



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

**CARLA DA SILVEIRA E OLIVEIRA BRONZE**

**INFLUÊNCIA DE *SCAFFOLDS* À BASE DE CIMENTO DE  
ALUMINATO DE CÁLCIO INCORPORADOS COM  
CÉLULAS MESENQUIMAIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA:  
*estudo in vivo***

**CARLA DA SILVEIRA E OLIVEIRA BRONZE**

**INFLUÊNCIA DE *SCAFFOLDS* À BASE DE CIMENTO DE  
ALUMINATO DE CÁLCIO INCORPORADOS COM CÉLULAS  
MESENQUIMAIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA: estudo *in vivo***

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

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Inflamação e Reparação tecidual.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana M. R. de Vasconcellos

Coorientadora: Dra. Ivone Regina de Oliveira

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. 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).

Bronze, Carla da Silveira E Oliveira

Influência de scaffolds à base de cimento de aluminato de cálcio, incorporados com células mesenquimais, na regeneração óssea: estudo in vivo / Carla da Silveira E Oliveira Bronze. - São José dos Campos : [s.n.], 2021. 75 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, 2021.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Ivone Regina De Oliveira

1. Scaffolds. 2. Células mesenquimais. 3. Regeneração óssea. 4. Biomateriais. 5. Cimento de aluminato de cálcio. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de , orient. II. De Oliveira, Ivone Regina, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Assoc. Luana M. R. de Vasconcellos** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Marianne Spalding**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Dra. Laís Morandini Carvalho**

Virginia Commonwealth University (VCU)

Department of Biomedical Engineering

Richmond – Virginia, USA

São José dos Campos, 01 de abril de 2021.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu marido Tiago, que exerceu papel fundamental na concretização deste trabalho, me apoiando, ajudando e incentivando sempre.

Aos meus pais Antônio Carlos e Flávia por serem meus maiores exemplos de vida.

Ao meu filhinho Miguel, que esteve juntinho a mim nestes últimos meses e me trouxe tanto amor.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que me deu força, saúde e serenidade durante todo o tempo do mestrado; e que colocou pessoas especiais em meu caminho.

À minha orientadora Profa. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por toda compreensão, comprometimento, dedicação e confiança neste período. Agradeço também pelo carinho e amizade. Muito obrigada!

À minha coorientadora Dra. Ivone Regina de Oliveira, pelo auxílio e parceria neste trabalho.

Ao meu marido Tiago: definitivamente, sem você esta conquista não seria possível. Obrigada por todo envolvimento em todas as etapas do mestrado, pelo apoio, incentivo e ajuda. A certeza de ter você ao meu lado me traz a tranquilidade necessária para que eu consiga realizar o que me proponho. Muito obrigada!

Aos meus pais Antônio Carlos e Flávia, minha irmã Paula, meu cunhado Danilo e meus sobrinhos Matheus e Lucas, por serem meu refúgio e minha paz.

Aos colegas e funcionários que conheci na UNESP e que me auxiliaram de alguma forma neste trabalho; em especial à Juliani que sempre se mostrou disponível, solícita e empenhada em me ajudar, e Sr. Toninho que me ajudou muito no biotério.

À Letícia e Thaís, alunas de iniciação científica pelo auxílio e parceria nos processos do trabalho.

Aos membros da banca avaliadora por aceitarem o convite e contribuírem para melhorias no trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló e vice-diretor Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge de Carvalho, pela oportunidade de realização deste trabalho.

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

*"De tudo, ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos começando,  
A certeza de que é preciso continuar e  
A certeza de que podemos ser interrompidos  
antes de terminar.  
Fazer da interrupção um novo caminho,  
Fazer da queda um passo de dança,  
do medo uma escada,  
do sono uma ponte,  
da procura um encontro".*

(Fernando Sabino – “O Encontro marcado”)

## SUMÁRIO

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                            | 8  |
| RESUMO .....                                                                      | 12 |
| ABSTRACT .....                                                                    | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                | 14 |
| 2 PROPOSIÇÃO .....                                                                | 21 |
| 2.1 Objetivo Geral .....                                                          | 21 |
| 2.2 Objetivos Específicos.....                                                    | 21 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                         | 22 |
| 3.1 Amostras de <i>scaffolds</i> .....                                            | 22 |
| 3.1.1 Caracterização das amostras de <i>scaffolds</i> .....                       | 23 |
| 3.2 Comitê de ética.....                                                          | 24 |
| 3.3 Isolamento das células mesenquimais .....                                     | 25 |
| 3.4 Procedimento cirúrgico.....                                                   | 30 |
| 3.5 Análises histológica e histomorfométrica.....                                 | 34 |
| 3.6 Análise estatística .....                                                     | 37 |
| 4 RESULTADOS.....                                                                 | 39 |
| 4.1 Caracterização dos <i>scaffolds</i> .....                                     | 39 |
| 4.2 Avaliação da incorporação das células mesenquimais aos <i>scaffolds</i> ..... | 41 |
| 4.3 Análise histológica .....                                                     | 42 |
| 4.4 Análise histomorfométrica .....                                               | 55 |
| 5 DISCUSSÃO .....                                                                 | 63 |
| 6 CONCLUSÕES .....                                                                | 68 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                 | 69 |
| ANEXO.....                                                                        | 75 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Influência do tamanho dos poros no processo de osteogênese .....                                | 17 |
| Figura 2 – Amostra do scaffold.....                                                                        | 23 |
| Figura 3 – Obtenção das células mesenquimais.....                                                          | 27 |
| Figura 4 – Células cultivadas, observadas ao microscópio óptico .....                                      | 28 |
| Figura 5 – Scaffolds posicionados na placa de 96 poços com células mesenquimais .....                      | 28 |
| Figura 6 – Distribuição dos scaffolds na placa de 96 poços para incorporação das células mesenquimais..... | 29 |
| Figura 7 – Sequência de atos realizados no procedimento cirúrgico .....                                    | 32 |
| Figura 8 – Linha do tempo dos procedimentos executados .....                                               | 34 |
| Figura 9 – Secção dos fêmures em fragmentos menores e fragmentos já incluídos em blocos de parafina .....  | 35 |
| Figura 10 – Quantificação de tecido ósseo neoformado pelo Programa Image J.....                            | 37 |

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11 – Micrografias eletrônicas de varredura dos arcabouços preparados a partir de impregnação de esponja em suspensões aquosas de cimento de aluminato de cálcio e suas blendas ..... | 40 |
| Figura 12 – Micrografias eletrônica de varredura dos arcabouços após cultura celular por 5 dias .....                                                                                       | 42 |
| Figura 13 – Corte histológico observado no grupo CAC (aumento de 2x) .....                                                                                                                  | 44 |
| Figura 14 – Corte histológico observado no grupo CAC (aumento de 10x) .....                                                                                                                 | 44 |
| Figura 15 – Corte histológico observado no grupo CAC/MSC (aumento de 2x) .....                                                                                                              | 45 |
| Figura 16 – Corte histológico observado no grupo CAC/MSC (aumento de 10x) .....                                                                                                             | 46 |
| Figura 17 – Corte histológico observado no grupo FOSF (aumento de 2x) .....                                                                                                                 | 47 |
| Figura 18 – Corte histológico observado no grupo FOSF (aumento de 10x) ....                                                                                                                 | 47 |
| Figura 19 – Corte histológico observado no grupo FOSF/MSC (aumento de 2x) .....                                                                                                             | 48 |
| Figura 20 – Corte histológico observado no grupo FOSF/MSC (aumento de 10x) .....                                                                                                            | 49 |
| Figura 21 – Corte histológico observado no grupo ZNO (aumento de 2x) .....                                                                                                                  | 50 |

|                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 22– Corte histológico observado no grupo ZNO (aumento de 10x).....                                                                                                                                                                          | 50 |
| Figura 23 – Corte histológico observado no grupo ZNO/MSD<br>(aumento de 2x).....                                                                                                                                                                   | 51 |
| Figura 24 – Corte histológico observado no grupo ZNO/MSD<br>(aumento de 10x).....                                                                                                                                                                  | 52 |
| Figura 25 – Corte histológico observado no grupo ZIRC (aumento de 2x).....                                                                                                                                                                         | 53 |
| Figura 26 – Corte histológico observado no grupo ZIRC (aumento de 10x).....                                                                                                                                                                        | 53 |
| Figura 27 – Corte histológico observado no grupo ZIRC/MSD<br>(aumento de 2x).....                                                                                                                                                                  | 54 |
| Figura 28 – Corte histológico observado no grupo ZIRC/MSD<br>(aumento de 10x).....                                                                                                                                                                 | 55 |
| Figura 29 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da<br>neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) .....                                                                                                                          | 56 |
| Figura 30 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da<br>neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) na interface com o <i>scaffold</i> de CAC, comparando<br><i>scaffold</i> sem células (sc) e com células mesenquimais (cc)..... | 57 |
| Figura 31 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da<br>neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) na interface com o <i>scaffold</i> de FOSF, comparando                                                                         |    |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| <i>scaffold</i> sem células (sc) e com células mesenquimais (cc)..... | 58 |
|-----------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 32 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da neoformação óssea (mm <sup>2</sup> ) na interface com o <i>scaffold</i> de ZNO comparando <i>scaffold</i> sem células (sc) e com células mesenquimais (cc)..... | 59 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 33 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da neoformação óssea (mm <sup>2</sup> ) na interface com o <i>scaffold</i> de ZIRC, comparando <i>scaffold</i> sem células (sc) e com células mesenquimais (cc)..... | 60 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 34 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da neoformação óssea (mm <sup>2</sup> ) na interface da região de inserção dos <i>scaffolds</i> de CAC, FOSF, ZNO e ZIRC, não incorporado com células (sc) e incorporado com células mesenquimais (cc)..... | 61 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

Bronze CS. Influência de *scaffolds* à base de cimento de aluminato de cálcio, incorporados com células mesenquimais, na regeneração óssea: estudo *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

## RESUMO

O cimento de aluminato de cálcio (CAC) tem se tornado um biomaterial de destaque para a neoformação óssea devido às suas propriedades físicas, mecânicas e biocompatibilidade, além de possuir coeficiente de expansão térmica similar ao osso humano. O objetivo neste trabalho foi avaliar o potencial de regeneração óssea de *scaffolds* à base de CAC, incorporados ou não com células mesenquimais (MSC) em defeitos ósseos realizados em fêmures de ratos. Foram produzidos 48 *scaffolds* de CAC e suas blendas fosfato tricálcico (FOSF), óxido de zinco (ZNO) e zircônia (ZIRC), sendo que metade destes foram incorporados com MSC. Vinte e três ratos *Wistar* foram utilizados, sendo 03 para isolamento das MSC e 20 para confecção de defeitos ósseos em ambos os fêmures. Estes, receberam *scaffolds* do mesmo material incorporados com MSC do lado esquerdo e não incorporados do lado direito (n=5); e foram eutanasiados 21 dias após o procedimento cirúrgico. Na análise dos *scaffolds* por microscopia eletrônica de varredura foram verificadas estruturas com poros abertos e interconectados, além de adesão celular em todos os grupos. Na análise histológica, foi observado que todos os grupos apresentaram trabéculas ósseas neoformadas, entremeadas por células da medula óssea e tecido conjuntivo. Na histomorfometria, para os *scaffolds* não incorporados com MSC, observou-se que o grupo ZIRC apresentou maior neoformação óssea e nos *scaffolds* incorporados com MSC, o grupo FOSF demonstrou melhores resultados, ambos exibindo diferença estatística para os demais grupos ( $p < 0,05$ ). Na análise intragrupos, todos os grupos exibiram maior neoformação óssea quando incorporados com MSC, exceto o grupo ZIRC, único que apresentou melhores resultados quando não incorporado com MSC. Concluiu-se que *scaffolds* da blenda ZIRC promovem maior neoformação óssea, porém, quando estes são incorporados com MSC, a blenda FOSF exibe os melhores resultados. A incorporação de MSC influenciou positivamente a neoformação óssea, exceto na blenda ZIRC. Concluiu-se ainda que, dentre todos os grupos, o ZIRC sem células e o FOSF com células mostraram-se mais promissores na neoformação óssea, sem diferença estatística entre eles ( $p < 0,05$ ).

Palavras-chave: *Scaffolds*. Células mesenquimais. Tecido ósseo. Regeneração óssea. Cimento de aluminato de cálcio. Biomateriais.

*Bronze CS. Influence of scaffolds based on calcium aluminate cement, incorporated with mesenchymal cells, in bone regeneration: an in vivo study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.*

## **ABSTRACT**

Calcium aluminate cement (CAC) has become a prominent biomaterial for bone neoformation due to its physical, mechanical and biocompatibility properties, in addition to having a coefficient of thermal expansion similar to human bone. The objective of this work was to evaluate the bone regeneration potential of scaffolds based on CAC, incorporated or not with mesenchymal cells (MSC) in bone defects performed in rat femurs. 48 CAC scaffolds and their tricalcium phosphate (FOSF), zinc oxide (ZNO) and zirconia (ZIRC) blends were produced, half of which were incorporated with MSC. Twenty three Wistar rats were used, being 03 for isolation of MSC and 20 for making bone defects in both femurs. These received scaffolds of the same material incorporated with MSC on the left side and not incorporated on the right side ( $n = 5$ ); and were euthanized 21 days after the surgical procedure. In the analysis of the scaffolds by scanning electron microscopy, structures with open and interconnected pores were verified, in addition to cell adhesion in all groups. In the histological analysis, it was observed that all groups presented bone trabeculae. neoformed, interspersed with bone marrow cells and connective tissue. In histomorphometry, for the scaffolds not incorporated with MSC, it was observed that the ZIRC group showed greater bone neoformation and in the scaffolds incorporated with MSC, the FOSF group demonstrated better results, both showing statistical difference for the other groups ( $p < 0.05$ ). In the intragroup analysis, all groups exhibited greater bone neoformation when incorporated with MSC, except for the ZIRC group, the only one that showed better results when not incorporated with MSC. It was concluded that scaffolds from the ZIRC blend promote greater bone neoformation, however, when these are incorporated with MSC, the FOSF blend exhibits the best results. The incorporation of MSC positively influenced bone neoformation, except in the ZIRC blend. It was also concluded that, among all groups, ZIRC without cells and FOSF with cells were more promising in bone neoformation, with no statistical difference between them ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** Scaffolds. Mesenchymal cells. Bone tissue. Bone regeneration. Calcium aluminate cement. Biomaterials.

## 1 INTRODUÇÃO

A Medicina Regenerativa é um campo de pesquisa interdisciplinar emergente, cujas aplicações clínicas são focadas no reparo, substituição ou regeneração de órgãos, tecidos ou células. Possui a finalidade de restaurar as funções mecânicas e biológicas perdidas ou prejudicadas resultantes de diversos fatores, como traumas, tumores, infecções, defeitos congênitos, doenças degenerativas e envelhecimento. Este campo utiliza a combinação de várias abordagens tecnológicas que, além das terapias tradicionais de transplantes de órgãos, incluem o uso de terapia gênica, transplante de células-tronco e bioengenharia de tecidos (Mason, Dunnill, 2008).

A bioengenharia de tecidos é uma vertente multidisciplinar da Medicina Regenerativa, que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde com a finalidade de acelerar a regeneração e o reparo de tecidos danificados (Tabata, 2009). Essa ciência visa desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida bem como o aprimoramento de terapias já existentes (Kaigler, Mooney, 2001; Sachlos et al., 2003). Biomaterial é toda substância ou combinação de substâncias, naturais ou sintéticas, que não sejam drogas ou fármacos e que interagem com sistemas biológicos, tratando, aumentando ou substituindo quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (Donaruma, 1988).

Atualmente, com o aumento da expectativa de vida da população, existe uma maior chance de o indivíduo apresentar doenças degenerativas, desenvolver condições patológicas que causem perda de tecidos como por exemplo, as neoplasias e tumores e há maior probabilidade dele se expor a traumas e fraturas ósseas. Neste contexto, um dos maiores desafios da bioengenharia é o

desenvolvimento de biomateriais que auxiliem na recuperação do tecido ósseo (Khosla, Hofbauer, 2017).

As modalidades de tratamento convencionais utilizadas na reconstrução do tecido ósseo incluem enxertos de diferentes origens, tais como o enxerto autógeno, o qual é fornecido pelo próprio indivíduo; o alógeno, obtido de indivíduos da mesma espécie, porém, geneticamente diferentes e os xenógenos, obtidos de um doador de outra espécie (Precheur, 2007; Ratner et al., 2013). O enxerto autógeno é considerado o padrão ouro a ser utilizado, porém apresenta problemas de comorbidades e quantidade limitada de osso disponível (Precheur, 2007). Quanto ao uso dos enxertos alógeno e xenógeno, existem riscos de rejeição e infecção associados (Ratner et al., 2013). Em vista destas limitações e com objetivo de superá-las, novos biomateriais sintéticos vêm sendo desenvolvidos nas últimas décadas visando substituir o tecido ósseo perdido ou danificado (Kargozar et al., 2017; Maglione et al., 2017; Moraes et al., 2017, Oliveira et al., 2016; Ratner et al., 2013).

