

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – *CAMPUS* SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL – PPGBMA

Jessica Asami

**ARCABOUÇO BIORREABSORVÍVEL DE POLI(L-CO-D,L ÁCIDO LÁCTICO-CO-
TRIMETILENO CARBONATO) CULTIVADO COM CÉLULA-TRONCO
MESENQUIMAL DIRECIONADA À REGENERAÇÃO ÓSSEA: ESTUDO *IN VITRO*
E *IN VIVO***

Sorocaba

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – *CAMPUS* SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL – PPGBMA

Jessica Asami

**ARCABOUÇO BIORREABSORVÍVEL DE POLI(L-CO-D,L ÁCIDO LÁCTICO-CO-
TRIMETILENO CARBONATO) CULTIVADO COM CÉLULA-TRONCO
MESENQUIMAL DIRECIONADA À REGENERAÇÃO ÓSSEA: ESTUDO *IN VITRO*
E *IN VIVO*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Sorocaba

2020

Asami, Jessica

ARCABOUÇO BIORREABSORVÍVEL DE POLI(L-CO-D,L ÁCIDO LÁCTICO-CO-TRIMETILENO CARBONATO) CULTIVADO COM CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL DIRECIONADA À REGENERAÇÃO ÓSSEA: ESTUDO IN VITRO E IN VIVO. / Jessica Asami. -- 2020.

94 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

Banca examinadora: Newton Maciel Oliveira, Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Bibliografia

1. Biotecnologia . 2. Engenharia Tecidual. 3. Regeneração Óssea. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da
andidata Jéssica Asami, realizada em 10/03/2020:

Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek
PUC-SP

Prof. Dr. Newton Maciel Oliveira
PUC-SP

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin
UFSCar

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores brasileiros que lutam incansavelmente e se entregam à vida acadêmica visando estabelecer um futuro melhor para a sociedade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me iluminar nesse caminho e me proporcionar saúde e proteção nessa jornada.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais Margarete, Silvio e Lincoln, aos meus avós Yoshio e Setsuko (*in memoriam*), às minhas irmãs Caroline e Isabela, ao meu cunhado Patrick e à minha sobrinha Beatriz. Serei eternamente grata por todo o suporte, tanto financeiro quanto emocional nessa fase acadêmica, sem vocês nada disso seria possível, devo todas as minhas conquistas a vocês, muito obrigada!

Agradeço ao meu namorado Diogo, o qual foi muito mais que um companheiro nessa trajetória, me motivando sempre a querer buscar e realizar os meus sonhos. Obrigada meu amor! Você me faz querer crescer todos os dias para ter um futuro melhor ao seu lado.

Agradeço ao laboratório de Biomateriais (Labiomat) onde me encontrei como pesquisadora e, acima de tudo, descobri que uma equipe é, na verdade, uma família. Minha gratidão vai especialmente para a minha professora e orientadora Eliana Duek com seus conselhos e palavras de motivação e aos assistentes de pesquisa Moema e Daniel, com seus vastos conhecimentos, me mostrando que a cada dia há algo novo a ser aprendido. Por último quero dizer especialmente aos alunos Flávia, Lucas, Pâmela, Rodrigo e Mayara, e a técnica Priscila, sem vocês o laboratório não teria a mesma alegria e motivação, obrigada!

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram comigo, boa parte do tempo foi para me proporcionar diversão, distração e alegria. Vocês foram essenciais para deixar a mente e o corpo mais leve e equilibrado.

Por fim, agradeço à instituição de fomento CAPES, no qual me auxiliou financeiramente com os meus estudos e a minha pesquisa. Agradeço também às instituições de ensino UFSCar, PUC-SP, UNISO e IDPC-SP que me deram todo o suporte para que o meu projeto fosse desenvolvido com sucesso.

“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda
como se fosse viver para sempre.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

ASAMI, Jéssica. Título: Arcabouço Biorreabsorvível de Poli(L-Co-D,L Ácido Láctico-Co-Trimetileno Carbonato) Cultivado com Célula-Tronco Mesenquimal Direcionada à Regeneração Óssea: Estudo *in vitro* e *in vivo*. 2020. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2020.

Problemas degenerativos e inflamatórios dos ossos e articulações representam cerca de metade das doenças crônicas desenvolvidas em indivíduos com mais de 50 anos em todo o mundo, conduzindo a problemas de dor prolongada e incapacidade física. A sua prevalência aumenta com a idade e estilo de vida, pelo que, com o aumento da população idosa, estes casos têm vindo a aumentar. A resolução destas situações normalmente exige cirurgias que envolvem a aplicação de implantes ou enxertos ósseos. Apesar do êxito destas soluções terapêuticas, têm surgido alguns inconvenientes, relacionados com o fato de os implantes serem susceptíveis ao desenvolvimento de infecções e dos enxertos, poderem originar dores, infecções, morte dos tecidos do local doador e rejeições imunológicas. Com a finalidade de sanar estas limitações surgiu a Engenharia de Tecidos, que constitui uma área promissora na reparação e reconstrução de lesões ósseas, através do desenvolvimento de matrizes tridimensionais porosas, habitualmente designadas por scaffolds. Associadas a estas estruturas estão células osteoprogenitoras e fatores de crescimento, que conduzem à formação de tecido ósseo novo, através da estimulação da capacidade natural de regeneração dos tecidos do paciente. Visando esta importante lacuna clínica, o biomaterial Poli(L-co-D,L ácido láctico-co-Trimetileno Carbonato) (PLDLA-TMC) apresenta particularidades vantajosas para a área médica, principalmente quando o mesmo estiver associado com células-tronco mesenquimais (CTMs), em função da atividade imunomoduladora destas células. Portanto, neste trabalho foi desenvolvido um arcabouço 3D de PLDLA-TMC com poros de 300 e 600 μm . Nos experimentos *in vitro*, utilizaram-se CTMs de origem humana e murina, as quais foram semeadas no arcabouço de PLDLA-TMC para ensaios de proliferação e diferenciação osteogênica. No ensaio *in vivo*, foram utilizados 36 ratos para o defeito ósseo na calota craniana e separados em 3 grupos: controle negativo, grupo com PLDLA-TMC e grupo com PLDLA-TMC+CTMs, no tempo de 8 e 12 semanas. Os resultados *in vitro* obtidos pela análise da Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) mostraram que os arcabouços 3D de PLDLA-TMC de 600 μm , quando comparados aos de 300 μm , foram mais favoráveis a aderência, crescimento e diferenciação celular, e, principalmente, apresentaram característica osteoindutora. Já os implantes do arcabouço de PLDLA-TMC e CTMs, por meio das análises histológicas e por MicroCT, demonstraram os melhores resultados no período de 12 semanas, obtendo menor processo inflamatório e maior regeneração do tecido ósseo.

Palavras-chave: Engenharia Tecidual. Biomateriais. PLDLA-TMC. Diferenciação Celular. Osteogênese.

ABSTRACT

Asami, J. Bioreabsorbent scaffold of Poly(L-co-D,L lactic acid-co-Trimethylene Carbonate), grown with mesenchymal stem cells directed to bone reconstruction: *in vitro* and *in vivo* studies. Dissertation of Master Degree in Biotechnology of Environmental Monitoring. Sorocaba: Federal University of São Carlos; 2020.

Degenerative and bones inflammatory problems represents almost half of chronic diseases developed on people older than 50 years old around the world, leading to problems of prolonged pain and physical limitation. Its prevalence increases with age and life style, therefore, with elderly population growth, these cases have been increasing too. These problems resolution, usually demand surgeries which involve implant and bone graft. Even with these therapeutic solution success, some inconvenient have been appearing, because of the fact implants are susceptible to infections, and because of grafts can lead to severe pain, local tissue death, and immunological rejection. Aiming to solve these limitations, Tissue engineering have appeared as an promising field of bone wound repair and reconstruction, through tridimensional porous matrix development, usually designated as scaffolds. Associated to these structures, are osteoprogenitors cells and growth factors, which lead to new bone tissue growth, through stimulation of ability of natural tissue regeneration of patient. Aiming this important clinical gap, the biomaterial Poly(L-co-D,L lactic acid- co-Trimethylene Carbonate) (PLDLA-TMC) presents advantageous features to the medical field, mainly when related to stem cells, due to immunemodelling activities of this cells. Therefore, in this essay it was seeding in a PLDLA-TMC 3D scaffold with different pores sizes (300 e 600 μm) for proliferation and osteogenic differentiation. *In vivo* assay were used 36 *Wistar* rats and were made a cranial bone defect with 8 mm diameter, separated in 3 groups: negative control, group with PLDLA-TMC and group with PLDLA-TMC+MSC, in periods of 8 and 12 weeks. The results *in vitro* assay obtained for analysis by Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) showed that PLDLA-TMC 3D scaffolds with 600 μm pore size, when compared the scaffold of 300 μm pore size, favored the adherence and cell growth, and mainly, presented osteoinductive characteristic, which means that the material itself induced cellular differentiation. The scaffolds implants of PLDLA-TMC with MSC, through histological and microCT analysis, showed better results in the period of 12 weeks, obtaining less inflammatory process and greater regeneration of bone tissue.

Key Words: Tissue Engineering. Biomaterial. PLDLA-TMC. Cellular Differentiation. Osteogenesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Gráfico representativo do aumento no número publicações na área da regeneração tecidual.....	22
FIGURA 2 - Representação esquemática do chamado “ <i>Omnis cellula e cellula</i> ” de Virchow, no qual cada célula se origina a partir de outra célula.....	32
FIGURA 3 - Ilustração esquemática da remodelação óssea.....	37
FIGURA 4 - Ilustração da estrutura química do terpolímero PLDLA-TMC.....	43
FIGURA 5 - Esquema representativo da síntese do terpolímero PLDLA-TMC.....	44
FIGURA 6 - Fluxograma de imagens do isolamento das CTMs de ratos Wistar onde se observa a tricotomia de ambas as coxas do animal (A), os fêmures e tíbias limpos (B), os ossos após o corte das epífises (C) e a amostra preparada para ser centrifugada no tubo falcon.....	46
FIGURA 7 - Imagens do cultivo de CTMs de ratos <i>Wistar</i> mostrando a aderência e a proliferação após o tempo de 4 dias. Observado na microscopia óptica invertida por contraste de fase, no aumento de 200x. Barra de 100 µm.....	47
FIGURA 8 - Representação esquemática dos grupos de implante na calota craniana de ratos Wistar.....	50
FIGURA 9 - Representação ilustrativa da região no qual foi realizado o defeito crítico no tamanho de 8 mm e local da incisão e sutura.....	51
FIGURA 10 - Ilustração esquemática do procedimento cirúrgico indicados pela seta: A) Tricotomia na parte frontal do animal; B) incisão de aproximadamente 30 mm; C) raspagem do periósteo; D) defeito de 8 mm de diâmetro; E) implante do material (ambos os grupos) e F) Sutura no local da incisão no formato em U.....	52
FIGURA 11 - Imagens ilustrativas (fora de escala) do arcabouço de PLDLA-TMC projetado a partir do programa computacional Solidworks.....	55
FIGURA 12 - Gráfico representativo da quantidade de células indiferenciadas e diferenciadas em arcabouço de PLDLA-TMC.....	56
FIGURA 13 - Imagens representativas obtidas pela MCVL das CTMs diferenciadas em osteoblastos em arcabouços de PLDLA-TMC com poros de 300 e 600 µm.....	57
FIGURA 14 - Gráfico representativo da detecção de fluorescência de sinal (A) em 1mm linear entre cada amostra de tamanho de poro (300 e 600 µm), sobrepostas entre si. Imagem representativa obtida pela MCVL, da diferenciação osteogênica em	

arcabouços de PLDLA-TMC com poros de 300 e 600 μm , por meio da marcação de OCN (B e C). Barras 50 μm	58
FIGURA 16 - Imagens obtidas pela MCVL do grupo de células diferenciadas no arcabouço de PLDLA-TMC, marcadas indiretamente pela OPN e OCN conjugadas com AlexaFluor 647® (vermelho), e os núcleos celulares marcados com DAPI (azul). Nas imagens é possível observar a alta expressão da OPN e OCN ao longo do arcabouço e também no interior dos poros. Além disso, observa-se uma alta proliferação de células diferenciadas a partir da marcação dos núcleos celulares. Barra de 50 μm	61
FIGURA 17 - Imagens obtidas a partir da MCVL, no qual os grupos foram marcados com OPN (vermelho) e DAPI (azul). O grupo controle A refere-se à lamínula de vidro cultivada com CTMs onde não sofreram diferenciação celular, enquanto que o grupo controle B compreende o arcabouço de PLDLA-TMC cultivado com CTMs não submetidas à diferenciação. O grupo C relaciona-se ao arcabouço de PLDLA-TMC cultivado com CTMs e submetida à diferenciação osteoblástica. O período de cultivo das células foi de 21 dias para todos os grupos. Barra de 50 μm	63
FIGURA 18 - Grau de anisotropia dos arcabouços em função do tempo de implante..	64
FIGURA 19 - Poros abertos em função do tempo de implante.....	66
FIGURA 20 - Poros fechados em função do tempo de implante.....	67
FIGURA 21 - Avaliação por microCT das calotas em regeneração após 8 (A, C e E) e 12 semanas (B,D e F) demonstrando as áreas em ossificação (setas identificando áreas de cor verde no interior do defeito crítico) no interior da cavidade do defeito crítico. Um controle contendo um arcabouço de PLDLA-TMC (*) não submetido aos procedimentos foi adicionado em cada análise para realizar uma comparação mensurável de densidade.....	69
FIGURA 22 - Apresentação histológica da região de defeitos com seus respectivos grupos. Em A, evidencia região de borda da lesão com tecido ósseo original (#) circundado por tecido mesenquimatoso (*) oriundo do periósteo adjacente. Em B, pequena espícula óssea jovem em processo de ossificação (estrela) rodeada por osteoblastos (cabeça-de-seta) sintetizando matriz óssea. Em C, observa-se pequena área jovem em ossificação (estrela) circundada por delicado mesênquima (*), em D, PLDLA-TMC degradando (M) circundado por tecido mesenquimatoso (seta) tangenciando as bordas. Imagem E evidencia extensa área em ossificação rica em tecido mesenquimatoso (*). Em F, áreas residuais contendo PLDLA-TMC (M).	

Barras (A, C e E) 300 e (B, D e F) 1000 μm 71

FIGURA 23 - Apresentação histológica da região de defeitos com seus respectivos grupos. Em A, evidencia região de borda da lesão com tecido ósseo (estrela) circundado por osteoblastos e tecido mesenquimatoso (*). Em B, observa-se tecido ósseo não lamelar (estrela) circundado por tecido contendo fibras colágenas delicadas com baixa densidade de células. Em C, observa-se extensa área de osso maduro circundado por área em ossificação (estrela), ao redor tecido adjacente já apresenta características de tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado. Em D evidencia área de ossificação rica em osteoblastos oriundos do mesênquima adjacente. Em E, região de centro de lesão com área em ossificação tanto lamelar quanto não lamelar (estrela) circundada por tecido conjuntivo frouxo rico em delgadas fibras colágenas. Em F, evidencia a alta densidade de células mesenquimais (*). Barras (A, C e E) 1000 e (B, D e F) 300 μm 74

FIGURA 24 - Imagens ilustrativas de comparação da análise histológica (A) com a análise pelo MicroCT (F), ambas as imagens do grupo tratamento de 12 semanas..... 76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Descrição dos primeiros desenvolvimentos de implantes à base de biomateriais.....	27
TABELA 2 - Artigos publicados de 2014 a 2018 pelo grupo de pesquisa do laboratório de Biomaterias-PUC/SP, mostrando o terpolímero PLDLA-TMC como um biomaterial promissor para aplicação na medicina regenerativa.....	30
TABELA 3 - Tabela representativa dos recentes trabalhos que utilizaram as CTMs para o reparo tecidual ósseo.....	35
TABELA 4 - Tabela representativa dos parâmetros utilizados para a impressão 3D do arcabouço de PLDLA-TMC com poros de 300 e 600 µm. Sendo que (*) é a distância entre cada camada e o quanto a impressora sobe no eixo z a cada vez que começa a próxima camada.....	45
TABELA 5 - Tabela representativa dos marcadores utilizados para análise do ensaio <i>in vitro</i> de proliferação e diferenciação celular.....	48
TABELA 6 - Grupos e respectivos defeitos realizados.....	49
TABELA 7 - Comparativo qualitativo dos principais parâmetros de reparo pós-implante.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
AL	Ácido Láctico
BMP-2	Proteína Morfogenética Óssea do tipo 2
BMP-6	Proteína Morfogenética Óssea do tipo 6
BMP-7	Proteína Morfogenética Óssea do tipo 7
BMPs	Proteínas Morfogenética Óssea
BSA	Albumina de Soro Bovino
CE	Células Embrionárias
CG	<i>Calcein Green</i>
CTH	Células-tronco Hematopoiética
CTMs	Células-tronco Mesenquimais
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulocitárias
hCTMs	Células-tronco Mesenquimais Humano
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IGFs	Fator de Crescimento semelhante à insulina
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina

PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCL-T	Poli (caprolactona triol)
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDLA	Poli(D,L ácido lático)
PFA	Paraformaldeído
PLDLA	Poli(L-co-DL ácido lático)
PLDLA-TMC	Poli(L-co-D,L ácido láctico-co-Trimetileno Carbonato)
PLLA	Poli(L-ácido lático)
PUC-SP	Pontifícia Universidade Católica- São Paulo
RANKL	Proteína Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
Runx2	Fator de Transcrição Óssea 2
S1P	Receptor de Esfingosina 1- Fosfato
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento
TMC	Trimetileno Carbonato
Wnt10B	Gene de Codificação de Proteínas

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	21
2.1	ENGENHARIA TECIDUAL	21
2.2	BIOMATERIAIS	24
2.2.1	POLÍMEROS	28
2.3	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	31
2.4	TECIDO ÓSSEO	35
2.5	O PAPEL DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NO REPARO TECIDUAL ÓSSEO	39
3.	OBJETIVO	42
3.1	GERAL	42
3.2	ESPECÍFICOS	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	SÍNTESE DO TERPOLÍMERO PLDLA-TMC	43
4.2	EXTRUSÃO DO PLDLA-TMC PARA OBTENÇÃO DE FIO	44
4.3	IMPRESSÃO “3D” DO PLDLA-TMC PARA OBTENÇÃO DO ARCABOUÇO	44
4.4	CULTURA CELULAR (ENSAIO <i>IN VITRO</i>)	45
4.4.1	ISOLAMENTO E OBTENÇÃO DAS CTMs	45
4.4.2	CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR	47
4.4.3	PROCESSAMENTO E MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A ANÁLISE NA MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)	47
4.4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4.5	IMPLANTE (ESTUDO <i>IN VIVO</i>)	49
4.5.1	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	50
4.5.1.1	COLETA DAS AMOSTRAS	52
4.5.2	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR A PARTIR DO ARCABOUÇO DE PLDLA-TMC COM POROS DE 300 E 600 μ M EM ENSAIO <i>IN VITRO</i>	55
5.2	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CTMS NO ARCABOUÇO DE PLDLA-TMC COM POROS DE 600 μ M	59
5.2.1	ANÁLISE POR MCVL DA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR OSTEOBLÁSTICA	59
5.3	ANÁLISE DO ENSAIO <i>IN VIVO</i>	63
5.3.1	ANÁLISE POR TOMOGRAFIA DOS PARÂMETROS DA ÁREA IMPLANTADA	63
5.3.2	ANÁLISE RADIOGRÁFICA DOS IMPLANTES (MICROCT)	67
5.3.3	ANÁLISE DOS IMPLANTES A PARTIR DO PROCESSO HISTOLÓGICO	70

6. CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Erro! Indicador não definido.

79

1. INTRODUÇÃO

O osso é uma estrutura que possui a função de movimentação e manutenção da estabilidade postural, sendo considerado um tecido de suporte, o qual trabalha juntamente com o tecido muscular (JIMI, *et al.*, 2012). Devido a esse fato, a necessidade do aprimoramento de técnicas para substituir, restaurar ou regenerar o tecido ósseo nas áreas da ortopedia, espinhal, dental, cirurgias cranianas e maxilofaciais, é extremamente importante em razão do envelhecimento da população mundial, e também pelas doenças que acarretam a perda desse tecido. (BRYDONE, *et al.*, 2010; WIESE e PAPE, 2010).

Deste modo, a Engenharia Tecidual surgiu como um campo interdisciplinar que visa a utilização de biomateriais e células em um ambiente adequado para que esses dois componentes interajam, propiciando assim o reparo dos tecidos (HOWARD, *et al.*, 2008; SCOTT, *et al.*, 2018).

Neste contexto, há diversos biomateriais que podem ser utilizados na área da Engenharia Tecidual, de origem tanto natural quanto sintética, de compostos, combinados ou não. Os biomateriais poliméricos são promissores nessa área, pois podem ser modificados de forma a obter propriedades adequadas para cada aplicação, tais como biodegradabilidade, flexibilidade e biocompatibilidade (SAITO, *et al.*, 2005). A aplicação desses biomateriais e a necessidade de uma estrutura tridimensional (3D) para reparação tecidual óssea, impulsionou o desenvolvimento e crescimento da área de biofabricação. Dessa forma, já é possível imprimir arcabouços e incorporar células progenitoras e potenciais fatores de crescimento que auxiliam na recuperação do tecido (ZHANG, *et al.*, 2018). Deste modo, um sistema 3D favorece a obtenção de poros com tamanho e distribuição de tamanho controlados, característica que influencia no crescimento, migração e diferenciação celular, que consequentemente irão promover a regeneração do tecido lesionado (MURPHY, *et al.*, 2010 ; SINGH, 2017).

Em associação com os biomateriais, (HEATH, 2000; KIM e EVANS, 2005) as células-tronco tem a capacidade distinta de se auto renovarem e se diferenciarem, sendo muito promissoras para as terapias celulares, diferentemente dos outros tipos celulares, como as células somáticas (MCARDLE, *et al.*, 2013). As células-tronco mesenquimais (CTMs) além de obter uma alta eficiência em seu isolamento e expansão, também são capazes de se diferenciar em múltiplas linhagens sob estímulos moleculares de cultura direcionada (COVAS, 2006).

Adicionalmente, a capacidade imunomoduladora das CTMs coloca estas células num patamar que regula e controla o processo inflamatório intrínseco que ocorre em lesões ósseas. As CTMs liberam citocinas que modificam o fenótipo de macrófagos pró-inflamatórios (M1) para anti-inflamatórios (M2). Deste modo, ocorre um processo mais acelerado de regressão da inflamação (CHUNG e SON, 2014). As citocinas induzem a uma ativação alternativa, fazendo uma mudança de fenótipo do macrófago, exibindo propriedades anti-inflamatórias e de reparo tecidual (GORDON, 2003, SUN *et al.*, 2016).

As células por sua vez participam ativamente no remodelamento do tecido ósseo, as quais incluem, os osteoclastos, osteoblastos e os osteócitos. As células osteoclásticas são recrutadas quando necessárias e são responsáveis pela degradação do tecido ósseo não funcional, enquanto a biossíntese de um novo osso para a substituição é realizada pelas células osteoblásticas. Por fim, os osteócitos, células mais abundantes no osso maduro, formam redes interconectadas em todo o tecido ósseo auxiliando no monitoramento do estresse mecânico nos tecidos ósseos (ARIAS, *et al.*, 2018).

O recrutamento dessa associação de biomateriais e células se faz necessária quando há uma lesão tecidual óssea que contém um tamanho crítico que não é possível ocorrer esse processo natural de remodelação. Os mesmos servem de suporte, recrutamento de moléculas e auxílio para a regeneração do tecido ósseo. Para compreender melhor esse caminho alternativo, se faz necessário entender as propriedades do material bem como o comportamento celular. Neste caso, os estudos *in vivo* e *in vitro* se mostram necessários, uma vez que o modo *in vivo* corrobora para compreender a administração e o destino de produtos químicos e a toxicidade, imitando as verdadeiras condições do organismo (NEBERT e SUNDBERG, 2016) e o estudo *in vitro* fornece a oportunidade de estudar a resposta celular em um sistema fechado, no qual as condições experimentais são mantidas (DOKE e DHAWALE, 2015).

Levando em consideração os requisitos necessários para promover o reparo do tecido ósseo, o terpolímero a base de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-Trimetileno Carbonato) (PLDLA-TMC) se mostrou ser um material promissor dentro da Engenharia Tecidual Óssea, por apresentar a capacidade de biorreabsorção, biocompatibilidade, flexibilidade e taxa de degradação compatíveis com as aplicações de interesse (MOTTA *et al.*, 2018). Além disso, estudos anteriores já comprovaram que o arcabouço de PLDLA-TMC, contendo poros de irregulares, se mostra também capaz de propiciar um ambiente favorável para a proliferação e migração de células osteoblásticas (MESSIAS, *et al.*, 2014) e o mesmo colabora no processo

de regeneração tecidual óssea nos defeitos não crítico em tíbias de ratos tipo *Wistar* (MOTTA, *et al.*, 2018).

Frente a todas essas características certificadas do terpolímero, a partir de parâmetros impostos nos estudos anteriores, bem como poros irregulares, comportamento de células diferenciadas e regeneração tecidual nos defeitos de tamanhos não críticos (tecido ósseo capaz de reparar sem fatores externos) (MESSIAS, 2014), o desafio do trabalho visa compreender se 1) o arcabouço a base de PLDLA-TMC com poros regulares, tanto de 300 quanto de 600 μm , modifica a proliferação, migração e diferenciação celular; 2) o material propicia o processo de diferenciação osteogênica a partir de CTMs indiferenciadas; 3) o material possui um potencial osteoindutor no local da lesão e 4) a associação de CTMs com o PLDLA-TMC auxilia na regeneração tecidual em de defeitos críticos ósseos.

Portanto, solucionar tais lacunas quanto ao comportamento do PLDLA-TMC é de grande interesse não apenas para o campo da ciência, mas principalmente para melhorar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos com danos no tecido ósseo, visando desse modo aprimorar e contribuir com a evolução deste campo de pesquisa, com ênfase na aplicação médica para regeneração tecidual óssea.

2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1 ENGENHARIA TECIDUAL

As primeiras referências de Engenharia Tecidual se deram há séculos atrás, entretanto o termo “Engenharia Tecidual” foi definido, pela primeira vez no Workshop da “*National Science Fundation*”, em 1988 como: “A aplicação dos princípios e métodos da engenharia e a ciência da vida para a compreensão fundamental da relação estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos, e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções” (SKALAK, *et al.*, 1988).

A partir desse novo termo, estudos se aprofundaram nesse contexto, um dos principais trabalhos que se destacam no âmbito da Engenharia Tecidual foi do americano Charles Alfred Vacanti, pesquisador pioneiro em engenharia de tecidos e células-tronco, que construiu um dispositivo poroso tridimensional à base de poliésteres sintéticos biodegradáveis em forma de uma orelha humana. Nesse dispositivo foram semeados condrócitos vivos, isolados de um bezerro recém-sacrificado e, posteriormente, implantado no subcutâneo no dorso de um rato. Esse experimento resultou na regeneração de tecidos da cartilagem com uma estrutura semelhante a uma orelha humana (VACANTI, *et al.*, 1992).

