



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ISNAYRA KEROLAYNNE CARNEIRO PACHECO

***Scaffold* de polímero de óleo de mamona (*Ricinus communis L*)
associado a células-tronco de medula óssea para engenharia
do tecido ósseo**

Teresina

2019

ISNAYRA KEROLAYNNE CARNEIRO PACHECO

***Scaffold* de polímero de óleo de mamona (*Ricinus communis L*)
associado a células-tronco de medula óssea para engenharia
do tecido ósseo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Linha de Pesquisa: Estudo de materiais e técnicas odontológicas

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cristina Vasconcelos Fialho

Co-orientadores: Prof. Dr. José Milton Elias de Matos e Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto

Teresina

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

P116s Pacheco, Isnayra Kerolayne Carneiro.
Scaffold de polímero de óleo de mamona (*Ricinus communis L*) associado a células-tronco de medula óssea para engenharia do tecido ósseo / Isnayra Kerolayne Carneiro Pacheco. – 2019.
92 f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) –
Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
“Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Vasconcelos Fialho”.
“Coorientadores: Prof. Dr. José Milton Elias de Matos e Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto”.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Poliuretano.
3. Micro CT. 4. Regeneração óssea. 5. Biomateriais.
I. Título.

CDD 617.605



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ / PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 5 - Bairro Ininga, Teresina, Piauí, 64049-550
Telefones: (86) 3237 1517 E-mail: ppgo@ufpi.edu.br
www.posgraduacao.ufpi.br/odontologia

ATA DE APRESENTAÇÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA (PPGO) DA UFPI

Aos 22 dias do mês de fevereiro do ano de 2019, às 08:30h, em sessão pública realizada na sala de aula do Mestrado em Odontologia da UFPI, situada no bloco 5 do Campus Universitário "Ministro Petrônio Portella", a aluna **ISNAYRA KEROLAYNE CARNEIRO PACHÊCO**, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado Acadêmico, defendeu a dissertação intitulada **Scaffold de polímero de mamona (*Ricinus communis* L) associado a células-tronco de medula óssea para engenharia do tecido ósseo** como requisito curricular indispensável à integralização do curso.

O trabalho foi orientado pela Profa. Dra. Ana Cristina Vasconcelos Fialho que presidiu a banca examinadora composta pelos professores:

1. Prof. Dr. Antonio Luiz Martins Maia Filho (1º Avaliador)
2. Profa. Dra. Márcia dos Santos Rizzo (2ª Avaliadora)
3. Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes (suplente)

A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO da referida dissertação e a presidente da banca divulgou o resultado formalmente aos alunos e demais presentes à sessão solene. A ata foi assinada pela presidente e demais componentes da Banca Examinadora e pela aluna orientada.

Presidente da Banca Examinadora: Ana Cristina Vasconcelos Fialho
Primeiro Avaliador: Antonio Luiz Martins Maia Filho
Segundo Avaliador: Márcia dos Santos Rizzo
Suplente: _____
Aluna: Isnayra Kerolayne Carneiro Pacheco

Scaffold de polímero de óleo de mamona (*Ricinus communis L*) associado a células-tronco de medula óssea para engenharia do tecido ósseo

COMISSÃO EXAMINADORA

1) Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Vasconcelos Fialho (Orientadora)

Titulação: Doutora em Biotecnologia

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof. Dr. Livio Cesar Cunha Nunes

Titulação: Doutor em Ciências Farmacêuticas e Pós-doutorado em Tecnologia Farmacêutica

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho

Titulação: Doutorado em Engenharia Biomédica

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Suplente:

1) Prof^a Dr^a Márcia dos Santos Rizzo

Titulação: Doutora em Patologia Experimental e Comparada

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por sua presença constante em minha vida, dando-me forças para realizar sonhos, acalmado meu coração nos momentos de aflição e iluminando meu caminho.

Aos meus pais, Durval e Maria, por dedicarem sua vida a incentivar minha educação, por apoiarem minhas escolhas e serem meu maior exemplo.

Ao meu irmão, Gleydson, por compreender os momentos de dificuldade durante estes anos e estimular meu crescimento.

Ao meu namorado, Mágnun, pelas inúmeras vezes em que me mostrou que posso ser melhor, por entender minha ausência e incentivar a conclusão deste ciclo.

Dedico a vocês este trabalho e reitero meu amor e minha gratidão!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Ana Cristina Vasconcelos Fialho, agradeço imensamente pela orientação, pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho, pela paciência e palavras de força nos momentos em que tive mais dificuldade. Agradeço também por ir além da orientação, incentivando sempre meu crescimento e dando exemplo, diariamente, de dedicação. Espero um dia ter metade do brilhantismo de sua mente e da bondade de seu coração!

Aos meus co-orientadores, Prof. Dr. José Milton Elias de Matos e Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto, sou grata pelo imenso auxílio na orientação deste trabalho e oferecendo suporte para sua realização, além da troca de conhecimentos.

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, pela oportunidade para realizar o curso de mestrado.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, ao Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-tronco, ao Laboratório de Física dos Materiais e ao setor de Patologia do Hospital Universitário da UFPI, agradeço pelo acolhimento e espaço cedido para realização de etapas importantes deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Karla Rovaris, pela colaboração com a realização da microtomografia computadorizada.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia, pelo auxílio à minha formação.

Aos colegas da 7^a turma e demais alunos do PPGO, agradeço pela convivência harmoniosa, em especial a Tainá e Natiele, por tornarem a rotina ainda mais leve e por serem revisoras auxiliares, oferecendo sugestões e auxílio sempre que precisei.

Aos professores Lívio César Cunha Nunes, Antônio Luiz Martins Maia Filho e Márcia dos Santos Rizzo, sou grata pela ajuda na qualificação deste trabalho.

Aos alunos de doutorado e mestrado Fernando Reis, Camila Ernanda, Huanna Waleska, Elis Rosélia, Felipe Viana e Yago Gabriel, agradeço por compartilharem seus conhecimentos e pelo auxílio à execução desta pesquisa.

Aos alunos de PIBIC e TCC, Wanderson Melo, Rafaela Monice e Fabianne Lima, agradeço pelo imenso apoio e aprendizado.

Aos funcionários do NUPCelt, Hermínio, Janete, Fabiana, Leiliane, Flávia e Luciana, sou grata pelo convívio, por concederem auxílio e serem sempre solícitos.

Ao secretário do PPGO, Plínio, por toda ajuda, pelo esmero com que faz seu trabalho e por ser exemplo de dedicação e organização.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pela bolsa de estudos concedida.

A todos, muito obrigada!

LISTA DE IMAGENS

Figura 1: Delineamento experimental – Grupos SC e C na tíbia direita e SCCT na esquerda.

Figura 2: Espectros FTIR para MAG, HDI e PU (A) e curvas de termogravimetria (TG e DTG) do PU (B).

Figura 3: *Scaffold* de PU de mamona em imagem digital (A) e microscopia eletrônica de varredura (B) cujas barras de escala correspondem a 500 e 100 μm respectivamente.

Figura 4: Adesão e proliferação de CTMMO em *scaffold* de PU de mamona em secções histológicas e em microscópio eletrônico de varredura.

Figura 5: Análise de citotoxicidade do *scaffold* de PU de mamona com CTMMO representada em porcentagem de viabilidade celular após ensaio de MTT.

Figura 6: Espectros de Raman para osso preexistente e os grupos de tratamento após 4 (A) e 8 (B) semanas da cirurgia.

Figura 7: Imagens de microtomografia computadorizada com cortes axiais representando os três grupos após 4 e 8 semanas.

Figura 8: Medidas de volume de osso neoformado dos três grupos, após 4 e 8 semanas, obtidas com análise tridimensional com microtomografia computadorizada.

Figura 9: Secções histológicas coradas com HE e visualizadas em microscópio de luz dos grupos de tratamento após 4 e 8 semanas.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resumo revisão de literatura sobre *scaffolds* poliméricos e engenharia de tecido ósseo

Quadro 2: Resumo revisão de literatura sobre óleo de mamona e regeneração óssea

Quadro 3: Resumo revisão de literatura sobre células-tronco mesenquimais de medula óssea e regeneração óssea

LISTASDE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR: Refletância total atenuada

BCP: Fosfato de cálcio bifásico

BMP-2 / 7: Proteína morfogenética óssea – 2 / 7

CTM: Célula-tronco mesenquimal

CTMMO: Célula-tronco mesenquimal de medula óssea

DMSO: Dimetilsulfóxido

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

G/nHAp: Gelatina/ nanohidroxiapatita

HA: Hidroxiapatita

HDI: Hexametileno diisocianato

hDPSC: Células-tronco de polpa dentária humana

HE: Hematoxilina/Eosina

iPSC-MSC: Células-tronco mesenquimais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

Micro-CT: Microtomografia computadorizada

MAG: Monoacilglicerídeo

MTT: Brometo de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)

NEPAS: Núcleo de Estudo e Pesquisa com Animais Silvestres

NUPCELT: Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-tronco

PCL: Policaprolactona

PEG: Polietilenoglicol

PLA: Ácido polilático

PLGA: Ácido polilático co-glicólico

PU: Poliuretana

rhBMP-2: Proteína morfogenética óssea humana

TGA: Análise termogravimétrica

TG: Termogravimetria

DTG: Termogravimetria derivada

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 <i>Scaffolds</i> poliméricos e engenharia de tecido ósseo	15
1.2 Óleo de mamona e regeneração óssea	23
1.3 Células-tronco mesenquimais de medula óssea e regeneração óssea 29	
REFERÊNCIAS.....	37
2. ARTIGO	42
RESUMO.....	43
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
Produção do <i>scaffold</i>	46
Caracterização do <i>scaffold</i>	46
Testes de cultivo celular <i>in vitro</i>	48
Regeneração óssea <i>in vivo</i>	49
RESULTADOS	54
Caracterização do <i>scaffold</i>	54
Testes de cultivo celular <i>in vitro</i>	55
Regeneração óssea <i>in vivo</i>	56
DISCUSSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	62

FIGURAS.....	67
3. PRESS RELEASE	73
4. PRODUÇÃO INTELECTUAL MARÇO 2017 – FEVEREIRO 2019	75
5. ANEXOS	84

1. REVISÃO DE LITERATURA

A revisão foi realizada por consulta às bases de dados eletrônicos *PubMed-Medline*, *Science Directe* *Scielo* usando as seguintes chaves de busca: “*bone marrow stem cells*” AND “*bone regeneration*”; “*castor oil*” AND “*bone regeneration*”; “*polymeric scaffolds*” AND “*bone tissue engineering*”. Além disso, foi realizada busca direta nas referências dos artigos. Foram definidos como critérios de inclusão estudos que realizaram testes *in vivo*, com métodos de análise semelhantes a este estudo, publicados entre 2012 e 2018. Esta revisão apresenta os artigos em ordem cronológica conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí (Anexo I).

1.1 *Scaffolds* poliméricos e engenharia de tecido ósseo

Para avaliar a eficácia de *scaffolds* de quitosana e alginato no reparo de defeitos ósseos críticos, Florczyk *et al.*(2013) realizaram testes *in vitro* e *in vivo*. Os *scaffolds* foram semeados com células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato *in vitro* e, após avaliação com microscópio eletrônico de varredura (MEV), foi verificado que os *scaffold*s suportaram crescimento celular e promoveram morfologia esférica das células-tronco. Em calvárias de ratos (n=30), defeitos de 5mm de diâmetro foram confeccionados e divididos em 5 grupos conforme tratamento: defeito vazio (controle) (1), *scaffold* de quitosana e alginato (2), *scaffold* de quitosana e alginato com células-tronco de medula óssea de ratos (3), *scaffold* de quitosana e alginato com aspirado de medula óssea (4) e *scaffold* de quitosana e alginato com proteína morfogenética óssea – 2 (BMP-2) (5). Os resultados foram avaliados após 4 e 16 semanas com microtomografia computadorizada (micro-CT) e análise histológica. Foi demonstrado que, após 4 semanas, houve fechamento do defeito nos grupos 2, 3, 4 e 5, com diferença significativa entre os grupos 1 e 5; após 16 semanas, houve diferença significativa entre os grupos 3 e 5 comparados ao grupo 1. Os

autores sugeriram que o *scaffold* de quitosana e alginato pode ser utilizado em engenharia de tecido ósseo.

Yang *et al.* (2013) produziram *scaffold* de polietilenoglicol (PEG) com ligações dissulfeto e seu potencial citotóxico foi avaliado utilizando mioblastos de ratos em ensaio de MTT. Como resultado, o *scaffold* e seus produtos de degradação não mostraram toxicidade às células e o nível de viabilidade celular foi mantido acima de 90%. Além disso, os autores também avaliaram o uso do *scaffold* de PEG associado a BMP-2 de humanos (rhBMP-2) em defeitos segmentares no rádio de coelhos (n=60) com diâmetro de 5 a 6mm e comprimento de 15mm. Os animais foram divididos em quatro grupos, conforme tratamento adotado: A- defeito sem material implantado, significando auto reparo, B- *scaffold* puro, C- *scaffold* com rhBMP-2, D- *scaffold* com rhBMP-2 e peptídeo RGD. Após 2, 4, 8 e 12 semanas, as análises com micro-CT e histológica mostraram melhores resultados dos grupos C e D em quantidade de tecido ósseo formado e qualidade de trabeculado ósseo, sendo o grupo D o único que restabeleceu a cavidade medular do rádio.

Goh *et al.* (2014) tiveram como objetivo avaliar a regeneração óssea peri-implantar dental após utilização de *scaffold* de policaprolactona com fosfato tricálcio e enxerto ósseo autógeno particulado em defeitos críticos cirúrgicos na parede vestibular peri-implantar de macacos. Após análise histológica e morfométrica, foi perceptível melhor contorno ósseo alveolar no grupo que recebeu o *scaffold*, em relação ao osso particulado autógeno. Apesar da regeneração óssea do defeito estar localizada apenas em áreas adjacentes ao mesmo, houve regeneração óssea mínima no seu interior.

Para avaliar a capacidade da associação de nanofibras biodegradáveis à base de ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) com células-tronco mesenquimais humanas da polpa dentária de dentes decíduos na promoção da formação óssea, Acasigua *et al.* (2014) criaram defeitos críticos na calvária de ratos, com diâmetro de 8 mm e os dividiram em 4 grupos. No grupo I, os animais não tiveram defeito preenchido; no II, receberam *scaffolds* sem células; no III, *scaffolds* semeados com células e no IV, *scaffolds* semeados com células previamente mantidas em meio osteogênico. Histologicamente, foi observada maior neoformação óssea no grupo IV estatisticamente significativa quando comparada com os demais grupos. Não houve diferença estatística

entre os grupos I, II e III mas em todos os grupos ocorreu neoformação óssea na região periférica.

No estudo de Shimet *et al.* (2014), dois sistemas de entrega de rhBMP-2, com colágeno e gelatina, foram desenvolvidos em *scaffolds* de policaprolactona (PCL) com PLGA. Para avaliar a capacidade de formação de novo osso, 30 coelhos foram divididos em 3 grupos: (1) *scaffold* de PCL/PLGA, (2) *scaffold* de PCL/PLGA com gelatina e rhBMP-2 e (3) *scaffold* de PCL/PLGA com colágeno e rhBMP-2. Os *scaffolds* foram implantados em defeitos segmentares no rádio dos coelhos, com 20mm de comprimento e, após 4 e 8 semanas, os tratamentos foram avaliados com microtomografia e análise histológica. Os resultados indicaram que o grupo 3 apresentou maior formação óssea, com diferença significativa comparado aos demais grupos e o novo tecido ósseo apresentou-se mais maduro. Em geral, a liberação sustentada de rhBMP-2 com uso de colágeno dos *scaffolds* promoveu e acelerou notavelmente a formação de novo osso até 8 semanas após a cirurgia.

Tayton *et al.* (2014) avaliaram a capacidade de regeneração óssea de *scaffolds* produzidos a partir de ácido poli-lático (PLA) com hidroxiapatita associados ou não a células-tronco esqueléticas em defeitos de 8mm de diâmetro por 15 mm de profundidade, no côndilo femoral de ovinos. Após 13 semanas, tanto a análise histológica quanto a de microtomografia computadorizada evidenciaram neoformação óssea ao redor e dentro dos *scaffolds*, embora esta estivesse incompleta em todos os casos. Além disso, a adição de células-tronco esqueléticas foi menos efetiva na geração de volume e qualidade de neoformação óssea no local do defeito comparada ao grupo de *scaffold* sozinho.

Com o objetivo de investigar o efeito de *scaffold* de quitosana com cobre na regeneração óssea de defeitos críticos em calvária de ratos, D'Mello *et al.* (2015) confeccionaram defeitos com 5mm de diâmetro nos dois lados da sutura sagital. Três grupos de tratamento foram avaliados: (1) defeito vazio (n=3), (2) *scaffold* de quitosana (n=2) e (3) *scaffold* de quitosana e cobre (n=2) e, quatro semanas após o procedimento cirúrgico, foram avaliados com micro-CT e análise histológica. A fração volumétrica do volume tecidual total de interesse (Volume ósseo de interesse/ volume total) foi duas vezes e onze vezes maior em defeitos tratados com estruturas de quitosana embebidas em cobre,

quando comparadas aos grupos de *scaffold* de quitosana e controle de defeitos vazios, respectivamente, com diferença significativa entre os 3 grupos. A histologia confirmou as diferenças observadas na análise com micro-CT.

Com objetivo de determinar a capacidade de regeneração óssea de células-tronco mesenquimais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC-MSC) em *scaffold* de hidroxiapatita, colágeno e quitosana, Xie *et al.* (2016) utilizaram esta associação em defeitos ósseos na calvária de camundongos. Os outros grupos não receberam células e foram compostos por *scaffolds* de quitosana, hidroxiapatita, quitosana e hidroxiapatita, quitosana e colágeno. O grupo que combinou iPSC-MSC e *scaffolds* de hidroxiapatita, quitosana e colágeno demonstrou os melhores resultados na regeneração dos defeitos, enquanto o grupo de *scaffold* de quitosana apresentou a menor quantidade de tecido ósseo formado.