O desenvolvimento de biomateriais sintéticos com o intuito de promover e acelerar a regeneração do tecido ósseo como alternativa aos enxertos ósseos convencionais é relevante, pois os biomateriais sintéticos não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas e são disponibilizados comercialmente (Donaruma, 1988). Os biomateriais podem gerar novo osso por meio de três mecanismos: osteocondução, osteoindução e osteogênese. A osteocondução é o mecanismo no qual o enxerto ósseo ou arcabouço previamente instalado fornece suporte para a proliferação celular e estimula a neoformação óssea para seu interior e para regiões circunjacentes a partir da proliferação de células ósseas progenitoras. A osteoindução é a capacidade do enxerto de estimular as células mesenquimais ou precursoras ósseas existentes nos tecidos adjacentes do sítio receptor a se diferenciarem em células ósseas que formarão novo osso. E a osteogênese é a formação óssea por

meio de osteoblastos e células osteoprogenitoras vivas transplantadas no enxerto, que possuem capacidade de atrair outras células viáveis, que iniciarão o reparo ósseo (Chau, Mobbs, 2009).

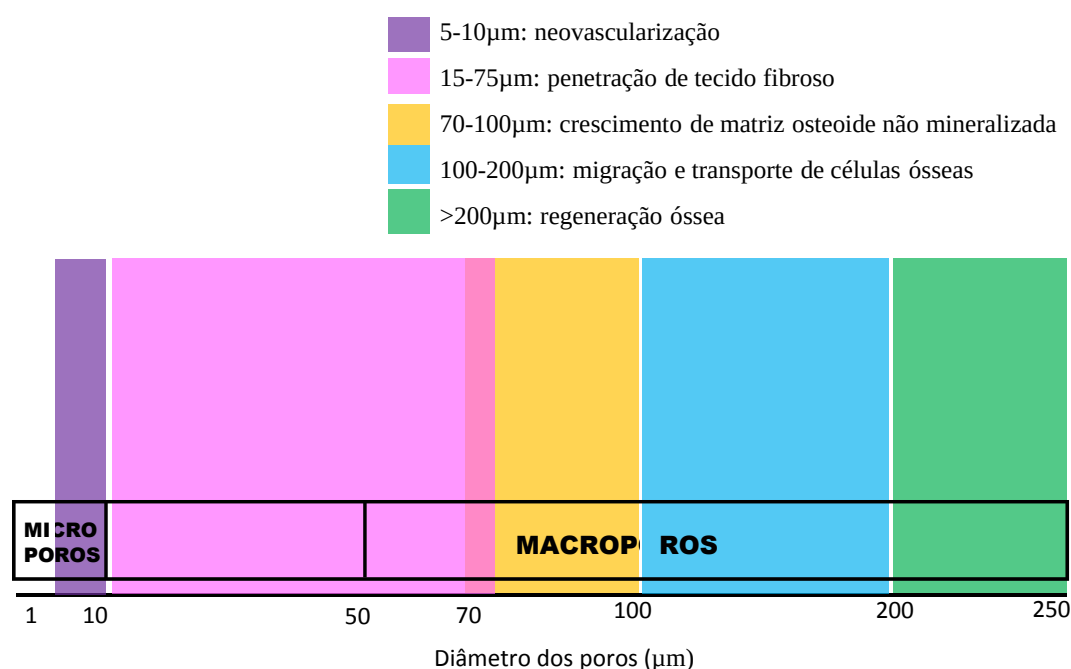
Os biomateriais utilizados como substitutos ósseos devem possuir algumas características, tais como serem biocompatíveis e osteocondutivos, viabilizando a migração de células osteoprogenitoras para o sítio lesado (Chan et al., 2009; Liu, Ma, 2004; Wan et al., 2006). Além disso, precisam proporcionar uma estrutura física adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (Precheur, 2007).

Existem diversas formas de apresentação e configuração espacial dos biomateriais sintéticos, tais como pós, blocos sólidos, membranas, hidrogéis, esponjas e *scaffolds*. Os biomateriais sintéticos ainda podem possuir variadas origens e composições químicas (Abukawa et al., 2006; Giannoudis et al., 2005). Biomateriais na configuração de *scaffolds* são aqueles que exibem o formato de arcabouços tridimensionais porosos, servindo de molde para a formação do novo tecido, podendo apresentar propriedades bioativas e serem biodegradáveis (Liu, Ma, 2004). Os *scaffolds* devem apresentar estrutura física contendo poros interconectados, de forma a mimetizar os meios físicos e químicos da matriz extracelular saudável, com a finalidade de guiar a migração, diferenciação e a proliferação celular (Taylor et al., 2009; Vunjak-Novakovic, Kaplan, 2006). Os *scaffolds* normalmente possuem propriedades osteocondutivas, preenchem espaços vazios e fornecem suporte mecânico, unindo partes ósseas separadas por um defeito ósseo e podem apresentar propriedades osteoindutivas ou osteogênicas (Blom, 2007).

O tamanho e a quantidade de poros dos *scaffolds* exercem importante influência na progressão da osteogênese (Hutmacher et al., 2007; Karageorgiou, Kaplan, 2005), sendo que maior quantidade e tamanho de poros resultam em maior crescimento ósseo (Fook et al., 2010). Dimensões de poros de 5µm

permitem a neovascularização; poros um pouco maiores (entre 15-75  $\mu\text{m}$ ) permitem a penetração de tecido fibroso no interior do *scaffold*, mas não de tecido ósseo; e poros de 70-100  $\mu\text{m}$  possibilitam crescimento de matriz osteóide não mineralizada (Hutmacher et al., 2007). O tamanho mínimo de poros necessário para migração, crescimento e transporte de células ósseas é de 100-200 $\mu\text{m}$ , sendo que acima de 200-350 $\mu\text{m}$ , a regeneração óssea é facilitada (Fook et al., 2010; Hutmacher et al., 2007) (Figura 1).

Figura 1 – Influência do tamanho dos poros no processo de osteogênese



Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora a macroporosidade (tamanho do poro >50  $\mu\text{m}$ ) possua um forte impacto nos resultados osteogênicos, a microporosidade (tamanho de poro < 10  $\mu\text{m}$ ) também desempenha um importante papel, pois aumenta a área de superfície,

propiciando à maior adsorção de proteínas indutoras de osso (Karageorgiou, Kaplan, 2005). A interconexão entre estes poros desempenha papel fundamental na migração e proliferação dos vasos sanguíneos, condição primordial para o crescimento tecidual. Além de fornecer nutrientes, a vascularização irá coordenar a atividade das células ósseas e sua migração para o sítio de implantação (Mastrogiacomo et al., 2006).

*Scaffolds* à base cimento de aluminato de cálcio (CAC) têm se mostrado promissores para a regeneração óssea, uma vez que tendem a liberar íons de cálcio devido à decomposição do aluminato de cálcio hidratado, favorecendo a diferenciação osteogênica e a mineralização durante o processo de regeneração óssea (Garcia et al., 2014; Moraes et al., 2017). Além disso, este material é capaz de formar material semelhante à apatita ou hidroxiapatita carbonatada em suas superfícies, caracterizando sua bioatividade e melhorando sua osseointegração (Loof et al., 2008; Oliveira et al., 2013). Estas características supracitadas, somadas às suas características de biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e coeficiente de expansão térmica semelhante ao osso humano (Oliveira, 2010), justificaram a escolha deste material para estudo neste trabalho.

Existem diferentes tipos de partículas que vêm sendo utilizadas de forma associada a outros materiais, visando melhorar as propriedades destes na reparação de defeitos ósseos. Trabalhos recentes associaram fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia ao CAC (de Las Nieves et al., 2019; de Oliveira et al., 2017; Henkel et al., 2013; Oliveira et al., 2016). O fosfato tricálcico se mostra como uma biocerâmica biocompatível e bioativa; o óxido de zinco apresenta propriedades bactericidas e a zircônia, além de adequada biocompatibilidade, apresenta boa resistência à corrosão, compressão e desgaste (Moldovan et al., 2015; He et al., 2008). Estudos demonstraram que a mistura do CAC com essas partículas de fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia, contendo 4%-p destes diferentes compostos apresentaram resistência a compressão similar ao osso

trabecular (2-12 MPa) (de Las Nieves et al., 2019; Henkel et al., 2013). Além disso, todas estas composições, denominadas blendas, mostraram resultados positivos quanto à viabilidade de células osteoblásticas, capacidade de induzir a mineralização e se apresentaram bioativas quando em contato com fluido corporal simulado em estudo *in vitro* (de Oliveira et al., 2017; Oliveira et al., 2016; de Las Nieves et al., 2019).

Avanços nas ciências e tecnologias médicas trouxeram o conceito de medicina regenerativa e engenharia de tecidos associados à terapia com células-tronco, que atualmente apresenta-se como uma modalidade de tratamento atraente e promissora no campo da reconstituição de tecidos (Ikebe, Suzuki, 2014; Squillaro et al., 2016). Em termos gerais, existem dois tipos principais de células-tronco: as embrionárias e as não embrionárias. Células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto e são pluripotentes, podendo se diferenciar em células de todas as três camadas germinativas (endoderma, mesoderma e ectoderma). As células-tronco não embrionárias, principalmente células-tronco adultas, podem ser isoladas de vários tecidos como a medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo; e são multipotentes, podendo se diferenciar em vários tipos celulares (Maitra et al., 2004; Souza et al., 2010; Wang et al., 2012). Atualmente as células mais comumente usadas em Medicina regenerativa são as células-tronco adultas derivadas da medula óssea (Ikebe, Suzuki, 2014; Souza et al., 2010; Squillaro et al., 2016; Wang et al., 2012).

O aumento do interesse pela terapia celular se deve ao potencial de multiplicação, autorrenovação e diferenciação das células mesenquimais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em células de diferentes linhagens, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, mioblastos e células de tendões, apresentando potencial para melhorar o reparo ou regeneração de tecidos danificados (Squillaro et al., 2016; Trohatou, Roubelakis, 2017). Estudos têm utilizado biomateriais sintéticos associados às células mesenquimais visando melhorar a diferenciação e o

crescimento ósseo na região de defeitos ósseos e têm demonstrado resultados promissores (Kargozar et al., 2017; Maglione et al., 2017). Ensaios pré-clínicos também demonstraram que a associação de células mesenquimais a biomateriais aumenta a capacidade osteogênica (Kargozar et al., 2017; Yuan et al., 2015; Zhang et al., 2019).

Dentro deste contexto, o objetivo neste estudo foi verificar se a utilização de *scaffolds* à base de cimento de aluminato de cálcio e suas blendas (fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia), incorporados ou não com células mesenquimais podem influenciar, favorecer ou estimular a regeneração do tecido ósseo, produzindo informações importantes quanto ao potencial da utilização destes biomateriais em terapia celular na regeneração tecidual.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral neste estudo foi avaliar a influência da utilização de *scaffolds* à base de cimento de aluminato de cálcio e suas blendas (fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia) na regeneração óssea, em defeitos ósseos realizados em fêmures de ratos.

### 2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar a influência de *scaffolds* à base de cimento de aluminato de cálcio e suas blendas (fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia), na regeneração óssea, por meio da quantificação e análise do tecido ósseo neoformado na interface entre osso e *scaffold*, nos defeitos ósseos;
- b) comparar a influência da incorporação de células mesenquimais (MSC) nos *scaffolds* com *scaffolds* não incorporados com estas células.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras de *scaffolds*

O presente estudo foi realizado em conjunto com a Professora Dra. Ivone Regina de Oliveira, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Foram produzidos 48 *scaffolds* por meio da técnica da réplica da esponja polimérica desenvolvida por Schwartzwalder e Somers em 1963. Esta técnica consiste na impregnação de esponjas de poliuretano com solução cerâmica seguida de tratamento térmico para a queima da parte orgânica da esponja (de Las Nieves et al., 2019).

Os *scaffolds* destinados a este trabalho foram produzidos a partir de esponjas poliméricas Scotch Brite, da marca 3M, contendo 49 poros por polegada linear. Estas, foram impregnadas por suspensões cerâmicas aquosas contendo teor de sólidos de 60%-p de cimento de aluminato de cálcio, seguida de tratamento térmico a 1300°. Para a formação das blendas, foram adicionados 4% em peso de aditivos (fosfato tricálcico, óxido de zinco ou zircônia) no cimento de aluminato de cálcio. Todos os *scaffolds* apresentaram medida final de 4,0 mm de diâmetro por 4,0 mm de comprimento (Figura 2).

A distribuição de tamanho dos poros e a porosidade total dos *scaffolds* foram avaliadas previamente a este estudo por meio de porosimetria de intrusão de mercúrio e todos eles, independentemente da composição, apresentaram porosidade entre 50 e 60 % e distribuição dos poros com picos nos diâmetros: 0,015; 30 (microporos) e principalmente, 200  $\mu\text{m}$  (macroporos) (de Las Nieves et al., 2019).

Estes *scaffolds* também foram previamente analisados quanto à bioatividade e comportamento em cultivo celular (adesão celular, viabilidade celular, produção de proteína, diferenciação em células ósseas e formação de nódulos de mineralização) e apresentaram resultados positivos (de Las Nieves et al., 2019).

Figura 2 – Amostra do *scaffold*



Fonte: Elaborada pelo autor.

### **3.1.1 Caracterização das amostras de *scaffolds***

Para analisar a topografia superficial das amostras, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) (EVO/MA10), do Laboratório Central Analítica Multiusuário do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP. As amostras foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (*stub*), auxiliado por uma fita dupla face de carbono (3M, Sumaré SP, Brasil) e metalizadas com uma fina camada de ouro por *sputtering* na máquina metalizadora (EMITECH K550X, Sputter Coater, Qrionum Technologies), por

130 s. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES).

### 3.2 Comitê de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, sob o número 012/2019 (ANEXO 1), e foi realizado de acordo com os princípios éticos para experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA). Este trabalho também seguiu as diretrizes preconizadas pelo ARRIVE (*Animal Research Reporting of In Vivo Experiments*) (Percie et al., 2020).

Foram utilizados para o desenvolvimento deste estudo 23 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), com aproximadamente 90 dias de vida, pesando cerca de 350g, provenientes do Biotério Central da Unesp situado em Botucatu. Todos os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos no Biotério do ICT/Unesp em gaiolas separadas: uma gaiola com 3 animais e quatro gaiolas com 5 animais em cada, com temperatura em torno de 20°C. Após cerca de 45 dias de adaptação ao ambiente, com ciclos diários de 12 horas alternando entre período de luz e período noturno, foi iniciado o experimento.

Três animais foram utilizados para o isolamento das células mesenquimais e os outros vinte animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, os quais receberam os *scaffolds* à base de CAC, associados ou não a células-mesenquimais. O grupo CAC foi definido como grupo controle. O quadro 1 demonstra os grupos deste estudo.

Quadro 1- Divisão dos grupos analisados

| GRUPOS   |                                              | Preenchimento dos defeitos ósseos |                                             |
|----------|----------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>1</b> | Cimento de aluminato de cálcio<br>(CONTROLE) | <u>Fêmur Esquerdo</u> →           | Scaffold incorporado com células (CAC/MSC)  |
|          |                                              | <u>Fêmur Direito</u> →            | Scaffold NÃO incorporado com células (CAC)  |
| <b>2</b> | Blenda CAC<br>+<br>Fosfato tricálcico        | <u>Fêmur Esquerdo</u> →           | Scaffold incorporado com células (FOSE/MS)  |
|          |                                              | <u>Fêmur Direito</u> →            | Scaffold NÃO incorporado com células (FOSE) |
| <b>3</b> | Blenda CAC<br>+<br>Zircônia                  | <u>Fêmur Esquerdo</u> →           | Scaffold incorporado com células (ZIRC/MS)  |
|          |                                              | <u>Fêmur Direito</u> →            | Scaffold NÃO incorporado com células (ZIRC) |
| <b>4</b> | Blenda CAC<br>+<br>Óxido de zinco            | <u>Fêmur Esquerdo</u> →           | Scaffold incorporado com células (ZNO/MS)   |
|          |                                              | <u>Fêmur Direito</u> →            | Scaffold NÃO incorporado com células (ZNO)  |

Fonte: Elaborado pelo autor.