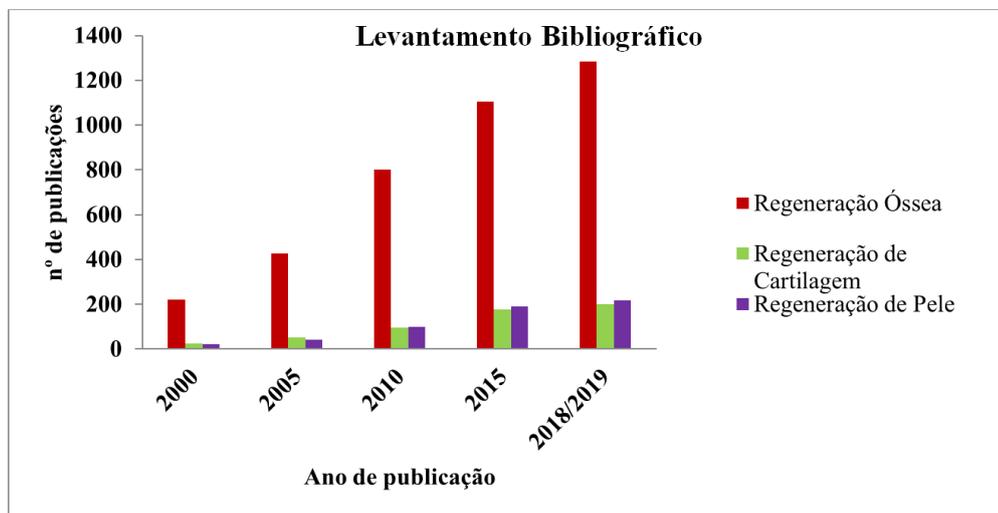
Em 1993, os pesquisadores Robert Langer e Joseph Vacanti adotaram três estratégias gerais para a criação de um novo tecido: 1) Células isoladas- são utilizadas para substituir somente as células que suprem a função necessária, faz com que evite complicações cirúrgicas e permite a manipulação das mesmas antes da infusão; 2) Substâncias indutoras do tecido - faz-se necessária a purificação e produção em larga escala de moléculas sinalizadoras apropriadas, bem como os fatores de crescimento e, em muitos casos, os mesmos desenvolvem métodos para direcionar as moléculas aos seus respectivos alvos; 3) Células cultivadas em matrizes - as células são ligadas às matrizes que posteriormente são implantadas e incorporadas no organismo. Essas matrizes podem ser de origem natural (como o colágeno) ou sintética (materiais à base de poliésteres, por exemplo) (LANGER e VACANTI, 1993).

Após estudos relacionados à aplicação da Engenharia Tecidual para a promoção da regeneração dos tecidos, Cao e colaboradores (1997) repetiram o experimento do pesquisador Vacanti, otimizando a forma da matriz 3D, no qual foi utilizado um molde de uma orelha de criança de três anos de idade, constituída a base de polímeros. Os condrócitos foram semeados na matriz em concentrações apropriadas e implantados no dorso de um rato de

linhagem *nude*. Assim, o comportamento da formação da neocartilagem madura apresentou funcionamento semelhante à cartilagem auricular nativa (CAO, *et al.*; 1997).

Esses trabalhos mostraram a importância da prática de reconstruir as estruturas funcionais biológicas por meio da Engenharia Tecidual e, recentemente, é uma grande meta em vários campos da medicina, incluindo o transplante de órgãos, a reconstrução na área oncológica (SCOTT, *et al.*, 2018) e também no tratamento ou substituição de danos teciduais (JENSEN, *et al.*, 2018). Atualmente, nota-se um avanço nas publicações na área de Engenharia Tecidual, associando os biomateriais com as práticas da regeneração óssea, de cartilagem e pele (Figura 1). Esse avanço é observada por meio do levantamento quantitativo no banco de dados PubMed de trabalhos publicados nos períodos de 2000, 2005, 2010, 2015 e 2019. A base para o levantamento foi por meio de palavras-chaves como: *bone regeneration biomaterials*, *cartilage regeneration biomaterials* e *skin regeneration biomaterials* e filtros: *Clinical Trial*, *Journal Article*, *Meta-Analysis* e *Review*.

FIGURA 1 - Gráfico representativo do aumento no número publicações na área da regeneração tecidual.



Fonte: Autoria Própria

Hoje em dia, a regeneração tecidual visa reparar diversos tecidos, bem como a promoção do reparo de pele, no qual é comumente realizada a associação de fármacos naturais com os biomateriais, a fim de auxiliar nesse processo reestruturação de tecidos dérmicos lesionados (SUGANYA, *et al.*, 2014; KOMATSU, *et al.*, 2017). Pesquisas recentes mostraram que essas combinações expressam resultados muito promissores, como por exemplo o uso da aroeira-vermelha associada ao arcabouço a base de PLDLA-TMC para o

reparo da lesão dérmica causada por queimaduras de segundo grau, conforme apresentado no estudo realizado por Komatsu e colaboradores (2019). Os resultados obtidos foram: diminuição da inflamação local, estímulo da epitelização e recuperação da derme.

Além da associação de fármacos aos biomateriais para fins terapêuticos atualmente são utilizadas também as terapias celulares, as quais utilizam células para propiciar o reparo tecidual. Esses biomateriais não apenas auxiliam como um substituto, mas também servem como um suporte para o crescimento, migração e diferenciação celular (ZHANG, *et al.*, 2018). Assim, como apresentado no estudo de Peng e colaboradores (2019), no qual desenvolveu um arcabouço de hidrogel a base de Polivinil Alcool (PVA) associado à quitosana com células-tronco mesenquimais (CTMs) semeadas, pode-se perceber que os resultados foram satisfatórios uma vez que o material promoveu uma excelente adesão, proliferação e diferenciação celular, além disso, os danos no tecido cartilaginoso foram recuperados com o auxílio do arcabouço de PVA/quitosana+ CTMs.

Este número crescente observado na figura 1, relacionado aos estudos na regeneração óssea, é devido a um problema clínico significativo na reconstituição de defeitos ósseos causados por lesões, câncer, malformações e outras doenças, que vem persistindo (DAMIA, *et al.*, 2018). Atualmente, muitos trabalhos são desenvolvidos em torno da medicina regenerativa óssea, onde, por meio da engenharia tecidual, busca a regeneração completa de tecidos danificados. Para isso, são necessárias quatro ferramentas centrais que, quando combinadas, promovem a regeneração óssea: (a) Biomateriais, (b) Biomoléculas, (c) Células e (d) Estímulos aplicados externamente (LOPES, *et al.*, 2018).

Tendo em vista essas principais ferramentas utilizadas no processo de cura do tecido ósseo, tem sido valorizado o uso de biomateriais sintéticos para este propósito, pois o mesmo, além de apresentar biocompatibilidade, também obtém propriedades mecânicas mais elevadas quando comparadas aos biomateriais naturais. Essa notável característica faz com que o mesmo tenha a habilidade de ser moldado de diferentes maneiras, dentre elas a eletrofição (ZEUGOLIS, *et al.*, 2008) e a impressão 3D (KIM, *et al.*, 2016). Pela eletrofição é possível ajustar o diâmetro das fibras a nível manométrico e micrométrico (WANG, *et al.*, 2017), já a impressão 3D garante na sua construção (arcabouço) algumas características, tais como: definir e controlar o tamanho dos poros, a forma, porosidade, distribuição e interconexão desses poros (CHIA e WU, 2015; CHRISTMAN, 2019). Tais controles na construção de dispositivos por impressão 3D fazem dos materiais um ponto favorável para a adesão, proliferação e migração celular (GUPTE, *et al.*, 2018; BABILOTTE, *et al.*, 2019).

Além disso, para que haja sucesso no reparo tecidual, a engenharia tecidual visa utilizar biomateriais biodegradáveis e/ou bioabsorvíveis, e que forneçam um ambiente químico *in vivo* adequado para o crescimento de novo tecido (FARID, 2019). As células mais propícias são as CTMs e/ou células embrionárias (CE), uma vez que ambas têm a capacidade de proliferação e diferenciação celular direcionadas ao estudo em questão e também capacidade de produção de matriz extracelular semelhante ao tecido nativo (HOWARD, *et al.*, 2008). Já os estímulos aplicados externamente podem ser fatores bioquímicos que melhoram a substituição das funções biológicas (AKTER, 2016), ou até mesmo ambientes modelos para a compreensão da regeneração de tecidos, como o modelo *in vitro* e o *in vivo* (SALA, *et al.*, 2013).

2.2 BIOMATERIAIS

De acordo com o jornal internacional “*Biomaterials*”, por definição, “Biomaterial é uma substância que foi projetada para assumir uma forma, seja sozinha ou em partes, para interagir com componentes de sistemas vivos com a finalidade terapêutica ou diagnóstica” (BIOMATERIALS, 2020). Os biomateriais podem assumir formas de implante, bem como implantes dentários e válvulas cardíacas, e também formas de dispositivos médicos, como biossensores por exemplo. Os mesmos são utilizados para substituir ou melhorar a função desses tecidos e órgãos que sofreram algum tipo de injúria (HUDECKI, *et al.*, 2019).

Além disso, os biomateriais podem ser compreendidos em três principais gerações. A primeira geração (1960 a 1970) buscava substituir, por meio dos dispositivos implantáveis à base de biomateriais, tecidos vivos cujas propriedades físicas levassem ao reparo e restauração da parte do corpo danificado. O intuito destes dispositivos e materiais era ser o mais inerte possível, a fim de reduzir a corrosão e liberação de íons e partículas após implantação, ou seja, corroborar numa resposta imune mínima para o corpo humano (HENCH, 1980; HENCH e POLAK, 2002; NAVARRO, *et al.*, 2008; HENCH e THOMPSON, 2010). As cerâmicas, como por exemplo, a alumina e a zircônia, são materiais bioinertes que mantêm suas propriedades químicas e físicas quando implantadas (SANTAVIRTA, *et al.*, 1998; PIRES, *et al.*, 2015).

A segunda geração ocorreu por volta de 1970, quando muitas aplicações biomédicas começaram a exigir que os biomateriais não fossem mais inertes no organismo, isto é, requerendo materiais bioativos, no qual houvesse uma interação com o mesmo (NING, *et al.*, 2015; ZAVAGLIA, *et al.*, 2016). Hench (1991) explica quatro processos de reações em

relação ao material: 1- Se o material apresentar toxicidade, o tecido circundante morre; 2- Se o material não for tóxico, apenas inerte, é formado um tecido fibroso de espessura variável; 3- Se o material não for tóxico, mas biologicamente ativo (bioativo), forma-se uma ligação interfacial e, 4- Se o material não for tóxico e se dissolver, o tecido circundante o substituirá (HENCH, 1991).

A terceira geração de biomateriais foi desenvolvida durante o período de 1990 e se faz presente até nos dias atuais, sendo que apresenta o intuito de combinar as propriedades dos materiais bioativos com os materiais biorreabsorvíveis, tornando-o um novo material. O mesmo é capaz de ativar genes e estimular a regeneração de tecidos vivos a nível molecular (NING, *et al.*, 2015).

A manipulação dos materiais, bem como os vidros bioativos e polímeros biorreabsorvíveis, promove as interações específicas com as células de modo a direcionar a proliferação, diferenciação, produção e organização da matriz extracelular. Assim, há duas alternativas de reparo por meio desses biomateriais: 1) Pela Engenharia Tecidual, na qual células são isoladas a partir de um indivíduo e cultivadas *in vitro*. Posteriormente, as células são semeadas sobre arcabouços feitos de biomateriais e cultivadas em modo estático externamente até o momento do implante, o qual posteriormente será reabsorvido pelo corpo e substituído por um tecido novo; 2) Pela regeneração tecidual *in situ*, o qual envolve o uso dos biomateriais na forma de pós, soluções e micropartículas contendo fármacos que estimulam a reparação tecidual local. Desta maneira as micropartículas a base de biomaterial encapsulando partículas de fármacos são ingeridos ou aplicados e liberam o fármaco de modo controlado ou não controlado (HENCH e POLAK, 2002).

Com os avanços no âmbito dos biomateriais para fins biomédicos, surgiu a quarta geração, que, além de reunir as características da geração anterior, como a degradação dos materiais no sistema biológico, também possibilitou o surgimento de novas propriedades e interações físico-química e biológicas desses biomateriais, bem como a regulação dos processos biológicos, integração no sistema biológico e combate à infecção após implantação (JANDT, 2007). Diante desse fato, atualmente, a preocupação em formular uma estrutura a base de biomaterial que seja ideal tanto para o implante de interesse quanto para a interação celular é considerável. Frente a essa demanda, o método de bioimpressão vem ganhando espaço no âmbito da medicina, procurando desenvolver um dispositivo com melhores propriedades e que resulte em um excelente reparo tecidual.

A bioimpressão (biofabricação) oferece a alternativa de combinar células de maneira controlada com matrizes naturais ou sintéticas a fim de construir estruturas que desempenham

a função similar ao tecido natural (SALARIS e ROSA, 2019). Dentre os desafios nas construções 3D de camadas de materiais biológicos, bioquímicos e células vivas está a adaptação das impressões que anteriormente serviam para plásticos e metais fundidos para criar uma microarquitetura de componentes da matriz extracelular e vários tipos de células com qualidade suficiente para mimetizar uma função biológica (MURPHY e ATALA, 2014; CHOUDHURY, *et al.*, 2018). Essa impressão se dá pela distribuição do material nos locais de destino para formar uma superfície plana ou espacial, alterando no equipamento a posição relativa entre o bico de impressão e a plataforma. Além disso, com estratégias apropriadas, a bioimpressão é capaz de depositar células e materiais simultaneamente (ZHOU, *et al.*, 2019).

Assim, com base no processo histórico dos biomateriais e suas aplicações como implantes, foram relatados os primeiros ensaios dessa modalidade utilizando animais e seres humanos, obtendo êxito nos resultados obtidos (Tabela 1).

TABELA 1. Descrição dos primeiros desenvolvimentos de implantes à base de biomateriais.

Implantes à base de Biomateriais	Biomaterial	Ano	Descrição	Bibliografia
Lentes de Contato	Poli(metil metacrilato)	1888-1948	O oftalmologista alemão Adolf Gaston Eugen Fick inventou a primeira lente de contato que obteve sucesso. Ele implantou primeiramente em coelhos e posteriormente em humanos.	RATNER, 2004.
Próteses de Joelho e Quadril	Teflon, Polietileno	1958-1961	O médico ortopedista britânico John Charnley foi um dos pioneiros na pesquisa do desenvolvimento da prótese de quadril e joelho utilizando material a base de teflon e polietileno.	RATNER, 2004.
Dispositivo Ventricular (Coração Artificial)	Poli(vinil cloreto)	1963	O médico Neerlandês Dr. Willem Kolff e seus colaboradores fizeram o primeiro implante de coração artificial em animais e o americano Paul Winchell patenteou o primeiro coração artificial.	UFUKERBULUT, LAZOGLU, 2011;
Implante Dentário	Titânio	1965	O médico Ortopedista sueco Per-Ingvar Branemark fez o primeiro implante dentário feito de titânio em formato de raiz e aplicou em humano.	BRENEMARK, <i>et al.</i> , 1985.

Fonte: Autoria Própria

Os biomateriais poliméricos bioabsorvíveis são os ideais candidatos para o desenvolvimento de tais dispositivos terapêuticos. Cada aplicação desses dispositivos demanda materiais com sua física, química, biologia, bioquímica e propriedades de degradação específicas para promover a eficiência terapêutica (LOPES, *et al.*, 2012). Uma das principais vantagens desses materiais biorreabsorvíveis é não necessitar a realização de uma 2ª intervenção cirúrgica em caso de procedimento de implante posterior à consolidação óssea ter se procedido (MOTTA e DUEK, 2009). Os biomateriais poliméricos, por sua vez, podem

ser de origem natural e sintética, e suas propriedades devem permitir sua utilização para a substituição de vários tipos teciduais (LOUREIRO, 2017).

2.2.1 POLÍMEROS

Os polímeros estão presentes desde o início dos tempos com os próprios suportes da base da vida. Todas as classes de organismos vivos são formadas de polímeros, porém uma compreensão mais clara dos mesmos veio com o desenvolvimento dos plásticos, materiais criados pelo homem (EBEWELE, 2000). A palavra polímero é derivada do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição), sendo uma macromolécula que contém muitas unidades de repetição (monômeros), unidas por ligações covalentes. Pelo conhecimento da sua massa molar é possível definir o comprimento dessas cadeias poliméricas (CANEVAROLO, 2006; LOVE, 2017).

Dentre as diversas classes poliméricas sintéticas, os polímeros à base de ácido láctico (PLA) são poliésteres que têm um grande potencial em aplicações biomédicas e deriva de recursos 100% renováveis. Além de possuírem características biodegradáveis e serem altamente versáteis, os mesmos não liberam componentes tóxicos durante sua fabricação (DRUMRIGHT, *et al.*, 2000; NOFAR e PARK, 2014).

O primeiro a desenvolver e sintetizar o Poli (ácido láctico) foi o químico e inventor americano Wallace Carothers, em 1932, o qual produziu um produto de baixa massa molecular aquecendo o ácido láctico à vácuo. No entanto, apenas mais tarde o polímero foi sintetizado com alta massa molecular pela polimerização da abertura do anel lactídeo, conferindo propriedades mecânicas superiores (MEHTA, *et al.*, 2005).

Em 1954 a empresa química americana *DuPont*[®], a qual Carothers fazia parte, produziu o PLA com maior massa molecular e, logo em seguida, foi patenteado (LOPES, *et al.*, 2012). Desde 2002 o PLA é produzido e comercializado pela empresa *Cargill*, empresa mais ativa no desenvolvimento de poli(ácido láctico), e *Dow Chemical*, uma vez que esse produtos poliméricos estão sendo utilizados em aplicações nos campos tecnológicos (GUPTA, *et al.*, 2007).

O PLA pode existir de três formas esteroquímicas: poli (L-lactideo) (PLLA), poli(D-lactideo) (PDLA) e poli(DL,L-lactideo) (PLDLA) (NAMPOOTHIRI, *et al.*, 2010). A associação dessas formas traz algumas vantagens, uma vez que é capaz de aliar propriedades mecânicas inerentes a determinada configuração química com a maior taxa de degradação de outra. A degradação do PLDLA se mostra aparente no terceiro mês de implante (*in vivo*),

mostrando que, para auxiliar no reparo de um tecido que exija um tempo maior, o mesmo pode ser satisfatório no processo regenerativo (MOTTA e DUEK, 2009).

O copolímero PLDLA proporciona boas propriedades mecânicas, o que lhe confere uma adequada aplicação cirúrgica como em fraturas ósseas e até mesmo em liberação controlada de fármaco (MOTTA e DUEK, 2009). O processamento do copolímero é dado pela polimerização do poli (L-ácido láctico), por meio da abertura do L-lactídeo, conhecido por possuir maior resistência mecânica. Contudo, o mesmo apresenta alta cristalinidade e longo tempo de degradação, o que pode acarretar em respostas indesejáveis ao organismo (MESSIAS, 2011).

Devido a isso, são realizadas sínteses de copolimerização entre os anéis L-lactídeo e D,L- lactídeo, resultando em um material com uma diminuição drástica da cristalinidade, obtendo copolímeros completamente amorfos (MOTTA e DUEK, 2007). Assim, o monômero D,L-lactídeo melhora a biocompatibilidade do material, e devido à sua alta massa molar, o mesmo apresenta boas propriedades mecânicas e uma excelente processabilidade térmica (BENDIX, 1998).

Em virtude das propriedades físico-químicas do copolímero, muitas pesquisas atrelam o mesmo no âmbito da Engenharia Tecidual, visando à regeneração de diferentes tipos de tecidos. O estudo de Más e colaboradores (2016) apresentou o copolímero PLDLA como um biomaterial promissor para o reparo tecidual ósseo em função do seu comportamento perante as células-tronco diferenciadas em osteoblastos. Suas características, como a conformidade 3D (arcabouço), auxiliou e facilitou o crescimento do tecido na área de implante (defeito na calota craniana em ratos *Wistar*), e também estimulou uma melhor distribuição dos pontos de partida da formação óssea. A taxa de degradação do PLDLA também foi analisada, mostrando uma taxa que começa após 8 semanas, semelhante ao tempo de formação óssea.

Diante das funcionalidades do biomaterial PLDLA no campo da regeneração tecidual, as associações do copolímero com outros tipos de materiais e, até mesmo com fármacos, tem ganhado espaço no campo da Engenharia Tecidual. As modificações físicas dos polímeros se dão pela necessidade de uma determinada aplicação, o qual exige as chamadas blends poliméricas (mistura física de dois ou mais polímeros) (LUNA, *et al.*, 2015). A associação de diversos materiais ao PLDLA torna-o um polímero com propriedades e características que favorecem o seu desempenho em relação às suas aplicações. Esposito e colaboradores (2013) mostraram a associação do PLDLA com o agente plastificante poli(caprolactona triol) (PCL-T) na engenharia de tecidos do menisco. Essa interação do PCL-T com o PLDLA resultou em

um material mais maleável, porém resistente, muito promissor para o desenvolvimento de um dispositivo direcionado ao substituto meniscal.

A inserção do trimetileno carbonato (TMC), pertencente à classe dos policarbonatos, na composição do copolímero poli(L-co-D,L ácido láctico), formando o terpolímero poli(L-co-D,L ácido láctico-co-TMC) (PLDLA-TMC), contribui para maior maleabilidade do material, permitindo uma ampla aplicação na área médica (MESSIAS, 2011). Desta maneira, combinar as boas propriedades mecânicas do poli(L-co-D,L ácido láctico) com a flexibilidade e deformação na ruptura conferida pelo TMC é de grande vantagem para a prática médica, levando em consideração o ajuste do tempo de degradação para aplicação como próteses, bem como para arcabouço na regeneração tecidual óssea (CABRERA, 2014).

O terpolímero PLDLA-TMC foi desenvolvido e patenteado em 2010 (Número do registro: PI0201100492) pelo Laboratório de Biomateriais, localizado na Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (PUC-SP) em Sorocaba, sobre a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Eliana Duek (MOTTA e DUEK, 2010). Estudos publicados (Tabela 2) demonstraram que o material é promissor na área da regeneração tecidual.

TABELA 2 - Artigos publicados de 2014 a 2018 pelo grupo de pesquisa do laboratório de Biomaterias-PUC/SP, mostrando o terpolímero PLDLA-TMC como um biomaterial promissor para aplicação na medicina regenerativa.

Artigo	Revista	Autores
<i>“Synthesis, Characterization, and Osteoblastic Cell Culture of Poly(L-co-D,L-lactide-co-trimethylene carbonate) Scaffolds.”</i>	<i>International Journal of Biomaterials</i>	<i>MESSIAS et al., 2014</i>
<i>“Development of a membrane of poly(L-co-D,L lactic acid-co-trimethylene carbonate) with aloe vera: An Alternative biomaterial designed to improve skin healing.”</i>	<i>Journal of Biomaterials Applications</i>	<i>KOMATSU, et al., 2017</i>
<i>“In vitro and in vivo studies on devices of poly(L-co-D,L lactic acid)-co- TMC for bone repair.”</i>	<i>Polymer Bulletin</i>	<i>MOTTA, et al., 2018</i>

Fonte: Autoria Própria

Segundo os artigos mencionados na tabela 2, o terpolímero PLDLA-TMC, obtém propriedades biorreabsorvíveis, importante vantagem para um implante, uma vez que, ao comparar com um polímero inerte, por exemplo, o terpolímero não requer uma segunda intervenção cirúrgica para a remoção do organismo, diminuindo a exposição e os efeitos colaterais no indivíduo (MOTTA, *et al.*, 2018). Sua morfologia contém vários poros no

interior do arcabouço 3D, a qual auxilia na condução do crescimento celular e sua viabilidade e proliferação de células osteoblásticas, o que demonstra ser um material com grande potencial para regeneração tecidual óssea (MESSIAS, *et al.*, 2014). Além disso, é possível conjugar o material tanto com células quanto com fármacos naturais, bem como a *Aloe Vera*, sendo um potencial dispositivo para a medicina regenerativa (KOMATSU, *et al.*, 2017).

Diante dos trabalhos desenvolvidos com o biomaterial PLDLA-TMC foi possível observar a boa interação das células com o material em estudo, servindo de auxílio para o reparo tecidual (MESSIAS, 2011). Assim, fica evidente também a importância das células-tronco para a Engenharia Tecidual Óssea.

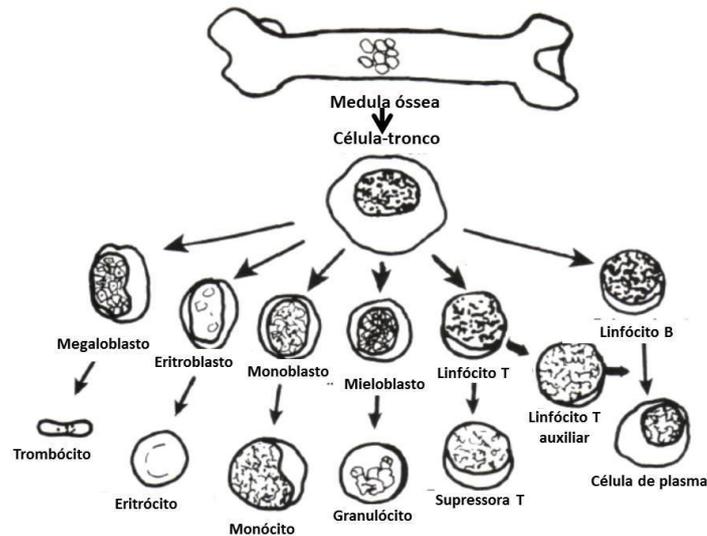
2.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco tem um papel potencial na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos. Essas células obtêm várias propriedades que as tornam uma fonte atraente de células para aplicações terapêuticas, bem como a autorrenovação e capacidade de diferenciar em células e tecidos especializados (SINGH e DYKXHOORN, 2019).

Nesse contexto, uma das maiores descobertas sobre a biologia celular se deu a partir dos estudos do médico polonês Rudolf Virchow (1821-1902). Enquanto estudava a formação dos ossos, ele analisou que as células ósseas eram desenvolvidas a partir das células da cartilagem e que, por sua vez, eram transformadas em células do tecido conjuntivo. Finalmente, ele chegou à conclusão de que as células não se originavam de um material amorfo, mas da divisão celular (LIN, 1983).

Em 1855, Virchow publicou o famoso livro “*Omnis cellula e cellula*” que dizia que cada célula se origina de outra célula (Figura 2) e, a partir disso, surgiu a Patologia Celular, no qual o médico afirmou que as doenças são derivadas das alterações das células normais, sendo chamado assim de “O pai da patologia” (LIN, 1983; SHULTZ, 2008; BIGNOLD, *et al.*, 2008).

FIGURA 2 - Representação esquemática do chamado “*Omnis cellula e cellula*” de Virchow, no qual cada célula se origina a partir de outra célula.



Fonte: Adaptado de LIN (1983)

O surgimento dos estudos relacionados às células multipotentes, CTMs e hematopoiéticas (CTH) no século XX estavam em evidência pelos pesquisadores Alexander Maximow (1874-1928) e Alexander Friedenstein (1924-1998), os quais foram pioneiros nessa área e responsáveis pela descoberta das células-tronco adultas não hematopoiéticas na medula óssea (AFANASYEV, *et al.*, 2009). Além disso, Friedenstein demonstrou que a medula óssea contém células estromais, ou seja, fibroblastos que, por sua vez, são capazes de se diferenciarem em células osteogênicas e também são necessárias para o desenvolvimento de um microambiente hematopoiético (FRIEDENSTEIN, 1976). Assim, por estudos *in vitro*, observou-se que as células fibroblásticas têm uma grande capacidade de proliferação extensiva e são grandes precursoras comuns de osso e de cartilagem (FREIDENSTEIN, *et al.*, 1987).

Células-tronco são definidas como células que conseguem se diferenciar em vários tipos de células especializadas sob certas condições fisiológicas ou práticas (WEI, *et al.*, 2013). As células podem se derivar de alguns tecidos específicos humanos, bem como o cordão umbilical, medula óssea, placenta, e as células-tronco mesenquimais, as quais derivam do mesênquima (TROUSON, *et al.*, 2011). Devido a este fato, as células-tronco vêm sendo incorporadas na medicina regenerativa a fim de auxiliar no processo de recuperação do tecido danificado ou até mesmo para cura de doenças (KOSARIC, *et al.*, 2019).

Atualmente, os estudos com células-tronco ligadas à regeneração tecidual têm sido bastantes aceitos devido à alta capacidade das mesmas em regenerar tecidos após um trauma, doença ou envelhecimento do mesmo (PITTENGER, *et al.*, 1999). De acordo com Cardoso e Arruda (2009) e Sohni e Verfaillie (2011) “As células-tronco possuem propriedades essenciais únicas, como a capacidade de auto renovação, ou seja, a predisposição de originar-se em outra célula-tronco com características idênticas e a diferenciação em linhagens sobre condições apropriadas”. As mesmas apresentam a habilidade de se diferenciar em mais de 200 tipos de células. Consoante ao seu grau de plasticidade, as células podem ser classificadas como totipotente, pluripotente ou multipotente (LEVY, *et al.*, 2017).