Caetano *et al* (2016) avaliaram o desempenho regenerativo de *scaffolds* de PCL aplicado em defeitos ósseos na calvária de ratos (5 mm) de três maneiras: *scaffold* sem células (1), *scaffold* com células-tronco de tecido adiposo humanas indiferenciadas (2) e *scaffold* com células-tronco de tecido adiposo humanas diferenciadas em osteoblastos *in vitro* (3). Como grupo controle foram utilizados defeitos ósseos vazios. Os animais (n=60) foram divididos igualmente entre os grupos e eutanasiados após 8 semanas do procedimento cirúrgico. A análise histológica observou pequena porção de osso novo no grupo controle, principalmente perto das bordas do defeito. Os grupos 1 e 3 apresentaram “ilhas” de formação óssea ao longo do defeito embutidas em tecido conjuntivo, que parecia estar dentro dos poros do *scaffold*. No grupo 2 maior parte do novo tecido correspondeu a áreas de osso novo próximo à borda, ao redor e ao longo do centro do defeito. A porcentagem de formação óssea do grupo 2 foi significativamente maior que os demais, o que levou os autores à sugestão de que células indiferenciadas, mesmo em caso de xenotransplante, contribuem fortemente para neoformação óssea.

Scaffolds de quitosana com gelatina e óxido de grafeno foram produzidos e testados *in vitro* e *in vivo* por Saravanan *et al.* (2017) para utilização em engenharia do tecido ósseo. O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado com ensaio de MTT utilizando células osteoprogenitoras de ratos e *scaffolds* de quitosana com gelatina e 0,25% de óxido de grafeno. Não houve

citotoxicidade significativa em concentrações do biomaterial até 30 mg/ml mas valor de densidade óptica diminuiu significativamente com valores superiores a 30 mg/ml. *In vivo*, realizaram defeitos ósseos de 3mm na tíbia de ratos, os quais foram divididos em três grupos: defeito sem preenchimento (1), com *scaffold* de quitosana e gelatina (2) e com *scaffold* de quitosana, gelatina e 0,25% de óxido de grafeno (3). Após 2 semanas análise histológica indicou formação de colágeno e osso novo com *scaffolds* do grupo 3 e os autores sugeriram potencial aplicação para engenharia de tecido ósseo.

Para investigar o efeito da combinação de fosfato de cálcio bifásico (BCP) e policaprolactona e células-tronco de polpa dental humana (hDPSC) na regeneração óssea, Wongsupa *et al.* (2017) utilizaram defeitos calvários (11 mm) bilaterais em coelhos. As calvárias foram alocadas aleatoriamente em quatro grupos: *scaffolds* PCL-BCP com células (n=3), *scaffold* PCL-BCP sozinho (n=3), partículas ósseas autógenas como controle positivo (n=3) e defeitos não preenchidos como controle negativo (n=3) e foram avaliadas com micro-CT e análise histológica. Em comparação com o *scaffold* sozinho, a regeneração óssea no grupo com *scaffold* e hDPSC combinados foi maior às 4 e 8 semanas. No entanto, a formação de tecido ósseo novo no grupo com osso autógeno, em todos os pontos de tempo foi superior aos grupos de *scaffolds* com e sem hDPSC.

Quadro 1: Resumo revisão de literatura sobre *scaffolds* poliméricos e engenharia de tecido ósseo

Biomaterial do <i>scaffold</i>	Uso de células-tronco ou moléculas bioativas	Estudo <i>in vivo</i>	Análise da neoformação óssea	Melhor resultado de neoformação óssea	Referência
Quitosana e alginato	Células-tronco de medula óssea e BMP-2	Calvária de ratos, defeitos 5 mm	Micro-CT e histologia	<i>Scaffold</i> + CTMO, <i>Scaffold</i> + BMP-2	Florczyk, 2013
Polietilenoglicol	rhBMP-2 e peptídeo RGD	Rádio de coelhos, defeitos segmentares diâmetro de 5mm e comprimento de 15mm	Micro-CT e histologia	<i>Scaffold</i> com rhBMP-2 e peptídeo RGD	Yang, 2013
Policaprolactona com fosfato tricálcio	-	Defeitos na parede vestibular peri-implantar de macacos	Histologia e morfometria	<i>Scaffold</i>	Goh, 2014
Ácido poli láctico-co-glicólico	Células-tronco mesenquimais da polpa dentária de dentes decíduos	Calvária de ratos, defeitos 8 mm	Histologia	<i>Scaffolds</i> semeados com células previamente mantidas em meio osteogênico	Acasigua, 2014
Policaprolactona +	rhBMP-2	Rádio de coelhos,	Micro-CT e histologia	<i>Scaffold</i> de	Shin, 2014

poli ácido láctico-co-glicólico com gelatina ou colágeno		defeitos segmentares de 20 mm		PCL/PLGA com colágeno e rhBMP-2	
Poli ácido láctico com hidroxiapatita	Células-tronco esqueléticas	Côndilo femoral de ovinos, defeitos de 8 mm	Micro-CT e histologia	<i>Scaffold</i> sem células	Tayton, 2014
Quitosana com ou sem cobre	-	Calvária de ratos, defeitos 5 mm	Micro-CT e histologia	Quitosana com cobre	D'Mello, 2015
Combinações de hidroxiapatita, colágeno e quitosana	Células-tronco mesenquimais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC-MSD)	Calvária de camundongos, defeitos 3mm	Micro-CT e histologia	iPSC-MSD e <i>scaffolds</i> de hidroxiapatita, quitosana e colágeno	Xie, 2016
Policaprolactona	Células-tronco de tecido adiposo humanas	Calvária de ratos, defeitos 5mm	Histologia	<i>Scaffold</i> com células-tronco de tecido adiposo humanas indiferenciadas	Caetano, 2017
Combinações de quitosana e gelatina com óxido de grafeno	-	Tíbia de ratos, defeitos 3mm	Histologia	<i>Scaffold</i> de quitosana, gelatina e 0,25% de óxido de grafeno	Saranavan, 2017

Fosfato de cálcio bifásico e policaprolactona	Células-tronco mesenquimais da polpa dentária	Calvária de coelhos, defeitos 11 mm	Micro-CT e histologia	Controle positivo, com osso autógeno	Wongsupa, 2017
---	---	-------------------------------------	-----------------------	--------------------------------------	----------------

1.2 Óleo de mamona e regeneração óssea

Polímero de mamona contendo nanopartículas de sílica foi utilizado por Nacer *et al.* (2012) como substituto ósseo e seu comportamento biológico foi avaliado. Para isso, vinte e sete ratos foram divididos em três grupos: G1 – polímero de óleo de mamona com carbonato de cálcio, G2 – polímero de óleo de mamona com carbonato de cálcio, dopado com 5% de nanopartículas de sílica, G3 – polímero de óleo de mamona com carbonato de cálcio, dopado com 10% de nanopartículas de sílica. Defeitos de 2mm foram confeccionados na diáfise femoral e avaliados histologicamente 15, 30 e 60 dias após o tratamento. A quantidade de osso neoformado foi maior em todos os períodos do G1, no entanto, houve maior quantidade de células osteogênicas no G3. Os autores concluíram que a associação de polímero de mamona a nanopartículas de sílica foi biocompatível e facilitou a neoformação óssea, promovendo a indução de células osteoprogenitoras.

Com objetivo de avaliar a citocompatibilidade e o efeito da regeneração óssea *in vivo* de *scaffold* de poliuretana produzida à base de óleo de mamona e 40% de hidroxiapatita, Du *et al.* (2014) realizaram testes *in vitro* e *in vivo*. Osteoblastos foram cultivados na superfície dos *scaffold*se, após 7 dias, a proliferação celular foi avaliada com ensaio de MTT e a superfície do *scaffold* foi observada com MEV. No estudo *in vivo*, um defeito ósseo de 3 mm foi criado no côndilo femoral de 16 ratos, que foram avaliados histologicamente após 4 e 8 semanas. No grupo 1, os animais foram tratados com *scaffold* de poliuretana de mamona e hidroxiapatita e no grupo dois, com o mesmo *scaffold* semeado com células osteoblásticas. No MEV, as células com morfologia osteoblástica típica formaram uma folha celular no *scaffold* e espalharam-se nos poros. O *scaffold* apresentou boa citocompatibilidade e forneceu microambiente 3D favorável para as células. *In vivo*, ambos os grupos resultaram em boa osteogênese.

Saran *et al.* (2015) tiveram como objetivo analisar a osteogênese após implantes de polímeros de mamona e realizaram análise histológica por microscopia de luz e tomografia computadorizada. Foram utilizados 44 coelhos

divididos entre grupo controle e grupo de tratamento com polímero de mamona e defeitos tibiais defeitos de 2mm de largura, que se estendiam da metáfise proximal à epífise distal foram realizados e avaliados após 90, 120 e 150 dias após a cirurgia. Aos 90 dias pós-cirurgia, houve deposição de tecido ósseo imaturo, que apresentou aumento da maturação ao longo do tempo (aos 120 e 150 dias pós-plantio), adquirindo aspecto lamelar. A avaliação com tomografia computadorizada confirmou a formação de osso nas regiões de contato entre a tibia e o polímero de mamona implantado.

Scaffolds porosos foram produzidos por Li *et al.* (2015) a partir de poliuretana de óleo de mamona e hidroxiapatita e, além das caracterizações física, química e mecânica, foram avaliadas citocompatibilidade *in vitro* e osteogênese *in vivo*. Para cultivo celular com *scaffold*, foram utilizadas células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos e, em seguida, a superfície do material foi avaliada com MEV e foi feito ensaio de MTT após 1, 4, 7 e 11 dias para avaliar a proliferação celular. Os resultados demonstraram que o *scaffold* possui excelente citocompatibilidade e é um modelo adequado para fixação, crescimento e proliferação de células-tronco mesenquimais (CTM) e diferenciação osteogênica. A viabilidade celular ou proliferação aumentou continuamente com o tempo de cultura e nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e o *scaffold* foi observada. Além disso, a osteogênese *in vivo* também foi avaliada utilizando seis coelhos que receberam o *scaffold* em defeitos de 7mm no côndilo femoral. Para análise com micro-CT, 2 animais foram escolhidos aleatoriamente e os demais foram analisados histologicamente. A quantidade de osso neoformado após 24 semanas é substancialmente maior que a quantidade de osso novo após 12 semanas. O novo osso regenerado apresentou matriz organizada e densa e se formou na interface de contato do *scaffold* e do osso preexistente, e na estrutura porosa do *scaffold* através do canal de poros interconectados

Nacer *et al.* (2015) tiveram como objetivo avaliar capacidade de osteogênese de polímero de mamona dopado com titanato de bário e sílica em ratos (n=24). Foram confeccionados defeitos de 2mm na diáfise femoral e, nos animais do grupo 1, foram utilizados *scaffolds* dopados com sílica e no grupo 2, *scaffolds* dopados com titanato de bário. Com análise histológica, no grupo 1, após 30 e 60 dias, foi observado aumento do crescimento ósseo ao redor e

dentro do *scaffold*, com abundante presença de tecido ósseo maduro e matriz colágena que precede a mineralização óssea. No grupo 2, após mesmo período, houve aumento da osteogênese na interface do *scaffold* com o tecido ósseo original, com crescimento ósseo para o interior do biomaterial, mas pequena neoformação óssea através do periosteio. Assim, os dois biomateriais foram considerados biocompatíveis e capazes de produzir neoformação óssea progressiva.

Hastes poliméricas de óleo de mamona dopadas com vidro bioativo e hidroxiapatita foram testadas por Santos *et al.* (2017) no canal medular do fêmur de camundongos para análise de sua aplicação como método de fixação de fraturas e reparo ósseo. Para isso, 28 animais foram divididos em três grupos: no grupo A foi implantado polímero de mamona dopado com vidro bioativo, no grupo B, polímero de mamona e no grupo C, polímero de mamona dopado com hidroxiapatita e vidro bioativo. A diáfise femoral de cada animal foi perfurada até o canal medular com broca de 0,7 mm de diâmetro e hastes de mesmo diâmetro, com 2 cm de comprimento foram introduzidas no canal medular. Após 15 e 60 dias, os animais foram eutanasiados e os segmentos foram analisados histologicamente. Apenas o grupo C, aos quinze dias, apresentou características de osteocondução e nenhum grupo indicou biodegradabilidade do material nos tempos estudados. No entanto, não houve reação inflamatória intensa e formação de cápsula fibrosa isolando os materiais em todos os grupos.

Du *et al.* (2018) avaliaram o efeito da adição de hidroxiapatita (HA) a *scaffolds* de poliuretanas de óleo de mamona na capacidade de osteogênese *in vivo*. Os autores realizaram testes de cultivo celular *in vitro* com *scaffolds* em diferentes concentrações de HA (0, 20 e 40%) cultivados com linhagem celular osteoblástica. Após 1, 4 e 7 dias de cultivo, a proliferação celular foi avaliada com o ensaio de MTT e, após 7 e 11 dias, a morfologia foi avaliada com MEV. Para o experimento com animais, 36 ratas foram divididas em 3 grupos: 1- poliuretana de mamona, 2- poliuretana de mamona com 20% de HA e 3- poliuretana de mamona com 40% de HA. Defeitos de 3mm foram realizados no côndilo femoral e, após 4, 8 e 12 semanas, os animais foram eutanasiados. Os resultados *in vitro* sugeriram que os *scaffolds* com HA podem oferecer amplo espaço para crescimento de células, e quanto mais carga de HA, melhor para a

biomineralização de células. As análises histológica e com microtomografia computadorizada indicaram que a formação de osso novo na estrutura porosa dos *scaffolds* com HA aumentou até certo ponto, este biomaterial apresentou boa capacidade de osteogênese e melhor regeneração óssea e a regeneração óssea no grupo com 40%de HA progrediu acentuadamente ao longo do período do estudo.

Quadro 2: Resumo revisão de literatura sobre óleo de mamona e regeneração óssea

Biomaterial do scaffold	Uso de células-tronco ou moléculas bioativas	Estudo <i>in vivo</i>	Análise da neoformação óssea	Melhor resultado de neoformação óssea	Referência
Polímero de mamona com carbonato de cálcio dopado com nanopartículas de sílica	-	Diáfise femoral de ratos, defeitos de 2 mm	Histologia	Polímero de mamona com carbonato de cálcio	Nacer, 2012
Poliuretana de óleo de mamona com 40% de hidroxiapatita	Osteoblastos	Côndilo femoral de ratos, defeitos 3 mm	Histologia	Resultados semelhantes dos <i>scaffolds</i> com e sem células	Du, 2014
Polímero de mamona	-	Tíbia de coelhos, defeitos de 2mm de largura, que estendia-se da metáfise proximal à epífise distal	Tomografia computadorizada e histologia	Polímero de mamona	Saran, 2014
Polímero de mamona com hidroxiapatita	-	Côndilo femoral de coelhos, defeitos 7 mm	Micro-CT e histologia	Apenas um grupo (com o material) foi testado e apresentou	Li, 2015

				melhor resultado após 24 semanas	
Polímero de mamona dopado com titanato de bário ou sílica	-	Diáfise femoral de ratos, defeitos 2 mm	Histologia	Os dois grupos estudados apresentaram resultados semelhantes	Nacer, 2015
Polímero de óleo de mamona dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita (hastes medulares)	-	Diáfise femoral de ratos	Histologia	Polímero de mamona dopado com hidroxiapatita e vidro bioativo, apenas no período inicial de avaliação	Santos, 2017
Polímero de mamona com hidroxiapatita (20 e 40%)	-	Côndilo femoral de ratas, 3 mm	Micro-CT e histologia	Polímero de mamona com 40% de hidroxiapatita	Du, 2018

1.3 Células-tronco mesenquimais de medula óssea e regeneração óssea

Koyanagi *et al.* (2013) avaliaram os efeitos da associação de fosfato β -tricálcio com células-tronco da medula óssea sobre o remodelamento de enxertos ósseos autólogos desvitalizados. Previamente à cirurgia, células-tronco mesenquimais de medula óssea cultivadas em meio contendo dexametasona foram suspensas em plasma sanguíneo autólogo e introduzidas em grânulos de fosfato β -tricálcio. Em cães, foi realizada ressecção da porção central da diáfise femoral dos membros direito e esquerdo, com 65 mm de comprimento, e imersão em solução salina normal esterilizada, mantida a 100 °C. A fim de promover a revascularização após o transplante, foram perfurados 20 túneis com 3 mm de diâmetro em intervalos regulares nos enxertos desvitalizados. O interior da amostra coletada do fêmur esquerdo foi preenchido com fosfato β -tricálcio e fixada de volta ao membro com placas de titânio. Procedimento semelhante foi realizado no membro direito, com diferença do preenchimento, realizado apenas com grânulos de fosfato β -tricálcio. Após 24 semanas, as análises com microtomografia computadorizada e histologia indicaram maior volume ósseo e de densidade mineral no grupo com células-tronco, o que levou os autores a sugerirem que o remodelamento ósseo progrediu em maior extensão para o grupo com células-tronco.

Para testar a hipótese de que *scaffolds* de hidroxiapatita (HA) com células semeadas melhoram a regeneração óssea, Rathbone *et al.* (2013) realizaram testes em coelhos. Defeito radial segmentar de 10 mm foi realizado em cada animale preenchido por *scaffolds*, correspondendo aos seguintes grupos: (1) *scaffolds* de HA, (2) *scaffolds* de HA com quantidade relativamente baixa de células derivadas de medula óssea, e (3) *scaffolds* de HA semeados com quantidade alta de células derivadas de medula óssea. Os defeitos foram avaliados com micro-CT na quarta e na oitava semana e com análise histológica na oitava. A utilização de células-tronco da medula óssea em *scaffolds* de HA em ambas as concentrações ofereceu pouco ou nenhum

benefício no aumento do volume ósseo regenerado, aumento do volume de calos ou aumento da taxa de formação de calo.

Um dos objetivos de Brennan *et al.* (2014) foi avaliar a regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico em ratos. Os defeitos foram confeccionados nas calvárias dos animais, com 4 mm de diâmetro e divididos em três grupos: defeito vazio (1), preenchido com fosfato de cálcio bifásico (2) e preenchido com fosfato de cálcio bifásico com células-tronco de medula óssea. Após 4 semanas, a análise histológica não indicou diferença estatística entre os grupos 2 e 3, apesar de haver tendência a maior formação óssea no grupo 3. Após 8 semanas, o percentual de formação óssea foi significativamente maior no grupo com *scaffold* e células-tronco. Defeitos vazios não atingiram fechamento completo e foram preenchidos com tecido fibroso, confirmando que o modelo era um defeito ósseo de tamanho crítico.