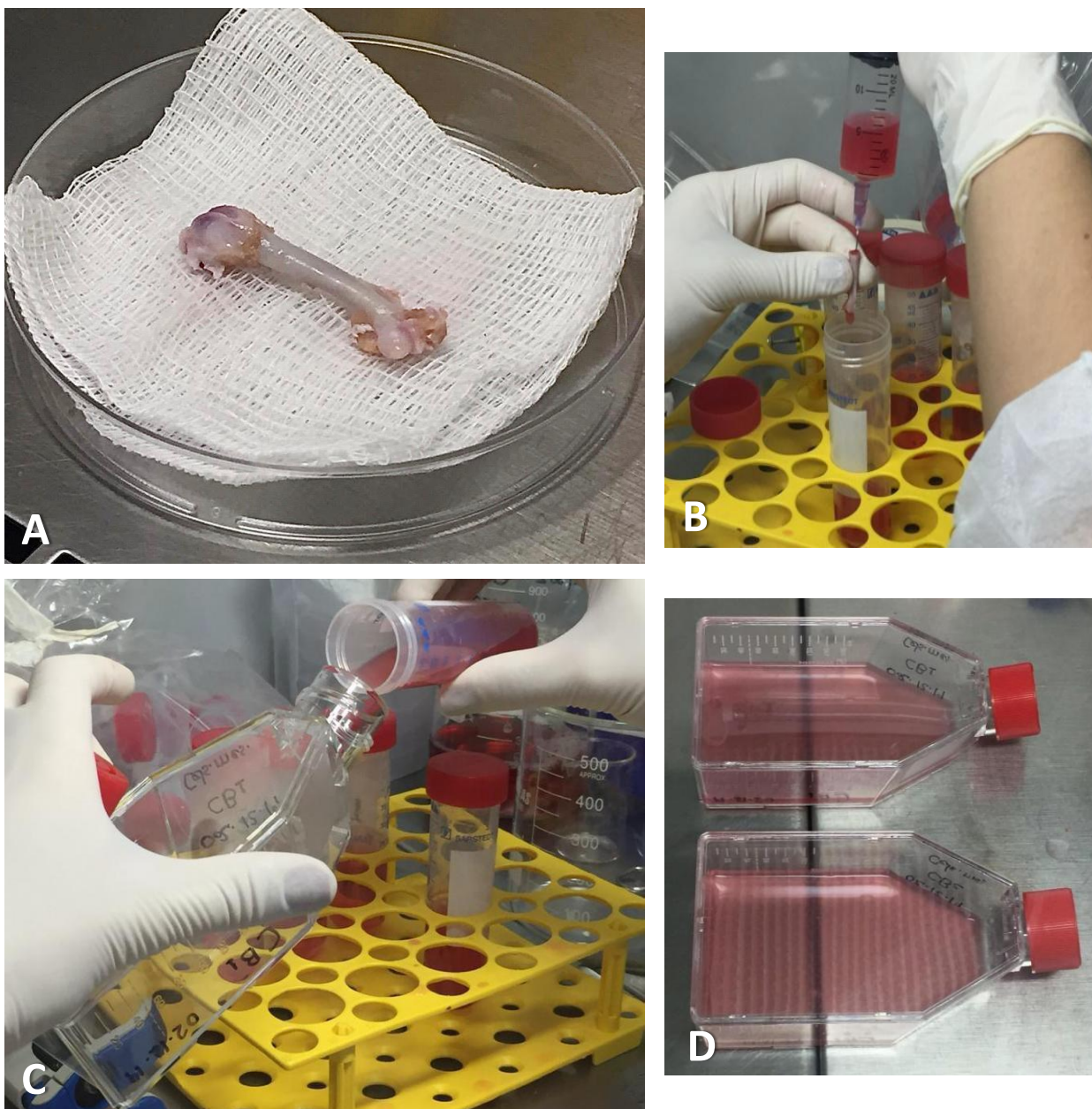
### 3.3 Isolamento das células mesenquimais

As células mesenquimais foram obtidas da medula óssea dos fêmures de 3 ratos *Wistar*, que apresentavam peso aproximado de 350g e 3 meses de idade, conforme descrito em Maniopoulos et al. (1988). Inicialmente, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico utilizando a combinação dos

fármacos cloridrato de xilazina (Anasedan<sup>®</sup> - Vetbrands, Jacareí - Brasil) e de cloridrato de Ketamina (Dopalen<sup>®</sup> – Vetbrands, Jacarei - Brasil). Foi calculada como dose excessiva, o triplo da dose recomendada para o peso do animal. A administração foi por via intramuscular, e após confirmação da instalação da anestesia, foi realizada a decapitação.

Posteriormente foi realizada a remoção dos 06 fêmures, que foram colocados em um tubo falcon de 50 mL contendo a solução de transporte composta por 95% de alfa MEM filtrado e 5 % de gentamicina. Após o transporte para o fluxo laminar e limpeza dos fêmures com clorexidina 0,12%, as células da medula óssea foram isoladas e inseridas em frascos para cultura celular de 250 mL e 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil) com meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (500 µg/mL) (Gibco). A seguir, os frascos foram incubados em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 3). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). Após a confluência das células, que se deu aproximadamente sete dias após o isolamento (Figura 4), as células foram liberadas enzimaticamente e plaqueadas na densidade de 2x10<sup>4</sup> de células em cada poço da microplaca de 96 poços (Kasvi) contendo os *scaffolds* (Figura 5), que foram previamente esterilizados em luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos.

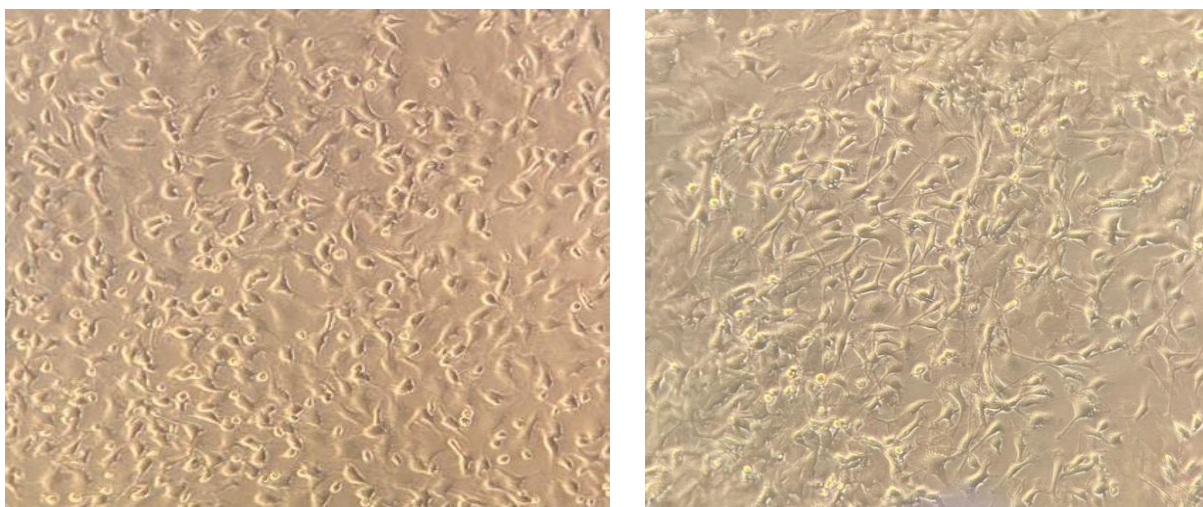
Figura 3 – Obtenção das células mesenquimais



Legenda: Obtenção das células mesenquimais do fêmur: A) Fêmur extraído do animal; B) Obtenção das células mesenquimais da medula óssea do fêmur; C) Armazenamento do meio de cultura contendo células mesenquimais; D) Meio de cultura com células pronto para ir à estufa.

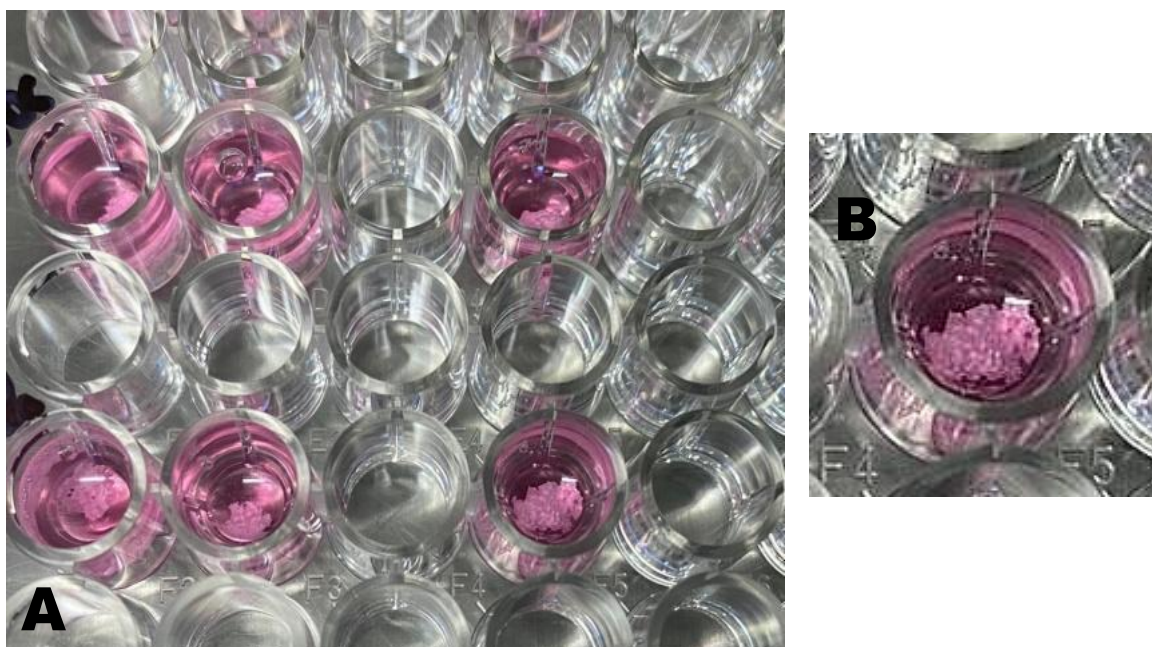
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 – Células cultivadas, observadas ao microscópio óptico



Legenda: Células após isolamento e cultura, vistas por microscópio óptico.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5 – *Scaffolds* posicionados na placa de 96 poços com células mesenquimais



Legenda: A) *Scaffolds* imersos em meio de cultura contendo células mesenquimais, B) Vista mais aproximada destes *scaffolds* imersos em meio de cultura.  
Fonte: Elaborada pelo autor.



realizada a inserção destes nos defeitos ósseos *in vivo*, conforme descrito no próximo tópico.

Para comprovar a presença e adesão das células, 02 *scaffolds* de cada grupo foram submetidos à análise em microscópio eletrônico de varredura após 5 dias do plaqueamento. Para esta análise, cada poço foi lavado duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS), pH 7,4. Em seguida, uma solução fixadora, composta de glutaraldeído, paraformaldeído e PBS foi mantida nos poços por 15 minutos. Após este tempo, a solução fixadora foi removida e os poços foram lavados duas vezes com PBS. Após este procedimento, os *scaffolds* foram desidratados em soluções crescentes de etanol (25, 50, 70, 90, 95, 100%), por 10 min em cada concentração. O álcool foi então, removido e a placa foi deixada em repouso em temperatura ambiente para secar.

Após a fixação e secagem dos *scaffolds*, foi realizada a análise por MEV (EVO/MA10), no Laboratório Central Analítica Multiusuário do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP. As amostras foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (*stub*), auxiliado por uma fita dupla face de carbono (3M, Sumaré SP, Brasil) e metalizadas com uma fina camada de ouro por *sputtering* na máquina metalizadora (EMITECH K550X, Sputter Coater, Qrionum Technologies), por um período de 130 s. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES) em diversas magnificações.

### **3.4 Procedimento cirúrgico**

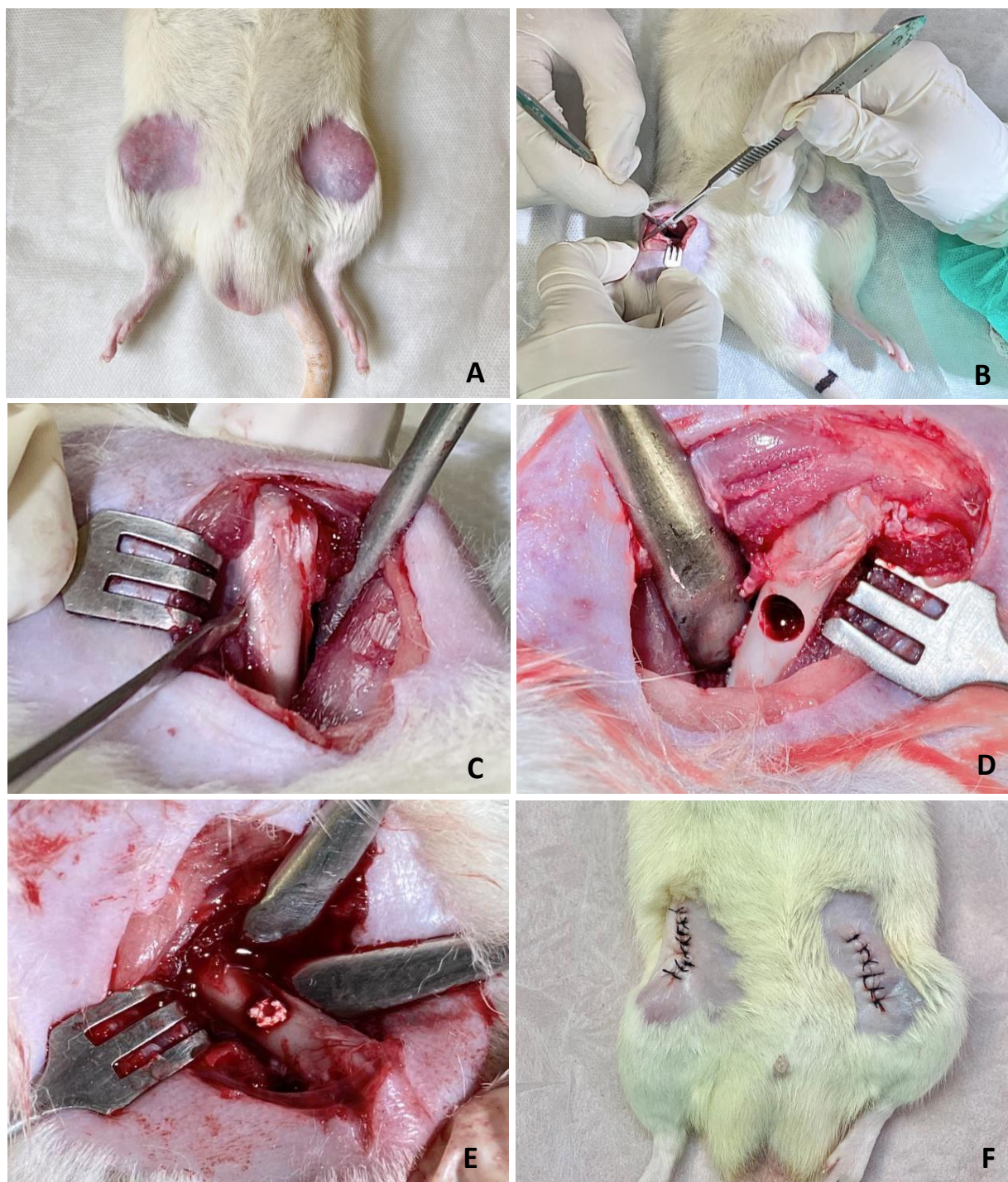
Nos ensaios *in vivo* deste estudo, foram realizados defeitos ósseos nos fêmures direitos e esquerdos de 20 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), com aproximadamente 90 dias, pesando cerca de 350g.

Inicialmente, os animais foram pesados e foi realizada a anestesia por via intramuscular pela combinação dos fármacos cloridrato de xilazina (Anasedan<sup>®</sup> - Vetbrands, Jacareí - Brasil) e de cloridrato de Ketamina (Dopalen<sup>®</sup> – Vetbrands, Jacareí - Brasil) de acordo com o peso do animal.

Em seguida a estes procedimentos, foi realizada a tricotomia e a antisepsia com solução de álcool iodado na região medial dos fêmures. Foi realizada incisão com lâmina de bisturi número 15 para viabilizar o acesso ao tecido ósseo e retalho total foi deslocado. Com uma broca esférica, foi realizado um defeito ósseo de 4,0mm de diâmetro em ambos os fêmures, sob irrigação abundante com cloreto de sódio a 0,9%, com a finalidade de evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso (Figura 7).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de acordo com o material de preenchimento do defeito ósseo, conforme descrito previamente no Quadro 1. O local do defeito ósseo do fêmur direito foi preenchido com o *scaffold* sem células incorporadas, enquanto que no fêmur esquerdo, o preenchimento foi com o *scaffold* incorporado com células mesenquimais. Os *scaffolds* inseridos nos fêmures direito e esquerdo dos ratos, foram do mesmo material, ou seja, do mesmo tipo de blenda ou do aluminato de cálcio homogêneo, visando evitar qualquer efeito sistêmico que o material pudesse apresentar (Figura 7). Em todos os animais, o retalho foi reposicionado e suturado com fio de seda nº 4 (Ethicon/Johnson & Johnson) (Figura 7).

