



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

KAUÊ ALBERTO PEREIRA

**FIBRA DE CARBONO EM DEFEITOS ÓSSEOS DE TAMANHO
CRÍTICO: estudo *in vivo* em ratos**

KAUÊ ALBERTO PEREIRA

**FIBRA DE CARBONO EM DEFEITOS ÓSSEOS DE TAMANHO CRÍTICO: estudo
in vivo em ratos**

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 MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. 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).

Pereira, Kauê Alberto

Fibra de carbono em defeitos ósseos de tamanho crítico: estudo in vivo em ratos / Kauê Alberto Pereira. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Andrea Carvalho De Marco.

1. Fibra de Carbono. 2. Regeneração óssea. 3. Materiais biocompatíveis. 4. Engenharia tecidual. I. De Marco, Andrea Carvalho, 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.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Andréa Carvalho De Marco (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista - Unesp

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Claudemir de Carvalho

Centro Universitário Funvic (Unifunvic)

Pindamonhangaba

São José dos Campos, 29 de julho de 2022.

DEDICATÓRIA

Á Deus por não ter me abandonado em nenhum momento, pelas bênçãos, glórias, e suporte nos momentos difíceis, assim como pela força para acreditar no caminho que Ele me ajudou a traçar, e por ter permitido chegar até aqui e alcançar todos os meus sonhos e objetivos.

Aos meus pais Magnus e Kelly pelo suporte e incentivo constante, pelo carinho e paciência. Se hoje estou aqui é devido a tudo o que me ensinaram, vocês são meu maior exemplo de vida, não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

A minha irmã Beatriz pelo incentivo e conselhos, aprendo muito com você e saiba que muita coisa que me disse me ajudou a chegar até aqui e a acreditar em mim mesmo.

A minha namorada Nathalia por ser minha maior companheira de vida e uma inspiração para mim. Sem seu apoio nada disso teria sido possível, você nunca me deixou abaixar a guarda e sempre estive ao meu lado quando eu mais precisei, seja para celebrar algo ou apenas ouvir minhas reclamações. Essa conquista é nossa.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Ciência e Tecnologia - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dra. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof.Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof. Assoc. Luciane Dias de Oliveira.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Aos meus amigos da Pós-graduação, pelo companheirismo e ajuda diária.

À Clarissa Carvalho Martins Maciel, Letícia Cavassini Torquato, Eduardo Antônio Chelin Suarez, Camilla Magnoni Moretto, Ludmilla Oliveira Mantovani, Vitor Galdino Pantoja Torres, e Juliani Caroline Ribeiro de Araújo Souto por participarem ativamente deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado, pelos processos nº 88887.475133/2020-00 e 88887.529145/2020-00 no período de 01/02/2020 a 28/02/2022.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica aos estudantes de Ensino Médio (PIBIC Jr), pela concessão de bolsa ao Vitor Galdino Pantoja Torres no ano de 2022.

À equipe técnica da clínica, Jacqueline Amaral Gomes Bueno, Marcia Cristina Lopes Garcia e Valeria Santos da Silva, pela ajuda e dedicação.

À minha orientadora Prof. Dra. Andréa Carvalho De Marco pelo carinho, empatia, paciência, compreensão e companheirismo nesse tempo de trabalho.

Aos animais deste estudo por doarem suas vidas em prol da ciência. Fizemos de tudo para honrá-los, respeitá-los e para que todo o sacrifício de vocês não fosse em vão.

“Como seres humanos, nossa grandeza não está tanto em ser capaz de refazer o mundo..., mas em ser capaz de refazer a nós mesmos.”

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Preparação da fibra de carbono e ativação.....	16
3.2 Modelo experimental <i>in vivo</i>	18
3.3 Cálculo Amostral	20
3.4 Procedimento Cirúrgico.....	21
3.5 Avaliação por microtomografia computadorizada tridimensional.....	22
3.6 Processamento histológico.....	24
3.7 Análise Histomorfométrica.....	25
3.8 Análise Estatística.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Análise descritiva histológica e da Micro-CT.....	28
4.2 Resultado da MicroCT.....	30
4.3 Análise Histomorfométrica.....	37
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE	53
ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquematização do forno tubular elétrico onde será inserido a porta amostra contendo a matéria prima que passará pelo processo de carbonização e ativação. 16	
Figura 2 – Análise microscópica do FFCA 17	17
Figura 3 – Análise microscópica do FFCAAg 18	18
Figura 4 - Fluxograma dos animais em grupos e subgrupos..... 20	20
Figura 5 – Imagens após a realização dos defeitos e inserção dos biomateriais 22	22
Figura 6 – Linha do tempo dos procedimentos experimentais 22	22
Figura 7 - microtomógrafo SkyScan 1172 (Kontich, Bélgica) usado para a realização das microtomografias 24	24
Figura 8 - Espécimes do período de 15 dias; fotomicrografias da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original de X2,5) .. 29	29
Figura 9 - Espécimes do período de 60 dias; fotomicrografias da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original de X2,5) .. 30	30
Figura 10 – Imagens da metodologia de reconstrução das calvárias após a microCT 31	31
Figura 11 – Delimitação das áreas de interesse na reconstrução das calvárias após análise por microCT 32	32
Figura 12 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando Volume ósseo (BV)..... 34	34

Figura 13 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando volume total tecidual (<i>TV</i>)	35
Figura 14 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando volume ósseo/fração de volume ósseo (<i>BV/TV</i>)	36
Figura 15 - Dados obtidos por MicroCT para os períodos de 15 e 60 dias, avaliando número de trabéculas (<i>Tb.N</i>)	37
Figura 16 – Média e desvio padrão da Área total do defeito (<i>AT</i>) em mm ²	40
Figura 17 - Média e desvio padrão da Área de Neoformação óssea (<i>AN</i>) em %	40
Figura 18 - Média e desvio padrão da Área de Neoformação Lamelar (<i>ANL</i>) em %	41
Figura 19 - Média e desvio padrão da Área de Neoformação Intramembranosa (<i>ANI</i>) em %	41
Figura 20 - Média e desvio padrão da Medida Central Linear (<i>MCL</i>) em mm	42

Pereira KA. Fibra de carbono em defeitos ósseos de tamanho crítico: estudo in vivo em ratos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

Materiais a base de carbono têm sido utilizado em várias áreas como química, engenharia, ciência dos materiais, ciências biomédicas, entre outras. Além disso, por serem quimicamente estáveis, mecanicamente fortes, acessíveis economicamente, e biologicamente compatíveis, chamaram a atenção como material de arcabouço para a engenharia tecidual óssea. Assim, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a fibra de carbono obtida a partir de fibra PAN têxtil, nas suas diferentes formas, com vistas à obtenção de *scaffolds* como potencial enxerto ósseo sintético. Foram utilizados 34 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*), e realizados dois defeitos ósseos críticos na calvária de cada animal com 5 mm de diâmetro. Vinte e quatro animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: Defeito ósseo + coágulo sanguíneo, Defeito ósseo + Feltro Fibra de Carbono Não Ativado (FFCNA), Defeito ósseo + Feltro Fibra de Carbono Ativado (FFCA), Defeito ósseo + Feltro Fibra de Carbono Ativado com Prata (FFCAAg), e foram observados por períodos distintos de 15 e 60 dias para análise histomorfométrica e micro CT. Dez animais foram divididos aleatoriamente nos mesmos 4 grupos para aplicação de marcadores fluorocromáticos e análise de aposição mineral (em andamento). Após o período de observação dos subgrupos, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestesia geral. Em seguida, as calvárias foram removidas para as análises. Na avaliação dos dois períodos (15 e 60 dias), o FFCNA mostrou-se melhor para os parâmetros de Área de Neoformação óssea, Área de Neoformação Lamelar e Área de Neoformação Intramembranosa. Em 60 dias, o grupo FFCNA apresentou maior volume ósseo, volume tecidual e maior número de trabéculas, mostrando-se um material sintético promissor como *scaffold* para regeneração óssea.

Palavras-chave: Fibra de Carbono. Regeneração óssea. Materiais biocompatíveis. Engenharia tecidual.

Pereira KA. Carbon fiber in critical size bone defects: an in vivo study in rats [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

ABSTRACT

*Carbon based materials have been used in some areas like chemistry, engineering, materials science, biomedical science, among others. In addition, because they are chemically stables, mechanically strong, economically accessible, and biologically compatible, they have drawn attention as a scaffold material for bone tissue engineering. Thus, the present study had a main objective to evaluate the carbon fiber obtained from textile PAN fiber, in its different forms, as a scaffold's potential synthetic bone. Thirty-four adult rats were used (*Rattus norvegicus*, albinus variation, Wistar), and two critical bone defects were made with 5mm in diameter. Twenty for animals was randomly divided in 4 groups: Bone defect + blood clot; Bone defect + Unactivated Carbon Fiber Felt (FFCNA); Bone defect + Activated Carbon Fiber Felt (FFCA); Bone defect + Carbon Fiber Felt Activated with Silver (FFCAAg), and was observed for different periods of 15 and 60 days for histomorphometrical analysis and micro CT. Ten animals were randomly divided in the same four groups for application of fluorochromatic markers and mineral apposition analysis (in progress). After the observation period of the subgroups, the animals were euthanized by general anesthesia overdose. Then, the calvarias were removed for the analysis. In the evaluation of the two periods (15 and 60 days), the FFCNA was better for the parameters of Bone Neoformation Area, Lamellar Neoformation Area and Intramembranous Neoformation Area. In 60 days, the FFCNA group presented higher bone volume, tissue volume and higher number of trabeculae, showing a promising synthetic material as scaffold for bone regeneration.*

Keywords: Carbon Fiber. Bone regeneration. Biocompatible materials. Tissue engineering.

1 INTRODUÇÃO

O osso é uma estrutura hierarquicamente organizada, que realiza as principais funções fisiológicas e estruturais, desempenhando assim, um importante papel nos seres vertebrados, porém, pode facilmente ser comprometido (Olszta et al., 2007). No entanto, microfraturas podem ser curadas sem que haja a percepção do indivíduo, devido a capacidade de autocura do osso (Peng et al., 2020). Entretanto, em se tratando de defeitos de larga escala, não ocorrerá a reparação completa da fratura (Schemitsch, 2017). Os defeitos ósseos têm etiologia variada. Alguns fatores podem estar associados, tais como: periodontite, conhecida como o principal fator etiológico da perda óssea alveolar, além de trauma, tumores, reabsorção pós extração dentária, osteomielite, e medicamentos que podem causar necrose do osso mandibular (Tüz et al., 2019). Os defeitos de tamanho crítico não têm uma única definição, mas no geral, podem ser considerados defeitos que apesar da estabilização cirúrgica, não reparam espontaneamente e requerem intervenção cirúrgica adicional, como enxertos ósseos (Keating et al., 2005).

O osso autógeno tem sido reconhecido como o padrão-ouro para o enxerto ósseo, fornecendo células osteogênicas, matriz extracelular, e sinais moleculares para a indução e diferenciação óssea (Khouri et al., 1996; Springfield, 1992). As vantagens dos enxertos autógenos são: osteocondução, osteoindução e efeitos osteogênicos que promovem elevado potencial regenerativo (Klijn et al., 2010). Porém, a remoção de enxertos autógenos implica em um segundo sítio cirúrgico doador e aumenta a morbidade do paciente (Chaushu et al., 2009; Sbordone et al., 2009). Um dos enxertos que apresenta o melhor resultado, juntamente com uma boa documentação clínica, é o xenoenxerto Bio-Oss®, que é uma matriz mineral óssea de origem natural, porosa e bovina, que oferece excelente compatibilidade com a matriz óssea humana, e estimula a osteogênese devido à compatibilidade que oferece. E deve-se notar que o osso criado pelo enxerto Bio-Oss® não é reabsorvível (Li et al., 2017; Oliveira et al., 2015). Sendo assim, algumas estratégias alternativas, como os substitutos ósseos, utilizando engenharia tecidual podem ser utilizados para a reconstrução óssea.

Engenharia tecidual é a combinação do uso de materiais e células para substituir o tecido biológico ou melhorá-lo (Yu et al., 2018). Seu principal objetivo por meio da modelação de estruturas biológicas com a finalidade de construir órgãos artificiais, é superar a dificuldade dos transplantes existentes. Para fabricar arcabouços, os pesquisadores utilizam materiais sintéticos ou recursos naturais. Além disso, esses arcabouços não devem exacerbar a resposta imune, e a resposta inflamatória, e devem ser biocompatíveis. Ademais, da mesma maneira, é necessário compatibilidade com o ambiente encontrado no corpo do indivíduo e com seus tipos específicos de células (Gomes et al., 2017; Murdock, Badylak, 2017).

Vários biomateriais para engenharia tecidual óssea foram desenvolvidos, como o colágeno, hidroxiapatita (HA), e fosfatos tricálcicos, no entanto, eles são incapazes de atender a demanda clínica, tendo em vista que possuem rápida taxa de degradação, e propriedades mecânicas insuficientes (Van Der Stok et al., 2011). Materiais a base de carbono tem sido utilizado em várias áreas como química, engenharia, ciência dos materiais, ciências biomédicas, entre outras. Além disso, por serem quimicamente estáveis, mecanicamente fortes, acessíveis economicamente, e biologicamente compatíveis, esses materiais chamaram a atenção como material de arcabouço para a engenharia tecidual óssea (Peng et al., 2020). Para fornecer espaço para adesão e migração celular, além de formação tecidual, os arcabouços normalmente precisam de uma estrutura tridimensional (3D) (Correa-Duarte et al., 2004; Crowder et al., 2013). O grafite e o diamante são os materiais 3D a base de carbono mais conhecidos, porém eles não foram estudados como arcabouços de engenharia tecidual óssea devido a sua falta de poros. O que torna-se um fator importante, devido ao fato de que a estrutura deve conter uma certa quantidade de poros para ocorrer adesão e proliferação celular, e diferenciação osteogênica para funcionar como arcabouço na engenharia tecidual óssea (Roseti et al., 2017).

Comparado a outros tipos comuns de carbono, a fibra de carbono ativada (FCA) possui características especiais. Ela proporciona uma capacidade alta e rápida de adsorção para componentes específicos, como íons, metais ou componentes orgânicos, devido ao fato destes possuírem pequenas dimensões, e pelo fato da FCA ter estruturas de poros bem definidas (Botanni, Tascón, 2005; Marsh, Reinoso, 2000). Devido ao fato da estrutura desses poros e de sua arquitetura serem formados diretamente na superfície por uma grande quantidade de microporos, a FCA tem um

mecanismo de adsorção rápido e menos energético, principalmente para gases (Mochida et al., 2000). A obtenção da FCA é feita a partir de fibra PAN (polímero de poliacrilonitrila) têxtil que passa por processo de carbonização e ativação para a produção do feltro fibra carbono ativado (FFCA) (do Amaral Junior et al., 2017; Marcuzzo et al., 2016).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo principal avaliar a fibra de carbono obtida a partir de fibra PAN têxtil, nas suas diferentes formas de apresentação, com vistas à obtenção de *scaffolds* como potencial enxerto ósseo sintético.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar a fibra de carbono obtida a partir de fibra PAN têxtil, nas suas diferentes formas de apresentação, com vistas à obtenção de *scaffolds* como potencial enxerto ósseo sintético.

2.2 Objetivos específicos

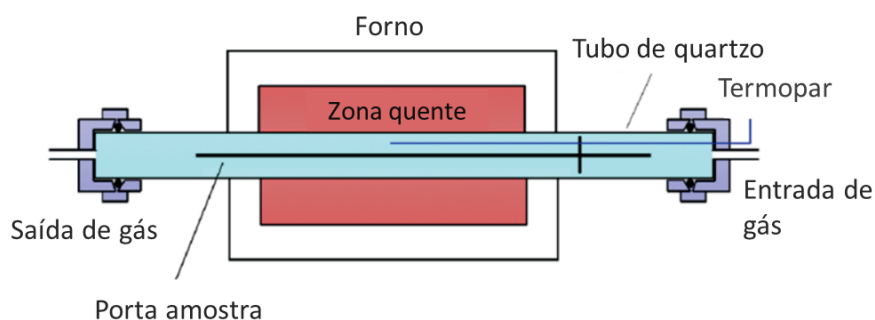
- a) Avaliar a neoformação óssea por meio das análises histomorfométrica e microtomografia computadorizada tridimensional (microCT)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação da fibra de carbono e ativação

As fibras PAN têxtil são utilizadas como precursoras de fibras de carbono, e da mesma maneira, como matéria-prima da indústria têxtil. Elas se apresentam em uma espécie de manta de cor esbranquiçada, que foram recortadas em seu devido formato. As fibras PAN de 5.0 dtex em cabo de 200 mil filamentos foram oxidadas termicamente e utilizadas como matéria prima para a produção de feltro. A matéria prima (feltro de fibra PAN oxidada) foi colocada em um porta amostra, especialmente desenhado, e inserido em um forno tubular elétrico para carbonização (900 °C) e em seguida foi ativado em atmosfera de CO₂ a 1000°C durante 50min (Figura 1).

Figura 1 - Esquematização do forno tubular elétrico onde será inserido a porta amostra contendo a matéria prima que passará pelo processo de carbonização e ativação

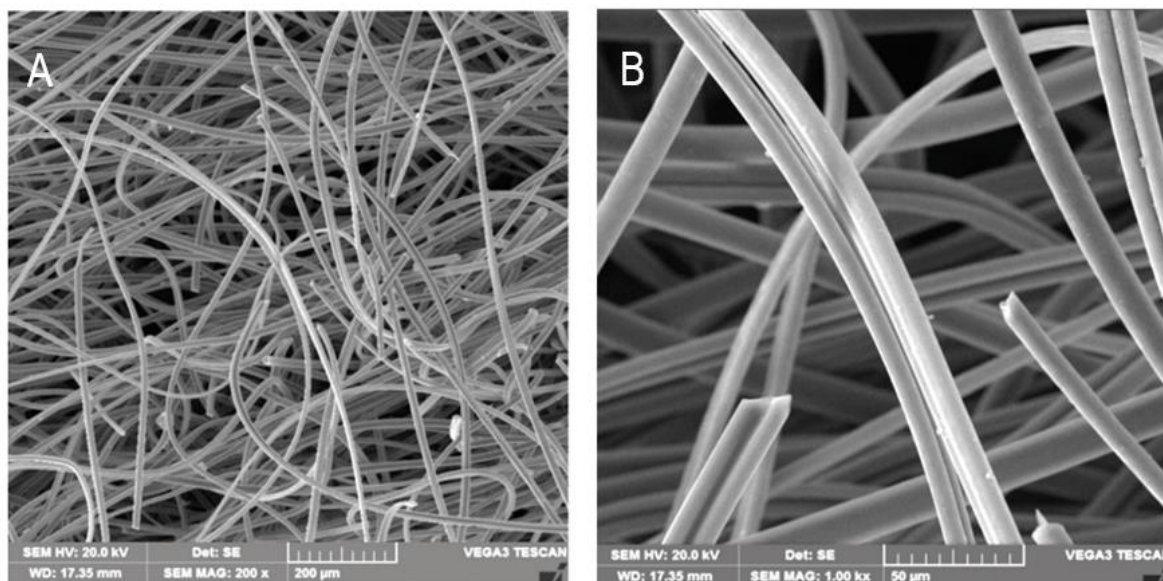


Fonte: Imagem adaptada de Marcuzzo et al., 2016.