Al-Hezaimi *et al.* (2015) avaliaram a regeneração óssea guiada em defeitos calvários utilizando células-tronco mesenquimais de medula óssea e membrana de colágeno com e sem grânulos de fosfato tricálcio. Para isso, foram realizados defeitos de 4.6 mm em 9 ratos, divididos em três grupos: o grupo controle (1) teve defeito coberto com membrana de colágeno, o grupo 2 foi preenchido com células-tronco e coberto com membrana de colágeno e o grupo 3, preenchido com grânulos de tricálcio fosfato embebidos de células-tronco de medula óssea e cobertos por membrana de colágeno. Avaliações com micro-CT foram realizadas após 2, 4, 6, e 10 semanas e a avaliação histológica foi feita após 10 semanas. A taxa de neoformação óssea entre os grupos 2 e 3 foi de aproximadamente 2.8 e 4 vezes, respectivamente, superior à taxa de formação de osso novo no grupo controle. No entanto a taxa de formação de osso novo nos grupos 2 e 3 em 4-6 semanas, respectivamente, foi bastante semelhante.

Comparar o uso de células-tronco adultas da medula óssea diferenciadas *in vitro* em osteoblastos, associadas a fosfato de cálcio *versus* enxerto ósseo autógeno no processo de reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico foi o objetivo de Allais *et al.* (2015). Foram utilizados 36 ratos para confecção de defeitos ósseos bilaterais de 5 mm de diâmetro na calvária. No mesmo animal, os defeitos foram tratados com cimento de fosfato de cálcio (1), cimento de fosfato de cálcio com células-tronco diferenciadas em osteoblastos

(2) ou enxerto com osso autógeno (3) de um dos lados e, o lado oposto foi preenchido apenas com coágulo sanguíneo (controle). Após 30 e 60 dias, foram realizadas análises histológicas. Os grupos experimentais apresentaram maior formação óssea do que o grupo controle nos dois períodos, com diferença significativa. Comparando os grupos experimentais entre si, aos 30 dias, o grupo 3 apresentou maior formação óssea, com diferença significativa entre os demais e aos 60 dias, os grupos 2 e 3 apresentavam formação óssea semelhante entre si e diferentes estatisticamente do grupo 1.

A fim de avaliar o sucesso da regeneração óssea guiada utilizando células-tronco mesenquimais de medula óssea autógenas em aumento ósseo vertical, Namli *et al.* (2015) utilizaram modelo de calvária de coelho e os desfechos foram comparados com enxertos de osso autógeno e grupo controle com *scaffold* sozinho. Foram utilizados 20 coelhos e, na calvária de cada um, foram realizados defeitos de 8 mm de diâmetro, seguidos de 3 tratamentos. As células-tronco foram associadas a *scaffold* de fosfato β -tricálcio com colágeno, o osso autógeno foi coletado no momento da cirurgia a partir de outro sítio doador na calvária do próprio animal e os três grupos, incluindo *scaffold* sozinho (controle), foram cobertos por cúpulas de aço inoxidável, fixadas por mini parafusos para promover a regeneração óssea guiada. Após 12 semanas, as análises com histologia e microtomografia computadorizada mostraram que a quantidade e a densidade do osso neoformado foram significativamente menores nas amostras do grupo controle do que nos demais grupos e não houve diferença significativa entre o grupo com células-tronco e osso autógeno.

Metal de tântalo poroso coberto com carbono vítreo foi estudado por Wei *et al.* (2016), que tiveram como objetivo avaliar a possibilidade de aplicação deste biomaterial com células-tronco mesenquimais de medula óssea autólogas para regeneração óssea. Foram realizados testes *in vitro* com tântalo poroso e carbono vítreo separados, dentre eles ensaio de proliferação celular com MTT e análise de adesão e crescimento celular com MEV, ambos utilizando células-tronco mesenquimais de medula óssea. Os resultados da proliferação celular foram semelhantes para os dois materiais, houve ausência de efeito inibitório de proliferação das células, no entanto, as amostras de tântalo poroso apresentaram melhor adesão e crescimento celular do que o carbono vítreo. Para o estudo *in vivo*, foi utilizado modelo de defeito em

trocanter maior com 1.0 x 0.7 cm de tamanho em cães e os grupos estudados foram: *scaffold* sozinho, *scaffold* com células-tronco de medula óssea autólogas, defeito com células-tronco injetadas e defeito vazio (controle). Após 3, 6 e 12 semanas, os resultados foram avaliados histologicamente e a associação do biomaterial com células-tronco foi o grupo com melhores resultados de neoformação óssea.

O estudo de Kargozar *et al.* (2017) propôs a inserção de vetor plasmídeo codificador de BMP-7 em células-tronco mesenquimais de medula óssea, que foram semeados em *scaffolds* de nanocompósitos de vidro bioativo com gelatina. Os resultados dos ensaios de proliferação e adesão celular *in vitro* demonstraram que o biomaterial é biocompatível e suporta adesão e crescimento celular. As construções de engenharia de tecidos preparadas foram implantadas em modelo de rato para avaliar sua aplicação na reconstrução de defeitos ósseos calvários críticos bilaterais, de 7 mm de diâmetro. Os animais foram divididos em três grupos, cada um com 5 animais: *scaffold* sozinho (controle) (1), *scaffold* com células-tronco de medula óssea (2) e *scaffold* com células-tronco de medula óssea modificadas (3). Após 2, 4 e 12 semanas, foram realizadas análises histológicas, indicando que o grupo 3 formou maior volume ósseo em todos os tempos estudados, além de apresentar maior quantidade de osso maduro no centro do defeito após 12 semanas.

Rocha *et al.* (2017) avaliaram o efeito de tratamentos com esponja hemostática de colágeno hidrolisado associada a células-tronco mesenquimais medulares alógenas e plasma rico em plaquetas xenógeno no reparo de falhas ósseas de coelhas com osteoporose secundária por privação estrogênica e hipercortisolismo iatrogênico. O modelo adotado foi de quatro defeitos de 2 mm nas diáfises tibiais, dois em cada membro do animal, para que os 4 tratamentos estudados coexistissem em cada um. Os tratamentos estudados foram esponja hemostática de colágeno com células-tronco, esponja com plasma rico em plaquetas, esponja com associação de células-tronco e plasma rico em plaquetas e esponja sozinha como controle. Foram realizadas análises histopatológicas após 30 e 60 dias. Aos 30 dias, pouca formação óssea foi evidenciada nos grupos, sem diferenças entre eles mas, após 60 dias, o grupo

de esponja com células-tronco apresentou melhores resultados de neoformação óssea.

Para investigar o efeito da incorporação de vidro bioativo sobre atividade osteoindutora e angiogênica de *scaffolds* de gelatina/nanohidroxiapatita (G/nHAp) com e sem células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, Oryan *et al.* (2018) realizaram testes *in vitro* e em defeito ósseo radial segmentar de tamanho crítico (5 mm) em modelo de rato. O ensaio de citotoxicidade com MTT foi realizado após 1, 3 e 7 dias de cultivo celular com *scaffolds* adicionados ou não de vidro bioativo e não houve indício de citotoxicidade para os dois biomateriais. *In vivo*, os defeitos ósseos (15 defeitos por grupo) foram deixados vazios ou tratados com autoenxerto, G/nHAp e G/nHAp/vidro bioativo com e sem CTM nas áreas defeituosas. As análises com microtomografia foram feitas 12 semanas após a cirurgia e a porcentagem de formação de novo osso foi significativamente maior no autoenxerto e todos os grupos tratados em comparação com o grupo não tratado e foi significativamente superior no autoenxerto e nos grupos tratados com *scaffolds* semeados com células-tronco comparados aos demais grupos. Os achados histopatológicos do *scaffold* G/nHAp/vidro bioativo semeado com CTM estavam mais próximos do autoenxerto do que os outros grupos, após 4 e 12 semanas.

Quadro 3: Resumo revisão de literatura sobre células-tronco mesenquimais de medula óssea e regeneração óssea

Biomaterial do scaffold	Uso de células-tronco ou moléculas bioativas	Estudo <i>in vivo</i>	Análise da neoformação óssea	Melhor resultado de neoformação óssea	Referência
Fosfato β -tricálcio	Células-tronco de medula óssea	Fêmur de cães, defeitos segmentares de 65 mm	Micro-CT e histologia	<i>Scaffold</i> com células-tronco	Koyanagi, 2013
Hidroxiapatita	Células-tronco de medula óssea	Rádio de coelhos, defeitos segmentares de 10 mm	Micro-CT e histologia	<i>Scaffold</i> sem células-tronco	Rathbone, 2013
Fosfato de cálcio bifásico	Células-tronco de medula óssea	Calvária de ratos, 4 mm	Histologia	<i>Scaffold</i> com células-tronco após 8 semanas	Brennan, 2014
Grânulos de fosfato tricálcio e membrana de colágeno	Células-tronco de medula óssea	Calvária de ratos, defeitos 4.6 mm	Micro-CT e histologia	Células-tronco com membrana de colágeno e células-tronco com fosfato tricálcio e membrana	Al-Hezaimi, 2015

				de colágeno	
Cimento de fosfato de cálcio	Células-tronco de medula óssea diferenciadas em osteoblastos	Calvária de ratos, defeitos bilaterais de 5 mm	Histologia	Aos 30 dias: osso autógeno. Aos 60 dias: cimento de fosfato de cálcio + osteoblastos e osso autógeno.	Allais, 2015
Fosfato β -tricálcio com colágeno	Células-tronco de medula óssea	Calvária de coelhos, defeitos 8 mm	Micro-CT e histologia	<i>Scaffold</i> com células-tronco e osso autógeno	Namli, 2015
Metal de tântalo poroso associado a carbono vítreo	Células-tronco de medula óssea	Trocater maior de cães, defeitos de 1 x 0.7 cm	Histologia	<i>Scaffold</i> com células-tronco	Wei, 2016
Nanocompósito de vidro bioativo com gelatina	Células-tronco de medula óssea com e sem BMP-7	Calvária de ratos, defeitos de 7 mm	Histologia	<i>Scaffold</i> com células-tronco modificadas por BMP-7	Kargozar, 2017
Esponja hemostática de colágeno	Células-tronco de medula óssea com	Tíbia de coelhos, 2 defeitos de 2	Histologia	Esponja com células-tronco após 60 dias	Rocha, 2017

hidrolisado	plasma rico em plaquetas	mm por membro			
Gelatina/ nanohidroxiapatita com e sem vidro bioativo	Células-tronco de medula óssea	Rádio de ratos, defeitos de 5 mm	Micro-CT e histologia	G/nHAp/ vidro bioativo com células-tronco e osso autógeno	Oryan, 2018

REFERÊNCIAS

Acasigua GAX, Bernardi L, Braghirolli DI, Sant'Ana Filho M, Pranke P, Fossati AC. Nanofiber Scaffolds Support Bone Regeneration Associated with Pulp Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;9(4):330–7.

Al-hezaimi K, Ramalingam S, Al-askar M, Arrejaie AS, Nooh N, Jawad F, et al. Real-time-guided bone regeneration around standardized critical size calvarial defects using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and collagen membrane with and without using tricalcium phosphate : an in vivo micro- computed tomographic and histolog. *Int J Oral Sci.* 2015;8(1):7–15.

Allais M, Maurette PE, Morais NG, Da Costa TB, Fraga S, E Silva ED de O, et al. Comparative study of bone regeneration in critical cranial bone defects using bone marrow adult stem cells and. *Rev Española Cirugía Oral y Maxilofac (English Ed).* 2014;37(1):15–22.

Brennan MÁ, Renaud A, Amiaud J, Rojewski MT, Schrezenmeier H, Heymann D, et al. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(5):114.

Caetano G, Violante R, Beatriz A, Ana S, Batista A, Domingos M, et al. Cellularized versus decellularized scaffolds for bone regeneration. *Mater Lett.* 2016;182:318–22.

Dos Santos VT, Facco GG, Ortiz HC, Da Silva IS. Behavior study of the doped castor bean polymer rod with bioactive glass and hidroxyapatite in mice femur medullary canal. *Acta Cir Bras.* 2017;32(2):116–24.

Du J, Zou Q, Zuo Y, Li Y. Cytocompatibility and osteogenesis evaluation of HA / GCPU composite as scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Surg.* 2014;12(5):404–7.

Du J, Zuo Y, Lin L, Huang D, Niu L, Wei Y, et al. Effect of hydroxyapatite fillers on the mechanical properties and osteogenesis capacity of bio-based polyurethane composite scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;88(August):150–9.

Florczyk SJ, Leung M, Li Z, Huang JI, Hopper RA, Zhang M. Evaluation of three-dimensional porous chitosan – alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. *J Biomed Mater Res Part A.* 2013;101(10):2974–83.

Goh BT, Chanchareonsook N, Tideman H, Teoh SH, Kwok J, Chow F, et al. The use of a polycaprolactone – tricalcium phosphate scaffold for bone regeneration of tooth socket facial wall defects and simultaneous immediate dental implant placement in *Macaca fascicularis*. *J Biomed Mater Res part A.* 2014;102–A:1379–88.

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

Koyanagi H, Ae K, Maehara H, Yuasa M, Masaoka T, Yamada T, et al. Massive Bone Reconstruction with Heat-Treated Bone Graft Loaded Autologous Bone Marrow-Derived Stromal Cells and β -Tricalcium Phosphate Composites in Canine Models. *J Orthop Res.* 2013;31(8):1308–16.

Li L, Zuo Y, Zou Q, Yang B, Lin L, Li J, et al. Hierarchical Structure and Mechanical Improvement of an n-HA/GCO–PU Composite Scaffold for Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(40):22618–29.

Mello SD, Elangovan S, Hong L, Ross RD, Sumner DR, Salem AK, et al. Incorporation of copper into chitosan scaffolds promotes bone regeneration in rat calvarial defects. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2015;103:1044–9.

Nacer RS, Ré R, Poppi, Carvalho P de TC, Silva BAK, Odashiro AN, et al. Castor oil polyurethane containing silica nanoparticles as filling material of bone defect in rats. *Acta Cir Bras*. 2012;27(1):56–62.

Nacer RS, Silva BAK da, Poppi RR, Silva DKM, Cardoso VS, Delben JRJ, et al. Biocompatibility and osteogenesis of the castor bean polymer doped with silica (SiO₂) or barium titanate (BaTiO₃) nanoparticles. *Acta Cir Bras*. 2015;30(4):255–63.

Namli H, Erdogan Ö, Gönlüsen G, Kahraman OE, Aydin HM, Karabag S, et al. Vertical Bone Augmentation Using Bone Marrow–Derived Stem Cells: An In Vivo Study in the Rabbit Calvaria. *Implant Dent*. 2016;25(1):54–62.

Oryan A, Eslaminejad MB, Kamali A, Hosseini S, Moshiri A. Mesenchymal stem cells seeded onto tissue-engineered osteoinductive scaffolds enhance the healing process of critical-sized radial bone defects in rat. *Cell Tissue Res*. 2018;374(1):63–81.

Rathbone CR, Guda T, Singleton BM, Oh DS, Appleford MR, Ong JL, et al. Effect of cell-seeded hydroxyapatite scaffolds on rabbit radius bone regeneration. *J Biomed Mater Res Part A*. 2013;102(5):1458–66.

Rocha MA de C, Silva LMC, Oliveira WA, Bezerra D de O, Silva L dos S, Medeiros BL do NM, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells and xenogenic platelet rich

plasma , associated or not , in the repair of bone failures in rabbits with secondary osteoporosis. *Acta Cir Bras.* 2017;32(9):767–80.

Saran WR, Chierice GO, Da Silva RAB, De Queiroz AM, Paula-Silva FWG, Da Silva LAB. Castor oil polymer induces bone formation with high matrix metalloproteinase-2 expression. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(2):324–31

Saravanan S, Chawla A, Vairamani M, Sastry TP, Subramanian KS, Selvamurugan N. Scaffolds containing chitosan, gelatin and graphene oxide for bone tissue regeneration in vitro and in vivo. *Int J Biol Macromol.* 2017;104:1975–85.

Shim J, Kim SE, Park JY, Kundu J. Scaffolds with Long-Term Delivery for Enhanced Bone Regeneration in a Rabbit Diaphyseal Defect. *Tissue Eng Part A.* 2014;20:1980–92.

Tayton E, Purcell M, Aarvold A, Smith JO, Briscoe A, Kanczler JM, et al. A comparison of polymer and polymer-hydroxyapatite composite tissue engineered scaffolds for use in bone regeneration. An in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(8):2613–24.

Wei X, Zhao D, Wang B, Wang W, Kang K, Xie H, et al. Tantalum coating of porous carbon scaffold supplemented with autologous bone marrow stromal stem cells for bone regeneration in vitro and in vivo. *Exp Biol Med.* 2016;0:1–11.

Xie J, Peng C, Zhao Q, Wang X, Yuan H, Li K, et al. Osteogenic Differentiation and Bone Regeneration of the iPSC-MSCs Supported by a Biomimetic Nanofibrous Scaffold. *Acta Biomater.* 2016;29:365–79.

Yang F, Wang J, Hou J, Guo H, Liu C. Bone regeneration using cell-mediated responsive degradable PEG - based scaffolds incorporating with rhBMP-2. *Biomater*. 2013;34(5):1514–28.

2. ARTIGO

Formatado de acordo com as normas do periódico: “*Journal of Biomedical Materials Research Part A*” (Anexo II).

Título: *Scaffold* de polímero de óleo de mamona (*Ricinus communis L*) associada a células-tronco de medula óssea para engenharia do tecido ósseo.

Título curto: Polímero de mamona e engenharia de tecido ósseo

Autores:

Isnayra Kerolayne Carneiro Pacheco – Universidade Federal do Piauí –
Teresina (PI) – isnayrap@gmail.com

Ana Cristina Vasconcelos Fialho – Universidade Federal do Piauí – Teresina
(PI) – anacrisvf@gmail.com

Endereço para correspondência:

Profª Drª Ana Cristina Vasconcelos Fialho

Rua Prisco Medeiros, nº 1866

Edifício Maria Luiza, Apt. 703

Bairro Ininga

Teresina-PI, CEP: 64049-620

RESUMO

A engenharia de tecido ósseo surgiu como alternativa para terapias de regeneração óssea e apresenta como abordagem terapêutica promissora a associação de *scaffolds* a células-tronco. O objetivo deste trabalho foi produzir *scaffolds* de poliuretano de mamona, caracterizá-lo e avaliar sua capacidade de regeneração óssea *in vivo* após incorporação de células-tronco de medula óssea. A caracterização foi realizada com espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura e análise de porosidade. Em seguida, a capacidade do *scaffold* de suportar adesão e crescimento celular em sua superfície foi avaliada pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e histológica. A análise de citotoxicidade foi feita com ensaio de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio). Em tíbias de coelhos foram realizados defeitos ósseos e avaliada a capacidade de regeneração óssea dos grupos *scaffold*, *scaffold* com células-tronco e controle, após 4 e 8 semanas, com espectroscopia de Raman, microtomografia computadorizada e histomorfometria. O *scaffold* apresentou porosidade adequada, com tamanho médio de poro 209,5 μm , ausência de citotoxicidade e suporte para adesão e proliferação celular. No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados *in vivo* nos dois períodos de avaliação. São necessários mais estudos acerca dos fatores que influenciam a associação de *scaffolds* a células-tronco em engenharia de tecido ósseo.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, poliuretano, microCT, regeneração óssea, biomateriais.