Figura 7 – Sequência de atos realizados no procedimento cirúrgico



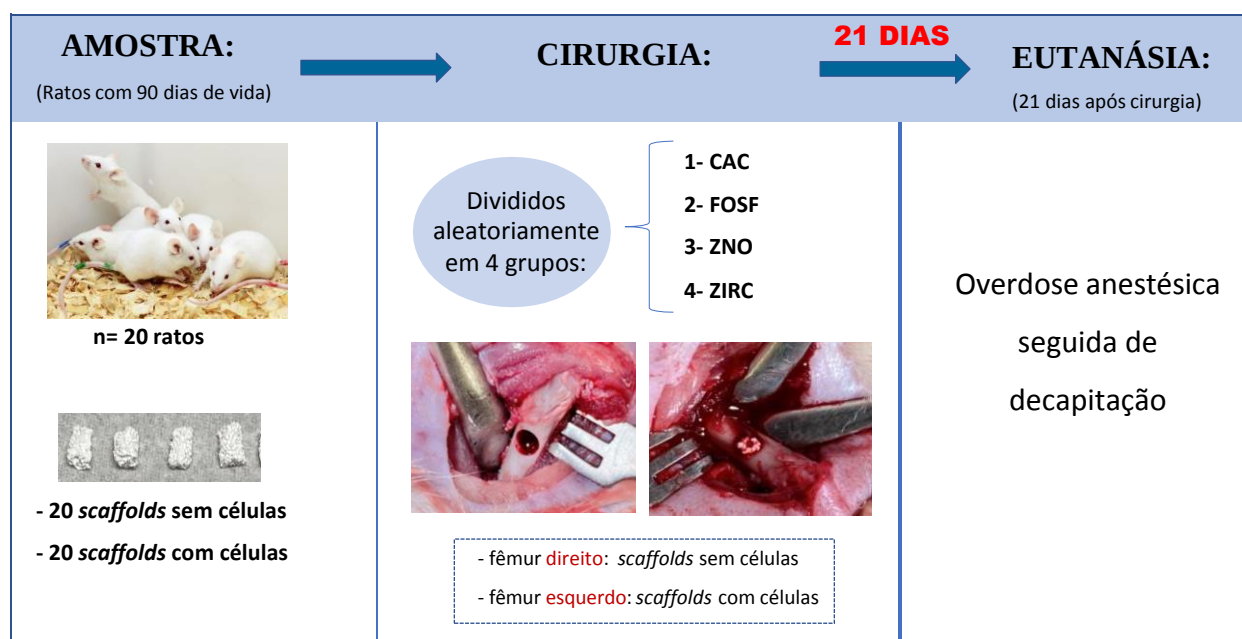
Legenda: Procedimento cirúrgico: A) Tricotomia da região medial dos fêmures; B) Incisão com lâmina de bisturi; C) Fêmur exposto e tecidos moles divulsionados; D) Defeito ósseo; E) *Scaffold* inserido no interior do defeito ósseo; F) Tecidos reposicionados e suturados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a cirurgia, todos os animais foram submetidos à analgesia via subcutânea durante 5 dias, com Tramadol na dose de 8mg/kg, administrado de 12 em 12 horas. O tramadol se combina com os receptores opioides do cérebro e bloqueia a transmissão de estímulos de dor, não exibindo efeito anti-inflamatório como a maioria dos analgésicos (Lamana et al., 2017).

Os animais foram recolocados em gaiolas contendo 5 animais, com ração e água *ad libitum*, em ambiente com exaustão do ar, e monitorados até o prazo da eutanásia de 21 dias (Figura 8). Todos os animais foram eutanasiados com dose excessiva da solução combinada dos fármacos cloridrato de xilazina (Anasedan® - Vetbrands, Jacareí - Brasil) e cloridrato de Ketamina (Dopalen® – Vetbrands, Jacareí - Brasil) e após confirmação da instalação da anestesia, foi realizada a decapitação. Em seguida, os fêmures foram removidos para análises histológica e histomorfométrica. Os fêmures foram acondicionados em formol tamponado a 10%, por período mínimo de 48 horas para fixação dos tecidos e posteriormente foram submetidos ao procedimento histológico convencional.

Figura 8 – Linha do tempo dos procedimentos executados



Fonte: Elaborada pelo autor.

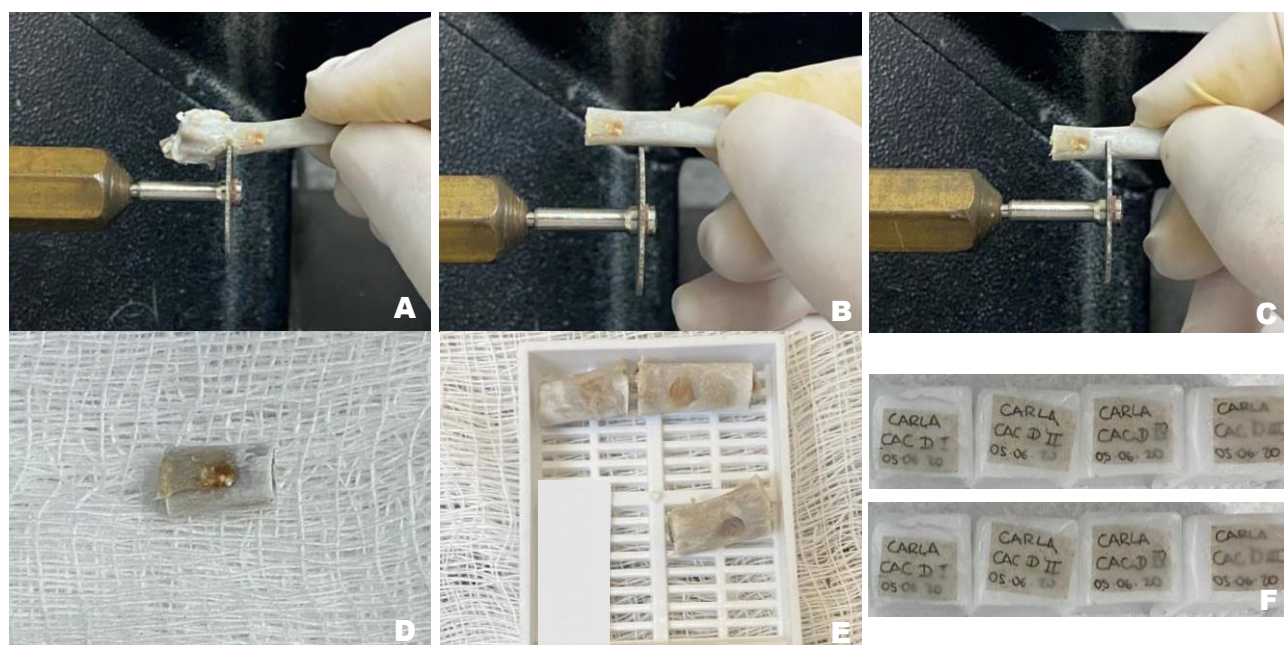
### 3.5 Análises histológica e histomorfométrica

Após a fixação com formol, os fêmures contendo os defeitos ósseos foram cortados (Figura 9) em fragmentos ósseos menores com disco de *carborundum* posicionado no torno de alta rotação (Nevoni, Brasil).

A seguir, foram submetidos à descalcificação pela técnica de desmineralização no Laboratório de Tecido Ósseo do ICT/Unesp, utilizando o ácido fórmico 20% por um período aproximado de 90 dias. Posteriormente, as peças foram seccionadas transversalmente no centro da região de inserção do *scaffold* e os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina utilizando o processador de tecidos automático (LEICA, TP 1020, EUA). Finalmente as peças foram emblocadas em parafina e submetidas à técnica laboratorial de rotina para

o preparo das lâminas histológicas. Foram confeccionadas 5 lâminas para cada fragmento ósseo. As lâminas foram preparadas obtendo-se cortes semi-seriados de 5 $\mu$ m, os quais foram coradas por hematoxilina e eosina (HE - Merck & Co, Inc).

Figura 9 – Secção dos fêmures em fragmentos menores e fragmentos já incluídos em blocos de parafina



Legenda: A) Remoção epifisária do fêmur com disco de *carborundum*; B) Fêmur adequadamente posicionado para secção óssea; C) Secção óssea parcialmente realizada; D) Fragmento ósseo com dimensões reduzidas, contendo a região de inserção do *scaffold*; E) Fragmentos ósseos no interior do cassete para descalcificação; F) Fragmentos ósseos incluídos em blocos de parafina.

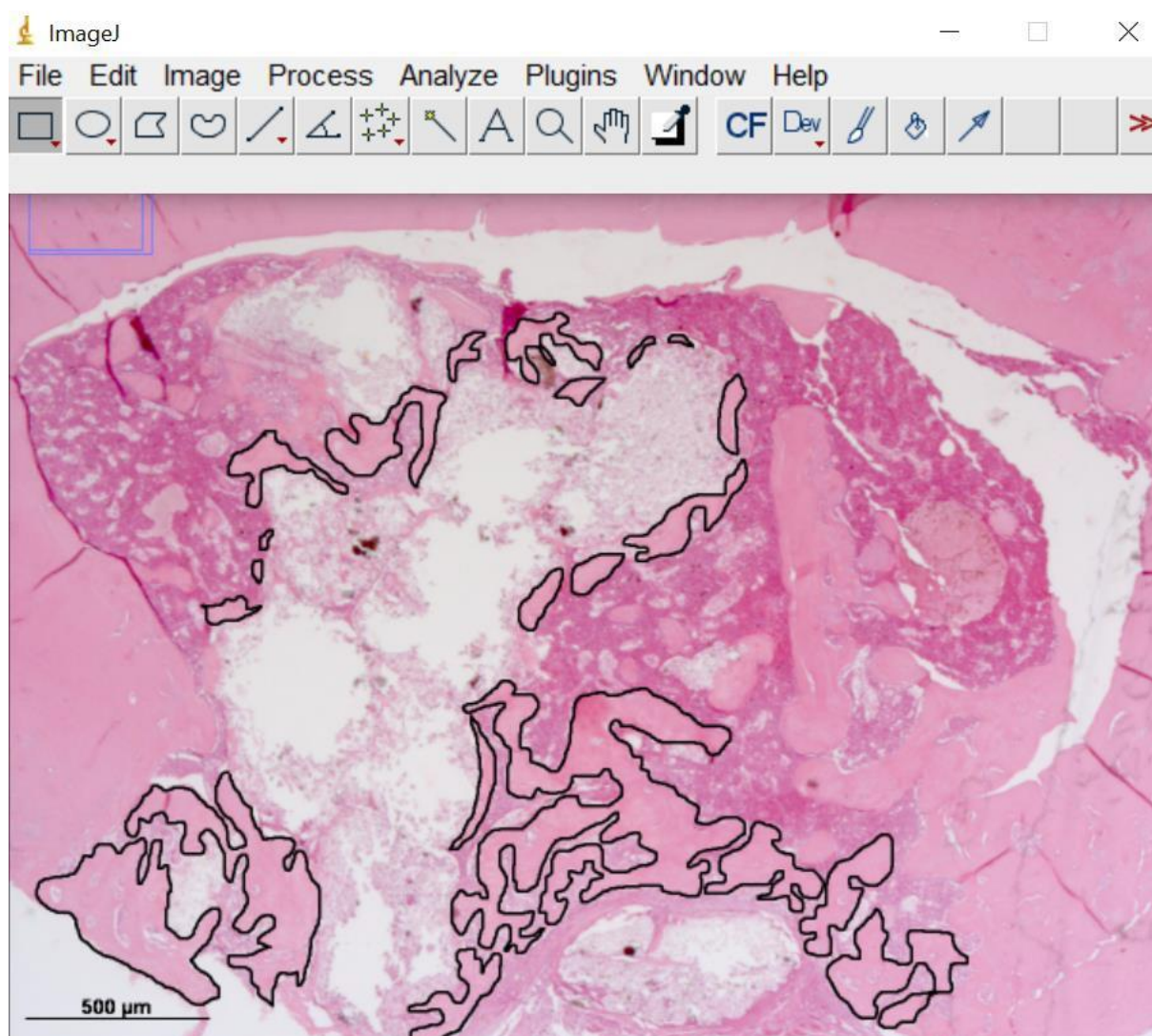
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, avaliando-se a formação do tecido de granulação, a neoformação óssea, o arranjo de trabéculas ósseas e a maturação óssea até a remodelação final.

Para a análise histomorfométrica, os cortes histológicos foram fotografados com microscópio de luz Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss do Brasil), com câmera digital acoplada Canon, modelo *Power Shot A640*. Foram obtidas imagens digitais (formato JPEG) com aumento de 2x na região do defeito, as quais foram utilizadas para análise quantitativa do tecido de reparação óssea. Estas imagens foram analisadas por meio do *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD), que possibilita a quantificação do osso neoformado na região de inserção do *scaffold*. A área das regiões correspondentes ao tecido de reparação óssea neoformado foi calculada em microns<sup>2</sup> e foi realizada a média dos valores obtidos para cada grupo, os quais foram avaliados por análise estatística.

A figura 10 ilustra como foi analisada a imagem obtida do corte histológico no programa *Image J*.

Figura 10 – Quantificação de tecido ósseo neoformado pelo Programa *Image J*



Legenda: Análise histomorfométrica através do programa *Image J*. Em preto, delimitação de uma área de neoformação óssea. Grupo blenda fosfato.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.6 Análise estatística

Conforme estudo prévio do grupo de pesquisa (Santana-Melo et al., 2017), o número de animais foi estimado por meio de um cálculo estatístico a partir da

análise de grupo simples considerando a estimativa de confiabilidade (Log  $\beta$ ), estimativa de erro da amostra (Log  $p$ ) e a margem de perda de animais durante o experimento. A formula usada foi:

$$n = \frac{\log \beta}{\log p} \times 1.2 \therefore = \frac{\log 0.6}{\log 0.5} \times 1.2 = 5,18 \approx 5 \text{ animais}$$

Após o cálculo obteve-se um número aproximado de 5,18 animais por grupo. Dessa forma, foram utilizados neste estudo, 5 animais por grupo.

Os dados coletados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Confirmada a distribuição normal dos dados, estes foram submetidos à análise de variância (Anova) para comparação intergrupos e complementado pelo teste de Tukey quando necessário, com a finalidade de verificar as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Para análise intragrupo (*scaffold* incorporado com células e não incorporado com células), foi utilizado teste *t* para verificar as diferenças. Os testes foram realizados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5%.

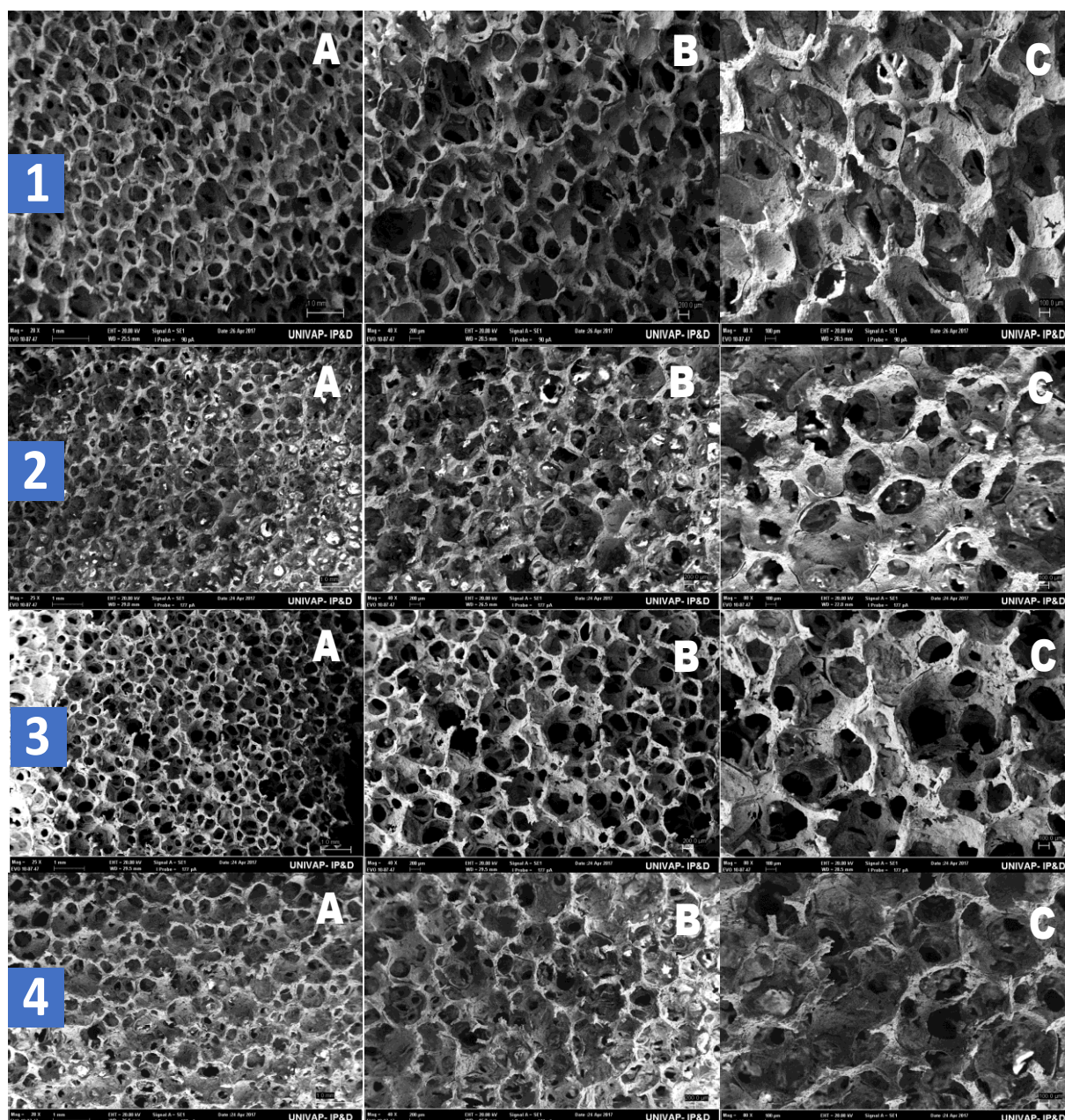
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos *scaffolds*

Para avaliação da topografia superficial das amostras dos *scaffolds* de CAC e suas blendas, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV EVO/MA10). Nesta análise, foi observada a aparência tridimensional característica dos *scaffolds* e foi verificado que todos eles, independentemente da composição, apresentaram estruturas altamente porosas com poros abertos e definidos. Estes poros apresentaram-se interconectados e de diferentes tamanhos, nas magnificações, conforme demonstrado na figura 11.