À microscopia eletrônica de varredura (MEV) é possível observar que o feltro fibra carbono ativado (FFCA) possui estrutura bidimensional desordenada como é ilustrado na figura 2A, suas fibras têm cerca de 10-15µm de diâmetro (Figura 2B). Na adsorção de gás nitrogênio foi indicado que a superfície das fibras é povoada por microporos, sendo sua grande maioria dimensionados em torno de 1,2 nm, o diâmetro máximo apresentado foi de aproximadamente 3,2 nm. Com relação à sua capacidade

de adsorção pelo iodo e pelo azul de metileno, a FFCA apresentou níveis maiores do que os encontrados na literatura, sugerindo maior eficiência para pequenos compostos moleculares (Marcuzzo et al., 2016).

Figura 2 – Análise microscópica do FFCA

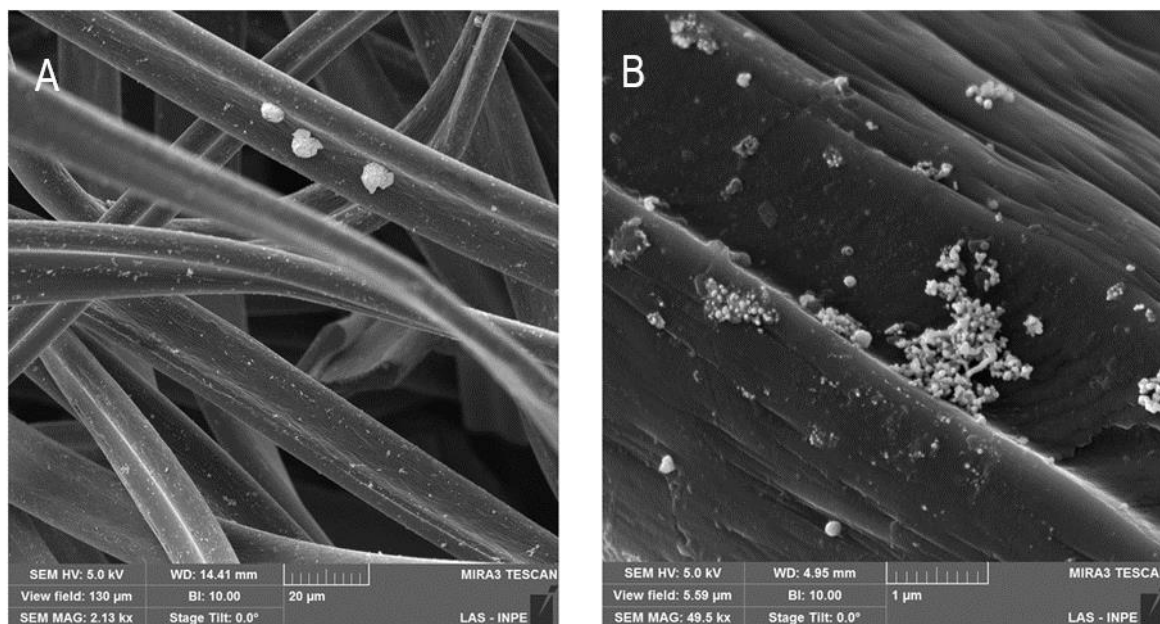


Legenda: a) MEV da estrutura dos filamentos do FFCA; b) detalhe das fibras ativadas do FFCA.

Fonte: Imagens adaptadas de Marcuzzo et al., 2016.

Para a preparação do feltro fibra de carbono ativado com prata (FFCAAg), o FFCA foi imerso em uma solução aquosa de nitrato de prata (2g L^{-1} de AgNO_3) até saturar a adsorção, durante 24 horas. A amostra foi lavada com água deionizada e seca em estufa a vácuo a 50°C , formando um compósito de prata no feltro fibra de carbono ativado (Rodrigues et al., 2019). A adsorção de prata ocorre em toda a superfície das fibras (Figura 3A), porém, as partículas de prata não são uniformemente distribuídas, observa-se que em regiões específicas ocorre formação de aglomerados de prata na superfície do FFCA (Figura 3B), o tamanho estimado do grão de prata formado na superfície da fibra de carbono é de 200 nm de diâmetro (Rodrigues et al., 2019).

Figura 3 – Análise microscópica do FFCAAg



Legenda: a) MEV representando a distribuição das partículas de prata nas fibras do FFCAAg; b) detalhe da superfície das fibras do FFCAAg

Fonte: Imagens não publicadas e cedidas de Marcuzzo et al., 2016

3.2 Modelo experimental *in vivo*

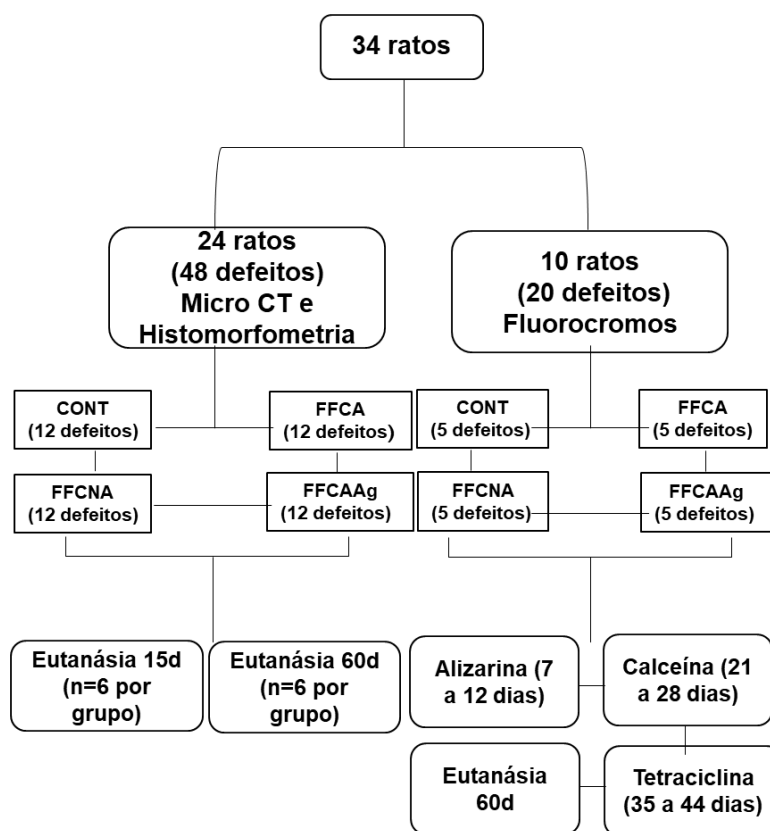
Todos os procedimentos *in vivo* foram realizados de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA. Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética no uso de animais – CEUA e aprovado protocolo nº 15/2020 (Anexo A). A descrição deste trabalho seguiu as diretrizes do Animal research: Reporting in vivo experiments – ARRIVE (Percie du Sert et al., 2020).

Foram utilizados 34 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), com 90 dias de idade, peso aproximado de 300g, fornecidos pelo Biotério Central da Unesp – Campus de Botucatu-SP. Os ratos foram armazenados em gaiolas apropriadas e receberam dieta e água *ad libitum*, e mantidos sobre temperatura de 23°C.

Para as análises de histomorfometria e micro CT 24 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (Figura 4): Defeito ósseo + Coágulo sanguíneo (C),

Defeito ósseo + Feltro Fibra de Carbono Não Ativado (FFCNA), Defeito ósseo + Feltro Fibra Carbono Ativado (FFCA), Defeito ósseo + Feltro Fibra de Carbono Ativado com Prata (FFCAAg). Cada grupo foi subdividido de acordo com os períodos de observação de 15 (Barbirato et al., 2018) e 60 dias (Rasouli Ghahroudi et al., 2014). Foram realizados 2 defeitos por animal, de acordo com o princípio dos 3R's – "*Reduction*" (Russell, Burch, 1959) sendo estes espécimes, utilizados posteriormente para histomorfometria. Sendo assim, foram necessários 6 animais para os grupos C e FFCNA para o período de 15 dias e 6 animais para os mesmos grupos para o período de 60 dias. Da mesma maneira ocorreu para os grupos FFCA e FFCAAg, sendo 6 animais necessários para o período de 15 dias e 6 animais para o período de 60 dias. Para a análise complementar dos marcadores celulares fluorocromáticos (em andamento) foram utilizados 10 animais (Figura 4), totalizando 20 defeitos, alocados aleatoriamente nos grupos mencionados acima, sendo realizados também 2 defeitos por animal. Dessa forma, 5 defeitos por grupo foram analisados.

Figura 4 - Fluxograma dos animais em grupos e subgrupos



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3 Cálculo Amostral

A partir de estudo anterior (Garcia et al., 2014) pôde-se obter a variabilidade dos dados ao redor de 0.5 mm^2 para a área de neoformação óssea. Assim, com a ajuda do programa Minitab (versão 17.1, 2013) e do programa estatístico PIFACE Russ Lenth (Softpedia, Bucharest, Romania) Russel V. Lenth (versão 1.76, 2011) foi realizado um estudo de poder de teste. Verificou-se que com $n = 6$ é possível detectar uma diferença média do efeito “Tratamento” igual a 0.8 mm^2 com poder de 80%.

3.4 Procedimento Cirúrgico

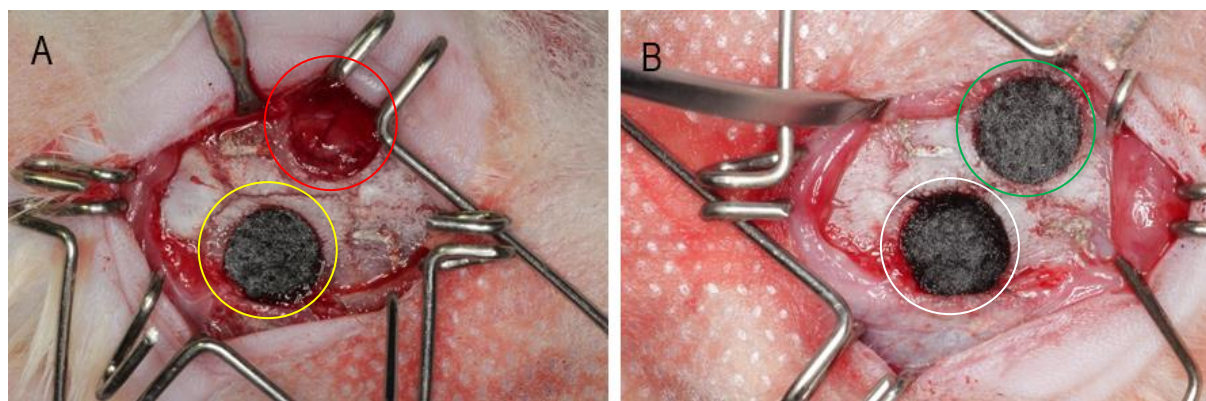
Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados com uma solução de 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan– Ceva Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 100 mg/Kg de cetamina base (Dopalen – Ceva Brasil), anestésico geral, via intramuscular. Os animais foram eutanasiados por sobredose, em dose triplicada, da associação de Cetamina (Dopalen), e Xilazina (Anasedan)

Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região superior da cabeça e assepsia com clorexidina. Em seguida, uma incisão longitudinal na pele, com cerca de 1 cm foi feita ao longo da sutura sagital, expondo a calvária. O periósteo também foi incisado. Os tecidos moles foram afastados como o auxílio de afastadores de tamanho adequado à região de trabalho.

Em cada animal foram realizados dois defeitos ósseos de tamanho crítico com 5 mm de diâmetro (Calixto et al., 2011; Nagata et al., 2013), utilizando-se um motor elétrico que permite velocidade controlada em 800 RPM e uma broca trefina sob constante irrigação com soro fisiológico estéril. Durante o procedimento cirúrgico houve cuidado para evitar-se danos à dura-máter ou ao seio sagital superior. Em seguida, utilizando-se ponta de ultrassom em forma de lâmina (W1-0-CVDentus) em um aparelho piezocirúrgico (DentSurg CVDentus Sao José, SP, Brasil) sob irrigação constante foi confeccionada uma marcação em formato de “L” a 2 mm da borda do defeito no local correspondente ao seu maior diâmetro, a marcação foi, então, preenchida com amálgama. Após essa etapa, o biomaterial foi colocado e as formas de apresentação (grupos) foram distribuídas aleatoriamente (Figuras 5A e 5B). O tecido subcutâneo e a pele foram suturados com fio de seda 4,0 e foi administrada uma medicação analgésica (Tramal – 8mg/kg, via oral, a cada 12 horas por 5 dias). Além do Pentabiótico 0,01 ml a cada 100g de peso vivo, via intramuscular, em dose única imediatamente após a cirurgia.

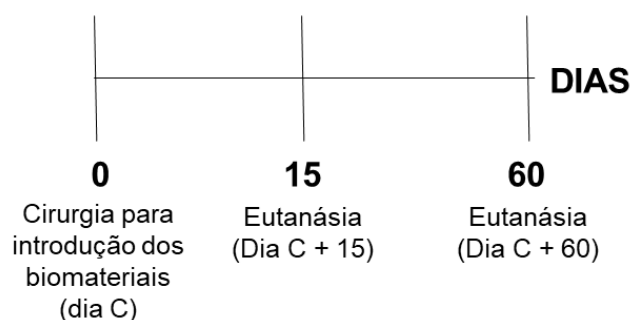
Em 15 e 60 dias os animais de cada grupo foram eutanasiados (Figura 6). Em seguida, após os testes de sensibilidade os animais foram decapitados pela guilhotina. Por fim, a calvária foi removida para análise.

Figura 5 – Imagens após a realização dos defeitos e inserção dos biomateriais



Legenda: a) defeitos realizados na calvária, sendo o círculo vermelho o grupo C, círculo amarelo o FFCNA; b) defeitos realizados na calvária, sendo o círculo verde o FFCA e o branco FFCAAg
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 6 – Linha do tempo dos procedimentos experimentais



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 Avaliação por microtomografia computadorizada tridimensional

Após a eutanásia, os segmentos ósseos foram mantidos em solução de formalina tamponada a 10%, pH 7,0, por 48 h e depois transferidos para uma solução de etanol a 70%. Em seguida, as amostras foram submetidas à microtomografia computadorizada tridimensional (microCT), utilizando-se o microtomógrafo SkyScan

1172 (Kontich, Bélgica) (Figura 7). Os parâmetros utilizados para o escaneamento foram os seguintes: Pixel da câmera: 12.45; Voltagem: 65Kv, Amperagem: 385 μ A; e Filtro: Alumínio 1mm. As imagens geradas foram posteriormente reconstruídas, espacialmente reorientadas e analisadas softwares específicos (NRecon / DataViewer / CTan, Skyscan, Aartselaar, Bélgica).

Foram realizadas as análises: volume ósseo (BV), volume total tecidual (TV), número de trabéculas ($Tb.N$), espaço entre as trabéculas ($Tb. Sp$), volume total tecidual (TV) usado pra calcular a fração de volume ósseo (BV / TV), considerada a região circular de interesse (RCI), com 5 mm de diâmetro com espessura de 30 cortes axiais com 18 μ m de espessura. A partir do *threshold* utilizado nas análises (25-250 tons de cinza) dentro da RCI (Aroni et al., 2019). Essa análise foi realizada às cegas por examinador calibrado e treinado.

Figura 7 - microtomógrafo SkyScan 1172 (Kontich, Bélgica) usado para a realização das microtomografias



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6 Processamento histológico

Para as análises histológica e histomorfométrica, a área operada foi fixada em formol a 10% por um período máximo de 48 horas. Cada espécime foi catalogado. Em seguida teve início o processo de descalcificação em ácido fórmico (Merck KGaA, em Darmstadt, Alemanha) na concentração de 20% (Rasouli Ghahroudi et al., 2014). Após a descalcificação os espécimes foram embebidos em parafina.

Os cortes foram realizados no sentido longitudinal das peças assim que foi observado o aparecimento de amálgama, sinalizando a região de maior diâmetro do defeito; os cortes tiveram espessura de 5 μm e foram realizados de forma semi seriada.

No total, foram realizados cortes com 5 μm de espessura para confecção de 10 lâminas, cada uma contendo pelo menos três cortes seriados, em seguida, esses cortes foram corados por hematoxilina-eosina e examinados em microscopia de luz (Messora et al., 2008; Nunes et al., 2019). Para análise histomorfométrica apenas três das dez lâminas de cada espécime foram selecionadas, e de cada uma dessas três lâminas o melhor corte foi escolhido para a análise, por meio da observação dos cortes que estavam mais nítidos e com a região de interesse do estudo bem delimitada, totalizando três imagens panorâmicas para análise de cada animal. A captura de uma imagens dos cortes foi a partir de uma câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) acoplada ao microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) que as transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2. Um único examinador fez a captura das imagens que receberam códigos e posteriormente foram analisadas por um outro examinador, permitindo o cegamento dos dados.

3.7 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada por um único examinador devidamente calibrado. Seis cortes foram selecionados e nesses cortes uma medida foi tomada; após 24h as medidas foram novamente tomadas, e foram submetidas ao teste de correlação de Pearson por um segundo pesquisador, e o examinador foi considerado calibrado quando atingiu pelo menos $p=0,9$ de concordância entre os exames. A análise foi realizada em aumento de X2.5. As medidas histomorfométricas foram realizadas a partir de fotomicrografias montadas em forma de uma fotografia panorâmica onde foi possível visualizar o defeito em toda a sua extensão. A análise histomorfométrica foi realizada com utilização do programa computacional AxioVision Release 4.7.2. O critério a seguir foi utilizado para padronizar a análise das imagens

digitais (Messora et al., 2008): área total (em mm²) correspondente à área total do defeito cirúrgico original, determinada pela identificação das superfícies externa e interna do osso original da calvária e das bordas direita e esquerda do defeito cirúrgico e, em seguida, conectando-os com linhas desenhadas de acordo com suas respectivas curvaturas.

O osso imaturo recém-formado foi identificado pela borda do defeito adjacente ao osso lamelar original. A área óssea recém-formada (em mm²) foi delineada dentro da área total do defeito. A área total foi considerada 100% da área a ser analisada. As áreas de neoformação óssea dentro dos defeitos foram calculadas como uma porcentagem da área total. O osso imaturo recém-formado foi identificado pelo crescimento ósseo no defeito adjacente ao osso lamelar original. As imagens possuíam códigos para a não identificação do grupo experimental ao qual pertencem, possibilitando uma análise cega dos dados. Foram feitas as seguintes medidas:

- a) Área total do defeito (AT): área total do defeito cirúrgico (mm²).
- b) Área de neoformação total (AN): proporção da área de neoformação óssea dentro dos limites determinados entre as bordas do defeito, em %.
- c) Área de neoformação lamelar (ANL): proporção de neoformação óssea em %, das bordas do lado direito e esquerdo.
- d) Área de neoformação intramembranosa (ANI): proporção de neoformação óssea em % na região central do defeito, separado do osso formado nas bordas.
- e) Distância central entre as bordas de osso neoformado (MCL): medida linear em mm da distância remanescente entre as bordas de osso neoformado.