INTRODUÇÃO

Engenharia de tecido ósseo é um campo interdisciplinar que envolve biotecnologia, engenharia, biologia e medicina e emergiu como alternativa promissora às terapias de substituição, auxiliando o processo de regeneração óssea (1,2). Sua proposta de tratamento supre desvantagens clínicas decorrentes do uso de enxertos ósseos autógenos e alógenos que, apesar de serem considerados primeira opção no tratamento de defeitos ósseos, ainda estão associados a necessidade de segunda cirurgia e indisponibilidade de tecido doador(1,3). A engenharia de tecidos utiliza biomateriais como arcabouços (*scaffold*), que fornecem estrutura e substrato para crescimento e desenvolvimento de tecidos, direcionando o crescimento e a diferenciação de células no *scaffold*, além da possibilidade de incorporação de fatores de crescimento que aceleram este processo(4).

Scaffolds são elementos-chave para esse campo de estudo e devem ser capazes de fornecer suporte para o processo de regeneração de ossos danificados(5,6). Biomateriais utilizados como *scaffolds* devem apresentar, além de biocompatibilidade, boa degradação, poros interconectados com tamanho que facilite adesão e proliferação celular, formação de matriz extracelular, crescimento de tecido e transporte de nutrientes e resíduos metabólicos(7,8). O desenvolvimento de *scaffolds* compatíveis com esses conceitos tem sido um dos maiores desafios para a engenharia de tecidos. Apesar da grande quantidade de estudos realizados nos últimos anos, muitos *scaffolds* ainda encontram-se distantes da aplicação clínica(5,8).

Polímeros são biomateriais bastante estudados para aplicação em engenharia de tecido ósseo e, dentre eles, se destaca o poliuretano (PU), que é formado por reação entre polioliol e diisocianato. Diferenciam-se dos demais substitutos ósseos,

pois possuem propriedades físico-químicas personalizáveis e propriedades mecânicas flexíveis(7,9).O óleo de mamona (*Ricinus communis L*), matéria prima disponível em abundância no território brasileiro e em países como China, Índia, França e EUA, pode ser utilizado como poliols na produção de PU de base biológica e apresenta como vantagens baixo custo, disponibilidade universal e fácil processabilidade(9,10).Estudos prévios relataram bons resultados de neoformação óssea do polímero de mamona(11–13), no entanto o mecanismo relacionado ao processo de formação óssea obtida com uso deste biomaterial ainda é pobremente compreendido (14).

Outro recurso que a engenharia de tecidos dispõe é o uso de células-tronco associadas ao *scaffold*. Células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea, até o momento, são a fonte celular mais utilizada para engenharia de tecido ósseo. A medula óssea contém CTM com excelente plasticidade, que contribuem para regeneração de tecidos mesenquimatosos como osso, cartilagem, músculo, ligamentos, tendões e tecido adiposo (15).

Para abordar esses pontos, este estudo focou, inicialmente, na busca do método de produção e da formulação de poliuretano de mamona que melhor se adequasse ao uso como *scaffold* e sua caracterização. Em seguida, avaliamos a capacidade de regeneração óssea do *scaffold* de poliuretano de mamona incorporado a células-tronco mesenquimais de medula óssea em modelos de defeitos ósseos na tíbia de coelhos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção do *scaffold*

Para obtenção do polímero utilizado como *scaffold*, o monoacilglicerídeo (MAG) do óleo de mamona foi produzido conforme metodologia de Reis *et al.*(16), demonstrada na Figura 1A. Em sistema com banho de aquecimento termostaticado e sob agitação constante, a temperatura foi estabilizada a 140°C e foram adicionados óleo de mamona^ae glicerol^b. Após 10 minutos de agitação, hidróxido de lítio^bfoi adicionado a 0,05% de massa do óleo. O sistema foi mantido em agitação por 5 horas para finalizar a reação.

Para síntese dos polímeros (poliuretanos), representada na Figura 1B, foi utilizado o mesmo sistema de agitação e aquecimento, com temperatura inicial de 80°C. Assim, foram adicionados monoacilglicerídeo (5g) e polietilenoglicol (PEG)^b(2,5g, com peso molecular 1500), e agitados até completa dissolução.Em seguida, hexametileno diisocianato (HDI) ^bfoi adicionado na razão molar MAG:HDI de 1:4,5 e o sistema permaneceu em agitação até finalização da polimerização. A formação do poliuretano foi detectada pelo aumento da viscosidade e formação de material esponjoso e a amostra permaneceu mais 12h sob temperatura inicial para cura completa do poliuretano.

Caracterização do *scaffold*

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Para confirmar a produção do poliuretano, espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em espectrofotômetro^ccom refletância total atenuada (ATR). Foi utilizado modo de transmitância e comprimento de onda entre 800 e 4000 cm^{-1} (13).

^a Mundo dos óleos, Brasil.

^b Sigma-aldrich, EUA.

^cVertex 70, Bruker, EUA.

Análise térmica

A técnica de análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada para avaliar a estabilidade e a decomposição térmica do polímero obtido em função da perda de massa. O analisador térmico^d foi padronizado com razão de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio, até temperatura de 600 °C e massa da amostra de aproximadamente 7mg.

Microscopia eletrônica de varredura

Para analisar as características da superfície dos *scaffolds*, incluindo tamanho médio dos poros e sua interconectividade, três amostras foram revestidas previamente com ouro, posicionadas em *stubs* de alumínio e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV)^e. O microscópio foi operado com voltagem de aceleração de 10 kV, no modo SE. O software de análise de imagem *ImageJ* foi utilizado para avaliar o tamanho dos poros nas imagens obtidas.

Análise de Porosidade

A porosidade total (P) dos *scaffolds* foi determinada utilizando método de deslocamento de líquido descrito anteriormente (17). Os *scaffolds*, com peso conhecido, foram imersos em etanol absoluto (EtOH)^f durante 48h. A quantidade total de EtOH que os *scaffolds* conseguiram absorver neste foi determinada aplicando a seguinte equação: $P(\%) = (W2 - W1 / d_{\text{etanol}} \times V_{\text{scaffold}}) \times 100$. W2 e W1 representam peso úmido (registrado após 48h de imersão) e peso seco (obtido previamente à imersão) dos *scaffolds*, respectivamente, o d_{etanol} representa a densidade do etanol e o V_{scaffold} é o volume do *scaffold* molhado, que foi determinado diretamente pela imersão. A análise foi feita em triplicata.

^dTGA-51H, Shimadzu, Japão

^e Quanta 250 FEG, FEI, EUA

^f Dinâmica Química Contemporânea LTDA., Brasil

Testes de cultivo celular *in vitro*

Cultivo celular

Células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMMO) foram obtidas do banco de células do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPCelt/UFPI). As células foram isoladas da medula óssea de coelhos clinicamente saudáveis, caracterizadas por Silva *et al.*(18) e utilizadas neste experimento na terceira e quarta passagens. Os *scaffolds* de poliuretano de mamona foram esterilizados em autoclave e cultivados com CTMMO em meio de cultivo α -MEM^g em estufa incubadora^h umidificada (37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade).

Morfologia e adesão celular

A morfologia e a adesão das CTMMO aos *scaffold* foram avaliadas por meio de processamento histológico e microscópio eletrônico de varredura. Previamente à análise, os *scaffolds* foram cortados em amostras (n=6) retangulares de 10 x 7 x 2 mm. Para cada poço, 10⁵ CTMMO foram ressuspensas em 1,5 ml de meio de cultivo e plaqueadas sobre amostra do *scaffold* em placa de 12 poços, que foi incubada durante 7 dias.

Após esse período, metade das amostras foram embebidas em meio de inclusãoⁱ, seccionadas em criostato^j com espessura de 5 μ m e coradas com hematoxilina e eosina. As amostras restantes foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, revestidas com ouro e analisadas em MEV.

^g Gibco, Fisher Scientific, England

^h TE-399, TECNAL, Brasil

ⁱ EasyPath, Erviegas, Brasil

^j HYRAX C 25, Zeiss, Alemanha

Análise de citotoxicidade

O ensaio de MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio^b foi realizado para avaliar a citotoxicidade do *scaffold* utilizando CTMMO. Uma amostra do *scaffold* foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO)^k para obtenção de solução-mãe de 80mg/ml. Esta solução foi diluída em meio α -MEM a fim de obter concentrações de 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 $\mu\text{g/mL}$, não ultrapassando a concentração de 0,2% de DMSO. Em seguida, 100 μL de meio α -MEM e 10^4 CTMMO foram adicionados por poço em placa de 96 poços e incubados por 24h para adesão celular. Após duas lavagens com meio de cultivo para remover células que não aderiram, as diferentes concentrações de solução-mãe foram testadas em triplicata, adicionadas de α -MEM em cada poço, com volume final de 100 μL e incubadas por 48h (19). Células em poços sem solução do *scaffold* serviram como controle negativo considerado 100% de viabilidade (20). Seguido ao período de incubação, 10 μL de MTT diluído em α -MEM a 5 mg/mL foram adicionados em cada poço e a placa foi novamente incubada por 5h. O sobrenadante foi descartado e 100 μL de DMSO foi adicionado para dissolver os cristais formazan formados, e estes foram medidos com densidade óptica de 550 nm em leitora de placa^l.

Regeneração óssea *in vivo*

Animais

Este estudo foi realizado conforme as normas do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa e os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPI sob parecer nº

^b Sigma-aldrich, EUA.

^k Mallinckrodt Chemicals, EUA.

^l Elx800, Biotek, EUA.

379/17. Foram utilizados oito coelhos machos, raça Nova Zelândia, clinicamente saudáveis, com maturação esquelética e peso médio de 2 kg. Os animais permaneceram alojados no Núcleo de Experimento e Pesquisa de Animais Silvestres (NEPAS), em gaiolas individuais e foram alimentados com ração específica para a espécie, associada a feno, leguminosas, tubérculos e água *ad libitum*.

Delineamento experimental

Para avaliar a capacidade de regeneração óssea do *scaffold* de poliuretano de mamona acelulare incorporado com CTMMO, defeitos de 2 mm de diâmetro (21) foram confeccionados nas diáfises das tíbias de cada animal. Assim, dois defeitos foram produzidos na tíbia direita e um na esquerda, para que os três grupos coexistissem em cada animal. A localização dos grupos foi padronizada de modo que, na tíbia direita, implantou-se *scaffold* acelular (grupo S) em defeito ósseo superior e o defeito inferior permaneceu vazio (controle negativo - grupo C); o defeito na tíbia esquerda foi preenchido com *scaffold* incorporado com CTMMO (10^6 CTMMO/*scaffold*) (grupo SCT) (Figura 2). Com amostras contendo oito defeitos por grupo, as análises foram realizadas após 4 e 8 semanas.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram sedados por associação de quetamina^m (30 mg/kg, IM) e midazolamⁿ (0,2 mg/kg, IM) e, em seguida, intubados e mantidos sob anestesia inalatória com isoflurano a 2%. A pele foi tricotomizada e incisada longitudinalmente para, após divulsão dos tecidos moles, produzir defeito ósseo unicortical com furadeira ortopédica^o sob irrigação constante com soro fisiológico a 0,9%.

^m Quetamina injetável 10g/100mL. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda, Brasil.

ⁿ Midazolam injetável 15mg (5mg/mL). Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda, Brasil.

^o Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Brasil

Na tíbia direita, padronizou-se a distância de 3 cm entre os defeitos. Logo após, as feridas cirúrgicas foram suturadas utilizando fio de nylon 5-0.

No período pós-operatório, os animais receberam terapia analgésica com morfina (2,5 mg/kg, IM), anti-inflamatória com flunixin meglumine^p (1 mg/Kg, IM) e antibioticoterapia com enrofloxacino^p (10 mg/kg, IM).

Os animais foram eutanasiados após 4e 8 semanas de tratamento, totalizando quatro amostras por grupo em cada período. A sedação foi realizada por associação de quetamina (30 mg/kg/IM) e midazolam (0,2 mg/kg/IM) e a eutanásia, por sobredosagem anestésica de tiopental sódico (60 mg/Kg/IV). As tíbias foram imediatamente removidas e fixadas em formol tamponado a 10%.

Espectroscopia de Raman

Microscópio Raman^q foi utilizado para obtenção de dados da composição molecular do tecido neoformado nos locais dos defeitos e comparados em relação ao espectro de osso preexistente. A potência e o comprimento de onda do laser foram de 50 mW e 785 nm, respectivamente, com tempo de aquisição espectral de 15s e as análises realizadas em três pontos diferentes da amostra. Todos os espectros foram coletados no mesmo dia para evitar desalinhamentos ópticos e mudanças na potência do laser e foram utilizadas duas amostras de cada grupo para análise. A presença dopico, em $\sim 958 \text{ cm}^{-1}$, foi avaliada nos espectros das amostras.

Análise com microtomografia computadorizada

O escaneamento dos defeitos ósseos nas tíbias, foi realizado utilizando microtomografia computadorizada^r com os seguintes parâmetros de aquisição: 80

kV,

^p Baytril, Bayer, Brasil

^q Senterra II, Bruker, EUA

^r μ CT-SkyScan 1172, Bruker, USA

120 μ mA, 14 μ m, 0,5 mm filtro Al, 0.3° parcela de giro, 3 frames e um giro de 180°. O software NRecon^r foi utilizado para a reconstrução dos volumes, com as seguintes correções de artefato: 5 de redução de artefatos em anéis, 2 de suavização e 20% de redução de fenômeno de endurecimento do feixe. As imagens reconstruídas foram reorientadas no software Dataviewer^r, para a visualização em posição padrão (axial) de todos os defeitos. Para análise dos parâmetros de qualidade óssea, o software CTAn^r foi utilizado e a região de interesse analisada consistiu em estrutura com formato de disco, com 2 mm de diâmetro e 100 cortes axiais de altura. Para a análise da região de formação óssea ectópica, o mesmo software foi utilizado e a porção de osso formado além da cortical externa foi quantificada por meio de seleção manual da área de interesse, respeitando a superfície da tíbia. O software CTVox^r foi utilizado para gerar e editar as imagens tridimensionais.

Análise histológica

Após fixação, as amostras foram descalcificadas com EDTA 10% e cortadas em duas, transversalmente, no centro do defeito. Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (50, 70, 90 e 100%), incluídos em parafina e seccionados com 4 μ m de espessura. Em seguida, foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica.

Análise estatística

Os dados quantitativos foram analisados quanto à normalidade de distribuição utilizando o teste Shapiro-Wilk e apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$). As médias foram comparadas usando análise de variância de um fator (One-way ANOVA) seguida de teste de Tukey para avaliação *post hoc*, considerando nível de significância de $p < 0,05$ para todas as medidas. Todos os dados foram apresentados

^r μ CT-SkyScan 1172, Bruker, USA

como média \pm desvio padrão (DP) e foram analisados utilizando Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 20.0.

RESULTADOS

Caracterização do *scaffold*

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 3 apresenta os espectros de FTIR do *scaffold* de poliuretano de mamona e de seus componentes. O polímero mostra banda de absorção a 3315 cm^{-1} , que corresponde à vibração de alongamento NH de uretano e confirma a presença de grupos uretanos. Os picos a 2941 e 2864 cm^{-1} foram atribuídos às vibrações assimétrica e simétrica dos grupos CH_3 , respectivamente. O estiramento das carbonilas (C=O) das ligações de uretano aparece em 1681 cm^{-1} , deslocadas em relação à sua posição no MG (1747 cm^{-1}) devido à atração do nitrogênio presente nas ligações de uretano do PU. Em 1541 cm^{-1} , o pico de absorção corresponde à amida II (ligações NH+ estiramento de C-N), em 1261 cm^{-1} a CNH e em 1128 cm^{-1} refere-se à ligação C–O–C. A banda característica do grupo NCO livre residual, anteriormente encontrada no espectro do HDI em 2260 cm^{-1} , não foi encontrada no espectro do PU.

Análise térmica

As curvas de TG e DTG estão apresentadas na Figura 3B. A termogravimetria mostrou três estágios de decomposição distintos. O primeiro com perda mássica de 16%, próximo a 180 °C , está associado à decomposição da ligação uretano que ocorre pela dissociação de PU em isocianatos e álcool, à formação de aminas primárias e grupos olefínicos terminais nas cadeias de poliéster, e consequente formação de aminas secundárias e CO_2 . O segundo ocorre por volta de 280 °C e refere-se à degradação de partes flexíveis da cadeia, como dissociação da ligação éster através de cisão da cadeia, desidrogenação e policondensação de grupos

alquilo presentes no MG, com perda de massa de 20%. No último estágio da decomposição, em torno de 380 °C, ocorre 57% de perda referente à degradação do segmento flexível do PU e essa fase também pode ser associada à decomposição térmica de ligações carbodiimida, formando CO₂ e carvão, no estado sólido, que permanece na forma de resíduo. A curva DTG mostrou três estágios de decomposição em 225, 280 e 460 °C e mostra também um quarto evento endotérmico com temperatura abaixo de 100 °C, referente à perda de solvente ou água.

Microscopia eletrônica de varredura e análise de porosidade

O *scaffold* de poliuretano de mamona e as micrografias obtidas com MEVs são apresentados na Figura 4. A estrutura altamente porosa dos *scaffolds* apresentou poros interconectados, com morfologia irregular, distribuição não uniforme e tamanho médio de 209,5 ± 91 µm. A porosidade média obtida pelo teste de deslocamento de líquidos no *scaffold* foi de 72,6% ± 9,3.

Testes de cultivo celular *in vitro*

Morfologia e adesão celular

A análise histológica dos *scaffolds* cultivados com CTMMO (Figura 5A) evidenciou presença de células com morfologia fusiforme, capazes de fixar-se e se distribuir no interior dos poros do poliuretano. As micrografias obtidas com MEV (Figura 5B-C) confirmaram a capacidade de distribuição e adesão das células na superfície do *scaffold* e interior dos poros. As CTMMO apresentaram-se em grupos, formando colônias e fixadas à superfície do poliuretano, com prolongamentos citoplasmáticos e formato fibroblastóide.