Células totipotentes são aquelas que dão origem a todos os tecidos extra-embriônicos e também a todos os tecidos do corpo e linhagem germinativa (BAKER e PERA, 2017; TATULLO, *et al.*, 2020). As células pluripotentes possuem uma gama de capacidades funcionais. As mesmas podem gerar células de cada uma das três camadas germinativas embrionárias: a endoderme, a mesoderme e a ectoderme, considerando também a sua capacidade em proliferar-se em longo prazo (YEN, *et al.*, 2005; ROBINSON e DALEY, 2013; TATULLO, *et al.*, 2020). Já as células multipotentes, dão origem apenas a uma determinada linhagem de células, como por exemplo, CTMs e neurais (SHWINDT *et al.*, 2005; TATULLO, *et al.*, 2020).

As CTMs, além de apresentar uma multipotência, demonstram também que são capazes de se diferenciar em células maduras de várias linhagens principalmente derivada de tecidos mesodérmicos (RIBAS, *et al.*, 2018), assim, podendo se diferenciar em todas as linhagens osteoblásticas, tais como células estromais, células de revestimento ósseo, osteoprogenitores, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos (MATSUO e IRIE, 2008) e também em adipócitos, condroblastos, fibroblastos e mioblastos (DOMINICI, *et al.*, 2006, MATSUO e IRIE, 2008).

As CTMs, do mesmo modo, são muito propícias na reparação e regeneração de tecidos, como por exemplo, os implantes de enxertos ósseos que mantém a população de CTMs nativas para o ambiente original, fazendo com que aquele defeito seja recuperado (SRINIVASAN, *et al.*, 2019). Essa recuperação é possível devido às CTMs terem a capacidade de amenizar as inflamações locais e promoverem células progenitoras e células residentes a fim de regenerar a função normal, tanto das células quanto do tecido no microambiente (QI, *et al.*, 2018; SHERMAN, *et al.*, 2019). Assim, as CTMs fazem com que o tecido se recupere positivamente, modulando as respostas imunes, e evitando a ocorrência

de processos inflamatórios agudos na região da lesão, características próprias desse tipo celular. (ZHANG, *et al.*, 2013; AKKER, *et al.*, 2013; GOULART, *et al.*, 2018).

Estudos com as CTMs, atualmente, estão sendo desenvolvidos a fim de colaborar na medicina, beneficiando-se da sua capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares, com intuito de ser uma potência nas terapias regenerativas (FITZSIMMONS, *et al.*, 2018). Além de utilizarem as CTMs como métodos de tratamentos, as pesquisas também estão associando essas CTMs com os biomateriais, uma vez que, lesões ósseas podem chegar a proporções que o próprio tecido ósseo não possui a capacidade de remodelamento, ou seja, para isso necessita de um suporte para que o processo regenerativo ocorra (WINKLER, *et al.*, 2018).

Diante dessas atuais perspectivas, ensaios *in vivo* (Tabela 3) têm apresentado resultados promissores no que diz respeito aos biomateriais em associação com as células voltadas à regeneração tecidual óssea. De acordo com Qadhi e colaboradores (2020), quando implantado o material conjuntamente com as CTMs, a área de calcificação é de cerca de 55%, enquanto que o implante apenas com o material tem a taxa aproximada de 35% de área calcificada. Complementarmente, estudos de Song e colaboradores (2019) mostraram, por meio dos implantes, que a taxa de densidade mineral óssea encontrada foi de $0,15 \text{ g/cm}^3$ para implantes apenas com material e $0,55 \text{ g/cm}^3$ para implantes que utilizaram material e CTMs associadas, assegurando novamente o sucesso dessa combinação no reparo do tecido ósseo.

Para corroborar com os resultados satisfatórios mencionados acima, Cassaro e colaboradores (2019) apresentaram também uma conclusão similar aos demais estudos, indicando uma significância maior na deposição da matriz óssea com implantes biopoliméricos e CTMs. Assim, a utilização das células para fins regenerativos se mostra próspero e com uma taxa de sucesso muito maior quando comparado apenas com a utilização de biomateriais no processo da regeneração tecidual.

TABELA 3 - Tabela representativa dos recentes trabalhos que utilizaram as CTMs para o reparo tecidual ósseo.

Regeneração de tecidos ósseos (estudos <i>in vivo</i>)			
Material	Tipo Celular	Implante	Autor
Material comercial de hidroxiapatita com gel de sílica	CTMs derivada da medula óssea e CTMs derivada da gengiva	Implantes em tíbias de coelho Defeito de 6 mm de diâmetro Período de implante: 6 semanas	GAMILAH <i>et al.</i> , 2020
Arcabouço a base de colágeno com quecertina e hidroxiapatita	CTMs derivada da medula óssea de ratos	Implantes em calvaria de ratos Defeitos de 4 mm de diâmetro Período de implante: 8 semanas	JEONG <i>et al.</i> , 2019
Biopolímero de fibrina e fosfato de cálcio bifásico	CTMs da medula óssea de ratos	Implantes em fêmur de ratos Defeitos de 5 mm de diâmetro Período de implante: 8 semanas	CASSARO <i>et al.</i> , 2019

Fonte: Autoria Própria

2.4 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o principal elemento que compõe o esqueleto feito de compostos naturais e uma estrutura anisotrópica, ou seja, uma estrutura que apresenta uma heterogeneidade (SZABÓ e THURNER, 2013). Sua função característica é conferir rigidez e dureza, atuando como um tecido de sustentação altamente especializado, o qual proporciona a locomoção, apoio mecânico, proteção e que também atua como um reservatório metabólico dos sais minerais (STEVENS, *et al.*, 1995; GENESER, 2003). O osso é composto de uma matriz orgânica que ganha um reforço a partir dos depósitos de cálcio. A matriz orgânica é constituída de aproximadamente 95% de colágeno tipo I, sendo os outros 5% composto por proteoglicanos e proteínas não colagenosas. A matriz orgânica do osso contém sais cristalinos depositados os quais são, principalmente, o cálcio e a hidroxiapatita (MARKS e ODGREN, 2002).

Esse tecido é um tipo especializado de tecido conjuntivo constituído por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células que compõem o osso são: 1) Osteócitos, que se encontram em cavidades ou lacunas no interior da matriz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004); 2) Osteoblastos, promotores da parte orgânica da matriz, entre elas, a osteocalcina (OCN) e a osteopontina (OPN), proteínas não colagenosas secretadas pelas células osteoblásticas durante a formação óssea (ANDERSON, *et al.*, 2018); e 3)

Osteoclastos, células gigantes, multinucleadas, móveis que reabsorvem o tecido ósseo e ainda participam das etapas de remodelação dos ossos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são as primeiras células que estão envolvidas no processo de reabsorção óssea, cujo processo está intimamente relacionado à remodelação do osso em resposta ao desenvolvimento ou alteração de tensões mecânicas no esqueleto. Os osteoclastos também têm o papel de manutenção e, ao longo prazo, da homeostase do cálcio no sangue (MOHAMED, 2008; BELLIDO, *et al.*, 2019).

A partir das células osteoprogenitoras, os osteoblastos possuem a finalidade de sintetizar e secretar a matriz orgânica do osso, além de calcificar diretamente essa matriz com base na secreção de pequenas vesículas contendo fosfatase alcalina e outros fatores iniciais de ossificação (TELSER, *et al.*, 2008). Os mesmos, derivados de CTMs, são fortemente regulados por proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (YAMAGUCHI, *et al.*, 2000). As BMP-2 e BMP-7 apresentam a habilidade de induzir a osteogênese *in vivo* (BEEDERMAN, *et al.*, 2013). A BMP-2 está intimamente ligada à indução do fator de transcrição Cbfa1 que envolve os genes na formação óssea e diferenciação osteoblástica a partir das células mesenquimais (BANERJEE, *et al.*, 2001; LIAN e STEIN, 2003; WANG e YEUNG, 2017). A BMP-7, por sua vez, é capaz de promover a angiogênese (WANG e YEUNG, 2017).

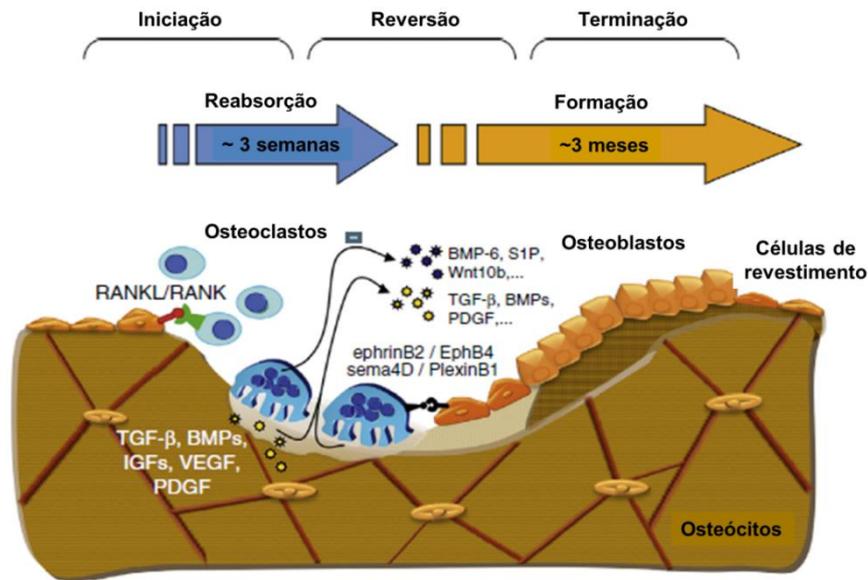
Posterior à fase de mineralização, na qual os osteoblastos participam ativamente, os mesmos se diferenciam em osteócitos, sendo completamente envolvidos pela matriz óssea (ROCHEFORT, *et al.*, 2010; SCHAFFLER, *et al.*, 2014). Além de ter um papel importante na homeostase do Ca^{2+} , os osteócitos também produzem matriz óssea, embora não com o mesmo desempenho que os osteoblastos (TELSER, *et al.*, 2008).

Resumidamente, a remodelação óssea acontece primeiramente pelo recrutamento de precursores hematopoiéticos e a diferenciação (pela expressão de osteoblastos por ligantes osteoclastogênicos que ativam o receptor do fator RANKL) dos mesmos em osteoclastos. Os osteoclastos se modificam em multinucleados e reabsorvem o osso. A fase de transição da mudança de reabsorção para a formação óssea se dá pela ativação de alguns fatores e sinais bem como: (1) Fatores de crescimento incorporados a matriz óssea e libertados após a reabsorção osteoclástica: TGF- β , BMPs, IGFs, PDGF; (2) Sinais solúveis decorrentes ou não de osteoclastos: BMP-6, S1P e Wnt10b e (3) Moléculas ligadas à membrana: Efrinas e Semaforinas.

Na fase de terminação, as lacunas são preenchidas por formação óssea através dos osteoblastos que posteriormente se achatam formando uma camada de células de revestimento

na superfície óssea ou então se tornam osteócitos conectados por canalículos dentro do osso (Figura 3) (MAES e KRONENBERG, 2015).

FIGURA 3 - Ilustração esquemática da remodelação óssea.



Fonte: Adaptado de MAES e KRONENBERG (2015)

O tecido ósseo pode ser formado de duas maneiras, denominada endocondral e intramembranosa. O modo denominado endocondral ocorre sobre uma matriz de cartilagem hialina que, gradativamente, é reabsorvida e substituída pelo tecido ósseo formado, com início da diferenciação de células do tecido conjuntivo próximo (WOLF, *et al.*, 2012). A ossificação intramembranosa ocorre de uma forma direta no tecido conjuntivo e assim, o osso se desenvolve diretamente dentro de uma membrana de tecido conjuntivo mole ao invés de uma matriz cartilaginosa (AFONSO, 1998). O modo endocondral promove a formação de ossos longos, um processo mais complexo, e a intramembranosa geralmente desenvolve ossos do complexo crânio-facial (JANONES, 2009; WOLF, *et al.*, 2012).

O osso é um tecido que apresenta a capacidade única de regeneração (GERIS, *et al.*, 2008). Quando o mesmo sofre um trauma (no qual há perda de tecido ósseo), é comumente realizado um enxerto ósseo, o qual é feito um procedimento cirúrgico para reposição de um novo osso ou um material de substituição. Esses substitutos são colocados no espaço ao redor da fratura ou em cavidades encontradas no osso (defeito) para ajudar na cura (DACULSI, *et al.*, 2013).

Os enxertos utilizados nesses processos podem ser autógenos ou alógenos. O enxerto autógeno é composto por células do tecido do próprio indivíduo (KUMAR, *et al.*, 2013) e podem ser adquiridos por diferentes segmentos do corpo em diversas formas como tiras, blocos ou partículas (ARTZI, *et al.*, 2005). Ele é capaz de promover a osteoindução, osteocondução e a osteogênese (BAUER e MUSCHLER 2000). O enxerto alógeno é obtido por outro indivíduo da mesma espécie (PINTO, *et al.*, 2007), seja ele um doador vivo ou de cadáveres humanos (STOPA, *et al.*, 2018).

Nesse procedimento de enxerto ocorrem três mecanismos necessários para realizar a regeneração nos defeitos ósseos: osteoindução, osteocondução e osteogênese (FISHERO, *et al.*, 2015). A osteoindução é o estímulo das células osteoprogenitoras para se diferenciarem em osteoblastos e formar um novo tecido ósseo no músculo ou sob a pele. A osteocondução é a capacidade de um material servir como um arcabouço para as células capilares sanguíneas, sobre o qual o tecido ósseo cresce ao longo do material. (NAKAMURA, 2007; MARTIN e BETTENCOURT, 2018). Já a osteogênese é classificada por uma sequência de eventos incitados pelas células osteoblásticas que se proliferam e expressam o próprio fenótipo (ELANGO, *et al.*, 2016).

Para um material ser apropriado para aplicação na regeneração óssea, o mesmo necessita ser caracterizado como biocompatível, bioativo, osteocondutível, osteoindutível, além de apresentar boas propriedades mecânicas para garantir a integridade durante a reparação óssea (MESKINFAM, 2017). Para tanto, um substituto ósseo na forma de um arcabouço tridimensional (3D) permite a proliferação celular e, conseqüentemente, a regeneração dos tecidos osteogênicos durante a recuperação da lesão (ELGALI, *et al.*, 2016).

Assim, as práticas *in vivo* e *in vitro* se fazem necessárias, uma vez que o modelo *in vivo* corrobora para compreender a administração e o destino de produtos químicos e a toxicidade, imitando as verdadeiras condições do organismo (NEBERT e SUNDBERG, 2016). Adicionalmente, o estudo *in vitro* fornece a oportunidade de estudar a resposta celular em um sistema fechado, no qual as condições experimentais são mantidas (DOKE e DHAWALE, 2015). Essas práticas podem ser consideradas componentes da engenharia tecidual (O'BRIEN, 2011).

Atualmente, os estudos na regeneração do tecido ósseo vêm tomando proporções bastante significativas. Pesquisas recentes mostram que os biomateriais (sintéticos e naturais) são capazes de estimular a ativação das vias de sinalização celular, levando a expressão da atividade do fator de transcrição óssea Runx2. A Runx2 é responsável pela diferenciação das

CTMs em células osteoblásticas, mostrando que os biomateriais são ótimos osteoindutores (RAO, *et al.*, 2018).

A associação dos biomateriais com as CTMs visam melhorar a regeneração tecidual, uma vez que as CTMs promovem a vascularização no local da lesão e acelera o crescimento do tecido, reduzindo a formação de cicatrizes, que resulta em melhores taxas de recuperação a níveis estruturais e funcionais (CASEIRO, *et al.*, 2015). No estudo de Caseiro e colaboradores (2015), além de trazer a concepção de biomateriais, tanto natural quanto sintético, como uma ótima ferramenta para a reparação e regeneração do tecido muscular esquelético, os autores trazem também a ideia da utilização das CTMs para corroborar nesse processo de cura tecidual.

Para que as CTMs apresentem os benefícios terapêuticos, é importante compreender os seus efeitos parácrinos sobre as populações vizinhas. Desse modo, o estudo investigou, quais os tipos de fatores parácrinos estavam sendo secretados pelas CTMs que afetariam significativamente os resultados regenerativos.

Para além dos fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e componentes da matriz extracelular já identificados foram observados, por meio do secretoma de CTMs do estroma, cordão umbilical, medula óssea, líquido amniótico e tecido adiposo, níveis relevantes de fatores proliferativos, quimiotáticos e imunomoduladores, tais como TGF- β s, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6, IL-8, além de fatores vasculogênicos, comprovando que as CTMs podem ser consideradas uma ferramenta importante na reparação e regeneração do tecido muscular esquelético (CASEIRO *et al.*, 2015). Logo, frente a este panorama e diante da importância da regeneração óssea, a engenharia tecidual óssea é desenvolvida a fim de trazer benefícios terapêuticos aos pacientes, bem como melhorar a qualidade de vida destes indivíduos por meio de tais tratamentos inovadores e cada vez mais eficazes.

2.5 O PAPEL DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NO REPARO TECIDUAL ÓSSEO

A inflamação é um processo natural que ocorre quando há um tecido lesionado. Essa lesão induz a uma resposta inflamatória que acarreta no recrutamento de moléculas iniciais associadas aos danos, moléculas associadas a patógenos e por leucócitos. A resposta inflamatória é caracterizada por vias celulares intrínsecas e extrínsecas bem como citocinas, fatores de crescimento, matriz extracelular e a transição fenotípica das populações de leucócitos nas lesões. Esses processos são respectivamente interdependentes e importantes

para que ocorra uma resposta bem regulada e que assim transcorra uma cicatrização eficiente da lesão (URAO, 2016).

Segundo Gethin (2012) o processo inflamatório agudo ocorre em sete etapas: 1) A partir do diagnóstico do tecido lesionado, há o contato das bactérias e outros patógenos com o local da ferida; 2) Neste processo, as plaquetas do sangue liberam proteínas que auxiliam na coagulação do mesmo no local da lesão; 3) Os mastócitos por sua vez secretam fatores que mediam a vasodilatação e a constrição vascular. O recrutamento de sangue, plasma e células à área lesionado são aumentadas; 4) Seguindo as etapas anteriores, os neutrófilos secretam fatores que ceifam e degradam os patógenos; 5) Os neutrófilos e macrófagos removem esses patógenos por fagocitose; 6) Esses macrófagos vão liberar hormônios chamadas de citocinas que vão se ligar à células do sistema imunológico ao local e ativando as células envolvidas no reparo tecidual e 7) A resposta inflamatória prossegue até que o material estranho seja eliminado e a lesão seja reparada.

Os principais macrófagos envolvidos no processo inflamatório são os macrófagos pró-inflamatórios (M1) e o anti-inflamatório (M2). Os macrófagos M1 estão relacionados ao estágio inicial da inflamação, produzindo altos níveis de citocinas, enquanto que os macrófagos M2 produzem menos citocinas e estão associados à resolução da inflamação e reparo do tecido (GALLI *et al.*, 2012).

Uma vez que há o processo natural de inflamação, predominantemente chamada de inflamação aguda, o qual tem uma duração relativamente curta, de horas a dias, dependendo da extensão (ANDERSON, 2013), essa mesma inflamação pode obter estímulos inflamatórios persistentes, acarretando em uma inflamação crônica (ANDERSON, 2019). A inflamação crônica é frequentemente associada à destruição irreversível do tecido parenquimatoso, no lugar do defeito é preenchido com tecido conjuntivo fibroso. Há o aumento da proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e a neovascularização pela secreção de citocinas pelas células T e macrófagos do tipo M1 (TROWBRIDGE, 1990; ANDERSON, 2013). A inflamação crônica ocorre quando o mecanismo do processo inflamatório agudo falha ao eliminar o tecido lesionado (LINTERMANS, *et al.*, 2014). Outra forma de inflamação crônica é a granulomatosa o qual pode ser identificadas as presenças de macrófagos agregados grandes, ativados e com quantidades significativas, macrófagos epitelioides ou células gigantes multinucleadas (HOENERHOFF e BRIX, 2015).

Diante desse processo inflamatório crônico, existem algumas alternativas para evitar que esse tipo de inflamação ocorra, dentre essas alternativas se encontra a utilização das CTMs no local lesionado. As CTMs tem a capacidade de fornecer imunorregulação específica

do local, ou seja, ela é capaz de adotar um fenótipo diferente em resposta à detecção de um ambiente inflamatório (BERNARDO e FIBBE, 2013). Assim, a variabilidade de ativação dos diferentes estados dos macrófagos durante todo o curso da inflamação pode ser imunomodulada pelas CTMs, ativando os diferentes fenótipos de macrófagos, sejam eles pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios (SALDAÑA *et al.*, 2019).

Do mesmo modo que o processo inflamatório ocorre de forma natural no local de uma lesão, no defeito no tecido ósseo também acontece esse processo, iniciando por uma resposta inflamatória imediata acompanhada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias. Quando há uma lesão perfeitamente alinhada e sem ruptura de vasos sanguíneos, a inflamação ativa um processo de ossificação intramembranosa que produz diretamente uma nova estrutura óssea lamelar sem requerer nenhuma fase de remodelação. Já nas lesões com grandes defeitos hipóxicos e deformação interfragmentares a resposta de ossificação intramembranosa ocorre subperiostealmente diretamente às extremidades da fratura, gerando um calo duro (processo que ocorre pelo preenchimento de células cartilaginosas que posteriormente sofrem calcificação) (GAMBARI, *et al.*, 2019).

O tecido ósseo humano, quando sofre uma lesão de alta dimensão, não tem a capacidade de se auto-reparar. Assim, comumente é utilizado, nestes casos, um implante de material sintético ou natural. Desta maneira, os implantes na engenharia de tecidos auxiliam no processo inflamatório que atua diretamente na transformação rápida e eficaz dos macrófagos M1 envolvidos nessa etapa para os macrófagos M2, promovendo a diferenciação osteogênica e uma cicatrização óssea efetiva (MU, *et al.*, 2018; WATERS, *et al.*, 2017).

3. OBJETIVO

3.1 GERAL

Avaliar em modelos *in vitro* e *in vivo* a resposta das CTMs cultivadas em arcabouço 3D a base de PLDLA-TMC direcionada a regeneração tecidual óssea.

3.2 ESPECÍFICOS

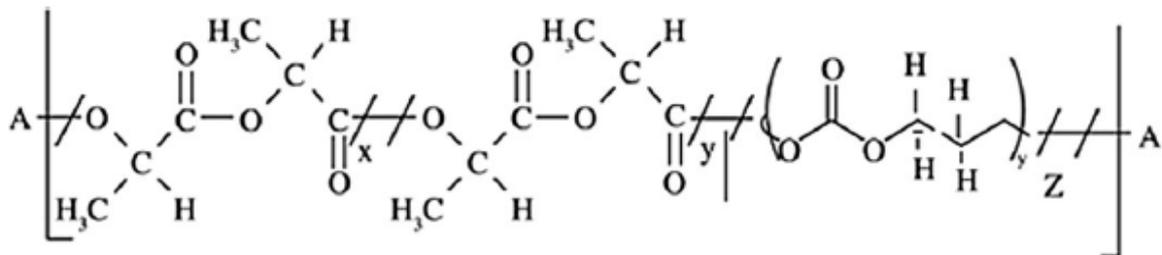
- Obter o arcabouço de PLDLA-TMC, com poros de diferentes tamanhos (300 e 600 μm), a partir da impressão 3D;
- Obter as CTMs a partir do isolamento da medula óssea dos fêmures e tíbias de ratos *Wistar*;
- Analisar a citocompatibilidade do material PLDLA-TMC cultivado com as CTMs em arcabouços com poros de 300 μm e 600 μm ;
- Averiguar a diferenciação celular osteoblástica a partir das CTMs cultivadas no arcabouço 3D com poros de 300 μm e 600 μm de PLDLA-TMC;
- Verificar o potencial osteoindutor do arcabouço *in vitro* não submetidos a fatores de diferenciação osteogênicos;
- Implantar o arcabouço que apresentar maior capacidade de diferenciação e proliferação na calota de ratos submetidos a defeito crítico experimental;
- Avaliar histologicamente o processo de regeneração dos implantes de PLDLA-TMC impresso e comparar com seus respectivos grupos;
- Avaliar por meio da técnica de microCT as áreas em regeneração a fim de identificar pontos de calcificação em toda a extensão dos defeitos implantados com o material.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DO TERPOLÍMERO PLDLA-TMC

O terpolímero PLDLA-TMC foi sintetizado via reação de polimerização em massa, através da abertura dos anéis dos monômeros de L-ácido láctico, D,L-ácido láctico e trimetileno carbonato, cuja estrutura está representada na figura 4. As proporções entre monômeros L-ácido láctico/D,L ácido láctico/trimetileno carbonato utilizadas foram duas: 56:24:20 e 50:20:30 (PÊGO *et al.*, 2003). O catalisador utilizado foi o octanoato de estanho, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ e a relação monômero/catalisador (M/C) de 5000, conforme estudos anteriores. (MOTTA; DUEK, 2009). A reação de polimerização ocorreu em uma ampola de vidro, na qual foram adicionados o catalisador e as massas de monômeros, e em seguida foi submetida à vácuo, vedada e imersa em banho de óleo a 130°C por 48h.

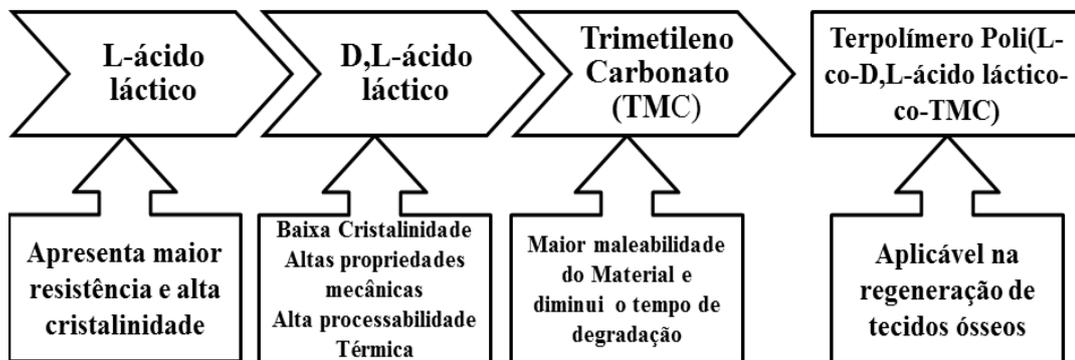
FIGURA 4 - Ilustração da estrutura química do terpolímero PLDLA-TMC



Fonte: MOTTA *et al.* (2018)

Após o tempo estipulado, o terpolímero foi dissolvido em clorofórmio (CHCl_3) e coagulado em metanol (CH_3OH) (Figura 5). Esses processos foram necessários para purificar o material sintetizado. Em seguida foi realizada a secagem do terpolímero numa estufa a vácuo, mantida a 60°C durante 72h. Na etapa final, para adquirir o aspecto granuloso, o terpolímero foi triturado para posterior obtenção de fios.

FIGURA 5 - Esquema representativo da síntese do terpolímero PLDLA-TMC.



Fonte: Autoria Própria

4.2 EXTRUSÃO DO PLDLA-TMC PARA OBTENÇÃO DE FIO

Após ser triturado criogenicamente o polímero foi extrudado utilizando uma extrusora mono rosca (Modelo: AX 16:26m marca: AX Plásticos). A extrusão se deu por três zonas de aquecimento com temperaturas de 90°C, 95°C e 100°C respectivamente. A velocidade da rosca foi de 18 rpm e a relação L/D (comprimento/diâmetro) é de 25. Ao final da extrusão, obteve-se um fio de PLDLA-TMC com diâmetro de 1,75 mm.

4.3 IMPRESSÃO “3D” DO PLDLA-TMC PARA OBTENÇÃO DO ARCABOUÇO

Os arcabouços foram impressos em 3D, utilizando a impressora DForce, modelo Delta, fabricada pela empresa FLSUN e foram utilizados todos os parâmetros necessários (Tabela 4). A impressora está nas dependências do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) em São Paulo. As imagens dos dispositivos porosos foram desenhadas com o auxílio do programa computacional (*Solidworks*). Essa técnica permite que o arcabouço seja projetado de acordo com a finalidade do seu uso, definindo a porosidade, o tamanho e a estrutura geométrica adequada para cada defeito específico (MADRID *et al.*, 2019). No estudo em questão, os tamanhos dos poros do arcabouço de PLDLA-TMC definidos foram de 300 e 600 µm, pois, de acordo com a literatura a taxa de sucesso no crescimento, migração e aderência das CTMs, mais especificamente as células diferenciadas em osteoblastos, são maiores em arcabouços contendo essa faixa de tamanho de poros (CHANG, *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018).