Estes resultados mostraram que o *design* destes *scaffolds* é adequado para sua utilização como biomaterial substituto do tecido ósseo, uma vez que mimetizou de forma tridimensional a matriz extracelular, o que possibilita a migração e multiplicação celular no interior dessa rede de poros interconectados.

Figura 11 – Micrografias eletrônicas de varredura dos arcabouços preparados a partir de impregnação de esponja em suspensões aquosas de cimento de aluminato de cálcio e suas blendas



Legenda: Micrografias eletrônicas de varredura para arcabouços de 1) Cimento de aluminato de cálcio e suas blendas contendo 4%-p de: 2) Fosfato tricálcico, 3) Zircônia, 4) Óxido de zinco. Magnificações: A: 28 ou 25x; B: 40x; C: 80x.

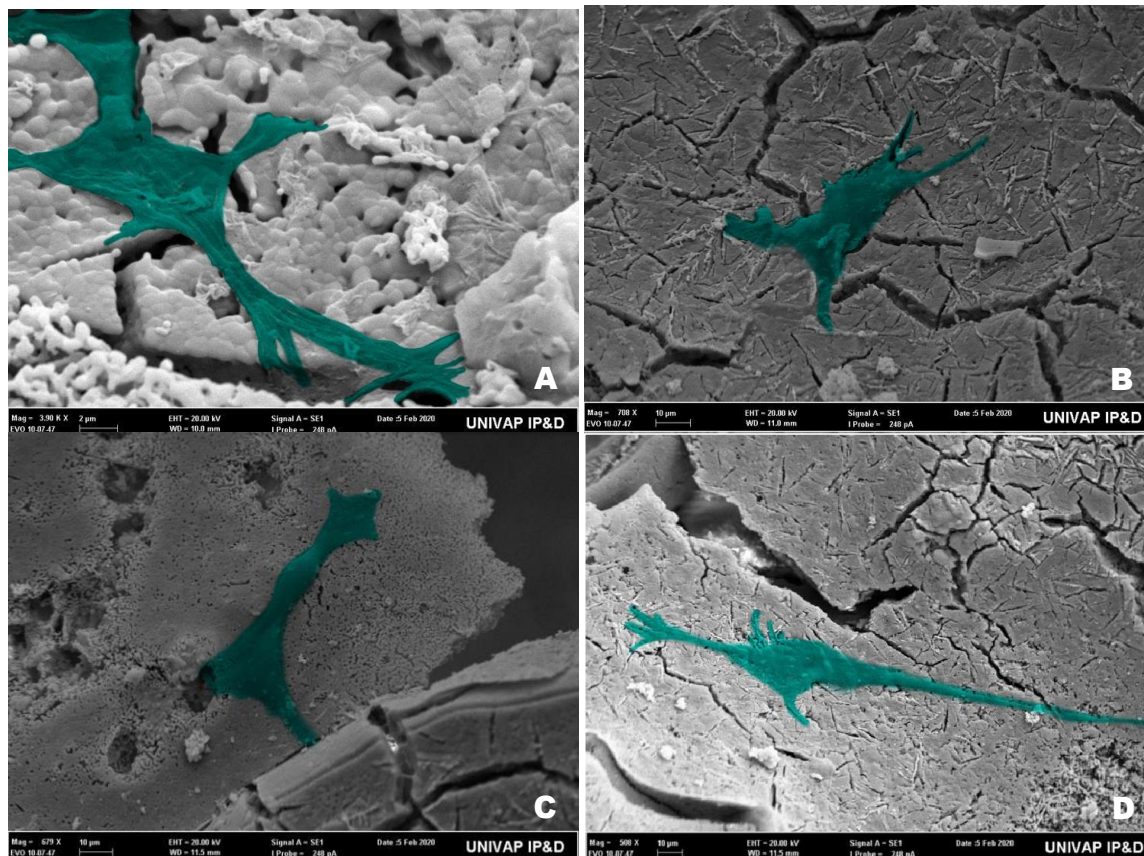
Fonte: Elaborada pelo autor.

## **4.2 Avaliação da incorporação das células mesenquimais aos *scaffolds***

Para avaliação da incorporação e adesão das células mesenquimais, dois *scaffolds* de cada grupo foram plaqueados juntamente com as células por 5 dias. Após este período, as células foram fixadas e os *scaffolds* foram avaliados por micrografias obtidas por MEV.

Foi possível observar que houve adesão celular em todos os *scaffolds* utilizados neste estudo, independente da composição destes. As células aderidas foram visualizadas e estão demonstradas na figura 12. As amostras dos *scaffolds* de CAC, FOSF e ZIRC exibiram células aderidas com prolongamentos mais evidenciados.

Figura 12 – Micrografias eletrônica de varredura dos arcabouços após cultura celular por 5 dias



Legenda: Adesão celular nos *scaffolds*. Em verde, células destacadas. A) CAC - magnificação: 3.900x; B) Fosfato tricálcico - magnificação: 708x; C) Óxido de zinco - magnificação: 679x; D) Zircônia - magnificação: 508x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 4.3 Análise histológica

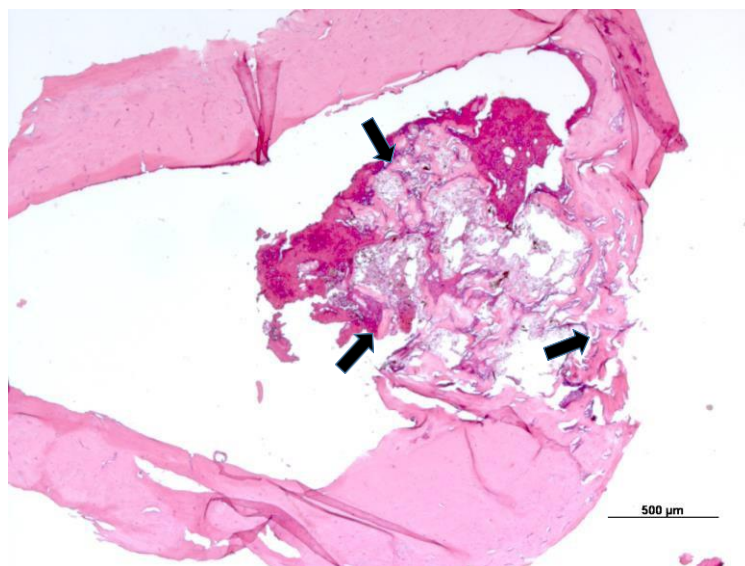
Nas análises histológicas, foi possível observar o tecido ósseo neoformado na região de inserção dos *scaffolds* de diferentes materiais.

Em todos os grupos, os cortes histológicos revelaram tecido ósseo neoformado formado por trabéculas revestidas por osteoblastos, contendo

numerosos osteócitos no seu interior. Estas trabéculas apresentaram-se finas e espaçadas e por vezes exibiram-se mais espessadas e contínuas, entremeadas por células da medula óssea e tecido conjuntivo por vezes fibroso (Figuras 13 a 28). Os *scaffolds* foram dissolvidos no processo de descalcificação com ácido fórmico e por isso, apenas resíduos destes puderam ser visualizados como áreas de pigmentação acastanhada nos cortes histológicos de todos os grupos (Figuras 13 a 28). Não foram verificados processos inflamatórios e nem reação de corpo estranho em nenhum grupo. Por se tratar de um material poroso, nos cortes histológicos foi possível identificar as regiões destes poros, onde anteriormente havia o *scaffold*. Em 21 dias não houve o restabelecimento de todo o osso original em nenhum dos grupos (Figuras 13 a 28), porém por vezes foi observada ponte óssea entre as extremidades das corticais ósseas preexistentes, na região de inserção do *scaffold* poroso (Figura 13, 19, 25).

Nos cortes histológicos do grupo CAC sem incorporação com células mesesenquimais, foi possível observar que o tecido ósseo neoformado ocorreu a partir das laterais em direção ao centro do defeito, constituído por trabéculas ósseas delgadas. Nessa região observou-se espaços medulares amplos e a formação de uma ponte óssea entre as corticais preexistentes. Foi verificado que essa neoformação invaginou-se para a região medular do fêmur, ocupando parte desta região (Figuras 13 e 14).

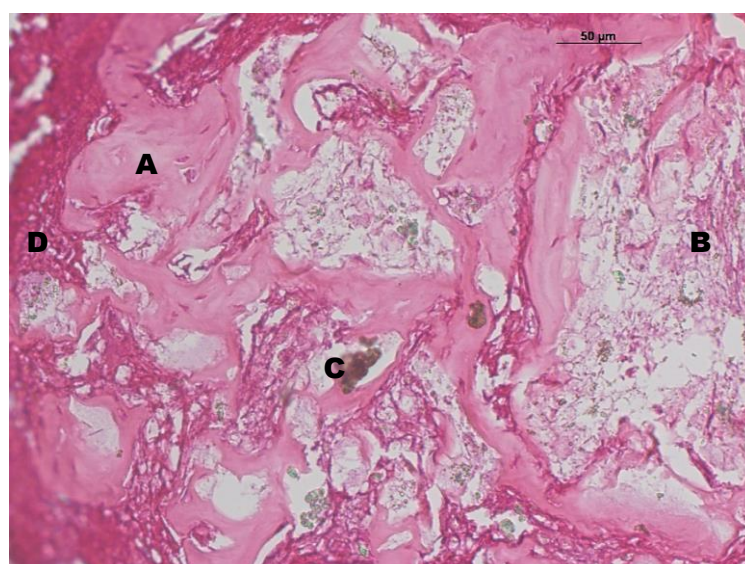
Figura 13 – Corte histológico observado no grupo CAC (A.O.: 20x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: as setas indicam trabéculas ósseas neoformadas na interface com o *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 – Corte histológico observado no grupo CAC (A.O.:100x)

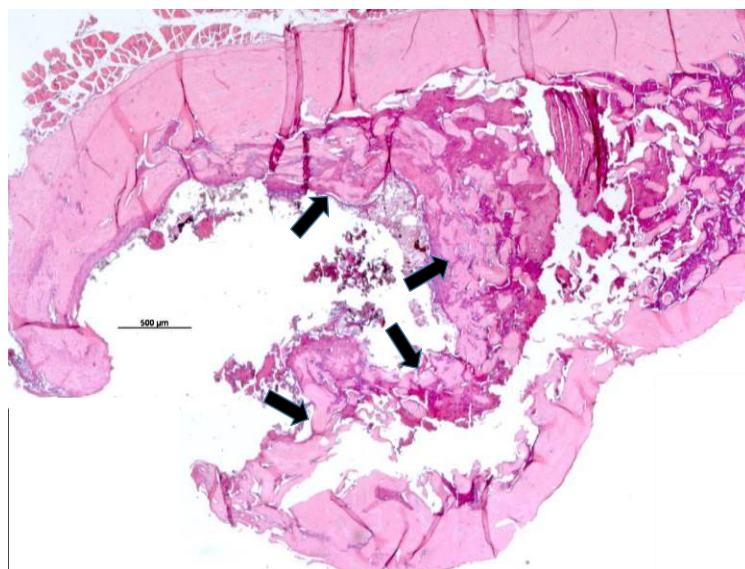


Legenda: Micrografia em microscópio óptico. A) Trabécula óssea neoformada; B) Tecido conjuntivo entre as trabéculas ósseas; C) Resíduo do *scaffold*; D) Células da medula óssea.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No grupo CAC incorporado com células mesenquimais foi observado que o tecido ósseo neoformado desenvolveu-se principalmente na região inferior do *scaffold* e proliferou em direção a medula óssea do fêmur. As trabéculas ósseas neste grupo apresentaram-se mais espessas comparadas com o grupo CAC sem células, porém não foi verificada formação de ponte óssea entre as corticais preexistentes (Figuras 15 e 16).

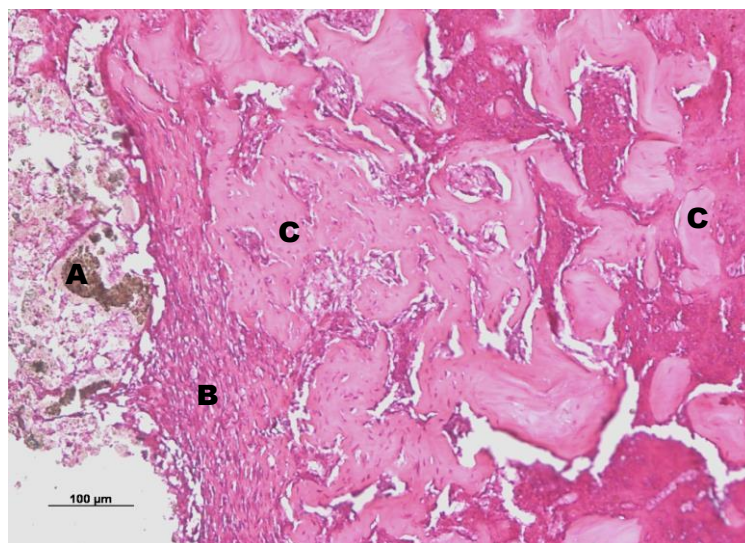
Figura 15 – Corte histológico observado no grupo CAC/MSC (A.O.: 20x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: as setas indicam trabéculas ósseas neoformadas na interface com o *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 – Corte histológico observado no grupo CAC/MSC (A.O.: 100x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico. A) Resíduo do *scaffold*; B) Tecido conjuntivo; C) Trabéculas ósseas neoformadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

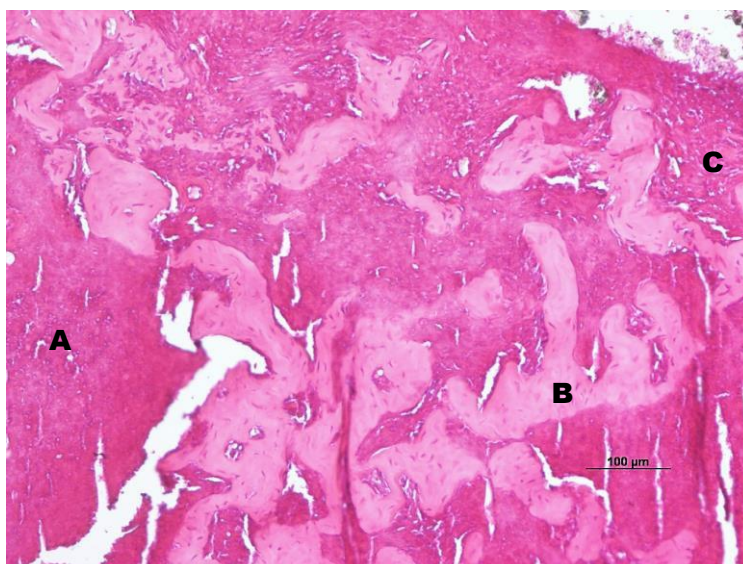
Nos cortes histológicos do grupo FOSF sem incorporação com células mesenquimais, foi possível observar que o tecido ósseo neoformado ocorreu principalmente na região subjacente à região anteriormente ocupada pelos *scaffolds*, com proliferação para a região da medula óssea do fêmur, sem presença de ponte óssea entre as corticais preexistentes. Grande quantidade de células da medula óssea foram visualizadas entremeando as trabéculas ósseas, estendendo-se para a região superior da inserção do *scaffold* (Figuras 17 e 18).

Figura 17 – Corte histológico observado no grupo FOSF (A.O.: 20x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: as setas indicam trabéculas ósseas neoformadas na interface inferior do *scaffold*.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

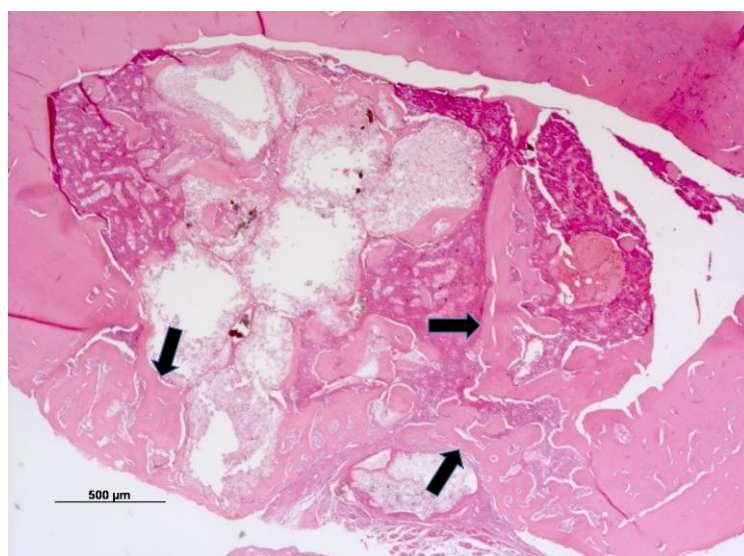
Figura 18 – Corte histológico observado no grupo FOSF (A.O.: 100x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico. A) Células da medula óssea; B) Trabécula óssea neoformada; C) Tecido conjuntivo.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

No grupo FOSF incorporado com células mesenquimais, foi possível observar a neoformação óssea partindo das laterais das corticais ósseas preexistentes em direção ao centro da região de inserção do *scaffold*. Essa neoformação óssea entre as corticais preexistentes apresentou-se com distribuição irregular, formando uma ponte óssea com áreas mais delgadas e áreas mais espessadas entre as corticais. Verificou-se também que a neoformação óssea se estendeu para o interior da região medular do fêmur, porém em áreas que se encontravam preenchidas pelos *scaffolds* porosos (Figuras 19 e 20).

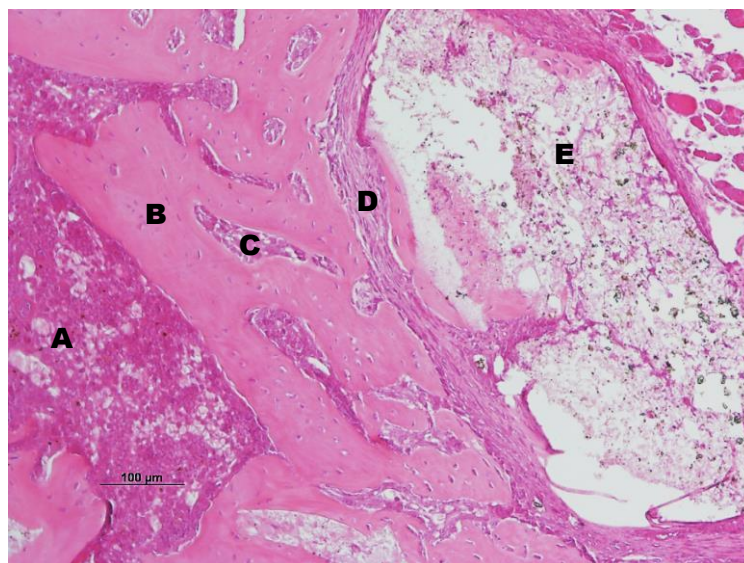
Figura 19 – Corte histológico observado no grupo FOSF/MSC (A.O.: 20x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: as setas indicam trabéculas ósseas neoformadas na interface inferior do *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 – Corte histológico observado no grupo FOSF/MSC (A.O.: 100x)

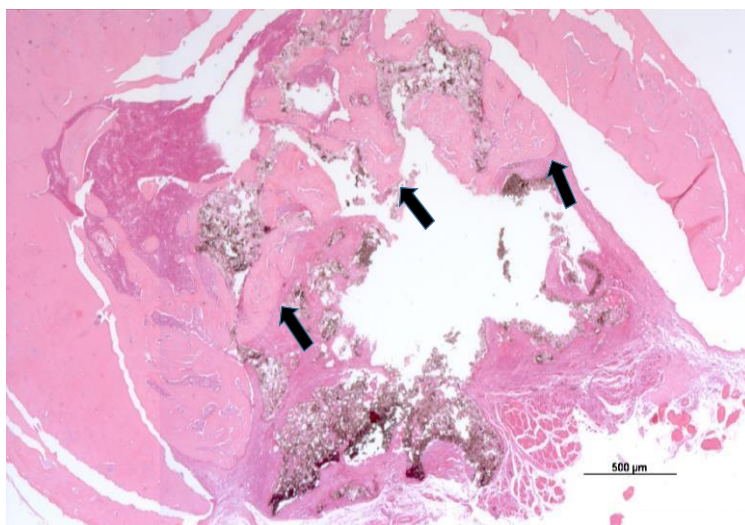


Legenda: Micrografia em microscópio óptico. A) Células da medula óssea; B) Trabécula óssea neoformada; C) Tecido medular entremeado com as trabéculas ósseas; D) Tecido conjuntivo fibroso; E) Tecido conjuntivo contendo resíduos do *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No grupo dos *scaffolds* de ZNO não incorporados com células mesenquimais, verificou-se a presença de trabéculas ósseas espessas na região subjacente à região onde encontravam-se os *scaffolds* porosos, na região da medula óssea do fêmur, sem formação de ponte óssea. Áreas de resíduos de *scaffolds* demonstrados por áreas acastanhadas também foram observadas em maior quantidade, comparado com os outros grupos (Figuras 21 e 22).

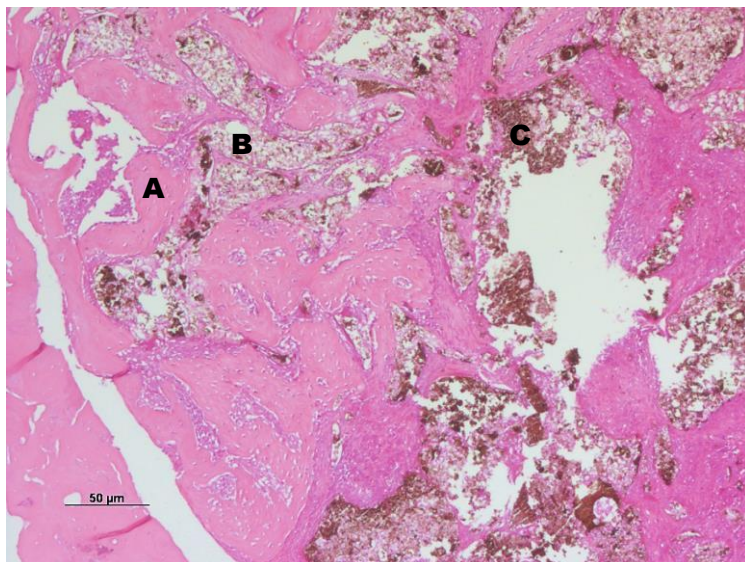
Figura 21 – Corte histológico observado no grupo ZNO (A.O.: 20x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: as setas indicam trabéculas ósseas neoformadas na interface inferior do *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 – Corte histológico observado no grupo ZNO (A.O.: 100x)

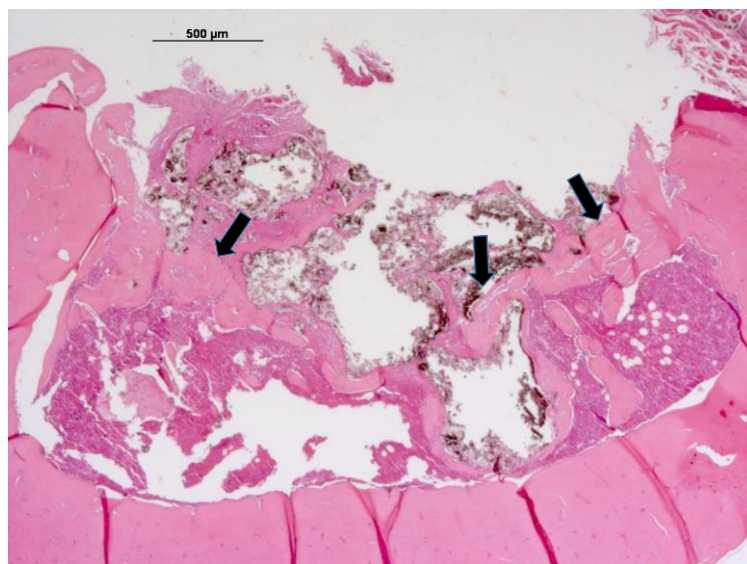


Legenda: Micrografia em microscópio óptico. A) Trabécula óssea neoformada; B) Tecido conjuntivo; C) Resíduos do *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No grupo dos *scaffolds* de ZNO incorporados com células mesesquimais, verificou-se a presença de trabéculas ósseas espessas na região da medula óssea do fêmur (subjacente à região onde se encontravam os *scaffolds* porosos). Áreas de resíduos de *scaffolds* demonstrados por áreas acastanhadas também foram observadas (Figuras 23 e 24).

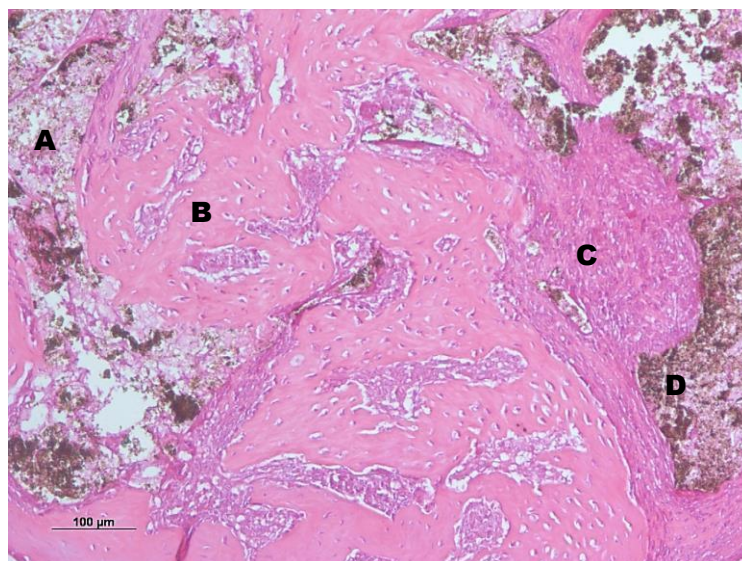
Figura 23 – Corte histológico observado no grupo ZNO/MS (A.O.: 20x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: as setas indicam trabéculas ósseas neoformadas na interface com o *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

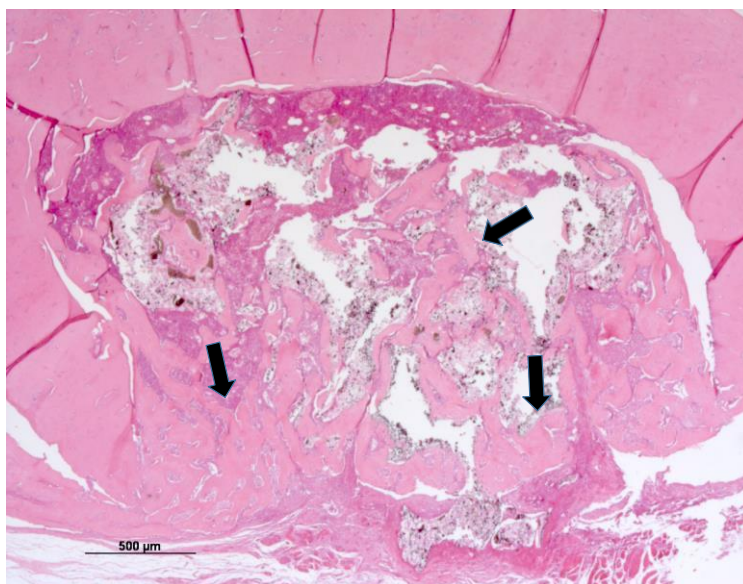
Figura 24 – Corte histológico observado no grupo ZNO/MSC (A.O.: 100x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico. A) Tecido conjuntivo; B) Trabécula óssea neoformada; C) Tecido conjuntivo fibroso; D) Resíduos do *scaffold*.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

No grupo ZIRC sem incorporação com as células mesenquimais, observou-se que o tecido ósseo neoformado ocorreu a partir das laterais das corticais óssas preexistentes em direção ao centro da região de inserção do *scaffold*, formando uma ponte óssea entre as corticais ósseas preexistentes. Essa neoformação invaginou-se para a região medular do fêmur, ocupando parte desta região. Áreas de resíduos de *scaffolds* demonstrados por áreas acastanhadas também foram observadas (Figuras 25 e 26).

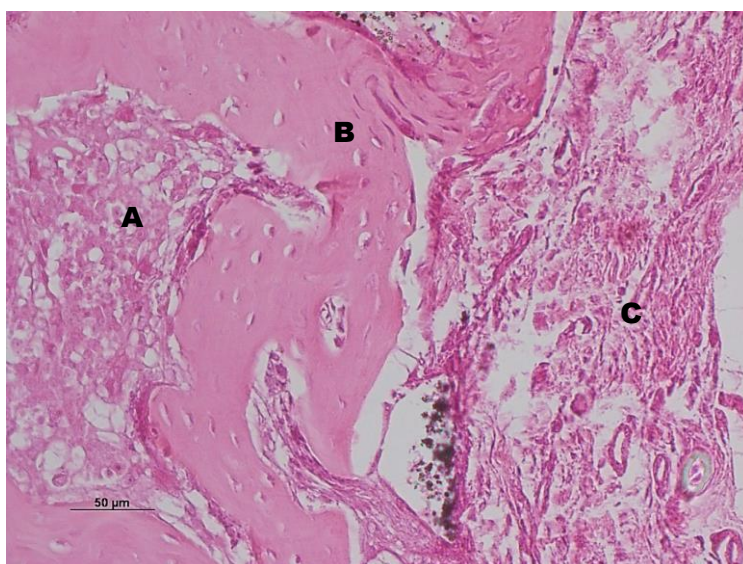
Figura 25 – Corte histológico observado no grupo ZIRC (A.O.: 20x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: as setas indicam strabéculas ósseas neoformadas na interface com o *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26 – Corte histológico observado no grupo ZIRC (A.O.: 100x)

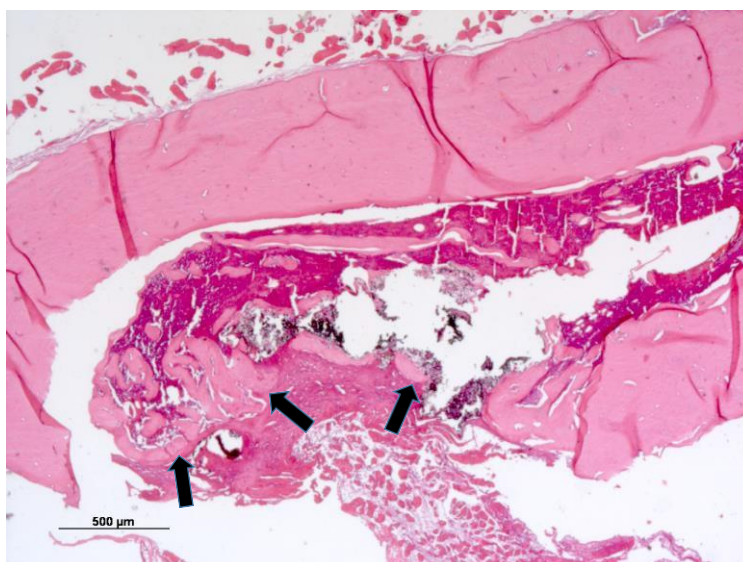


Legenda: Micrografia em microscópio óptico. A) Tecido conjuntivo; B) Trabécula óssea neoformada; C) Tecido conjuntivo fibroso contendo vasos sanguíneos (tecido de granulação).

Fonte: Elaborada pelo autor.

No grupo ZIRC incorporado com células mesenquimais, verificou-se a formação de tecido ósseo na interface com a região anteriormente preenchida pelo *scaffold*. O tecido ósseo neoformado foi visualizado principalmente subjacente ao centro da região de inserção do *scaffold*. Áreas de resíduos de *scaffolds* demonstrados por áreas acastanhadas também foram observadas (Figuras 27 e 28).