Análise de citotoxicidade

A Figura 6 apresenta os resultados do ensaio de MTT demonstrados pela conversão de absorbância em porcentagem de viabilidade celular nas diferentes concentrações de solução-mãe do *scaffold* de poliuretano de mamona após 48h. O *scaffold* causou redução da viabilidade das CTMMO em suas concentrações mais altas (1600 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). No entanto, não houve diferença significativa ($p= 0,19$) entre a viabilidade celular destas concentrações e o controle negativo pois, apesar da redução, os valores ainda foram mantidos acima de 90%.

Regeneração óssea *in vivo*

Os espectros de Raman obtidos dos defeitos ósseos, 4 (A) e 8 (B) semanas, após a cirurgia, estão representados na Figura 7. O pico em 958cm^{-1} , que sugere a presença de PO_4^{3-} , foi encontrado em todos os grupos após 4 semanas, com menor intensidade em relação ao osso preexistente. Com intensidade aumentada e mais próxima do osso preexistente, o pico em 958cm^{-1} manteve-se nos três grupos, após 8 semanas.

Imagens de micro-CT representativas para 4 e 8 semanas de neoformação óssea após a cirurgia de cada grupo são apresentadas na Figura 8. Como esperado, novo osso foi formado, principalmente das bordas para o centro do defeito em todos os grupos, mas, nos grupos S e SCT também houve tendência de neoformação óssea no centro do defeito. Além disso, houve formação óssea ectópica, adjacente à região do defeito, ocasionada pelo deslocamento de parte do biomaterial e a análise de volume de novo osso considerou as duas regiões. Após 8 semanas, o tecido ósseo neoformado apresentou-se com maior densidade em todos os grupos,

indicando maior maturação, e em maior quantidade quando comparado ao resultado após 4 semanas, conforme mostra a Figura 9. Em ambos os períodos, o grupo S apresentou maior volume ósseo, seguido dos grupos SCT e C, mas sem diferença estatística ($p=0,6$ para 4 semanas e $p=0,1$ para 8 semanas).

Imagens de cortes histológicos estão representadas na Figura 10. Após 4 semanas, no grupo S, este tecido é altamente organizado e permeado por tecido ósseo neoformado imaturo e tecido conectivo, apresentando muitos osteócitos dispersos pela matriz e com presença de *scaffold* em alguns espécimes. No grupo SCT observou-se uma matriz osteóide mais organizada, porém ainda imatura e heterogênea, com grande número de osteócitos aprisionados em lacunas, com áreas de aspecto trabecular (esponjoso) e tecido colagenoso pouco organizado. Ainda foi possível observar grande número de osteoblastos em plena atividade contornando essa matriz. O grupo C apresentou infiltrado inflamatório mononuclear discreto e presença na porção mais central de alguns defeitos de tecido ósseo lacunar, com osteócitos dispersos desordenadamente em matriz ainda imatura. Após 8 semanas, o tecido ósseo preenchia quase todo o defeito do grupo S, com áreas de mineralização caracterizando a deposição de cálcio, osteócitos aprisionados na matriz e matriz osteóide ainda imatura, mas começando a apresentar-se mais homogênea. O grupo SCT apresentava fragmentos do *scaffold* ainda não totalmente reabsorvido, o qual possuía matriz óssea mais madura, organizada e de aspecto lamelar, com menor número de osteócitos presos em lacunas, além de osteoblastos ainda em atividade. Células inflamatórias já estavam ausentes no grupo C e a matriz óssea imatura em substituição ao tecido conjuntivo e dirigindo-se ao centro do defeito.

DISCUSSÃO

Diversos métodos têm sido utilizados para produção de *scaffolds* poliméricos, incluindo técnicas de impressão 3D, eletrofição, evaporação de solventes e lixiviação de partículas, os quais garantem melhor controle sobre propriedades estruturais e mecânicas dos biomateriais(6). No entanto, o custo para sua produção costuma ser mais elevado e, neste estudo, buscamos produzir poliuretano a partir de reação simples de polimerização, utilizando polioli à base de óleo de mamona. A síntese de poliuretano possui versatilidade devido à alta reatividade do grupo isocianato com hidroxila de compostos, como o óleo de mamona utilizado para produção do monoacilglicerídeo (22).

A composição química demonstrada por FTIR do poliuretano confirmou a síntese devido à presença da ligação N-H, característica de uretanos, e à formação de grupos carbonilas, causada pela interação entre os grupos NCO, do HDI, e OH, do MG de óleo de mamona (23). A ausência do grupo NCO livre residual no espectro do PU permitiu concluir que houve reação total entre o monoacilglicerídeo e o diisocianato durante a síntese (24). A análise térmica mostrou que o primeiro estágio de perda de massa do *scaffold* produzido foi a 180 °C, importante para o processo de esterilização com calor úmido, realizado em autoclave a 121°C. A possibilidade de esterilização sem prejuízo às características físicas e de manuseio é um dos principais fatores para bom desempenho do *scaffold*, além de permitir ambiente estéril para cultivo celular (6).

Especificamente para o reparo de defeitos ósseos, *scaffolds* com estrutura altamente porosa garantem resultados mais promissores, pois facilitam penetração de novos vasos (angiogênese), difusão de nutrientes e conteúdos metabólicos e integração entre *scaffold* e tecido circundante(25,26). Considerando que o osso

esponjoso humano possui porosidade entre 30 e 90%(6), o *scaffold* de mamona produzido em nosso estudo é considerado adequado para regeneração óssea pois apresentou 72,6% de porosidade interna. Este resultado aproxima-se de Wang *et al.*(23), que produziu *scaffold* com óleo de mamona e obteve 78% de porosidade. Além disso, o valor médio de tamanho de poro encontrado foi de 209,5 μm , valor que difere de Du *et al.*(27), que produziu *scaffold* de polímero de mamona com poros de 500 μm , mas corrobora com a descrição de estudos anteriores, que descrevem tamanho de poro ideal para crescimento ósseo dentro de biomateriais de 200 a 350 μm (6,28) e valor mínimo de 100 μm para difusão de nutrientes e oxigênio para sobrevivência celular(29).

A associação entre *scaffold* e células-tronco para a regeneração óssea tem sido descrita extensivamente em estudos para engenharia de tecidos em busca de melhor compreensão das interações moleculares entre diferentes *scaffolds*, células-tronco e o microambiente envolvido no reparo de lesões (30). Além disso, a capacidade de suportar adesão celular e fornecer suporte temporário com condições suficientes para manter sua estrutura é considerada característica fundamental para bom desempenho do *scaffold* (31). Neste estudo, por meio de análise histológica e MEV, demonstrou-se que o *scaffold* de poliuretano de mamona foi eficaz como matriz para crescimento de células-tronco mesenquimais de medula óssea pois estas apresentaram boa ancoragem e proliferação satisfatória quando cultivadas com este biomaterial. Esse processo é ocasionado pela interação de sinais no microambiente celular, tais como interação entre células, entre células e a matriz extracelular e entre células e o biomaterial(32). A boa interação com o biomaterial pode ser justificada pelas características de porosidade apresentadas por este poliuretano, pois migração, proliferação e nutrição celular são favorecidas por esta

propriedade. Estudo anterior (33), realizado com polímero de mamona em formato granular também encontrou boas características de adesão e proliferação de CTMMO à superfície do biomaterial, apesar da ausência de poros na superfície do biomaterial. No entanto, os autores atribuíram o resultado à presença de carbonato de cálcio na composição do polímero.

A ausência de toxicidade às células também deve ser característica de *scaffolds* destinados ao reparo de tecido danificado, por isso a citotoxicidade do *scaffold* produzido às CTMMO foi avaliada. O ensaio de MTT avalia a atividade metabólica celular e, apesar da redução de viabilidade nas maiores concentrações, os valores mantiveram-se acima de 90%, não considerado citotóxico e próximo a valores encontrados na literatura para poliuretano de mamona(34).

Após caracterizar e demonstrar que o *scaffold* de poliuretano de mamona suporta proliferação e adesão de células e não apresenta citotoxicidade, nosso objetivo secundário foi avaliar a eficácia dos *scaffolds* semeados com CTMMO em defeitos tibiais em coelhos. Nossa hipótese, baseada no resultado de diversos estudos anteriores(35–37), era de que a incorporação das células ao *scaffold* teria melhor efeito na regeneração do defeito ósseo. No entanto, os resultados das análises por microtomografia e histológica demonstraram que a adição de CTMMO ao *scaffold* de poliuretano de mamona não aumentou a formação óssea. Apesar do grande número de estudos que diferem deste resultado, Rai *et al.*(32)e Rathbone *et al.*(38) também encontraram excelentes resultados de *scaffolds* com CTMMO *in vitro*, mas o transplante destas células indiferenciadas *in vivo* não apresentou bons resultados. Isto fortalece a ideia da influência de fatores externos no destino das células(39). Entre eles, foi demonstrado que a variação do nível de sobrevivência celular(32), a falta de fatores de diferenciação apropriados (38), a dependência

crítica da expressão de fatores tróficos e a presença de mediadores pró-inflamatórios(40) podem limitar ou suspender o processo de regeneração. Além disso, existem controvérsias quanto ao estado de diferenciação celular para reparo de defeitos ósseos, mas nossos resultados concordam com a provável influência deste no potencial regenerativo.

Como sugestões de melhorias para trabalhos futuros com este *scaffold* de poliuretano de mamona propomos, primeiramente, a busca por alternativas que auxiliem sua manutenção estável dentro do defeito. Além disso, sugerimos rastreamento das células-tronco utilizadas para investigar sua sobrevivência quando utilizadas *in vivo*, podendo justificar melhor o resultado encontrado.

O *scaffold* de poliuretano de mamona apresentou resultados satisfatórios de caracterização e suporte para adesão e proliferação celular, além da ausência de citotoxicidade. A incorporação de células-tronco mesenquimais de medula óssea ao *scaffold* foi capaz de reparar defeitos ósseos na tíbia de coelhos, mas sem diferenças estatísticas comparado ao *scaffold* acelular e ao grupo controle. Estudos futuros devem direcionar melhor entendimento dos fatores que influenciam o destino e a ação das células-tronco associadas a este biomaterial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal do Piauí pelo suporte para desenvolvimento do estudo, ao LIMAV e ao NUPCelt por auxílio durante a execução e à Universidade Federal da Paraíba pela assistência com microtomografia.

REFERÊNCIAS

1. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363–408.
2. Shadjou N, Hasanzadeh M. Review Article Graphene and its nanostructure derivatives for use in bone tissue engineering : Recent advances. 2016;1250–75.
3. Wongsupa N, Nuntanaranont T, Kamolmattayakul S, Thuaksuban N. Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem cells/poly(epsilon-caprolactone)-biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects. [Internet]. *J Mater Sci: Mater Med.* 2017;28:77.
4. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cells Mater.* 2013;26:120–32.
5. Causa F, Netti PA, Ambrosio L. A multi-functional scaffold for tissue regeneration: The need to engineer a tissue analogue. *Biomaterials.* 2007;28(34):5093–9.
6. Susmita Bose, Mangal Roy and AB. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012;30(10):546–54.
7. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25:2445–61.
8. Chen Z, Song Y, Zhang J, Liu W, Cui J, Li H, et al. Laminated electrospun nHA/PHB-composite scaffolds mimicking bone extracellular matrix for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 2017;72:341–51.
9. Du J, Zuo Y, Lin L, Huang D, Niu L, Wei Y, et al. Effect of hydroxyapatite fillers on the mechanical properties and osteogenesis capacity of bio-based polyurethane composite scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;88:150–9.
10. Dos Santos VT, Facco GG, Ortiz HC, Da Silva IS. Behavior study of the doped

- castor bean polymer rod with bioactive glass and hidroxyapatite in mice femur medullary canal. *Acta Cir Bras.* 2017;32(2):116–24.
11. Pereira-Júnior OCM, Rahal SC, Iamaguti P, Felisbino LS, Pavan TP, Vulcano LC. Comparison between polyurethanes containing castor oil (Soft Segment) and cancellous bone autograft in the treatment of segmental bone defect induced in rabbits. *J Biomater Appl.* 2007;21(3):283–97.
 12. Nacer RS, Ré R, Poppi, Carvalho P de TC, Silva BAK, Odashiro AN, et al. Castor oil polyurethane containing silica nanoparticles as filling material of bone defect in rats. *Acta Cir Bras.* 2012;27(1):56–62.
 13. Li L, Zuo Y, Zou Q, Yang B, Lin L, Li J, et al. Hierarchical Structure and Mechanical Improvement of an n-HA/GCO–PU Composite Scaffold for Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(40):22618–29.
 14. Saran WR, Chierice GO, Da Silva RAB, De Queiroz AM, Paula-Silva FWG, Da Silva LAB. Castor oil polymer induces bone formation with high matrix metalloproteinase-2 expression. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(2):324–31.
 15. Seong JM, Kim B-C, Park J-H, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang Y-S. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2010;5(6):062001.
 16. Reis FS, De Matos JME, Fialho ACV. Síntese e caracterização de polímeros derivado do óleo da mamona e do buriti com potencial aplicação na área médico- odontológica. 2016.
 17. Torres AL, Gaspar VM, Serra IR, Diogo GS, Fradique R, Silva AP, et al. Bioactive polymeric – ceramic hybrid 3D scaffold for application in bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C.* 2013;33(7):4460–9.
 18. Silva MDA, Leite YK de C, De Carvalho CES, Feitosa MLT, Alves MM de M, Carvalho FA de A, et al. Behavior and biocompatibility of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells with bacterial cellulose membrane. *PeerJ.* 2018;6:1–22.
 19. Saravanan S, Chawla A, Vairamani M, Sastry TP, Subramanian KS,

- Selvamurugan N. Scaffolds containing chitosan , gelatin and graphene oxide for bone tissue regeneration in vitro and in vivo. *Int J Biol Macromol.* 2017;104:1975–85.
20. Carvalho CES, Sobrinho-junior EPC, Brito LM, Nicolau LAD, Carvalho TP, Moura AKS, et al. Experimental Parasitology Anti- Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl .) Fr . All .: Composition , cytotoxicity and possible mechanisms of action. *Exp Parasitol.* 2017;175:59–67.
 21. Rocha MA de C, Silva LMC, Oliveira WA, Bezerra D de O, Silva L dos S, Medeiros BL do NM, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells and xenogenic platelet rich plasma , associated or not , in the repair of bone failures in rabbits with secondary osteoporosis. *Acta Cir Bras.* 2017;32(9):767–80.
 22. Zapata-Catzin GA, Bonilla-Hernández M, Vargas-Coronado RF, Cervantes-Uc JM, Vázquez-Torres H, Hernandez-Baltazar E, et al. Effect of the rigid segment content on the properties of segmented polyurethanes conjugated with atorvastatin as chain extender. *J Mater Sci Mater Med.* 2018;29(11):161.
 23. Wang L, Li Y, Zuo Y, Zhang L, Zou Q, Cheng L. Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration. *Biomed Mater.* 2009;4(2):025003.
 24. Chattopadhyay DK, Raju KVSÑ. Structural engineering of polyurethane coatings for high performance applications. *Prog Polym Sci.* 2007;32:352–418.
 25. Ge M, Ge K, Gao F, Yan W, Liu H, Xue L, et al. Biomimetic mineralized strontium-doped hydroxyapatite on porous poly (l -lactic acid) scaffolds for bone defect repair. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:1707–21.
 26. Casagrande S, Tiribuzi R, Cassetti E, Selmin F, Gervasi GL, Barberini L, et al. Biodegradable composite porous poly(dl-lactide-co-glycolide) scaffold supports mesenchymal stem cell differentiation and calcium phosphate deposition. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2017;21(0):1–11.
 27. Du J, Zou Q, Zuo Y, Li Y. Cytocompatibility and osteogenesis evaluation of HA / GPCU composite as scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Surg.* 2014;12(5):404–7.

28. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. Biomaterials The effect of mean pore size on cell attachment , proliferation and migration in collagen – glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(3):461–6.
29. Rouwkema J, Rivron NC, Blitterswijk CA Van. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2008;26(8):434–41.
30. Ceccarelli G, Presta R, Benedetti L, Cusella De Angelis MG, Lupi SM, Rodriguez Y Baena R. Emerging Perspectives in Scaffold for Tissue Engineering in Oral Surgery. *Stem Cells Int*. 2017;2017.
31. Bagher Z, Ebrahimi-barough S, Azami M, Safa M, Joghataei MT. Cellular activity of Wharton ' s Jelly-derived mesenchymal stem cells on electrospun fibrous and solvent-cast film scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2016;104(1):218–26.
32. Rai B, Lin JL, Lim ZXH, Guldberg RE, Hutmacher DW, Cool SM. Biomaterials Differences between in vitro viability and differentiation and in vivo bone-forming ef fi cacy of human mesenchymal stem cells cultured on PCL e TCP scaffolds. *Biomaterials*. 2010;31(31):7960–70.
33. Pereira-Junior OCM, Rahal SC, Lima-Neto JF, Landim-Alvarenga F da C, Monteiro FOB. In vitro evaluation of three different biomaterials as scaffolds for canine mesenchymal stem cells. *Acta Cir Bras*. 2013;28(5):353–60.
34. Bonfil M, Sirkecioglu A, Bingol-ozakpinar O, Uras F, Seniha FG. Castor Oil and PEG-Based Shape Memory Polyurethane Films for Biomedical Applications. *J Appl Polym Sci*. 2014;131(15):1–11.
35. Brennan MÁ, Renaud A, Amiaud J, Rojewski MT, Schrezenmeier H, Heymann D, et al. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(5):114.
36. Koyanagi H, Ae K, Maehara H, Yuasa M, Masaoka T, Yamada T, et al. Massive Bone Reconstruction with Heat-Treated Bone Graft Loaded Autologous Bone Marrow-Derived Stromal Cells and b -Tricalcium Phosphate

- Composites in Canine Models. *J Orthop Res.* 2013;31(8):1308–16.
37. Kargozar S, Hashemian SJ, Soleimani M, Millan PB, Askari M, Khalaj V, et al. Acceleration of bone regeneration in bioactive glass/gelatin composite scaffolds seeded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells over-expressing bone morphogenetic protein-7. *Mater Sci Eng C.* 2017;75:688–98.
 38. Rathbone CR, Guda T, Singleton BM, Oh DS, Appleford MR, Ong JL, et al. Effect of cell-seeded hydroxyapatite scaffolds on rabbit radius bone regeneration. *J Biomed Mater Res Part A.* 2013;102(5):1458–66.
 39. Annibali S, Bellavia D, Ottolenghi L, Cicconetti A, Cristalli MP, Quaranta R, et al. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial critical size defect: Preliminary data. *J Biomed Mater Res Part B, Appl biomat.* 2014;102: 815-25.
 40. Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimble JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat rev endocrinol.* 2016;11(3):140–50.