TABELA 4 - Tabela representativa dos parâmetros utilizados para a impressão 3D do arcabouço de PLDLA-TMC com poros de 300 e 600 μm . Sendo que (*) é a distância entre cada camada e o quanto a impressora sobe no eixo z a cada vez que começa a próxima camada.

Parâmetros utilizados na impressora 3D	
Temperatura da mesa	Sem aquecimento
Temperatura do cabeçote	168°C
Velocidade de impressão	3 cm/s
Velocidade máxima de impressão (3 primeiras camadas)	40% (24 mm/s)
Velocidade máxima de impressão (4ª camada em diante)	100% (60 mm/s)
*Distância entre as camadas	0,01 mm
Abertura do cabeçote	0,02 mm

Fonte: Autoria Própria

4.4 CULTURA CELULAR (ENSAIO *IN VITRO*)

Para o primeiro experimento *in vitro* foram utilizadas hCTMs adquiridas da empresa *Thermo Fisher Scientific*[®] (Código: R7788110) e para o segundo experimento utilizou-se das CTMs de origem murina, obtidas a partir do isolamento da medula óssea de ratos *Wistar*.

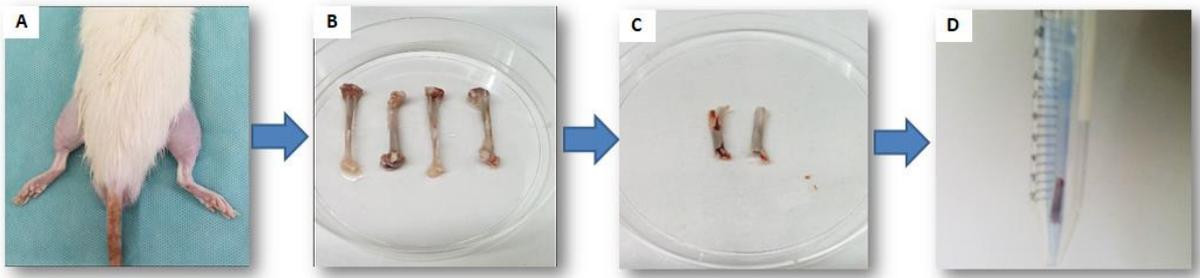
4.4.1 ISOLAMENTO E OBTENÇÃO DAS CTMs

Para o isolamento das CTMs foram utilizados 2 ratos *Wistar* machos de aproximadamente 2 meses de idade (Comitê de ética CEUA nº 2018/92), os quais foram sacrificados por overdose de halotano. Posteriormente ao sacrifício, foi realizada a tricotomia de cada coxa com auxílio de uma lâmina de barbear e em seguida, abatida a pele, deslocou-se o fêmur e a tibia, que foram armazenados em um tubo tipo falcon contendo 50 mL de PBS (do inglês, *phosphate buffer saline*) estéril e 1 mL de antibiótico/antimicótico (Sigma[®]).

Dentro da câmara de fluxo, foi realizada a limpeza dos ossos, retirando a musculatura com auxílio de um bisturi e uma tesoura cirúrgica. Seguido da limpeza, foram retiradas as epífises (extremidades do osso) com o auxílio de um alicate. Cada parte foi colocada em um tubo tipo falcon com 2 mL de PBS estéril para a centrifugação na velocidade de 4000 rpm por 2 minutos. Posteriormente, foi retirado o osso do tubo, permanecendo apenas o *pellet* com PBS. Logo após esse processo, foi colocado 1 mL de meio DMEM (Sigma[®]) (do inglês,

Dulbecco's Modified Eagle Medium) com antibiótico/antimicótico dentro de cada tubo falcon e com o auxílio de uma pipeta, foi homogeneizado o meio com o pellet e o PBS. Após o processo de homogeneização, as amostras foram levadas para a centrifuga novamente a 1300 rpm por 2 minutos (Figura 6).

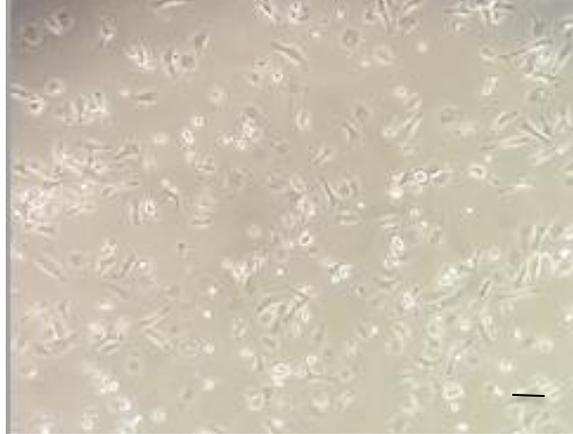
FIGURA 6 - Fluxograma de imagens do isolamento das CTMs de ratos *Wistar* onde se observa a tricotomia de ambas as coxas do animal (A), os fêmures e tíbias limpos (B), os ossos após o corte das epífises (C) e a amostra preparada para ser centrifugada no tubo falcon.



Fonte: Autoria Própria

Para finalizar, após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante de cada tubo falcon e o pellet dos tubos foram reunidos em um só tubo, voltando a ser homogeneizado com 1 mL de meio DMEM completo, contendo 0,2 M de L-glutamina, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab[®]), 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 50 µg/mL de gentamicina e 2,5 µg/mL de anfotericina-B. Em seguida, esse pellet foi colocado em uma garrafa de meio de cultura celular, T-25 cm³ (Corning[®]), completando com 13 mL de meio DMEM completo, totalizando 14 mL de meio de cultura e colocado numa câmara de CO₂ 5% à 37°C (MENDES JUNIOR *et al.*, 2017). O meio foi trocado nas primeiras 24h de cultivo e depois a cada 2 dias. Após 4 dias de cultivo, foi observada a aderência e proliferação das CTMs nas garrafas de meio de cultura celular (Figura 7).

FIGURA 7 - Imagens do cultivo de CTMs de ratos *Wistar* mostrando a aderência e a proliferação após o tempo de 4 dias. Observado na microscopia óptica invertida por contraste de fase, no aumento de 200x. Barra de 100 μm .



Fonte: Autoria Própria

4.4.2 CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Inicialmente, para o cultivo de CTMs numa concentração de 2×10^4 cel/cm² os arcabouços de PLDLA-TMC (8 mm de diâmetro) foram esterilizados com etanol 70% por aproximadamente 30 minutos, seguidos de 3 lavagens com PBS e ambientado em DMEM por 24h. Após esse procedimento, as CTMs foram desprendidas da garrafa de cultivo T-75 utilizando solução de Tripsina (Sigma[®])/EDTA (do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) (Sigma[®]) e cultivadas nos arcabouços em placas de cultivo de 48 poços (Corning[®]). O material cultivado com as CTMs foram mantidos em DMEM contendo 10% de SFB e 1 mL de antibiótico/antimicótico (Sigma[®]), na concentração de 10 unidades de penicilina, 0,10 mg estreptomicina e 0,25 μg de anfotericina, a 37°C em incubadora com 5% de CO₂.

Após quatro dias de cultivo, para os ensaios de diferenciação osteogênica, o meio de cultura foi trocado e as células foram induzidas pelo uso periódico do *kit* de diferenciação celular (*Stem cell osteogenic medium Gibco- Invitrogen[®]*). Como controle, as CTMs foram semeadas na mesma concentração em lamínulas redondas de vidro Thermanox[®] (Nunc ThermoScientific, USA). Após 21 dias de cultivo, a diferenciação das CTMs foi analisada.

4.4.3 PROCESSAMENTO E MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A ANÁLISE NA MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)

Previamente às análises de MCVL, foi realizado o processamento das amostras. Deste modo, as amostras, anteriormente fixadas em paraformaldeído (PFA) 4%, foram submetidas duas vezes a lavagem com PBS não estéril. Em seguida, as amostras permaneceram em solução de PBS+Triton-X-100[®] 0,25 durante uma hora. Decorrido o tempo estipulado, as amostras foram lavadas por duas vezes com a solução de PBS+Tween 20[®] e após a lavagem, foi adicionado 1 mL de BSA (do inglês, *albumin bovine serum*) a 1% por 30 minutos. Ao final, foram lavadas novamente com a solução de PBS+Tween 20[®].

Seguinte ao processamento, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (do inglês, *4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride*) e para a marcação do citoesqueleto as células foram marcadas com faloidina conjugada com *Alexafluor 647*[®] (faixa de espectro em vermelho). Para a detecção de depósitos de cálcio, foi utilizado a OCN, proteína de ligação ao cálcio e hormônio secretado por osteoblastos, e OPN, secretada por pré-osteoblastos e osteoblastos, estando envolvida na adesão celular na matriz óssea em formação, ambas foram conjugadas com *Alexafluor 647*[®]. As imagens foram analisadas pelo MCVL (Leica TCS SP8, Alemanha). Para a contagem de todas as células presentes nos arcabouços, foi realizada a reconstrução da imagem em 3D. Além das marcações citadas acima, foi utilizada, complementarmente, a marcação direta de Calcein Green (CG) (Tabela 5). A proporção utilizada foi de 2 gotas de CG para 1000 µL de PBS-Tween 20[®]. O CG é um corante que penetra nas células e pode ser usado para determinar a viabilidade celular na maioria das células eucarióticas. Em células vivas, a calceína AM não fluorescente é convertida em calceína fluorescente verde, após esterases (enzimas responsáveis pela catalização da hidrólise de ésteres) intracelulares removerem os ésteres acetoximetil. (SCIENTIFIC, [s.d.]).

TABELA 5 - Tabela representativa dos marcadores utilizados para análise do ensaio *in vitro* de proliferação e diferenciação celular.

Abreviação da marcação	Nome do marcador	Expressão de:
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	Núcleo celular
FALO	Faloidina	Citoesqueleto
OPN	Osteopontina	Osteoblastos
OCN	Osteocalcina	Osteoblastos
CG	Calcein Green	Depósitos de cálcio

Fonte: Autoria Própria

4.4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da proliferação das células indiferenciadas e diferenciadas no arcabouço de PLDLA-TMC com poros de 300 e 600 μm foram submetidos à análise de variância ANOVA: um critério para comparação nos mesmos tempos e dois critérios para comparação em tempos diferentes. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste de Bonferroni com $p < 0.05$ e < 0.01 indicando significância e 95% de intervalo de confiança.

4.5 IMPLANTE (ESTUDO *IN VIVO*)

Foram utilizados 36 ratos *Wistar* somente do sexo masculino, com idade aproximada de 2 meses e pesando entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (FCMS/PUC-SP) (Comitê de ética CEUA nº 2018/85). Eles permaneceram em gaiolas individuais, receberam ração comercial e água *ad libitum*, e foram mantidos em regime de claro-escuro correspondente a 12h, em ambiente com exaustão de ar e temperatura controlada de cerca de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os ratos foram divididos em três grupos, sendo que os implantes permaneceram no período de 8 e 12 semanas. Para cada grupo foram destinados 12 animais entre os dois

Grupo	Defeito/preenchimento
Grupo Controle	Defeito crítico ausente de material.
Grupo Defeito com PLDLA-TMC	Defeito crítico preenchido com o arcabouço de PLDLA-TMC.

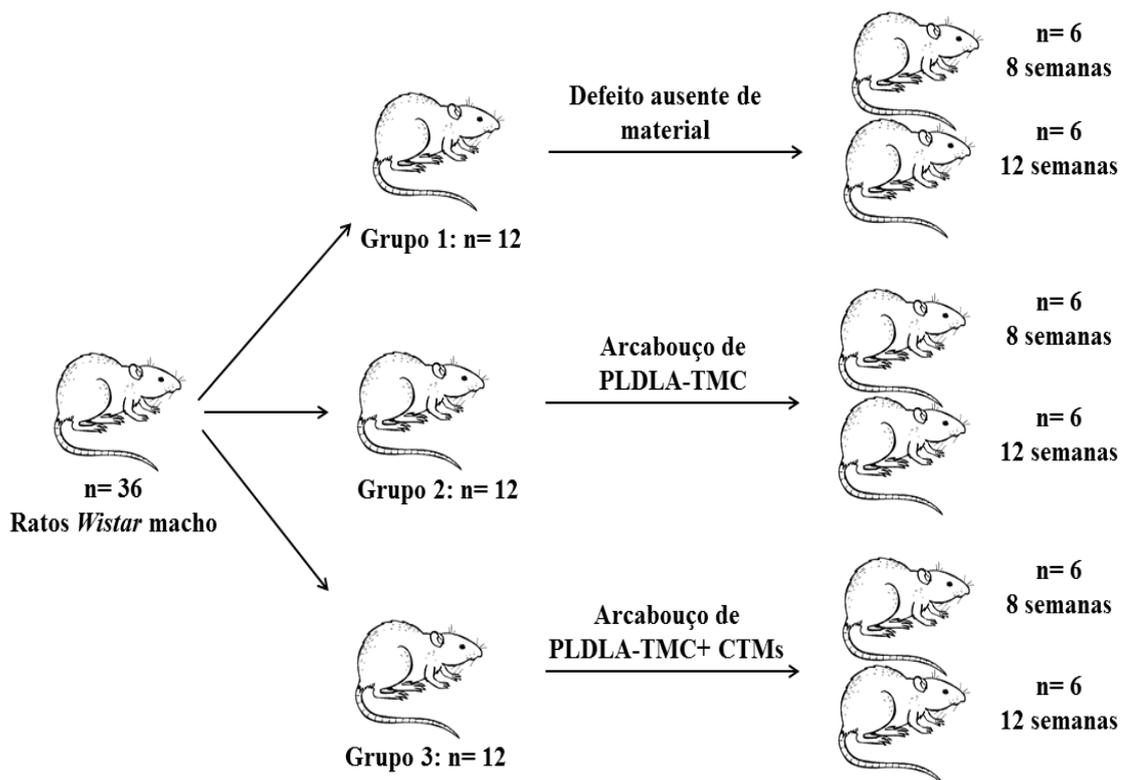
períodos estabelecidos (8 e 12 semanas). Todos os grupos foram submetidos ao defeito crítico de 8 mm de diâmetro (LEVI, *et al.*, 2010) no centro da calota craniana (Figura 8 e Tabela 6).

TABELA 6 - Grupos e respectivos defeitos realizados.

Grupo Defeito com PLDLA-TMC+CTMs	Defeito crítico preenchido com o arcabouço de PLDLA-TMC cultivado com CTMs.
---	---

Fonte: Autoria Própria

FIGURA 8 - Representação esquemática dos grupos de implante na calota craniana de ratos *Wistar*

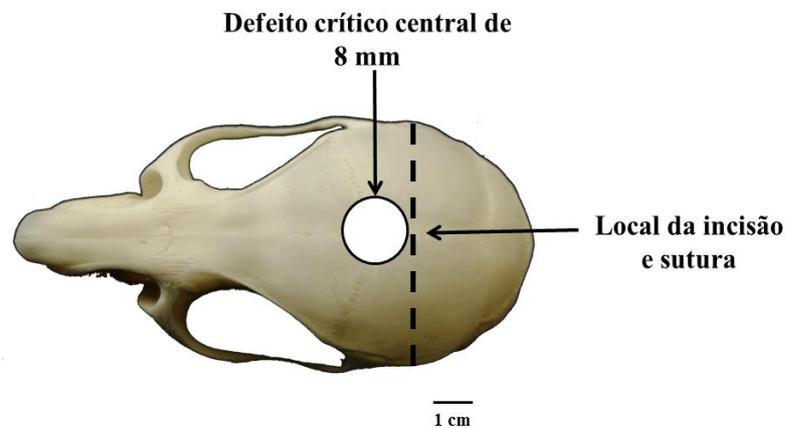


4.5.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Previamente ao procedimento cirúrgico, os ratos foram pesados e submetidos à anestesia geral administrada via intramuscular com uma solução de cloridrato de cetamina 10

% (40 mg/kg) mais cloridrato de xilazina 2 % (5 mg/kg) por peso corporal. Após a anestesia geral, foi realizada a tricotomia da parte dorsal do crânio do rato seguida de antissepsia com solução de iodo-polvedine na região do ferimento. Uma incisão de aproximadamente 1 cm foi feita no escalpe do animal, seguindo o trajeto da sutura frontal. A musculatura e o periósteo foram descolados e rebatidos, expondo os ossos parietais. O defeito ósseo no tamanho crítico central foi realizado com o auxílio de uma broca trefina com 8 mm de diâmetro (Figura 9), montada em motor elétrico odontológico de baixa rotação (Beltec[®]), sob irrigação constante de solução fisiológica estéril, a fim de evitar superaquecimento das bordas do defeito.

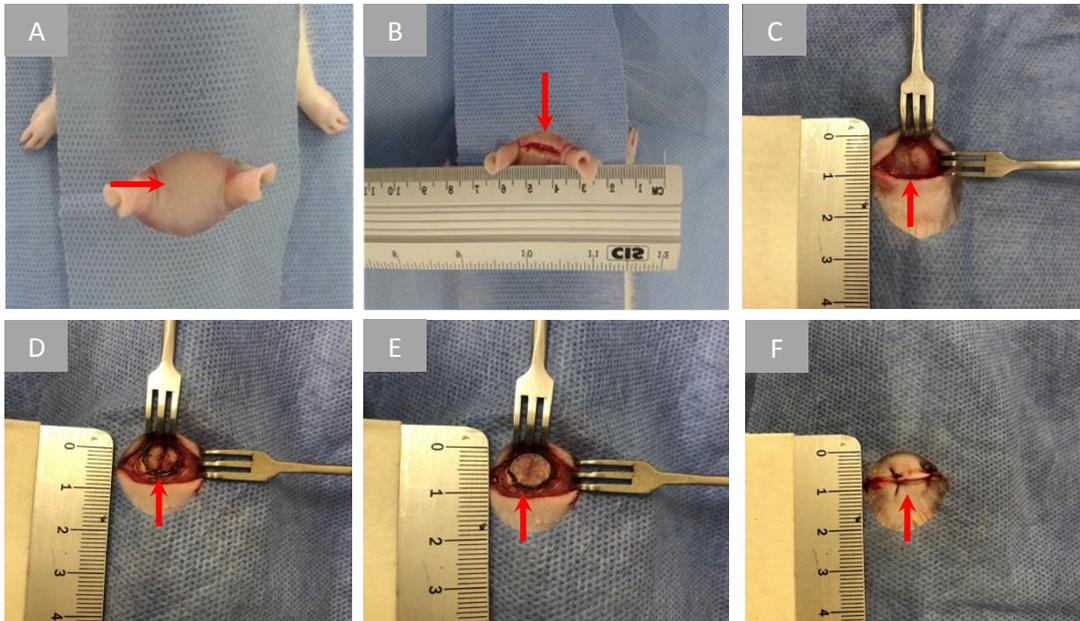
FIGURA 9 - Representação ilustrativa da região no qual foi realizado o defeito crítico no tamanho de 8 mm e local da incisão e sutura.



Fonte: Autoria Própria

Com exceção do grupo Controle, nos demais grupos foram realizados os implantes de PLDLA-TMC e PLDLA-TMC+CTMs no defeito na calota craniana anteriormente realizada. Após o implante, a pele foi reposicionada e suturada no formato em U (Figura 10). Todos os animais foram mantidos em observação até que o efeito da anestesia geral cessasse. Durante o pós-operatório, os animais receberam analgésicos, paracetamol (200 mg/kg), durante três dias e, concomitantemente a isso, foram monitorados periodicamente (MENDES JUNIOR *et al.*, 2017).

FIGURA 10 - Ilustração esquemática do procedimento cirúrgico indicados pela seta: A) Tricotomia na parte frontal do animal; B) incisão de aproximadamente 30 mm; C) raspagem do periósteo; D) defeito de 8 mm de diâmetro; E) implante do material (ambos os grupos) e F) Sutura no local da incisão no formato em U.



Fonte: Autoria Própria

4.5.1.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Após 8 e 12 semanas da implantação, os ratos foram sacrificados por overdose de halotano. As calotas cranianas da região da cirurgia foram retiradas e rapidamente colocadas em solução fixadora de formoldeido 10% por um período de 24h e armazenadas em um recipiente limpo e devidamente identificado. Posterior ao tempo de 24h na solução de formaldeído, as amostras foram submetidas à descalcificação numa solução de EDTA 10% por 30 dias, fazendo trocas periódicas da solução.

4.5.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As amostras descalcificadas foram retiradas da solução de EDTA 10% e preparadas para análise histológica de acordo com as técnicas utilizadas para Microscopia de Luz, utilizando-se da parafina como meio de inclusão. Desta forma, o material foi processado da seguinte forma:

1) Desidratação: etanol a 70% (24h), etanol a 80% (30 min), etanol a 95% (30 min) e etanol a 100% (3 tempos de 30 min);

2) Diafanização: etanol a 100% + xilol (na proporção de 1:1 por 30 min), xilol puro (por 60 min);

3) Embebição: xilol + parafina (na proporção 1:1 por 30 min dentro da estufa), parafina pura (2 tempos de 90 min).

4) Inclusão: em parafina líquida à temperatura de 70°C

Os blocos os quais as amostras foram incluídas em parafina permaneceram em temperatura ambiente para secagem e armazenadas posteriormente em um local frio. Os cortes foram realizados em micrótomo (Leica[®]) com a espessura de 3 µm. As lâminas com o material histológico foram alocadas em estufa a 40°C para que o excesso de parafina seja eliminado e foram coradas de seguinte maneira:

1) Desparafinação: xilol (duas passagens de 20 min);

2) Hidratação (lavagens sequenciais): etanol a 100%, etanol a 95%, etanol a 80%, etanol a 70% e água corrente (várias lavagens);

3) Coloração com Hematoxilina – Eosina;

Nesta técnica foram utilizados 2 corantes: a hematoxilina e a eosina. A hematoxilina é um corante básico, que cora os compostos aniônicos (ex: ácidos nucleicos), apresentando uma tonalidade azul arroxeado enquanto a eosina é um corante ácido que cora os compostos catiônicos (a maioria das proteínas, glicoproteínas ácidas, etc) em tom róseo-avermelhado.

Primeiramente as lâminas contendo as amostras foram coradas com hematoxilina, ficando encobertas com a solução durante 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram submetidas à lavagem em água corrente. Na sequência, a mesma foi imersa em eosina aquosa 0.5% por aproximadamente 1 minuto, sendo lavadas em seguida em água corrente. Após essa etapa, as lâminas passaram novamente pelo processo de desidratação em álcool: álcool 70%, álcool 80%, álcool 100% (2 vezes). As mesmas foram submetidas a secagem em estufa à 60°C por cerca de 10 minutos. Ao final, os cortes foram fixados entre lâmina e lamínula com o uso de entelan (Merk[®]).

4.5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A histomorfometria foi realizada com uma unidade de controle de câmera NIKON (DS-U2) acoplada ao microscópio óptico invertido (NIKON[®]- E800). Para

análise quantitativa do osso neoformado, 6 seções histológicas por amostra foram digitalizadas empregando-se objetiva de 10X, permitindo a cobertura de todo o implante de PLDLA-TMC. Usando o software NIS-Elements Advanced Research de análise de imagem, as áreas do implante e osso neoformado foram detectadas e, em seguida, o contorno da área do implante foi designado como a região de interesse.

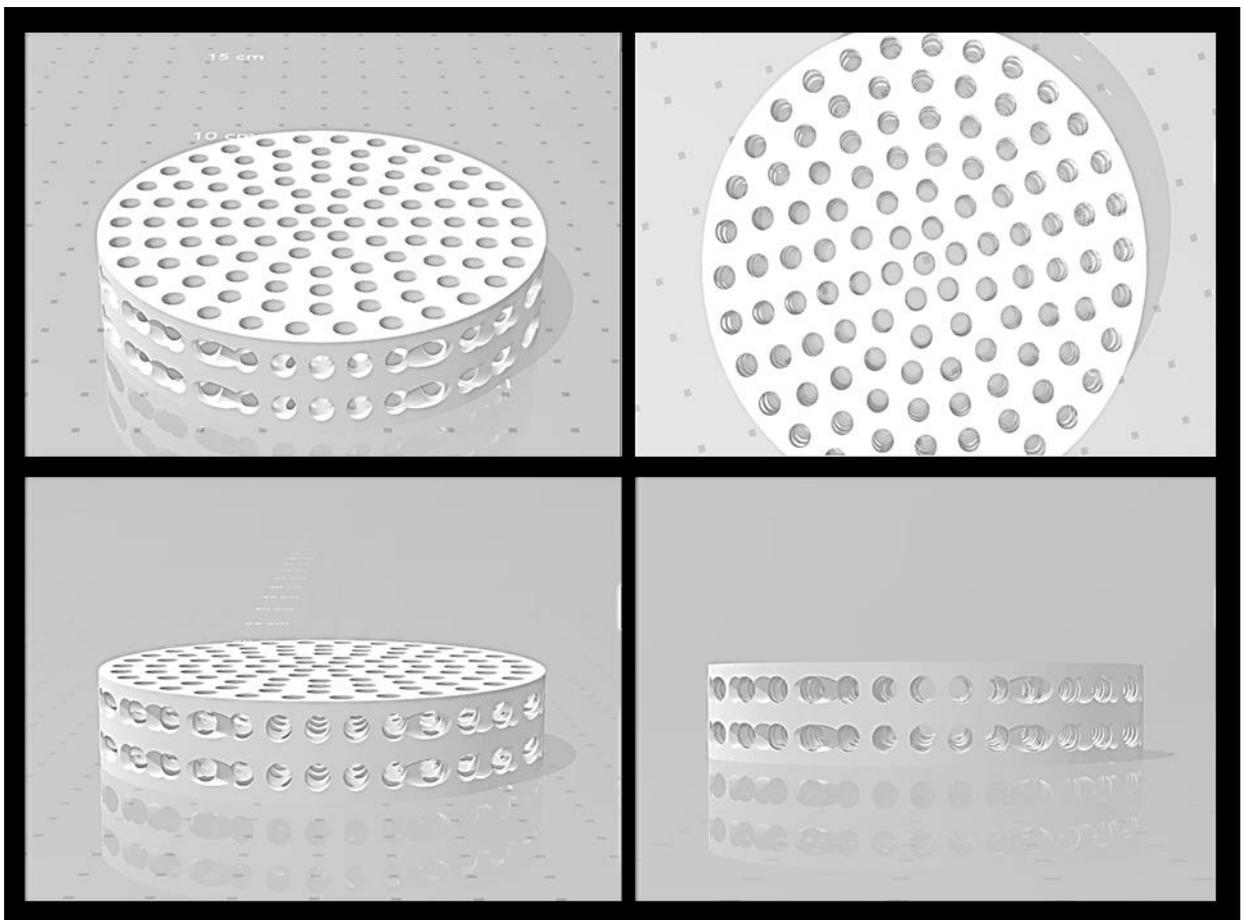
4.5.4 ANÁLISE MICROCT

Essa análise de MicroCT (Skyscan1174: X-Ray Microtomograph, marca: Bruker) foi realizado no laboratório da Universidade de Sorocaba (UNISO). Para este procedimento, a amostra (calota com defeito crítica e arcabouço) foi fixada em um suporte e colocado dentro do equipamento para a realização da análise morfológica e obtenção de dados referente ao arcabouço.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O projeto final para impressão do arcabouço a base de PLDLA-TMC resultou na estrutura apresentada na figura 11 (projeto desenvolvido no programa computacional *Solidworks*). O projeto foi utilizado tanto para imprimir os arcabouços com tamanho de poros de 300 μm quanto para 600 μm .

FIGURA 11 - Imagens ilustrativas (fora de escala) do arcabouço de PLDLA-TMC projetado a partir do programa computacional *Solidworks*.