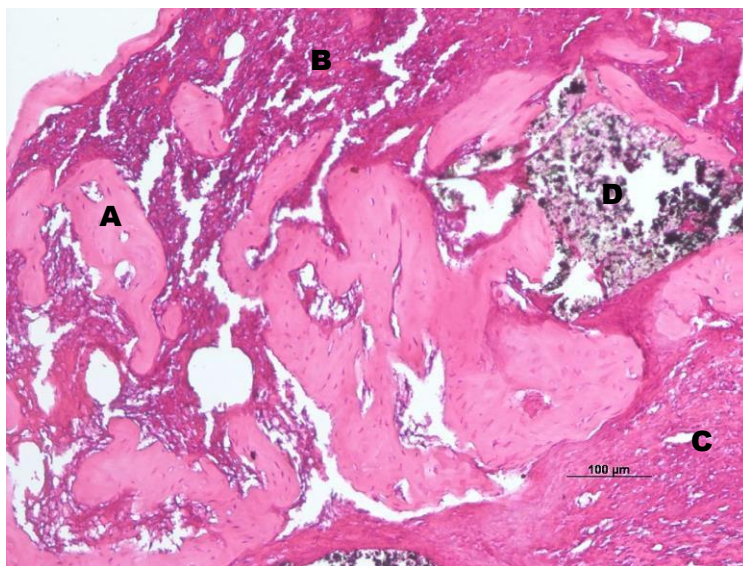
Figura 27 – Corte histológico observado no grupo ZIRC/MSC (A.O.: 20x)



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: as setas indicam trabéculas ósseas neoformadas na interface com o *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 28 – Corte histológico observado no grupo ZIRC/MSC (A.O.: 100x)



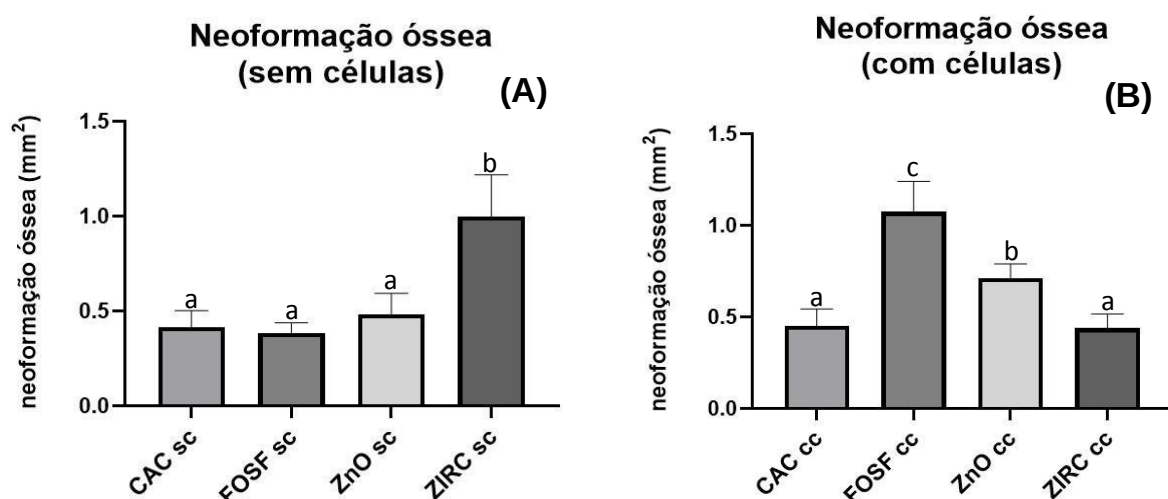
Legenda: Micrografia em microscópio óptico. A) Trabécula óssea neoformada; B) Células da medula óssea; C) Tecido conjuntivo fibroso; D) Resíduos do *scaffold*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada utilizando imagens de cortes histológicos realizados na região de inserção do *scaffold*. O software *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD) foi utilizado para quantificar a proliferação de tecido ósseo na interface com o *scaffold*. Os resultados apresentados na figura 29 referem-se à neoformação óssea na interface da região de inserção do *scaffold* poroso produzido com os materiais CAC e suas blendas (fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia), incorporados e não incorporados com células mesenquimais.

Figura 29 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) nos grupos analisados



Legenda: Gráfico de neoformação óssea na interface com os *scaffolds* de CAC e suas blendas: fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia: A) *scaffolds* não incorporados com células; B) *scaffolds* incorporados com células mesenquimais. \*letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: Elaborada pelo autor.

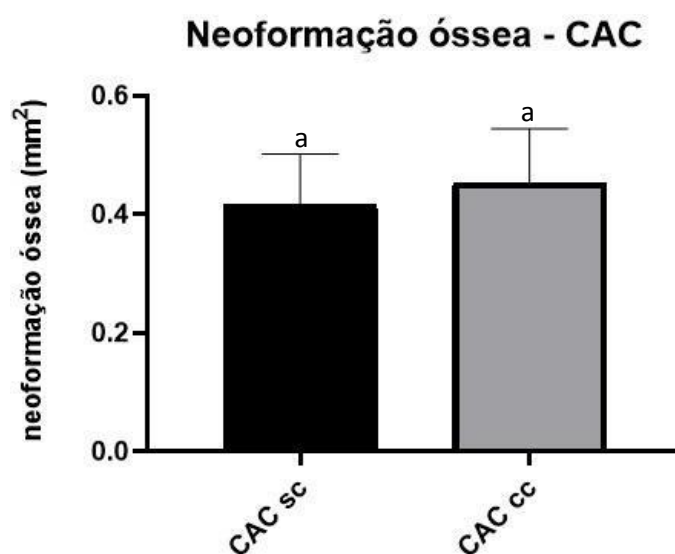
Com relação aos *scaffolds* que não foram incorporados com células mesenquimais, observou-se que o grupo da blenda zircônia demonstrou maior neoformação óssea, exibindo diferença estatística quando comparado com todos os demais grupos ( $p < 0,05$ ). O grupo da blenda óxido de zinco foi o segundo grupo com maior neoformação óssea, seguido dos grupos CAC e fosfato tricálcico. Contudo, não houve diferença estatística para a neoformação óssea nestes grupos (óxido de zinco, CAC e fosfato tricálcico) ( $p > 0,05$ ).

Com relação aos *scaffolds* que foram incorporados com células mesenquimais, foi observada maior neoformação óssea no grupo da blenda fosfato tricálcico, que exibiu diferença estatística quando comparada com todos os outros grupos ( $p < 0,05$ ). O grupo da blenda óxido de zinco foi o segundo grupo com maior neoformação óssea e também exibiu diferença estatística quando

comparado com os outros grupos ( $p < 0,05$ ). Os grupos do CAC e da blenda zircônia foram os grupos com menor neoformação óssea, não demonstrando diferença estatística entre eles ( $p > 0,05$ ).

Os resultados apresentados nas figuras 30 a 33 referem-se à comparação intragrupos da neoformação óssea obtida na interface da região de inserção do *scaffold*, na qual foi comparado o mesmo material, quando este foi incorporado e não incorporado com células mesenquimais.

Figura 30 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) na interface com o *scaffold* de CAC, comparando *scaffold* sem células (sc) e com células mesenquimais (cc)



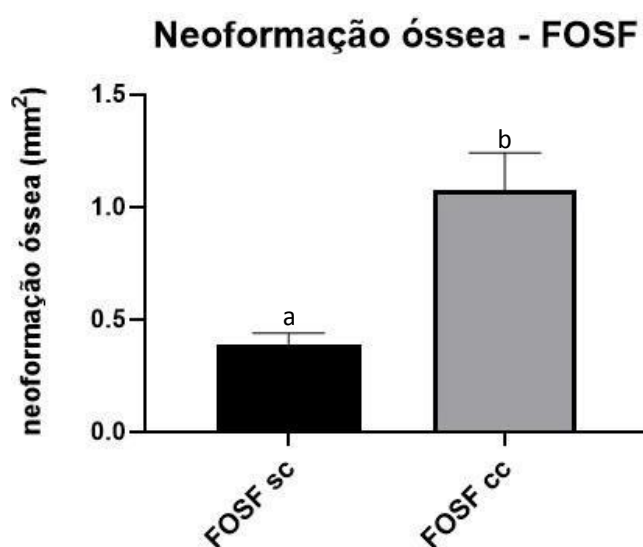
Legenda: \*letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o grupo CAC, os resultados obtidos revelaram que os valores de neoformação óssea foram semelhantes quando estes materiais foram incorporados e não incorporados com células mesenquimais, não sendo observada diferença

estatística ( $p>0,05$ ) entre eles.

Figura 31 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) na interface com o *scaffold* de FOSF, comparando *scaffold* sem células (sc) e com células mesenquimais (cc)

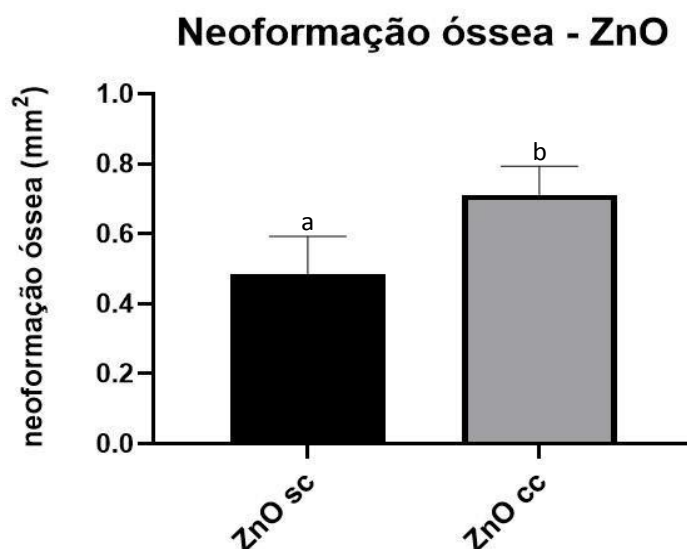


Legenda: \*letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados obtidos para o grupo da blenda fosfato tricálcico revelaram que a neoformação óssea foi maior quando este material foi incorporado com células mesenquimais, sendo observada diferença estatística ( $p<0,05$ ) quando comparado com os *scaffolds* não incorporados com estas células.

Figura 32 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) na interface com o *scaffold* de ZNO, comparando *scaffold* sem células (sc) e com células mesenquimais (cc)

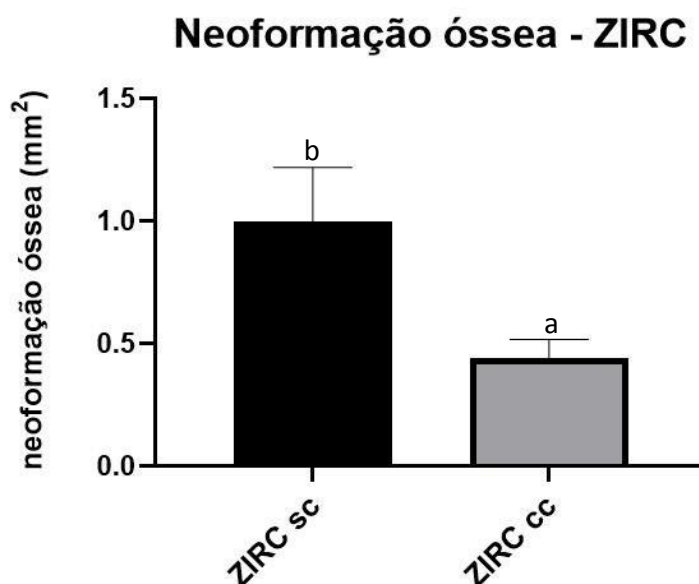


Legenda: \*letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o grupo da blenda óxido de zinco, os resultados revelaram que a neoformação óssea foi maior quando este material foi incorporado com células mesenquimais, sendo observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os *scaffolds* não incorporados com estas células.

Figura 33 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) na interface com o *scaffold* de ZIRC, comparando *scaffold* sem células (sc) e com células mesenquimais (cc)



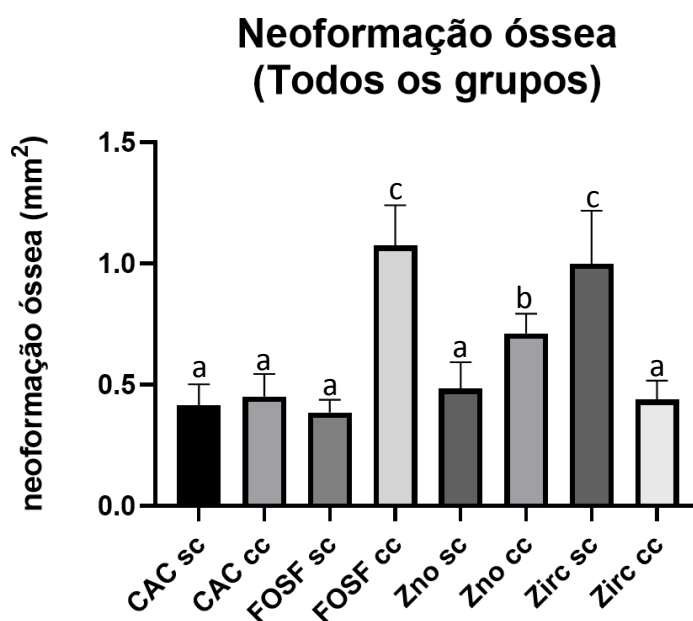
Legenda: \*letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o grupo da blenda zircônia, os resultados revelaram que a neoformação óssea foi maior quando este material não foi incorporado com células mesenquimais, sendo observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os *scaffolds* incorporados com estas células.

Os resultados apresentados na figura 34 referem-se à comparação da neoformação óssea obtida na interface com os *scaffolds*, na qual foram comparados todos os materiais, quando estes foram incorporados e não incorporados com células mesenquimais.

Figura 34 – Gráfico de médias e desvio padrão ( $\pm$ ) dos dados obtidos da neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) na interface da região de inserção dos *scaffolds* de CAC, FOSF, ZNO e ZIRC, não incorporado com células (sc) e incorporado com células mesenquimais (cc)



Legenda: Gráfico de neoformação óssea na interface da região de inserção dos *scaffolds* de CAC e suas blends: fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia, sem células (sc) e com incorporação de células (cc). \*letras diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na comparação entre todos os grupos de *scaffolds* dos diferentes materiais, incorporados ou não com células mesenquimais, foi verificado que os grupos FOSF incorporado com células e o ZIRC não incorporado com células mesenquimais apresentaram os melhores resultados, com maior neoformação óssea na interface com os *scaffolds*, não havendo diferença estatística entre eles ( $p < 0,05$ ). Seguido destes grupos, o maior valor de neoformação óssea foi observado no grupo ZNO incorporado com células, que diferiu estatisticamente de todos os outros grupos ( $p < 0,05$ ). E por fim, os demais grupos CAC incorporado e não incorporado com células, FOSF não incorporado com células, ZNO não

incorporado com células e ZIRC incorporado com células apresentaram resultados menores valores de neoformação óssea, sem diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre eles.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a neoformação óssea em defeitos confeccionados em fêmures de ratos, os quais foram preenchidos com biomateriais à base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) e suas blendas fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia, na configuração de *scaffolds*, associados ou não associados com células mesenquimais. Os biomateriais são utilizados para restaurar ou substituir algum tecido, órgão ou função do corpo (Pereira et al., 2012). Nesse estudo, os biomateriais (*scaffolds* à base de cimento de aluminato de cálcio) foram utilizados com as funções de preencher e restaurar o volume do tecido ósseo perdido, fornecer uma função mecânica local além de servir de suporte para proliferação de células, estimulando a neoformação óssea. O intuito foi contribuir com a inovação de novos biomateriais para a área médica e odontológica, por meio da análise do potencial da utilização *in vivo* destes *scaffolds*, na qual serão obtidas informações importantes quanto ao seu uso em regeneração tecidual associada a terapia celular.

Os produtos à base de CAC são provenientes de uma nova geração de biomateriais que vem sendo desenvolvidos a fim de desempenhar suas funções na regeneração de tecido ósseo acompanhando o aumento da expectativa de vida da população (Parreira et al., 2016). O CAC possui propriedades relevantes para seu uso como biomaterial, especialmente na reparação de defeitos ósseos, devido às suas vantagens de biocompatibilidade e alta resistência mecânica quando sujeito à compressão (Parreira et. al., 2016). Além disso, apresenta vantagens econômicas em relação ao seu preço e também de seus derivados, e estudos demonstram a possibilidade da produção em território nacional, diminuindo a dependência de produtos importados (Parreira et al., 2016). Foram utilizados neste estudo, *scaffolds* de cimento de aluminato de cálcio e suas blendas, que são assim

denominadas por serem formadas por uma composição de CAC e aditivos de partículas de óxido de zinco, zircônia e fosfato tricálcico. A metade destes *scaffolds* foi incorporada com células mesenquimais previamente a sua inserção nos defeitos ósseos dos fêmures dos ratos visando associar a bioatividade do material com a terapia celular.

Nos estudos *in vitro* de de Las Nieves et al. (2019), os *scaffolds* de CAC com teores de sólidos de 60% adicionados com 4% de peso dos aditivos fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia não se mostraram citotóxicos, demonstrando adequada viabilidade celular, uma vez que todas as composições apresentaram valores superiores a 70% nos ensaios de MTT. Contudo, as blendas zircônia e óxido de zinco mostraram maior número de células viáveis e foram os grupos que apresentaram os maiores valores de atividade da fosfatase alcalina, indicando sua capacidade de induzir a mineralização (de Las Nieves et al., 2019). Além disso, quanto à distribuição dos poros destes *scaffolds*, verificados por porosimetria de mercúrio, de Las Nieves et al. (2019) demonstraram que estas mesmas blendas de zircônia e óxido de zinco apresentaram poros de maior tamanho comparadas com os outros grupos, o que parece favorecer a neoformação óssea (Fook et al., 2010; Hutmacher et al., 2007). Corroborando com estas informações, nos resultados do presente estudo *in vivo*, para os *scaffolds* não incorporados com células mesenquimais, foi verificado que a blenda de zircônia foi a que apresentou melhores resultados, exibindo maior neoformação óssea em comparação com os demais grupos, apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com os demais grupos, seguida da blenda óxido de zinco não apresentou diferença estatística para o CAC e o FOSF. Portanto, estes resultados *in vivo* são condizentes com os resultados *in vitro*.

Biomateriais à base de zircônia têm ganhado atenção como um biomaterial para reconstrução de tecido duro devido às suas boas propriedades mecânicas, químicas e biológicas. Eles apresentam baixa taxa de corrosão, baixa toxicidade

e baixa aderência bacteriana (Denry, 2008; Tosiriwatanapong, Singhatanadgit, 2018), se mostrando relevante para aplicações na engenharia de tecidos (Mohan et al., 2020). A combinação de CAC e ZIRC na estabilização de fraturas de compressão vertebral, resultou em altos valores de resistência a compressão, semelhante ao PMMA (Engqvist et al., 2008). No presente estudo, os scaffolds da blenda zircônia apresentaram os melhores resultados e mostraram maior taxa de neoformação óssea quando não incorporados com células mesenquimais.

Segundo Szpalski et al. (2012), a associação de células mesenquimais com *scaffolds* e outros biomateriais oferecem uma estratégia para melhorar a diferenciação e crescimento ósseo em comparação com *scaffolds* sem estas células. Essa estratégia tem se mostrado promissora, apresentando resultados positivos no sentido de estimular o processo regenerativo ósseo, como demonstrado previamente por Yuan et al. (2015) e Maglione et al. (2017). Ensaios pré-clínicos de Kargozar et al. (2017) e Zhang (2019) também mostraram que a associação de células mesenquimais com *scaffolds* aumenta a capacidade osteogênica. No presente estudo, essa premissa foi verdadeira e corrobora com estes resultados para todos os grupos, exceto para o grupo da blenda zircônia, já que nos resultados intragrupos, comparando *scaffolds* incorporados ou não com células mesenquimais, verificou-se que os *scaffolds* incorporados apresentaram melhores resultados, devido a maior neoformação óssea. Apenas o grupo da blenda zircônia apresentou resultados com valores inferiores quando os *scaffolds* foram associados a células mesenquimais ( $p < 0,05$ ), não concordando com o estudo *in vivo* de An et al. (2012), que relatou aumento da neoformação óssea quando utilizados *scaffolds* de zircônia e hidroxiapatita associado com células. Os resultados não satisfatórios para o grupo ZIRC associado a células mesenquimais neste presente estudo pode ter ocorrido se os íons de zircônia tiverem sido solubilizados durante os 5 dias de impregnação com as células no meio de cultura. Dessa forma, a hipótese seria a de que restaria o *scaffold* de CAC sem os íons

zircônia incorporado com as células, e o desempenho seria similar aos *scaffolds* de CAC sem aditivos, que foi exatamente o resultado encontrado. Os *scaffolds* de CAC e da blenda zircônia apresentaram resultados semelhantes quando ambos foram incorporados com células mesequimais ( $p>0,05$ ).

Castro-Raucci et al. (2017) avaliaram blendas de CAC com cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) associadas com óxido de bismuto ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) e óxido de zinco (ZNO) como radiopacificadores em culturas de células osteogênicas. Os autores concluíram que o CAC com  $\text{CaCl}_2$  associado ao ZNO promoveu melhor taxa de sobrevivência e diferenciação de células osteoblásticas, sugerindo maior potencial de reparo ósseo desta blenda no contexto de terapias endodônticas. O óxido zinco atua indiretamente no reparo ósseo por agir sobre enzimas e hormônios que se relacionam com o crescimento ósseo, além de inibirem osteoclastos, que são responsáveis pela reabsorção óssea (Souza et al., 2018). Neste presente estudo, os *scaffolds* da blenda ZNO se destacou na comparação intergrupos, ficando em 2º lugar na neoformação óssea, com diferença estatística para os demais grupos ( $p<0,05$ ). Na comparação intragrupo, quando estes foram incorporados com células mesenquimais, exibiram resultados mais promissores comparado com os *scaffolds* não incorporados com estas células ( $p<0,05$ ).

O potencial do fosfato tricálcico em composições para uso como substituto ósseo vem sendo relatado na literatura (Las Nieves, 2019; Sawada et al., 2018). No estudo de Sawada et al. (2018), foram avaliados *in vivo* três tipos de biomateriais (ósseo bovino desproteínizado,  $\beta$ -fosfato tricálcico e uma mistura de  $\alpha$ -fosfato tricálcico com hidroxiapatita) como substitutos ósseos em defeitos criados na calvária de cães. Os resultados mostraram que o  $\beta$ -fosfato tricálcico apresentou um volume maior de neoformação óssea. O estudo *in vitro* de Las Nieves et al. (2019) mostrou maior formação de matriz mineralizada (nódulos de mineralização) no grupo de *scaffolds* da blenda fosfato tricálcico, indicando esta composição como promissora para a engenharia de tecidos. Neste presente estudo,

os *scaffolds* da blenda fosfato tricálcico quando associada a células mesenquimais foi o grupo com maior neoformação óssea, mostrando ser um material potencial na regeneração óssea na presença de células.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicaram, por meio da quantificação e análise do tecido ósseo neoformado na interface da região de inserção dos biomateriais, que o uso de *scaffolds* de CAC e suas blendas (fosfato tricálcico, óxido de zinco e zircônia) permitiram a neoformação óssea nesta região, independente se incorporados ou não com células mesenquimais.

A incorporação de células mesenquimais nos *scaffolds* foi benéfica e influenciou positivamente a neoformação óssea em todos os grupos, exceto no grupo da blenda zircônia. No entanto, este grupo dos *scaffolds* produzidos com a blenda zircônia não incorporados com células mesenquimais foi o que demonstrou maior neoformação óssea na interface com a região de inserção do *scaffold*, sugerindo um melhor potencial de regeneração óssea deste, quando não incorporado com células mesenquimais.

Quando incorporados com células mesenquimais, o grupo da blenda contendo fosfato tricálcico se destacou positivamente, formando maior quantidade de tecido ósseo, indicando ser um material promissor para ser utilizado em terapia celular.

Comparando todos os grupos, incorporados ou não com células mesenquimais, os grupos que demonstraram melhores resultados foram os grupos FOSF com células e ZIRC sem células.

## REFERÊNCIAS\*

Abukawa H, Papadaki M, Abulikemu M, Leaf J, Vacanti JP, Kaban LB, et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. *Dent Clin North Am*. 2006 Apr;50(2):205-16, viii. doi: 10.1016/j.cden.2005.11.006.

An SH, Matsumoto T, Miyajima H, Nakahira A, Kim KH, Imazato S. Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction. *Dent Mater*. 2012 Dec;28(12):1221-31. doi: 10.1016/j.dental.2012.09.001.

Blom A. (V) Which scaffold for which application? *Curr Orthop*. 2007;21(4):280-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cuor.2007.06.005>.

Castro-Raucci LMS, Teixeira LN, Barbosa AFS, Fernandes RR, Raucci-Neto W, Jacobovitz M, et al. Calcium chloride-enriched calcium aluminate cement promotes in vitro osteogenesis. *Int Endod J*. 2018 Jun;51(6):674-83. doi: 10.1111/iej.12883.

Chan WD, Perinpanayagam H, Goldberg HA, Hunter GK, Dixon SJ, Santos GC Jr, et al. Tissue engineering scaffolds for the regeneration of craniofacial bone. *J Can Dent Assoc*. 2009 Jun;75(5):373-7.

Chau AM, Mobbs RJ. Bone graft substitutes in anterior cervical discectomy and fusion. *Eur Spine J*. 2009 Apr;18(4):449-64. doi: 10.1007/s00586-008-0878-4.

de Las Nieves González Vicuna I, Grancianinov KJS, dos Santos KW, dos Santos Ortega F, de Camargo Reis Mello D, de Vasconcellos LMR, et al. Scaffolds' production based on calcium aluminate blends and their biological properties. *Res Biomed Eng [Internet]*. 2019 Jun 1;35(2):131–41. doi: <https://doi.org/10.1007/s42600-019-00015-0>.

de Oliveira IR, Raniero LJ, Leite VMC, Castro-Raucci LMS, de Oliveira PT, Pandolfelli VC. In vitro apatite-forming ability of calcium aluminate blends. *Ceram Int*. 2017;43(13):10071-9.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater*. 2008 Mar;24(3):299-307. doi: 10.1016/j.dental.2007.05.007.

Donaruma LG. Definitions in biomaterials. *J Polym Sci Polym Lett Ed* [Internet]. 1988 Aug 20;26(9):414. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pol.1988.140260910>

Engqvist H, Persson TT, Lööf J, Faris A, Hermansson L. Chemical stability of a novel injectable bioceramic for stabilisation of vertebral compression fractures. *Trends Biomater Artif Organs*. 2008;21(2):98–106.

Fook ACBM, Aparecida AH, Fook MVL. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. *Matéria (Rio Janeiro)* [Internet]. 2010;15(3):392-9. <http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo11110/>.

Garcia Lda F, Huck C, Menezes de Oliveira L, de Souza PP, de Souza Costa CA. Biocompatibility of new calcium aluminate cement: tissue reaction and expression of inflammatory mediators and cytokines. *J Endod*. 2014 Dec;40(12):2024-9. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.015.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.029.

He X, Zhang YZ, Mansell JP, Su B. Zirconia toughened alumina ceramic foams for potential bone graft applications: fabrication, bioactivation, and cellular responses. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jul;19(7):2743-9. doi: 10.1007/s10856-008-3401-x.

Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions - a 21st century perspective. *Bone Res*. 2013 Sep 25;1(3):216-48. doi: 10.4248/BR201303002.

Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jul-Aug;1(4):245-60. doi: 10.1002/term.24.

Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int*. 2014;2014:951512. doi: 10.1155/2014/951512.

Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ*. 2001 May;65(5):456-62.

Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5474-91. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.

Kargozar S, Hashemian SJ, Soleimani M, Milan PB, Askari M, Khalaj V, et al. Acceleration of bone regeneration in bioactive glass/gelatin composite scaffolds seeded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells over-expressing bone morphogenetic protein-7. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Jun 1;75:688-98. doi: 10.1016/j.msec.2017.02.097.

Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017 Nov;5(11):898-907. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30188-2.

Lamana SMS, Napimoga MH, Nascimento APC, Freitas FF, de Araujo DR, Quinteiro MS, et al. The anti-inflammatory effect of tramadol in the temporomandibular joint of rats. *Eur J Pharmacol*. 2017 Jul 15; 807:82-90. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.04.012. Epub 2017.

Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. 2004 Mar;32(3):477-86. doi: 10.1023/b:abme.0000017544.36001.8e.

Lööf J, Svahn F, Jarmar T, Engqvist H, Pameijer CH. A comparative study of the bioactivity of three materials for dental applications. *Dent Mater*. 2008 May;24(5):653-9. doi: 10.1016/j.dental.2007.06.028.

Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Mar;33(6):597-604. doi: 10.1038/sj.bmt.1704400.

Maglione M, Spano S, Ruaro ME, Salvador E, Zanconati F, Tromba G, et al. In vivo evaluation of chitosan-glycerol gel scaffolds seeded with stem cells for full-thickness mandibular bone regeneration. *J Oral Sci*. 2017;59(2):225-32. doi: 10.2334/josnusd.16-0235. PMID: 28637982.

Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*. 1988 Nov;254(2):317-30. doi: 10.1007/BF00225804.

Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med*. 2008 Jan;3(1):1-5. doi: 10.2217/17460751.3.1.1.

Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3230-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.031.

Mohan Babu M, Syam Prasad P, Venkateswara Rao P, Hima Bindu S, Prasad A, Veeraiah N, et al. Influence of ZrO<sub>2</sub> addition on structural and biological activity of phosphate glasses for bone regeneration. *Materials (Basel)*. 2020 Sep 12;13(18):4058. doi: 10.3390/ma13184058.

Moldovan M, Prodan D, Popescu V, Prejmerean C, Saroși C, Saplontai M, et al. Structural and morphological properties of HA-ZnO powders prepared for biomaterials. *Open Chem*. 2015 Jan 28;13(1):725-33. doi: <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0083>.

Moraes PC, Marques ICS, Basso FG, Rossetto HL, Pires-de-Souza FCP, Costa CAS, et al. Repair of bone defects with chitosan-collagen biomembrane and scaffold containing calcium aluminate cement. *Braz Dent J*. 2017 May-Jun;28(3):287-95. doi: 10.1590/0103-6440201601454.

Oliveira I, Pandolfelli V, Jacobovitz M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *Int Endod J*. 2010 Dec; 43 (12):1069-76. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01770.

Oliveira IR, Andrade TL, Araujo KCML, Luz AP, Pandolfelli VC. Hydroxyapatite synthesis and the benefits of its blend with calcium aluminate cement. *Ceram Int*. 2016;42(2). doi:10.1016/j.ceramint.2015.10.0.

Oliveira IR, Andrade TL, Jacobovitz M, Pandolfelli VC. Bioactivity of calcium aluminate endodontic cement. *J Endod*. 2013 Jun;39(6):774-8. doi: 10.1016/j.joen.2013.01.013.

Parreira RM. Produção e caracterização de cimento aditivado a base de aluminato de cálcio visando aplicações como Biomaterial na área médico odontológica [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade do Vale do Paraíba; 2016.

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.

Pereira MM, Vasconcelos WL, Zavaglia CAC. Materiais cerâmicos – ciência e aplicação como biomateriais. In: Oréfice RL, Pereira MM, Mansur HS. *Biomateriais fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p. 61-81.

Precheur HV. Bone graft materials. *Dent Clin North Am.* 2007 Jul;51(3):729-46, viii. doi: 10.1016/j.cden.2007.03.004.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 3rd ed. Kidlington: Academic Press; 2013. 1056p. ISBN 9780123746269.

Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2003 Jun 30;5:29-39; discussion 39-40. doi: 10.22203/ecm.v005a03.

Santana-Melo GF, Rodrigues BVM, da Silva E, Ricci R, Marciano FR, Webster TJ, et al. Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017 Jul 1;155:544-52. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.053.

Sawada K, Nakahara K, Haga-Tsujimura M, Iizuka T, Fujioka-Kobayashi M, Igarashi K, et al. Comparison of three block bone substitutes for bone regeneration: long-term observation in the beagle dog. *Odontology.* 2018 Oct;106(4):398-407. doi: 10.1007/s10266-018-0352-7.

Souza CF de, Napoli P de, Han SW, Lima VC de, Carvalho AC de C. Células tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? *Rev Bras Cardiol Invasiva.* 2010;18(3):344–53. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S2179-83972010000300019>.

Souza KG, Santos PL, Marques RFC, Jafelicci Jr. M, Santos FA, Magdalena AG. A Influência do zinco no reparo ósseo: uma revisão de literatura. *Rev Virtual Quim.* 2018;10(3):474-86.

Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant*. 2016;25(5):829-48. doi: 10.3727/096368915X689622.

Szpalski C, Barbaro M, Sagebin F, Warren SM. Bone tissue engineering: current strategies and techniques--part II: Cell types. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012 Aug;18(4):258-69. doi: 10.1089/ten.TEB.2011.0440. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22224439.

Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*. 2009 Jun 6;6 Suppl 3(Suppl 3):S311-24. doi: 10.1098/rsif.2008.0448.focus. Epub 2009 Mar 4. PMID: 19324684.

Taylor ED, Khan Y, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: a primer for the practicing hand surgeon. *J Hand Surg Am*. 2009 Jan;34(1):164-6. doi: 10.1016/j.jhsa.2008.09.002. PMID: 19121744.

Tosiriwatanapong T, Singhatanadgit W. Zirconia-Based biomaterials for hard tissue reconstruction. *Bone Tissue Regen Insights*. 2018 Mar; 9:1-9. doi: 10.1177/1179061X18767886.

Trohatou O, Roubelakis MG. Mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine: past, present, and future. *Cell Reprogram*. 2017 Aug;19(4):217-24. doi: 10.1089/cell.2016.0062.

Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Tissue engineering: the next generation. *Tissue Eng*. 2006 Dec;12(12):3261-63.

Wan DC, Nacamuli RP, Longaker MT. Craniofacial bone tissue engineering. *Dent Clin North Am*. 2006 Apr;50(2):175-90, vii. doi: 10.1016/j.cden.2005.11.003.

Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012 Apr 30;5:19. doi: 10.1186/1756-8722-5-19.

Yuan N, Rezzadeh KS, Lee JC. Biomimetic scaffolds for osteogenesis. *Receptors Clin Investig*. 2015;2(3):898.

Zhang R, Li X, Liu Y, Gao X, Zhu T, Lu L. Acceleration of bone regeneration in critical-size defect using bmp-9-loaded nha/coli/mwcnts scaffolds seeded with bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int*. 2019 Apr 11;2019:7343957. doi: 10.1155/2019/7343957.

## ANEXO – Certificado do Comitê de ética



**UNESP**  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos



**ICT**  
Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP



**CERTIFICADO**  
**CEUA – Comissão de Ética no**  
**Uso de Animais**

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 012/2019, intitulado:- Influência de Scaffolds à base de cimento de aluminado de cálcio, incorporados com células mesenquimais, na regeneração óssea: Estudo in vivo " sob a responsabilidade de **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS** , tendo como colaboradora aluna de Mestrado **CARLA DA SILVEIRA E OLIVEIRA BRONZE**; 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 07/02/2020.

|                         |                                                                                         |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Finalidade              | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência da Autorização | 07/02/2020 a 31/12/2020                                                                 |
| Espécie/linhagem/raça   | Rato/heterogênico Wistar                                                                |
| Nº de Animais           | 26                                                                                      |
| Peso/idade              | 350 gr – 90 dias                                                                        |
| Sexo                    | macho                                                                                   |
| Origem                  | Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP                                             |

São José dos Campos, 07 de fevereiro de 2020



**Profa.Dra. PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**  
Coordenadora

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dâmas  
 CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076  
 Fax (12) 3947-9010 / guedes@fosjc.unesp.br/komori@fosjc.unesp.br