FIGURAS

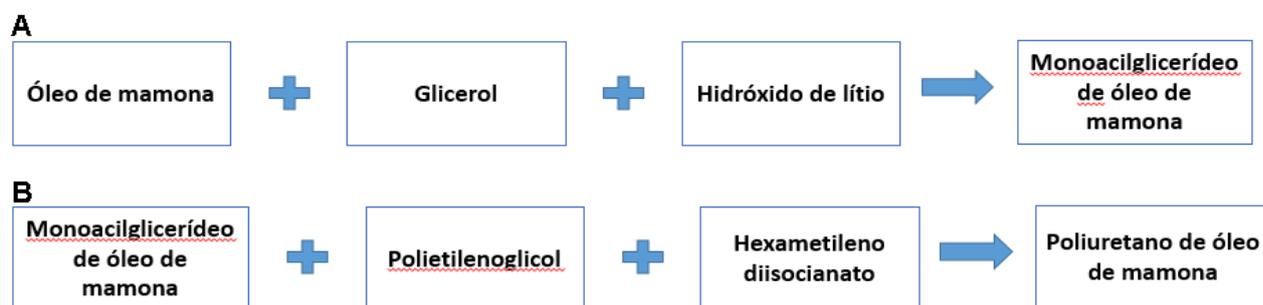


Figura 1: Produção de monoacilglicerídeo de óleo de mamona (A) e poliuretano de óleo de mamona (B).

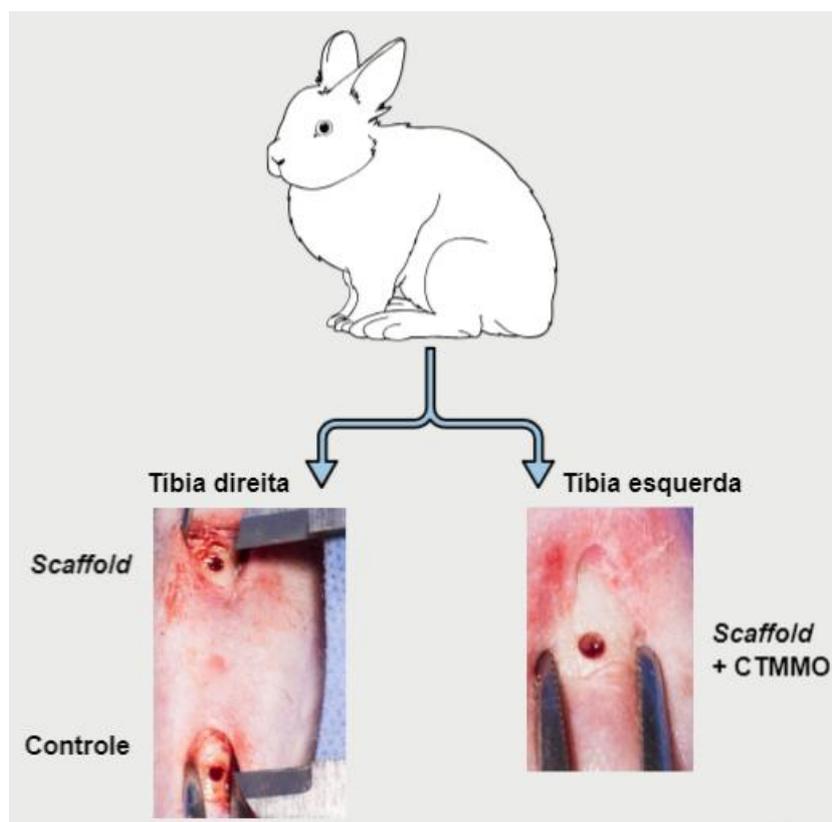


Figura 2: Delineamento experimental – Grupos SC e C na tibia direita e SCCT na esquerda.

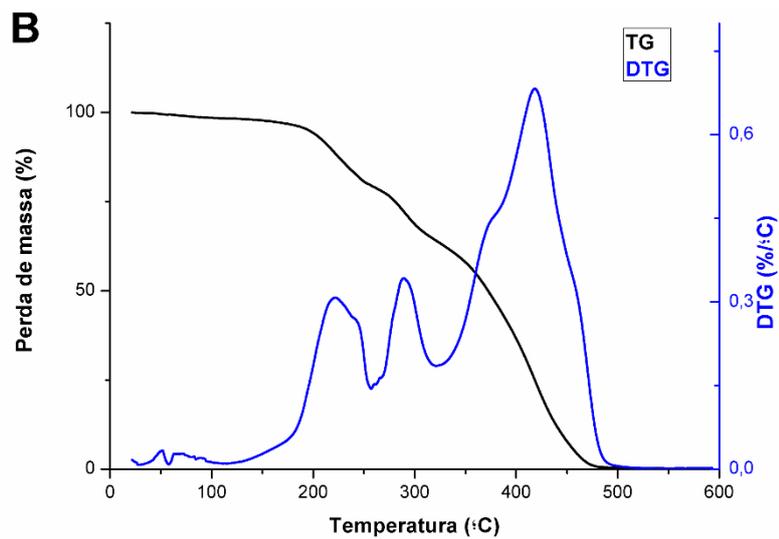
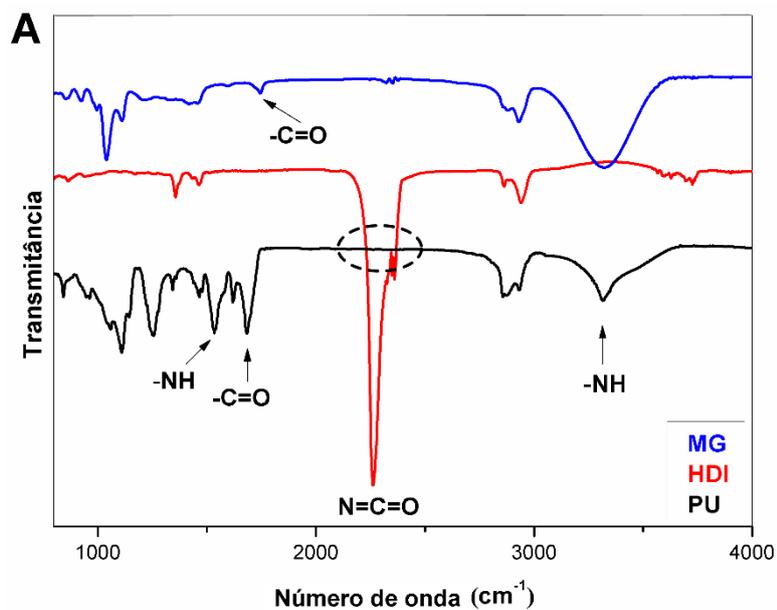


Figura 3: Espectros FTIR para MG, HDI e PU (A) e curvas de termogravimetria (TG e DTG) do PU (B).

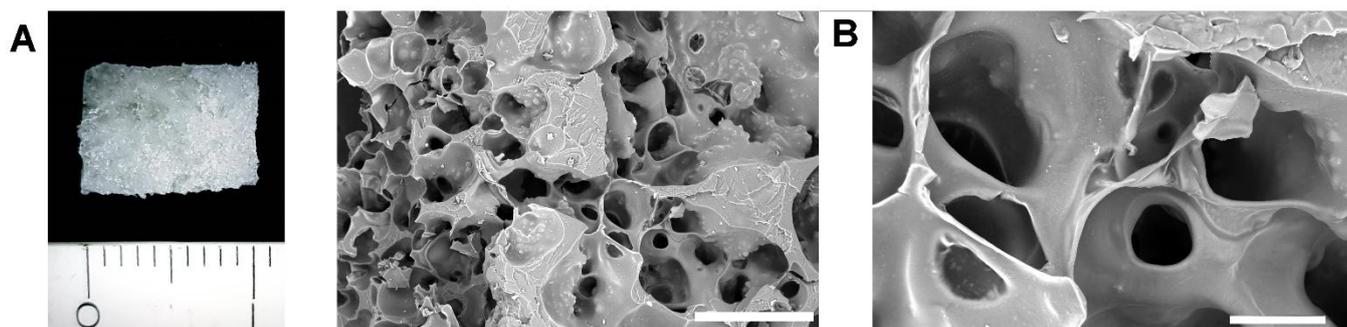


Figura 4: Scaffold de PU de mamona em imagem digital (A) e microscopia eletrônica de varredura (B) cujas barras de escala correspondem a 500 e 100 μm respectivamente.

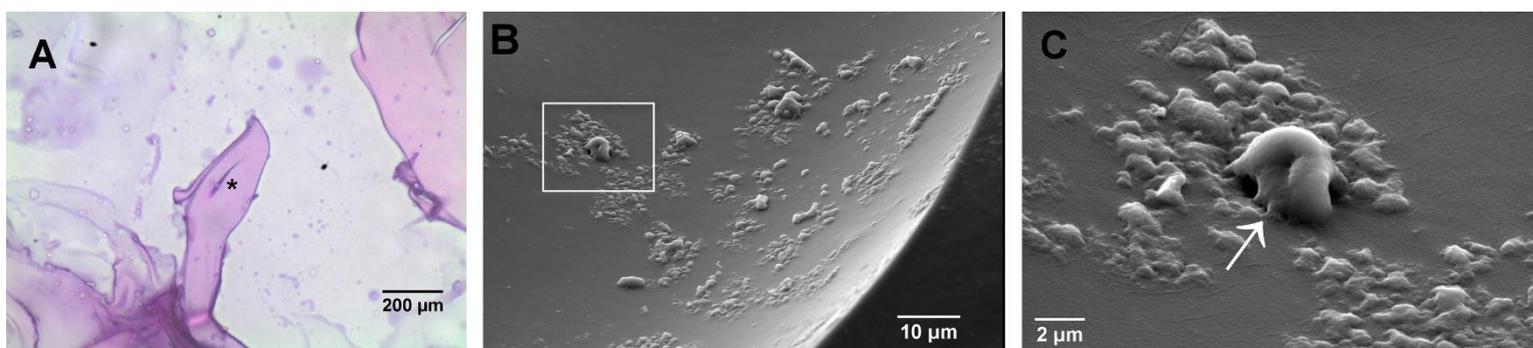


Figura 5: Adesão e proliferação de CTMMO em scaffold de PU de mamona em secções histológicas apresentando célula com aspecto fusiforme (*), magnificação de 100x (A) e em microscópio eletrônico de varredura, das quais a imagem à direita representa maior aumento (20000x) do campo selecionado na esquerda (5000x) e ambas apresentam células agrupadas e aderidas (seta) à superfície do biomaterial (B).

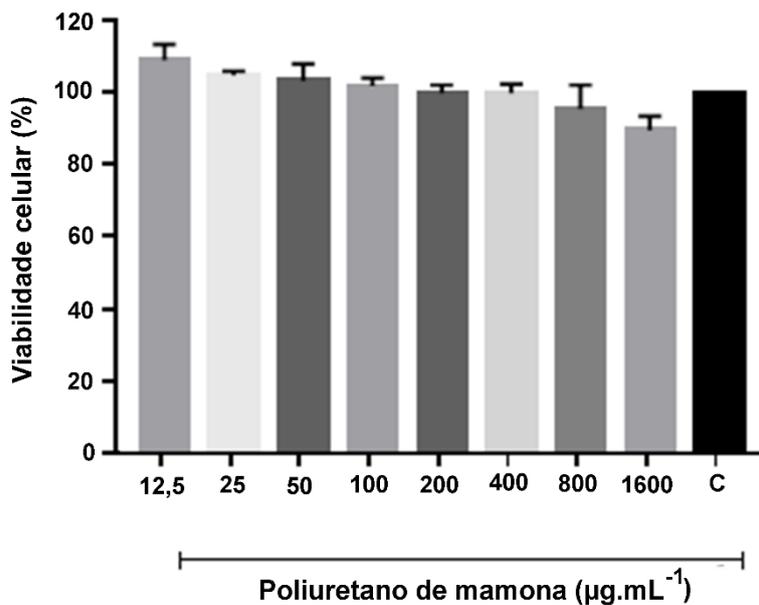


Figura 6: Análise de citotoxicidade do *scaffold* de PU de mamona com CTMMO representada em porcentagem de viabilidade celular após ensaio de MTT. Não houve diferença significativa entre as concentrações estudadas após 48h de cultivo.

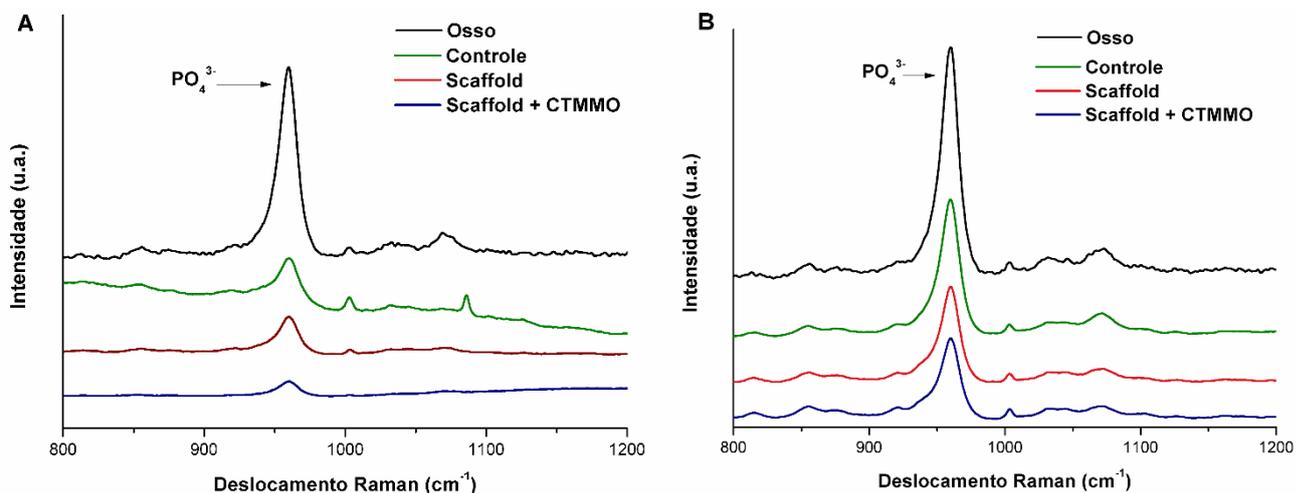


Figura 7: Espectros de Raman para osso preexistente e os grupos de tratamento após 4 (A) e 8 (B) semanas da cirurgia.

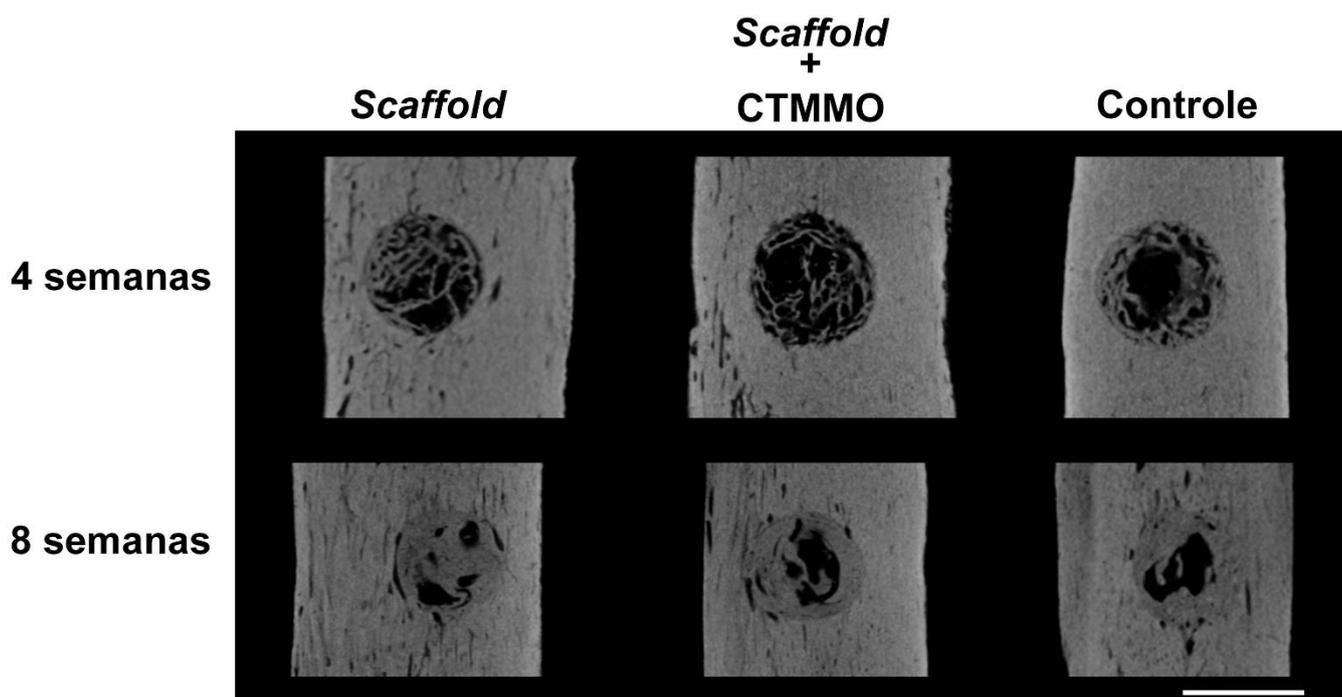


Figura 8: Imagens de microtomografia computadorizada com cortes axiais representando os três grupos e apresentando formação óssea difusa após 4 semanas e mais madura após 8 semanas (barra de escala: 2mm).

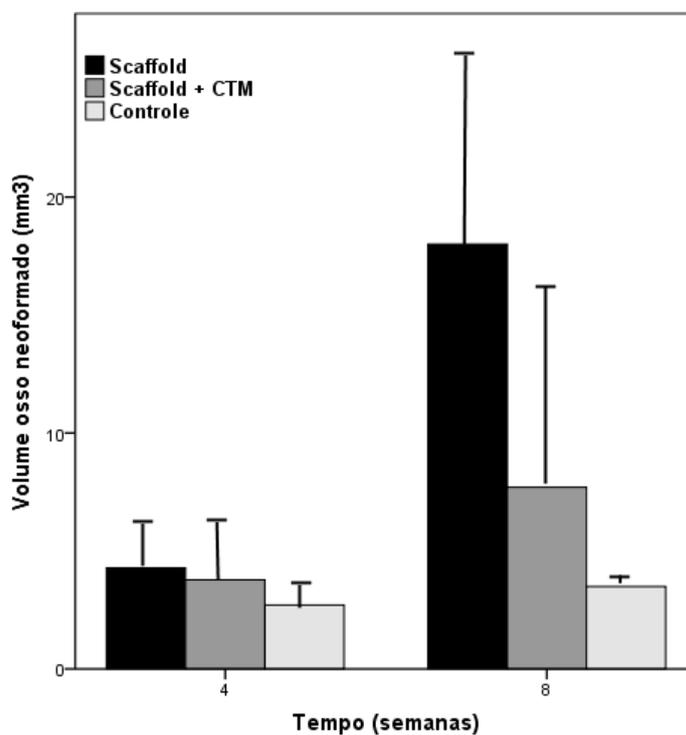


Figura 9: Medidas de volume de osso neoformado dos três grupos, após 4 e 8 semanas, obtidas com análise tridimensional com microtomografia computadorizada. Não houve diferença estatística entre os grupos em ambos os períodos ($p > 0,05$).