Fonte: Autoria Própria

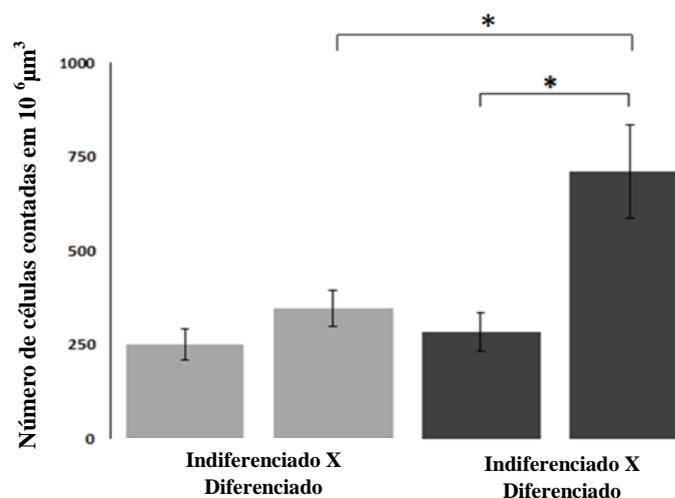
5.1 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR A PARTIR DO ARCABOUÇO DE PLDLA-TMC COM POROS DE 300 E 600 μm EM ENSAIO *IN VITRO*

A partir da obtenção do arcabouço de PLDLA-TMC impresso em 3D com um diâmetro de aproximadamente 8 mm com poros de 300 e 600 μm , hCTMs foram semeadas e

submetidas a diferenciação osteogênica por 21 dias. Para o controle positivo, as células não foram submetidas a diferenciação celular, apenas mantidas sob condições normais de meio de cultura pelo mesmo período de dias. Esses experimentos mostraram o comportamento das hCTMs nos diferentes tamanhos de poros encontrados no arcabouço.

O gráfico abaixo (Figura 12) apresenta a quantificação das células por área para as amostras com diferentes tamanhos de poros. Verifica-se que as amostras com tamanho de poros de 600µm foram significativas em comparação com seus respectivos controles positivos não diferenciados (* P <0,001). O mesmo padrão foi observado quando comparado com as amostras diferenciadas (tamanho de poro de 300 µm) com as amostras diferenciadas (tamanho de poro de 600 µm) (* P <0,001). Não houve diferença no crescimento celular cultivado em arcabouços com poros de 300µm com seu respectivo controle. O gráfico da contagem de células representa a média e o desvio padrão de um ensaio triplicado.

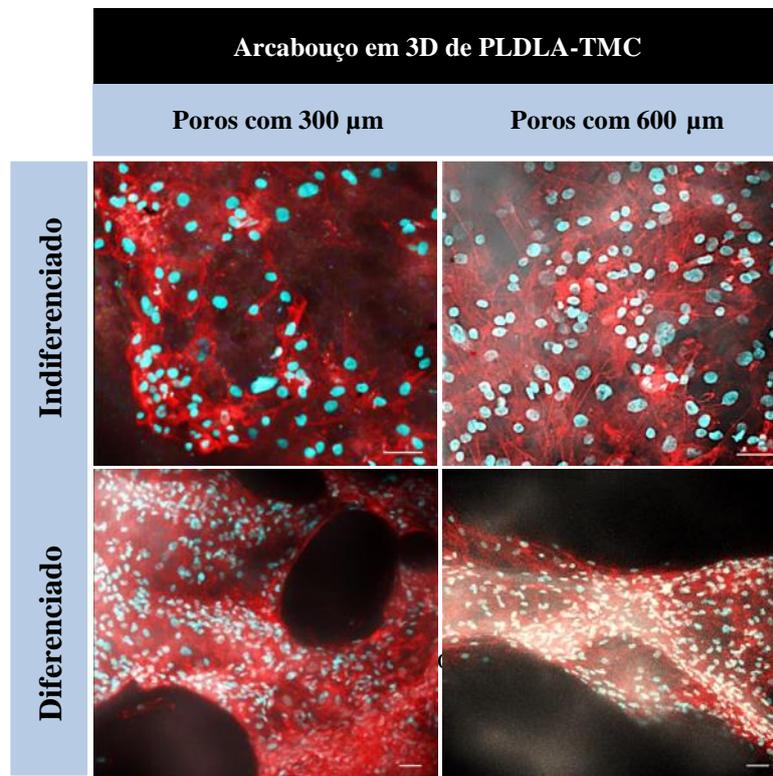
FIGURA 12 - Gráfico representativo da quantidade de células indiferenciadas e diferenciadas em arcabouço de PLDLA-TMC



Fonte: Autoria Própria

As imagens do MCVL (Figura 13) mostram em azul os núcleos marcados com DAPI e o citoesqueleto é identificado em vermelho pela faloidina conjugada com *Alexafluor 647*[®]. Para avaliar a diferenciação osteoblástica, a OCN se encontrava marcada em vermelho. Após 21 dias em cultura sob diferenciação osteogênica e meio convencional (DMEM), as hCTMs estavam amplamente aderidas e espreadas pelo material apresentando uma monocamada extensa em torno de todo o arcabouço.

FIGURA 13 - Imagens representativas obtidas pela MCVL das CTMs diferenciadas em osteoblastos em arcabouços de PLDLA-TMC com poros de 300 e 600 μm .



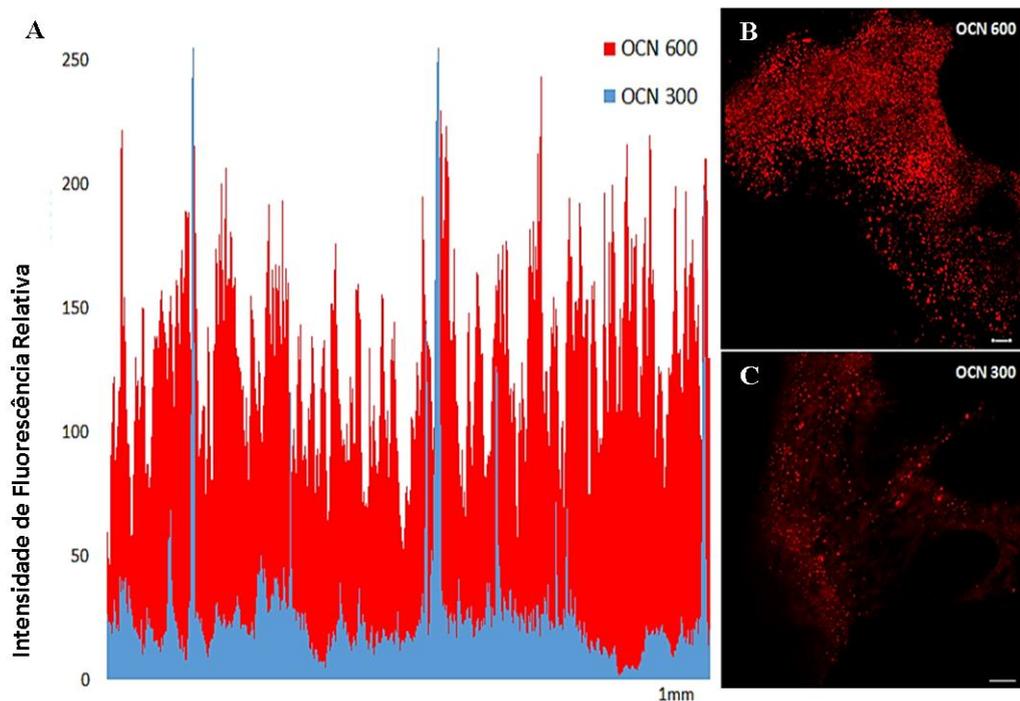
Fonte: Autoria própria

Um resultado significativo é observado quando comparada a amostra cultivadas com hCTMs indiferenciadas com as diferenciadas no arcabouço com o tamanho do poro de 600 μm , o que significa que as células apresentaram comportamento mais favorável, quanto a proliferação, quando cultivadas em poros maiores. A comparação da proliferação celular entre os dois tamanhos de poros de 300 μm e 600 μm sob diferenciação, demonstraram grande diferença estatística ($P < 0,0001$). Sabe-se que os arcabouços necessitam apresentar porosidades entre 300 a 600 μm para mediar a migração celular, aumentar a dinâmica de nutrientes e a eliminação de metabólitos, além de favorecer a neovascularização (RAO, *et al.*, 2018).

Entretanto, o maior tamanho de poro analisado, afeta substancialmente a atividade celular e resulta em maior adesão celular, como também apontado por Murphy *et al.* (2010). Segundo estudos, as células osteoblásticas obtêm melhor distribuição nos arcabouços com poros de 400 e 600 μm (BORKOWICZ *et al.*, 2019), o que favorece a migração celular e aumenta a dinâmica dos fluidos. Este é um indicativo de suporte direto e ativo para o reparo do tecido ósseo (MURPHY *et al.*, 2010).

Já a diferenciação celular foi observada pela presença de uma proteína de ligação ao cálcio, a OCN, hormônio secretado por osteoblastos maduros. O gráfico da intensidade de fluorescência relativa da OCN, imunomarcadas e identificadas pela detecção de espectros de emissão do *Alexafluor 647*[®] (vermelho) após 21 dias de cultivo sob meio osteogênico (Figura 14A), mostrou uma quantidade significativa de células diferenciadas em arcabouços que apresentam poros de 600 μm quando comparados aos arcabouços com poros de 300 μm . O mesmo pode ser observado nas imagens de MCVL o qual apresenta uma marcação acentuada de OCN nos poros de 600 μm quando comparada com a marcação nos poros de 300 μm (Figuras 14B e 14C).

FIGURA 14 - Gráfico representativo da detecção de fluorescência de sinal (A) em 1mm linear entre cada amostra de tamanho de poro (300 e 600 μm), sobrepostas entre si.. Imagem representativa obtida pela MCVL, da diferenciação osteogênica em arcabouços de PLDLA-TMC com poros de 300 e 600 μm , por meio da marcação de OCN (B e C). Barras 50 μm .



Fonte: Autoria Própria

Estudos mostraram que o aumento no tamanho dos poros induz a maior densidade celular e, conseqüentemente, os níveis de cálcio dispensado também são aumentados (DI LUCA *et al.*, 2016). Segundo HSU e colaboradores (2013), isso poderia ser explicado por maiores concentrações de oxigênio disponíveis quando poros maiores estão presentes, por

outro lado, nos poros pequenos o nível de oxigênio é limitado, afetando a troca metabólica e a capacidade de diferenciação de hCTMs.

5.2 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CTMS NO ARCABOUÇO DE PLDLA-TMC COM POROS DE 600 μ M

A partir dos resultados obtidos dos primeiros ensaios *in vitro* em ambos os tamanhos de poros, foi definido o arcabouço contendo poros de 600 μ m, o qual as células apresentaram melhores respostas em relação ao seu comportamento, bem como sua proliferação, espraiamento e diferenciação celular.

5.2.1 ANÁLISE POR MCVL DA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR OSTEOBLÁSTICA

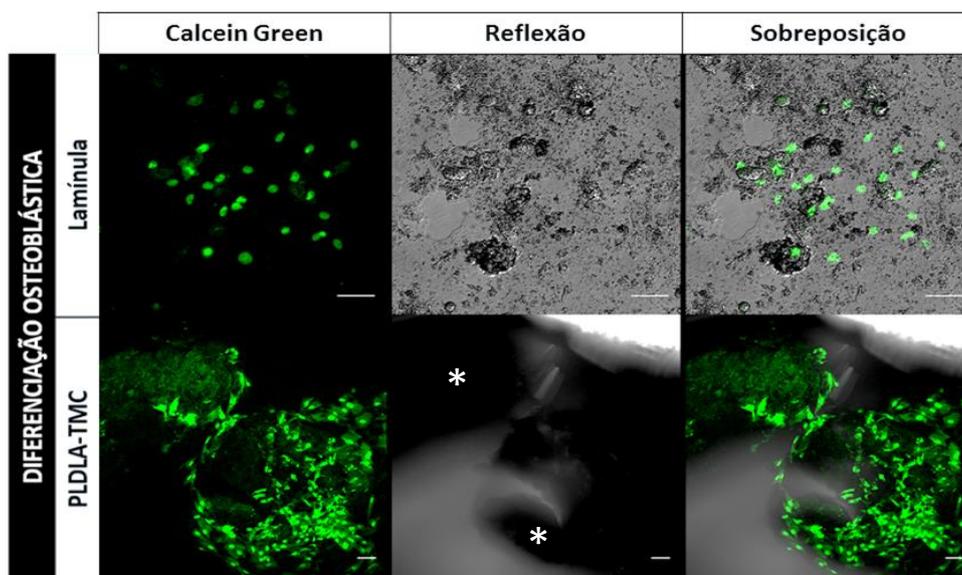
Mediante a análise na MCVL dos arcabouços de PLDLA-TMC cultivados com CTMs e submetidas à diferenciação em células osteoblásticas no tempo de 21 dias, é possível assegurar que o material proporciona uma ótima base para as células se aderirem, proliferarem e se diferenciarem. Na figura 15, por meio da marcação de CG, é possível observar tanto no grupo controle (laminula) quanto no grupo material (PLDLA-TMC) uma mineralização óssea marcada em verde. Quando em sobreposição das imagens, verifica-se a deposição da mineralização associada aos poros do arcabouço. Os arcabouços formados pelo PLDLA servem como suporte para o crescimento do tecido ósseo, ou seja, sustentam e estimulam a migração de células osteoblásticas (MAS, *et al.*, 2016). Por outro lado, a flexibilidade e a elasticidade que o TMC proporciona aos poros, são fundamentais para a proliferação das células, características essas que impedem a deformação desses poros no arcabouço o qual foi submetido a uma cultura celular dinâmica (SONG, *et al.*, 2010). Assim, é sabido que a morfologia dos poros do arcabouço formado pelo PLDLA-TMC conduz o crescimento das células, viabilidade e proliferação de osteoblastos (MESSIAS *et al.*, 2014).

Em relação à marcação por CG, muitos estudos o utilizam para marcar regiões de osso mineralizante, que permite a localização de osso novo, em experimentos *in vivo* (GAALLEN *et al.*, 2010; AIDO, *et al.*, 2014; SHIM, 2016). Contudo, neste estudo, ensaios com a marcação foram feitas em células previamente fixadas em um modelo *in vitro*, verificando a viabilidade celular e diferenciação osteoblástica, no grupo controle e material, pela fluorescência de

calceína, no qual a marcação indica os cristais de cálcio formados pelas CTMs diferenciadas em osteoblastos.

Essa técnica de marcação por CG com células previamente fixadas, não é usualmente aplicada uma vez que para células que são submetidas à fixação por formalina, é usado o ensaio de coloração *Alizarin Red*, para detecção de diferenciação óssea. Geralmente, o CG é utilizado em estudos com células vivas, mostrando em tempo real a atividade de diferenciação osteoblástica, (SERGUIENKO, *et al.*, 2018). O estudo utilizando esse tipo de marcação em células fixadas, ainda necessita de futuros experimentos e análises, em virtude de ser uma nova aplicação (adaptação do método recomendado pelo fabricante, como consta no protocolo. Cod: R37109 *NucGreen® Dead 488 ReadyProbes® Reagent Protocol for Viability*, marca: *Thermo Fisher Scientific*), uma vez que é recomendado o uso em células vivas e nesse caso as células estavam previamente fixadas em PFA 4%. Todavia, a vantagem neste novo método de utilização da marcação de CG é poder analisar de fato a diferenciação celular e também manter as células marcadas por um longo período, uma vez que essa marcação é utilizada nas células vivas, o qual o tempo de resistência celular é muito menor na análise.

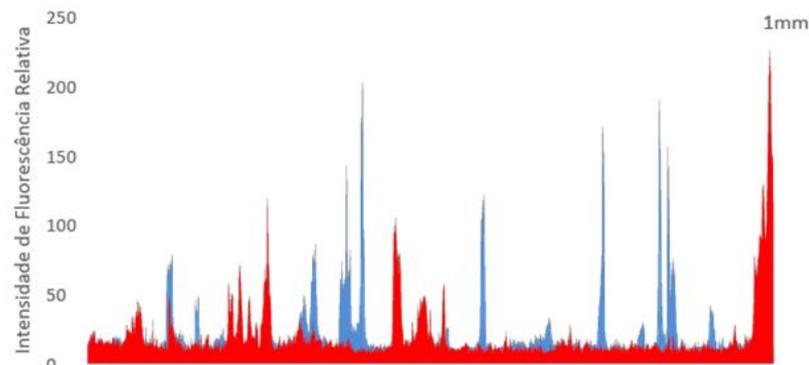
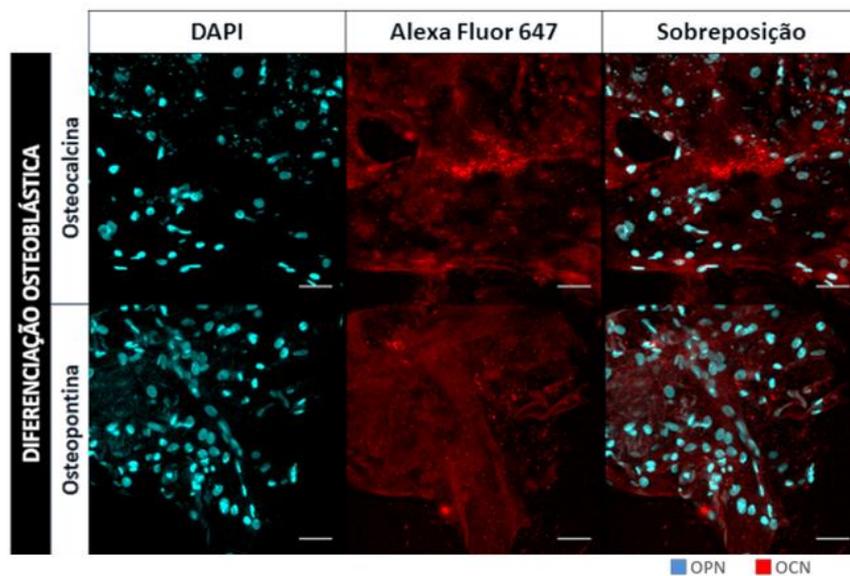
FIGURA 15 - Imagens obtidas por MVCL do grupo controle lâminula de vidro cultivada com CTMs e do arcabouço de PLDLA-TMC com CTMs, ambas submetidas à diferenciação osteoblástica no tempo de 21 dias e marcadas pelo CG (marcação de mineralização óssea em verde). Poros do arcabouço (*). Barra: 50 µm



Fonte: Autoria Própria

Outra avaliação da diferenciação osteoblástica ocorrida no arcabouço de PLDLA-TMC após 21 dias de cultivo se deu por meio da marcação indireta de OPN e OCN conjugadas com o fluoróforo *AlexaFluor 647*[®]. Nas imagens abaixo (Figura 16), é possível observar uma grande expressão, tanto de OPN como OCN, sendo que a intensidade de marcação foi semelhante para ambas as proteínas. Adicionalmente, por meio da marcação dos núcleos por DAPI, verificou-se a proliferação celular incorporada aos poros do material.

Figura 16. Imagens obtidas pela MCVL do grupo de células diferenciadas no arcabouço de PLDLA-TMC, marcadas indiretamente pela OPN e OCN conjugadas com *AlexaFluor 647*[®] (vermelho), e os núcleos celulares marcados com DAPI (azul). Nas imagens é possível observar a alta expressão da OPN e OCN ao longo do arcabouço e também no interior dos poros. Além disso, observa-se uma alta proliferação de células diferenciadas a partir da marcação dos núcleos celulares. Barra de 50 µm.



Fonte: Autoria Própria

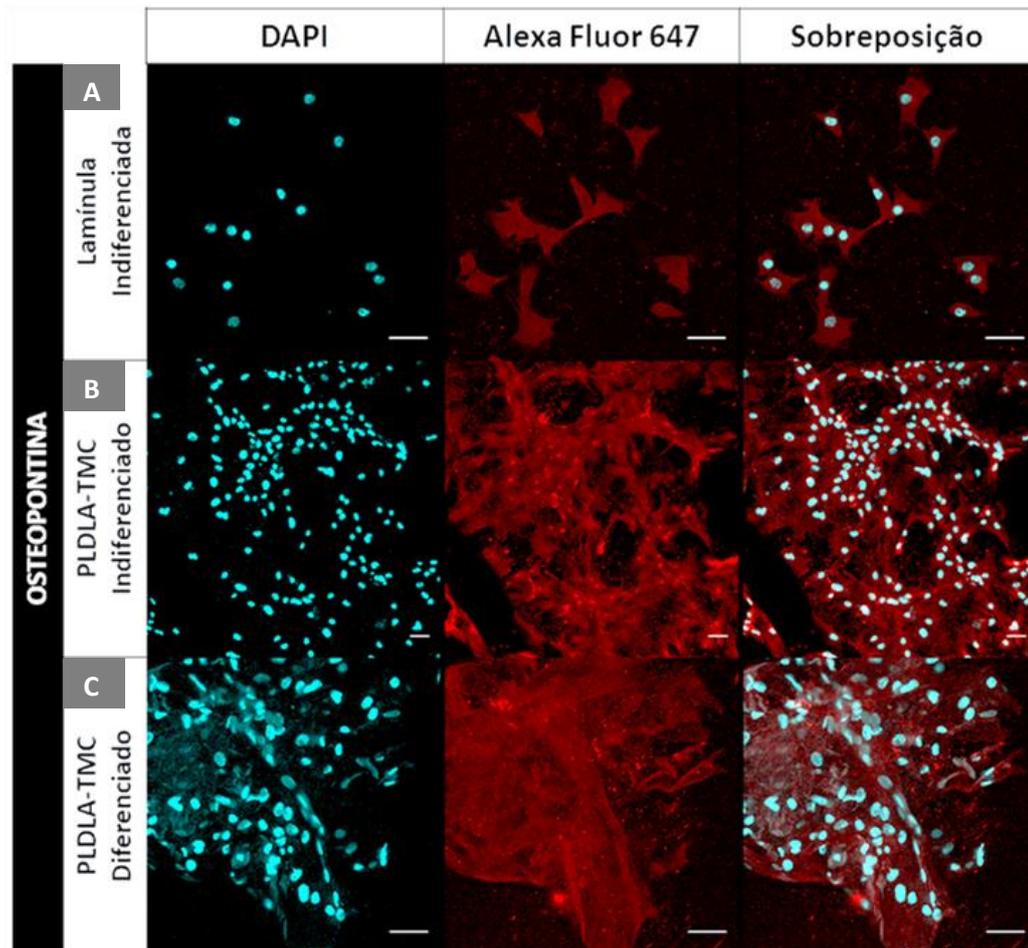
A presença da OCN e a OPN no material é significativa quando diz respeito à diferenciação, uma vez que as mesmas são proteínas não colagenosas que estão envolvidas na deposição e composição da matriz óssea, e são secretadas pelas células osteoblásticas (ANSELME, 2000; BAILEY *et al.*, 2017). Além da OCN ser utilizada como um marcador sérico da formação óssea (ZOCH, *et al.*, 2016), a sua expressão no material demonstra intensa atividade de diferenciação celular, uma vez que a OCN é transcrita apenas para a matriz orgânica, sendo um indicador útil da atividade sintética dos osteoblastos e também uma reguladora da mineralização (ZOCH, *et al.*, 2016; BLAIR *et al.*, 2017). A OPN não apenas participa do processo de biomineralização (GIACHELLI e STEITZ, 2000; ICER e KARADAG, 2018), mas também exercem algumas funções em tecidos calcificados, bem como a regulação e adesão de células ósseas e regulação da função dos osteoclastos e dos osteoblastos (GIACHELLI e STEITZ, 2000; KIPARI, *et al.*, 2002).

Quando comparado o grupo do arcabouço de PLDLA-TMC cultivado com CTMs diferenciadas com o grupo do material com CTMs indiferenciadas e grupo lamínula indiferenciadas (Figura 17), pode-se observar que o arcabouço que não foi submetido à diferenciação teve um resultado similar ao grupo diferenciado, mostrando uma expressão acentuada da OPN ao longo do material, bem como uma proliferação das CTMs diferenciadas, no qual o núcleo das mesmas foi marcado com DAPI.

Esse comportamento inerente do arcabouço sem o estímulo da diferenciação celular durante o cultivo de 21 dias mostra que o material é um elemento osteoindutor que auxilia na diferenciação das CTMs incorporado aos poros do material. Segundo alguns estudos, a estrutura porosa do arcabouço, sua composição química e configuração 3D desempenham um papel importante na função dos materiais, no qual auxilia e induz as células à diferenciação osteoblástica sem estímulos externos, como meio suplementados com cálcio, fosfato e fatores osteogênicos, tornando-se assim um material osteoindutor (HABIBOVIC, *et al.*, 2005; NAKAMURA, 2007; GARETA, *et al.*, 2015). Além disso, alguns arcabouços à base de polímeros sintéticos têm a capacidade de ativar o fator de transcrição *Runx2*, responsável na cascata de sinalização celular da formação óssea (RAO, *et al.*, 2018).

Conforme identificado por Messias *et al.* (2014), a morfologia porosa do arcabouço a base de PLDLA-TMC propicia o crescimento celular e viabilidade de osteoblastos, e esse favorecimento celular é maior quando comparado em arcabouços à base de PLDLA não associado ao TMC, portanto, isso significa que o material em estudo se mostra eficiente para sua utilização na engenharia de tecido ósseo.

Figura 17. Imagens obtidas a partir da MCVL, no qual os grupos foram marcados com OPN (vermelho) e DAPI (azul). O grupo controle A refere-se à lamínula de vidro cultivada com CTMs onde não sofreram diferenciação celular, enquanto que o grupo controle B compreende o arcabouço de PLDLA-TMC cultivado com CTMs não submetidas à diferenciação. O grupo C relaciona-se ao arcabouço de PLDLA-TMC cultivado com CTMs e submetida à diferenciação osteoblástica. O período de cultivo das células foi de 21 dias para todos os grupos. Barra de 50 μm .



Fonte: Autoria Própria

5.3 ANÁLISE DO ENSAIO IN VIVO

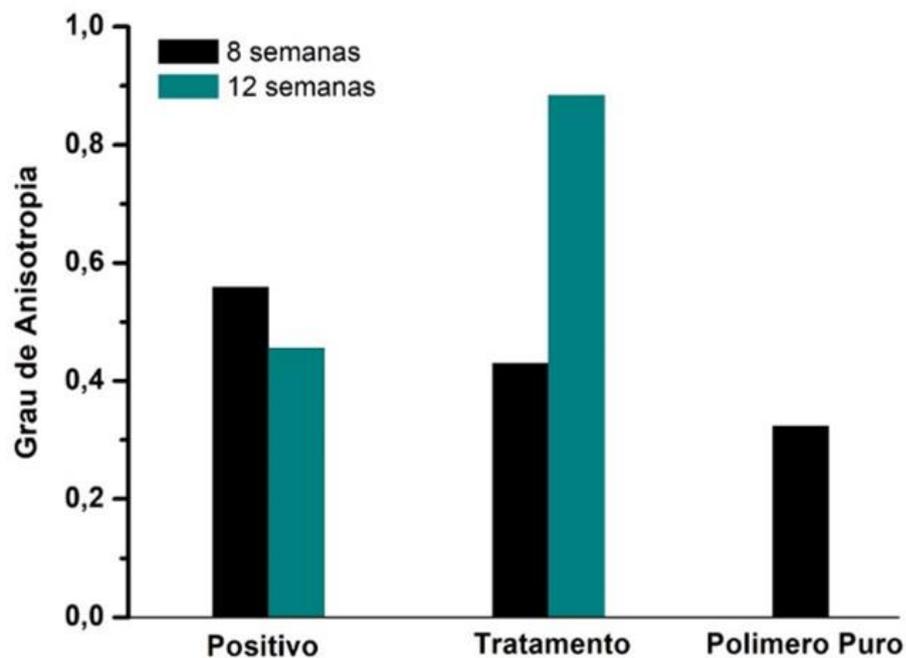
5.3.1 ANÁLISE POR TOMOGRAFIA DOS PARÂMETROS DA ÁREA IMPLANTADA

Por meio da análise do MicroCT foi possível obter resultados qualitativos, com valores absolutos de cada amostra processada. Com isso, observou-se o grau de anisotropia de

cada material e tempo de implante. A anisotropia está intimamente relacionada ao crescimento ósseo ou seja, quanto mais próximo de 0 mais a estrutura é isotrópica e quanto mais próximo de 1 mais anisotrópica, isso significa que se o valor medido do material se aproximar de 1, mais parecido será com a estrutura do osso.

A partir disso, a figura 18 mostra a porcentagem anisotrópica pelo tempo de implante, o qual é notável que após 8 semanas de implante, tanto para o grupo positivo quanto para o grupo tratamento, houve um aumento da anisotropia, quando comparado ao arcabouço do polímero puro (não implantado), mostrando que o material se tornou mais anisotrópico. Já no período de 12 semanas do grupo tratamento houve uma maior anisotropia do material em comparação com o polímero puro, chegando no valor próximo a 1.

FIGURA 18 - Grau de anisotropia dos arcabouços em função do tempo de implante.



Fonte: Autoria Própria

Esse aumento da anisotropia apresentada nos grupos pode estar relacionado a dois fatores importantes. O primeiro fator se enquadra na estrutura do arcabouço, seu formato tridimensional projetado com auxílio computacional (*Solidworks*) permite que o mesmo seja construído com tamanhos de poros uniformes e variáveis, bem como a precisão da interconectividade dos poros levando a maior anisotropia do material (de Mulder *et al.*, 2009). O segundo fator é o crescimento tecidual, para dentro da estrutura porosa do arcabouço,

durante o período de reparação óssea estabelecida. Mitchell e Tojeira (2013) diz que o crescimento e aderência das células está estreitamente relacionada a anisotropia do material, isso significa que quanto maior a anisotropia maior é a proliferação celular, resultando assim no reparo tecidual mais acentuado no local da lesão.

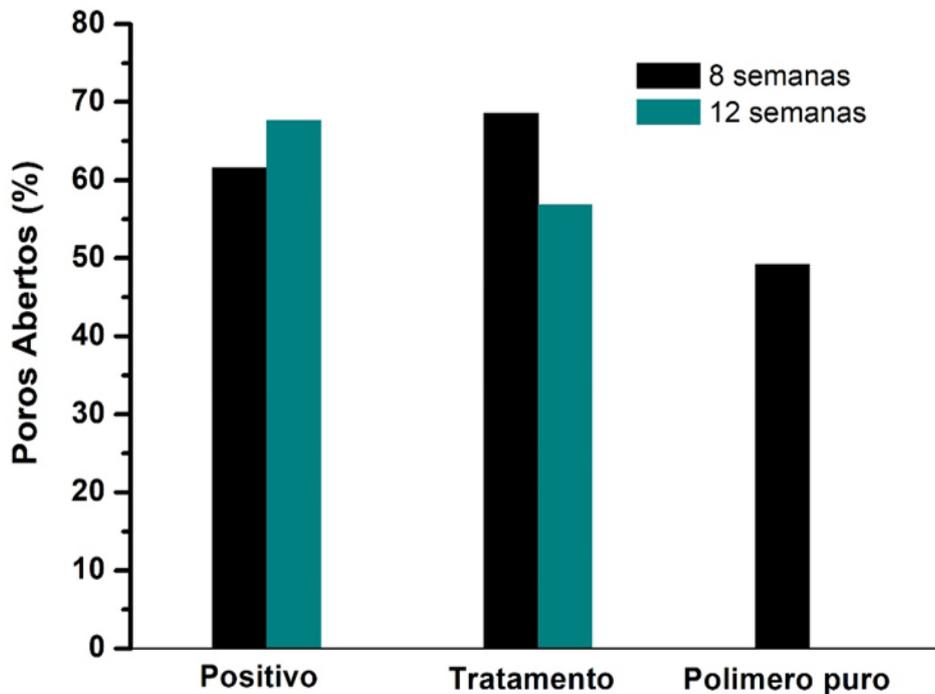
Por conta disso, a presença das células-tronco no arcabouço (grupo tratamento) acarretou em um aumento extenso do processo de ossificação após o tempo de 12 semanas, mostrando o alto índice de anisotropia identificado no gráfico. Esse resultado corrobora tanto com a imagem de microCT, que evidenciaram o crescimento ósseo difuso na região interna do defeito crítico, quanto na imagem histológica, o qual se mostra com uma ossificação mais acentuada.

Em relação aos poros da estrutura do arcabouço é possível observar, figura 19, a porcentagem de poros abertos em função dos tempos de implante de cada grupo amostral. Houve um aumento na porcentagem dos poros abertos entre as amostras do polímero puro e os arcabouços do grupo positivo e tratamento de ambos os tempos. Entretanto, quando comparado o grupo positivo nos tempos de 8 e 12 semanas, verifica-se um aumento da quantidade de poros abertos no grupo de 12 semanas. Este aumento na porcentagem de poros abertos no grupo positivo de 12 semanas pode estar relacionado à degradação do material. Segundo estudos de Esposito (2014) o arcabouço de PLDLA-TMC tem uma degradação *in vitro* mais acentuada no período de 12 semanas, o que explica o resultado do gráfico, uma vez que quando há degradação do material há também uma deformidade e destruição da estrutura porosa, aumentando assim a porcentagem .

No entanto, quando comparado o grupo tratamento de ambos os tempos, observa-se que o grupo de 12 semanas teve uma redução na quantidade de poros. Esta redução de poros abertos no grupo tratamento de 12 semanas pode ser explicado pela competição existente entre o processo de degradação do material e o crescimento tecidual no interior e na superfície do arcabouço. Os estudos de Odellius e colaboradores (2011) explicam que arcabouços poliméricos a base de ácido lático contendo poros maiores (300 a 500 μm) tem uma taxa de degradação muito mais alta do que arcabouços contendo poros menores (90 a 300 μm), ou seja, quanto maior o tamanho do poro, maior é o processo de hidrólise do material e com isso a morfologia do arcabouço é alterada levando a uma conformação sólida. Além disso, a presença de TMC faz com que o processo de degradação no modelo *in vivo* seja acelerada pela ação de enzimas, como mostra no estudo de Zhu e colaboradores (1991). Por outro lado, o sucesso da aderência, migração, proliferação e diferenciação osteoblástica a partir das CTMs se dá pelo arcabouço contendo tamanho de poros de aproximadamente 300 a 600 μm

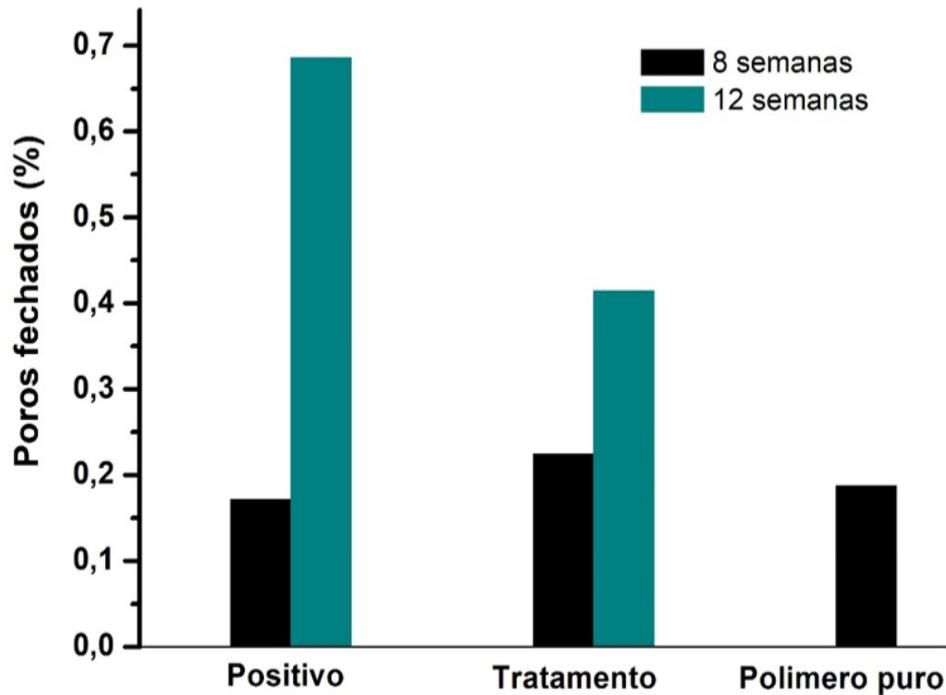
(ZHANG, *et al.*, 2018). Por isso que os indícios de uma possível competição entre o processo de degradação do polímero e o crescimento de tecido ósseo, encontrado no grupo tratamento de 12 semanas, pode explicar a diminuição da porcentagem de poros abertos.

FIGURA 19 - Poros abertos em função do tempo de implante.



Fonte: Autoria Própria

No que diz respeito à porcentagem de poros fechados, a figura 20 ilustra a quantidade de poros em função do tempo de implante, o qual é possível observar que houve um aumento na quantidade de poros fechados no grupo positivo e tratamento de 12 semanas. Fazendo uma comparação entre os dois grupos, não pode-se afirmar que houve uma diferença significativa, uma vez que a faixa da diferença é muito pequena, variando em décimos de porcentagem. Contudo, essa alteração aparente na elevação da porcentagem de poros fechados no tempo de 12 semanas pode estar relacionada à proliferação e diferenciação celular no interior dos poros, isso explicaria os fechamentos dos mesmos perdendo a sua interconectividade apresentada anteriormente. De acordo com Vissers e colaboradores (2015) arcabouços que contém poros entre 500 a 800 μm favorecem muito mais a proliferação de células e uma melhor resposta osteogênica. A partir disso, os poros interconectados são preenchidos por células e tecidos ocasionando o fechamento dos mesmos.

FIGURA 20 - Poros fechados em função do tempo de implante.

Fonte: Autoria Própria

5.3.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA DOS IMPLANTES (MICROCT)

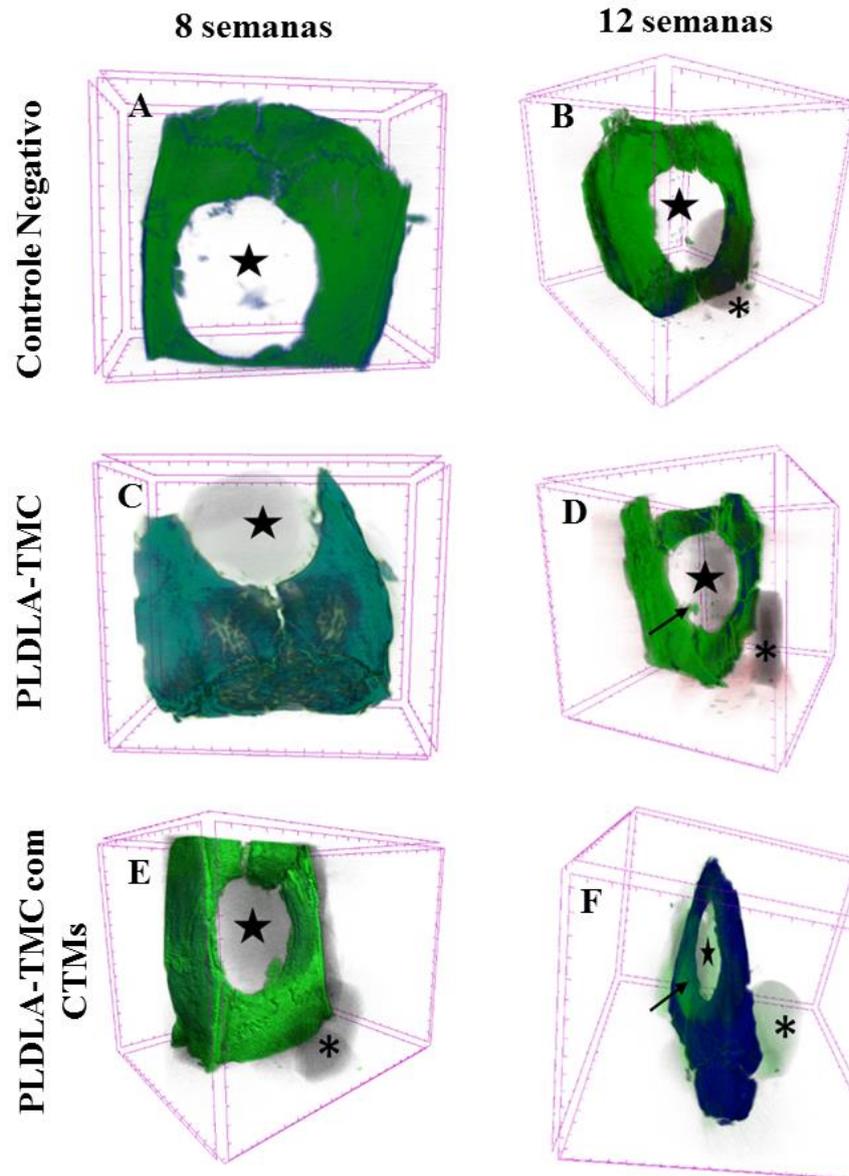
É importante ressaltar que a identificação do crescimento ósseo em microCT apresenta diferenças quanto aos resultados histológicos, uma vez que a histologia revela tanto o crescimento ósseo com baixa mineralização quanto com alta mineralização, sendo que na terminologia histológica é denominado de osso não-lamelar e lamelar, respectivamente (Figuras 23 e 24).

As imagens obtidas dos grupos amostrais (Figura 21) revelaram a área do defeito crítico ocupada por tecido ósseo apenas nos grupos após 12 semanas, com exceção do grupo tratamento com PLDLA-TMC com CTMs que revelou crescimento ósseo discreto no interior do defeito com 8 semanas. No entanto, o microCT evidencia apenas tecido ósseo já mineralizado, ou seja, histologicamente denominado lamelar (de apresentação de cor esverdeada na Figura 21). Apenas no grupo PLDLA-TMC com CTMs após 12 semanas foi observado extensa área de ossificação ao microCT ao redor de todo o defeito crítico, demonstrando que o processo de mineralização óssea, ou seja, a consolidação da lesão, ocorreu apenas neste grupo.

A não formação total do tecido ósseo no local da lesão, o qual não se evidencia nitidamente nas imagens, se deve a dois fatores importantes: o tamanho do defeito crítico ósseo e, conseqüentemente, o período de implante dos grupos. Muitos estudos *in vivo* no âmbito da regeneração tecidual óssea utilizam defeitos semi-críticos entre 4 a 6 mm de diâmetro fazendo com que o reparo desses defeitos seja mais notório ou até mesmo apresentando uma formação óssea completa. Isso implica, por conseguinte, no tempo de implante, sendo de 4 a 8 semanas, assim, quanto menor o defeito ósseo menor será também o período de formação (ZHANG, *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018).

Contudo, experimentos *in vivo* de Hwang e colaboradores (2017) utilizaram o defeito crítico ósseo de 8 mm de diâmetro em um período de implante (arcabouço a base de Policaprolactona (PCL), poli (ácido láctico glicólico) (PLGA) e fosfato beta-tricálcico (β -TCP)) de 8 semanas e demonstrou uma neovascularização e osteogênese ao redor do defeito ósseo, corroborando com o mesmo padrão de resultados obtidos neste trabalho com o mesmo período correspondente.

FIGURA 21 - Avaliação por microCT das calotas em regeneração após 8 (A, C e E) e 12 semanas (B,D e F) demonstrando as áreas em ossificação (setas identificando áreas de cor verde no interior do defeito crítico) no interior da cavidade do defeito crítico. Um controle contendo um arcabouço de PLLDLA-TMC (*) não submetido aos procedimentos foi adicionado em cada análise para realizar uma comparação mensurável de densidade.



Fonte: Autoria Própria

5.3.3 ANÁLISE DOS IMPLANTES A PARTIR DO PROCESSO HISTOLÓGICO

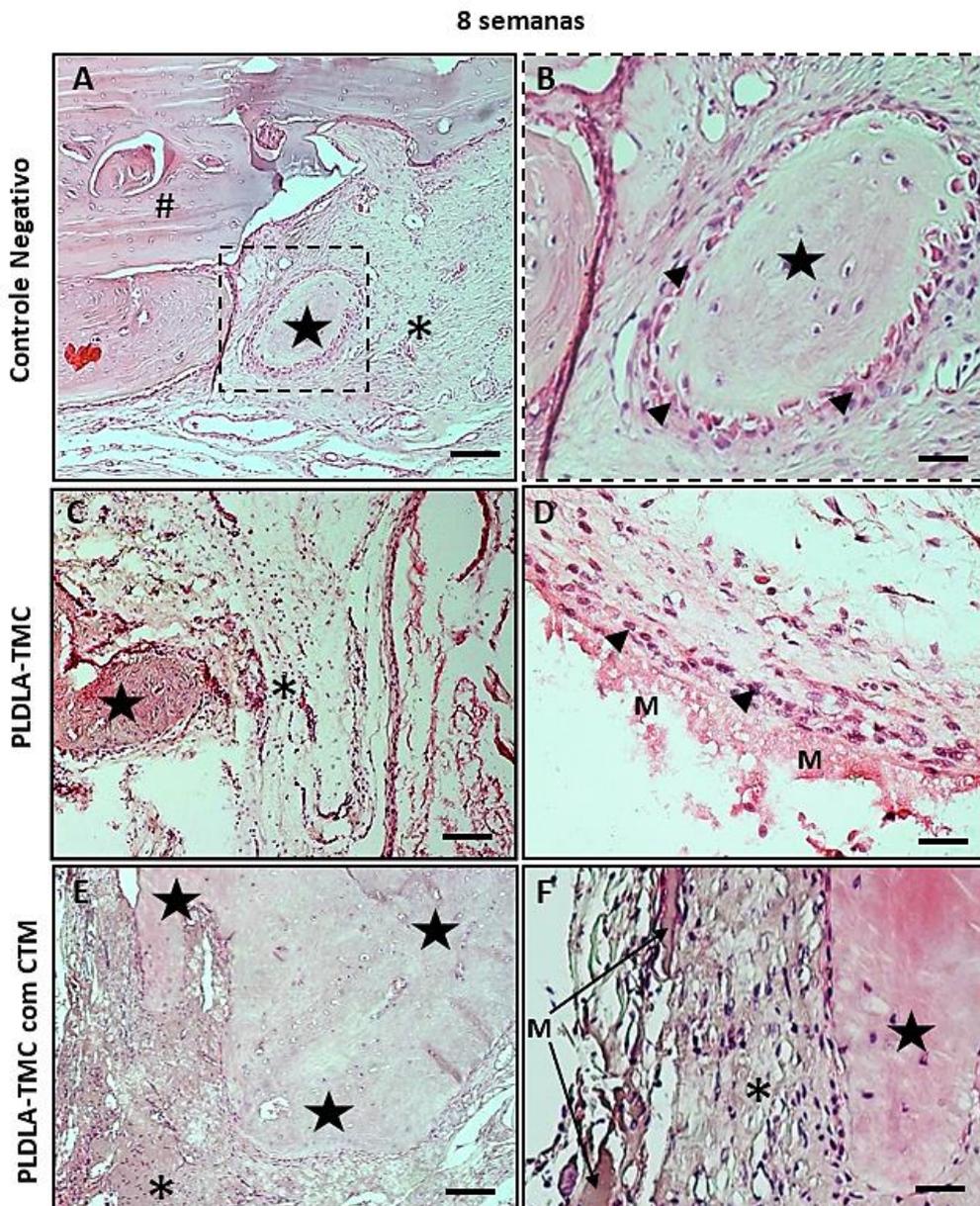
No grupo tratamento, as CTMs foram cultivadas no arcabouço de PLDLA-TMC contendo poros de 600 μm , durante 4 dias antes do material ser implantado no defeito crítico na calota craniana de ratos *Wistar*. Após o implante, os mesmos permaneceram implantadas durante 8 e 12 semanas. Sabe-se que as células-tronco possuem alta capacidade de regenerar tecidos após um trauma, além de serem imunomodulatórias do processo inflamatório em lesões, por este motivo fez-se a associação do material a base de PLDLA-TMC com as CTMs para realizar um comparativo do processo de ossificação quando apenas o implante de PLDLA-TMC.

I. Grupos do tempo de 8 semanas

Microscopicamente, o controle negativo (defeito ausente de material) mostrou que o extenso mesênquima circundante da área lesionada apresentou diversas ramificações em direção às áreas de borda com escassa osteogênese inicial sem indícios de mineralização. Além de discreto processo inflamatório no tecido conjuntivo frouxo adjacente. O grupo positivo (defeito com arcabouço de PLDLA-TMC) demonstrou região de borda com pequenas espículas jovens na área em continuidade com o osso antigo com intensa proliferação do periósteo adjacente, rodeado de mesênquima frouxo rico em microcirculação.

Na região do material, observa-se que o mesmo se apresenta intensamente fragmentado e degradado (conforme imagem D da figura 22) circundado por tecido mesenquimatoso de alta densidade celular sendo que o mesmo não apresentou um processo inflamatório significativo no local da lesão. Já o grupo tratamento (defeito com arcabouço de PLDLA-TMC/CTMs) foi observado extenso crescimento ósseo em direção da periferia ao centro com espessas espículas de osso jovem não lamelar contornado com camadas de osteoblastos e rico mesênquima adjacente, e nenhum indício de processo inflamatório expressivo foi identificado (figura 22).

FIGURA 22 - Apresentação histológica da região de defeitos com seus respectivos grupos. Em A, evidencia região de borda da lesão com tecido ósseo original (#) circundado por tecido mesenquimatoso (*) oriundo do periósteo adjacente. Em B, pequena espícula óssea jovem em processo de ossificação (estrela) rodeada por osteoblastos (cabeça-de-seta) sintetizando matriz óssea. Em C, observa-se pequena área jovem em ossificação (estrela) circundada por delicado mesênquima (*), em D, PLDLA-TMC degradando (M) circundado por tecido mesenquimatoso (seta) tangenciando as bordas. Imagem E evidencia extensa área em ossificação rica em tecido mesenquimatoso (*). Em F, áreas residuais contendo PLDLA-TMC (M). Barras (A, C e E) 300 e (B, D e F) 1000 μ m.



Fonte: Autoria Própria

Baseado nos resultados obtidos dos diferentes grupos pode-se entender que a utilização de uma estrutura de arcabouço 3D polimérica auxilia na colonização, migração, crescimento e diferenciação de células, uma vez que o grupo negativo não apresentou osteogênese expressiva por não conter esse tipo de estrutura. Isso mostra que o arcabouço desempenha a função de suporte para que ocorra o reparo do tecido, como apontados previamente por estudos anteriores (GONZÁLEZ *et al.*, 2020). Segundo Qazi e colaboradores (2017) as estruturas 3D porosas podem modificar a atividade molecular das CTMs fazendo com que a comunicação parácrina entre as células seja mais eficiente na resposta regenerativa, explicando assim o crescimento ósseo maior encontrado no grupo positivo e tratamento. Além disso, os tamanhos dos poros influenciam na vascularização, como explica Bobbert e Zadpoor (2017) que evidenciou em seu trabalho uma maior angiogênese em arcabouços contendo poros maiores de 400 μm , enquanto que nos poros abaixo de 300 μm limitaram a migração e proliferação celular.

Foi identificada também uma menor atividade inflamatória nos grupos que receberam o biomaterial (PLDLA-TMC e PLDLA-TMC com CTMs), o que faz referência direta a relevância de seu uso nesta pesquisa. Outros estudos já demonstraram que a implantação de células progenitoras ou tronco mesenquimais associadas aos biomateriais favorecem o a regeneração e minimizam o processo inflamatório (MUKHERJEE *et al.*, 2019). Assim como as células, os biomateriais, da mesma maneira, podem apresentar respostas imunoinflamatórias, influenciando as moléculas do local da lesão a reduzir essa inflamação (MUNERATO, *et al.*, 2020).

II. Grupos do tempo de 12 semanas

É possível observar no controle negativo uma região de borda da lesão com tecido ósseo circundado por osteoblastos e tecido mesenquimatoso adjacente. Observa-se também outra região demonstrando tecido ósseo não lamelar circundado por tecido contendo fibras delicadas com baixa densidade de células. O grupo positivo se assemelhou aos grupos do período de 8 semanas, pois apresentou também uma região de borda com espículas jovens na área que segue o osso antigo. Houve uma acentuada proliferação do periosteio em anexo cercado de mesênquima frouxo rico em microcirculação. Não foram identificadas células gigantes de corpo estranho, o qual seria um indicativo de processo inflamatório agudo, portanto, mesmo sem células implantadas, apenas o PLDLA-TMC não houve indícios inflamatórios que viessem a retardar a regeneração.

No grupo tratamento, por sua vez, foi identificado crescimento ósseo inclusive na região central da lesão com escasso inflamatório. Diversas espículas ósseas presentes desde a região de borda até a região central foram identificadas além de intenso processo angiogênico adjacente a essa região. Na porção cefálica da região implantada, foi identificado PLDLA-TMC em degradação preferencialmente encapsulado com pequena área de tecido de granulação apenas na região central. Toda região adjacente ao osso antigo e ao osso em formação são circundadas por extenso tecido mesenquimatoso com alta densidade celular. Isso significou que as células implantadas se proliferaram ao redor do material e se organizaram em massas celulares semelhantes a blastemas, estruturas compostas de aglomerados de células indicativas de diferenciação, e se mesclaram ao tecido conjuntivo residente.

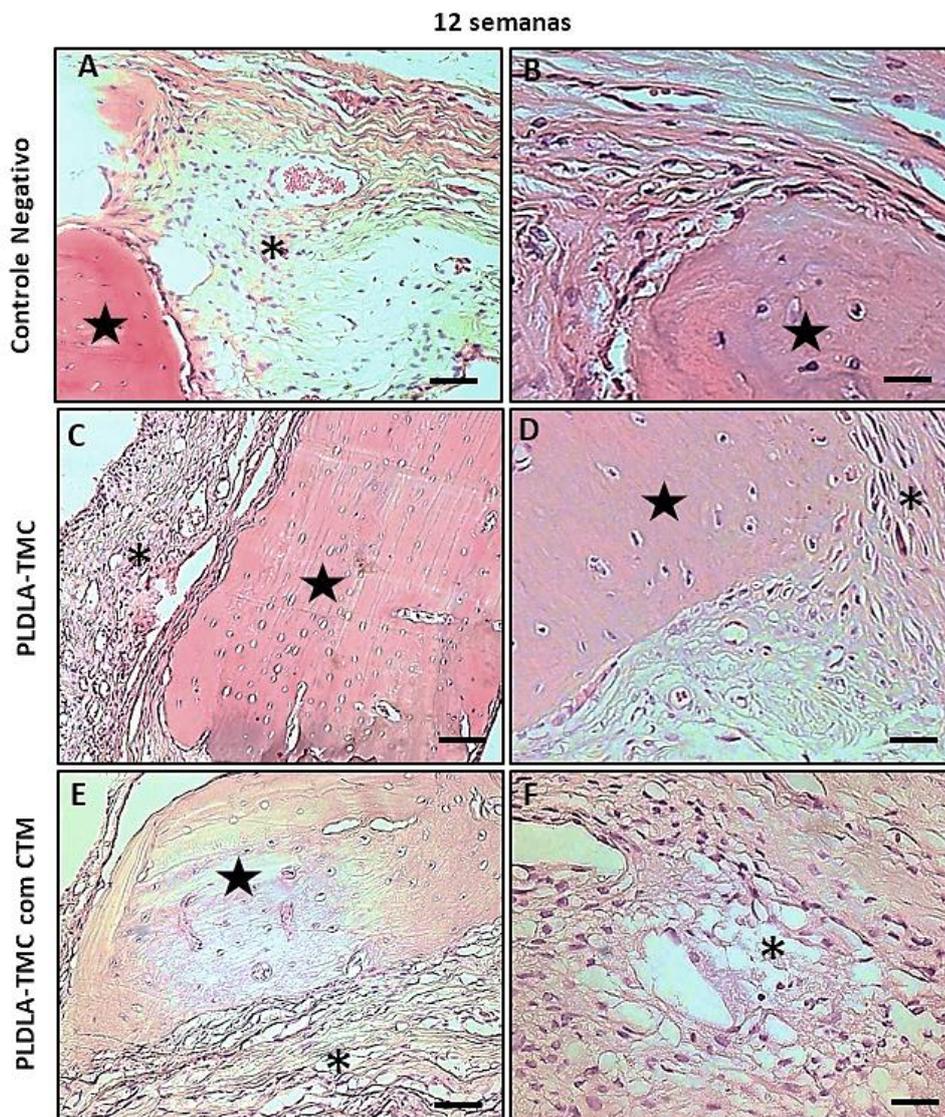
Diante dos resultados apresentados a partir da análise histológica dos implantes (Figura 23), é possível compreender que o implante de PLDLA-TMC/CTMs se mostrou com melhor resultado em relação aos outros grupos. Isso se deve ao fato das CTMs terem propriedades reparadoras e atuação reguladora do efeito inflamatório, assim, o tecido minimiza a inflamação típica da lesão e fazendo com que o tecido consiga reparar com maior rapidez e eficiência (CHEN *et al.*, 2019). Além disso, a própria sinalização molecular no sítio lesionado induz as CTMs adjacentes ao local da lesão a migrarem e se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares de origem conjuntiva, dentre elas os osteoblastos no caso de lesões ósseas.

Deste modo, as CTMS atuam de maneira versátil visto que ao serem estimuladas por sinais específicos, podem se diferenciar tanto para contribuir na regeneração tecidual quanto para regular o processo inflamatório (LIU, *et al.*, 2009). Em um estudo *in vivo* de Jehn e colaboradores (2020) foi possível afirmar que os implantes a base polimérica de Poli (ácido láctico glicólico) (PLGA) e fosfato beta-tricálcico (β -TCP) associado às CTMs obtiveram melhores resultados quando comparados com implantes apenas com o arcabouço de PLGA/ β -TCP, evidenciando uma alta vascularização no local, ou seja, a presença das CTMs auxiliou na ocorrência de uma maior angiogênese. Esse resultado corrobora com as análises evidenciadas neste trabalho.

FIGURA 23 - Apresentação histológica da região de defeitos com seus respectivos grupos.

Em A, evidencia região de borda da lesão com tecido ósseo (estrela) circundado por osteoblastos e tecido mesenquimatoso (*). Em B, observa-se tecido ósseo não lamelar (estrela) circundado por tecido contendo fibras colágenas delicadas com baixa densidade de células. Em C, observa-se extensa área de osso maduro circundado por área em ossificação (estrela), ao redor tecido adjacente já apresenta características de tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado. Em D evidencia área de ossificação rica em osteoblastos oriundos do mesênquima adjacente. Em E, região de centro de lesão com área em ossificação tanto lamelar quanto não lamelar (estrela) circundada por tecido conjuntivo frouxo rico em delgadas fibras colágenas. Em F, evidencia a alta densidade de células mesenquimais (*).

Barras (A, C e E) 1000 e (B, D e F) 300µm.



III. Análise comparativa dos tempos de implante

Com base em uma análise comparativa dos grupos em diferentes tempos de implantes, é possível observar que o grupo do controle negativo após 12 semanas evidencia as regiões de borda com osso jovem não lamelar demonstrando periosteio rico em osteoblastos ativos pela alta acidofilia, enquanto que o mesênquima adjacente se apresentou altamente celular e proximal ao osso jovem e altamente fibroso mais distalmente. Já o grupo de 8 semanas, se apresenta histologicamente semelhante, o qual demonstra que durante o intervalo de 4 semanas que é o período entre estes grupos, houve pouco avanço da neoformação óssea na área do defeito em razão da ausência de fatores que aceleram o reparo tecidual.

A principal diferença do controle positivo entre 8 a 12 semanas pós-implante se fundamenta no processo mais desenvolvido de crescimento ósseo a partir da região de borda, além do tecido mesenquimatoso com maior quantidade de fibras colágenas após 12 semanas. A observação de lamelas no tecido ósseo ainda jovem foi também notável no tempo mais tardio, o que revela um processo de remodelamento ósseo mais acentuado em períodos longos.

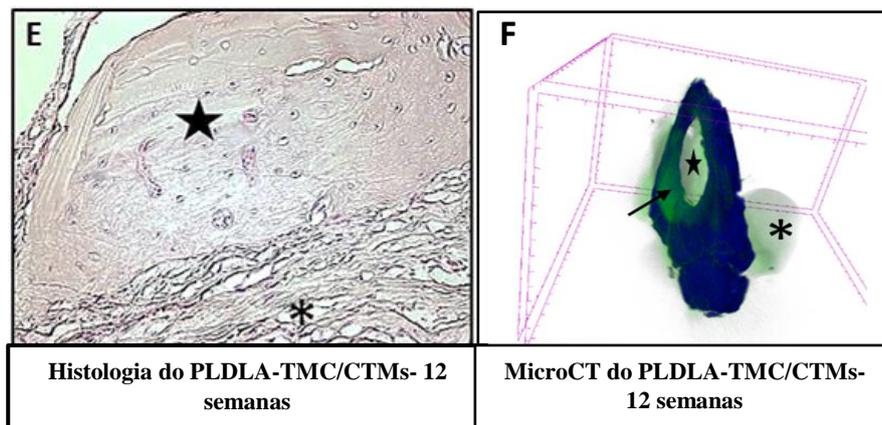
O grupo PLDLA-TMC/CTMs de 8 e 12 semanas demonstraram os melhores resultados, com áreas de maior proliferação celular óssea, menor processo inflamatório e maior angiogênese quando comparados aos demais. Diversos estudos já demonstraram a relação desses processos na regulação do reparo ósseo (LIN *et al.*, 2017). A angiogênese é maior no começo do reparo e vai regredindo na medida em que o novo tecido ósseo é formado, o que leva a concluir sobre a importância da vascularização local na neoformação óssea, visto que a chegada dos fatores de crescimento e o estabelecimento do processo inflamatório no sítio lesionado dependem de uma angiogênese inicial acelerada. Essa vascularização é um processo complexo que envolve tanto as células e suas sinalizações como também uma estrutura 3D, neste caso, os biomateriais (IORDACHE, *et al.*, 2015).

Em contrapartida é possível identificar, no grupo de 12 semanas, uma área de ossificação muito mais extensa e madura na região da lesão. Isso mostra que não apenas a associação de material/células auxilia no processo de regeneração, mas também o tempo de implante é fundamental para que haja um resultado significativo. Yoon e colaboradores (2007) já evidenciaram resultados similares nos tempos de 12 semanas, mostrando que nesse período pós-implante, os defeitos contendo arcabouço a base de PLGA implantado com células foram parcialmente preenchidos com osso recém-formado, não apenas nas margens do defeito, mas também apresentavam “ilhas” de tecido ósseo no centro da lesão. Conforme

também identificado no estudo de Groppo e colaboradores (2017) foi possível observar uma redução significativa no volume do defeito ósseo após o período de 12 semanas pós-implante do arcabouço polimérico, quando comparada com grupos de 4 e 8 semanas, mesmo não apresentando cicatrização óssea completa nesse período.

Para fins comparativos, a imagem A e a imagem F, estão representadas na figura 24, e demonstra que o osso neoformado na região do centro da lesão nas observações histológicas, se encontra representado em sua totalidade disperso por toda a região do defeito crítico conforme avaliado por microCT. É importante ressaltar que o discreto reparo tecidual identificado nos controles negativo e positivo, independente do tempo, ocorreram obrigatoriamente a partir das regiões de borda. No entanto, no grupo tratamento, tal reparo já pode ser observado após 12 semanas conforme revelou o microCT.

FIGURA 24 - Imagens ilustrativas de comparação da análise histológica (A) com a análise pelo MicroCT (F), ambas as imagens do grupo tratamento de 12 semanas.



Fonte: Autoria Própria

Após a análise dos resultados, é possível afirmar que houve uma excelente bioafinidade entre o biomaterial e as CTMs na neoformação de tecido ósseo, já que os grupos PLDLA-TMC com CTMs de 8 e 12 semanas tiveram os melhores resultados de regeneração, levando em consideração que o grupo de 12 semanas mostrou resultados mais expressivos do reparo ósseo. Isso pode ser explicado pelos fenômenos de menor atividade inflamatória, com maior angiogênese local, somados a um bom tamanho crítico de lesão e tempo de recuperação para análise.

TABELA 7 - Comparativo qualitativo dos principais parâmetros de reparo pós-implante.

Semanas/ grupos**	Infiltrado inflamatório*			Angiogênese*			Ossificação*		
	C-N	C-P	G-T	C-N	C-P	G-T	C-N	C-P	G-T
08	+	+	-	+	+	+++	+	+	++
12	+	+	-	+	++	+++	+	+	+++

*A identificação dos parâmetros ocorreu de maneira comparativa ao observar todos os 3 grupos avaliados, sendo que o sinal + indica uma presença mínima e sua repetição por até 3 vezes indica a maior ocorrência. A ausência de um determinado parâmetro é indicada pelo sinal -. ** C-N, controle negativo; C-P, controle positivo; G-T, grupo tratamento.

A tabela 7 demonstra para efeito comparativo, um panorama sobre estes principais fatores que levaram a um processo de reparo maior. Por fim, avaliar a ação de implantes do dispositivo biorreabsorvível de PLDLA-TMC associado à CTMs na regeneração óssea tem como relevância poder compreender os processos envolvidos na implantação de biomateriais poliméricos e contribuir para o desenvolvimento de novos biomateriais e elaborar estratégias que proporcionem um maior sucesso clínico de aplicação de biomateriais voltados à medicina regenerativa.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, pode-se concluir que o arcabouço de PLDLA-TMC, impresso em 3D com poros de 600 μm , foi capaz de promover a proliferação celular, a diferenciação osteogênica, além de apresentar grande potencial osteoindutor, pois mesmo sem os estímulos moleculares para diferenciação, houve diferenciação osteoblástica apenas na presença do material. Já os resultados *in vivo* evidenciaram que, nos grupos controle positivo e tratamento, tanto para 8 quanto para 12 semanas, o material implantado não gerou um processo inflamatório crônico no local da lesão e serviu como suporte para o crescimento, infiltração e diferenciação celular.

Especificamente, o grupo tratamento de PLDLA-TMC com CTMs no tempo de 12 semanas obteve maior sucesso na regeneração do tecido ósseo, mostrando uma maior área de ossificação no defeito crítico. Portanto, tais resultados comprovam que o PLDLA-TMC se mostra promissor para aplicações no âmbito da engenharia tecidual óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANASYEV, B. V.; ELSTNER, E.; ZANDER, A. R. A. J. Freidenstein, founder of Mesenchymal Stem Cell Concept. **Cellular Therapy and Transplantation**, 1, (3), 2009.

AFONSO, A. S.. **Interação entre Biomateriais e Tecido Ósseo**. Dissertação de doutorado da Faculdade de Medicina Dentária na Universidade do Porto. p. 24, 1998.

AIDO, M.; KERSCHNITZKI, M.; HOERTH, R.; BURGHAMMER, M.; MONTERO, C.; CHECA, S.; FRATZL, P.; DUDA, G. N.; WILLIE, B. M.; WAGERMAIER, W. Relationship Between Nanoscale Mineral Properties and Calcein Labeling in Mineralizing Bone Surfaces. **Connective Tissue Research**, 55 (1), 15-17, 2014.

AKKER, F.; DEDDENS, J. C.; DOEVENDANS, P. A.; SLUIJTER, J. P. G. Cardiac Stem Cell Therapy To Modulate Inflammation Upon Myocardial Infarction. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1830, 2449-2458, 2013.

AKTER, F. What is Tissue Engineering? **Tissue Engineering Made Easy**, 1-2, 2016.

ANDERSON, J. M. Inflammation, Wound Healing, and the Foreign-Body Response. **Host Reactions to Biomaterials and Their Evaluation**, 503-511, 2013.

ANDERSON, J. M. Biocompatibility and Bioresponse to Biomaterials. **Principles of Regenerative Medicine**, chapter 39, 2019.

ANDERSON, S. T.; KIDD, L. J.; BARTON, A. J.; GREER, R. M. Serum bone biomarkers and pyridinoline in mares during pregnancy and lactation, and in foals during early post-natal life. **Research in Veterinary Science**, 118, 34-40, 2018.

ANSELME, K. Osteoblast Adhesion on Biomaterials. **Biomaterials**, 21, 667-681, 2000.
ARIS, C. F.; HERRERO, M. A.; ECHEVERRI, L. F.; OLEAGA, G. E. LÓPEZ, J. M. Bone Remodeling: A Tissue-level process emerging from cell-level Molecular Algorithms. **PLOS one**, 1-19, 2018.

ARTZI, Z.; KOZLOVSKY, A.; NEMCOVSKY, C. E.; WEINREB, M. The Amount of Newly Formed Bone in Sinus Grafting Procedures Depends on Tissue Depth as Well as the Type and Residual Amount of the Grafted Material. **J Clin Periodontol**. 32(2):193-99; 2005.

BABILOTTE, J.; GUDURIC, V.; NIHOANNEN, D. L.; NAVEAU, A.; FRICAIN, J. C.; CATROS, S. 3D Printed Polymer–Mineral Composite Biomaterials for Bone Tissue Engineering: Fabrication and Characterization. **Journal of Biomedical Materials Research part B: Applied Biomaterials**, vol. 0008, 2019.

BAILEY, S.; KARSENTY, G.; GUNDBERG, C.; VASHISHTH, D. Osteocalcin and Osteopontin Influence Bone Morphology and Mechanical Properties. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1409 (1), 79-84, 2017.

BAKER, C. L.; PERA, M. F. Capturing Totipotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**, 22, 25-34, 2017.

BANERJEE, C.; JAVED, A.; CHOI, J. C.; GREEN, J.; ROSEN, V.; WIJNEN, A. J. V.; STEIN, J. L.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S.; Differential Regulation of the Two Principal Runx2/Cbfa1N-Terminal Isoforms in Response to Bone Morphogenetic Protein-2 during Development of the Osteoblast Phenotype. **Endocrinology**, 142, 4026–4039, 2001.

BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science, **Clin. Orthop. Relat. Res.** 371, 2000.

BELLIDO, T.; PLOTKIN, L. L.; BRUZZANITI, A. Bone Cells. **Basic and Applied Bone Biology**, 2, 37-55, 2019.

BENDIX, D. Chemical Synthesis of Polylactide and its Copolymers for Medical Applications. **Polym. Degrad. Stab**, 59, 129-135, 1998..

BERNARDO, M. E. e FIBBE, W. E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. **Cell Stem Cell**, 13, 2013.

BIGNOLD, L. P. COGHLAN, B. L. D.; JERSMANN, H. P. A. Virchow’s “Cellular Pathology” 150 years later. **Seminars in Diagnostic Pathology**, 25, 140-146, 2008.

BIOMATERIALS, ELSEVIER; 2019, <https://www.journals.elsevier.com/biomaterials/>; (Acessado janeiro 8, 2020).

BLAIR, H. C.; LARROUTURE, Q. C.; LI, Y.. LIN, H.; BEER-STOLTZ, D.; LIU, L.; TUAN, R. S.; ROBINSON, L. J.; SCHLESINGER, P. H.; NELSON, D. J. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation *In vivo* and *In vitro*. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 23 (3), 268-280, 2017.

BOOBERT, F. S. L.; ZADPOOR, A. A. Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone. **Journal of Materials Chemistry B**, 2017.

BORKOWICZ, M. K.; FILOVA, C. J.; KLEPETAR, J.; BACAVOKA, L.; PAMULA, E. Influence of pore size and hydroxyapatite deposition in poly(L-lactide-co-glycolide) scaffolds on the osteoblast-like cells cultured in static and dynamic conditions. **Materials Letters**, 241, 1-5, 2019.

BRÄNEMARK, P.-I.; ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. Tissue integrated prostheses. *In: Osseointegration in clinical dentistry*. Chicago : Quintessence Publ. Co. Inc. 1985.

BRYDONE, A. S.; MEEK, D.; MACLAINE, S. Bone Grafting, Orthopaedic Biomaterials, and the Clinical Need for Bone Engineering. **Journal of Engineering in Medicine**, 224, 12, 1329-1343, 2010.

CABRERA, A. R. E. **Processamento, Caracterização e Desempenho *in vivo* de Arcabouço Biorreabsorvível de PLDLA-co-TMC**. Tese de Doutorado Acadêmico. Campinas 2014.

CANEVAROLO, S. V. **Histórico**. Ciências dos Polímeros. 2ed, p. 17, 2006.

CAO, Y.; VACANTI, J. P.; PAIGE, K. T.; UPTON, J.; VACANTI, C. A. Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear. **Plastic and Reconstructive Surgery**, vol. 100, No, 2, 1997.

CARDOSO, G. B. C.; ARRUDA, A. C. F. O Papel das Células-tronco na Engenharia Tecidual. **Ciências & Cognição**, 14 (3), 214-219, 2009.

CASEIRO, A. R.; PEREIRA, T., BÁRTOLO, P. J.; SANTOS, J. D.; LUÍS, A. L.; MAURÍCIO, A. C. Mesenchymal Stem Cells and Biomaterials Systems- Perspective for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. **Procedia Engineering**, 110, 90-97, 2015.

CASSARO, C. V.; JUSTULIN-JUNIOR, L. A.; LIMA, P. R.; GOLIM, M. A.; BISCOLA, N. P.; CASTRO, M. V.; OLIVEIRA, A. L. R.; DOICHE, D. P.; PEREIRA, E. J.; FERREIRA-JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B. Fibrin Biopolymer as Scaffold Candidate to Treat Bone Defects in Rats. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 25, 2019.

CHANG, B.; SONG, W.; HAN, T.; YAN, J.; LI, F.; ZHAO, L.; KOU, H.; ZHANG, Y. Influence of Pore Size of Porous Titanium Fabricated by Vacuum Diffusion Bonding of Titanium Meshes on Cell Penetration and Bone Ingrowth. **Acta Biomaterialia**, 33, 311- 321, 2016.

CHEN, L.; LIU, G.; WU, J.; ZHOU, X.; ZHAO, Y.; CHEN, Z.; LIN, Z.; XIAO, Y. Multi-Faceted Effects of Mesenchymal Stem Cells (Mscs) Determined by Immune Microenvironment and their Implications on MSC/Biomaterial-Based Inflammatory Disease Therapy. **Applied Materials Today**, 1-14, 2019.

CHIA, H. L. e WU, B. M. Recent Advances in 3D Printing of Biomaterials. **Journal of Biological Engineering**, 9:4, 2015.

CHOUDHURY, D.; ANAND, S.; NAING, M. W. The Arrival of Commercial Bioprinters – Towards 3D Bioprinting Revolution!. **International Journal of Bioprinting**, vol. 04, n. 2, 2018.

CHRISTMAN, K. L. Biomaterials for Tissue Repair Biomaterials Can Promote Endogenous Healing Without Delivering Cells or Therapeutics. **Regenerative Medicine**, vol. 363, 2019.

CHUNG, E.; SON, Y. Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and Macrophages in Tissue Repair. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 11(6), 431–438, 2014.

COVAS, D. T. Célula-tronco Mesenquimais. In: COVAS, D. T. **Células-tronco: A Nova Fronteira da Medicina**. 1ed. São Paulo: Atheneu, 3, 35-48, 2006.

DACULSI, G.; FELLAH, B. H.; MIRAMOND, T.; DURAND, M. Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, What Are the Fundamental Properties for a Smart Bone Substitutes. **Research in Image and Health Technologies**. p. 3, 2013.

DAMIA, C.; MARCHAT, D.; LEMOINE, C.; DOUARD, N.; CHALEIX, V.; SOL, V.; LAROCLETTE, N.; LOGEART-AVRAMOGLU, D.; BRIE, J.; CHAMPION, E. . Functionalization of phosphocalcic bioceramics for bone repair applications. **Material Science & Engineering C**. 2018.

de MULDER, E. L. W.; BUMA, P.; HANNINK, G. Anisotropic Porous Biodegradable Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering. **Materials**, 2, 1674-1696, 2009.

DI LUCA, A.; OSTROWSKA, B.; MOLDERO, I. L.; LEPEDDA, A.; SWIESZKOWSKI, W.; BLITTERSWIJK, C. V.; MORONI, L. Gradients in Pore Size Enhance the Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Scaffolds. **Scientific Reports** 6, 22898, 2016.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to Animal Testing: A Review. **Saudi Pharmaceutical Journal** 23, 223–229, 2015.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cell. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, 8 (4), 315-317, 2006.

DRUMRIGHT, R. E.; GRUBER, P. R.; HENTON, D. E. Polylactic Acid Technology. **Advanced Materials**, 12, 1841-1846, 2000.

EBEWELE, R. O. **Historical Development**. Polymer Science Technology, p. 15, 2000.

ELANGO, J.; ZHANG, J.; BAO, B.; PALANIYANDI, K.; WANG, S.; WU, W.; ROBINSON, J. S. Rheological, Biocompatibility and Osteogenesis Assessment of Fish Collagen Scaffold for Bone Tissue Regeneration. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, 91 51-59, 2016.

ELGALI, I.; TURRI, A.; XIA, W.; NORLINDH, B.; JOHANSSON, A.; DAHLIN, C.; THOMSEN, P.; OMAR, O. Guided Bone Regeneration Using Resorbable Membrane and Different Bone Substitutes: Early Histological and Molecular Events. **Acta Biomaterialia**, 29, 409-423, 2016.

ESPOSITO, A. R.; MODA, M.; CATTANI, S. M. M.; SANTANA, G. M.; BARBIERI, J. A.; MUNHOZ, M. M.; CARDOSO, T. P.; BARBO, M. L. P.; RUSSO, T.; D'AMORA, U.; GLORIA, A.; AMBROSIO, L.; DUEK, E. A. R. PLDLA/PCL-T Scaffold for Meniscus Tissue Engineering. **BioResearch Open Access**, 1, 138-147, 2013.

ESPOSITO, A. R. Processamento, Caracterização e Desempenho *in vivo* de Arcabouço Biorreabsorvível de PLDLA-co-TMC. **Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica-UNICAMP**, 2014.

FARID, S. B. H. **Hard Tissue Engineering Applications**. Bioceramics: For Materials Science and Engineering, 119-158, 2019.

FISHERO, B. A.; KOHLI, N.; DAS, A.; CHRISTOHEL, J. J.; CUI, Q. Current Concepts of Bone Tissue Engineering for Craniofacial Bone Defect Repair. **Craniofacial Trauma and Reconstruction**, 8, 2015.

FITZSIMMONS, R. E. B.; MAZUREK, M. S.; SOOS, A.; SIMMONS, C. A. Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. **Stem Cells International**, 1-16, 2018.

FRIEDENSTEIN, A. J. Precursor Cell of Mechanocytes. **International Review of Cytology**, 327-359, 1976.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHYAN, R. K.; GERASIMOV, U. V. Bone Marrow Osteogenic Stem Cell: *in vitro* cultivation and transplantation in Diffusion Chambers. **Cell Proliferation**, 20 (3), 263-272, 1987.

GAALEN, S. M.; KRUYT, M. C.; GEUZE, R. E.; BRUJIN, J. D.; ALBLAS, J.; DHERT, W. J. A. Use of Fluorochrome Labels *In vivo* Bone Tissue Engineering Research. **Tissue Engineering**, 16 (2), 209-217, 2010.

GALLI, S. J.; BORREGAARD, N.; WYNN, T. A. Phenotypic and Functional Plasticity of Cells of Innate Immunity: Macrophages, Mast Cells and Neutrophils. **Nature Immunology**, 12(11): 1035- 1044, 2012.

GAMBARI, L.; GRIGOLO, B.; GRASSI, F. Hydrogen Sulfide in Bone Tissue Regeneration and Repair: State of the Art and New Perspectives. **International Journal Molecular Sciences**, 20, 5231, 2019.

GARETA, E. C.; COATHUP, M. J.; BLUNN, G. W. Osteoinduction of Bone Grafting Materials for Bone Repair and Regeneration. **Bone**, 81, 112-121, 2015.

GENESER. F. Histologia. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, p. 212-215, 2003.

GERIS, L.; GERISCH, A.; SLOTEN, J. V.; WEINER, R.; OOSTERWYCK, H. V. . Angiogenesis in bone fracture healing: A bioregulatory model. **Journal of Theoretical Biology**, 251 137–158, 2008.

GETHIN, G. Understanding the Inflammatory Process in Wound Healing. **British Journal of Community Nursing**, 17-22, 2012.

GIACHELLI, C. M.; STEITZ, S. Osteopontin: a Versatile Regulator of Inflammation and Biomineralization. **Matrix Biology**, 19, 615-622, 2000.

GONZALEZ, A. C.; DUTTA, D.; WALLACE, R.; CALLANAN, A. BRADLEY, M. Rapid Fabrication and Screening of Tailored Functional 3D Biomaterials. **Materials Science & Engineering C**, 108, 2020.

- GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages. **Nature Reviews Immunology**, 3, 23-35, 2003.
- GOULART, V. L.; FERREIRA, L. B.; DUARTE, C. A.; LIMA, I. L.; FERREIRA, E. R.; OLIVEIRA, B. C.; VARGAS, L. N.; MORAES, D. D.; SILVA, I. B. B.; FARIA, R. O.; SOUZA, A. G.; FILICE, L. S. C. Mesenchymal Stem Cells from Human Adipose Tissue and Bone Repair: A Literature Review. **Biotechnology Research & Innovation**, 2, 74-80, 2018.
- GROPPO, M. F.; CARIA, P. H.; FREIRE, A. R.; FIGUEROBA, S. R.; RIBEIRO-NETO, W. A.; BRETAS, R. E. S.; PRADO, F. B.; HAITER-NETO, F.; AGUIAR, F. H.; ROSSI, A. C. The Effect of a Hydroxyapatite Impregnated PCL Membrane in Rat Subcritical Calvarial Bone Defects. **Archives of Oral Biology**, 82, 209-215, 2017.
- GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. Poly(lactic acid) Fiber: An Overview. **Progress in Polymer Science**, 32 (4), 455-482, 2007.
- GUPTE, M. J.; SWANSON, W. B.; HU, J.; JIN, X.; MA, H.; ZHANG, Z.; LIU, Z.; FENG, K.; FENG, G.; XIAO, G.; HATCH, N.; MISHINA, Y. Pore Size Directs Bone Marrow Stromal Cell Fate and Tissue Regeneration in Nanofibrous Macroporous Scaffolds by Mediating Vascularization. **Acta Biomaterialia**, 82, 1-11, 2018.
- HABIBOVIC, P.; YUAN, H.; VALK, C. M.; MEIJER, G.; BLITTERWIJK, C. A.; GROOT, K. 3D Microenvironment as Essential Element for Osteoinduction by Biomaterials. **Biomaterials**, 26, 3565-3575, 2005.
- HEATH, C. A. Cells for Tissue Engineering. **TIBTECH**, 18, 17-19, 2000.
- HENCH, L. L. Biomaterials. **Science**, vol 208, p. 826-831, 1980.
- HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **J. Am. Ceram. Soc.**, vol 74 No 7, 1487-510, 1991.
- HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, vol 295, p. 1016-1017, 2002.
- HENCH, L. L.; THOMPSON, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. **J. R. Soc. Interface** 7, S379-S391, 2010.
- HOENERHOFF, M. J. e BRIX, A. Bone-Inflammation. **National Toxicology Program**, 2015. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/musculoskeletal/bone/jinflamm/index.htm>. Acesso em: 05/02/2020.
- HOWARD, D.; BUTTERY, L. D.; SHAKESHEFF, K. M.; ROBERTS, S. J. Tissue Engineering: Strategies, Stem Cells and Scaffolds. **Journal of Anatomy**, 213, 66-72, 2008.
- HSU, S. H.; CHEN, C. T.; WEI, Y. H. Inhibitory Effects of Hypoxia on Metabolic Switch and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, 31(12), 2779-2788, 2013.

HUDECKI, A.; KIRYCZYNSKI, G.; LOS, M. J.; Biomaterials, Definition, Overview. **Stem Cell and Biomaterials for Regenerative Medicine**, chapter 7, 2019.

HWANG, K.; CHOI, J.; KIM, J.; CHUNG, H. Y.; JIN, S.; SHIM, J.; YUN, W.; JEONG, C.; HUH, J. Comparative Efficacies of Collagen-Based 3D Printed PCL/PLGA/ β -TCP Composite Block Bone Grafts and Biphasic Calcium Phosphate Bone Substitute for Bone Regeneration. **Materials**, 10, 421, 2017.

ICER, M. A.; KARADAG, M. G. The Multiple Functions and Mechanisms of Osteopontin. **Clinical Biochemistry**, 59, 17-24, 2018.

IODACHE, F.; GRUMEZESCU, A. M.; MANIU, H.; CURUTIU, C. Development of scaffolds for vascular tissue engineering: biomaterial mediated neovascularization. **Current Stem Cell Research & Therapy**, 11 (2), 2015.

JANDT, K. D. Evolutions, Revolutions and Trends in Biomaterials Science – A Perspective**. **Advanced Engineering Materials**, 9, n. 12, 2007.

JANG, J.; PARK, J. Y.; GAO, G.; CHO, D. W. Biomaterials-Based 3D Cell Printing for Next-Generation Therapeutics and Diagnostics. **Biomaterials**, 156, 88-106, 2018.

JANONES, D. S. **Presença de Osteoaderina Durante a Ossificação Intramembranosa e Endocondral Através de Imunocitoquímica e Western Blotting**. Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo, p. 15, 2009.

JEHN, P.; WINTERBOER, J.; KAMPMANN, A.; ZIMMERER, R.; SPALTHOFF, S.; DITTMANN, J.; GELLRICH, N.; TAVASSOL, F. Angiogenic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Combination with Different Scaffold Materials. **Microvascular Research**, 127, 2020.

JENSEN, G.; MORRILL, C.; HUANG, Y. 3D tissue engineering an emerging technique for pharmaceutical research. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2018.

JIMI, E.; HIRATA, S.; OSAWA, K.; TERASHITA, M.; KITAMURA, C.; FUKUSHIMA, H. The Current and Future Therapies of Bone Regeneration to Repair Bone Defects. **International Journal of Dentistry**, 1-7, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Tecido Ósseo**. Histologia Básica, 10ed, p. 136, 2004.

KIM, B. S.; JANG, J.; CHAE, S.; KONG, J. S.; AHN, M.; CHO, D. W. Three-Dimensional Bioprinting of Cell-Laden Constructs with Polycaprolactone Protective Layers for Using Various Thermoplastic Polymers. **Biofabrication**, 8, 2016.

KIM, K. M.; EVANS, G. R. D. **Tissue Engineering: The Future of Stem Cells**. Topics in Tissue Engineering, 2, 2-21, 2005.

KIPARI, M. M. T.; OPHASCHAROENSUK, V.; WESSON, J. A.; JOHNSON, R.; HUGHES, J. Osteopontin- A Molecule for all Seasons. **Quarterly Journal of Medicine**, 95, 3-13, 2002.

KOMATSU, D.; MISTURA, D. V.; MOTTA, A.; DOMINGUES, J. A.; HAUSEN, M. A.; DUEK, E. Development of a Membrane of Poly (L-co-D,L lactic acid-co-trimethylene carbonate) with Aloe Vera: An Alternative Biomaterial Designed to Improve Skin Healing. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 32, p. 311-320, 2017.

KOMATSU, D.; HAUSEN, M. A.; ERI, R. Y.; LEAL, V.; PEDRINI, F.; YAKSIC, C.; ALVES, T. F. R.; CHAUD, M. V.; FANELLI, C.; NORONHA, I.; DUEK, E. A. R. Alternative Cutaneous Substitutes Based on Poly(- - , -lactic acid- -trimethylene carbonate) with Raddi Extract Designed for Skin Healing. **ACS Omega**, v. 4, p. 18317-18326, 2019.

KOSARIC, N.; KIWANUKA, H.; GURTNER, G. Stem Cell Therapies for Wound Healing. **Expert Opinion on Biological Therapy**, 2019.

KUMAR, P.; VINITHA, B.; FATHIMA, G.; Bone Grafts in Dentistry. **Journal of Pharmacy and Bioallied Science**, 125-7, 2013.

LANGER, R. VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, New Series, Vol. 260, No. 5110. pp. 920-926, May 14, 1993.

LEVI, B.; JAMES, A. W.; NELSON, E. R.; VISTNES, D.; WU, B.; LEE, M.; GUPTA, A.; LONGAKER, M. T. Human Adipose Derived Stromal Cells Heal Critical Size Mouse Calvarial Defects. **PLOS One**, v.5(6), 2010.

LEVY, D.; MELO, T. C. M.; RUIZ, L. M.; BYDLOWSKI, S. P. Oxysterol and Mesenchymal Stem Cell Biology. **Chemistry and Physics of Lipids**, 207, 223-230, 2017.

LIAN, J. B.; STEIN, G. S. Runx2/Cbfa1: A Multifunctional Regulator of Bone Formation. **Current Pharmaceutical Design**, 9, 2677-2685, 2003.

LIN, J. I. Rudolf Virchow: Creator of Cellular Pathology. **Laboratory Medicine**, 14, p 792-793, 1983.

LIN, W.; XU, L.; ZWINGENBERGER, S.; GIBON, E.; GOODMAN, S. B.; LI, G. Mesenchymal Stem Cells Homing to Improve Bone Healing. **Journal of Orthopaedic Translation**, 9, 19-27, 2017.

LIU, Z.; ZHUGE, Y.; VALAZQUEZ, O. C. Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, 106:984-991, 2009.

LINTERMANS, L. L.; STEGEMAN, C. A.; HEERINGA, P.; ABDULAHAD, W. H. T Cells in Vascular Inflammatory Diseases. **Frontiers in Immunology**, vol. 05, 2014.

LOPES, D.; CRUZ, C. M. ; OLIVEIRA, M. B.; MANO, J. F. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, 185, 240-275, 2018.

LOPES, M. S.; JARDINI, A. L.; FILHO, R. M. Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. **Procedia Engineering**, 42, 1402-1413, 2012.

LOVE, B. Polymeric Biomaterials. **Biomaterials**, 205-238, 2017.

LOUREIRO, L. A. S. Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties. Reference Module in Materials **Materials Science and Engineering**. 1-6, 2017.

Luna, I. Z.; Dam, K. C.; Sawaruddin Chowdhury, A. M.; Md. Abdul Gafur, Khan, N.; Khan, R. A. Advances in Materials Science and Engineering, **Hindawi Publishing Corporation**, Cairo, 1–7, 2015.

MADRID, A. P. M.; VRECH, S. M.; SANCHEZ, M. A.; RODRIGUEZ, A. P. Advances in Additive Manufacturing for Bone Tissue Engineering Scaffolds. **Materials Science & Engineering C**. 100, 631-644, 2019.

MAES, C.; KRONENBERG, H. M. Bone Development and Remodeling. *Endocrinology, Diabetes and Metabolism*, 60, 1038-1062, 2015.

MARKS, S. C., & ODGREN, P. R. Structure and development of the skeleton. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & G. A. Rodan (Eds.), **Principles of bone biology**, vol. 1, pp. 3–15, 2002.

MARTIN, V.; BETTENCOURT, A. Bone Regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. **Materials Science and Engineering**, 82, 363- 371, 2018.

MÁS, B. A.; FREIRE, D. C. L.; CATTANI, S. M. M.; MOTTA, A. C.; BARBO, M. L. P.; DUEK, E. A. R. Biological Evaluation of PLDLA Polymer Synthesized as Construct on Bone Tissue Engineering Application. **Materials Research** (São Carlos. On-line), v. 1, p. 1, 2016.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-Osteoblast Communication. **Archives Of Biochemistry and Biophysics**, 473, 201-209, 2008.

MCARDLE, A.; PAIK, K. J.; CHUNG, M. T.; HU, M. S.; WALMSLEY, G.; ZIMMERMANN, A.; WONG, V. W.; HSUEH, B. CHUNG, A. S.; GURTNER, G. C.; LORENZ, H. P.; LONGAKER, M. T.; WAN, D. C. Manipulation of Stem Cells and Their Microenvironment for Tissue Engineering. **Surgery Current Research**, 3, 1-8, 2013.

MEHTA, R.; KUMAR, V.; BHUNIA, H.; UPADHYAY, S. N. Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review. **Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews**, 45 (4), 325-349, 2005.

MENDES JUNIOR, D.; DOMINGUES, J. A.; HAUSEN, M. A.; CATTANI, S. M. M.; ARAGONES, A.; OLIVEIRA, A. L. R.; INÁCIO, R. F.; BARBO, M. L. P.; DUEK, E. A. R. Study of Mesenchymal Stem Cells Cultured on a Poly(lactic-co-glycolic acid) Scaffold Containing Simvastatin for Bone Healing. **Journal Applied Biomaterials & Functional Materials**, 15 (2), 133-141, 2017.

MESKINFAM, M. **Polymer Scaffolds for Bone Regeneration**. Characterization of Polymeric Biomaterials, 444-445, 2017.

MESSIAS, A. D. **Arcabouços de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) para o crescimento de células osteoblásticas (SaOS-2)**. Dissertação de Mestrado Acadêmico. Campinas 2011.

MESSIAS, A. D.; MARTINS, K. F.; MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Synthesis, Characterization, and Osteoblastic Cell Culture of Poly(L-co-D,L-lactide-co-trimethylene carbonate) Scaffolds. **International Journal of Biomaterials**. P.1-7, 2014.

MITCHELL, G. R.; TOJEIRA, A. Role of Anisotropy in Tissue Engineering. **Procedia Engineering**, 59, 117-125, 2013.

MOHAMED, A. M. An Overview of Bone Cells and Their Regulating Factors of Differentiation. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, 15 (1), 4-12, 2008.

MOTTA, A. C. **Síntese e caracterização de dispositivos de poli(L-co-D,L ácido láctico). Estudo da degradação *in vitro* e *in vivo***. Dissertação de Doutorado Acadêmico. Campinas 2007.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Estudo Inicial da Degradação “*in vivo*” de Poli(L-co-D,L ácido láctico), Sintetizado em Laboratório, Aplicado como Prótese Tibial em Coelhos. **Revista Matéria**, 14, 3, 1070-1076, 2009.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese de Terpolímero Bioreabsorvível para Aplicação Médica. Patente: Privilégio de Inovação. Número do Registro: PI0201100492, título: “Síntese de terpolímero bioreabsorvível para aplicação médica”, Instituição de Registro: **INPI-Instituto Nacional da Propriedade Industrial**. Depósito: 09/03/2010.

MOTTA, A. C. FEDRIZZI, V. M.; BARBO, M. L. P.; DUEK, E. A. R. *In vitro* and *in vivo* studies on devices of poly(l-co-d,l lactic acid)-co-TMC for bone repair. **Polymer Bulletin**, v. 1, p. 1-15, 2018.

MU, Y.; YANG, L.; LI, C.; QING, W. Role of Inflammatory Factors in Regulation of Osteogenesis in Tissue-Engineered Bone. **Osteogenesis and Bone Regeneration**, 1-13, 2018.

MUKHERJEE, S.; DARZI, S.; PAUL, K.; WERKMEISTER, J. A.; GARGETT, C. E. Mesenchymal stem cell-based bioengineered constructs: foreign body response, cross-talk with macrophages and impact of biomaterial design strategies for pelvic floor disorders. **Interface Focus**, 9, 2019.

MUNERATO, M. S.; BIGUETTI, C. C.; SILVA, R. B. P.; SILVA, A. C. R.; BACELAR, A. C. Z.; SILVA, J. L.; COUTO, M. C. R.; DUARTE, M. A. H.; SANTIAGO-JUNIOR, J. F.; BOSSINI, P. S.; MATSUMOTO, M. A. Inflammatory Response and Macrophage Polarization Using Different Physicochemical Biomaterials for Oral and Maxillofacial Reconstruction. **Materials Science & Engineering C**, 107, 2020.

MURPHY, S. V. e ATALA, A. 3D Bioprinting of Tissues and Organs, **Nature Biotechnology**, vol. 32, n. 08, 2014.

MURPHY, C. M.; HAUGH, M. G.; O'BRIEN, F. J. The Effect of Mean Pore size on Cell Attachment, Proliferation and Migration in Collagen-glycosaminoglycan Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Biomaterials**, vol. 31, issue 3, p. 461-466, 2010.

NAKAMURA, T. Biomaterial Osteoinduction. **Journal of Orthopaedic Science**, 12, 111-112, 2007.

NAMPOOTHIRI, K. M.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An Overview of the Recent Developments in Polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, 101, 8493-8501, 2010.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in Orthopaedics. **J. R. Soc. Interface**, 5, 1137-1158, 2008.

NEBERT, D. W. SUNDBERG, M. I. What do Animal Experiments Tell us that *in vitro* Systems Cannot? The Human Toxome Project. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 75, 1-4, 2016.

NING, C.; ZHOU, L.; TAN, G. Fourth-generation biomedical materials. **Materials Today**, 2015.

NOFAR, M.; PARK, C. B. Poly (lactic acid) foaming. **Progress in Polymer Science**, 39, 1721-1741, 2014.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. **Materials Today**, 14(3), 88-95, 2011.

ODELIUS, K.; HOGLUND, A.; KUMAR, S.; HAKKARAINEN, M.; GHOSH, A. K.; BHATNAGAR, N.; ALBERTSSON, A. C. Porosity and Pore Size Regulate the Degradation Product Profile of Polylactide. **Biomacromolecules**, 12, 1250-1258, 2011.

PÊGO A. P.; SIEBUM B.; GRIJPMAN D. Preparation of Degradable Porous Structures Based on 1,3- Trimethylene Carbonate and D,L Lactide (Co) Polymers For Heart Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, 9:981–993, 2003.

PENG, L.; ZHOU, Y.; LU, W.; ZHU, W.; LI, Y.; CHEN, K.; ZHANG, G.; XU, J.; DENG, Z.; WANG, D. Characterization of a Novel Polyvinyl Alcohol/Chitosan Porous Hydrogel Combined With Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and its Application in Articular Cartilage Repair. **BMC Musculoskeletal Disorders**, 20:257, 2019.

PINTO, J. G. S.; CIPRANDI, M. T. O.; AGUIAR, R. C.; LIMA, P. V. P.; HERNANDEZ, P. A. G.; SILVA, A. N. J. . Enxerto Autógeno X Biomateriais no Tratamento de Fratura e Deformidades Faciais- Uma Revisão de Conceitos Atuais. **RFO**, 12, 3, 79-84, 2007.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, 284, 143-147, 1999.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mercado. **Química Nova**, vol 38, No. 7, 957-971, 2015.

QADHI, G. SOLIMAN, M.; SHADY, I. RASHED, L. Gingival Mesenchymal Stem Cells as an Alternative Source to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Regeneration of Bone Defects: *In vivo* Study. **Tissue and Cell**, 63, 2020.

QAZI, T. H.; MOONEY, D. J.; DUDA, G. N.; GEISLER, S. Biomaterial that Promote Cell-Cell Interactions Enhance the Paracrine Function of MSCs. **Biomaterials**, 140, 103-114, 2017.

QI, K.; LI, N.; ZHANG, Z.; MELINO, G. Tissue Regeneration: The Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and Immune Response. **Cellular Immunology**, 326, 86-93, 2018.

RAO, S. H.; HARINI, B.; SHADAMARSHAN, R. P. K.; BALAGANGADHARAN, K.; SELVAMURUGAN, N. Natural and Synthetic Polymers/Bioceramics/Bioactive Compounds-Mediated Cell Signalling in Bone Tissue Engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, 110, 88-96, 2018.

RATNER, B. D. **A History of Biomaterials**. Biomaterials Science. 2nd ed. p 10-11, 2004.

RIBAS, T. A.; FORNI, M. F.; WINNISCHOFER, S. M. B.; SOGAYAR, M. C.; LIMA, M. T. Extracellular Matrix Dynamics During Mesenchymal Stem Cells Differentiation. **Developmental Biology**, 1-12, 2018.

ROBINTON, D. A.; DALEY, G. Q. The promise of Induced Pluripotent Stem Cells in Research and Therapy. **Nature**, 481 (7381), 295-305, 2013.

ROCHEFORT, G. Y.; PALLU, S.; BENHAMOU, C. L. Osteocyte: The Unrecognized Side of Bone Tissue. **Osteoporos International**, 21, 1457-1469, 2010.

SAITO, N.; MURAKAMI, N.; TAKAHASHI, J.; HORIUCHI, H.; OTA, H.; KATO, H.; OKADA, T.; NOZAKI, K.; TAKAOKA, K. Synthetic Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems for Bone Morphogenetic Proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57, 1037-1048, 2005.

SALA, C. C.; RIBES, M. A.; MUIÑOS, T. F.; SANCHO, L. R.; CHICÓN, P. L.; REVERTÉ, C. A.; CAMINO, J. C.; GIL, A. M.; SEMINO, C. E. Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine. **Journal of Bioengineering and Bioelectronics**, 2013.

SALARIS, F. e ROSA, A. Construction of 3D in Vitro Models By Bioprinting Human Pluripotent Stem Cells: Challenges and Opportunities. **Brain Research**, 1723, 2019.

SALDAÑA, L.; BENSIAMAR, F.; VALLÉS, G.; MANCEBO, F. J.; GARCÍA-REY, E. VILABOIA, N. Immunoregulatory Potential of Mesenchymal Stem Cells Following Activation by Macrophage-Derived Soluble Factors. **Stem Cell Research & Therapy**, 10:58, 2019.

- SANTAVIRTA, S.; KONTTINEN, Y.T.; LAPPALAINEN, R.; ANTTILA, A.; GOODMAN, S.B.; LIND, M.; SMITH, L.; TAKAGI, L.; GDMEZBARRENA, E.; NORDSLETTEN, L.; XU, J.-W. Materials in total joint replacement. **Current Orthopaedics**, 12(1):51-57, 1998.
- SCHAFFLER, M. B.; CHEUNG, W. Y.; MAJESKA, R.; KENNEDY, O. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. **Calcified Tissue International**, 94 (1), 5-24, 2014.
- SCHEMITSCH, E. H. Size Matters: Defining critical in Bone Defect Size!. **Journal Orthopedic Trauma**, vol. 3, n.10, 2017.
- SCIENTIFIC, T. F. **CellTrace™ Calcein Green, AM - Special Packaging**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C34852>>. Acesso em: 3 jul. 2019
- SCOTT, C. J.; ZACHARY, L. S.; BRYAN, S .S.; GARY, D. S. . Tissue Engineering and Conduit Substitution. **Urologic Clinics of North America**, 45, 133-141, 2018.
- SERGUIENKO, A.; WANG, M. Y.; MYKLEBOST, O. Real-Time Vital Mineralization Detection and Quatification During *In vitro* Osteoblast Differentiation. **Biological Procedures Online**, 20:14, 1-5, 2018.
- SHERMAN, L. S.; ROMAGANO, M. P.; WILLIAMS, S. F.; RAMESHWAR, P. Mesenchymal Stem Cell Therapies in Brain Disease. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, p. 1-9, 2019.
- SHIM, M. J. Bone Changes in Femoral Bone of Mice Using Calcein Labeling. **Korean J Clin Lab Sci.**, 48(2):114-117, 2016.
- SHULTZ, M. Rudolf Virchow. **Emerging Infectious Diseases**, 14, p. 1480, 2008.
- SHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. Proliferar ou Diferenciar? Perspectivas de Destino das Células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, 16 (1), 13-19, 2005.
- SINGH, A. Biomaterials innovation for next generation ex vivo immune tissue engineering. **Biomaterials**, 130, 104-110, 2017.
- SINGH, H. e DYKXHOORN, D. M. Induced Pluripotent Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Encyclopedia of Tissue and Regenerative Medicine**, 1-8, 2019.
- SKALAK, R.; FOR. C. F. **Tissue Engineering**. Alan R. Liss. Inc. New York, 1988.
- SOHNI. A.; VERFAILLIE, C. M.; Multipotent Adult Progenitor Cells. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, 24, 3-11, 2011.
- SONG, J. E.; TIAN, J.; KOOK, Y. J.; THANGAVELU, M.; CHOI, J. H.; KHANG, G. A BMSCs-laden Quercetin/Duck's Feet Collagen/Hydroxyapatite Sponge for Enhanced Bone Regeneration. **Journal Biomedical Mater Research**, 108A, 784-794, 2020.
- SONG, J. E.; TRIPATHY, N.; SHIN, J. H.; LEE, D. H.; CHA, J. G.; PARK, C. H.; SUH, D. S.; KHANG, G. *In vivo* Bone Regeneration Evaluation of Duck's Feet Collagen/PLGA Scaffolds in Rat Calvarial Defect. **Macromolecular Research**, 25 (10), 994-999, 2017.

- SONG, Y.; KAMPHUIS, M. M. J.; ZHANG, Z.; STERK, L. M. T.; VERMES, I.; POOT, A. A. GRIJPM, D. W. Flexible and Elastic Porous Poly(Trimethylene Carbonate) Structures for Use in Vascular Tissue Engineering. **Acta Biomaterialia**, 6 (4), 1269-1277, 2010.
- SOUZA, A. T. P.; FREITAS, G. P.; LOPES, H. B.; FERRAZ, E. P.; OLIVEIRA, F. S.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Effect of Cell Therapy with Allogeneic Osteoblasts on Bone Repair of Rat Calvaria Defects. **Cytotherapy**, 20:1267-1277, 2018.
- SRINIVASAN, A.; FULTS, M. L.; SUPRONOWICZ, P.; ESQUIVEL, R.; ZAMILPA, R. Mesenchymal Stem Cell-Derived Products for Tissue Repair and Regeneration. **A Roadmap to Non-Hematopoietic Stem Cell-Based Therapeutics**, 419-440, 2019.
- STEVENS, A.; LOWE, J. Histologia. 1.ed. São Paulo: **Manole**, cap. 14, p. 233-236, 1995.
- STOPA, Z.; GUTOWSKA, M.; ABED, K.; LELONKIEWICZ, D. S.; KAMINSKI, A.; FIEDOR, P. Evaluation of the Safety and Clinical Efficacy of Allogenic Bone Grafts in the Reconstruction of the Maxilla and Mandible. **Transplantation Proceedings**. 2018.
- SUGANYA, S.; AHILA, S. C.; KUMAR, B. M.; KUMAR, M. V. Evaluation and Comparison of Anti-Candida Effect of Heat Cure Polymethylmethacrylate Resin Enforced with Silver Nanoparticles and Conventional Heat Cure Resins: An *In Vitro* Study. **Indian Journal of Dental Research**, vol. 25, 204-207, 2014.
- SUN, A. R.; FRIIS, T.; SEKAR, S.; CRAWFORD, R., XIAO, Y.; PRASADAM, I. Is Synovial Macrophage Activation the Inflammatory Link Between Obesity and Osteoarthritis? **Current Rheumatology Reports**, 18(9), 57, 2016.
- SZABÓ, M. E.; THURNER, P. J. Anisotropy of bovine cortical bone tissue damage properties. **Journal of Biomechanics**, 46(1), 2-6, 2013.
- TATULLO, M.; GARGIULO, I. C.; DIPALMA, G.; BALLINI, A.; INCHINGOLO, A. M.; PADUANELLI, G.; NGUYEN, C. K.; INCHINGOLO, A. D.; MAKEEVA, I.; SCACCO, S.; NUZZOLESE, M.; VITO, D.; INCHINGOLO, F. Stem Cells and Regenerative Medicine. **Translational Systems Medicine and Oral Disease**, 387-407, 2020.
- TELSER, A. G.; YOUNG, J.K.; BALDWIN, K. M. Histologia. 1.ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, cap. 5, p. 132-138, 2008.
- TROUNSON, A.; THAKAR, R. G.; LOMAX, G.; GIBBONS, D. Clinical Trials For Stem Cell Therapies. **BMC Medicine**, 9:52, 2011.
- TROWBRIDGE, H. O. Immunological Aspects of Chronic Inflammation and Repair. **Journal of Endodontics**, vol. 16, n. 2, 1990.
- UFUKERBULUT, D. e LAZOGLU, I. Biomaterials for improving the blood and tissue compatibility of total artificial hearts (TAH) and ventricular assist devices (VAD). **Biomaterials for Artificial Organs**, 207-235, 2011.
- URAO, N. e KOH, T. J. Manipulating Inflammation to Improve Healing. **Wound Healing Biomaterials**, vol.1, 2016.

VACANTI, C. A.; CIMA, L. G.; RATKOWSKI, D.; UPTON, J.; VACANTI, J. P. Tissue Engineered Growth of New Cartilage in the Shape of a Human Ear Using Synthetic Polymers Seeded with Chondrocytes. **Materials Research Society**, 252, 1992.

VISSERS, C. A. B.; HAVERSTINE, J. N.; LEACH, J. K. Pore size regulates mesenchymal stem cell response to Bioglass-loaded composite scaffolds. **Journal of Materials Chemistry B**, 3, 2015.

WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. **Bioactive Materials** 2, 224-247, 2017.

WATERS, M.; VORD, P. V.; DYKE, M. V. Keratin Biomaterials Augment Anti-inflammatory Macrophage Phenotype *in vitro*. **Acta Biomaterialia**, 2017.

WEI, X.; YANG, X.; HAN, Z. P.; QU, F.; SHAO, L.; SHI, Y. Mesenchymal Stem Cells: A New Trend For Cell Therapy. **Acta Pharmacologia Sinica**, 34, 747-754, 2013.

WIESE, A.; PAPE, H. C. Bone Defects Caused by High-Energy Injuries, Bone Loss, Infected Nonunions, and Nonunions. **Orthopedic Clinics of North America**, 41, 1-4, 2010.

WINKLER, T.; SASS, F. A.; DUDA, G. N.; BLEEK, K. S.; A Review of Biomaterials in Bone Defect Healing, Remaining Shortcomings and Future Opportunities for Bone Tissue Engineering. **Bone & Joint Research**, vol. 07, n. 03, 2018.

WOLF, R. B.; GOMES, R. C. T.; VERNA, C.; MAIORAL, G. C. C. C.; RAMPAZO, T. C.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES, J. M. J. Aspectos Moleculares dos Esteroides Sexuais sobre a Cartilagem e os Ossos. **Rev Assoc Med Bras**, 58, 4, 493-497, 2012.

YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T.; SUDA, T. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. **Endocrine Reviews**, 21, 4, 393-411, 2000.

YEN, B. L.; HUANG, H.; CHIEN, C. C.; JUI, H. Y.; KO, B. S.; YAO, M.; SHUN, C. T.; YEN, M. L.; LEE, M. C.; CHEN, Y. C. Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta. **Stem Cells**, 23, 3-9, 2005.

YOON, E.; DHAR, S.; CHUN, D. E.; GHARIBJANIAN, N. A.; EVANS, G. R. D. *In Vivo* Osteogenic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells/Poly Lactide-Co-Glycolic Acid Constructs for Bone Regeneration in a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Model. **Tissue Engineering**, vol. 03, n. 03, 2007.

ZAVAGLIA, C. A. C. SILVA, M. H. P. Feature Article: Biomaterials. **Reference Module in Material Science and Materials Engineering**, 1-5, 2016.

ZEUGOLIS, D. I.; KHEW, S. T.; YEW, E. S. Y.; EKAPUTRA, A. K.; TONG, Y. W.; YUNG, L. Y. L.; HUTMACHER, D. W.; SHEPPARD, C.; RAGHUNATH, M. Electro-Spinning of Pure Collagen Nano-Fibres- Just an Expensive Way to Make Gelatin?. **Biomaterials**, 29, 2293-2305, 2008.

ZHANG, C. XIE, B.; ZOU, Y.; ZHU, D.; LEI, L.; ZHAO, D.; NIOE, H. Zero-dimensional, one dimensional, two-dimensional and three-dimensional biomaterials for cell fate regulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 132, 33-56, 2018.

ZHANG, H.; MAO, X.; DU, Z.; JIANG, W.; HAN, X.; ZHAO, D.; HAN, D.; LI, Q. Three Dimensional Printed Macroporous Polylactic Acid/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Promoting Bone Formation in a Critical-Size Rat Calvarial Defect Model. **Science and Technology of Advanced Materials**, vol. 17, n. 01, 136-148, 2016.

ZHANG, K.; WANG, S.; ZHOU, C.; CHENG, L.; GAO, X.; XIE, X.; SUN, J.; WANG, H.; WIER, M. D.; REYNOLDS, M. A.; ZHANG, N.; BAI, Y.; XU, H. H. K. Advanced Smart Biomaterials and Constructs for Hard Tissue Engineering and Regeneration. **Bone Research**, 6, 1-14, 2018.

ZHANG, R.; LIU, Y.; YAN, K.; CHEN, L.; CHEN, X.; LI, P.; CHEN, F.; JIANG, X. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Experimental Traumatic Brain Injury. **Journal of Neuroinflammation**, 10:106, 2013.

ZHANG, Y.; LI, R.; WU, W.; QING, Y.; TANG, X.; YE, W.; ZHANG, Z.; QIN, Y. Adhesion and Proliferation of Osteoblast-Like Cells on Porous Polyetherimide Scaffolds. **Biomed Research International**, 1-7, 2018.

ZHOU, D.; CHEN, J.; LIU, B.; ZHANG, X.; LI, X.; XU, T. Bioinks for Jet-Based Bioprinting. **Bioprinting**, 16, 2019.

ZOCH, M. L.; CLEMENS, T. L.; RIDDLE, R. C. New Insights into the Biology of Osteocalcin. **Bone**, 82, 42-49, 2016.

ZHU, K. J.; HENDREN, R. W.; JENSEN, K.; PITT, C. G. Synthesis, Properties, and Biodegradation of Poly(1,3-trimethylene carbonate). **Macromolecules**, v. 24, n. 8, p. 1736-1740, 1991.