ipe D, Ivanovski S. Optimization of 3D bioprinting of periodontal ligament cells. *Dent Mater*. 2019 Dec; 35(12):1683-1694. doi: 10.1016/j.dental.2019.08.114. Epub 2019 Oct 8. PMID: 31601443.
 - 77- Thirivikraman G, Athirasala A, Gordon R, Zhang L, Bergan R, Keene DR, Jones JM, Xie H, Chen Z, Tao J, Wingender B, Gower L, Ferracane JL, Bertassoni LE. Rapid fabrication of vascularized and innervated cell-laden bone models with biomimetic intrafibrillar collagen mineralization. *Nat Commun*. 2019;10(1):3520. doi: 10.1038/s41467-019-11455-8.
 - 78- Tigmeanu CV, Ardelean LC, Rusu LC, Negrutiu ML. Additive Manufactured Polymers in Dentistry, Current State-of-the-Art and Future Perspectives A Review. *Polymers* (Basel). 2022;14(17):3658. doi: 10.3390/polym14173658.
 - 79- Tsolakis IA, Gizani S, Panayi N, Antonopoulos G, Tsolakis AI. ThreeDimensional Printing Technology in Orthodontics for Dental Models: A Systematic Review. *Children* (Basel). 2022;9(8):1106. doi: 10.3390/children9081106.
 - 80- Unagolla JM, Jayasuriya AC. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Appl Mater Today*. 2020;18:100479. doi: 10.1016/j.apmt.2019.100479.
 - 81- Viray CM, van Magill B, Zreiqat H, Ramaswamy Y. Stereolithographic Visible-Light Printing of Poly(L-glutamic acid) Hydrogel Scaffolds. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022;8(3):1115-1131. doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c01519.
 - 82- Wang Z, Kumar H, Tian Z, Jin X, Holzman JF, Menard F, Kim K. Visible Light Photoinitiation of Cell-Adhesive Gelatin Methacryloyl Hydrogels for Stereolithography 3D Bioprinting. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(32):26859-26869. doi: 10.1021/acsami.8b06607.

- 83- Woodard JR, Hildore AJ, Lan SK et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* 28(1), 45–54 (2007).
- 84-WU, C. et al. Silicate bioceramics in bone tissue regeneration: advances and prospects. *Acta Biomaterialia*, v. 96, p. 35–51, 2019. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.05.046.
- 85- Wu Z, Liu J, Lin J, Lu L, Tian J, Li L, Zhou C. Novel Digital Light Processing Printing Strategy Using a Collagen-Based Bioink with Prospective CrossLinker Procyanidins. *Biomacromolecules*. 2022;23(1):240 – 252. doi: 10.1021/acs.1c01244.
- 86-Xiao S, Zhao T, Wang J, Wang C, Du J, Ying L, Lin J, Zhang C, Hu W, Wang L, Xu K. Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Rev Rep*. 2019;15(5):664-679. doi: 10.1007/s12015-019-09893-4.
- 87-Yi S, Liu Q, Luo Z, He JJ, Ma HL, Li W, Wang D, Zhou C, Garciamendez CE, Hou L, Zhang J, Zhang YS. Micropore-Forming Gelatin Methacryloyl (GelMA) Bioink Toolbox 2.0: Designable Tunability and Adaptability for 3D Bioprinting Applications. *Small*. 2022;18(25):e2106357. doi: 10.1002/smll.202106357.
- 88- Yu H, Zhang X, Song W, Pan T, Wang H, Ning T, Wei Q, Xu HHK, Wu B, Ma D. Effects of 3-dimensional Bioprinting Alginate/Gelatin Hydrogel Scaffold Extract on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*. 2019 Jun;45(6):706-715. doi: 10.1016/j.joen.2019.03.004.
- 89- Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med*. 2019 Apr;13(2):152-159. doi: 10.1007/s11684-018-0628-x.
- 90-ZHANG, S.; et al. Research progress of injectable hydrogels in the treatment of bone defects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, volum 12, 2024. DOI=10.3389/fbioe.2024.1483547
- 91- Zhang W, Chang Q, Xu L, Li G, Yang G, Ding X, Wang X, Cui D, Jiang X. Graphene oxide-copper nanocomposite-coated porous CaP scaffold for vascularized bone regeneration via activation of Hif-1 α . *Adv. Healthcare Mater*. 2016;5(11):1299-309. doi: 10.1002/adhm.201500824.
- 92-ZHANG, X.; GONG, C.; WANG, X.; WEI, Z.; GUO, W. A bioactive gelatin-methacrylate incorporating magnesium phosphate cement for bone regeneration. *Biomedicines*, v. 12, n. 1, p. 228, 2024. DOI: 10.3390/biomedicines12010228.
- 93-ZHANG, X. et al. Immune homeostasis modulation by hydrogel-guided delivery systems: a tool for accelerated bone regeneration. *Biomaterials Science*, v. 11, n. 24, p. 6972–6986, 2023. DOI: 10.1039/D3BM00544E.
- 94- Zhao N, Wu Z, Qin L, Guo Z, Li D. Characteristics and Tissue Regeneration Properties of Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2015;25(2):135-44. doi: 10.1615/critreveukaryotgeneexpr.2015012539.

- 95-ZHOU, H.; MA, J. Magnesium-based biomaterials as emerging agents for bone reconstruction: From basic science to clinical translation. *Acta Biomaterialia*, v. 157, p. 1–20, 2023. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.12.018.
- 96-Zhu Y, Yu X, Liu H, Li J, Gholipourmalekabadi M, Lin K, Yuan C, Wang P. Strategies of functionalized GelMA-based bioinks for bone regeneration: Recent advances and future perspectives. *Bioact Mater*. 2024 May 9;38:346-373. doi: 10.1016/j.bioactmat.2024.04.032.