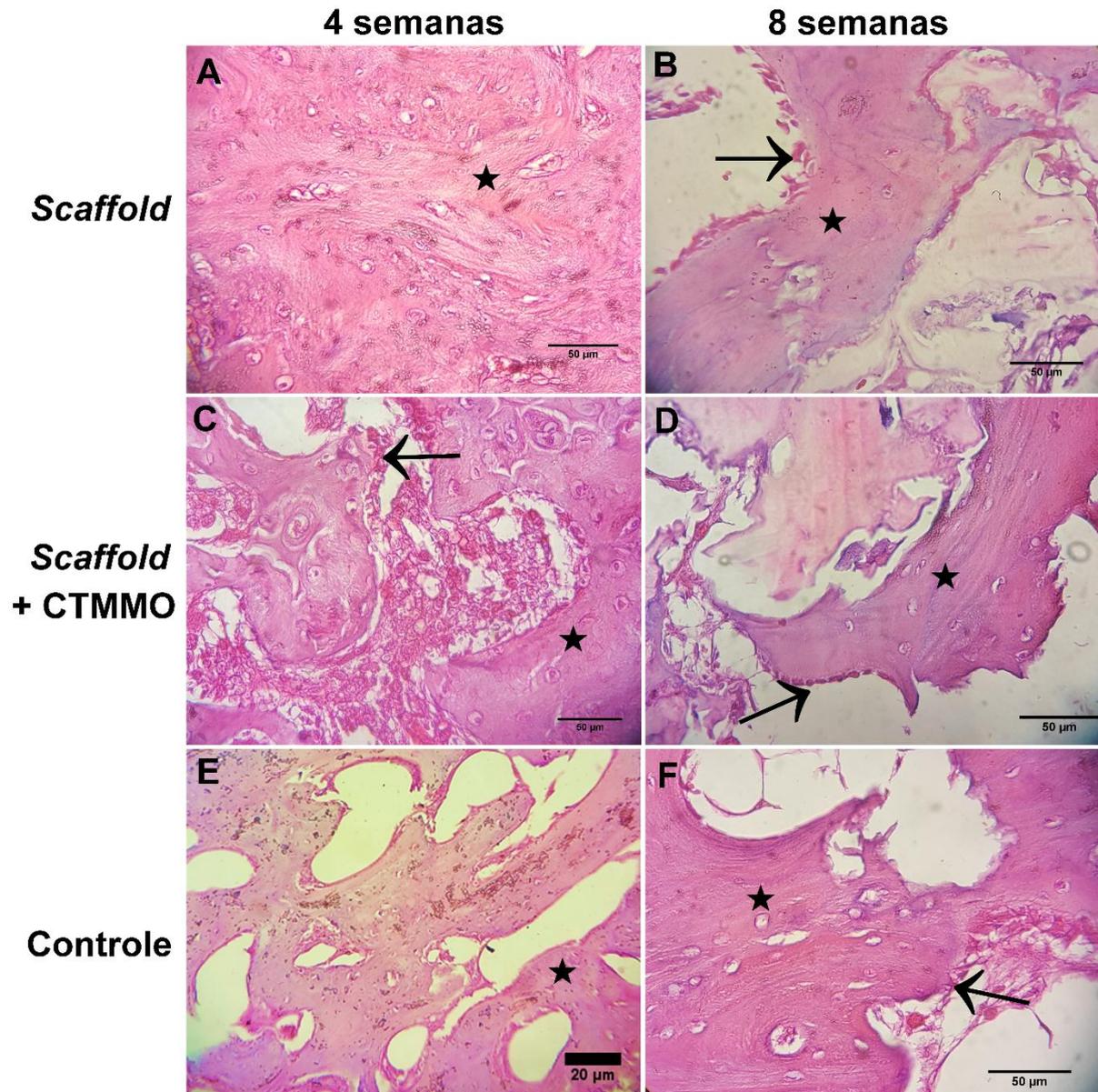


Figura 10: Secções histológicas coradas com HE e visualizadas em microscópio de luz dos grupos de tratamento após 4 e 8 semanas. Observa-se formação de matriz osteóide em todos os grupos (estrela) permeada por osteoblastos em atividade (seta). Imagem E com magnitude de 200x (barra de escala 20µm) e as demais, 500x (barra de escala 50 µm).

3. PRESS RELEASE

ÓLEO DE MAMONA E CÉLULAS-TRONCO: ALTERNATIVAS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM ODONTOLOGIA

Isnayra Kerolayne Carneiro Pacheco – Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPI (PPGO- UFPI)

Profª Drª Ana Cristina Vasconcelos Fialho – Professora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPI (PPGO- UFPI)

Acidentes, traumatismos, neoplasias, doença periodontal ou perda precoce de dentes associada à necessidade de reabilitação com implantes dentários são algumas das inúmeras causas de perda óssea em pacientes que procuram o consultório odontológico. Estes defeitos ósseos afetam uma proporção considerável da população idosa e de meia idade e, com o envelhecimento da população, a tendência é que ocorra um aumento da procura por tratamento para estas situações.

Nestes casos, o tratamento ainda considerado como primeira opção utiliza osso do próprio paciente, obtido em outra região, aplicado como enxerto no local onde há perda óssea. No entanto, a necessidade de segunda cirurgia para coletar tecido ósseo doador e, em alguns casos, a inviabilidade de coleta do enxerto devido ao volume limitado de osso do paciente nas regiões onde normalmente é realizada são consideradas desvantagens para escolha desta opção de tratamento.

Assim, o dentista normalmente lança mão do uso de biomateriais que auxiliam a formação óssea, realizando apenas uma cirurgia e obtendo resultados satisfatórios de recuperação do volume ósseo. No entanto, a maioria dos materiais utilizados possui custo elevado e, considerando estas condições, uma equipe multidisciplinar composta por cirurgiões dentistas do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPI, químicos e médicos veterinários desenvolveram e iniciaram os testes com um novo biomaterial no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados da Universidade Federal do Piauí.

O diferencial proposto é a produção de um polímero para uso em cirurgias de reparo ósseo em Odontologia que, além da redução de custos, apresenta como vantagens a produção menos complexa e a utilização de matéria-prima disponível no Brasil. O *Ricinus communis L.*, popularmente conhecido como mamona ou rícino, é uma planta bastante comum no território brasileiro e seu principal produto derivado é o óleo de mamona. O polímero obtido por reações químicas com o óleo de mamona foi liberado para uso médico e odontológico pelo Ministério da Saúde em 1999 e é o biomaterial produzido por este grupo de pesquisa. As fases iniciais do estudo com animais têm demonstrado resultados promissores em relação à biocompatibilidade deste polímero de mamona além da capacidade de promover regeneração óssea.

Outra alternativa de uso deste biomaterial é sua associação com células-tronco, também estudada pelo grupo no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-tronco da UFPI. A hipótese é que as células-tronco, quando utilizadas em boas condições, possam melhorar a capacidade deste polímero de formar tecido ósseo. As pesquisas com o polímero de mamona e células-tronco de medula óssea demonstraram que este material pode servir de suporte para o transplante das células, mas fases do estudo mais avançadas são necessárias antes da aplicação em seres humanos.

O grupo de pesquisa pretende registrar patente da metodologia deste polímero de mamona e espera que em breve seu uso possa contribuir para redução de custos para saúde pública, além da obtenção de excelentes resultados de regeneração óssea.

Jornal O Dia, Teresina-PI, p. 6 - 6, 04 fev. 2019.

4. PRODUÇÃO INTELECTUAL MARÇO 2017 – FEVEREIRO 2019

- **Projetos de Pesquisa**

2017: *Scaffold* de polímero de mamona associado a células-tronco para engenharia de tecido ósseo na odontologia

- **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. SILVA, NMP; **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; CARVALHO, C. E. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Inovações em engenharia tecidual óssea: produção de scaffold polimérico de óleo de buriti In: XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI, 2018, Teresina. Anais eletrônicos da XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI. 2018. v.6. p.34 - 35
2. NOGUEIRA, MA; GOMES, LRR; SILVA, NMP; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Membrana reabsorvível de polímero de buriti (*mauritia flexuosa*) para regeneração óssea guiada. In: XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI, 2018, Teresina. Anais eletrônicos da XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI. 2018. v.6. p.35 - 35
3. NOGUEIRA, MA; GOMES, LRR; SILVA, NMP; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. O uso de membranas reabsorvíveis em regeneração óssea guiada. In: 1ª Jornada acadêmica de odontologia da Devry/Facid, 2018, Teresina. Anais eletrônicos da 1ª jornada acadêmica de odontologia da Devry/Facid. 2018. v.1. p.37 - 37
4. LIMA FS; MATOS, J. M. E.; **PACHECO**, I. K. C.; RIBEIRO, A. B.; MATOS, L. F. L.; FIALHO, A. C. V. Scaffold como matriz osteocondutora na reparação óssea: análise de biocompatibilidade In: XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI, 2018, Teresina. Anais eletrônicos da XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI. 2018. v.6. p.35 - 36
5. **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; CARVALHO, C. E. S.; ARGOLO NETO, N. M.; FIALHO, A. C. V. Scaffold de polímero de mamona como matriz para crescimento celular para engenharia de tecido ósseo na odontologia In: XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI, 2018, Teresina. Anais eletrônicos da XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI. 2018. v.6. p.25 - 26
6. **PACHECO**, I. K. C.; NOGUEIRA, MA; LIMA FS; FIALHO, A. C. V.

Scaffolds poliméricos associados a células-tronco mesenquimais para engenharia de tecido ósseo In: 1ª Jornada acadêmica de odontologia da Devry/Facid, 2018, Teresina. Anais eletrônicos da 1ª jornada acadêmica de odontologia da Devry/Facid. 2018. v.1. p.37 - 37

7. LIMA FS; SILVA, NMP; GOMES, LRR; NOGUEIRA, MA; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Uso de laser de baixa intensidade no tratamento alternativo de pacientes com necrose óssea. In: 1ª Jornada acadêmica de odontologia da Devry/Facid, 2018, Teresina. Anais eletrônicos da 1ª jornada acadêmica de odontologia da Devry/Facid. 2018. v.1. p.36 - 36

8. GOMES, LRR; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; VIEIRA, E. G.; SILVA FILHO, E. C.; FIALHO, A. C. V. Tratamento de degenerações articulares com hidrogéis à base de polissacarídeos e hidroxiapatita. In: XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI, 2018, Teresina. Anais eletrônicos da XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI. 2018. v.6. p.91 - 91

9. DUARTE, AML; **PACHECO**, I. K. C.; PEREIRA, LF; LIMA, AS; FIALHO, A. C. V. Análise das propriedades mecânicas de scaffolds para reparos ósseos: revisão de literatura In: XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba, 2017, Parnaíba. Anais eletrônicos da XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba. 2017. v.7. p.146 - 146

10. COSTA, I. V. S.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, L. E. G.; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Análise do perfil dos acadêmicos de odontologia sobre conhecimento e adoção das normas de Biossegurança - Revisão sistematizada. In: XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba, 2017, Parnaíba. Anais eletrônicos da XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba. 2017. v.7. p.110 - 110

11. MORAIS, J. P. P.; **PACHECO**, I. K. C.; ALMEIDA JUNIOR, V. C.; GUERRA, SPL; RIZZO, MS; FIALHO, A. C. V. Análise histológica de tecido ósseo defeituoso submetido a terapia com biomateriais de polímero de mamona In: XV Jornada acadêmica de odontologia - UFPI, 2017, Teresina. Anais eletrônicos da XV Jornada acadêmica de odontologia - UFPI. , 2017. v.5. p.65 - 65

12. **PACHECO**, I. K. C.; MOURA, JSS; SILVA, NMP; MORAIS, J. P. P.; GOMES, LRR; FIALHO, A. C. V. Associação de scaffolds poliméricos e células-tronco mesenquimais para engenharia do tecido ósseo. In: XV

- Jornada acadêmica de Odontologia - UFPI, 2017, Teresina. Anais Eletrônicos da XV Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI. 2017. v.5. p.56 - 56
13. GOMES, LRR; LIMA FS; SILVA, NMP; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Avaliação da citotoxicidade de scaffolds na engenharia dos tecidos: testes de extrato de adesão In: XV Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI, 2017, Teresina. Anais eletrônicos da XV Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI. 2017. v.5. p.12 - 12
14. MOURA, JSS; FIALHO, PHS; **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Development of absorbable suture from the polymer of sunflower oil. In: XV Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI, 2017, Teresina. Anais eletrônicos da XV Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI. 2017. v.5. p.74 - 75
15. LIMA FS; NOGUEIRA, MA; GOMES, LRR; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Influência da microflora periodontal como fator etiológico da osteonecrose dos maxilares associada a medicamentos In: XV Jornada Acadêmica de Odontologia de Parnaíba, 2017, Parnaíba. Anais eletrônicos da XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba. 2017. v.7. p.158 -
16. SILVA, NMP; MORAIS, J. P. P.; **PACHECO**, I. K. C.; RIZZO, MS; FIALHO, A. C. V. Neoformação óssea guiada por biomateriais de polímeros de mamona sob a perspectiva histológica. In: XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba, 2017, Parnaíba. Anais eletrônicos da XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba. 2017. v.7. p.158 - 158
17. **PACHECO**, I. K. C.; MORAIS, J. P. P.; ALMEIDA JUNIOR, V. C.; FIALHO, A. C. V. Processo de reparação óssea após uso de polímero de buriti (*Mauritia flexuosa*) como substituto ósseo: avaliação histológica. In: 7º Congresso Internacional de Odontologia do Piauí, 2017, Teresina. Anais Eletrônicos do 7º Congresso Internacional de Odontologia do Piauí. 2017. v.1. p.93 - 94
18. MOURA, JSS; **PACHECO**, I. K. C.; TEIXEIRA, J. F. L.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Produção de biomembrana como substrato para adesão celular: contribuição para regeneração óssea guiada. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2017, Campinas. Brazilian Oral Research 34th SBPqO Annual Meeting. 2017. v.31. p.185 - 185

19. **PACHECO**, I. K. C.; MOURA, JSS; TEIXEIRA, J. F. L.; MORAIS, J. P. P.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Produção e caracterização de scaffolds de polímero de mamona para engenharia do tecido ósseo. In: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2017, Campinas. Brazilian Oral Research 34th SBPqO Annual Meeting. 2017. v.31. p.334 - 334
20. MORAIS, J. P. P.; MOURA, JSS; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; ALMEIDA JUNIOR, V. C.; FIALHO, A. C. V. Reparação óssea frente a enxertos de polímeros de mamona em ratos: análise histológica. In: 7^o Congresso Internacional de Oodntologia do Piauí, 2017, Teresina. Anais eletrônicos do 7^o Congresso Internacional de Oodntologia do Piauí. 2017. v.1. p.93 - 94
21. LIMA FS; SILVA, NMP; MORAIS, J. P. P.; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Scaffolds poliméricos associados a células-tronco mesenquimais para engenharia do tecido ósseo. In: XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba, 2017, Parnaíba. Anais eletrônicos da XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba. 2017. v.7. p.157 - 157
22. SILVA, NMP; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; MORAIS, J. P. P.; GOMES, LRR; FIALHO, A. C. V. Scaffolds poliméricos em engenharia tecidual óssea. In: XV Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI, 2017, Teresina. Anais Eletrônicos da XV Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI. 2017. v.5. p.13 - 13
23. GOMES, LRR; LIMA FS; NOGUEIRA, MA; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Teste de extrato e adesão celular na avaliação da citotoxicidade de scaffolds - revisão de literatura. In: XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba, 2017, Parnaíba. Anais eletrônicos da XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba. 2017. v.7. p.131 - 131
24. NOGUEIRA, MA; GOMES, LRR; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Uso de membranas reabsorvíveis em regeneração óssea guiada - revisão de literatura In: XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba, 2017, Parnaíba. Anais eletrônicos da XV Jornada acadêmica de odontologia de Parnaíba. 2017. v.7. p.61 - 61

- **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**
 1. MOURA, JSS; **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Fio de sutura absorvível a base de óleo de girassol: desenvolvimento e aplicação para cirurgia bucomaxilofacial. In: XXIV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2017, São Paulo. Anais Eletrônicos do XXIV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial. Dental Press International., 2017. p.245 - 246
 2. MOURA, JSS; **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Scaffolds a partir de polímero de mamona (*Ricinus communis*) para uso em cirurgia bucomaxilofacial: produção e caracterização. In: XXIV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2017, São Paulo. Anais Eletrônicos do XXIV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial. Dental Press International, 2017. p.245 – 246

- **Textos em jornais de notícias/revistas**
 1. **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Óleo de mamona e células-troco: alternativas para regeneração óssea em odontologia. Jornal O Dia, Teresina-PI, p. 6 - 6, 04 fev. 2019.
 2. CARVALHO, N. S. R. ;**PACHECO**, I. K. C. ; ARAUJO, T. C. B. . SAÚDE BUCAL: CONHECER PARA PREVENIR. Página Oficial do Ministério Público do Estado do Piauí, 03 maio 2018.

- **Apresentação de trabalho e palestra**
 1. SILVA, NMP; **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Caracterização de Scaffold de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para uso em engenharia tecidual, 2018.
 2. SILVA, NMP; **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; CARVALHO, C. E. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Inovações em engenharia tecidual óssea: produção de scaffold polimérico de óleo de buriti, 2018.