3.8 Análise Estatística

Para a análise dos dados, foi efetuada a estatística descritiva para se estabelecer medidas de tendência central e de variabilidade. Em seguida, foram analisados pela ANOVA 2 fatores, complementados pelos testes post-hoc, Tukey e Sidák. O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

4 RESULTADOS

Durante todo o estudo, 10 animais foram á óbito, que ocorreram durante o ato cirúrgico, provavelmente em decorrência da medicação anestésica. Após correção da dose, não houve mais óbito de animais. Um total de 5 animais foram pedidos a mais além do número inicial do estudo, devido ao óbito de alguns, e foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Aqueles em que o procedimento cirúrgico foi bem-sucedido apresentaram-se bem, e após retornarem do efeito anestésico, mantiveram-se ativos e com a alimentação dentro da normalidade. Visualmente nenhum sinal de dor foi detectado. Decorridos os períodos de observação e eutanásia, as calvárias permaneceram fixadas por 48h em formol 10%, e em seguida foram transferidas para álcool 70% até a realização da microCT.

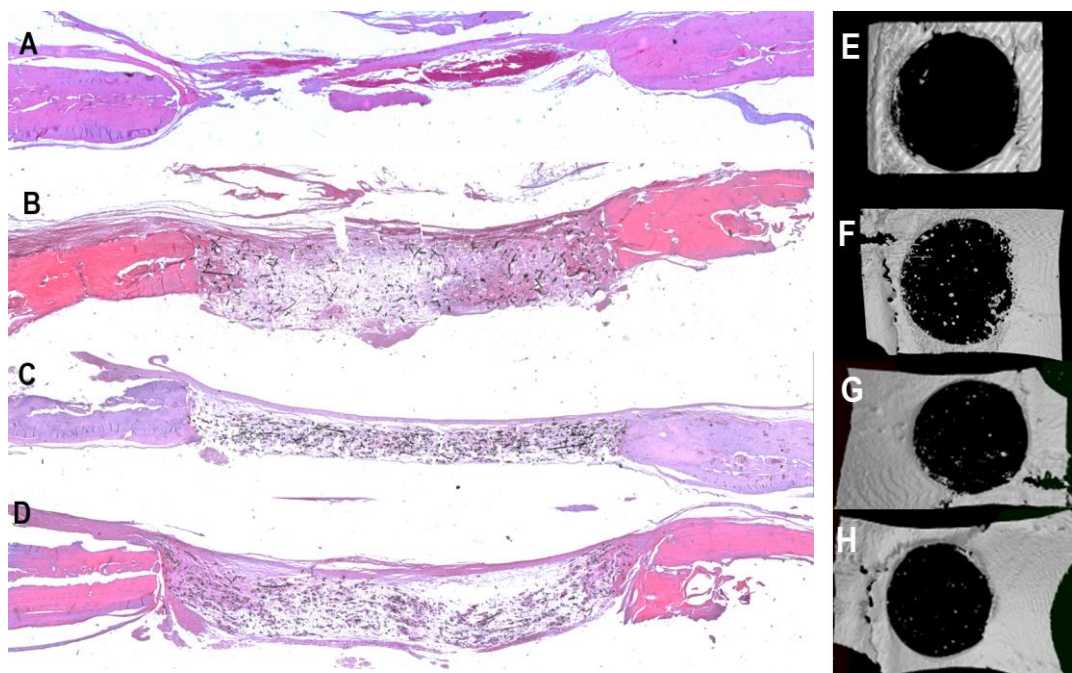
4.1 Análise descritiva histológica e da Micro-CT

Em 15 dias foi possível visualizar no grupo C (Figuras 8A e 8E) o defeito em toda a sua extensão sem neoformação óssea com as bordas do osso nativo com nitidez, e a região do interior do defeito mostrou-se ocupada por coágulo. Nos grupos FFCNA, FFCA e FFCAAg foi possível observar o defeito ósseo preenchido pelo biomaterial (Figuras 8B, 8C, 8D). As imagens obtidas por Micro-CT correspondentes a estes são as figuras - 8F, 8G e 8H. No grupo FFCNA foi possível observar pequenas ilhas de matriz osteóide próximas às bordas do defeito (Figura 8B).

Aos 60 dias, no grupo C, foi possível notar o defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo denso (Figura 9A). A imagem corresponde ao grupo C na análise obtida por micro-CT é a figura 9E. Nos espécimes do grupo FFCA e FFCAAg (Figuras 9C, 9D), foi possível notar novo osso formado próximo às bordas do defeito, ainda com a presença do biomaterial em seu interior. As imagens obtidas por Micro-CT correspondentes a estes são as figuras (9G e 9H). No entanto, não há sinais de faixa de osso neoformado ao longo da extensão do defeito cirúrgico que indique seu fechamento. Já no grupo FFCNA (Figura 9B e 9F) a ponte de osso neoformado é

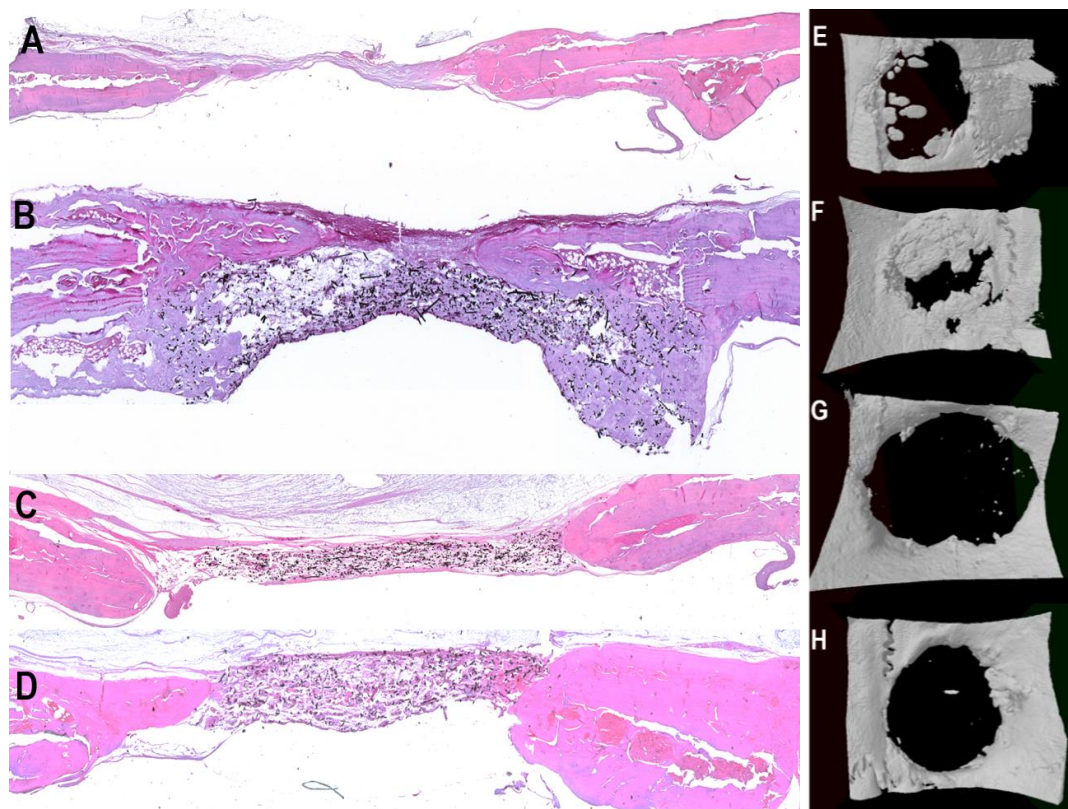
evidente, proporcionando o fechamento do defeito cirúrgico quase em sua totalidade, há a presença de biomaterial e neoformação óssea que se estende para baixo das bordas do defeito, permeando o biomaterial, de forma até mesmo ectópica.

Figura 8 - Espécimes do período de 15 dias; fotomicrografias da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original de X2,5)



Legenda: a) C; b) FFCNA; c) FFCA; e d) FFCAAg. E defeito cirúrgicos reconstruídos por micro-CT sendo e) C; f) FFCNA; g) FFCA; e h) FFCAAg
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9 - Espécimes do período de 60 dias; fotomicrografias da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original de X2,5)

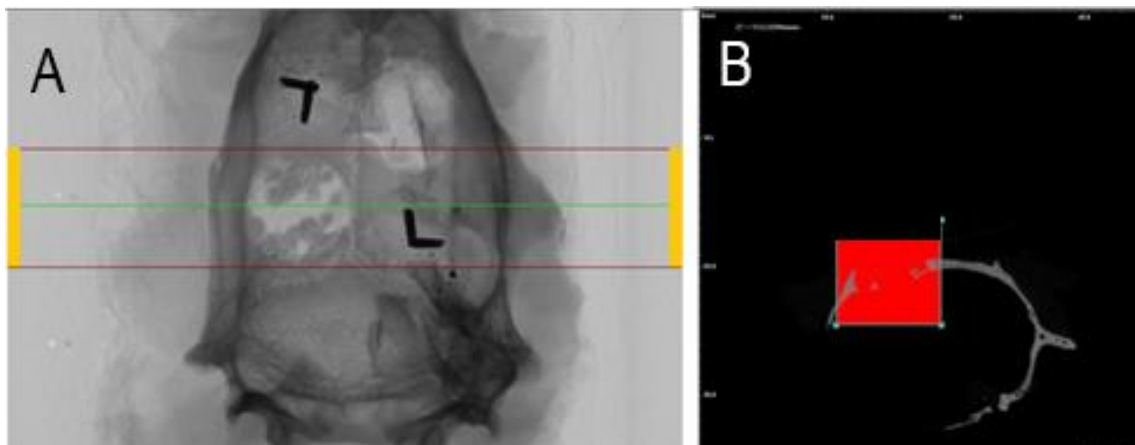


Legenda: a) C; b) FFCNA; c) FFCA; e d) FFCAAg. E defeito cirúrgicos reconstruídos por micro-CT sendo e) C; f) FFCNA; g) FFCA; e h) FFCAAg
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Resultado da MicroCT

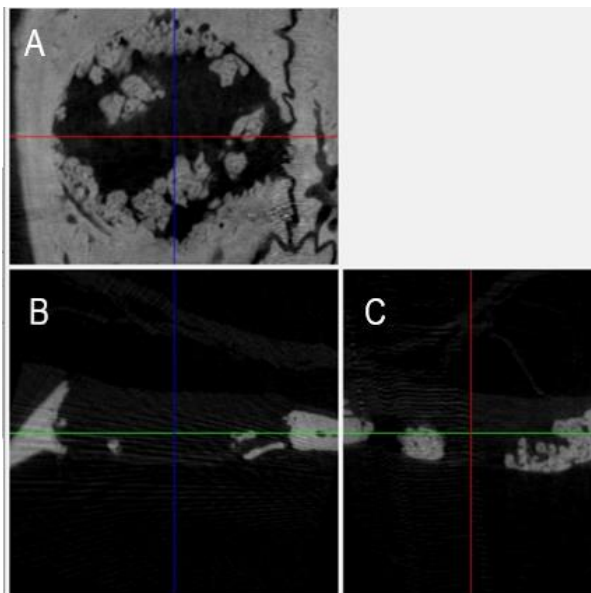
A microCT foi realizada na Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp, utilizando-se o microtomógrafo SkyScan 1172 (Kontich, Bélgica) (Figura 7). Após o recebimento das imagens, estas foram reconstruídas por meio do Software NRecon, onde foi escolhida a área da reconstrução (Figura 10A), e posteriormente delimitada a principal área de interesse da análise (Figura 10B). Após esse processo, foi utilizado o software Dataviewer para delimitar os planos de orientação, e realização dos ajustes das imagens (Figuras 11A, 11B e 11C). Posteriormente, o software CTAn foi utilizado para a seleção das imagens e suas análises para obtenção dos resultados.

Figura 10 – Imagens da metodologia de reconstrução das calvárias após a microCT



Legenda: a) delimitação da área de reconstrução, sendo as linhas vermelhas delimitando toda a área a ser reconstruída e a linha verde centralizada entre as duas linhas vermelhas. b) por meio do quadrado vermelho, sendo feita a delimitação da área de interesse
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 – Delimitação das áreas de interesse na reconstrução das calvárias após análise por microCT



Legenda: a) delimitação da principal área de análise por meio do cruzamento das duas linhas em corte no sentido coronal. b) delimitação da área de interesse no corte sentido transversal. c) delimitação da área de interesse em corte no sentido sagital
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados das análises da MicroCT demonstrados a seguir foram obtidos a partir de cinco espécimes de cada grupo para os períodos de 15 dias e 60 dias.

Os valores absolutos de média e desvio padrão estão apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente:

Tabela 1 – Valores absolutos de média e desvio padrão dos dados obtidos por microCT a partir dos espécimes para o período de 15 dias

Parâmetros	C 15d	FFCNA 15d	FFCA 15d	FFCAA _g 15d
BV (mm³)	0.78 ± 0.38	2.34 ± 0.51	0.81 ± 0.57	1.23 ± 0.92
TV (mm³)	20.46 ± 4.98	31.45 ± 9.51	25.04 ± 5.57	29.35 ± 5.38
BV/TV (%)	3.80 ± 1.62	8.03 ± 3.04	2.98 ± 2.04	4.18 ± 3.25
Tb. N (mm⁻¹)	0.33 ± 0.11	0.49 ± 0.15	0.25 ± 0.15	0.28 ± 0.20
Tb. Sp (mm)	0.62 ± 0.13	0.88 ± 0.27	0.72 ± 0.15	0.83 ± 0.14

Legenda: Dados obtidos por MicroCT para o período de 15 dias, avaliando os seguintes parâmetros: volume total ósseo (BV); volume total tecidual (TV); fração de volume ósseo/volume tecidual (BV/TV); número de trabéculas (Tb. N); e o espaço entre as trabéculas (Tb. Sp).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Valores absolutos de média e desvio padrão dos dados obtidos por microCT a partir dos espécimes para o período de 60 dias

Parâmetros	C 60d	FFCNA 60d	FFCA 60d	FFCAA _g 60d
BV (mm³)	3.75 ± 0.60	10.18 ± 1.92	1.60 ± 1.87	2.31 ± 2.70
TV (mm³)	24.49 ± 5.73	43.43 ± 3.40	24.06 ± 4.83	27.33 ± 6.98
BV/TV (%)	15.95 ± 3.17	23.48 ± 4.16	8.17 ± 10.16	7.73 ± 9.03
Tb. N (mm⁻¹)	0.69 ± 0.12	1.05 ± 0.22	0.36 ± 0.42	0.33 ± 0.38
Tb. Sp (mm)	0.66 ± 0.13	0.91 ± 0.15	0.68 ± 0.12	0.80 ± 0.19

Legenda: Dados obtidos pelas análises do MicroCT para o período de 60 dias, avaliando os seguintes parâmetros: volume total ósseo (BV); volume total tecidual (TV); fração de volume ósseo/volume tecidual (BV/TV); número de trabéculas (Tb. N); e o espaço entre as trabéculas (Tb. Sp).

Fonte: Elaborada pelo autor.

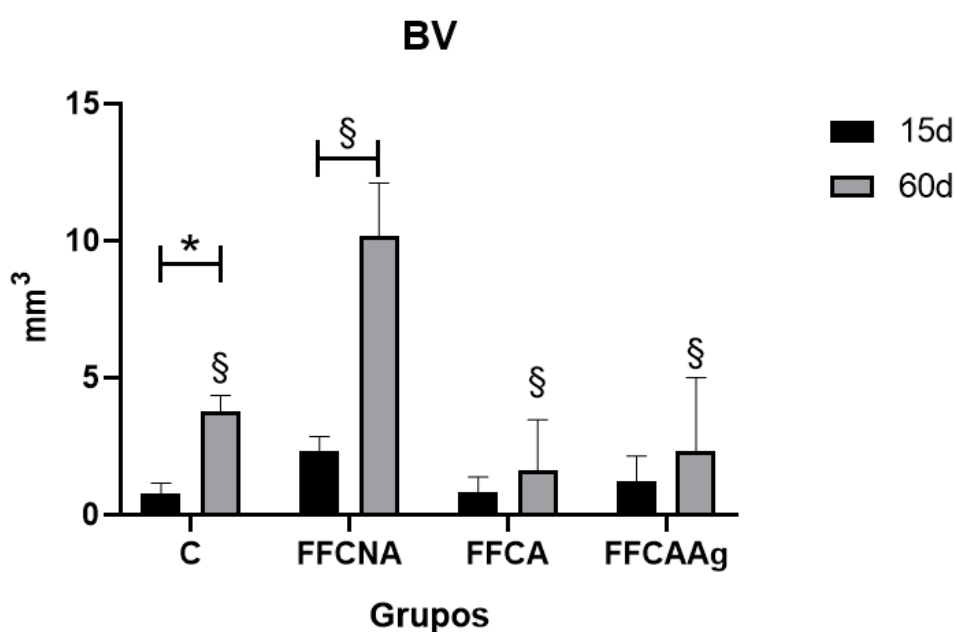
As diferenças estatísticas significativas obtidas pela análise estatística inferencial estão descritas a seguir:

Em 15 dias, para os parâmetros avaliados, todos os grupos apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si.

Em 60 dias, BV (C vs. FFCNA, $p < 0,0001$, FFCNA vs. FFCA, $p < 0,0001$, FFCNA vs. FFCAA_g, $p < 0,0001$), TV (C vs. FFCNA, $p < 0,0001$, FFCNA vs. FFCA, $p < 0,0001$, FFCNA vs. FFCAA_g, $p < 0,0001$) o grupo FFCNA apresentou diferença estatística significativa em relação aos outros grupos (Figuras 12 e 13). Para os parâmetros

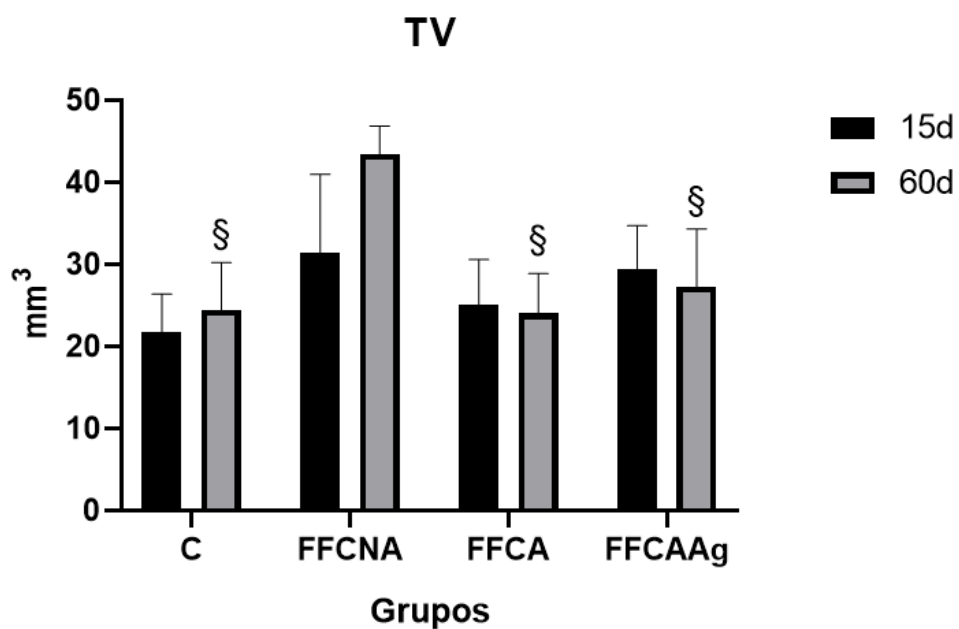
BV/TV e Tb. N, o grupo FFCNA apresentou diferença estatística significativa em relação aos grupos FFCA e FFCAA_g ($p < 0,0001$), mas não em relação ao grupo C (Figuras 14 e 15). Já para o parâmetro Tb. Sp, os grupos não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

Figura 12 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando Volume ósseo (BV)



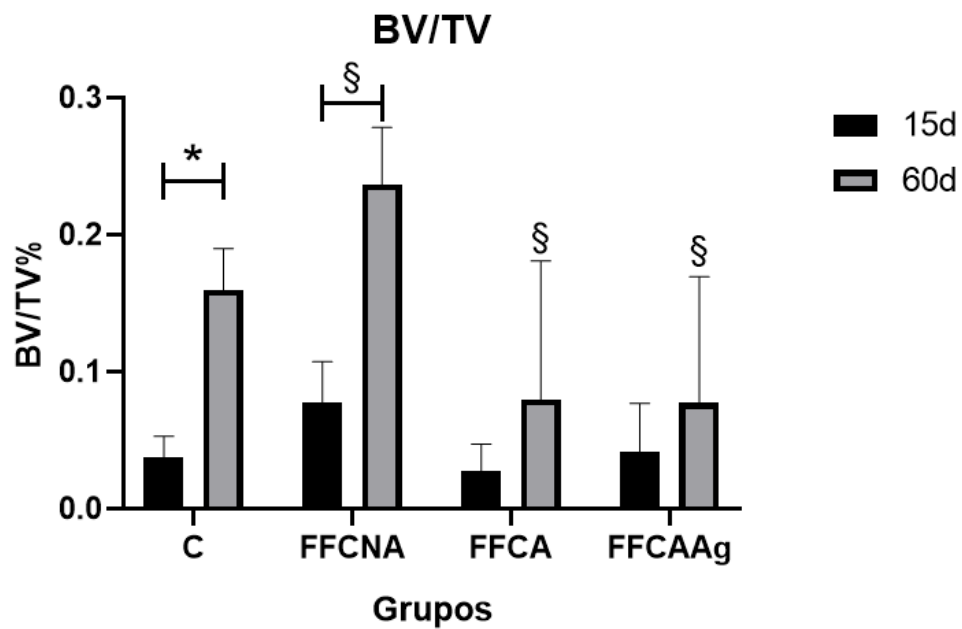
Legenda: Diferença inter e intragrupos para C (*) e FFCNA (§).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando volume total tecidual (TV)



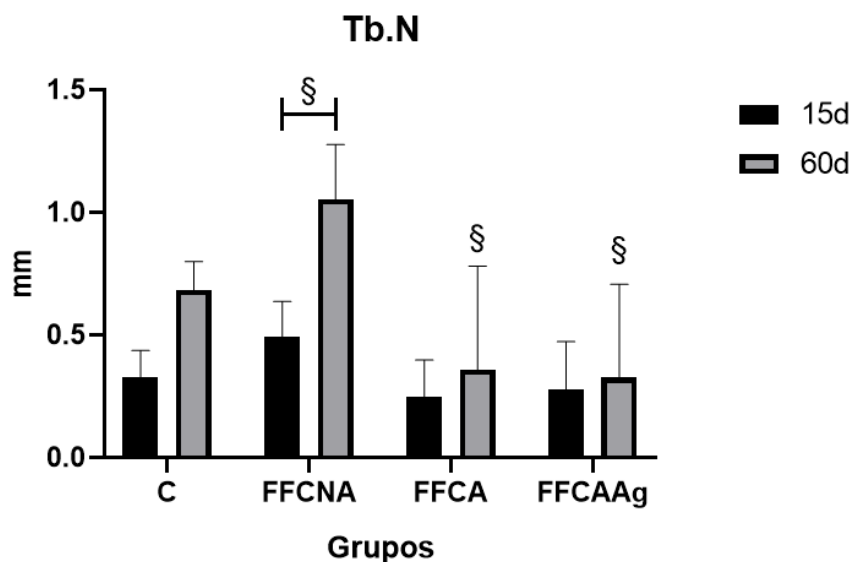
Legenda: Diferença intergrupos para FFCNA (§).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando volume ósseo/fração de volume ósseo (BV/TV)



Legenda: Diferença inter e intragrupos para C (*) e FFCNA (§).
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 15 - Dados obtidos por MicroCT para os períodos de 15 e 60 dias, avaliando número de trabéculas (*Tb.N*)



Legenda: Diferença intra e intergrupos para FFCNA (§).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Análise Histomorfométrica

Os valores absolutos de média e desvio padrão estão apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente:

Tabela 3 – Valores absolutos de média e desvio padrão dos dados obtidos por análise histomorfométrica a partir dos espécimes para o período de 15 dias

Parâmetros	C 15d	FFCNA 15d	FFCA 15d	FFCAA 15d
AT (mm²)	0.72 ± 0.10	1.33 ± 0.50	0.76 ± 0.22	1.47 ± 0.27
AN (%)	4.43 ± 3.34	36.38 ± 8.73	7.35 ± 7.69	7.99 ± 4.57
ANL (%)	4.43 ± 3.34	35.72 ± 9.33	7.35 ± 7.69	7.99 ± 4.57
ANI (%)	0.00 ± 0.00	0.57 ± 1.28	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
MCL (mm)	2.02 ± 0.23	1.89 ± 0.53	2.08 ± 0.46	2.54 ± 0.08

Legenda: Dados obtidos pela análise histomorfométrica para o período de 15 dias, avaliando Área Total (AT); Área de Neoformação (AN); Área de Neoformação Lamelar (ANL); Área de Neoformação Intramembranosa (ANI); Medida Central (MC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Valores numéricos absolutos de média e desvio padrão dos dados obtidos por análise histomorfométrica a partir dos espécimes para o período de 60 dias

Parâmetros	C 60d	FFCNA 60d	FFCA 60d	FFCAAg 60d
AT (mm²)	0.93 ± 0.46	2.51 ± 0.24	2.04 ± 0.12	0.80 ± 0.24
AN (%)	27.11 ± 26.64	42.00 ± 9.06	27.04 ± 10.64	32.35 ± 7.52
ANL (%)	26.98 ± 26.67	38.59 ± 10.39	26.33 ± 11.08	32.35 ± 7.52
ANI (%)	0.12 ± 0.13	3.40 ± 4.66	0.71 ± 1.59	0.00 ± 0.00
MCL (mm)	0.95 ± 0.30	1.64 ± 0.66	2.11 ± 0.68	1.38 ± 0.17

Legenda: Dados obtidos pela análise histomorfométrica para o período de 60 dias, avaliando Área Total (AT); Área de Neoformação (AN); Área de Neoformação Lamelar (ANL); Área de Neoformação Intramembranosa (ANI); Medida Central (MC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em 15 dias, no parâmetro da Área Total do Defeito (AT) o grupo FFCNA demonstrou diferença estatística significativa para o grupo C e FFCA (FFCNA vs. C, $p=0,0139$; FFCNA vs FFCA, $p=0,0247$), porém foi estatisticamente semelhante para o grupo FFCAAg. O grupo FFCAAg demonstrou diferença estatística significativa para o grupo C e FFCA (FFCAAg vs C, $p=0,0018$; FFCAAg vs FFCA, $p=0,0035$), porém foi estatisticamente semelhante ao grupo FFCNA (Figura 16).

No parâmetro Área de Neoformação óssea (AN), o grupo FFCNA demonstrou diferença estatística significativa para todos os grupos (FFCNA vs C, $p=0,0009$; FFCNA vs FFCA, $p=0,0028$; FFCNA vs FFCAAg, $p=0,0035$). Os outros grupos (C, FFCA, FFCAAg) foram estatisticamente semelhantes entre si (Figura 17).

No parâmetro Área de Neoformação Lamelar (ANL), o grupo FFCNA demonstrou diferença estatística significativa para todos os grupos (FFCNA vs C, $p=0,0015$; FFCNA vs FFCA, $p=0,0043$; FFCNA vs FFCAAg, $p=0,0054$). Os outros grupos (C, FFCA, FFCAAg) foram estatisticamente semelhantes entre si (Figura 18).

No parâmetro Área de Neoformação Intramembranosa (ANI), os grupos foram estatisticamente semelhantes entre si, com valores absolutos maiores para o grupo FFCNA (Figura 19).

No parâmetro Medida Central Linear (MCL), os grupos foram estatisticamente semelhantes entre si, com valores absolutos maiores para o grupo FFCAg (Tabela 3 e Figura 21).

Em 60 dias, no parâmetro da Área Total do Defeito (AT) o grupo FFCNA demonstrou diferença estatística significativa para o grupo C e FFCAAg (FFCNA vs. C, $p < 0,0001$; FFCNA vs FFCAAg, $p < 0,0001$), porém foi estatisticamente semelhante para o grupo FFCA (Figura 16). O grupo FFCA demonstrou diferença estatística significativa para o grupo C e FFCAAg (FFCA vs C, $p < 0,0001,18$; FFCA vs FFCAAg, $p < 0,0001$), porém foi estatisticamente semelhante ao grupo FFCNA.

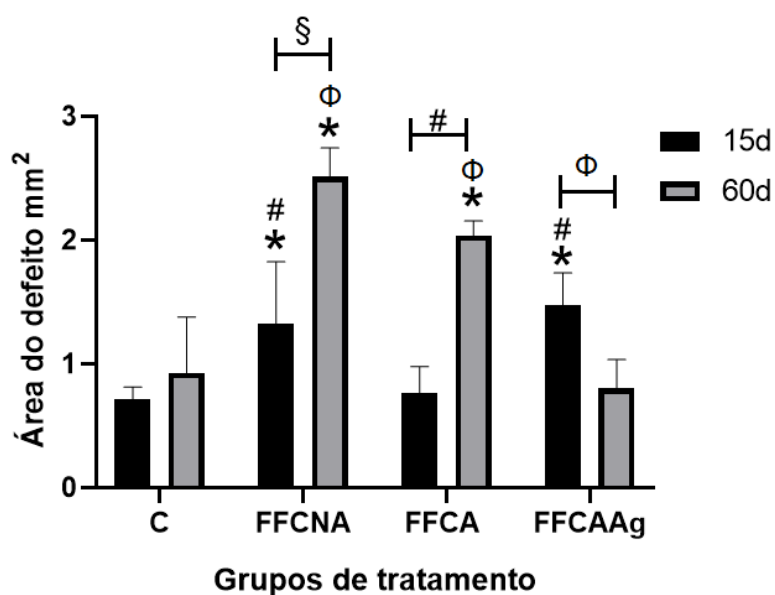
. No parâmetro Área de Neoformação óssea (AN), os grupos foram estatisticamente semelhantes entre si, com valores absolutos maiores para o grupo FFCNA (Figura 17).

No parâmetro Área de Neoformação Lamelar (ANL), os grupos foram estatisticamente semelhantes entre si, com valores absolutos maiores para o grupo FFCNA. (Figura 18).

No parâmetro Área de Neoformação Intramembranosa (ANI), o grupo FFCNA demonstrou diferença estatística significativa para o grupo C e FFCAAg (FFCNA vs. C, $p = 0,0335$; FFCNA vs FFCAAg, $p = 0,0261$), porém foi estatisticamente semelhante para o grupo FFCA (Figura 19). Os outros grupos (C, FFCA E FFCAAg) foram estatisticamente semelhantes entre si.

No parâmetro Medida Central Linear (MCL), o grupo FFCA apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo C (FFCA vs C, $p = 0,0014$), porém foi estatisticamente semelhante para os grupos FFCNA e FFCAAg (Figura 20).

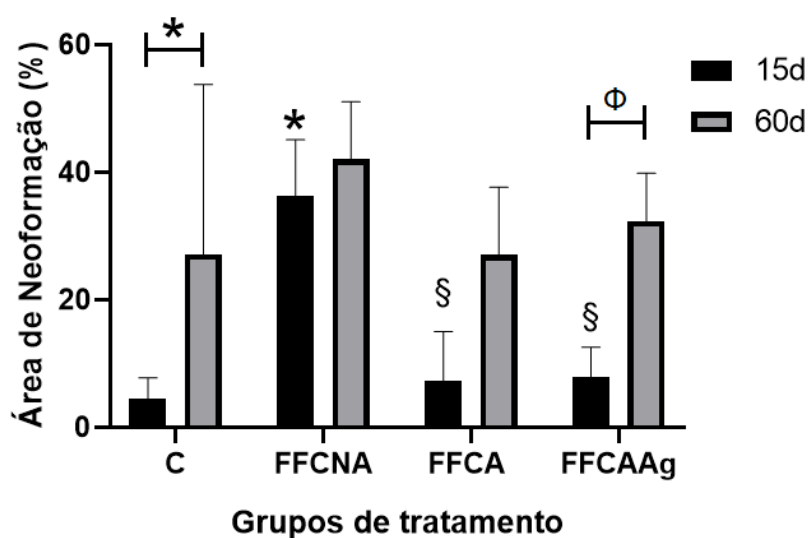
Figura 16 – Média e desvio padrão da Área total do defeito (AT) em mm²



Legenda: Diferença inter e intragrupos para C (*), FFCNA (§), FFCA (#) e FFCAA (Φ)

Fonte: Elaborada pelo autor.

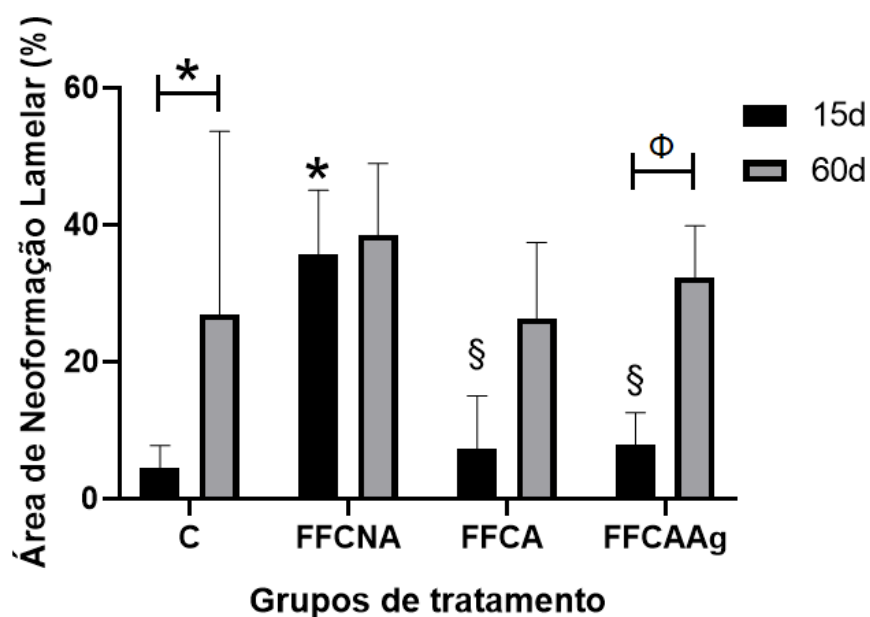
Figura 17 - Média e desvio padrão da Área de Neoformação óssea (AN) em %



Legenda: Diferença inter e intragrupos para C (*), FFCNA (§), FFCA (#) e FFCAA (Φ)

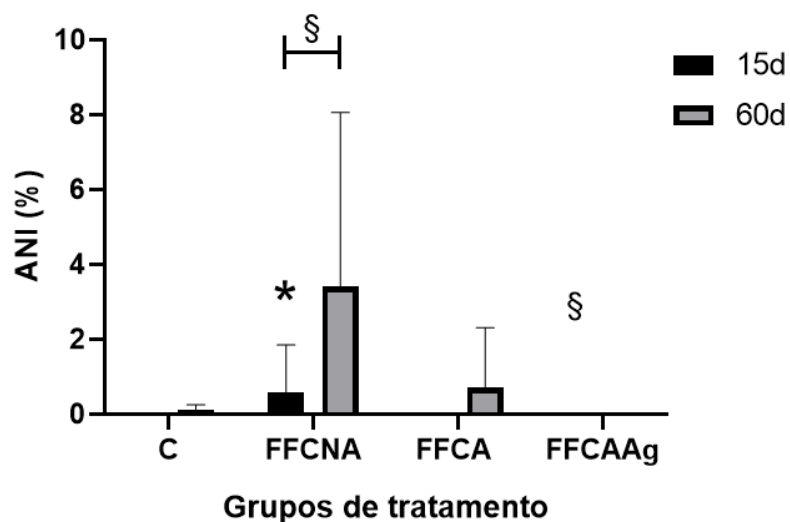
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 - Média e desvio padrão da Área de Neoformação Lamelar (ANL) em %



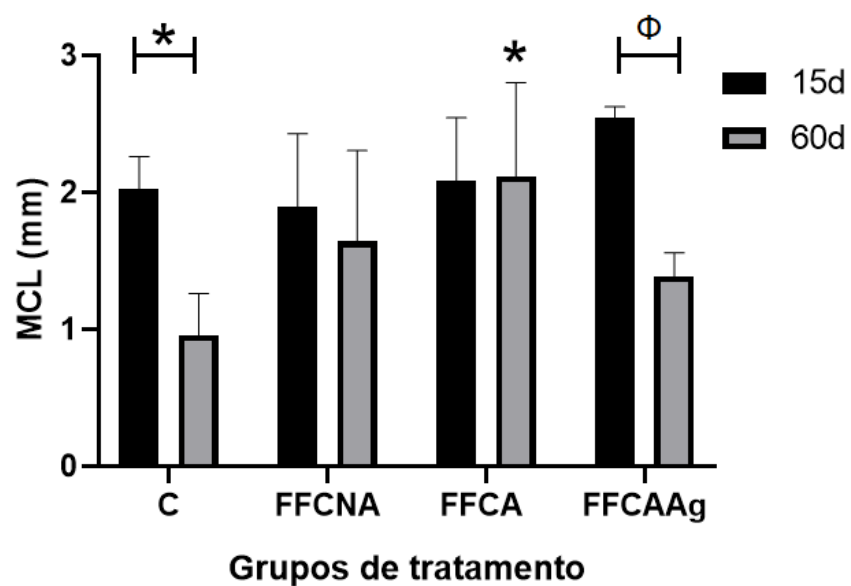
Legenda: Diferença inter e intragrupos para C (*), FFCNA (§), FFCA (#) e FFCAA (Φ)
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 - Média e desvio padrão da Área de Neoformação Intramembranosa (ANI) em %



Legenda: Diferença inter e intragrupos para C (*), FFCNA (§), FFCA (#) e FFCAA (Φ)
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 - Média e desvio padrão da Medida Central Linear (MCL) em mm



Legenda: Diferença inter e intragrupos para C (*), FFCNA (§), FFCA (#) e FFCAA (Φ)
 Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a fibra de carbono obtida a partir de fibra PAN têxtil, nas suas diferentes formas de apresentação, com vistas à obtenção de *scaffolds* como potencial enxerto ósseo sintético.

Na análise por microCT, os maiores valores de volume ósseo (BV) e volume tecidual (TV) foram observados no grupo FFCNA, tendo apresentado diferença estatística significativa quando comparados aos outros grupos no período de 60 dias. Esses dados corroboram com os apresentados por Ryu et al. (2014), já que em seu estudo a Fibra de Carbono a base de fibra PAN apresentou regeneração óssea, e preencheu mais de 50% do defeito cirúrgico. Uma possível explicação para a maior osteogênese para o grupo FFCNA seria sua adsorção aprimorada de proteínas da matriz extra-celular, que pode levar à estimulação da via de sinalização da osteogênese das células (Ryu et al., 2014). Além disso, a FFCNA tem boa adsorção de fibronectina, o que é relevante para a osteogênese, uma vez que essa substância tem um papel crucial na interação das células mesenquimais e da fibra (Namgung et al., 2011).

Na mesma análise, para o parâmetro BV/TV e Tb. N o grupo FFCNA apresentou diferença estatística para os grupos FFCA e FFCAAg para o período de 60 dias. O que é corroborado pela reconstrução das imagens 3D, onde em 60 dias há a presença de neoformação óssea, principalmente no grupo FFCNA, diferenciando-se das demais. Os dados do presente estudo são justificáveis devido a apresentação diferente nas formas das fibras, já que depois do processo de ativação FFCA e FFCAAg possuem porosidade. Ryu et al. (2014) citaram que para uma efetiva neoformação óssea o tamanho de poros necessário seriam de 75-100 μ , sendo que a FFCA usada neste estudo apresentou poros do tamanho de 0,0032 μ , fato que pode ter influenciado na diferenciação das células mesenquimais, uma vez que se sabe que a estrutura deve conter uma certa quantidade de poros para ocorrer adesão e proliferação celular, e diferenciação osteogênica para funcionar como arcabouço na engenharia tecidual óssea (Roseti et al., 2017).

Por meio da análise histomorfométrica, foi possível observar maior neoformação óssea (AN) no grupo de FFCNA 15 dias. Uma hipótese a ser considerada seria sobre os genes da osteogênese, uma vez que Ryu et al. (2014) constataram que fibras a base de Pan permitem a expressão de genes específicos para osteogênese, como colágeno tipo I (principal proteína óssea), osteocalcina e osteopontina, marcadores específicos de osteoblastos para a mineralização da matriz óssea, esses dados indicam que os eventos citados podem estar envolvidos nos períodos iniciais da reparação óssea quando associado à FFCNA. Outra condição observada, ainda no período de 15 dias, diz a respeito do grupo FFCAAg, onde foi observado início de neoformação óssea próxima às bordas do defeito, no entanto, de forma extremamente incipiente. Uma hipótese a ser considerada seria da concentração da prata incorporada ao biomaterial, no presente estudo a incorporação por prata se deu $430000 \mu\text{g/ml}$ e, de acordo com a literatura, sabe-se que em grandes quantidades, na ordem de 10^0 a $10^2 \mu\text{g/ml}$, a prata pode ser tóxica ao organismo (Vazquez-Muñoz et al., 2017), diante disso, são necessários mais estudos para investigar qual a concentração de prata seria a ideal para ser aplicada à Fibra de Carbono com vistas à aplicação na engenharia tecidual, já que as suas propriedades antimicrobianas são evidentes na literatura (Durán et al., 2018).

De modo semelhante ao parâmetro AN, na área de neoformação óssea lamelar (ANL), no período de 15 dias, foi possível observar maior neoformação em favor do grupo FFCNA. O que pode ser explicado devido ao fato do padrão de neoformação óssea, como observado por Bosco et al. (2016) e Fan et al. (2018), ocorrer de maneira centrípeta, devido ao aporte sanguíneo, e do reparo ósseo depender principalmente da disponibilidade de células precursoras osteogênicas no osso ou tecido mole adjacente e da capacidade dessas células de invadirem o defeito e se diferenciarem em osteoblastos (Rasouli et al., 2014). Foram constatados também altos níveis de atividade de fosfatase alcalina, expressão de Runx2 e conteúdo de cálcio na FFCNA (Ryu et al., 2014), características comuns da formação óssea celular (Ducy et al., 1997; Gahawar et al., 2013).

Para o parâmetro ANI, foi possível observar maior neoformação em favor do grupo FFCNA. Sabe-se que o osso é produzido sob uma certa carga mecânica e uma polarização elétrica (Fukada, Yasuda, 1958). Além disso, estudos em animais demonstraram que o reparo ósseo pode ser acelerado com campos eletromagnéticos

(Cané et al., 1996; Inoue et al., 2002), o que demonstra a influência desse fator na regeneração óssea. Então, uma hipótese a ser considerada seria sobre a atividade elétrica de cada material; sabe-se que a propriedade elétrica da FFCNA é totalmente dependente da sua porosidade, e como citado anteriormente, o tamanho de seus poros foi de $0,0032\mu$, fator que pode ter influenciado em suas propriedades elétricas, e consequentemente, na neoformação óssea.

As medidas lineares referentes às distâncias remanescentes entre as bordas de osso neoformado nos dão outro parâmetro clínico importante, que é o de fechamento do defeito ósseo. Apesar de não ter ocorrido diferenças estatísticas significativas entre os grupos de materiais estudados, por meio das análises e das imagens histomorfométricas e da microCT foi possível constatar o fechamento quase completo do defeito cirúrgico tratado pelo grupo FFCNA em 60 dias. Este é um dado muito importante e bastante promissor, pois ficou evidente a superioridade do desempenho do grupo tratado com a FFCNA tanto no período de 15 dias como em 60 dias. Pensando em estudos futuros e vislumbrando uma possível transposição clínica, este biomaterial deve ser estudado com mais profundidade, por meio de outras análises que possibilitem compreensão de eventos celulares, moleculares e suas interações com as propriedades físicas, químicas e elétricas do referido biomaterial.

Adicionalmente, foi possível observar diferença estatística em favor do grupo FFCNA quando comparados aos outros grupos no período de 60 dias na análise por microCT.

Observou-se diferença entre os resultados encontrados nas análises por MicroCT e histomorfométrica, tendo em vista que a análise por microCT constatou diferença estatística na neoformação óssea em favor do grupo FFCNA para o período de 60 dias e a análise histomorfométrica não. Além do fato da análise histomorfométrica ter constatado diferença estatística para neoformação óssea em favor do grupo FFCNA para o período de 15 dias, e a micro-CT não. Uma hipótese a ser considerada são as diferenças entre ambas as análises. Enquanto a análise por microCT é realizada em 3 planos, permitindo a reconstrução do defeito cirúrgico em estruturas 3D, a histomorfométrica é realizada em apenas um plano, em cortes semi seriados, não sendo possível realizar a análise do defeito em toda a sua extensão, ou melhor, em todas as suas dimensões, fato que pode causar divergências entre os resultados encontrados.

Outro fator importante é que em alguns espécimes foi possível observar um processo de neoformação óssea de certo modo ectópico nos grupos tratados com FFCNA. Quanto a este achado, mais estudos são necessários para avaliar a confirmação dessa hipótese. Em caso de confirmação, isso acarretará a necessidade de encontrar meios para se controlar esse processo, para que a utilização do biomaterial possa proporcionar neoformação óssea e preservação do volume de forma organizada.

Uma das limitações encontradas foi a dificuldade de comparação dos resultados do presente estudo com dados da literatura, devido às diferentes formas de apresentação das fibras, principalmente devido à escassez de dados quanto à FFCNA na literatura. Portanto, mais estudo in vivo, com possíveis períodos de observações diferentes, com análises em nível celular e molecular são necessários para gerar dados mais aprofundados das reais características e capacidades do biomaterial.

De forma complementar, se por um lado foi considerada a escassez de dados biológicos acerca da FFCNA, por outro lado, este é um tópico de extrema relevância deste estudo que lhe assegura o caráter inédito.

Outro fato importante de destacar é que a inclusão da prata e a ativação da fibra não interferem de forma significativa para melhores resultados, uma vez que o grupo FFCNA apresentou os melhores resultados, o que é relevante para fins de custos do material, tendo em vista que a ativação e a inclusão da prata aumentam consideravelmente os custos do estudo.

6 CONCLUSÃO

Na avaliação dos dois períodos (15 e 60 dias), o FFCNA mostrou-se melhor para os parâmetros de Área de Neoformação óssea, Área de Neoformação Lamelar e Área de Neoformação Intramembranosa.

Em 60 dias, o grupo FFCNA apresentou maior volume ósseo, volume tecidual e maior número de trabéculas, mostrando-se um material sintético promissor como *scaffold* para regeneração óssea.

REFERÊNCIAS*

- Amaral Junior MA, Matsushima JT, Rezende MC, Gonçalves ES, Marcuzzo JS, Baldan MR. Production and characterization of activated carbon fiber from textile PAN Fiber. *J Aerosp Tec Manage*. 2017;9(4):423–30. doi: <https://doi.org/10.5028/jatm.v9i4.83>.
- Aroni MAT, Costa Neto PF, Oliveira GJPL, Marcantonio RAC, Marcantonio Junior E. Bone repair induced by different bone graft substitutes in critical-sized defects in rat calvaria. *Rev Odontol UNESP*. 2019;48:1–11. doi: <https://doi.org/10.1590/1807-2577.04119>.
- Barbirato DS, Fogacci MF, Gusman H, Takiya C, Carvalho DP, Samsone C. Hydroxyapatite calvaria graft repair in experimental diabetes mellitus in rats. *J Craniomaxillofac Trauma*. 2018; 46 (9): 1576–85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.04.016>
- Botanni EJ, Tascón JMD. *Adsorption by Carbons*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science; 2005. ISBN 9780080444642
- Bosco AF, Faleiros PL, Carmona LR, Garcia VG, Theodoro LH, de Araujo NJ, et al. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Oct; 163:303-10. doi: [10.1016/j.jphotobiol.2016.08.040](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.040)
- Calixto JC, Lima CE, Frederico L, Lima RP, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Apr;39(3):215-20. doi: [10.1016/j.jcms.2010.03.009](https://doi.org/10.1016/j.jcms.2010.03.009). Epub 2010 Apr 24. PMID: 20456964.
- Canè V, Zaffe D, Cavani F, Botti P, Soana S. PEMFs modulate the enzymatic activity during the bone repair process. *Bone* 1996;19(3):133. doi: [10.1016/S8756-3282\(96\)90742-5](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(96)90742-5).
- Chaushu G, Mardinger O, Calderon S, Moses O, Nissan J. The use of cancellous block allograft for sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the posterior atrophic maxilla. *J Periodontol*. 2009 Mar;80(3):422-8. doi: [10.1902/jop.2009.080451](https://doi.org/10.1902/jop.2009.080451). PMID: 19254126

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Correa-Duarte MA, Wagner N, Rojas-Chapana J, Morsczech C, Thie M, Giersig M. Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks as scaffolds for cell seeding and growth. *Nano Letters*. 2004;4(11):2233–6. doi:<https://doi.org/10.1021/nl048574f>

Crowder SW, Prasai D, Rath R, Balikov DA, Bae H, Bolotin KI, et al. Three-dimensional graphene foams promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanoscale*. 2013 May 21;5(10):4171-6. doi: 10.1039/c3nr00803g. PMID: 23592029; PMCID: PMC3672224.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-54. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80257-3. PMID: 9182762

Fan YP, Lu JF, Xu AT, He FM. Physio chemical characterization and biological effect of anorganic bovine bone matrix and organic-containing bovine bone matrix in comparison with Bio-Oss in rabbits. *J Biomater Appl*. 2018 Oct;33(4):566-75. doi: 10.1177/0885328218804926

Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Japan* 1957;12:1158-62

Garcia VG, Sahyon AS, Longo M, Fernandes LA, Gualberto Junior EC, Novaes VC, et al. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014 Oct;42(7):1196-202. doi: 10.1016/j.jcms.2014.02.008. Epub 2014 Feb 25. PMID: 24657115.

Gaharwar AK, Mihaila SM, Swami A, Patel A, Sant S, Reis RL, et al. Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Adv Mater*. 2013 Jun 25; 25(24):3329-36. doi: 10.1002/adma.201300584. Epub 2013 May 13. PMID: 23670944.

Gomes ME, Rodrigues MT, Domingues RMA, Reis RL. Tissue engineering and regenerative medicine: new trends and directions-a year in review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017 Jun;23(3):211-24. doi: 10.1089/ten.TEB.2017.0081. PMID: 28457175.

Guskuma MH, Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Rangel-Garcia Junior I, Okamoto R, Okamoto T, et al. Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2010 Jul-Aug;18(4):346-53. doi: 10.1590/s1678-77572010000400005. PMID: 20835568; PMCID: PMC5349066.

Inoue N, Ohnishi I, Chen D, Deitz LW, Schwardt JD, Chao EY. Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. *J Orthop Res*. 2002 Sep;20(5):1106-14. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00031-1. PMID: 12382979.

Keating JF, Simpson AH, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br.* 2005 Feb;87(2):142-50. doi: 10.1302/0301-620x.87b2.15874. PMID: 15736731.

Khoury RK, Brown DM, Koudsi B, Deune EG, Gilula LA, Cooley BC, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plast Reconstr Surg.* 1996 Jul;98(1):103-9. doi: 10.1097/00006534-199607000-00017. PMID: 8657761.

Klijn RJ, Meijer GJ, Bronkhorst EM, Jansen JA. A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Oct;16(5):493-507. doi: 10.1089/ten.TEB.2010.0035. PMID: 20334505.

Li Y, Yang L, Zheng Z, Li Z, Deng T, Ren W, et al. Bio-Oss® modified by calcitonin gene-related peptide promotes osteogenesis in vitro. *Exp Ther Med.* 2017 Nov;14(5):4001-8. doi: 10.3892/etm.2017.5048. Epub 2017 Aug 28. PMID: 29067095; PMCID: PMC5647716.

Marcuzzo JS, Cuña A, Tancredi N, Mendez E, Bernardi HH. Microporus activated carbon fiber felt from Brazilian textile PAN fiber: preparation, characterization and application as super capacitor electrode. *Rev Bras Apl Vác.* 2016; 35(2):58–63. <https://doi.org/10.17563/rbav.v35i2.10>

Marsh H, Reinoso FR. *Sciences of carbon materials* 1st edition. Amsterdam: Elsevier Science; 2006. ISBN: 9780080444635

Messora MR, Nagata MJ, Mariano RC, Dornelles RC, Bomfim SR, Fucini SE, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.* 2008 Apr;43(2):217-23. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01017.x. PMID: 18302625.

Mochida I, Korai Y, Shirahama M, Kawano S, Hada T, Seo Y, et al. Removal of SO_x and NO_x over activated carbon fibers. *Carbon.* 2000;38(2):227–39.

Murdock MH, Badylak SF. Biomaterials-based In situ tissue engineering. *Curr Opin Biomed Eng.* 2017 Mar 1;1:4-7. doi: 10.1016/j.cobme.2017.01.001. Epub 2017 Mar 22. PMID: 29038794; PMCID: PMC5640432.

Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, de Campos N, Messora MR, Bomfim SR, et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B.* 2013 Apr 5;121:6-14. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.01.013. Epub 2013 Feb 16. PMID: 23474527.

Namgung S, Kim T, Baik KY, Lee M, Nam JM, Hong S. Fibronectin-carbon-nanotube hybrid nanostructures for controlled cell growth. *Small.* 2011 Jan 3;7(1):56-61. doi:10.1002/smll.201001513. PMID: 21061404.

Nunes CMM, Ferreira CL, Bernardo DV, Oblack GB, Longo M, Santamaria MP, et al. The influence of LLLT applied on applied on calvarial defect in rats under effect of cigarette smoke. *J Appl Oral Sci.* 2019 Jun 13;27:e20180621. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0621. PMID: 31215599; PMCID: PMC6559756.

Oliveira MR, deC Silva A, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR Jr, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 May;44(5):649-55. doi: 10.1016/j.ijom.2014.12.005. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25553712.

Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, et al. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater Sci Eng R: Reports.* 2007; 58 (3–5): 77–116. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>

Peng Z, Zhao T, Zhou Y, Li S, Li J, Leblanc RM. Bone tissue engineering via carbon-based nanomaterials. *Adv Healthc Mater.* 2020 Mar;9(5):e1901495. doi: 10.1002/adhm.201901495. Epub 2020 Jan 24. PMID: 31976623.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020 Jul 14;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410. PMID: 32663219; PMCID: PMC7360023.

Rasouli Ghahroudi AA, Rokn AR, Kalhori KA, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro AL, et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci.* 2014 May;29(3):925-32. doi: 10.1007/s10103-013-1403-5. Epub 2013 Aug 31. PMID: 23996072.

Rodrigues AC, Da Silva EL, Quirino SF, Cuña A, Marcuzzo JS, Matsushima JT, et al. Ag@activated carbon felt composite as electrode for supercapacitors and a study of three different aqueous electrolytes. *Mater Res.* 2019;22(1):1–9. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2018-0530>.

Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C.* 2017;78:1246–62. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.

Russell W, Burch R. The principles of humane experimental technique. *Med J Austr.* 1959;1(13):500. doi: <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x> .05.017.

Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris G, Sbordone C, Guidetti F. Implant success in sinus-lifted maxillae and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Mar-Apr;24(2):316-24. PMID: 19492648.

Schemitsch EH. Size matters: defining critical in bone defect size! *J Orthop Trauma*. 2017 Oct;31 Suppl 5:S20-S22. doi: 10.1097/BOT.0000000000000978. PMID: 28938386.

Springfield DS. Autogenous bone grafts: nonvascular and vascular. *Orthopedics*. 1992;15(10):1237–41.

Tüz HH, Koç O, Meral SE, El AS. Reconstruction and implant-supported rehabilitation of an iatrogenically caused maxillary alveolar defect. *Implant Dent*. 2019 Oct;28(5):510-3. doi: 10.1097/ID.0000000000000910. PMID: 31135650.

Van der Stok J, Van Lieshout EM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands - a systematic literature review. *Acta Biomater*. 2011 Feb;7(2):739-50. doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.035. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20688196.

Yu L, Wu Y, Liu J, Li B, Ma B, Li Y, Huang Z, He Y, Wang H, Wu Z, Qiu G. 3D culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) could improve bone regeneration in 3d-printed porous Ti6Al4V Scaffolds. *Stem Cells Int*. 2018 Sep 5;2018:2074021. doi: 10.1155/2018/2074021. PMID: 30254680; PMCID: PMC6145055.

APÊNDICE A – Dissertação no formato de artigo para submissão para publicação
Biomaterials advances

Carbon fiber in critical size bone defects: an in vivo study in rats.

Kauê Alberto Pereira^{1,2}, Clarissa Carvalho Martins Maciel¹, Letícia Cavassini Torquato¹, Eduardo Chelin Suárez¹, Nataly Domingues Almeida¹, Luana Marotta Reis de Vasconcellos¹, Jossano Saldanha Marcuzzo³, Andrea Carvalho De Marco¹

¹ Department of Diagnosis and Surgery, São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology, São José dos Campos, SP, Brazil

² Fundação Universitária Vida Cristã, Unifunvic, Pindamonhangaba, SP, Brazil

³ JMHP – Materials Consulting, São José dos Campos, SP, Brazil

Corresponding author: Kauê Alberto Pereira

Av Engenheiro Francisco José Longo, 777, São José dos Campos, São Paulo,
CEP: 12.245-000, Brazil.

Tel: +55- 12- 3947-9000 Fax: +55- 12- 3947-9010

E-mail: kauealberto@outlook.com

ABSTRACT

Carbon based materials have been used in some areas like chemistry, engineering, materials science, biomedical science, among others. In addition, because they are chemically stable, mechanically strong, economically accessible, and biologically compatible, they have drawn attention as a scaffold material for bone tissue engineering. Thus, the present study had a main objective to evaluate the carbon fiber obtained from textile PAN fiber, in its different forms, as a scaffold's potential synthetic bone. Thirty-four adult rats were used (*Rattus norvegicus*, albinus variation, Wistar), and two critical bone defects were made with 5mm in diameter. Twenty-four animals were randomly divided into 4 groups: Bone defect + blood clot; Bone defect + Unactivated Carbon Fiber Felt (FFCNA); Bone defect + Activated Carbon Fiber Felt (FFCA); Bone defect + Carbon Fiber Felt Activated with Silver (FFCAAg), and was observed for different periods of 15 and 60 days for histomorphometrical analysis and micro CT. Ten animals were randomly divided into the same four groups for application of fluorochromatic markers and mineral apposition analysis (in progress). After the observation period of the subgroups, the animals were euthanized by general anesthesia overdose. Then, the calvarias were removed for the analysis. In the evaluation of the two periods (15 and 60 days), the FFCNA was better for the parameters of Bone Neof ormation Area, Lamellar Neof ormation Area and Intramembranous Neof ormation Area. In 60 days, the FFCNA group presented higher bone volume, tissue volume and higher number of trabeculae, showing a promising synthetic material as scaffold for bone regeneration.

Keywords: Carbon Fiber. Bone Regeneration. Biocompatible materials. Tissue Engineering

1. Introduction

Bone is a hierarchically organized structure, which performs the main physiological and structural functions, thus playing an important role in vertebrate beings, but can easily be compromised [1]. However, microfractures can be cured without the individual's perception, due to the bone's self-healing ability [2]. However, in the case of large-scale defects, complete fracture repair will not occur [3]. Bone defects have varied etiology. Some factors may be associated, such as periodontitis, known as the main etiological factor of alveolar bone loss, in addition to trauma, tumors, post-tooth extraction resorption, osteomyelitis, and medications that can cause necrosis of the mandibular bone [4]. Critically sized defects do not have a single definition, but in general, defects can be considered that despite surgical stabilization, do not repair spontaneously and require additional surgical intervention, such as bone grafts [5].

Autogenous bone has been recognized as the gold standard for bone grafting, providing osteogenic cells, extracellular matrix, and molecular signals for bone induction and differentiation [6,7]. The advantages of autogenous grafts are: osteoconduction, osteoinduction and osteogenic effects that promote high regenerative potential [8]. However, the removal of autogenous grafts implies a second donor surgical site and increases the morbidity of the patient [9,10]. One of the grafts that presents the best result, along with good clinical documentation, is the bio-oss xenograft®, which is a bone mineral matrix of natural, porous, and bovine origin, which offers excellent compatibility with the human bone matrix, and stimulate osteogenesis due to the compatibility it offers. And it should be noted that the bone created by the Bio-Oss® graft is not reabsorbable [11,12]. Thus, some alternative strategies, such as bone substitutes, using tissue engineering can be used for bone reconstruction.

Tissue engineering is the combination of the use of materials and cells to replace biological tissue or improve it [13]. Its main objective through the modeling of biological structures in order to build artificial organs is to overcome the difficulty of existing transplants. To manufacture frameworks, researchers use synthetic materials or natural resources. In addition, these frameworks should not exacerbate the immune response, and the inflammatory response, and should be biocompatible. In addition,

in the same way, it is necessary compatibility with the environment found in the body of the individual and with its specific types of cells [14,15].

Several biomaterials for bone tissue engineering have been developed, such as collagen, hydroxyapatite (HA), and tricalcium phosphates, however, they are unable to meet clinical demand, given that they have rapid degradation rate, and insufficient mechanical properties [16]. Carbon-based materials have been used in various areas such as chemistry, engineering, materials science, biomedical sciences, among others. Moreover, because they are chemically stable, mechanically strong, economically accessible, and biologically compatible, these materials drew attention as framework material for bone tissue engineering [2]. To provide space for cell support and migration, in addition to tissue formation, frameworks typically need a three-dimensional (3D) structure [17,18]. Graphite and diamond are the best-known 3D carbon-based materials, but they have not been studied as bone tissue engineering frameworks due to their lack of pores. This becomes an important factor, due to the fact that the structure must contain a certain number of pores to occur cell adhesion and proliferation, and osteogenic differentiation to function as a framework in bone tissue engineering [19].

Compared to other common types of carbon, activated carbon fiber (FCA) has special characteristics. It provides a high and fast adsorption capability for specific components, such as ions, metals, or organic components, since they have small dimensions, and the fact that FCA has well-defined pore structures [20,21]. Since the structure of these pores and their architecture are formed directly on the surface by a large amount of micropores, fca has a fast and less energetic adsorption mechanism, mainly for gases [22]. The FCA is obtained from PAN fiber (polyacrylonitrile polymer) textile that goes through carbonization process and activation to produce felt activated carbon fiber (FFCA) [23,24].

Thus, the main objective of this study is to evaluate the carbon fiber obtained from textile PAN fiber, in its different forms of presentation, with a view *to obtaining scaffolds* as a potential synthetic bone graft.

2. Materials and methods

2.1 Carbon fiber preparation and activation

PAN textile fibers are used as precursors of carbon fibers, and in the same way, as raw material of the textile industry. They present themselves in a kind of blanket of whitish color, which were cut in their proper shape. PAN fibers of 5.0 dtex in 200,000 filament cable were thermally oxidized and used as raw material for felt production. The raw material (oxidized PAN fiber felt) was placed in a specially designed sample port and inserted into an electric tubular furnace for carbonization (900 °C) and then activated in CO_2 atmosphere at 1000°C for 50min.

In scanning electron microscopy (SME) it is possible to observe that the activated carbon fiber felt (FFCA) has a disordered two-dimensional structure as illustrated in Figure 1A, its fibers are about 10-15 μm in diameter (Figure 1B). In the adsorption of nitrogen gas it was indicated that the surface of the fibers is populated by micropores, with a large majority of which were sized around 1.2 nm, the maximum diameter presented was approximately 3.2 nm.

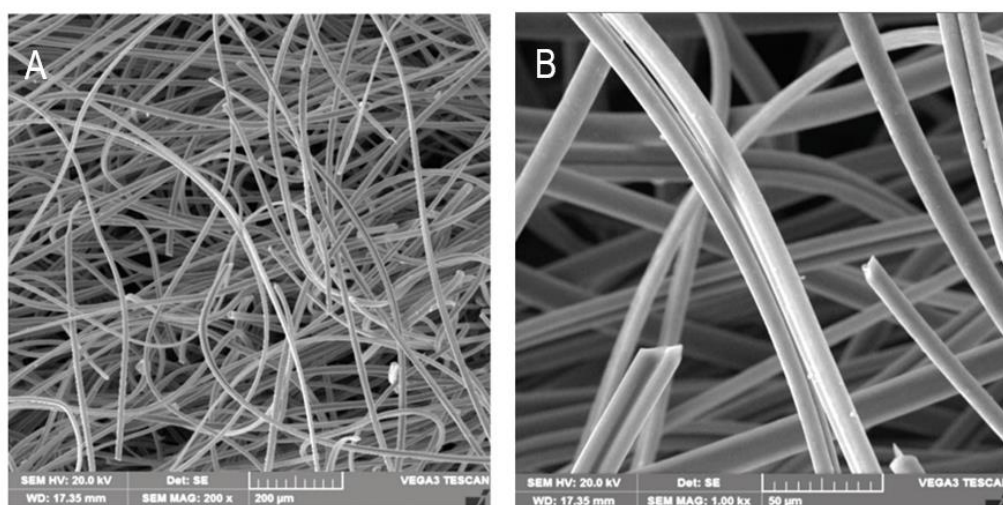


Fig. 1. A) SME of the structure of ffca filaments; B) detail of ffca activated fibers

For the preparation of silver activated carbon fiber (FFCAAg) felt, FFCA was immersed in an aqueous solution of silver nitrate (2g L⁻¹ of AgNO_3) until it saturates the adsorption for 24 hours. The sample was washed with deionized water and dried in a vacuum oven at 50°C, forming a silver composite in activated carbon fiber felt [25]. Silver adsorption occurs on the entire surface of the fibers (Figure 2A), but silver particles are not evenly distributed, it is observed that in specific regions silver

agglomerates form on the surface of the FFCA (Figure 2B), the estimated size of the silver grain formed on the surface of the carbon fiber is 200 nm in diameter [25].

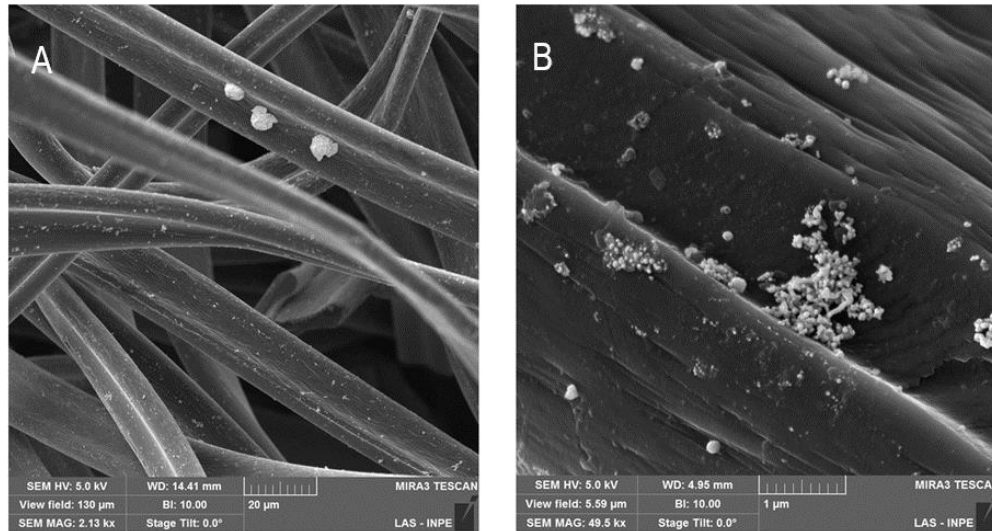


Fig. 2. A) SME of the structure of FFCA filaments; B) detail of FFCA activated fibers.

2.2 Experimental model in vivo

This study was submitted to the Ethics Committee on the use of animals - CEUA and approved protocol no. 15/2020. The description of this work followed the guidelines of Animal research: Reporting in vivo experiments – ARRIVE [26].

Thirty-four adult rats (*Rattus norvegicus*, *albinus variation*, *Wistar*), 90 days of age, approximate weight of 300g were used.

For the histomorphometry and micro-CT analyses 24 animals were used. They were randomly divided into 4 groups: Bone defect + Blood clot (C), Bone Defect + Felt Not Activated Carbon Fiber (FFCNA), Bone Defect + Activated Carbon Fiber Felt (FFCA), Bone Defect + Silver Activated Carbon Fiber Felt (FFCAAg). Each group was subdivided according to the observation periods of 15 [27] and 60 days [28]. Two defects were performed per animal, according to the principle of the 3R's – "Reduction" [29] and these specimens were later used for histomorphometry. Thus, 6 animals were needed for groups C and FFCNA for the period of 15 days and 6 animals for the groups the same groups for the period of 60 days. Similarly, 6 animals were needed for the FFCA and FFCAAg groups, with 6 animals required for the period of 15 days and 6 animals for the 60-day period. For the complementary analysis of fluorochromatic cell

markers, 10 animals were used, totaling 20 defects, randomly allocated to the groups mentioned above, and 2 defects per animal were also performed. Thus, 5 defects per group were analyzed.

In each animal, two bone defects of critical size with a diameter of 5 mm were performed [30,31] and the biomaterial was placed and the forms of presentation (groups) were randomly distributed (Figure 3A and 3B).

At 15 and 60 days the animals of each group were euthanized by an anesthetic overdose. Then, after the sensitivity tests the animals were beheaded by the guillotine. Finally, the calvaria was removed for analysis.

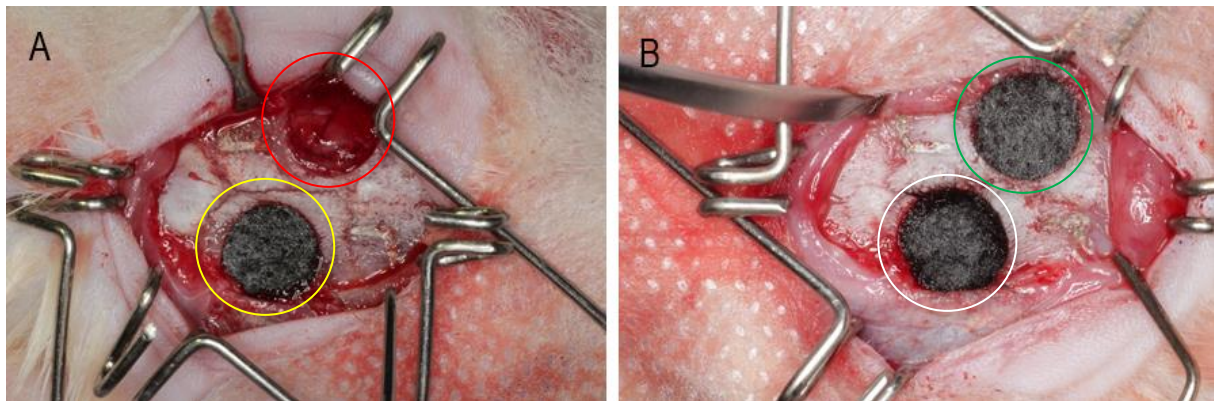


Fig. 3. A: defects performed in the calvária, with the red circle being group C, yellow circle or FFCNA; B: defects performed in the calvária, with the green circle being the FFCA and the white FFCAAg.

2.3 MicroCT evaluation

The analyses were performed: bone volume (*BV*), total tissue volume (*VT*), number of trabeculae (*Tb.N*), space between trabeculae (*Tb.Sp*), total tissue volume (*VT*) used to calculate the bone volume fraction (BV / TV), considered the circular region of interest (*RCI*). This analysis was performed by a calibrated, trained, and blind examiner.

2.4 Histomorphometric evaluation

Histomorphometric analysis was performed by a single examiner duly calibrated. And the following measurements were made:

- a) Total defect area (*TA*): total area of the surgical defect (mm²).

- b) Total neoformation area (AN): proportion of the bone neoformation area within the limits determined between the edges of the defect, in %.
- c) Lamelar neoformation area (ANL): proportion of bone neoformation in %, from the edges of the right and left side.
- d) Area of intramembranous neoformation (ANI): proportion of bone neoformation in % in the central region of the defect, separated from the bone formed at the edges.
- e) Central distance between the edges of neoformed bone (MCL): linear measure in mm of the remaining distance between the edges of neoformed bone.

2.5 Statistical analysis

For data analysis, descriptive statistics were performed to establish measures of central tendency and variability. Then, 2 factors were analyzed by ANOVA, complemented by post-hoc tests, Tukey and Sidák. The level of significance adopted was the conventional value of 5%.

3 Results

3.1 Histological and Micro-CT descriptive analysis

In 15 days, it was possible to visualize in group C (Figures 4A and 4E) the defect in its entire extension without bone neoformation with the edges of the native bone clearly, and the region inside the defect was occupied by clot. In the FFCNA, FFCA and FFCAAg groups, it was possible to observe the bone defect filled by the biomaterial (Figures 4B, 4C, 4D). The images obtained by Micro-CT corresponding to these are the figures - 4F, 4G and 4H. In the FFCNA group it was possible to observe small islands of ostoid matrix near the edges of the defect (Figure 4B).

At 60 days in group C it was possible to notice the bone defect filled with dense connective tissue (Figure 5A). The image corresponding to group C obtained by micro-CT is Figure 5E. In the FFCA and FCCA group specimens (Figures 5C, 5D). it was possible to notice new bone formed near the edges of the defect, still with the presence

of the biomaterial inside. The images obtained by Micro-CT corresponding to these are the figures (5G and 5H). However, there are no signs of neoformed bone band along the extent of the surgical defect that indicates its closure. In the FFCNA group (Figure 5B and 5F) the neoformed bone bridge is evident, providing the closure of the surgical defect almost in its entirety, there is the presence of biomaterial and bone neoformation that extends down the edges of the defect, permeating the biomaterial, even ectopically.

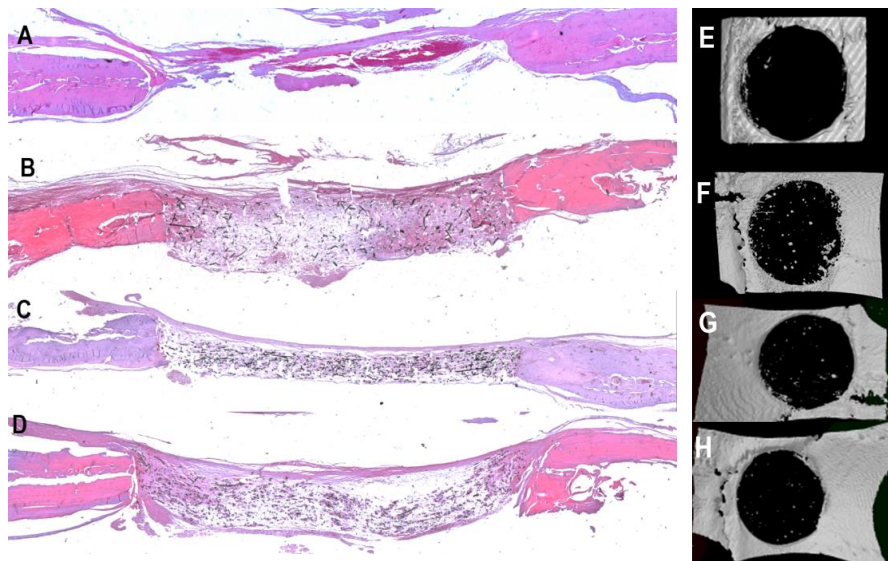


Figure 4 - Specimens from the period of 15 days; photomicrographs of the panoramic view of the surgical defect (hematoxylin and eosin staining, original increase of X2.5), being A: C, B: FFCNA, C: FFCA and D: FFCAAg. And surgical defect reconstructed by micro-CT being E: C, F: FFCNA, G: FFCA and H: FFCAAg.

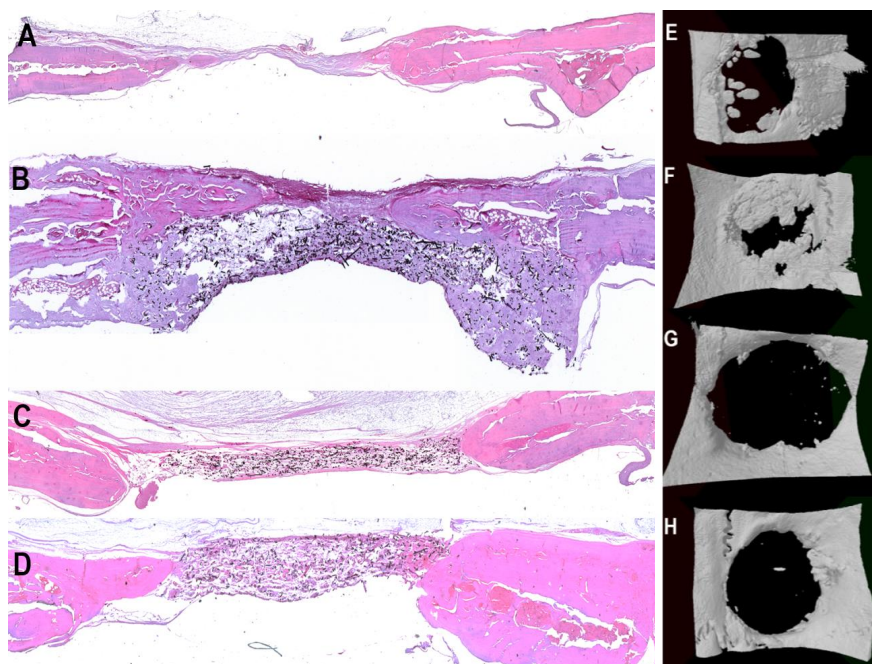


Figure 5 - Specimens from the period of 60 days; photomicrographs of the panoramic view of the surgical defect (hematoxylin and eosin staining, original increase of X2.5), being A: C, B: FFCNA, C: FFCA and D: FFCAAg. And surgical defect reconstructed by micro-CT being E: C, F: FFCNA, G: FFCA and H: FFCAAg.

3.2 MicroCT results

The following MicroCT analyse data were obtained from five specimens from each group for the periods of 15 days and 60 days.

The significant statistical differences obtained by inferential statistical analysis are described below:

In 15 days, for the evaluated parameters, all groups presented statistically similar results.

In 60 days, BV (C vs. FFCNA, $p < 0.0001$, FFCNA vs. FFCA, $p < 0.0001$, FFCNA vs. FFCAAg, $p < 0.0001$), TV (C vs. FFCNA, $p < 0.0001$, FFCNA vs. FFCA, $p < 0.0001$, FFCNA vs. FFCAAg, $p < 0.0001$) the FFCNA group showed a statistically significant difference in relation to the other groups (Figures 6 and 7). For the parameters BV/TV and Tb. N, the FFCNA group showed a statistically significant difference in relation to the FFCA and FFCAAg groups ($p < 0.0001$), but not in relation to group C (figures 8 and 9). For the Tb. Sp parameter, the groups did not present statistically significant differences between them.

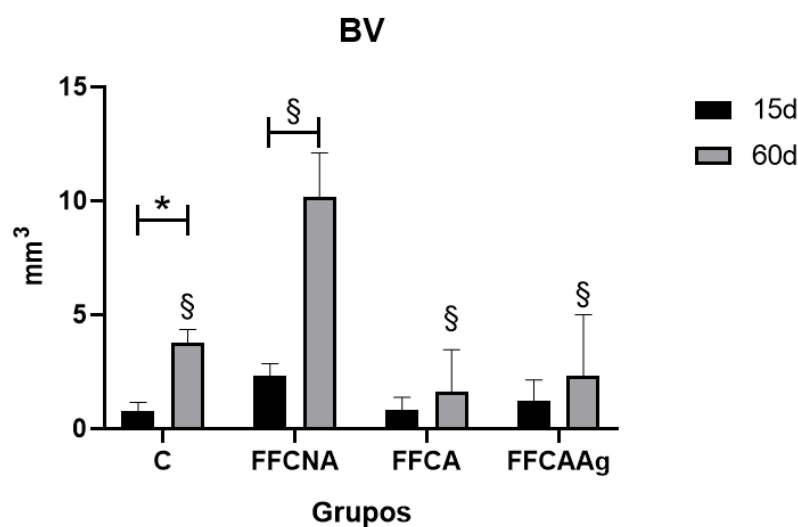


Figure 6 - Inter and intragroup difference for C (*) and FFCNA (\$).

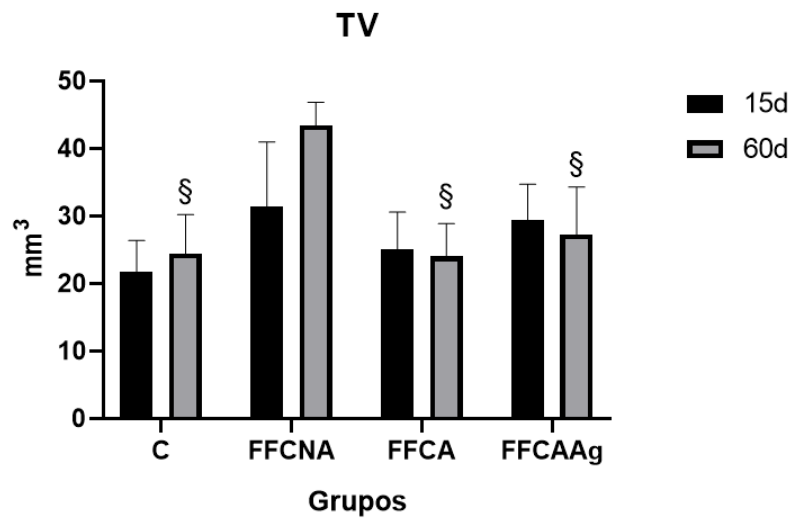


Figure 7 - Intra- and intergroup difference for FFCNA (§).

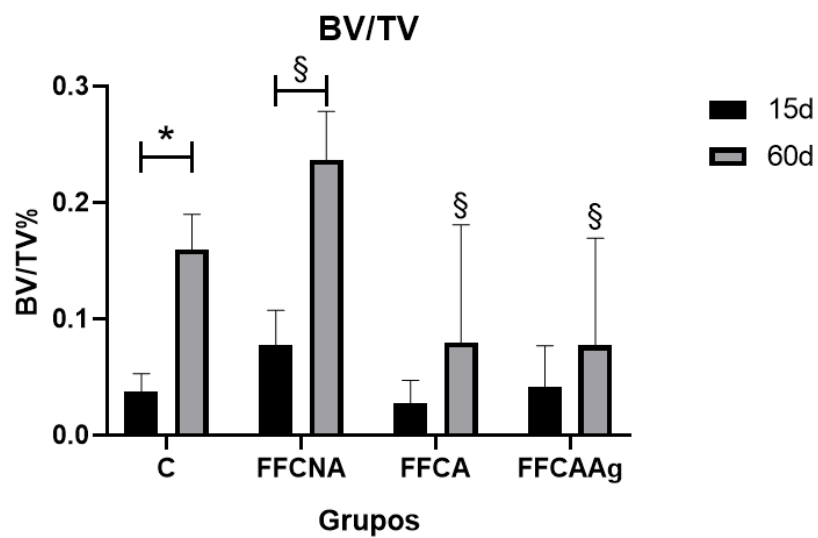


Figure 8 - Inter and intragroup difference for C (*) and FFCNA (§).

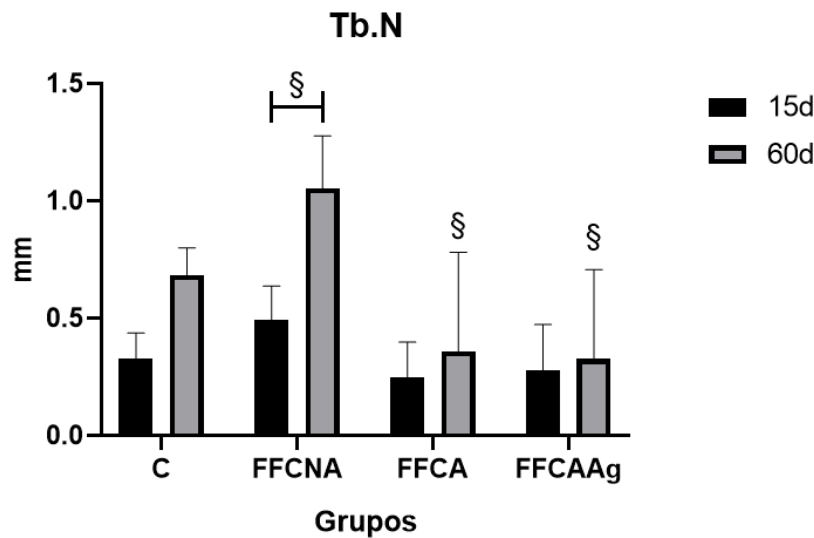


Figure 9 - Intra- and intergroup difference for FFCNA (§).

3.3 Histomorphometric results

In 15 days, in the Total Defect Area (TA) parameter, the FFCNA group showed a statistically significant difference for group C and FFCA (FFCVS NA. C, $p=0.0139$; FFCNA vs FFCA, $p=0.0247$), but was statistically similar for the FFC AAg group. The FFCAA group showed a statistically significant difference for group C and FFCA (FFCAA vs C, $p=0.0018$; FFCAA vs. FFCA, $p=0.0035$), but was statistically similar to the FFCNA group (Figure 10).

In the bone neoformation area (AN) parameter, the FFCNA group showed a statistically significant difference for all groups (FFCNA vs C, $p=0.0009$; FFCNA vs FFCA, $p=0.0028$; FFCNA vs. FFCAA, $p=0.0035$). The other groups (C, FFCA, FFCAA) were statistically similar to each other (Figure 11).

In the Lamelar Neoformation Area (ANL) parameter, the FFCNA group showed a statistically significant difference for all groups (FFCNA vs C, $p=0.0015$; FFCNA vs. FFCA, $p=0.0043$; FFCNA vs. FFCAA, $p=0.0054$). The other groups (C, FFCA, FFCAA) were statistically similar to each other (Figure 12).

In the Intramembraneous Neoformation Area (ANI) parameter, the groups were statistically similar to each other, with higher absolute values for the FFCNA group (Figure 13).

In the Linear Central Measure (MCL) parameter, the groups were statistically similar to each other, with higher absolute values for the FFCAg group (Figure 14).

In 60 days, in the Total Defect Area (TA) parameter, the FFCNA group showed a statistically significant difference for group C and FFCAAg (FFCNA vs. C, $p < 0.0001$; FFCNA vs FFCAAg, $p < 0.0001$), but was statistically similar for group FFCA (Figure 10). The FFCA group showed a statistically significant difference for group C and FFCAAg (FFCA vs C, $p < 0.0001$; FFCA vs FFCAAg, $p < 0.0001$), but was statistically similar to the FFCNA group.

. In the Bone Neoformation Area (AN) parameter, the groups were statistically similar to each other, with higher absolute values for the FFCNA group (figure 11).

In the Lamelar Neoformation Area (ANL) parameter, the groups were statistically similar to each other, with higher absolute values for the FFCNA group. (Figure 12).

In the Intramembranous Neoformation Area (ANI) parameter, the FFCNA group showed a statistically significant difference for group C and FFCAAg (FFCVS NA. C, $p = 0.0335$; FFCNA vs FFCAAg, $p = 0.0261$), but was statistically similar for group FFCA (Figure 13). The other groups (C, FFCA and FFCAAg) were statistically similar to each other.

In the Linear Central Measure (MCL) parameter, the FFCA group showed a statistically significant difference in relation to group C (FFCA vs C, $p = 0.0014$), but it was statistically similar for the FFCNA and FFCAAg groups (Figure 14).

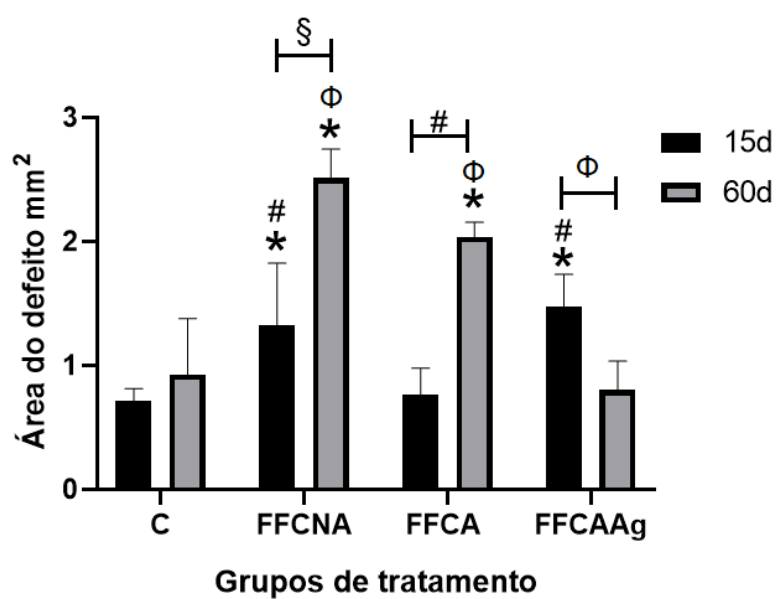


Figure 10 - Inter and intragroup difference for C (*), FFCNA (§), FFCA (#) and FFCAA (Φ)

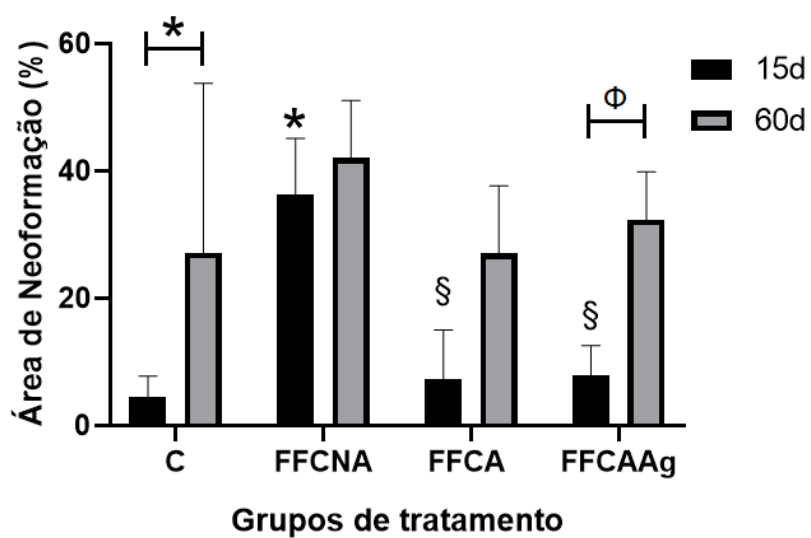


Figure 11 - Inter and intragroup difference for C (*), FFCNA (§), FFCA (#) and FFCAA (Φ)

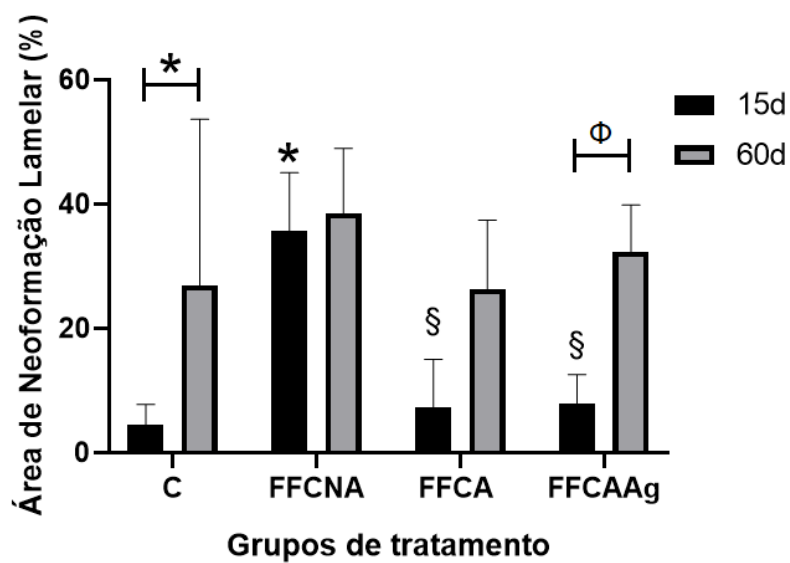


Figure 12 - Inter and intragroup difference for C (*), FFCNA (§), FFCA (#) and FFCAA g (Φ)

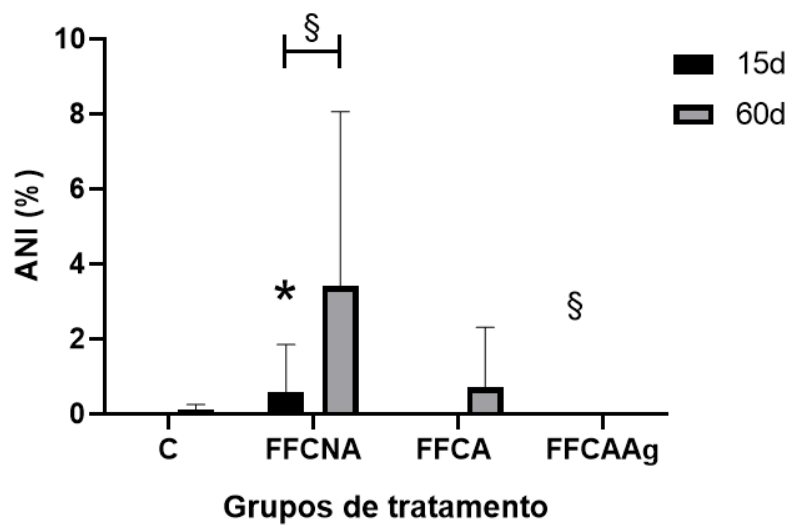


Figure 13 - Inter and intragroup difference for C (*), FFCNA (§), FFCA (#) and FFCAA g (Φ)

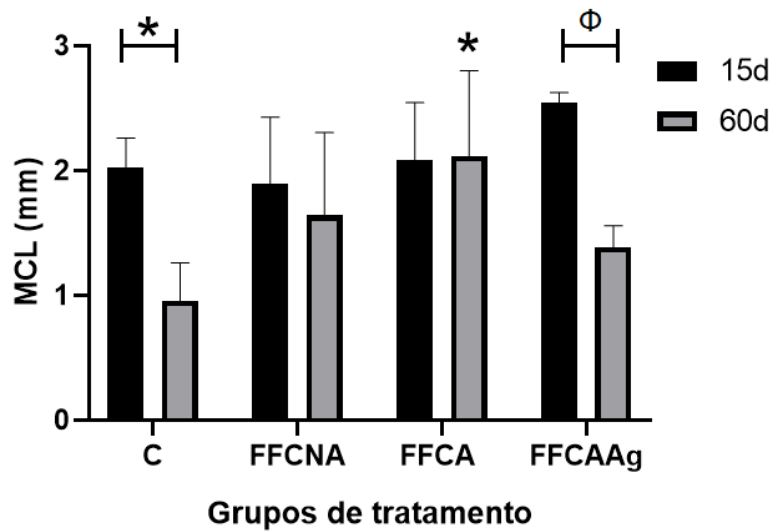


Figure 14 - Inter and intragroup difference for C (*), FFCNA (§), FFCA (#) and FFCAAg (Φ)

4 Discussion

The main objective of this study was to evaluate the carbon fiber obtained from textile PAN fiber, in its different forms of presentation, with a view *to obtaining scaffolds* as a potential synthetic bone graft.

In the microCT analysis, the highest values of bone volume (BV) and tissue volume (VT) were observed in the FFCNA group, with a statistically significant difference when compared to the other groups in the 60-day period. These data corroborate those presented by Ryu et al., 2014, since in their study the carbon fiber-based PAN fiber presented bone regeneration and filled more than 50% of the surgical defect. A possible explanation for the greater osteogenesis for the FFCNA group would be its improved adsorption of extracellular matrix proteins, which can lead to stimulation of the signaling pathway of the osteogenesis of cells [32]. In addition, FFCNA has good adsorption of fibronectin, which is relevant for osteogenesis, since this substance plays a crucial role in the interaction of mesenchymas cells and fiber [33].

In the same analysis, for the parameter BV/TV and Tb. N the FFCNA group showed statistical difference for the FFCA and FFCAAg groups for the period of 60 days. This is corroborated by the reconstruction of 3D images, where in 60 days there is the presence of bone neoformation, especially in the FFCNA group,

differentiating from the other ones. The data of the present study are justifiable due to different presentation in the forms of fibers, since after the activation process FFCA and FFCAAg have porosity. Ryu et al., 2014 mentioned that for an effective bone neoformation the required pore size would be 75-100 μ , and the FFCA used in this study presents pores the size of 0.0032 μ , a fact that may have influenced the differentiation of mesenchymal cells, since it is known that the structure must contain a certain amount of pores to occur cell adhesion and proliferation, and osteogenic differentiation to function as a framework in bone tissue engineering [19].

In the present study, through histomorphometric analysis, it was possible to observe greater bone neoformation (AN) in the 15-day FFCNA group. One hypothesis to be considered would be about osteogenesis genes, since Ryu et al., 2014 found that Pan-based fibers allow the expression of specific genes for osteogenesis, such as type I collagen (main bone protein), osteocalcin and osteopontin, specific osteoblast markers for bone matrix mineralization, these data indicates that the events cited may be involved in the initial periods of bone repair when associated with FFCNA. Another condition observed, still in the period of 15 days, concerns the FFCAAg group, where the onset of bone neoformation was observed near the edges of the defect, however, in an extremely incipient manner. One hypothesis to be considered would be the concentration of silver incorporated into the biomaterial, in the present study the incorporation by silver was 430000 μ g/ml, and according to the literature, it is known in large quantities, in the order of 10^0 to 10^2 μ g/ml, silver can be toxic to the organism [34]. Therefore, further studies are needed to investigate which silver concentration would be ideal to be applied to Carbon Fiber with a view to application in tissue engineering, since its antimicrobial properties are evident in the literature [35].

Similarly, to the AN parameter, in the area of lamellar bone neoformation (ANL), in the period of 15 days, it was possible to observe greater neoformation in favor of the FFCNA group. This can be explained by the fact that the pattern of bone neoformation, as observed by Bosco et al., 2016 and Fan et al., 2018, occurs in a centripetal manner, due to blood supply, and bone repair depends mainly on the availability of osteogenic precursor cells in bone or adjacent soft tissue and the ability of these cells to invade the defect and differentiate into osteoblasts [28]. High levels of alkaline phosphatase activity, Runx2 expression and calcium content in FFCNA [32] were also observed, common characteristics of cellular bone formation [38, 39].

For the ANI parameter, it was possible to observe greater neoformation in favor of the FFCNA group. It is known that the bone produces on a certain mechanical load and an electrical polarization [40]. In addition, animal studies have shown that bone repair can be accelerated with electromagnetic fields [41,42], which demonstrates the influence of this factor on bone regeneration. Therefore, one hypothesis to be considered would be about the electrical activity of each material, and it is known that the electrical property of FFCA is totally dependent on its porosity, and as previously mentioned, its size was 0.0032μ , a factor that may have influenced its electrical properties, and consequently, in bone neoformation.

The linear measurements referring to the remaining distances between the edges of neoformed bone give us another important clinical parameter, which is the fectionation of the bone defect. Although there were no statistically significant differences between the groups of materials studied, through the analysis and histomorphometric images and microCT it was possible to verify the almost complete closure of the surgical defect treated by the FFCNA group in 60 days. This is a very important fact of the present study and very promising, because it was evident the superiority of the performance of the group treated with FFCNA both in the period of 15 days and in 60 days. Thinking about future studies and envisioning a possible clinical transposition, this biomaterial should be studied in more depth, through other analyses that allow understanding of cellular, molecular events and their interactions with the physical, chemical and electrical properties of said biomaterial.

Additionally, it was possible to observe a statistical difference in favor of the FFCNA group when compared to the other groups in the 60-day period in the microCT analysis.

In the present study, it was possible to observe the difference between the results found in the MicroCT and histomorphometric analyses, considering that the microCT analysis found a statistical difference in bone neoformation in favor of the FFCNA group for the period of 60 days and the histomorphometric analysis did not. In addition to the fact that histomorphometric analysis found a statistical difference for bone neoformation in favor of the FFCNA group for the period of 15 days, and microCT did not. One hypothesis to be considered is the differences between both analyses. While microCT analysis is performed in 3 planes, allowing the reconstruction of the surgical defect in 3D structures, the histomorphometric is performed in only one plane,

in semi-serial sections, and it is not possible to perform the analysis of the defect in its entire length, or rather, in all its dimensions, a fact that can cause divergences between the results found.

Another important factor is that in some specimens it was possible to observe a bone neoformation process in a certain ectopic way in the groups treated with FFCNA. As for this finding, more studies are needed to evaluate the confirmation of this hypothesis. In case of confirmation, this will lead to the need to find ways to control this process, so that the use of biomaterial can provide bone neoformation and volume preservation in an organized way.

One of the limitations found was the difficulty of comparing the action of the results of the present study with data from the literature, due to the different forms of presentation of fibers, mainly due to the scarcity of data regarding FFCNA in the literature. Therefore, more in vivo study, with possible periods of different observations, with analyses at the cellular and molecular level are necessary to generate more in-depth data of the real characteristics and capacities of biomaterial.

In addition, if on the one hand, the scarcity of biological data about FFCNA was considered, on the other hand, this is a topic of extreme relevance of this study that assures it the unprecedented character.

Another important fact to highlight is that the inclusion of silver and fiber activation do not significantly interfere for better results, since the FFCNA group presented the best results, which is relevant for material cost purposes, considering that the activation and inclusion of silver considerably increase the costs of the study.

5 Conclusion

In the evaluation of the two periods (15 and 60 days), the FFCNA was better for the parameters of Bone Neoformation Area, Lamelar Neoformation Area and Intramembranous Neoformation Area.

In 60 days, the FFCNA group presented higher bone volume, tissue volume and higher number of trabeculae, showing a promising synthetic material as *scaffold* for bone regeneration.

References

- [1] Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., Douglas, E. P., & Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 58(3–5), 77–116. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>
- [2] Peng, Z., Zhao, T., Zhou, Y., Li, S., Li, J., & Leblanc, R. M. (2020). Bone Tissue Engineering via Carbon-Based Nanomaterials. *Advanced Healthcare Materials*, 9(5), 1–30. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901495>
- [3] Schemitsch, E. H. (2017). Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *Journal of Orthopaedic Trauma*, 31(10), S20–S22. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000000978>
- [4] Tüz, H. H., Koç, O., Meral, S. E., & El, A. S. (2019). Reconstruction and Implant-Supported Rehabilitation of an Iatrogenically Caused Maxillary Alveolar Defect. *Implant Dentistry*, 28(5), 510–513. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000910>
- [5] Keating, J. F., Simpson, A. H. R. W., & Robinson, C. M. (2005). The management of fractures with bone loss. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*, 87(2), 142–150. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B2.15874>
- [6] Khouri, R. K., Brown, D. M., Koudsi, B., Deune, E. G., Gilula, L. A., Cooley, B. C., & Reddi, A. H. (1996). Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 98(1), 103–109.
- [7] Springfield, D. S. (1992). Autogenous bone grafts: nonvascular and vascular. *Orthopedics*, 15(10), 1237–1241.
- [8] Klijn, R. J., Meijer, G. J., Bronkhorst, E. M., & Jansen, J. A. (2010). A meta-analysis of histomorphometric results an graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 16(5), 493–507. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0035>

- [9] Chaushu, G., Mardinger, O., Calderon, S., Moses, O., & Nissan, J. (2009). The Use of Cancellous Block Allograft for Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement in the Posterior Atrophic Maxilla. *Journal of Periodontology*, 80(3), 422–428. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.080451>
- [10] Sbordone, L., Toti, P., Menchini-Fabris, G., Sbordone, C., & Guidetti, F. (2009). Implant success in sinus-lifted maxillae and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 24(2), 316–324.
- [11] Li, Y., Yang, L., Zheng, Z., Li, Z., Deng, T., Ren, W., Wu, C., & Guo, L. (2017). Bio-Oss® modified by calcitonin gene-related peptide promotes osteogenesis in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(5), 4001–4008. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5048>
- [12] Oliveira, M. R., deC. Silva, A., Ferreira, S., Avelino, C. C., Garcia, I. R., & Mariano, R. C. (2015). Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 44(5), 649–655. <https://doi.org/10.1016/J.IJOM.2014.12.005>
- [13] Yu, L., Wu, Y., Liu, J., Li, B., Ma, B., Li, Y., Huang, Z., He, Y., Wang, H., Wu, Z., & Qiu, G. (2018). 3D culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) could improve bone regeneration in 3d-printed porous Ti6Al4V Scaffolds. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2074021>
- [14] Gomes, M. E., Rodrigues, M. T., Domingues, R. M. A., & Reis, R. L. (2017). Tissue engineering and regenerative medicine: new trends and directions - A year in review. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 23(3), 211–224. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0081>
- [15] Murdock, M. H., & Badylak, S. F. (2017). Biomaterials-based in situ tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 1, 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.01.001>
- [16] Van Der Stok, J., Van Lieshout, E. M. M., El-Massoudi, Y., Van Kralingen, G. H., & Patka, P. (2011). Bone substitutes in the Netherlands - A systematic literature review. *Acta Biomaterialia*, 7(2), 739–750. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.035>

- [17] Correa-Duarte, M. A., Wagner, N., Rojas-Chapana, J., Morsczech, C., Thie, M., & Giersig, M. (2004). Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks as scaffolds for cell seeding and growth. *Nano Letters*, 4(11), 2233–2236. <https://doi.org/10.1021/nl048574f>
- [18] Crowder, S., Kasner, E., Hunter, C. A., Ph, D., Kariko, K., & Ph, D. (2013). Three-dimensional graphene foams promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanoscale*, 5(10), 4171–4176. <https://doi.org/10.1002/ana.22528>
- [19] Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering C*, 78, 1246–1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>
- [20] Botanni, E. J., & Tascón, J. M. D. (2008). *Adsorption by Carbons*.
- [21] Marsh, H., & Reinoso, F. R. (2000). *Sciences of carbon materials*.
- [22] Mochida, I., Korai, Y., Shirahama, M., Kawano, S., Hada, T., Seo, Y., Yoshikawa, M., & Yasutake, A. (2000). Removal of SO₂ and NO_x over activated carbon fibers. *Carbon*, 38(2), 227–239.
- [23] do Amaral Junior, M. A., Matsushima, J. T., Rezende, M. C., Gonçalves, E. S., Marcuzzo, J. S., & Baldan, M. R. (2017). Production and characterization of activated carbon fiber from textile PAN Fiber. *Journal of Aerospace Technology and Management*, 9(4), 423–430. <https://doi.org/10.5028/jatm.v9i4>
- [24] Marcuzzo, J. S., Cuña, A., Tancredi, N., Mendez, E., & Bernardi, H. H. (2016). Microporus activated carbon fiber felt from Brazilian textile PAN fiber: preparation, characterization and application as super capacitor electrode. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*, 35(2), 58–63. <https://doi.org/10.17563/rbav.v35i2.1022>
- [25] Rodrigues, A. C., Da Silva, E. L., Quirino, S. F., Cuña, A., Marcuzzo, J. S., Matsushima, J. T., Gonçalves, E. S., & Baldan, M. R. (2019). Ag@activated carbon felt composite as electrode for supercapacitors and a study of three different aqueous electrolytes. *Materials Research*, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2018-0530>
- [26] Percie du Sert, N. P., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod,

- M., ... Würbel, H. (2020). The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- [27] Barbirato, D. da S., Fogacci, M. F., Gusman, H., Takiya, C. M., Carvalho, D. P. de, & Samsone, C. (2018). Hydroxyapatite calvaria graft repair in experimental diabetes mellitus in rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 46(9), 1576–1585. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.04.016>
- [28] Rasouli Ghahroudi, A. A., Rokn, A. R., Kalhori, K. A. M., Khorsand, A., Pournabi, A., Pinheiro, A. L. B., & Fekrazad, R. (2014). Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: A double blind experimental study. *Lasers in Medical Science*, 29(3), 925–932. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1403-5>
- [29] Russell, W., & Burch, R. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*
- [30] Calixto, J. C., Villaboim De Castro Lima, C. E., Frederico, L., Pio Dos Santos De Castro Lima, R., & Anbinder, A. L. (2011). The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 39(3), 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2010.03.009>
- [31] Nagata, M. J. H., Santinoni, C. S., Pola, N. M., De Campos, N., Messoria, M. R., Bomfim, S. R. M., Ervolino, E., Fucini, S. E., Faleiros, P. L., Garcia, V. G., & Bosco, A. F. (2013). Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: A new therapeutic approach to enhance bone healing. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 121, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.01.013>
- [32] Ryu S, Lee C, Park J, Lee JS, Kang S, Seo YD, Jang J, Kim BS. Three-dimensional scaffolds of carbonized polyacrylonitrile for bone tissue regeneration. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014 Aug 25;53(35):9213-7. doi: 10.1002/anie.201403794. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25044682.
- [33] Namgung S, Kim T, Baik KY, Lee M, Nam JM, Hong S. Fibronectin-carbon-nanotube hybrid nanostructures for controlled cell growth. *Small*. 2011 Jan 3;7(1):56-61. doi: 10.1002/sml.201001513. PMID: 21061404.
- [34] Vazquez-Muñoz R, Borrego B, Juárez-Moreno K, García-García M, Mota Morales JD, Bogdanchikova N, Huerta-Saquero A. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? *Toxicol Lett*.

2017 Jul 5;276:11-20. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.05.007. Epub 2017 May 5. PMID: 28483428.

[35] Durán, Nelson, Rolim, Wallace R., Durán, Marcela, Fávaro, Wagner J., & Seabra, Amedea B.. (2019). NANOTOXICOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: TOXICIDADE EM ANIMAIS E HUMANOS. *Química Nova*, 42(2), 206-213. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170318>.

[36] Bosco AF, Faleiros PL, Carmona LR, Garcia VG, Theodoro LH, de Araujo NJ, Nagata MJ, de Almeida JM. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Oct;163:303-10. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.040. Epub 2016 Aug 31.

[37] Fan YP, Lu JF, Xu AT, He FM. Physiochemical characterization and biological effect of anorganic bovine bone matrix and organic-containing bovine bone matrix in comparison with Bio-Oss in rabbits. *J Biomater Appl*. 2018 Oct;33(4):566-575. doi: 10.1177/0885328218804926

[38] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-54. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80257-3. PMID: 9182762.

[39] Gaharwar AK, Mihaila SM, Swami A, Patel A, Sant S, Reis RL, Marques AP, Gomes ME, Khademhosseini A. Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Adv Mater*. 2013 Jun 25;25(24):3329-36. doi: 10.1002/adma.201300584. Epub 2013 May 13. PMID: 23670944.

[40] Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Japan* 1957; 12:1158 - 62

[41] Canè V, Zaffe D, Cavani F, Botti P, Soana S. PEMFs modulate the enzymatic activity during the bone repair process. *Bone* 1996;19:133S.

[42] Inoue N, Ohnishi I, Chen D, Deitz LW, Schwardt JD, Chao EYS. Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. *J Orthop Res* 2002; 20:1106-14.

ANEXO A – Certificado de aprovação do comitê de ética do uso de animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Ribeirão Preto - São José dos Campos



INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
UNESP



CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 15/2020, intitulado:- **Fibra de carbono ativada em defeitos ósseos de tamanho crítico: Estudo in vivo em ratos**, sob a responsabilidade de **ANDREA CARVALHO DE MARCO**, tendo como colaboradores:- Kauê Alberto Pereira, Clarissa Carvalho Martins Maciel, Leticia Cavassini Torquato e Eduardo Antonio Chelín Suárez, 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 19/11/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	19/11/2020 a 19/12/2021
Espécie/inhagem/raça	Ratos Heterogêneo Wistar
Nº de Animais	34 ratos
Período	90 dias / 300 grs.
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

COMPROMISSOS:-

Relatório científico	PERÍODO	ENVIO PARA A CEUA
PARCIAL	19/11/2020 a 19/06/2021	05/07/2021
FINAL	20/06/2021 a 19/12/2021	19/01/2022

Obs:- 01) O não cumprimento dos prazos já está implicando na impossibilidade de análise de novos protocolos pela CEUA/ICT-CSJC, caso não haja solicitação de prorrogação do prazo para entrega do relatório, com justificativa.

02) Será enviado via Secretaria da CEUA-ICT-CSJC-UNESP, aviso de alerta para envio do RC

São José dos Campos, 19 de novembro de 2020


Prof. Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO
Vice-Coordenadora em exercício