3. NOGUEIRA, MA; GOMES, LRR; SILVA, NMP; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Membrana reabsorvível de polímero de buriti (mauritia flexuosa) para regeneração óssea guiada, 2018
4. NOGUEIRA, MA; GOMES, LRR; SILVA, NMP; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. O uso de membranas reabsorvíveis em regeneração óssea guiada, 2018.
5. **PACHECO**, I. K. C.; CARVALHO, N. S. R.; ARAUJO, T. C. B. Saúde bucal: conhecer para prevenir, 2018. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
6. LIMA FS; MATOS, L. F. L.; **PACHECO**, I. K. C.; RIBEIRO, A. B.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Scaffold como matriz osteocondutora na reparação óssea: análise de biocompatibilidade, 2018.
7. **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; CARVALHO, C. E. S.; ARGOLO NETO, N. M.; FIALHO, A. C. V. Scaffold de polímero de mamona como matriz para crescimento celular para engenharia de tecido ósseo na odontologia, 2018.
8. **PACHECO**, I. K. C.; NOGUEIRA, MA; LIMA FS; FIALHO, A. C. V. Scaffolds poliméricos associados a células-tronco mesenquimais para engenharia de tecido ósseo, 2018.
9. GOMES, LRR; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; VIEIRA, E. G.; SILVA FILHO, E. C.; FIALHO, A. C. V. Tratamento de degenerações articulares com hidrogéis à base de polissacarídeos e hidroxiapatita, 2018.
10. LIMA FS; SILVA, NMP; GOMES, LRR; NOGUEIRA, MA; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Uso de laser de baixa intensidade no tratamento alternativo de pacientes com necrose óssea, 2018.
11. DUARTE, AML; **PACHECO**, I. K. C.; PEREIRA, LF; LIMA, AS; FIALHO, A. C. V. Análise das propriedades mecânicas de scaffolds para reparos ósseos: revisão de literatura, 2017.
12. COSTA, I. V. S.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, L. E. G.; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Análise do perfil dos acadêmicos de odontologia sobre conhecimento e adoção das normas de Biossegurança - Revisão sistematizada, 2017.
13. MORAIS, J. P. P.; **PACHECO**, I. K. C.; ALMEIDA JUNIOR, V. C.; GUERRA, SPL; RIZZO, MS; FIALHO, A. C. V. Análise histológica de tecido

ósseo defeituoso submetido a terapia com biomateriais de polímero de mamona, 2017.

14. **PACHECO**, I. K. C.; MOURA, JSS; SILVA, NMP; MORAIS, J. P. P.; GOMES, LRR; FIALHO, A. C. V. Associação de scaffolds poliméricos e células-tronco mesenquimais para engenharia do tecido ósseo, 2017.

15. GOMES, LRR; LIMA FS; SILVA, NMP; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Avaliação da citotoxicidade de scaffolds na engenharia dos tecidos: testes de extrato de adesão, 2017.

16. MOURA, JSS; FIALHO, PHS; **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Development of absorbable suture from the polymer of sunflower oil, 2017.

17. MOURA, JSS; **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Fio de sutura absorvível a base de óleo de girassol: desenvolvimento e aplicação para cirurgia bucomaxilofacial, 2017.

18. LIMA FS; NOGUEIRA, MA; GOMES, LRR; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V. Influência da microflora periodontal como fator etiológico da osteonecrose dos maxilares associada a medicamentos, 2017.

19. SILVA, NMP; MORAIS, J. P. P.; **PACHECO**, I. K. C.; RIZZO, MS; FIALHO, A. C. V. Neoformação óssea guiada por biomateriais de polímeros de mamona sob a perspectiva histológica, 2017.

20. **PACHECO**, I. K. C.; MORAIS, J. P. P.; ALMEIDA JUNIOR, V. C.; FIALHO, A. C. V. Processo de reparação óssea após uso de polímero de buriti (Mauritia flexuosa) como substituto ósseo: avaliação histológica, 2017.

21. MOURA, JSS; **PACHECO**, I. K. C.; TEIXEIRA, J. F. L.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Produção de biomembrana como substrato para adesão celular: contribuição para regeneração óssea guiada, 2017.

22. REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V.; **PACHECO**, I. K. C. Produção e caracterização de scaffolds de polímero de mamona para engenharia do tecido ósseo, 2017.

23. **PACHECO**, I. K. C.; MOURA, JSS; TEIXEIRA, J. F. L.; MORAIS, J. P. P.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V. Produção e caracterização de scaffolds de polímero de mamona para engenharia do tecido ósseo, 2017.

24. MORAIS, J. P. P.; MOURA, JSS; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; ALMEIDA JUNIOR, V. C.; FIALHO, A. C. V.Reparação óssea frente a enxertos de polímeros de mamona em ratos: análise histológica, 2017.

25. MOURA, JSS; **PACHECO**, I. K. C.; REIS, F. S.; MATOS, J. M. E.; FIALHO, A. C. V.Scaffolds a partir de polímero de mamona (*Ricinus communis*) para uso em cirurgia bucomaxilofacial: produção e caracterização, 2017.

26. LIMA FS; SILVA, NMP; MORAIS, J. P. P.; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V.Scaffolds poliméricos associados a células-tronco mesenquimais para engenharia do tecido ósseo, 2017.

27. LIMA FS; SILVA, NMP; MORAIS, J. P. P.; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V.Scaffolds poliméricos associados a células-tronco mesenquimais para engenharia do tecido ósseo, 2017.

28. SILVA, NMP; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; MORAIS, J. P. P.; GOMES, LRR; FIALHO, A. C. V.Scaffolds poliméricos em engenharia tecidual óssea, 2017.

29. GOMES, LRR; LIMA FS; NOGUEIRA, MA; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V.Teste de extrato e adesão celular na avaliação da citotoxicidade de scaffolds - revisão de literatura, 2017.

30. NOGUEIRA, MA; GOMES, LRR; LIMA FS; **PACHECO**, I. K. C.; FIALHO, A. C. V.Uso de membranas reabsorvíveis em regeneração óssea guiada - revisão de literatura, 2017.

- **Participação em banca de trabalhos de conclusão**

- Graduação**

- 1. FIALHO, A. C. V.; QUELEMES, PV; LOPES, M. C. A.; **PACHECO**, I. K. C. Participação em banca de João Pedro Pereira de Moraes. Biomateriais poliméricos para aplicação na engenharia tecidual óssea, 2018. (Odontologia) Universidade Federal do Piauí

- 2. FIALHO, A. C. V.; SILVA, K. R.; **PACHECO**, I. K. C.; BANDEIRA, A. V. L. Participação em banca de Rafaela Monice Mota Costa. Scaffold de mamona com células tronco: uma nova perspectiva para reparação óssea., 2018. (Odontologia) Universidade Federal do Piauí

3. LOPES, M. C. A.; FIALHO, A. C. V.; BARROS, S. S. L. V.; **PACHECO**, I. K. C. Participação em banca de Mércia Vanessa Rocha Portela. Evolução de Ameloblastoma para Carcinoma Ameloblástico. Revisão de literatura com relato de caso clínico. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) - Universidade Federal do Piauí.

4. FIALHO, A. C. V.; MOURA, WL; QUELEMES, PV; **PACHECO**, I. K. C. Participação em banca de Brenda Izabela Santana Mota. Aplicabilidade dos biopolímeros na engenharia tecidual: análise de genotoxicidade, 2017. (Odontologia) Universidade Federal do Piauí

5. FIALHO, A. C. V.; MATOS, J. M. E.; CARVALHO, LRR; **PACHECO**, I. K. C. Participação em banca de Joyce Samandra Silva Moura. Fio de sutura absorvível a base de óleo de girassol (*Heliathus annuus*): contribuição para cirurgias, 2017. (Odontologia) Universidade Federal do Piauí.

- **Participação em banca de comissões julgadoras**

1. XVI Jornada Acadêmica de Odontologia - UFPI, 2018. Universidade Federal do Piauí.

2. 1ª Jornada Acadêmica de Odontologia da Devry/Facid, 2018. Faculdade Integral Diferencial.

3. Congresso Internacional de Estudantes e Profissionais da Saúde - DELTA SAÚDE, 2017. Delta científica.

5. ANEXOS

ANEXO I -NORMATIZAÇÃO TÉCNICA PPGO

Normatização técnica das Dissertações do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPI, aprovado em Reunião do Colegiado em 12/04/2016.

As dissertações deverão ser escritas em fonte Times New Roman ou Arial tamanho 12 com espaçamento 1,5 e margens inferior e superior de 3 cm e direita e esquerda de 2,5 cm, alinhamento justificado e paginação no canto inferior esquerdo e conter os seguintes elementos:

I - Elementos pré-textuais:

- a) Primeira folha dando visibilidade à Universidade, ao Programa, ao autor e título da dissertação;
- b) Segunda folha dando visibilidade ao nome do autor, ao título do trabalho, ao nível (mestrado acadêmico), a área de concentração, a linha de pesquisa, ao nome do orientador e coorientador, ao local (cidade) e ao ano;
- c) Folha de aprovação, dando visibilidade à Comissão Julgadora com as respectivas assinaturas;
- d) Dedicatória (opcional);
- e) Agradecimentos (opcional);
- f) Lista de ilustrações (opcional);
- g) Lista de tabelas (opcional);
- h) Lista de abreviaturas e siglas (opcional);
- i) Lista de símbolos (opcional);
- j) Sumário.

II – Elementos textuais

- a) Resumo em português contendo no máximo 300 palavras (opcional);
- b) Revisão de literatura ou artigo de revisão;
- c) Artigo(s);
- d) Press release.

III – Elementos pós-textuais

- a) Produção Intelectual
- b) Anexos
- c) Apêndices

OBS: As referências devem ser formatadas de acordo com as normas de Vancouver, sempre ao final das secções que necessitem das mesmas.

ANEXO II – AUTOR GUIDELINES (JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A)

Aims and Scope

The Journal of Biomedical Materials Research Part A is an international, interdisciplinary, English-language publication of original contributions concerning studies of the preparation, performance, and evaluation of biomaterials; the chemical, physical, toxicological, and mechanical behavior of materials in physiological environments; and the response of blood and tissues to biomaterials. The Journal publishes peer-reviewed articles on all relevant biomaterial topics including the science and technology of alloys, polymers, ceramics, and reprocessed animal and human tissues in surgery, dentistry, artificial organs, and other medical devices. The Journal also publishes articles in interdisciplinary areas such as tissue engineering and controlled release technology where biomaterials play a significant role in the performance of the medical device.

The Journal of Biomedical Materials Research is the official journal of the Society for Biomaterials (USA), the Japanese Society for Biomaterials, the Australasian Society for Biomaterials, and the Korean Society for Biomaterials.

Articles are welcomed from all scientists. Membership in the Society for Biomaterials is not a prerequisite for submission.

Online Submission and Peer Review

In taking a step toward expediting the publication process, Journal of Biomedical Materials Research Part A is pleased to offer web-based submission and peer review.

To submit your manuscript online please:

Log on to <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-a> .If you have not already done so, create an account for yourself in the system by clicking on the "Create an Account" button. To monitor the progress of your manuscript throughout the review process, just login periodically and check your Author Center.

Please be sure to study the Instructions and Forms given at the site carefully, and then let the system guide you through the submission process. Online help is available to you at all times during the process. You are also able to exit/re-enter at any stage before finally “submitting” your work. All submissions are kept strictly confidential. If you have any questions, do not hesitate to contact us at jbmra@wiley.com.

To ensure the most rapid review process for submitted manuscripts, it is now a requirement for authors to suggest at least 4 possible reviewers for their paper with complete contact information, including name, affiliation, and email address. Please note that it is a requirement to include the affiliated institution of each preferred reviewer. We also strongly recommend that you list the reviewer's institutional email address, instead of their personal account. Your submission will be unsubmitted to address these issues if they are not listed correctly.

All correspondence should be sent to the Journal Administration Office, Attn: Ms. Lisa Brodsky, Assistant Managing Editor, Journal of Biomedical Materials Research Editorial Office, c/o John Wiley & Sons, Inc., 111 River Street (MS 8-02), Hoboken, NJ 07030-5774.

Authors in Japan please note: Wiley-Japan can provide authors in Japan with a list of recommended services to check and improve the English in their papers BEFORE SUBMISSION. Please see the site as follows: http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp

Copyright/Licensing and Permissions:

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. **For authors signing the copyright transfer agreement:**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:
CTA Terms and

Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen: If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

It is the author's responsibility to obtain written permission to reproduce material that has appeared in another publication.

Use of Animals: When animals are used in the research reported, the authors must state: "NIH guidelines (or for non-U.S. residents similar national regulations) for the care and use of laboratory animals (NIH Publication #85-23 Rev. 1985) have been observed." In studies involving human subjects, the authors must include; "all subjects enrolled in this research have responded to an Informed Consent which has been approved by my Institutional Committee on Human Research and that this protocol has been found acceptable by them." The dates of approval by the

Committee and the ethical guidelines followed should be made a part of the Methods section.

Conflict of Interest. JBMR has adopted a policy that requires authors to make a statement concerning potential conflict of interest relating to their submitted articles. They must select one of the following applicable statements as indicated by superscript following the title of their manuscripts.

1. The author, or one or more of the authors, has received or will receive remuneration or other prerequisites for personal or professional use from a commercial or industrial agent in direct or indirect relationship to their authorship. 2. The benefits accruing to the author or authors from a commercial or industrial party will be applied to a research fund, nonprofit institution or other organization with which the author(s) are associated. 3. No benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the author(s). 4. The author(s) choose not to respond to any of the above listed statements.

Instructions for Manuscript Preparation

Manuscript: For optimal production, prepare manuscript text in size 12 font on 8-1/2 x 11 inch page, double-spaced, with at least 1-inch margins on all sides. Text files should be formatted as .doc or .rtf files. Refrain from complex formatting; the Publisher will style your manuscript according to the Journal design specifications. Do not use desktop publishing software such as PageMaker or Quark Xpress or other software such as Latex. If you prepared your manuscript with one of these programs, export the text to a word processing format. Please make sure your word processing programs "fast save" feature is turned off. Please do not deliver files that contain hidden text: for example, do not use your word processor's automated features to create footnotes or reference lists.

Original Articles should appear in the following order: title page (including authors and affiliations), abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, figure legends. Number pages consecutively starting with the title page as page 1.

Please be sure to submit your illustrations and tables as separate files; the system will automatically create a pdf file of your paper for the reviewers.

Title Page: The name(s) and affiliation of the author(s) should appear only on a separate title page. Please do not mark any other parts of the manuscript with name(s) and affiliation(s) of author(s). Use only a short title on the following pages of the manuscript. Author(s) name(s) should not be used. The paper should be subdivided into the expected classical sections and, if necessary, subsections. Manuscripts including references (but not figures or tables) should be no longer than 18 pages.

Abstract: A short synopsis (200 words or less) is required for all papers. This synopsis should be carefully prepared, for it is the source of most abstracts. The synopsis should be a summary of the entire paper, not the conclusions alone, and should precede the main body of the paper.

Keywords: The author is requested to supply, below the synopsis, a list of five keywords or phrases that most clearly typify the outstanding points made in the manuscript.

References:

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. Sample references follow:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.
2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.
3. Gilmor ML, Rouse ST, Heilman CJ, Nash NR, Levey AI. Receptor fusion proteins and analysis. In: Ariano MA, editor. *Receptor localization*. New York: Wiley-Liss; 1998. p 75-90. Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

Figure Legends: Please supply complete captions for all figures. Captions are to appear on a separate page at the end of the manuscript. **Symbols and**

Equations: Authors are cautioned to type, wherever possible, all mathematical and chemical symbols, equations, and formulas and to identify in the margin all Greek or unusual symbols the first time they are used (e.g., k , K , x , α). Underline all vector quantities with a wavy line. Use fractional exponents to avoid root signs. When mentioning a material, chemical reagent, instrument or other product, use the generic

name only. If further identification (proprietary name, manufacturer's name and address) is required, list it as a footnote.

Tables: Please save Tables separately and supply numbers and titles for all. All table columns should have an explanatory heading. Tables should be submitted as doc or rtf files (it is preferred that tables are prepared using Word's table edit tool).

Illustrations: When preparing digital art, please consider:

Resolution: The minimum requirements for resolution are:

1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs.

300 DPI/PPI for picture-only photographs

600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Formats:

For the editorial review process, GIF and JPEG files are acceptable; upon submission of a revision, TIFF or EPS files will be required. For the editorial review process, color images may be submitted in RGB color; upon revision, CMYK color will be required.

Delivery of production-quality files early in the review process may facilitate smooth and rapid publication once a manuscript has been accepted.

Note that these file formats are not acceptable for printing: JPG, GIF, PNG, PCX, PNG, XBM, Word, and Excel. We recommend creating your graphics in Photoshop, Illustrator, or Freehand and importing them into your page applications as TIFFs with all fonts included. Do not scan figures as JPEGs and convert to TIFFs. For further guidance on preparing digital figure files, authors are encouraged to visit <http://cjs.cadmus.com/da/applications.asp>.

To ensure that your digital graphics are suitable for print purposes, please go to RapidInspector™ at <http://rapidinspector.cadmus.com/zwi/index.jsp>. This free, stand-alone software application will help you to inspect and verify illustrations right on your computer.

A legend must be provided for each illustration and must define all abbreviations used

therein. Legends should be placed at the end of the manuscript text file.

Color Illustrations: Color figures are generally printed in the Journal at the author's expense. The publisher will provide cost estimates prior to printing. A limited number of color figures that are of critical importance and that significantly enhance the presentation will be considered for publication at the publisher's expense subject to editorial recommendation. Final decision on publication of color figures will be at the discretion of the Editor. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

Author Alterations or Revisions. It is absolutely necessary to limit alterations to factual and typographical errors. Authors will be charged for revisions, and publication of their work will be delayed. In order to expedite the publication and online posting of articles in Wiley Online Library, JBMR sends page proofs in pdf format via e-mail to the corresponding author's e-mail address. Please follow the instructions in the e-mail; contact names and numbers are given for questions, problems, or if an author wishes to receive a paper proof.

Reprints: Reprints may be ordered

at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=JBMA>.

Note to NIH Grantees:

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance.

This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

ANEXO III – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA PELO CEUA (UFPI)



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

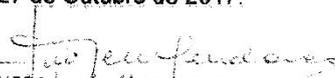


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "***Efeito do scaffold de polímero de mamona (Ricinus communis L.) e de células-tronco mesenquimais alógenas na reparação de falhas ósseas induzidas em coelhos (Oryctolagus cuniculus)***", registrada nº 379/17, sob a responsabilidade da Profa. Dra. ANA CRISTINA VASCONCELOS FIALHO do Departamento de Patologia e Clínica Odontológica/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **27/10/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Dezembro/2017 à Março/ 2019
Espécie/Linhagem/raça	Coelhos
Nº de Animais	10
Peso/ Idade	---/---
Sexo	Machos
Origem	Serão adquiridos animais oriundos de pet shops de Teresina.

Teresina, 27 de Outubro de 2017.


 Prof^a Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora