



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO
GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**



**ESPONJA FIBRILAR DE FLUORETO DE POLIVINILIDENO
ENRIQUECIDA COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO NO
REPARO DO DEFEITO ÓSSEO EXPERIMENTAL EM TÍBIA
DE RATOS**

PAULO HENRIQUE DE AFFONSECA JARDIM

CAMPO GRANDE, MS
2022

1 **PAULO HENRIQUE DE AFFONSECA JARDIM**

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

**ESPONJA FIBRILAR DE FLUORETO DE POLIVINILIDENO
ENRIQUECIDA COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO NO
REPARO DO DEFEITO ÓSSEO EXPERIMENTAL EM TÍBIA
DE RATOS**

*Fibrillar sponge of polyvinylidene fluoride enriched with reduced graphene oxide in
the repair of experimental bone defect in tibia of rats*

PAULO HENRIQUE DE AFFONSECA JARDIM

Orientador:

Prof. Dr. FABRÍCIO DE OLIVEIRA FRAZÍLIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul, como requisito à obtenção do título de
Doutor em Ciências Veterinárias.

CAMPO GRANDE, MS
2022



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Esponja fibrilar de fluoreto de polivinilideno enriquecida com óxido de grafeno reduzido no reparo do defeito ósseo experimental em tibia de ratos", registrada com o nº 1.022/2019, sob a responsabilidade de **Fabrizio de Oliveira Frazilio** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 2ª reunião ordinária do dia 26/03/2019.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/03/2019 a 04/03/2021
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	90
Peso/Idade	260 - 350g / 03 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério - UT/INBIO/UFMS

Fábio José Carvalho Faria

Coordenador da CEUA/UFMS

Campo Grande, 29 de março de 2019.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria, Professor do Magisterio Superior**, em 29/03/2019, às 10:54, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

RESUMO

58

59

60 JARDIM, P.H.A. Esponja fibrilar de fluoreto de polivinilideno enriquecida com
61 óxido de grafeno reduzido no reparo do defeito ósseo experimental em tíbia de
62 ratos. 2022. Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
63 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato
64 Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022.

65

66 Estudos recentes com fluoreto de polivinilideno (PVDF) e óxido de grafeno
67 reduzido (rGO) demonstram resultados promissores no reparo ósseo. Objetivou-
68 se com esse estudo avaliar a utilização de PVDF associado ao rGO no reparo de
69 defeitos ósseos monocorticais unilaterais realizados em tíbia de ratos. Foram
70 distribuídos 90 animais divididos em 3 grupos de 30: DEF (Controle), PVDF e
71 PVDF/rGO, que por sua vez foram subdivididos conforme o tempo de avaliação
72 (10, 20 e 30 dias). O grupo DEF foi submetido apenas ao defeito ósseo e não
73 recebeu tratamento. Os outros grupos foram submetidos ao defeito ósseo e
74 tratados da seguinte forma: defeitos preenchidos com fluoreto de
75 polivinilideno = PVDF e defeitos preenchidos com fluoreto de polivinilideno
76 enriquecido com óxido de grafeno reduzido = PVDF/rGO. Para as análises foram
77 realizadas avaliações séricas de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase alcalina
78 óssea (FAO) assim como avaliações histológicas da região do defeito conforme o
79 tempo de avaliação. Os grupos PVDF e PVDF/rGO demonstraram níveis maiores
80 de fosfatase alcalina óssea aos 20 e 30 dias pós-operatórias quando comparadas
81 dentro de seu grupo e aos 30 dias quando comparadas com o grupo DEF. As
82 análises histológicas demonstraram aos 20 dias maior neoformação de tecido
83 ósseo do grupo DEF quando comparado com o grupo PVDF/rGO, presença maior
84 de osteoblastos no grupo DEF em comparação aos grupos PVDF e PVDF/rGO
85 assim como presença maior de infiltrado inflamatório do grupo PVDF/rGO em
86 relação aos grupos DEF e PVDF. Foi evidenciada aos 30 dias de avaliação
87 grande número de células gigantes multinucleadas assim como intensa reação
88 periosteal no grupo PVDF/rGO. Com auxílio das análises estatísticas significativas
89 ($P < 0.05$) concluiu-se que os biomateriais PVDF e PVDF/rGO elevaram os níveis de
90 fosfatase alcalina óssea aos 20 e 30 dias de avaliações. A utilização dos
91 biomateriais PVDF e PVDF/rGO não aceleraram o processo de reparo ósseo em
92 comparação ao grupo DEF. O biomaterial PVDF/rGO promoveu grande formação
93 de células gigantes multinucleadas.

94 **Palavras-chave:** Consolidação óssea, piezoelectricidade, cirurgia veterinária,
95 nanomateriais, solution blow spinning.

96

97

98

99

100

101

102

103

ABSTRACT

104

105 **JARDIM, P.H.A. Fibrillar polyvinylidene fluoride sponge enriched with**
106 **reduced graphene oxide in the repair of the experimental bone defect in rat**
107 **tibia. 2022. Doctorate - Graduate Program in Veterinary Sciences. Faculty of**
108 **Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso**
109 **do Sul, Campo Grande, MS, 2022.**

110

111 Recent studies with polyvinylidene fluoride (PVDF) and reduced graphene oxide
112 (rGO) demonstrate promising results in bone repair. The aim of this study was to
113 evaluate the use of PVDF associated with rGO in the repair of unilateral
114 monocortical bone defects performed in the tibia of rats. Ninety animals were
115 divided into 3 groups of 30: DEF (Control), PVDF and PVDF/rGO, which in turn
116 were subdivided according to the evaluation time (10, 20 and 30 days). The DEF
117 group was submitted only to the bone defect and received no treatment. The
118 other groups were submitted to the bone defect and treated as follows: defects
119 filled with polyvinylidene fluoride = PVDF and defects filled with polyvinylidene
120 fluoride enriched with reduced graphene oxide = PVDF/rGO. For the analyses,
121 serum alkaline phosphatase (ALP) and bone alkaline phosphatase (FAO)
122 estimates were performed, as well as histological estimates of the defect region
123 according to the evaluation time. The PVDF and PVDF/rGO groups showed higher
124 levels of bone alkaline phosphatase at 20 and 30 days after surgery when
125 compared within their group and at 30 days when compared with the DEF group.
126 Histological analyzes demonstrated, at 20 days, a greater neoformation of bone
127 tissue in the DEF group when compared to the PVDF/rGO group, a greater
128 presence of osteoblasts in the DEF group compared to the PVDF and PVDF/rGO
129 groups, as well as a greater presence of inflammatory infiltrate in the PVDF
130 /rGO than to the DEF and PVDF groups. At 30 days of evaluation, a large number
131 of multinucleated giant cells was observed, as well as an intense periosteal
132 reaction in the PVDF/rGO group. With the help of weighted statistical analyzes
133 ($P < 0.05$) it is concluded that the PVDF and PVDF/rGO biomaterials increase the
134 levels of bone alkaline phosphatase at 20 and 30 days of estimates. The use of
135 PVDF and PVDF/rGO biomaterials did not accelerate the bone repair process
136 compared to the DEF group. The PVDF/rGO biomaterial promoted great formation
137 of multinucleated giant cells.

138 **Keywords:** Bone consolidation, piezoelectricity, veterinary surgery,
139 nanomaterials, solution blow spinning.

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

LISTA DE FIGURAS

150

151 Figura 1 - Distribuição dos animais em seus grupos..... 13

152 Figura 2 - Indução do defeito ósseo. A) Membro pélvico direito preparado para o
 153 procedimento. B) Incisão crânio-medial de pele e subcutâneo. C) Perfuração da
 154 cortical medial com broca esférica (seta). D) Defeito ósseo monocortical medial
 155 em tibia (seta)..... 15

156 Figura 3 – Quantidade de animais excluídos de cada grupo em cada variável20

157 Figura 4 – Defeitos monocorticais. A) Localização correta do defeito. B)
 158 Localização metafisária proximal indesejada.....20

159 Figura 5 - Fraturas. A) Fratura completa de tibia e fíbula em diáfise com
 160 desalinhamento do eixo anatômico. B) Fratura completa de tibia em diáfise com
 161 pouco desvio do eixo anatômico.....21

162 Figura 6. Nova distribuição dos animais em seus grupos após as exclusões.....21

163 Figura 7 – Representações estatísticas das comparações de FAL e FAO antes do
 164 procedimento (Bas) e no momento da eutanásia (Eut) em cada tempo de
 165 avaliação do grupo DEF..... 24

166 Figura 8 – Representações estatísticas das comparações de FAL e FAO antes do
 167 procedimento (Bas) e no momento da eutanásia (Eut) em cada tempo de
 168 avaliação do grupo PVDF.....25

169 Figura 9 – Representações estatísticas das comparações de FAL e FAO antes do
 170 procedimento (Bas) e no momento da eutanásia (Eut) em cada tempo de
 171 avaliação do grupo PVDF/rGO.....26

172 Figura 10 – Representações estatísticas das comparações entre os grupos em
 173 seus respectivos tempos. A) Fosfatase Alcalina Sérica. B) Fosfatase Alcalina
 174 Óssea.....28

175 Figura 11. Cortes histológicos do grupo DEF–10 dias corados por HE visualizados
 176 por microscopia de luz. A) extensão do defeito ósseo realizado. B) Fibras de
 177 colágeno (seta azul) e infiltrado inflamatório (seta amarela)29

178 Figura 12 – Cortes histológicos do grupo DEF–20 dias corados por HE
 179 visualizados por microscopia de luz. A) extensão do defeito ósseo realizado. B)
 180 Tecido ósseo neoformado (seta azul). Formação de tecido mieloide (seta
 181 amarela). Preenchimento das lacunas osteocíticas (seta preta)30

182	Figura 13 – Cortes histológicos do grupo DEF–30 dias corados por HE	
183	visualizados por microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo preenchida. B)	
184	Predominância de tecido ósseo compacto (seta azul). Preenchimento das lacunas	
185	osteocíticas (seta amarela)	31
186	Figura 14 – Cortes histológicos do grupo DEF corados por HE visualizados por	
187	microscopia de luz. A) 10 dias. B) 20 dias. C) 30 dias.....	31
188	Figura 15 – Cortes histológicos do grupo PVDF–10 dias corados por HE	
189	visualizados por microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo. B) Predominância	
190	de Tecido ósseo neoformado (seta azul). Preenchimento das lacunas osteocíticas	
191	(seta preta). Fibras colágenas (seta verde). Formação de tecido mieloide (seta	
192	amarela)	32
193	Figura 16 – Cortes histológicos do grupo PVDF–20 dias corados por HE	
194	visualizados por microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo. B) Predominância	
195	de Tecido ósseo neoformado (seta azul). Preenchimento das lacunas osteocíticas	
196	(seta preta). Formação de tecido mieloide (seta amarela)	33
197	Figura 17 – Cortes histológicos do grupo PVDF–30 dias corados por HE	
198	visualizados por microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo. B) Predominância	
199	de Tecido ósseo (seta azul). Preenchimento das lacunas osteocíticas (seta preta)	
200	33
201	Figura 18 – Cortes histológicos apresentando biomaterial encapsulado do grupo	
202	PVDF corados por HE e visualizados por microscopia de luz (setas pretas)	
203	33
204	Figura 19 – Cortes histológicos do grupo PVDF/rGO–10 dias corados por HE	
205	visualizados por microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo pouco preenchida.	
206	B) Predominância de biomaterial e células inflamatórias. Tecido ósseo (seta azul).	
207	Biomaterial PVDF/rGO (seta preta). Infiltrado inflamatório (seta amarela)	35
208	Figura 20 – Cortes histológicos do grupo PVDF/rGO–20 dias corados por HE	
209	visualizados por microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo preenchida por	
210	células inflamatórias e tecido ósseo neoformado. B) Predominância de biomaterial	
211	e células inflamatórias. Biomaterial PVDF/rGO (seta preta). Infiltrado inflamatório	
212	(seta amarela)	36
213	Figura 21 – Cortes histológicos do grupo PVDF/rGO corados por HE visualizados	
214	por microscopia de luz. A) PVDF/rGO – 20 dias. Área do defeito ósseo preenchida	
215	por células inflamatórias envolvendo o biomaterial. B) PVDF/rGO – 30 dias.	

216	Células gigantes multinucleadas envolvendo o biomaterial (setas amarelas)	
217	36
218	Figura 22 – Cortes histológicos do grupo PVDF/rGO–30 dias corados por HE	
219	visualizados por microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo preenchida por	
220	células inflamatórias e tecido ósseo. B) Reação periosteal intensa abrangendo	
221	todas as corticais não envolvidas no processo cirúrgico. Tecido ósseo neoformado	
222	(seta azul). Tecido ósseo compacto (seta amarela)	37
223	Figura 23 – Representação estatística das comparações das variáveis avaliadas	
224	histologicamente entre os grupos aos 10 dias.....	38
225	Figura 24 – Representação estatística das comparações das variáveis avaliadas	
226	histologicamente entre os grupos aos 20 dias.....	39
227	Figura 25 – Representação estatística das comparações das variáveis avaliadas	
228	histologicamente entre os grupos aos 30 dias.....	39
229		
230		
231		
232		
233		
234		
235		
236		
237		
238		
239		
240		
241		
242		
243		
244		
245		
246		
247		
248		
249		
250		

251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Escore histológico segundo Costa et al. (2015) modificado.....	17
Quadro 2 - Resultados das análises bioquímicas sanguíneas pré-operatórias de ratos winstar machos.....	22
Quadro 3 - Resultados das médias dos valores bioquímicos sanguíneos do grupo DEF.....	24
Quadro 4 - Resultados das médias dos valores bioquímicos sanguíneos do grupo PVDF.....	25
Quadro 5 - Resultados das médias dos valores bioquímicos sanguíneos do grupo PVDF/rGO.....	26

295
296
297
298
299

SUMÁRIO

300	1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
301	2. OBJETIVOS	3
302	2.1. Objetivo geral	3
303	2.2. Objetivos específicos	3
304	3. REVISÃO DE LITERATURA	4
305	3.1. Tecido e reparo ósseo	4
306	3.2. Fluoreto de Polivinilideno (PVDF)	7
307	3.3. Óxido de grafeno reduzido	9
308	4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
309	4.1. Locais de desenvolvimento	11
310	4.2. Síntese do Fluoreto de polivinilideno	11
311	4.3. Síntese do óxido de grafeno reduzido e Associação com o PVDF	12
312	4.4 Animais e Grupos experimentais	13
313	4.5. Período pré-operatório	14
314	4.6. Anestesia	14
315	4.7. Indução do Defeito Ósseo e Aplicação dos biomateriais	14
316	4.8. Período Pós-operatório	16
317	4.9. Análise de fosfatase alcalina	16
318	4.10. Protocolo de eutanásia e descarte	16
319	4.11. Análises histomorfológicas	17
320	5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
321	6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
322	6.1. Modelo experimental	19
323	6.2. Fosfatase alcalina e fosfatase alcalina óssea	23
324	6.3 Análises Histológicas	28
325	7. CONCLUSÃO.....	41
326	8. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO.....	41
327	9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
328		

1. INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento da nanociência, nanomedicina e ciência dos materiais favoreceu a fabricação de novos projetos e materiais de engenharia tecidual, especialmente para o tratamento de defeitos ósseos (CHIARA et al., 2012; CINQUE et al., 2015; GRUNWALD et al., 2018).

Essas lesões têm tido um aumento significativo devido a condições crônicas de saúde e fraturas associadas à idade da população. O problema se torna muito maior se considerarmos os ocasionados por acidentes e doenças (TANG, 2016).

O tratamento de fraturas ósseas, especialmente as com perdas de fragmentos, atraso da união ou até mesmo a não união, tem como padrão ouro a utilização de autoenxertos ósseos (MOSHIRI et al., 2014; BUCK & MURTHA, 2017). No entanto, enxertos ósseos naturais (aloenxertos, autoenxertos e xenoenxertos), ainda que sejam a abordagem clínica mais comum, apresentam vários problemas relacionados à morbidade local, transmissão de doenças, falta de acessibilidade e altos custos (MOSHIRI et al., 2014; VYAS et al., 2017). Para superar essas limitações, os enxertos sintéticos (scaffolds), representam uma alternativa promissora para a engenharia de tecidos (VYAS, et al., 2017).

Dentre as possibilidades de terapias utilizadas como auxílio e/ou tratamento, os materiais bioativos podem ser agrupados segundo suas propriedades que intensificam a cicatrização quanto a osteogênese, formação de novo osso, osteoindução, recrutamento e diferenciação de células formadoras de osso, osteocondução, suporte mecânico, ou um arcabouço para células formadoras de osso. Essas opções terapêuticas podem ser usadas isoladamente ou em combinações sinérgicas para melhorar a cura da fratura e fornecer o fator deficiente (EGGER et al., 2014).

Entre os materiais que vem atraindo a atenção dos pesquisadores estão os com efeitos piezoelétricos. Em 1880 Jacques e Pierre Curie descobriram que um potencial elétrico poderia ser gerado aplicando-se pressão a cristais de quartzo, a sais de Rochelle e até a cristais de cana de açúcar nomeando este fenômeno de “o efeito piezo” (KARTZIR, 2003).

361 A piezoeletricidade óssea ocorre devido ao colágeno, pois mesmo o osso
362 desmineralizado em solução ácida apresenta efeito piezoelétrico, podendo gerar
363 sinais elétricos depois de ter sofrido tensão mecânica e contribuindo para
364 reparação óssea (BASSET & BECKER, 1962). Fukada e Yasuda (1957)
365 descreveram esse efeito ao demonstrar que o osso desenvolve campos elétricos
366 em sua superfície quando submetido à tensão mecânica. Dentre os polímeros
367 piezoelétricos mais estudados quanto à capacidade osteogênica está o fluoreto
368 de polivinilideno (PVDF) (RAJABI et al., 2015).

369 Integrando o grupo de materiais utilizados, os nanomateriais a base de
370 grafeno também chamam a atenção em aplicações biomédicas devido às suas
371 propriedades físico-químicas únicas, funcionalização, boa biocompatibilidade e
372 alta área de superfície, sendo investigado em diversas funções como
373 biossensores, entrega de medicamentos, bioimagens, diagnóstico terapias, entre
374 outros (LIN et al., 2016).

375 Um desses materiais é o óxido de grafeno reduzido (rGO), obtido por meio
376 da remoção parcial de alguns grupos funcionais de oxigênio da estrutura do óxido
377 de grafeno (XU et al., 2015). O óxido de grafeno é um material com
378 características benéficas na biologia óssea, como a promoção da mineralização
379 de hidroxiapatita com qualidade osteocondutora (LIU et al., 2014), o aumento da
380 formação de nódulos mineralizados (ZANCANELA et al., 2016), o favorecimento
381 da formação de apatita semelhante ao tecido ósseo, a adesão celular e
382 diferenciação osteogênica (PENG et al., 2017) e a obtenção de valores elevados
383 de diferenciação celular óssea de células tronco mesenquimais de ratos (REN et
384 al., 2017). Em geral, o rGO tem melhor biossegurança e estabilidade do que GO
385 *in vivo*, e sua composição está relacionada a uma menor citotoxicidade (YAN et al.,
386 2017).

387 Assim, para que se possa compreender e recapitular a cascata de
388 cicatrização, defeitos ósseos devem ser realizados *in vivo* por meio de modelos
389 animais apropriados contribuindo com a padronização ou eliminação das variáveis
390 que resultarão em sucesso ou fracasso de materiais de engenharia de tecidos
391 (KHAN e LANE, 2004). Existem muitos modelos animais experimentais que são
392 usados para avaliar substitutos de enxertos ósseos. Os quatro principais são:
393 defeito calvarial, osso longo ou segmentar, defeito cortical parcial e defeito ósseo
394 esponjoso (BIGHAM-SADEGH e ORYAN, 2015).

395 Em 2006, Prado et al. realizaram defeitos ósseos circulares em tíbias de
396 ratos com a finalidade de padronização de um modelo experimental, sugerindo
397 um tamanho do defeito ósseo de 3mm de diametro com avaliações realizadas em
398 menores períodos do que as estabelecidas no estudo (15, 30, 45 dias).

399 A engenharia de tecidos ósseos oferece uma ampla variedade de opções
400 para promover a cicatrização e regeneração óssea, no entanto os esforços para
401 encontrar uma abordagem mais adequada e ideal continuam. Estudos têm
402 demonstrado resultados promissores de regeneração do tecido ósseo, ensejando
403 a perspectiva de que terapias celulares associadas a biomateriais em defeitos
404 ósseos poderão se beneficiar com o progresso dos ensaios *in vivo* e *in vitro*.

405

406 **2. OBJETIVOS**

407

408 **2.1. Objetivo geral**

409

410 Avaliar a utilização da esponja fibrilar de PVDF enriquecida com óxido de
411 grafeno reduzido no reparo de defeito ósseo em tíbia de ratos.

412

413 **2.2. Objetivos específicos**

414

415 • Realizar análise descritiva do processo de reparo ósseo monocortical de
416 3mm de diâmetro em tíbia proximal medial de ratos aos 10, 20 e 30 após a
417 indução do defeito.

418 • Avaliar os níveis séricos de fosfatase alcalina serica (FAL), fosfatase
419 alcalina termoestável (FAte) e fosfatase alcalina óssea (FAO) nos períodos pré e
420 pós-operatórios (10, 20 e 30 dias) após a indução dos defeitos ósseos sem
421 preenchimento, preenchidos com esponja fibrilar de PVDF e os preenchidos com
422 esponja fibrilar de PVDF enriquecida com óxido de grafeno reduzido e compará-
423 los.

424 • Avaliar a neoformação de tecido ósseo, deposição de fibras colágenas,
425 preenchimento das lacunas osteocíticas, presença de osteoblastos, formação de
426 tecido mieloide e presença de infiltrado inflamatório nos períodos 10, 20 e 30 dias
427 após a indução dos defeitos ósseos sem preenchimento, preenchidos com

428 esponja fibrilar de PVDF e os preenchidos com esponja fibrilar de PVDF
429 enriquecida com óxido de grafeno reduzido e compará-los.

430

431 **3. REVISÃO DE LITERATURA**

432

433 **3.1. Tecido e reparo ósseo**

434

435 O tecido ósseo é o principal componente do esqueleto. Protege órgãos
436 vitais localizados na cavidade torácica, caixa craniana e canal raquidiano. Este
437 tecido também proporciona apoio aos músculos esqueléticos, fazendo com que
438 suas contrações resultem em movimentos úteis, além de armazenar substâncias
439 como cálcio, fosfato, e outros íons, liberando-os de forma controlada para
440 manutenção das concentrações nos líquidos corporais (JUNQUEIRA e
441 CARNEIRO, 2019).

442 Este tecido tem origem embrionária a partir de células indiferenciadas do
443 mesênquima. Essas podem originar os múltiplos tecidos mesenquimais, como o
444 conjuntivo, cartilaginoso, adiposo, muscular, mucoso e o hematopoiético
445 (INTROINI, 2011). Sua osteogênese pode acontecer por ossificação
446 intramembranosa (internamente no tecido conjuntivo) ou por ossificação
447 endocondral (no interior de um molde cartilaginoso). As duas formas de
448 desenvolvimento possuem o mesmo mecanismo de deposição e mineralização
449 óssea, dando origem a um tecido ósseo no qual não se distingue a maneira como
450 se formou inicialmente. Os tipos de osteogênese se referem apenas ao
451 microambiente inicial no qual o osso se forma. O osso formado originalmente é
452 chamado de osso primário, que é substituído gradual e continuamente por osso
453 secundário (SAMUELSON, 2007; OVALLE e NAHIRNEY, 2014).

454 O osso é considerado um tipo especializado de tecido conjuntivo,
455 constituído por células e material extracelular calcificado denominado matriz
456 óssea, revestidas externa e internamente por camadas conjuntivas contendo
457 células osteogênicas, chamadas de perióstio e endóstio. A matriz óssea é
458 composta de uma parte orgânica e de uma parte inorgânica. Aproximadamente
459 95% da matriz orgânica é constituída por fibras colágenas, principalmente
460 colágeno tipo I, sendo os proteoglicanos e as glicoproteínas os componentes
461 restantes. Devido a riqueza de fibras de colágeno, essa matriz cora-se pelos

462 corantes seletivos do colágeno e por HE, determinada pela cor vermelho-rosa por
463 eosina. A parte inorgânica compõe cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os
464 íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio. Porém, existem pequenas
465 quantidades de bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A associação de
466 hidroxiapatita e fibras de colágeno proporciona a característica singular de dureza
467 do tecido ósseo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2019).

468 Macroscopicamente verifica-se que o osso é formado por uma parte
469 compacta, o osso compacto, sem cavidades visíveis e em seu interior por uma
470 estrutura esponjosa, o osso esponjoso, com muitas cavidades intercomunicantes.
471 As extremidades dos ossos longos, também chamadas de epífises, são formadas
472 de osso esponjoso revestidas por uma delgada camada superficial de osso
473 compacto. A diáfise, região cilíndrica, é formada quase que em sua totalidade por
474 osso compacto, com uma pequena quantidade de osso esponjoso em sua
475 superfície interna que delimita o canal medular (JUNQUEIRA & CARNEIRO,
476 2019).

477 O osso compacto constitui 80% do esqueleto e forma a camada externa
478 dos ossos. Nele, as fibras de colágeno estão distribuídas na forma de lamelas,
479 que ficam paralelas umas às outras ou se dispõem em camadas concêntricas em
480 torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers. Cada sistema é
481 constituído por um longo cilindro, paralelo ao eixo longitudinal do osso (diáfise).
482 No centro desse cilindro existe o canal de Havers que contém vasos, nervos e
483 tecido conjuntivo frouxo. Esses canais comunicam-se entre si com a cavidade
484 medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais
485 denominados de canais de Volkmann (SILVA, 2009).

486 As células que compõe o tecido ósseo são: células osteoprogenitoras,
487 osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. As células osteoprogenitoras são
488 derivadas do mesênquima e possuem potencialidade para se diferenciarem em
489 osteoblastos. No osso maduro localizam-se no endóstio e revestem os canais de
490 Havers, sendo mais ativas durante o processo de crescimento ósseo (GITIRANA,
491 2004). Os osteócitos são células que se encontram na matriz óssea e ocupam
492 lacunas das quais partem canalículos. Cada lacuna é constituída por apenas um
493 osteócito, que se comunica com outro através de seus prolongamentos, por meio
494 de junções comunicantes por onde passam pequenas moléculas e íons de um
495 para o outro. Outra célula que compõe o tecido ósseo é o osteoblasto, que são

496 encontrados sempre nas superfícies ósseas, dispostos lado a lado, lembrando um
497 epitélio simples e responsável por sintetizar a parte orgânica (colágeno tipo I,
498 proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea, concentrar fosfato de cálcio,
499 participando da mineralização da matriz e na síntese de osteonectina e a
500 osteocalcina, responsáveis por facilitar a deposição de cálcio e estimular a
501 atividade dos osteoblastos. A célula responsável pela reabsorção e remodelação
502 óssea é o osteoclasto, células gigantes multinucleadas e extensamente
503 ramificadas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

504 A reparação é um processo complexo. Porém, bem ordenado é iniciado em
505 resposta a injúrias, resultando em reestabelecimento da estrutura e função do
506 esqueleto (DIMITRIOU et al., 2005; AL-AQL et al., 2008).

507 A forma mais comum da cicatrização das fraturas é a consolidação indireta
508 ou secundária, caracterizada por uma cicatrização óssea endocondral e
509 intramembranosa (GERSTENFELD et al., 2006). Neste processo, assim como na
510 regeneração de outros tecidos, são identificadas fases distintas e que se
511 sobrepõem, sendo estas: fase inflamatória, fase reparadora e fase remodeladora
512 (GRIFFON, 2005; CROSS, 2012).

513 Quando ocorre uma fratura, os vasos sanguíneos se rompem levando a
514 uma hemorragia local, formando posteriormente um hematoma dando início a
515 fase inflamatória com seu influxo de células e liberação de fatores teciduais. Uma
516 vez que essa fase aguda diminui, a fase reparadora é iniciada. Células
517 mesenquimais pluripotentes decorrentes do endóstio, perióstio e tecidos moles
518 circundantes são induzidas e diferenciadas em fibroblastos, condroblastos e
519 osteoblastos. Essas células produzem tecido fibroso, cartilagem e tecido ósseo,
520 respectivamente. A medida que o processo reparador caminha até o ponto final
521 da união óssea clínica, ele se sobrepõe à fase de remodelação. Durante essa
522 fase, o osso desnecessário é reabsorvido e o osso se aproxima de sua forma
523 original de acordo com a lei de Wolff (CROSS, 2012).

524 Outra característica importante é a piezoelectricidade óssea. Fukada e
525 Yasuda (1957) descreveram esse efeito ao demonstrar que o osso desenvolve
526 campos elétricos em sua superfície quando submetido à tensão mecânica. Essa
527 característica ocorre devido ao colágeno, pois mesmo o osso desmineralizado em
528 solução ácida ainda apresenta efeito piezoelétrico podendo gerar sinais elétricos
529 depois de ter sofrido tensão mecânica (BASSET & BACKER, 1962). A

530 compressão óssea causa uma carga negativa que estimula a atividade
531 osteoblástica, enquanto a tensão causa uma carga positiva, estimulando a
532 atividade osteoclástica. Este fenômeno também ilustra o benefício da sustentação
533 de peso durante a consolidação da fratura. O processo de remodelação pode
534 continuar por anos, eventualmente resultando em osso sem evidência histológica
535 ou radiográfica de cicatriz, uma característica compartilhada por poucos tecidos
536 (CROSS, 2012).

537 Deve-se atentar que alguns fatores como a diminuição de suprimento
538 vascular, deficiência no vigor da resposta osteocondral e deficiências da
539 estabilidade ou continuidade física, podem contribuir para o atraso ou
540 impedimento da cicatrização óssea. O uso de fatores bioativos, células e/ou
541 matrizes de suporte pode melhorar o reparo da fratura fornecendo ou estimulando
542 o fator deficiente (EGGER et al., 2014).

543

544 **3.2. Fluoreto de Polivinilideno (PVDF)**

545

546 Mais conhecido por sua sigla PVDF, o fluoreto de polivinilideno é um
547 polímero sintético que possui alta piroeletricidade e piezoeletricidade
548 (DUCHEYNE e HASTINGS, 1984; RIBEIRO et al., 2012).

549 A piezoeletricidade é um fenômeno que ocorre quando materiais sólidos
550 geram carga elétrica em resposta ao estresse mecânico (STEVEN e HENRY,
551 2007). Desta forma, materiais piezoelétricos podem gerar cargas elétricas em
552 resposta a uma tensão aplicada ou a uma deformação mecânica minuciosa,
553 eliminando assim a necessidade de fontes de energia externas para estimulação
554 elétrica (CARDOSO et al., 2018). Essa característica foi descoberta em 1880,
555 quando Jacques e Pierre Curie observaram que um potencial elétrico poderia ser
556 gerado aplicando-se pressão a cristais de quartzo, a sais de Rochelle, e até a
557 cristais de cana de açúcar nomeando este fenômeno de efeito piezo (KARTZIR,
558 2003). Tal fenômeno foi evidenciado no PVDF quando Kawai em 1969 induziu
559 este efeito aplicando um campo elétrico no mesmo (KAWAI, 1969).

560 O PVDF exhibe cinco polimorfos cristalinos, incluindo as fases α e ϵ não
561 polares e as fases polares β , γ e δ , dependendo das condições de cristalização e
562 processamento (MONDAL et al., 2018). Dentre esses polimorfos, a fase β é a

563 mais procurada devido às suas propriedades piezoelétricas e piroelétricas
564 superiores as outras (DAMARAJU et al., 2013; ZADOROSNY et al., 2013).

565 Em meio as técnicas de obtenção de materiais na fase β para aplicações
566 como elemento eletroativo, estão: o estiramento mecânico uni ou biaxial de filmes
567 originalmente na fase α (BRANCIFORTI, 2007; BERA et al., 2016), a cristalização
568 do PVDF a partir da solução, desde que a evaporação do solvente seja lenta
569 (GREGORIO, 2008; BERA et al., 2016), a eletrofiação (electrospinning),
570 considerada a mais popular e que utiliza forças elétricas para produzir fibras
571 poliméricas de diversos diâmetros, e mais recentemente, estudos tem
572 demonstrado sucesso utilizando uma técnica denominada *Solution Blow Spinning*
573 (SBS) (ROTTA et al., 2016; LARIOS et al., 2018). Nessa, a força motriz é gerada
574 pela presença de um gás pressurizado, onde as principais vantagens são o baixo
575 custo de produção, alta taxa de produtividade (CENA et al., 2018) e a não
576 utilização de alta tensão, produzindo fibras de diâmetros semelhantes aos
577 produzidos por eletrofiação (DIAS et al., 2018).

578 As aplicações desse polímero são diversas e dependem da característica
579 distinta que cada fase fornece (BRANCIFORTI, 2007). Algumas delas como seu
580 comportamento eletroativo, boa biocompatibilidade, excelente resistência química
581 e estabilidade térmica, viabilizaram sua utilização em aplicações biomédicas,
582 eletrônicas, ambientais e de captação de energia (RIBEIRO et al., 2015;
583 CARDOSO et al., 2018; MONDAL et al., 2018). Outra característica não menos
584 importante é sua alta hidrofobicidade, fator que pode dificultar determinadas
585 aplicações, pois influencia diretamente na absorção do material. Desse modo,
586 busca-se desenvolver a modificação deste material com a finalidade de fornecer
587 característica hidrofílica e agregar novas propriedades (JANG et al., 2015;
588 LARIOS et al., 2018).

589 Sua utilização em tecido ósseo é interessante pois, como é de
590 conhecimento, o osso desenvolve campos elétricos em sua superfície quando
591 submetido a tensão mecânica. Tal característica foi descoberta por Fukada e
592 Yasuda em 1957, incentivando mais estudos realizados na área.

593 As pesquisas demonstram resultados animadores não só quanto a boa
594 compatibilidade do PVDF e suas associações (DEFTERALI et al., 2016; BARSKI
595 et al., 2017; LI et al., 2018) como também na indução de diferenciação de células-
596 tronco osteogênicas (RIBEIRO et al., 2015; DAMARAJU et al., 2017), ação

597 antimicrobiana, aumento da densidade de osteoblastos (LI et al., 2018) e aumento
598 da adesão de osteoblastos junto a produção de colágeno no local (SZEWCZYK et
599 al., 2019), elucidando o grande potencial deste material por suas propriedades
600 osteoindutoras e aplicações na engenharia de tecidos ósseos.

601

602 **3.3. Óxido de grafeno reduzido**

603

604 A grafita ou grafite, como é popularmente conhecido, é um alótropo do
605 carbono encontrado naturalmente em grande quantidade e apresenta uma
606 estrutura do tipo lamelar, formada por planos de átomos de carbono organizados
607 de forma hexagonal (camadas de grafeno) em hibridização do tipo sp²
608 (MACEDO, 2011).

609 O grafeno e seus compostos são estruturas com alta área de superfície,
610 leve, elasticidade mecânica excepcional, grande mobilidade como transportador,
611 biocompatibilidade, capacidade de funcionalização e baixa resistividade térmica e
612 elétrica (MISRA et al., 2012) encontrado em um simples lápis (CARDOSO, 2017).
613 Inicialmente suas características superiores aos materiais tradicionais
614 encontrados nas principais aplicações da engenharia mecânica, térmica e elétrica
615 (DREYER et al., 2010), levantaram a perspectiva de sua produção de maneira
616 rentável e em larga escala (CARDOSO, 2017).

617 Devido à dificuldade em produzi-lo com propriedades adequadas e em
618 bastante quantidade utiliza-se o óxido de grafeno (GO) e o óxido do grafeno
619 reduzido (rGO), como materiais alternativos ao grafeno (YU et al., 2013).

620 Houve um grande e rápido aumento nas aplicações de óxido de grafeno
621 (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO) no campo biomédico, incluindo
622 administração de drogas, biosensores e ferramentas de diagnóstico. Dentre
623 todas as aplicações, os scaffolds baseados em GO e rGO são um sistema muito
624 promissor que tem chamado a atenção por sua grande projeção clínica em
625 terapias de regeneração de tecidos (RASLAN et al., 2020).

626 O rGO é obtido removendo alguns grupos funcionais parciais de oxigênio
627 do óxido de grafeno (XU et al., 2015). O GO, descoberto a quase 150 anos
628 (BRODIE, 1960), é constituído por uma pequena monocamada de átomos de
629 carbono com formato de favo de mel bidimensional (MEHRALI et al., 2014),
630 proveniente da esfoliação do grafite oxidado (PARK e RUOFF, 2009; DREYER et

631 al., 2010). Alguns outros nomes podem ser dados ao rGO como: Grafeno
632 funcionalizado, grafeno quimicamente modificado, grafeno quimicamente
633 convertido e grafeno reduzido (EDA & CHHOWALLA, 2010).

634 As técnicas mais atrativas utilizadas para obtenção de rGO são as que
635 envolvem processos químicos e térmicos, devido a simplicidade e baixo custo
636 (GANGULY et al., 2011). Porém, na redução química os agentes redutores são
637 tóxicos (ZHAO et al., 2012), produzem um material com baixa proporção
638 Carbono/Oxigênio e folhas de rGO de baixa qualidade (ZHANG et al., 2018). Com
639 o intuito de melhorar sua qualidade, outros métodos de produção de rGO são
640 empregados. O método de redução térmica do GO o reduz termicamente sob
641 vácuo em uma atmosfera inerte ou redutora (BARADARAN et al., 2014), em uma
642 faixa de temperatura entre 300 ° C e 2000 ° C (PEI & CHENG, 2012; WANG et al.,
643 2008). Ainda, pode-se utilizar o aquecimento do GO em forno micro-ondas ou a
644 redução fito-térmica onde se obtêm o rGO com auxílio do feixe de laser direto (LI
645 et al., 2010).

646 Com o avanço das pesquisas, estudos relacionados a biocompatibilidade e
647 resposta celular frente a esses materiais também cresceram. Embora utilizado em
648 diversas áreas, Panzarini et al. (2016) relatam que os resultados sobre a
649 toxicidade ainda são conflitantes. Sabe-se que a toxicidade do GO está
650 relacionada a vários fatores incluindo dose (MISRA, et al., 2012; MITTAL, et al.,
651 2016; CIRIZA et al., 2018), tipo celular envolvido (LV et al., 2012; RASLAN et al.,
652 2020) assim como seu tamanho estrutural lateral (MITTAL et al., 2016). Estes
653 conflitos também são encontrados nos estudos relacionados ao rGO, atribuindo
654 até mesmo as técnicas empregadas para sua obtenção como fatores importantes
655 do nível de citotoxicidade (ZHANG et al., 2018).

656 Paralelamente, outros estudos elucidaram resultados promissores quanto
657 ao comportamento desses materiais no tecido ósseo. Supronowicz et al. (2002)
658 perceberam que poderiam auxiliar na estimulação elétrica de osteoblastos
659 durante a formação do tecido por meio de sua superior condutividade elétrica.
660 Zancanela et al. (2016), notaram a possibilidade de aumentar a formação de
661 nódulos mineralizados e estimular a biomineralização acelerando a regeneração
662 óssea. Peng et al. (2017) promoveram a formação de apatita semelhante ao
663 tecido ósseo melhorando a adesão celular e diferenciação osteogênica e Norahan
664 et al. (2019) ativaram a diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas

665 da medula óssea humana em osteoblastos após 14 dias, mesmo sem a adição de
666 um meio de diferenciação osteogênico.

667

668 **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

669

670 **4.1. Locais de desenvolvimento**

671

672 Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Centro Cirúrgico
673 Experimental do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
674 (UFMS).

675 A síntese do óxido de grafeno reduzido e do PVDF, assim como sua
676 associação, foram realizadas no Laboratório de Nanomateriais e Nanotecnologia
677 Aplicada (LNNA), localizado no Instituto de Física (INFI) da UFMS.

678 As análises de fosfatase alcalina sérica foram realizadas no Laboratório de
679 Patologia Clínica, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
680 (FAMEZ) da UFMS.

681 As análises histomorfológicas foram realizadas no Laboratório de Histologia
682 do Instituto de Biociências, localizado na UFMS.

683

684 **4.2. Síntese do Fluoreto de polivinilideno**

685

686 A síntese foi realizada pela técnica denominada *Solution Blow Spinningg*
687 (SBS) desenvolvida por Medeiros et al. (2009). O filme fibroso de PVDF foi obtido
688 a partir de soluções contendo: PVDF, N, N-dimetilformamida (DMF) e acetona em
689 quantidades de 2,4 gramas, 16mL e 4mL respectivamente. Primeiramente foi
690 adicionado 16mL de DMF em um Becker, adicionando gradativamente pequenas
691 quantidades de PVDF sob agitação constante em temperatura ambiente 25°C
692 com auxílio de um agitador magnético. Após a completa dissolução dos 2,4
693 gramas de PVDF, foi acrescentado 4mL de acetona na solução inicial. Essa
694 solução foi aspirada em uma seringa de 10mL que por sua vez foi encaixada em
695 uma bomba de infusão de seringa, ajustando a taxa de infusão em 0,11mL/min,
696 de acordo com as opções oferecidas na programação do aparelho. Em seguida,
697 uma agulha 22G foi acoplada à seringa instalada na bomba e encaixada no
698 aerógrafo utilizando uma pressão de gás de 120 kPa. As fibras produzidas foram

699 coletadas em papel alumínio inserido em um coletor cilíndrico girante, a uma
700 distância de 15 cm da agulha ejetora.

701

702 **4.3. Síntese do óxido de grafeno reduzido e Associação com o PVDF**

703

704 A síntese foi realizada por esfoliação química do grafite pelo método
705 modificado de Hummer's descrito por Hirata et al. (2004), onde o grafite é
706 misturado ao nitrato de sódio em um recipiente resfriado a zero grau Celsius. Na
707 sequência, adicionou-se ácido sulfúrico sob agitação homogênea e em seguida,
708 adicionou-se gradualmente permanganato de potássio nessa solução, de modo
709 que a temperatura não ultrapasse 20 °C. Após duas horas de reação a solução foi
710 removida do banho de zero grau Celsius, mas permanecendo sob agitação por 5
711 dias. Como resultado, uma pasta viscosa de cor marrom avermelhada foi obtida.
712 Então, misturou-se essa pasta a uma solução aquosa com 5% em massa de
713 H₂SO₄, deixando-se reagir por duas horas. Na sequência, foram adicionados
714 cerca de 30% em massa de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), reagindo por mais
715 duas horas.

716 A purificação ocorreu com a dispersão e precipitação de toda a mistura em
717 solução aquosa, com 3 e 0,5% de H₂SO₄ e H₂O₂, respectivamente. Após dois dias
718 de precipitação, o sobrenadante da solução foi removido e descartado. Esse
719 processo foi repetido dez vezes. Para finalizar, um pequeno volume da pasta
720 precipitada foi disperso em água deionizada por sonicação, obtendo-se assim o
721 óxido de grafeno. Para garantir a homogeneidade de solução que contém o óxido
722 de grafeno, o material particulado precipitado foi removido. Assim, restaram na
723 solução apenas flocos de monocamadas de óxido de grafeno, ou até mesmo
724 flocos com poucas camadas (< 5), ficando estáveis em água por longos períodos.
725 Em seguida foi realizada a fragmentação do óxido de grafeno com auxílio de
726 ultrassom de alta potência durante 72 horas, seguida de filtração em membrana
727 de acetato de celulose com 220nm resultando na obtenção de flocos com menos
728 de 220nm de óxido de grafeno.

729 Após sua produção, este foi transferido para uma placa de Petri e colocado
730 em uma estufa a 40°C durante 24 horas para secagem. Após a secagem, o
731 material seco foi retirado da placa de Petri com auxílio de uma espátula, fazendo
732 movimentos de fricção da espátula no material. Esse produto foi levado ao forno

733 tubular para então passar pelo tratamento térmico em uma atmosfera inerte com
734 fluxo de argônio, a uma temperatura de 200°C durante 20 minutos, obtendo como
735 resultado o óxido de grafeno reduzido.

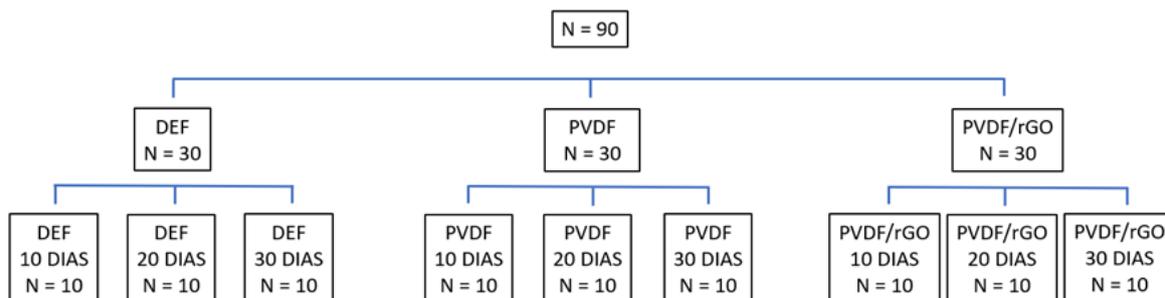
736 Após a obtenção dos materiais, o óxido de grafeno reduzido foi introduzido
737 na solução de PVDF. Para a dispersão do pó de óxido de grafeno reduzido foi
738 utilizado uma ponteira ultrassônica da marca Eco-Sonics com frequência
739 ultrassônica de 20 kHz com micropona de titânio de 4mm de diâmetro operando
740 a uma potencia de 50W. Primeiramente foi preparada uma solução de 5ml de
741 DMF para dispersão do rGO na proporção de 1mg em relação a massa de PVDF.
742 A dispersão resultante foi sonicada durante 20 minutos em intervalos intercalados
743 de 5 minutos. Enquanto isso o PVDF foi dissolvido, sob agitação e aquecimento a
744 70°, em DMF (40%). Após o processo, verteu-se a solução contendo a dispersão
745 no bequer contendo o polímero dissolvido. Desta forma a solução concentrada do
746 polímero dissolvido passou a ter concentração de 20%. Após a homogeneização
747 da mistura em agitação magnética a solução foi levada para o processo de
748 obtenção dos nanocompositos.

749

750 **4.4 Animais e Grupos experimentais**

751

752 O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da
753 proposta registrada com o número 1022/2019 em 29 de março de 2019. Foram
754 utilizados noventa ratos da linhagem *Wistar albino (Rattus norvegicus)*, machos
755 adultos com idade aproximada de três meses, e peso de 260 a 350 gramas,
756 fornecidos pelo biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Esses
757 foram mantidos com dieta à vontade e alojados em caixas apropriadas para a
758 espécie com forragem de maravalha substituída regularmente. Os animais foram
759 distribuídos aleatoriamente em 3 grupos de 30 animais: DEF (Controle), PVDF e
760 PVDF/rGO, que por sua vez foram subdivididos conforme o tempo de avaliação
761 (10, 20 e 30 dias) em 3 grupos de 10 animais (Figura 1).



762

763 Figura 1. Distribuição dos animais em seus grupos.

764

765 **4.5. Período pré-operatório**

766

767 Os animais passaram por um período de adaptação visando o ajuste dos
 768 horários de alimentação, limpeza e obtenção do peso/idade pré-determinados. O
 769 período de duração dessa etapa foi de 20 dias. Antecedendo o procedimento
 770 cirúrgico, os animais foram distribuídos aleatoriamente. Esta seleção foi realizada
 771 identificando os animais inicialmente com números de “1” a “90” para
 772 posteriormente sortear os números que ficariam em cada grupo. Em seguida os
 773 animais foram identificados quanto ao seu grupo correspondente com auxílio de
 774 uma ficha de identificação fixada em sua caixa, contendo a sigla do grupo, o dia
 775 da cirurgia e o dia da eutanásia.

776

777 **4.6. Anestesia**

778

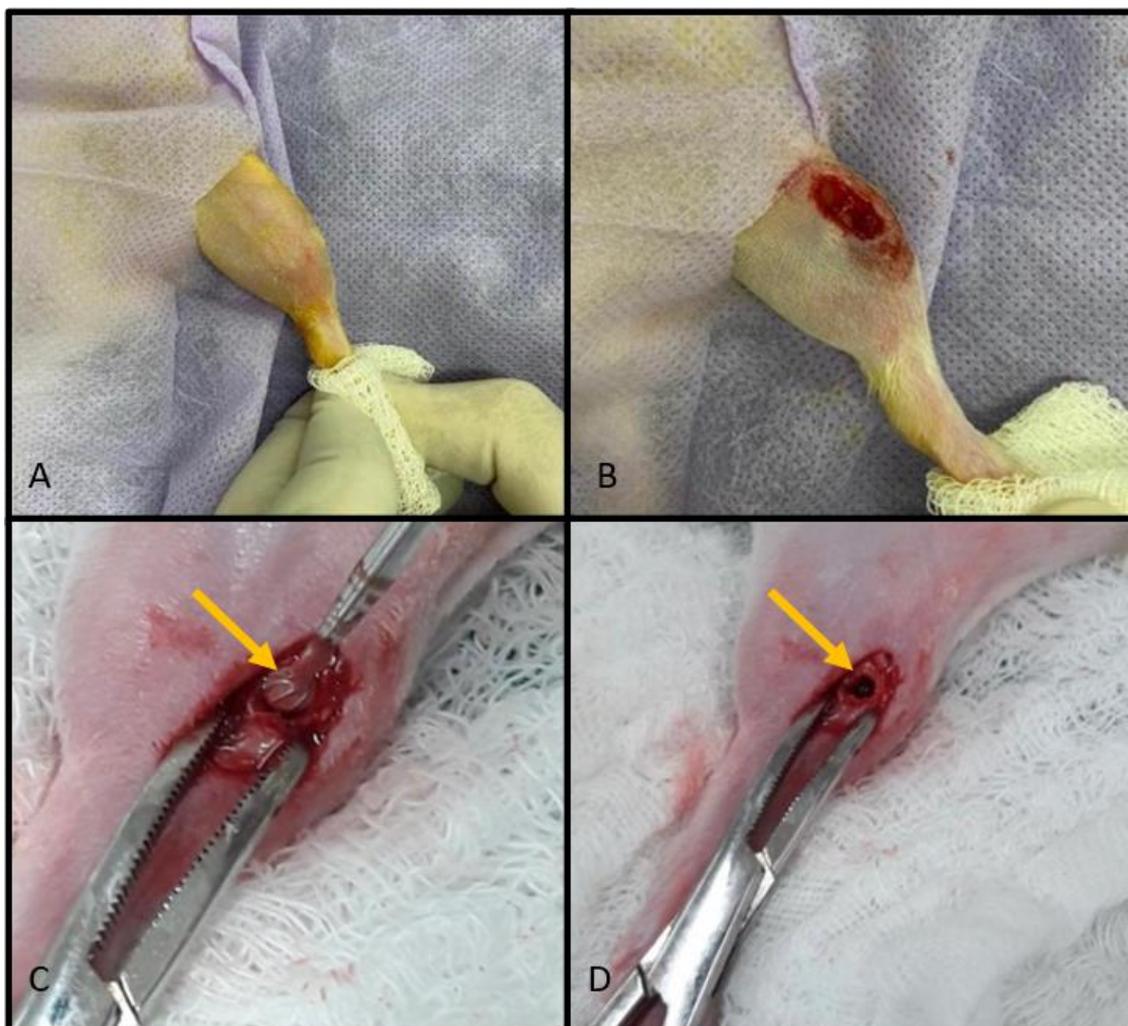
779 Os animais foram induzidos em uma câmara de indução do aparelho
 780 inalatório de experimentação com isoflurano vaporizado a 4%. Após a indução foi
 781 administrado cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®) na dose de 75mg/kg por via
 782 intraperitoneal em associação com cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®) na dose de
 783 7mg/kg, calculada individualmente conforme o peso de cada animal. A
 784 manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano vaporizado em 2% com
 785 auxílio de uma máscara própria para espécie.

786

787 **4.7. Indução do Defeito Ósseo e Aplicação dos biomateriais**

788

789 Sob técnica asséptica, foi realizada incisão da pele, na face crânio-medial
790 proximal da tíbia esquerda, de aproximadamente 2 cm, para confecção do defeito
791 ósseo (Figura 2A, 2B). Após o acesso, foi realizado um defeito ósseo utilizando
792 um Drill (Cãomédica®) de velocidade controlada por pedal (até 33000 rpm),
793 equipada com broca esférica em aço inox (CãoMedica®) de 3mm (Figura 2C). O
794 defeito ósseo foi produzido na diáfise proximal sob irrigação contante de solução
795 fisiológica e se estendeu do periósteo até o canal medular (Figura 2D).



796
797 Figura 2. Indução do defeito ósseo. A) Membro pélvico direito preparado para o procedimento. B)
798 Incisão crânio-medial de pele e subcutâneo. C) Perfuração da cortical medial com broca esférica
799 (seta). D) Defeito ósseo monocortical medial em tíbia (seta).

800

801 Após confecção do defeito ósseo, esses foram tratados conforme o grupo
802 do animal da seguinte forma:

803

- 804 • Grupo DEF – O defeito ósseo não foi recoberto, sendo certificado o controle
805 hemostático, apenas foi realizada sutura simples na pele.
- 806 • Grupo PVDF – O defeito ósseo foi tratado com a esponja fibrilar de PVDF e
807 sutura simples da pele.
- 808 • Grupo PVDF/rGO – O defeito ósseo foi tratado com a esponja fibrilar de PVDF
809 enriquecida com óxido de grafeno e sutura simples da pele.

810 Em todos os animais a sístese da pele foi realizada utilizando fio de Nylon
811 (SHALON®) 4-0 no padrão Sultan.

812

813 **4.8. Período Pós-operatório**

814

815 Após o término da cirurgia todos os animais foram tratados com
816 Cetoprofeno 5mg/Kg via subcutânea a cada 24 horas durante 2 dias, Morfina
817 5mg/Kg via subcutânea (1 aplicação), enrofloxacina 10mg/Kg via intramuscular (1
818 aplicação) e rifamicina spray a cada 24 horas durante 5 dias na ferida cirúrgica.
819 Após 6 horas das primeiras aplicações, foi administrado tramadol 12,5mg/kg via
820 subcutânea a cada 12 horas durante 48 horas.

821

822 **4.9. Análise de fosfatase alcalina**

823

824 As amostras de sangue foram obtidas após a indução anestésica dos
825 animais e aos 10, 20 e 30 dias de pós-operatório (eutanásia). As amostras obtidas
826 após a indução anestésica foram de aproximadamente 2 mL de sangue do plexo
827 orbital. O sangue foi armazenado em tubos coletores e encaminhados ao
828 laboratório de Patologia Clínica. Para as amostras obtidas após indução da
829 osteotomia, foi realizada a punção cardíaca com auxílio de uma seringa de 3 mL e
830 agulha 26G. O animal foi eutanasiado após a punção cardíaca. Os valores das
831 concentrações de fosfatase alcalina óssea foram obtidos utilizando o método de
832 termoestabilidade térmica sugerido por Burtis & Ashwood (1998).

833

834 **4.10. Protocolo de eutanásia e descarte**

835

836 Os animais foram induzidos com isoflurano em alta vaporização até que se
837 atingisse plano profundo de anestesia. Ato contínuo, foi induzida a parada
838 cardiopulmonar aplicando 1 ml de cloreto de potássio 10% via intracardiaca.

839 Após a eutanásia foi coletado o membro pélvico esquerdo para as outras
840 avaliações.

841

842 **4.11. Análises histomorfológicas**

843

844 Os membros pélvicos foram inicialmente dissecados para coleta dos
845 fragmentos ósseos. Uma vez a tíbia isolada dos tecidos circundantes, foi
846 realizada a desarticulação fêmorotibial e tíbio-társica e o fragmento foi imerso em
847 formaldeído tamponado a 10%.

848 As amostras foram preparadas para cortes histológicos de 4 micrômetros
849 de espessura e coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e Tricômio de
850 Masson, descrito por Prophet et al. (1992), para observação em microscopia
851 óptica. A interpretação das análises histológicas foi realizada mediante seleção de
852 critérios de Costa et al. (2015). Os critérios analisados foram: neoformação de
853 tecido ósseo, deposição de fibras colágenas, preenchimento das lacunas
854 osteocíticas, presença de osteoblastos, formação de tecido mieloide e presença
855 de infiltrado inflamatório, sendo, para cada critério, atribuído um número
856 correspondente à proporção observada.

857

858 Quadro 1 – Escore histológico segundo Costa et al. (2015), modificado.

NEOFORMAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO	
Ausência de neoformação óssea	0
Presença de menos de 25% de neoformação de tecido ósseo	1
Presença de 25% a 50% de neoformação de tecido ósseo	2
Presença de mais de 50% de neoformação de tecido ósseo	3
DEPOSIÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS	
Ausência de fibras colágenas	0

Presença de menos de 25% de deposição de fibras colágenas	1
Presença de 25% a 50% de deposição de fibras colágenas	2
Presença de mais de 50% de deposição de fibras colágenas	3
PREENCHIMENTO DAS LACUNAS OSTEOCÍTICAS	
Sem preenchimento das lacunas osteocíticas	0
Presença de menos de 25% de preenchimento das lacunas osteocíticas	1
Presença de 25% a 50% de preenchimento das lacunas osteocíticas	2
Presença de mais de 50% de preenchimento das lacunas osteocíticas	3
PRESENÇA DE OSTEOBLASTOS	
Ausência de osteoblastos	0
Presença de menos de 25% de osteoblastos	1
Presença de 25% a 50% de osteoblastos	2
Presença de mais de 50% de osteoblastos	3
FORMAÇÃO DE TECIDO MIELOÍDE	
Ausência de tecido mieloide	0
Presença de menos de 25% de tecido mieloide	1
Presença de 25% a 50% de tecido mieloide	2
Presença de mais de 50% de tecido mieloide	3

mieloide	
PRESENÇA DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO	
Ausência de infiltrado inflamatório	0
Presença de menos de 25% de infiltrado inflamatório	1
Presença de 25% a 50% de infiltrado inflamatório	2
Presença de mais de 50% de infiltrado inflamatório	3

859

860 Cada score foi checado três vezes para confirmar a consistência da
861 graduação aferida a cada amostra. A lâmina foi avaliada em toda a sua extensão.

862 A análise descritiva morfológica foi realizada pelo método visual da
863 interface de implantação do biomaterial.

864

865 **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

866

867 Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste Tukey para
868 os valores da FA e seus subtipos. Para as análises histológicas foi realizado o
869 teste Kruskal wallis seguido de teste Dunn. As diferenças foram consideradas
870 estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

871

872 **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

873

874 **6.1. Modelo experimental**

875

876 O modelo experimental de defeito ósseo monocortical em tibia proximal de
877 ratos *wistar* demonstrou algumas limitações. Foram excluídos 36 animais do
878 estudo conforme os fatores demonstrados a seguir (Figura 3). Inicialmente, devido
879 a proporção do tamanho da broca esférica em relação a argura que a região
880 óssea apresentava, houve uma tendência em realizar os defeitos em regiões mais
881 proximais da tibia (Figura 4). Essa região apresenta grande quantidade de osso
882 esponjoso e poderia interferir nas avaliações pois o processo de consolidação

883 aconteceria de forma mais eficiente do que os realizados em regiões mais distais.
 884 Nestas condições, 4 animais pertencentes ao grupo DEF foram excluídos. Quanto
 885 a mortalidade ocorrida no estudo, 2 animais morreram durante o procedimento
 886 anestésico no grupo DEF e 3 animais nas primeiras 24 horas após o
 887 procedimento cirurgico, desses últimos 1 do grupo PVDF e 2 do grupo
 888 PVDF/rGO. Em 18 animais foram identificadas fraturas nas primeiras 24 horas
 889 (Figura 5). Desses, 6 no grupo DEF, 5 no grupo PVDF e 7 no grupo PVDF/rGO. A
 890 deiscência de pontos também foi observada. Essa alteração foi identificada nas
 891 primeiras 24 horas após a cirurgia em 1 animal do grupo DEF, 1 animal do grupo
 892 PVDF e 2 do grupo PVDF/rGO. Essas alterações determinaram a exclusão
 893 desses pacientes das avaliações. Para as análises estatísticas foram excluídos 3
 894 animais do grupo PVDF e 2 animais do grupo PVDF/rGO com o intuito de igualar
 895 as variáveis analisadas. Com essas exclusões, o desenho experimental do estudo
 896 foi modificado para um numero total de 54 animais (Figura 6).

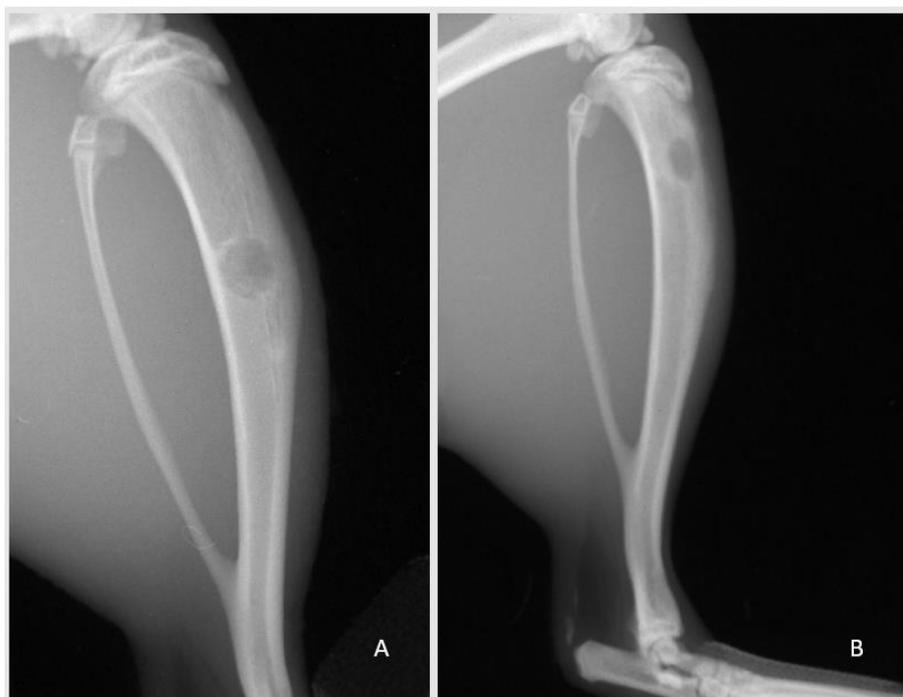
897

	Defeito inadequado	Óbito	Fratura	Deiscência	Exclusão	Total
DEF	4	2	6	1	0	13
PVDF	0	1	5	1	3	10
PVDF/rGO	0	2	7	2	2	13
Total	4	5	18	4	5	36

898

899 Figura 3 – Quantidade de animais excluídos de cada grupo em cada variável.

900



901

902 Figura 4 – Defeitos monocorticais. A) Localização correta do defeito. B) Localização metafisária
903 proximal indesejada.

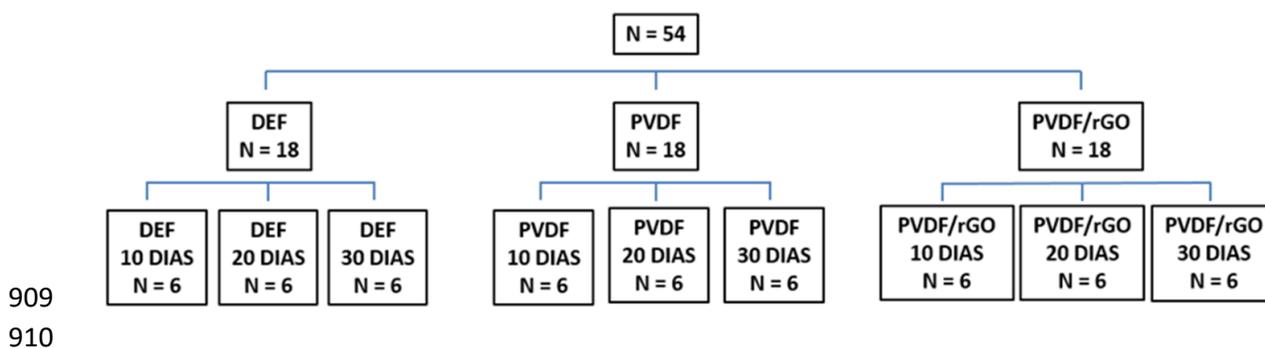
904



905

906 Figura 5 – Fraturas. A) Fratura completa de tíbia e fíbula em diáfise com desalinhamento do eixo
907 anatômico. B) Fratura completa de tíbia em diáfise com pouco desvio do eixo anatômico.

908



911 Figura 6. Nova distribuição dos animais em seus grupos após as exclusões.

912

913 Neste estudo, instituiu-se o defeito ósseo monocortical de tamanho crítico
 914 em tíbia de ratos pois o modelo possui características importantes para o
 915 procedimento cirúrgico: sua diáfise apresenta-se superficialmente na face medial
 916 do membro pélvico, facilitando o acesso cirúrgico com poucos danos a
 917 musculatura, vasos e nervos adjacentes. O defeito ósseo monocortical dispensa a
 918 utilização de fixadores ósseos. Além disso, o modelo experimental selecionado é
 919 padronizado na literatura e a tíbia possui forças fisiológicas atuantes como tensão
 920 muscular e compressão pelo peso do corpo (NAJJAR e KAHN, 1977; PRADO,
 921 2006; NETO, et al. 2010), fazendo com que ocorresse um possível benefício do
 922 processo de consolidação óssea com o efeito piezoelétrico do material estudado.
 923 O tamanho do defeito foi selecionado de acordo com os resultados encontrados
 924 por Prado (2006). Em seu estudo foram avaliados diferentes tamanhos de
 925 defeitos monocorticais em tíbia de ratos (2mm, 3mm e 3,5mm de diâmetro) além
 926 da tentativa de um grupo piloto com diâmetro de 4mm que não obteve sucesso
 927 devido ao alto índice de fraturas ocorridas (10 em 12 animais operados). As
 928 avaliações de Prado (2006) foram realizadas em diferentes tempos (15, 30 e 35
 929 dias) sendo recomendado ao final do estudo a utilização do tamanho
 930 intermediário (3mm) com tempos de avaliações menores, relatando apenas a
 931 ocorrência de 1 caso de fratura no grupo 3mm. Assim, em nosso estudo foram
 932 realizados defeitos ósseos de 3mm de diâmetro e avaliados aos 10, 20 e 30 dias
 933 após sua indução.

934

935 **6.2. Fosfatase alcalina e fosfatase alcalina óssea**

936

937 O volume de sangue obtido e o método de coleta foram selecionados de
 938 acordo com o peso corporal do animal e a facilidade de obtenção da amostra pelo
 939 plexo orbital. Segundo Everds & Ramaiah (2017), como uma orientação geral,
 940 para uma única coleta a cada 2 a 3 semanas podem ser obtidos de 10 a 15% do
 941 volume total do sangue do animal sem que haja efeitos adversos como anemia,
 942 hipoxia ou hipotensão. O volume de sangue circulante do rato é estimado em
 943 6,4% do peso corporal ou 57 a 69 ml/Kg. Em nosso estudo, não foram
 944 observados problemas relacionados ao volume de sangue coletado, uma vez que
 945 os animais foram pesados anteriormente.

946 Diversos estudos têm demonstrado que existem variações de valores
 947 hematológicos e bioquímicos encontrados em diferentes biotérios (PINHEIRO et
 948 al., 1998; MELO et al., 2012; LIMA et al., 2014). Essas variações relacionam-se a
 949 diferenças intraespécies decorrentes da localização geográfica, do manuseio,
 950 gênero, linhagem, genótipo e podem ainda ser influenciadas por outros fatores
 951 como idade, dieta, ambiente, entre outros (NUNES et al., 1994; PINHEIRO et al.,
 952 1998; MELO et al., 2012). No presente estudo os valores encontrados de FAL
 953 (Quadro 2) foram próximos ao encontrado por Silva (2015).

954

955 Quadro 2 - Resultados das análises bioquímicas sanguíneas pré-operatórias de
 956 ratos winstar machos.

Análise	Média U/L (n=53)	S.D (n=54)	Mínimo U/L	Máximo U/L
FAL	172,9	62,1	88	378
FAte	76,2	24,3	35	174
FAO	96,7 U/L (FAL-FAte) ou 44,0% (FAte/FAL)			

957 *FAL – Fosfatase Alcalina. FAte – Fosfatase Alcalina Termo estável. FAO – Fosfatase Alcalina
 958 Óssea.

959

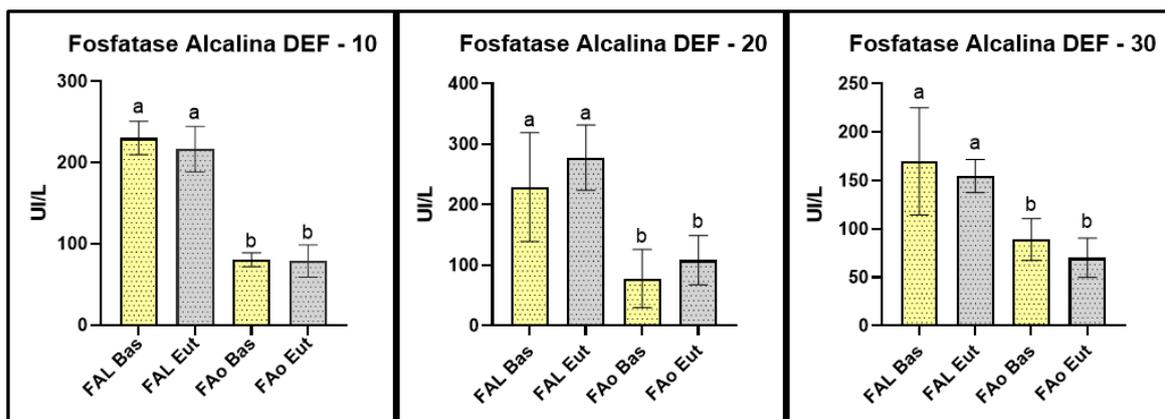
960 Silva (2015) teve como objetivo a caracterização de um modelo
 961 experimental para doença renal em ratos obtidos no biotério central da UFMS,
 962 onde os valores de FAL demonstraram variações conforme o tempo de coleta: 24
 963 horas (199,75 U/L), 5 dias (172,75 U/L), 7 dias (145,25 U/L), 14 dias (115,50 U/L)

964 e 21 dias (141,25 U/L). Também, a autora sugere que a tendência de diminuição
 965 desses valores poderia estar associada com o aumento da idade dos animais.

966 Para a obtenção dos valores relacionados a FAO, as amostras de soro
 967 foram aquecidas a 56°C durante 10 minutos. Vários estudos demonstraram que a
 968 fosfatase alcalina óssea é mais termolável que a hepática (CADEAU e MALKIN,
 969 1973; FITZGERALD et al., 1969; MOSS e WHITBY, 1975; MOSS, 1982; MATOS
 970 e SANTANA, 1996; GOES, et al. 2012). Assim, quando aquecidas, a fosfatase
 971 alcalina termoestável permanece. O valor obtido após o aquecimento (FAet) pode
 972 ser subtraído do valor original da FAL revelando o valor da FAO (GOES, et al.
 973 2012). Este valor pode ser também expresso em percentual da atividade original,
 974 ou seja, quanto menor for esse valor, maior será a atividade da fosfatase alcalina
 975 óssea contida na amostra (CADEAU e MALKIN, 1973; FITZGERALD et al., 1969;
 976 MOSS e WHITBY, 1975; MOSS, 1982; MATOS e SANTANA, 1996). No presente
 977 estudo o valor encontrado nas amostras coletadas no tempo pré-cirúrgico foi 44%,
 978 sugerindo uma maior concentração de FAO presente em relação aos outros
 979 subtipos.

980 As comparações realizadas dentro do grupo DEF entre os valores obtidos
 981 de FAL no momento pré-cirúrgico e após a eutanásia e nos diferentes tempos (10,
 982 20 e 30 dias), não tiveram resultados estatisticamente significativos assim como
 983 os resultados de FAO quando confrontados (Figura 7).

984



985

986 Figura 7 – Representações estatísticas das comparações de FAL e FAO antes do procedimento
 987 (Bas) e no momento da eutanásia (Eut) em cada tempo de avaliação do grupo DEF.

988

989 Estes resultados sugerem que neste estudo a atividade da FAL e FAO não
 990 evidenciaram uma resposta osteoblástica suficiente para elevar estatisticamente
 991 os valores avaliados (Quadro 3).

992

993 Quadro 3 - Resultados das médias dos valores bioquímicos sanguíneos do grupo
 994 DEF.

Análise	10 dias Média / SD	20 dias Média / SD	30 dias Média / SD
FAL Bas (UI/L)	230,2 / 20,6	229,3 / 89,8	170 / 53,3
FAL Eut (UI/L)	216,5 / 28,2	277,8 / 54,1	154,8 / 17,2
FAO Bas(UI/L)	80,5 / 8,6	78,2 / 48,1	89,2 / 21,5
FAO Eut (UI/L)	79 / 19,9	108,5 / 40,8	70,2 / 20,3

995 *FAL Bas – Fosfatase alcalina sérica basal. FAL Eut – Fosfatase alcalina sérica eutanásia. FAO
 996 Bas – Fosfatase alcalina óssea basal. FAO Eut – Fosfatase alcalina óssea eutanásia.

997

998 Sabe-se que estas enzimas estão presentes nos osteoblastos e
 999 membranas vesiculares extracelulares e que contribuem com o processo de
 1000 mineralização óssea promovendo o crescimento de cristais de hidroxiapatita após
 1001 a protrusão dos cristais na matriz extracelular (ORIMO e SHIMADA, 2008; NIZET
 1002 et al. 2020) e é considerada um marcador de diferenciação osteoblástica,
 1003 expresso durante as fases iniciais do processo de consolidação óssea (JAFARY,
 1004 et al. 2017).

1005 Quando comparados os mesmos valores no grupo PVDF – 10 dias
 1006 (Quadro 4), a FAL e FAO foram maiores no momento pré-cirúrgico em relação
 1007 aos valores encontrados no momento da eutanásia. No grupo PVDF – 20 dias não
 1008 houve diferença estatística entre os valores de FAL porém os valores de FAO
 1009 obtiveram resultados estatisticamente diferentes, demonstrando um aumento
 1010 significativo dos valores após a eutanásia. Este aumento foi evidenciado também
 1011 no grupo PVDF – 30 dias (Figura 8).

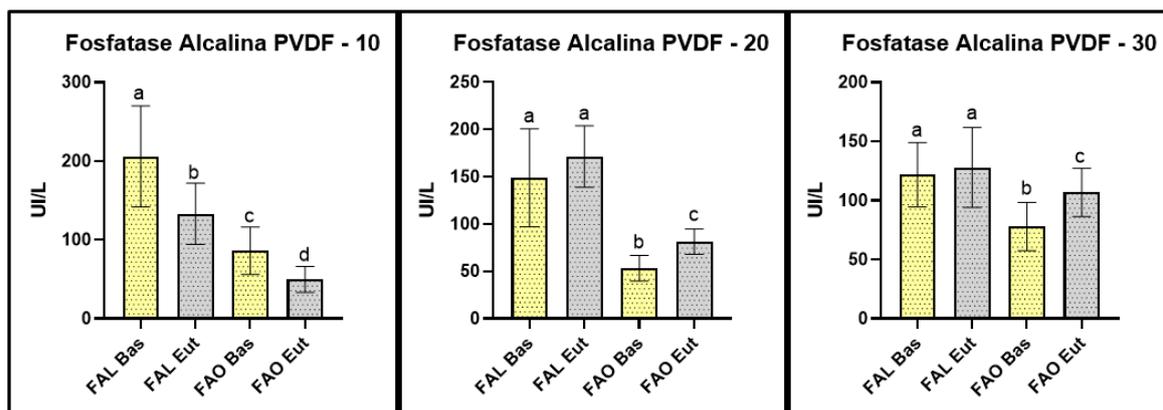
1012

1013 Quadro 4 - Resultados das médias dos valores bioquímicos sanguíneos do grupo
 1014 PVDF.

Análise	10 dias Média / SD	20 dias Média / SD	30 dias Média / SD
FAL Bas (UI/L)	206 / 64,2	148,8 / 51,9	121,8 / 27,2

FAL Eut (UI/L)	133 / 38,8	171,3 / 32,5	128 / 33,9
FAO Bas(UI/L)	86 / 30	53,2 / 13,6	77,8 / 20,4
FAO Eut (UI/L)	49,7 / 16,4	81,2 / 13,5	106,8 / 20,4

1015 *FAL Bas – Fosfatase alcalina sérica basal. FAL Eut – Fosfatase alcalina sérica eutanásia. FAO
 1016 Bas – Fosfatase alcalina óssea basal. FAO Eut – Fosfatase alcalina óssea eutanásia.
 1017



1018
 1019 Figura 8 – Representações estatísticas das comparações de FAL e FAO antes do procedimento
 1020 (Bas) e no momento da eutanásia (Eut) em cada tempo de avaliação do grupo PVDF.
 1021

1022 Considerando as propriedades piezoelétricas do PVDF estes resultados
 1023 podem estar relacionados a uma possível estimulação dos osteoblastos. Estas
 1024 células podem ser ativadas em regiões negativamente polarizadas (CROSS,
 1025 2012). Kitsara et al. (2019) sugerem que a simples adesão celular osteoblastica
 1026 em scaffolds de PVDF podem gerar um estresse mecânico capaz de uma
 1027 autoestimulação celular. Damaraju et al. (2013) relataram que após a
 1028 diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais houve um pico da
 1029 atividade de fosfatase alcalina entre 7-14 dias, diminuindo enquanto a
 1030 mineralização aumentava.

1031 Os resultados encontrados no grupo PVDF/rGO – 10 não demonstraram
 1032 diferenças estatísticas quando comparados os valores de FAL e FAO antes e
 1033 após a eutanásia assim como no Grupo PVDF/rGO – 20. O grupo PVDF/rGO – 30
 1034 demonstrou diferença estatística nas avaliações dos valores tanto de FAL quanto
 1035 de FAO (Figura 9).

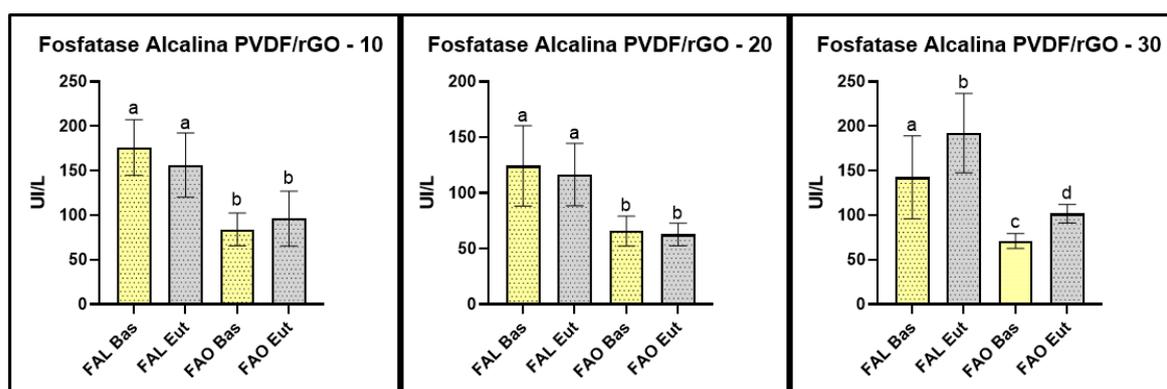
1036

1037 Quadro 5 - Resultados das médias dos valores bioquímicos sanguíneos do grupo
 1038 PVDF/rGO.

Análise	10 dias Média / SD	20 dias Média / SD	30 dias Média / SD
FAL Bas (UI/L)	176,2 / 31,3	124,3 / 36	142,5 / 46,7
FAL Eut (UI/L)	156,3 / 36,1	116,5 / 28,2	192,3 / 44,5
FAO Bas(UI/L)	84 / 18,3	65,7 / 13,4	71 / 8,3
FAO Eut (UI/L)	96,2 / 30,8	62,7 / 10,2	101,7 / 10,4

1039 *FAL Bas – Fosfatase alcalina sérica basal. FAL Eut – Fosfatase alcalina sérica eutanásia. FAO
 1040 Bas – Fosfatase alcalina óssea basal. FAO Eut – Fosfatase alcalina óssea eutanásia.

1041



1042

1043 Figura 9 – Representações estatísticas das comparações de FAL e FAO antes do procedimento
 1044 (Bas) e no momento da eutanásia (Eut) em cada tempo de avaliação do grupo PVDF/rGO.

1045

1046 Estes resultados sugerem um possível efeito tardio na atividade
 1047 osteoblástica provavelmente ocasionado pela associação dos biomateriais,
 1048 modificando suas características piezoelétricas ou até mesmo pelas
 1049 características individuais do rGO obtido, já que modificações em sua estrutura
 1050 durante o processo de redução do GO, ainda podem ocasionar uma oxidação da
 1051 membrana celular (ZHANG et al., 2018).

1052

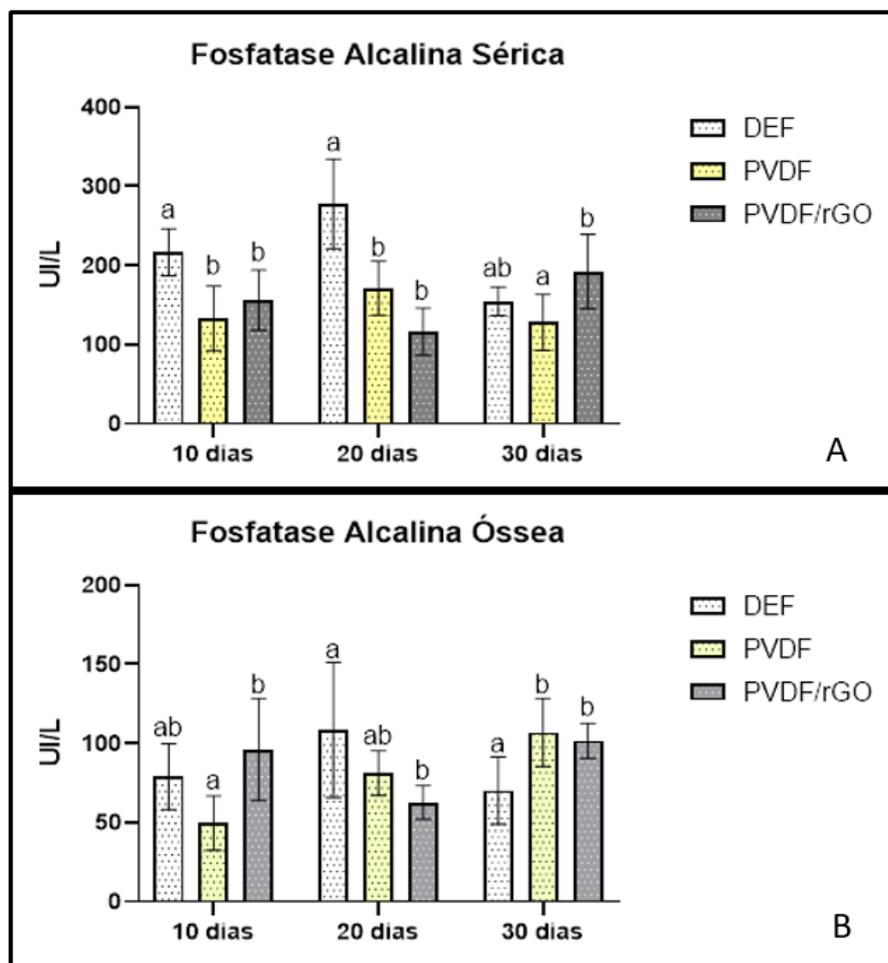
1053 As análises realizadas entre os grupos aos 10 dias, evidenciaram uma
 1054 diminuição dos valores de FAL dos grupos PVDF e PVDF/rGO em relação ao
 1055 DEF ($P < 0,05$). Ainda, o grupo PVDF apresentou valores menores estatisticamente
 1056 de FAO do que o grupo PVDF/rGO. Estes resultados sugerem uma possível
 1057 interferência dos outros subtipos como por exemplo o hepático, intestinal
 encontrados sistemicamente já que a FAO não acompanhou este aumento.

1058

1059 Aos 20 dias, as avaliações de FAL seguiram os resultados estatísticos
 1060 encontrados aos 10 dias ($DEF > PVDF = PVDF/rGO$), porém nas análises de FAO
 1061 foram detectados valores maiores do grupo DEF apenas em relação ao grupo
 PVDF/rGO ($P < 0,05$) indicando que este último tem um efeito mais contínuo na

1062 atividade de FAO. Aos 30 dias o grupo PVDF/rGO apresentou valores maiores de
 1063 FAL em relação ao grupo PVDF porém semelhantes estatisticamente ao grupo
 1064 DEF. Quando avaliados os valores de FAO, os grupos PVDF e PVDF/rGO
 1065 apresentaram valores maiores em relação ao grupo DEF e semelhantes entre si,
 1066 evidenciando o comportamento tardio desses materiais nos valores encontrados
 1067 neste estudo (Figura 10).

1068



1069

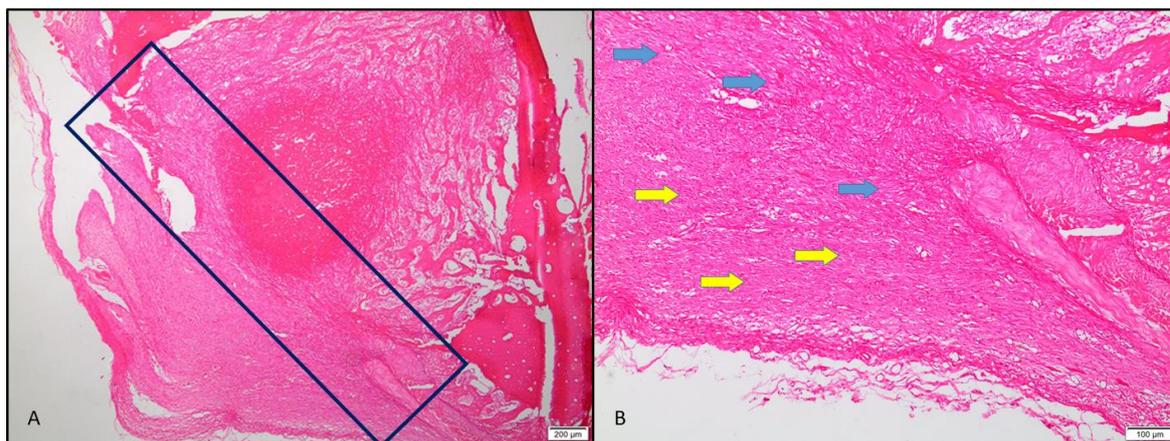
1070 Figura 10 – Representações estatísticas das comparações entre os grupos em seus respectivos
 1071 tempos. A) Fosfatase Alcalina Sérica. B) Fosfatase Alcalina Óssea.

1072

1073 6.3 Análises Histológicas

1074

1075 As análises realizadas dentro do grupo DEF demonstraram aos 10 dias,
 1076 preenchimento do defeito ósseo com predominância de fibras colágenas e
 1077 presença de infiltrado inflamatório, caracterizando um processo inicial de
 1078 consolidação óssea (Figura 11).



1079

1080

1081

1082

1083

1084

1085

1086

1087

1088

1089

1090

1091

1092

1093

1094

1095

1096

1097

1098

1099

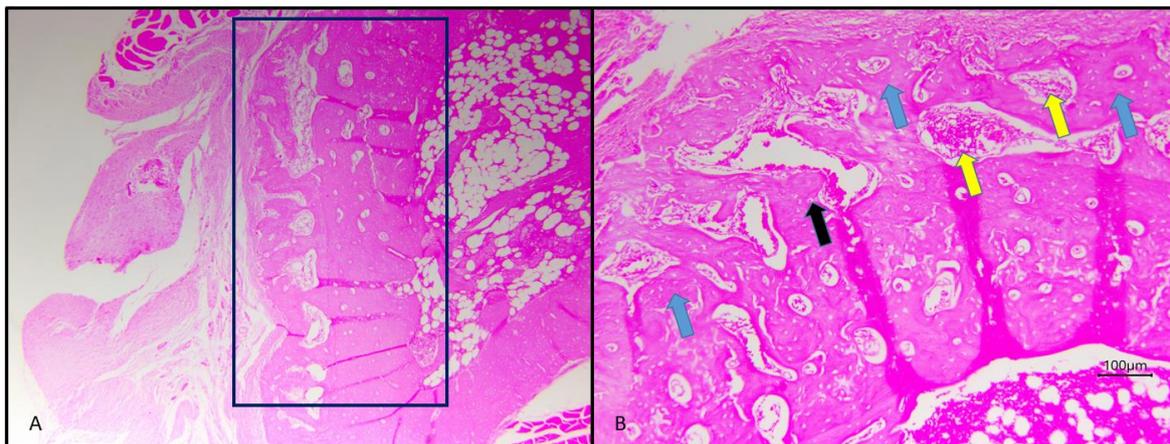
1100

1101

Figura 11. Cortes histológicos do grupo DEF–10 dias corados por HE visualizados por microscopia de luz. A) extensão do defeito ósseo realizado. B) Fibras de colágeno (seta azul) e infiltrado inflamatório (seta amarela).

Pinto et al. (2018) realizaram defeitos de 3mm de diâmetro monocorticais em tibia de ratos observando aos 15 dias de avaliação, nas análises histológicas do grupo controle, que as bordas dos defeitos eram claramente identificáveis, sendo os mesmos preenchidos com tecido inflamatório e granulação. Os achados encontrados pelos autores foram semelhantes aos encontrados neste estudo, apesar do tempo de avaliação diferente. Considerando que as fases de consolidação óssea se sobrepõem e ocorrem nesta espécie em um período curto de tempo, os achados são compatíveis com o esperado fisiologicamente, já que nesta fase inicial ocorre indução e diferenciação das células mesenquimais pluripotentes em fibroblastos, condroblastos e osteoblastos decorrentes do endóstio, perióstio e tecidos moles circundantes sendo responsáveis pela produção de tecido fibroso, cartilagem e tecido ósseo, respectivamente (CROSS, 2012).

Aos 20 dias observou-se um aumento dos valores atribuídos, principalmente nas variáveis: Neoformação de tecido ósseo, presença de osteoblasto, preenchimento das lacunas osteocíticas e formação de tecido mieloide, observou-se ainda um decréscimo destes valores nas variáveis deposição de fibras de colágeno e presença de infiltrado inflamatório (Figura 12).



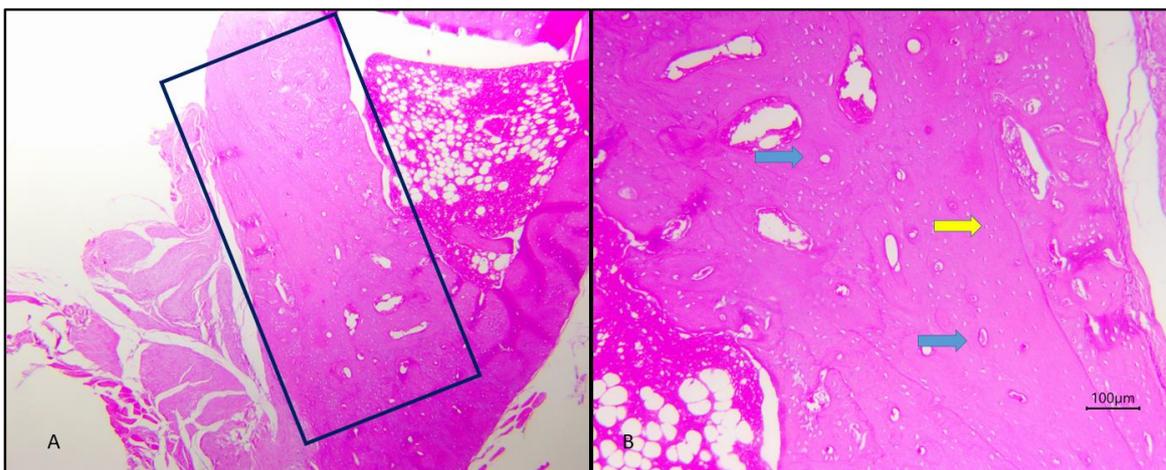
1102

1103 Figura 12. Cortes histológicos do grupo DEF–20 dias corados por HE visualizados por microscopia
1104 de luz. A) extensão do defeito ósseo realizado. B) Tecido ósseo neoformado (seta azul). Formação
1105 de tecido mieloide (seta amarela). Preenchimento das lacunas osteocíticas (seta preta).

1106

1107 Encontra-se na literatura estudos com diferentes tempos de avaliação para
1108 este modelo experimental (MACEDO et al., 2004; PRADO et al., 2006; PINTO et
1109 al, 2018; SAMPAIO, 2019), porém não foi encontrado um estudo que realizou as
1110 avaliações histológicas aos 20 dias. Analisando as informações encontradas na
1111 literatura, pode-se observar que o processo de consolidação fisiológico aos 20
1112 dias teria uma tendência, com o decorrer do tempo, a um aumento da tensão de
1113 oxigênio junto ao crescimento vascular, aumentando a atividade do osteoblasto e
1114 consequentemente o processo de mineralização da fibrocartilagem (CROSS,
1115 2012).

1116 Aos 30 dias de avaliação houve preminência da variável Neofomarcção
1117 de tecido ósseo com o decréscimo das outras variáveis (Figura 13). Estes
1118 resultados corroboram com o estudo de Prado et al. (2006), onde se observou um
1119 aumento crescente de tecido ósseo neoformado, estatisticamente diferente,
1120 quando este autor comparou esta variável em diferente tempos (15, 30 e 45 dias).



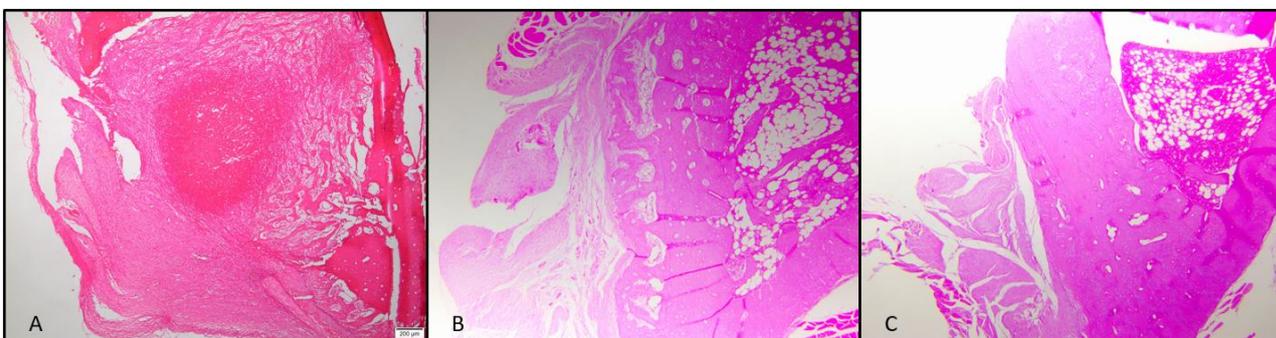
1121

1122 Figura 13. Cortes histológicos do grupo DEF-30 dias corados por HE visualizados por microscopia
 1123 de luz. A) Área do defeito ósseo preenchida. B) Predominância de tecido ósseo compacto (seta
 1124 azul). Preenchimento das lacunas osteocíticas (seta amarela).

1125

1126 Em nosso estudo pode-se observar que a área do defeito estava mais
 1127 preenchida com tecido ósseo neoformado em relação aos tempos iniciais de
 1128 avaliação (Figura 14). Porém, estatisticamente essa diferença não foi
 1129 evidenciada. Pinto et al. (2018), encontraram neste período, áreas de tecido de
 1130 granulação centralizadas na área do defeito com predominância de tecido
 1131 neoformado ao redor, estes resultados se assemelham aos encontrados neste
 1132 estudo. Esperava-se que a medida que o processo reparador caminhasse o ponto
 1133 final da união óssea clínica, esse se sobreposse à fase de remodelação onde o
 1134 osso desnecessário é reabsorvido e o osso se aproxima de sua forma original de
 1135 acordo com a lei de Wolff (CROSS, 2012).

1136

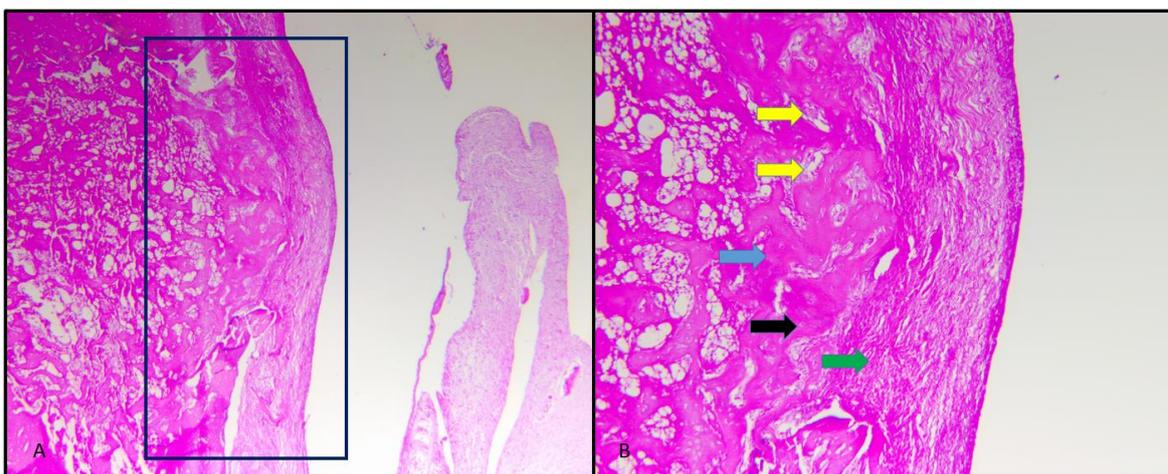


1137

1138 Figura 14. Cortes histológicos do grupo DEF corados por HE visualizados por microscopia de luz.
 1139 A) 10 dias. B) 20 dias. C) 30 dias.

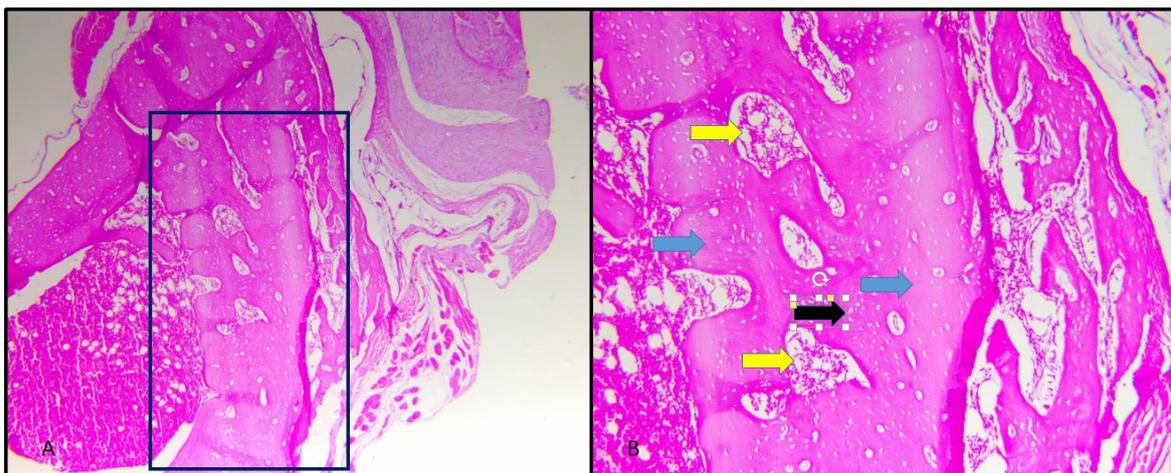
1140

1141 As análises realizadas dentro do grupo PVDF não demonstraram
1142 diferenças estatisticamente das variáveis entre os tempos de avaliação. Quando
1143 confrontadas com os outros grupos, foram identificadas diferenças estatísticas
1144 somente no tempo 20 dias, nas variáveis PO e PIINF, evidenciando uma
1145 diminuição dos valores atribuídos a variável PO em relação ao grupo DEF, assim
1146 como valores menores da variável PIINF em relação ao grupo PVDF/rGO. Apesar
1147 das diferenças estatísticas serem encontradas apenas aos 20 dias, nota-se
1148 visualmente, com maior facilidade a presença de áreas maiores de formação de
1149 tecido ósseo jovem, fibras colágenas e tecido mieloide em relação ao grupo DEF
1150 e PVDF/rGO aos 10 dias assim como um envoltório capsular contendo o
1151 biomaterial em seu interior. As imagens representativas das laminas histológicas
1152 do presente grupo estão ilustradas (Figura 15, Figura 16, Figura 17 e Figura 18).
1153



1154
1155 Figura 15. Cortes histológicos do grupo PVDF–10 dias corados por HE visualizados por
1156 microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo. B) Predominância de Tecido ósseo neoformado
1157 (seta azul). Preenchimento das lacunas osteocíticas (seta preta). Fibras colágenas (seta verde).
1158 Formação de tecido mieloide (seta amarela).

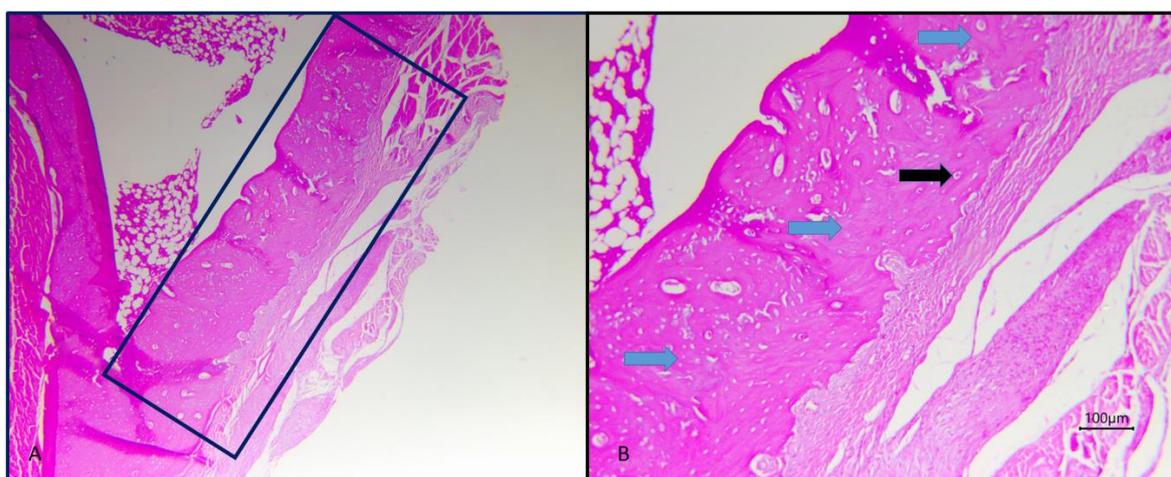
1159
1160



1161

1162 Figura 16. Cortes histológicos do grupo PVDF-20 dias corados por HE visualizados por
 1163 microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo. B) Predominância de Tecido ósseo neoformado
 1164 (seta azul). Preenchimento das lacunas osteocíticas (seta preta). Formação de tecido mieloide
 1165 (seta amarela).

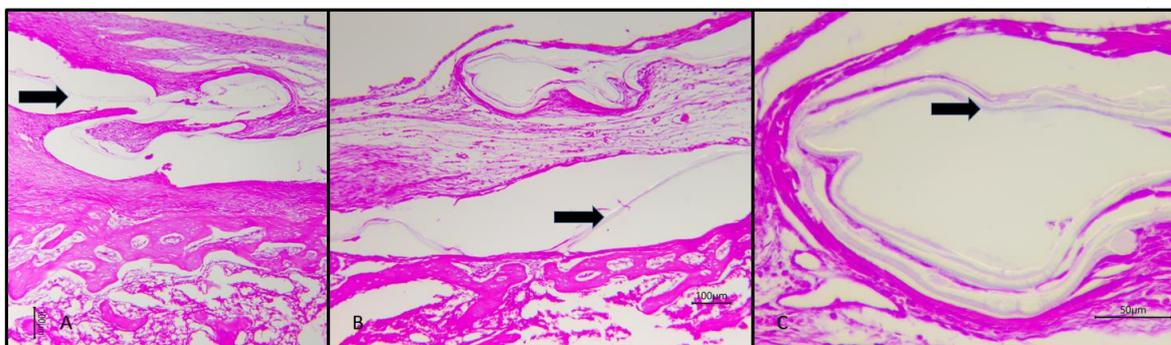
1166



1167

1168 Figura 17. Cortes histológicos do grupo PVDF-30 dias corados por HE visualizados por
 1169 microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo. B) Predominância de Tecido ósseo (seta azul).
 1170 Preenchimento das lacunas osteocíticas (seta preta).

1171



1172

1173 Figura 18. Cortes histológicos apresentando biomaterial encapsulado do grupo PVDF corados por
 1174 HE e visualizados por microscopia de luz (setas pretas).

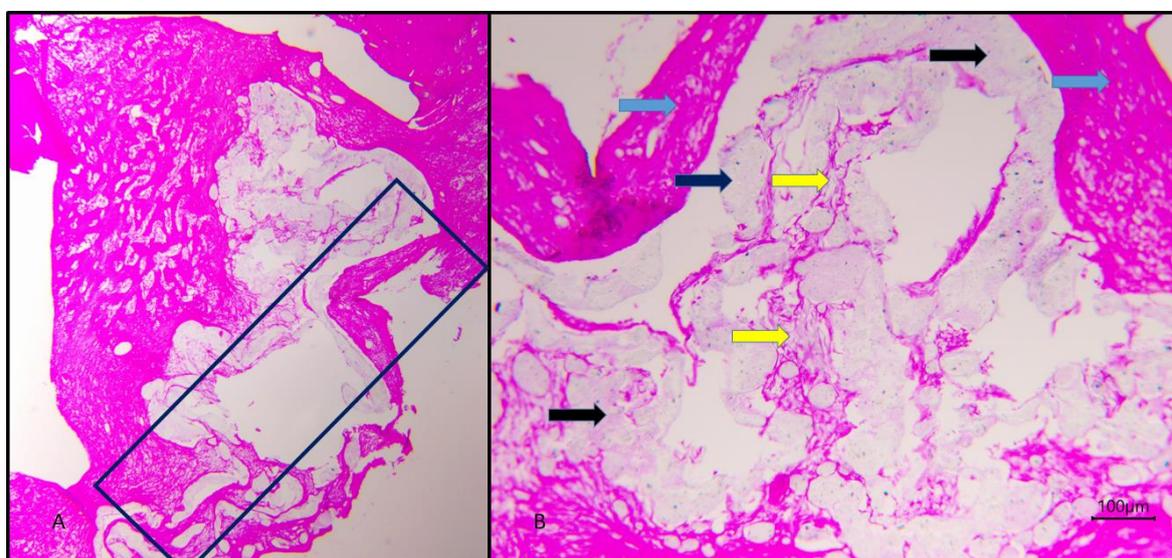
1175 Damaraju et al. (2013), evidenciaram um aumento da taxa de
1176 mineralização de matriz extracelular em culturas de células tronco mesenquimais
1177 diferenciadas em osteoblasto e cultivadas em diferentes scaffolds eletrofiados de
1178 PVDF fabricados com diferentes voltagens (12-25kV), encontrando uma maior
1179 atividade no grupo PVDF 25kV devido a sua maior presença de fibras β em
1180 comparação aos scaffolds produzidos com 12kV com menor concentração de
1181 fase β , sendo esta fibra a que apresenta maior relação com o efeito piezoelétrico
1182 do biomaterial. Também identificou que houve uma maior mineralização entre 10
1183 e 21 dias do cultivo celular. O material utilizado em nosso estudo foi produzido
1184 utilizando uma técnica diferente da convencional (eletrofiação), denominada
1185 *solution blow spinning*, onde não são utilizadas eletricidades para obtenção das
1186 fibras na de fase β porém o polímero foi anteriormente caracterizado e identificada
1187 grande concentração de fibras β .

1188 Apesar deste efeito piezoelétrico em células osteogênicas serem bem
1189 definidos, os resultados não significativos ($p>0.05$) encontrados neste estudo
1190 podem estar relacionados a não fixação do biomaterial no tecido ósseo para que
1191 este recebesse uma deformação maior relacionada as forças atuantes do tecido,
1192 assim como a dificuldade de adesão celular no biomaterial devido a
1193 hidrofobicidade e superfície lisa do PVDF. Paschoal (2003), utilizou em seu
1194 estudo filmes de PVDF acomodados entre a cortical e uma placa de
1195 osteossíntese ambas fixadas com parafusos em tíbias de coelhos. Em seu
1196 estudo, observaram que em 65% das tíbias que receberam o polímero houve um
1197 preenchimento tecidual bastante intenso.

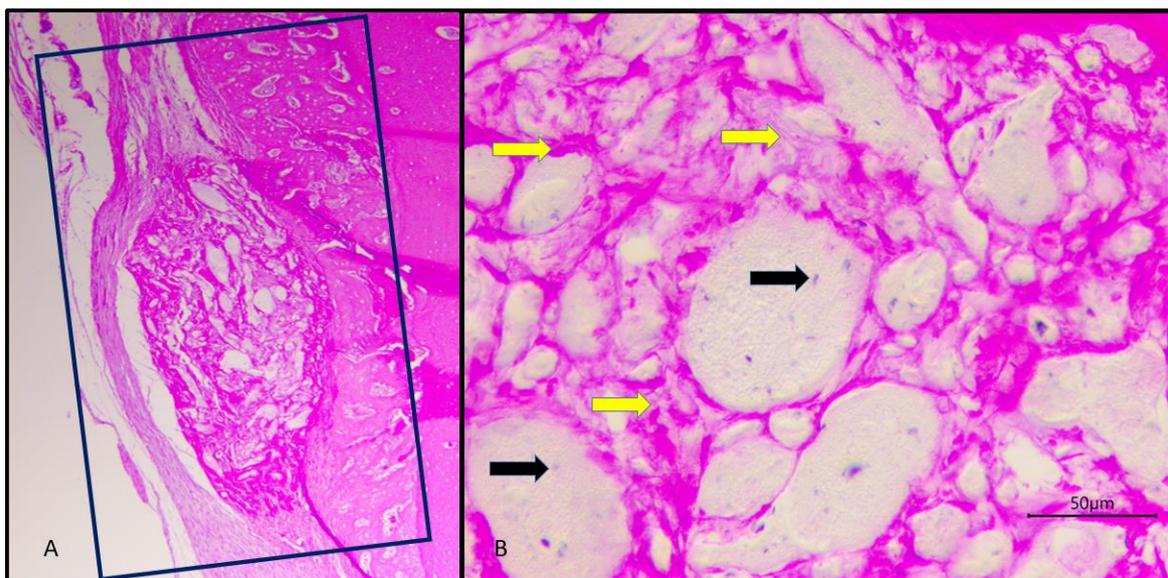
1198 Seguindo outra linha de pesquisa, Kitsara et al. (2019) visando melhorar a
1199 hidrofiliabilidade do polímero devido a sua absorção de água ser extremamente
1200 baixa ocasionando uma dificuldade de fixação celular e sua expansão, utilizaram
1201 scaffolds de PVDF tratados com plasma de oxigênio fazendo com que
1202 modificações em sua estrutura aumentassem sua hidrofiliabilidade estável por até 2
1203 anos, alcançando um aumento da adesão, expansão e proliferação celular assim
1204 como demonstraram também a capacidade de interação dos osteoblastos com o
1205 PVDF sem a necessidade de um estímulo externo para induzir uma resposta
1206 piezoelétrica, pois uma única nanofibra de PVDF produz 30 mV e esta voltagem
1207 parece ser suficiente para estimular eletricamente as vesículas presentes na
1208 membrana celular do osteoblasto quando este entra em contato com o polímero.

1209 Adicionalmente outros estudos se concentraram em modificar a área de superfície
1210 do material com o intuito de melhorar ainda mais a adesão celular. Szewczyk et
1211 al. (2019), modificaram a estrutura de filmes de PVDF apenas em sua geometria,
1212 combinando solventes como a dimetilacetamida (DMAc) e acetona e controlando
1213 a umidade e temperatura durante o processamento dos filmes. Os autores
1214 utilizaram umidade acima de 60% fazendo com que a alta quantidade de vapor
1215 d'água causasse a rugosidade superficial desejada para que ocorresse o aumento
1216 da adesão osteoblástica e formação de colágeno. Assim, com o intuito de
1217 melhorar as características de hidrofiliicidade e estímulo celular do PVDF *in vivo*,
1218 no presente estudo foi realizada a associação do polímero ao rGO.

1219 Inicialmente, as avaliações dentro do grupo PVDF/rGO apresentaram
1220 diferença estatística somente da variável PIINF do momento 10 dias em relação
1221 ao momento 20 dias. Os valores encontrados foram significativamente
1222 menores ($p < 0.05$). Foram encontradas áreas de encapsulamento do biomaterial
1223 (Figura 19) assim como uma distribuição marcante de células gigantes
1224 multinucleadas na periferia do biomaterial (Figura 20), também uma reação
1225 periosteal intensa nos tempos 20 e 30 dias de avaliação (Figura 21 e Figura 22).
1226



1227
1228 Figura 19. Cortes histológicos do grupo PVDF/rGO–10 dias corados por HE visualizados por
1229 microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo pouco preenchida. B) Predominância de biomaterial
1230 e células inflamatórias. Tecido ósseo (seta azul). Biomaterial PVDF/rGO (seta preta). Infiltrado
1231 inflamatório (seta amarela).



1232

1233

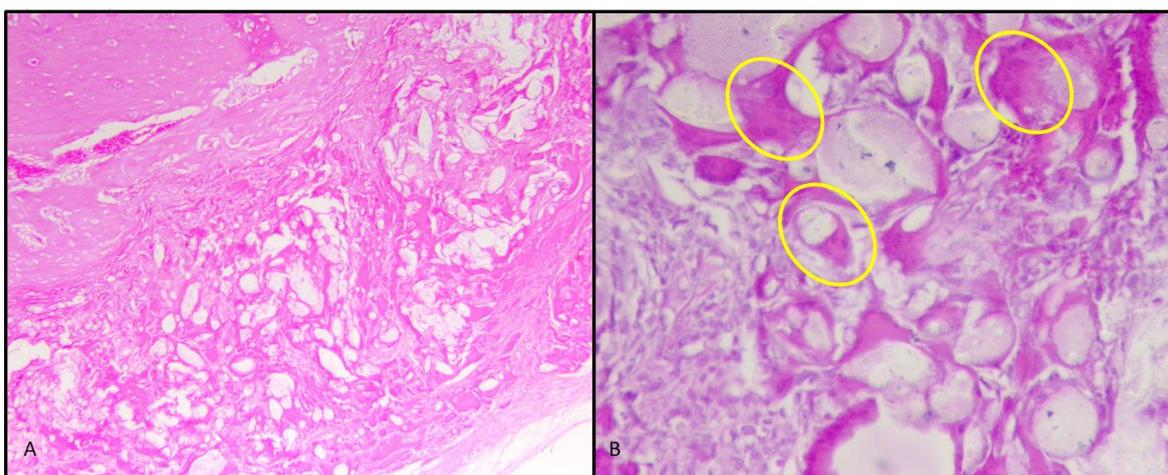
1234

1235

1236

1237

Figura 20. Cortes histológicos do grupo PVDF/rGO–20 dias corados por HE visualizados por microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo preenchida por células inflamatórias e tecido ósseo neoformado. B) Predominância de biomaterial e células inflamatórias. Biomaterial PVDF/rGO (seta preta). Infiltrado inflamatório (seta amarela).



1238

1239

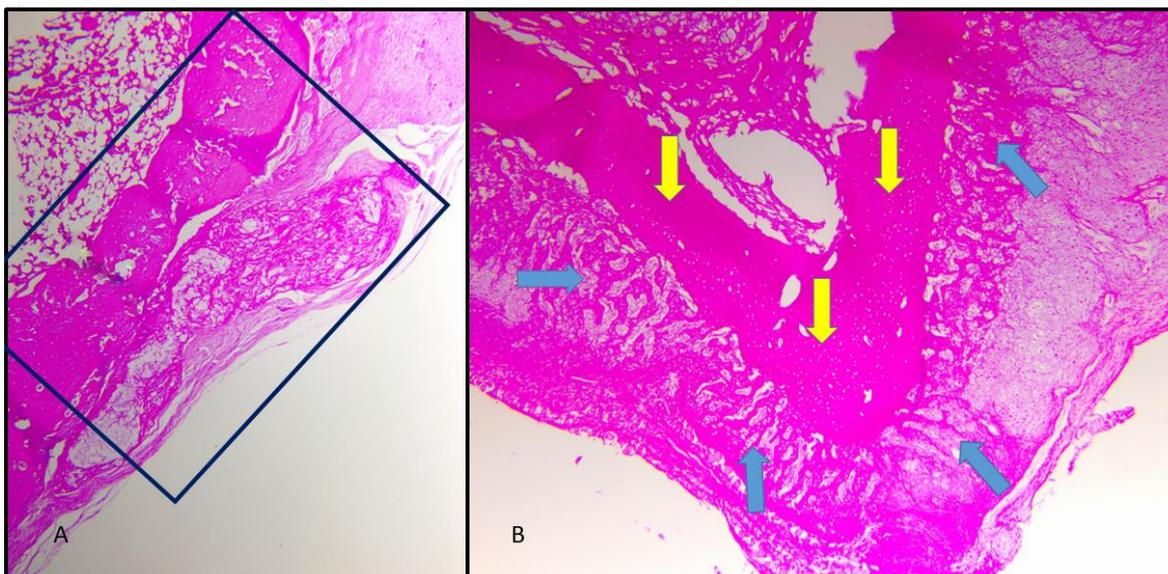
1240

1241

1242

1243

Figura 21. Cortes histológicos do grupo PVDF/rGO corados por HE visualizados por microscopia de luz. A) PVDF/rGO – 20 dias. Área do defeito ósseo preenchida por células inflamatórias envolvendo o biomaterial. B) PVDF/rGO – 30 dias. Células gigantes multinucleadas envolvendo biomaterial (setas amarelas).



1244

1245 Figura 22. Cortes histológicos do grupo PVDF/rGO–30 dias corados por HE visualizados por
 1246 microscopia de luz. A) Área do defeito ósseo preenchida por células inflamatórias e tecido ósseo.
 1247 B) Reação periosteal intensa abrangendo todas as corticais não envolvidas no processo cirúrgico.
 1248 Tecido ósseo neoformado (seta azul). Tecido ósseo compacto (seta amarela).

1249

1250 As células gigantes multinucleadas (CGM) são derivadas da linhagem
 1251 monócitos/macrófagos e quando presentes especificamente no tecido ósseo,
 1252 foram associadas em um passado recente a osteoclastos de reabsorção óssea ou
 1253 a uma reação de corpo estranho do tecido conjuntivo, resultando em
 1254 encapsulamento fibroso e/ou rejeição de material. Enquanto se acreditava que a
 1255 reação de corpo estranho estava ocorrendo, dados histológicos recuperados de
 1256 amostras humanas anos após sua implantação, colocaram essas hipóteses
 1257 originais em questão, demonstrando um volume ósseo melhor e mais estável a
 1258 longo prazo ao redor de alguns enxertos ósseos (MIRON et al. 2016).

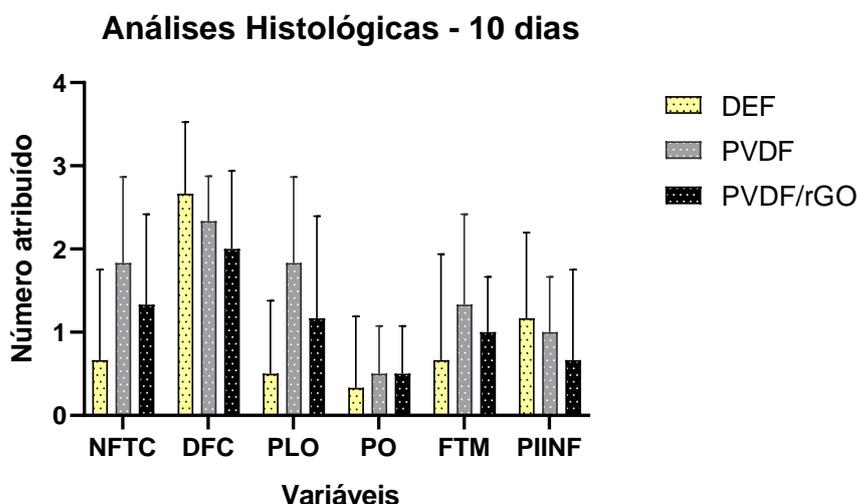
1259

1260 Inicialmente essas células foram denominadas células gigantes de corpo
 1261 estranho, pois relatos mostram em implantes de tecidos moles com falha, sua
 1262 presença de grandes números (RAO et al. 2012; NICK et al. 2013). Essas células,
 1263 também denominadas macrófagos frustrados, são resultado da fusão de
 1264 macrófagos que foram incapazes de fagocitar partículas maiores que sua
 1265 capacidade (RAO et al. 2012). Os estudos tem levantado a hipótese de que
 1266 dependendo da polarização do macrófago, ou seja, do fenótipos específicos
 1267 dessa célula (M1 macrófagos pró-inflamatórios ou M2 macrófago de cicatrização
 de tecidos e regeneração tecidual), estas células gigantes podem atuar de

1268 diferentes formas no tecido ósseo. Porém essa informação ainda segue em
 1269 estudo pois mesmo em tratamentos bem sucedidos, são encontradas
 1270 predominância de células M1 ao redor de alguns biomateriais. A literatura atual
 1271 também mostra que alguns biomateriais podem ditar o fenótipo dos macrófagos
 1272 interferindo na expressão de seus marcadores M2 e, conseqüentemente,
 1273 contribuindo para o processo cicatricial. Existem evidências crescentes de que
 1274 CGM podem desempenhar um papel na integração do osso ao biomaterial.
 1275 Porém sua caracterização ainda não foi bem definida.

1276 Com o intuito de melhorar as informações obtidas nos estudos com
 1277 biomateriais, MIRON et al. (2016) apresentou em seu estudo marcadores de
 1278 superfície comumente associados de osteoclastos e CGM para identificar
 1279 qualquer tipo de célula utilizando marcadores de superfície celular modernos para
 1280 fins de identificação.

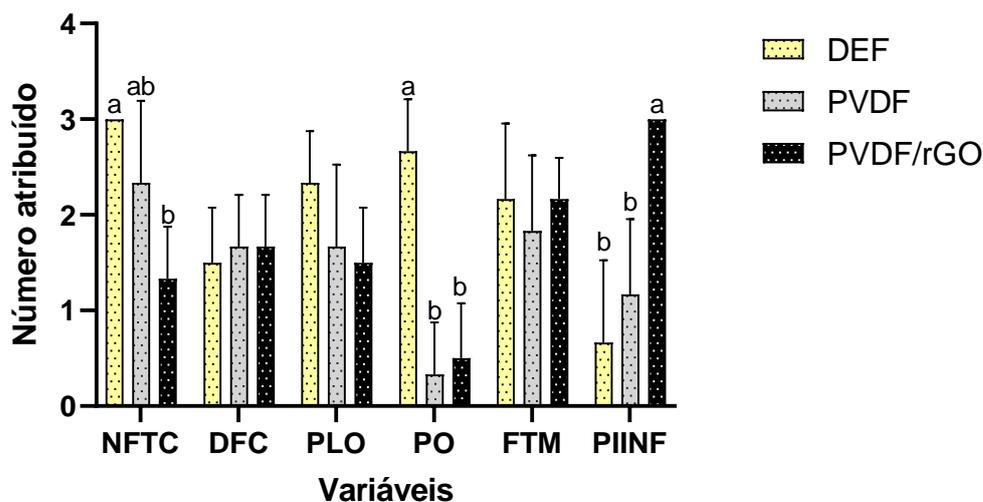
1281 Quando realizadas as comparações entre os grupos, aos 10 dias de
 1282 avaliação não foram encontradas diferenças estatísticas (Figura 23). Aos 20 dias
 1283 de avaliação foram evidenciadas diferenças estatísticas na variável PO e PIINF.
 1284 Estas variáveis se apresentaram significativamente menor que o grupo DEF e
 1285 significativamente superior aos grupos DEF e PVDF respectivamente ($p < 0.05$)
 1286 (Figura 24). Somente aos 30 dias de avaliação, os resultados apresentaram uma
 1287 distribuição de valores maiores atribuídos em relação ao grupo PVDF, levando a
 1288 entender que a associação dos biomateriais e/ou a presença do rGO trouxe
 1289 interferência nas propriedades desejadas (Figura 25).



1290

1291 Figura 23 – Representação estatística das comparações das variáveis avaliadas histologicamente
 1292 entre os grupos aos 10 dias. ($p > 0,05$)

Análises Histológicas - 20 dias

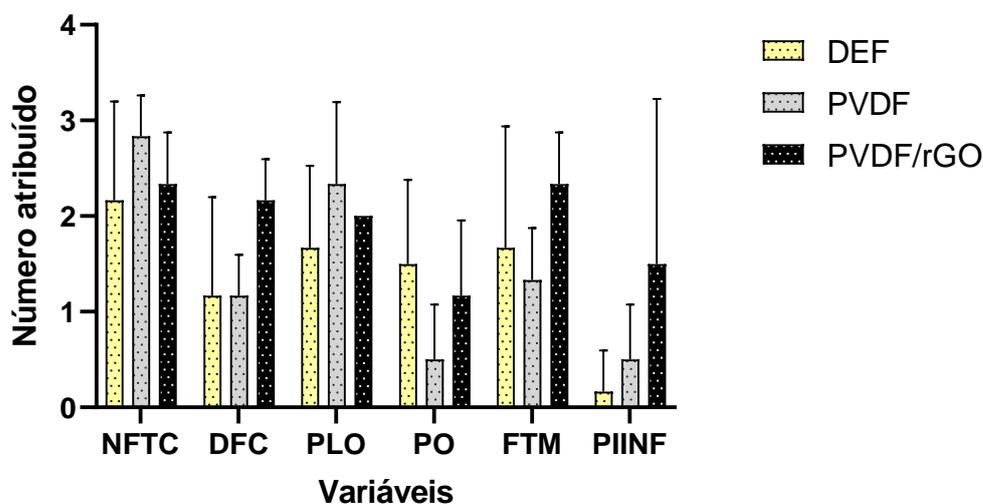


1293

1294 Figura 24 – Representação estatística das comparações das variáveis avaliadas histologicamente
 1295 entre os grupos aos 20 dias.

1296

Análises Histológicas - 30 dias



1297

1298 Figura 25 – Representação estatística das comparações das variáveis avaliadas histologicamente
 1299 entre os grupos aos 30 dias. ($p > 0,05$)

1300

1301 Quanto ao método utilizado e características do biomaterial, Larios et al.
 1302 (2018), ao realizar a síntese e caracterização de nanofibras de PVDF associadas
 1303 ao GO pela técnica SBS, identificaram maior presença de fase β nas fibras
 1304 fabricadas e uma boa interação do polímero com o GO possibilitando uma
 1305 diminuição da hidrofobicidade do polímero. Esses achados suportam a ideia de

1306 que os resultados obtidos em nosso estudo teriam uma tendência maior a
1307 alterações químicas e/ou estruturais do rGO.

1308 Apesar do conceito de que o GO pode melhorar a capacidade de
1309 hidrofobicidade do PVDF, quando é realizada a redução do GO para rGO,
1310 mudanças fisicoquímicas importantes ocorrem em sua estrutura. Com o crescente
1311 aumento das pesquisas, devido a retirada de alguns grupos funcionais, o rGO
1312 pode ter uma capacidade de adsorção de proteínas menor em relação ao GO
1313 devido a um aumento de sua hidrofobicidade resultante da perda de alguns
1314 grupos funcionais, porém ainda se tem dificuldade de caracterizar quais proteínas
1315 (ZHANG et al., 2018). Apesar desta característica, a seleção deste material para
1316 nosso estudo foi realizada também com base nos resultados benéficos
1317 previamente encontrados na literatura e os crescentes estudos realizados com
1318 este material em tecido ósseo (MEHRALI et al. 2014; LEE et al. 2015; KIM et al.
1319 2017; NORAHAN et al. 2019).

1320 Outros fatores tem ganhado extrema relevância nas pesquisas destes
1321 materiais frente a sua utilização em meio biológico pois ainda são muito
1322 contraditórios. Em estudos iniciais acreditava-se que devido a perda de alguns
1323 grupos funcionais que contem oxigênio durante o processo de redução e o
1324 aumento da hidrofobicidade, estes materiais seriam menos tóxicos do que o GO
1325 pois os grupos de oxigênio eram bastante reativos as biomoléculas (KANG et al.
1326 2017; CHATTERJEE et al. 2017). Mittal et al. (2016) comparando GO, GO
1327 termicamente reduzido e GO quimicamente reduzido em células pulmonares
1328 humanas fenotipicamente diferentes, células epiteliais brônquicas (BEAS-2B) e
1329 células epiteliais alveolares (A549), observaram uma maior toxicidade do GO e
1330 GO termicamente reduzido. Os autores descrevem que os resultados encontrados
1331 estão relacionados as partículas muito pequenas de GO que apresentam alta
1332 toxicidade devido ao seu pequeno tamanho e bordas afiadas, penetrando
1333 facilmente na membrana celular e entrando no citoplasma, causando,
1334 conseqüentemente, danos na membrana celular e extravasamento de conteúdo
1335 citoplasmático porém, partículas pequenas são facilmente eliminadas ao
1336 penetrarem nos glomérulos renais. Em contrapartida particular maiores são
1337 menos tóxicas pois não podem entrar na membrana celular. Resumidamente
1338 partículas de GO pequenas, com tamanhos laterais entre 50 e 350 nm, são
1339 internalizadas, enquanto as partículas grandes, com tamanho lateral entre 750 nm

1340 e 1300 nm, ficam aderidas em suas membranas plasmáticas. Este fato também
1341 traz consequências ao meio biológico pois causa ativação de receptores toll-like,
1342 fator de transcrição NF- κ B e citocinas pró-inflamatórias (MA et al, 2015). Zhang et
1343 al. (2018) compararam diferentes métodos de redução do óxido de grafeno
1344 (Irradiação por luz e redução por Fe²⁺) e suas toxicidades em culturas celulares
1345 de macrófagos murinos. Esses autores demonstraram que os GOs reduzidos por
1346 luz foram mais tóxicos devido à geração de radicais à base de grafeno e aumento
1347 da absorção celular, enquanto a redução por Fe²⁺ reduziu a absorção celular
1348 funcionando como antioxidante. Neste estudo foram utilizadas concentrações
1349 baixas de rGO termicamente reduzido porem, como estas estão incorporadas as
1350 fibras de PVDF sua penetração no citoplasma é dificultada, levando
1351 possivelmente a uma ativação dos mediadores inflamatórios.

1352 O processo de consolidação óssea frente a utilização de biomateriais
1353 envolve muitos fatores como químicos, hormonais e mecânicos. Em nosso
1354 estudo, apesar das dificuldades encontradas, não possível detectar diferenças
1355 entre os métodos de tratamento porem com os avanços das tecnologias e
1356 métodos de avaliação informações poderão serem acrescentadas.

1357

1358 **7. CONCLUSÃO**

1359

1360 Com base nos resultados obtidos conclui-se que os biomateriais PVDF e
1361 PVDF/rGO elevaram os níveis de fosfatase alcalina óssea aos 20 e 30 dias de
1362 avaliações. A utilização dos biomateriais PVDF e PVDF/rGO não aceleraram o
1363 processo de reparo ósseo em comparação ao grupo DEF. O biomaterial
1364 PVDF/rGO promoveu formação de alto numero de células gigantes
1365 multinucleadas.

1366

1367 **8. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU** 1368 **INOVAÇÃO**

1369

1370 O processo de reparo e remodelamento ósseo podem ser estimulados
1371 através de microlesões, estímulos mecânicos, estímulos combinados ou por
1372 mecanismos desconhecidos. Entretanto, em alguns casos clínicos, não ocorre

1373 regeneração óssea ou aumento de matriz óssea de forma esperada, tornando
1374 necessário a utilização de técnicas coadjuvantes para a obtenção dos resultados
1375 esperados. Assim, terapias alternativas como a utilização de biomateriais
1376 indutores ósseos são muito importantes, pois podem minimizar o tempo de
1377 tratamento e os custos, garantindo o retorno mais rápido às atividades normais do
1378 paciente. Devido as características bioativas do material utilizado neste estudo
1379 tetou-se produzir uma autoestimulação elétrica a nível celular, fornecendo
1380 estrutura adequada para adesão das células envolvidas no reparo do tecido
1381 ósseo, assim como diminuir os custos de produção, facilitando a comercialização
1382 e reduzindo os riscos de transmissão de doenças, rejeições, lesões iatrogênicas e
1383 baixa disponibilidade de materiais com custo acessível.

1384

1385

1386

1387

1388

1389

1390

1391

1392

1393

1394

1395

1396

1397

1398

1399

1400

1401

1402

1403

1404

1405

1406

1407

1408 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1409

1410 AL-AQL, Z.S.; ALAGL, A.S.; GRAVES, D.T.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN,
1411 T.A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and
1412 distraction. **Journal of Dental Research**, v.87, n.2, p.107-118, 2008.

1413 BARSKI, D.; ARNDT, C.; GERULLIS, H.; YANG, J.; BOROS, M.; OTTO, T.;
1414 KOLBERG, H.C. Transvaginal PVDF-mesh for cystocele repair: A cohort study.
1415 **International Journal of Surgery**. v.39, p.249-254, 2017.

1416 BARADARAN, S.; MOGHADDAM, E.; BASIRUN, W.J.; MEHRALI, M.;
1417 SOOKHAKIAN, M.; HAMDI, M.; MOGHADDAMG, M.R.N.; ALIASC, Y. Mechanical
1418 properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced
1419 graphene oxide composite. **Carbon**. v.69, p.32-45, 2014.

1420 BERA, B.; MANDAL, D.; SARKAR, M. Sensor Made of PVDF/graphene
1421 Electrospinning Fiber and Comparison between Electrospinning PVDF Fiber and
1422 PVDF/graphene Fiber. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**, v.2,
1423 n.11, p.1411-1413, 2016.

1424 BIGHAM-SADEGH, A.; ORYAN, A. Selection of animal models for pre-clinical
1425 strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue
1426 regeneration and engineering. **Connective Tissue Research**. v.56, n.3, p.175-
1427 194, 2015.

1428 BUCK, B.; MURTHA, Y.M. The management of bone defects in periarticular knee
1429 injuries: a review article. **The Journal of Knee Surgery**. v.30, n.3, p.194–199,
1430 2017.

1431 BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R. Tietz Fundamentos de Química Clínica, 4^oed.,
1432 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

1433 BRANCIFORTI, M. C.; SENCADAS, V.; LANCEROS-MENDEZ, S.; GREGORIO
1434 JR, R. New technique of processing highly oriented poly(vinylidene fluoride) films
1435 exclusively in the β phase. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer
1436 Physics**. v.45, n.19, p.2793-2801, 2007.

1437 BRODIE, B.C. Sur le poids atomique du graphite. **Annales de Chimie et de
1438 Physique**, v.59, p.466-472, 1960.

- 1439 CADEAU, B.J.; MALKIN, A. A relative stability test for the identification of serum
1440 alkaline phosphatase isoenzymes. **Clinica Chimica Acta**, v.45, n. 3, p.235-242,
1441 1973.
- 1442 CARDOSO, Q.A. **Estudo do processo de redução térmica em vácuo do óxido**
1443 **de grafeno visando a obtenção de matéria prima para supercapacitor**. 2017.
1444 f.73. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia nuclear –
1445 materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada a
1446 Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- 1447 CARDOSO, V.F.; CORREIA, D.M.; RIBEIRO, C.; FERNANDES, M.M.;
1448 LANCEROS-MÉNDEZ, S. Fluorinated Polymers as Smart Materials for Advanced
1449 Biomedical Applications. **Polymers**. v.10, n.2, p. 161, 2018.
- 1450 CENA, C.R.; SILVA, M.J.; MALMONGE, L.F.; MALMONGE, J.A.
1451 Poly(vinylpyrrolidone) sub-microfibers produced by solution blow-spinning. *Journal*
1452 *of Polymer Research*, v.25, n.238, 2018.
- 1453 CINQUE, L.; FORRESTER, A.; BARTOLOMEO, R. et al. FGF signalling regulates
1454 bone growth through autophagy. **Nature**, 528, 272–275, 2015.
- 1455 COSTA, B.D.; CAMARGO, N.H.; OLESKOVICZ, N. et al. Neoformação óssea e
1456 osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. **Pesquisa**
1457 **Veterinária Brasileira**. v.35, n.2, 2015.
- 1458 CHATTERJEE, N.; KIM, Y.; YANG, J. et al. A systems toxicology approach
1459 reveals the Wnt-MAPK crosstalk pathway mediated reproductive failure in
1460 *Caenorhabditis elegans* exposed to graphene oxide (GO) but not to reduced
1461 graphene oxide (rGO). **Nanotoxicology**, v.11, p.76–86, 2017.
- 1462 CHIARA, G.; LETIZIA, F.; LORENZO, F.; EDOARDO, S.; DIEGO, S.; STEFANO,
1463 S.; ERIBERTO, B.; BARBARA, Z. Nanostructured biomaterials for tissue
1464 engineered bone tissue reconstruction. **International Journal of molecular**
1465 **Sciences**, v. 13, n. 1, p. 737–757, 2012.
- 1466 CIRIZA, J.; SAENZ DEL BURGO, L.; GURRUCHAGA, H.; BORRAS, F.E.;
1467 FRANQUESA, M.; ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R.M.; PEDRAZ, J.L. Graphene
1468 oxide enhances alginate encapsulated cells viability and functionality while not
1469 affecting the foreign body response. **Drug Delivery**. v.25, n.1, p.1147-1160, 2018.
- 1470 CROSS, A.R. Fracture biology and biomechanics. In: TOBIAS, K.M.; JOHNSTON,
1471 S.A.N. **Veterinary surgery small animal**. St. Louis: Elsevier, cap.41, p.565- 571,
1472 2012.

- 1473 DAMARAJU, S.M.; WU, S.; JAFFE, M.; ARINZEH, T.L. Structural changes in
1474 PVDF fibers due to electrospinning and its effect on biological function.
1475 **Biomedical materials**. v.8, n.4, 2013.
- 1476 DAMARAJU, S.M.; SHEN, Y.; ELELE, E.; KHUSID, B.; ESHGHINEJAD, A.; LI, J.;
1477 JAFFE, M.; ARINZEH, T.L. Three-dimensional piezoelectric fibrous scaffolds
1478 selectively promote mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials*. v.149,
1479 p.51-62, 2017.
- 1480 DEFTERALI, C.; VERDEJO, R.; MAJEED, S.; BOSCHETTI-DE-FIERRO†, A.;
1481 MÉNDEZ-GÓMEZ, H.R.; DÍAZ-GUERRA, E.; FIERRO†, D.; BUHR, K.; ABETZ,
1482 C.; MARTÍNEZ-MURILLO, R.; VULUGA, D.; ALEXANDRE, M.; THOMASSIN,
1483 J.M.; DETREMBLEUR, C.; JÉRÔME, C.; ABETZ, V.; LÓPEZ-MANCHADO, M.A.;
1484 VICARIO-ABEJÓN, C. In Vitro Evaluation of Biocompatibility of Uncoated
1485 Thermally Reduced Graphene and Carbon Nanotube-Loaded PVDF Membranes
1486 with Adult Neural Stem Cell-Derived Neurons and Glia. **Frontiers in**
1487 **bioengineering and Biotechnology**. v.4, n.94, 2016.
- 1488 DIAS, Y. J.; GIMENES, T.C.; TORRES, S.S.P.V.; MALMONGE, J.A.; GUALDI,
1489 A.J.; DE PAULA, F.R. PVDF/Ni fibers synthesis by solution blow spinning
1490 technique. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**. v.29, n.1,
1491 p.514-518, 2018.
- 1492 DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P.V. Current concepts of molecular
1493 aspects of bone healing. **Injury**, v.36, p.1392-1404, 2005.
- 1494 DUCHEYNE, P.; HASTINGS, D.W. **Functional behavior of orthopedic**
1495 **biomaterials**. Florida, Ed. CRC Press, v.1, p.3, 1984.
- 1496 DREYER, D.R.; PARK, S.; BIELAWISKI, C.W.; RUOFF, R.S. The chemistry of
1497 graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, v.39, p.228-240, 2010.
- 1498 EDA, G.; CHHOWALLA, M. Chemically derived graphene oxide: towards large
1499 area thinfilm electronics and optoelectronics. **Advanced Materials**. v.22, n.22,
1500 p.2392-2415, 2010.
- 1501 EGGER, E., PLUHAR, E. Aceleração da cicatrização da fratura. In: BOJRAB, M.J.
1502 **Mecanismos das Doenças em Cirurgias de Pequenos Animais**. São Paulo:
1503 Roca, p.681-688, 2014.
- 1504 EVERDS, N.E.; RAMAIAH, L. The laboratory rat. In: KURTZ, D.M., TRAVLOS,
1505 G.S. **The Clinical Chemistry of laboratory animals**. 3^oed. Boca Raton: Taylor
1506 & Francis, p. 33-72, 2017.

- 1507 FITZGERALD, M.X.M.; FENNELLY, J.J.; MCGEENEY, K. The value of differential
1508 alkaline phosphatase thermostability in clinical diagnosis. *American Journal of*
1509 *Clinical Pathology*, v.51, p.194-201, 1969.
- 1510 FUKADA, E.; YASUDA, I. On the Piezoelectric Effect of Bone. **Journal of the**
1511 **Physical Society of Japan**. v.12, n.10, p.1158-1162, 1957.
- 1512 GANGULY, A.; SHARMA, S.; PAPAKONSTANTINO, P.; HAMILTON, J. Probing
1513 the Thermal Deoxygenation of Graphene Oxide Using High-Resolution In Situ X-
1514 ray-Based Spectroscopies. **The journal of physical chemistry C**. v.115 n.34,
1515 p.17009–17019, 2011.
- 1516 GERSTENFELD, L.C.; ALKHIARY, Y.M.; KRALL, E.A.; NICHOLLS, F.H.;
1517 STAPLETON, S.N.; FITCH, J.L. Three-dimensional reconstruction of fracture
1518 callus morphogenesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.54,
1519 p.1215-1228, 2006.
- 1520 GITIRANA, L.B. Tecido ósseo. In: Gitirana, L.B. **Histologia: Conceitos básicos**
1521 **dos tecidos**. São Paulo: Editora Atheneu, p.105-126, 2004.
- 1522 GOES, P.; MELO, M.I.; DUTRA, C.S. et al. Efeito do alendronato sobre a
1523 fosfatase alcalina específica do osso na perda óssea periodontal em ratos.
1524 **Arquivos de Biologia Oral**, v.57, 11 ed, p.1537-1544, 2012.
- 1525 GREGORIO JR, R. BORGES, D. S. Effect of crystallization rate on the formation
1526 of the polymorphs of solution cast poly(vinylidene fluoride) – **Polymer**. v.49, n.18,
1527 p.4009-4016, 2008.
- 1528 GRIFFON D.J. Fracture healing. In JOHNSON A.L.; HOULTON J.E.; VANNINI
1529 R. **AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat**. New York:
1530 Thieme Medical Publishers, p.529, 2005.
- 1531 GRUNWALD, V.; EBERHARDT, B.; BEX, A. et al. An interdisciplinary consensus
1532 on the management of bone metastases from renal cell carcinoma. **Nature**
1533 **Reviews Urology**, v.15, n. 8, p.511-521, 2018.
- 1534 HIRATA, M.; GOTOU, T.; HORIUCHI, S.; FUJIWARA, M.; OHBA, M. Thin-film
1535 particles of graphite oxide 1. **Carbon**, v.42, n.14, p. 2929–2937, 2004.
- 1536 INTROINI, S.O. **Avaliação do Reparo Tecidual em Defeito Ósseo por**
1537 **Microtomografia Tridimensional por Raios-X**. 2011. 72 f. Dissertação
1538 (Mestrado em Engenharia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
1539 Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

- 1540 JAFARY, F.; HANACHI, P.; GORJIPOUR, K. Osteoblast Differentiation on
1541 Collagen Scaffold with Immobilized Alkaline Phosphatase. **International Journal**
1542 **of organ transplantation medicine**, v.8, n. 4, p.195-202, 2017.
- 1543 JANG, W.; YUN, J.; JEON, K.; BYUN, H. PVDF/graphene oxide hybrid
1544 membranes via electrospinning for Water treatment applications. **Rsc Advances**.
1545 v.5, n.58, 2015.
- 1546 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: Junqueira, L.C.; Carneiro, J.
1547 **Histologia básica**. 12° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.132-148, 2013.
- 1548 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: Junqueira, L.C.; Carneiro, J.
1549 **Histologia básica**. 13° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.134-154,2019.
- 1550 KARTZIR, S. The Discovery of the Piezoelectric effect. **Archive for History of**
1551 **Exact Sciences**. V.57, n.1, p.61-91, 2003.
- 1552 KANG, Y.; LIU, J.; WU, J. et al. Graphene oxide and reduced graphene oxide
1553 induced neural pheochromocytoma-derived PC12 cell lines apoptosis and cell
1554 cycle alterations via the ERK signaling pathways. **International Journal of**
1555 **Nanomedicine**, v.12, p.5501-5510, 2017.
- 1556 KIM, J.; SHIN, Y.; LEE, J. et al. The effect of reduced graphene oxide-coated
1557 biphasic calcium phosphate bone graft material on osteogenesis. **International**
1558 **Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.8, p.1-17, 2017.
- 1559 KITSARA, M.; BLANQUER, A.; MURILLO, G. et al. Permanently hydrophilic,
1560 piezoelectric PVDF nanofibrous scaffolds promoting unaided electromechanical
1561 stimulation on osteoblasts. **Nanoscale**, v.11, n.18, p.8906-8917, 2019.
- 1562 KHAN, S.N.; LANE J.M. Spinal fusion surgery: animal models for tissue-
1563 engineered bone constructs. **Biomaterials**, v.25, p.1475-1485, 2004.
- 1564 LARIOS, G.S.; NOGUEIRA, F.S.; VIANA, J.L.; OLIVEIRA, R.H.; FERREIRA,
1565 D.C.O.; ILHA, D.N.; CANASSA, T.A.; PLAÇA, F.L. Síntese e Caracterização de
1566 Sub-microfibras de PVDF/GO via Blow-Spinning. **Journal of Experimental and**
1567 **Techniques Instrumentation**. v.1, n.4, 2018.
- 1568 LEE J.; SHIN, Y.; LEE, S. et al. Enhanced Osteogenesis by Reduced Graphene
1569 Oxide/Hydroxyapatite Nanocomposites. **Scientific Reports**, v.5, p.1-13, 2015.
- 1570 LI, Z.; YAO, Y.; LIN, Z.; MOON, K.; LIN, W.; WONG, C. Ultrafast, dry microwave
1571 synthesis of graphene sheets. **Journal of Materials Chemistry**. v.20, n.23, p.
1572 4781-4783, 2010.

- 1573 LI, Y.; SUN, L.; WEBSTER, T.J. The investigation of ZnO/Poly(vinylidene fluoride)
1574 nanocomposites with improved mechanical, piezoelectric, and antimicrobial
1575 properties for orthopedic applications. **Journal of Biomedical Nanotechnology**.
1576 v.14, n.3, p.536–545, 2018.
- 1577 LIU, H.; CHENG, J.; CHEN, F.; BAI, D.; SHAO, C.; WANG, J.; XI, P.; ZENG, Z.,
1578 Gelatin functionalized graphene oxide for mineralization of hydroxyapatite:
1579 biomimetic and in vitro evaluation. **Nanoscale**, v. 6, p. 5315-5322, 2014.
- 1580 LIMA, C.M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D. et al. Valores de referência
1581 hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar)
1582 provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**. V.10, 2014.
- 1583 LIN, J.; CHEN, X.; HUANG, P. Graphene-based nanomaterials for bioimaging.
1584 **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.
- 1585 LV, M.; ZHANG, Y.; LIANG, L.; WEI, M.; HU, W.; LI, X.; HUANG, Q. Effect of
1586 graphene oxide on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells
1587 line. **Nanoscale**. v.4, n.13, p.3861–3866, 2012.
- 1588 MA, J.; LIU, R.; WANG, X. et al. Crucial Role of Lateral Size for Graphene Oxide
1589 in Activating Macrophages and Stimulating Pro-inflammatory Responses in Cells
1590 and Animals. **ACS Nano**, v.27, n.10, p.10498-10515, 2015.
- 1591 MACEDO, N.G. **Estudo e desenvolvimento de grafite como agente anti-**
1592 **chama para PVC**. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de
1593 Filosofia, Ciências e Letras – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- 1594 MACEDO, N.L.; MATUDA, F.S.; MACEDO, L.G.S. et al. Bone defect regeneration
1595 with bioactive glass implantation in rats. **Journal of Applied Oral Science**, v.12,
1596 n.2, p.137–143, 2004.
- 1597 MATOS, M.A.A.; SANTANA, F.R. Identificação da isoenzima óssea de fosfatase
1598 alcalina por termoinativação: Relevância clínica e ensaio laboratorial. **Revista**
1599 **Brasileira de Ortopedia**, v.31, n.3, 1996.
- 1600 MEDEIROS, E.S.; GLENN, G.M.; KLAMCZYNSKI, A.P.; ORTS, W.J.; MATOSO,
1601 L.H.C. Solution blow spinning: A new method to produce micro and nanofibers
1602 from Polymer solution. **Journal of Applied Polymer Science**. v.113, n.4, p.2322-
1603 2330, 2009.
- 1604 MEHRALI, M.; MOGHADDAM, E.; SHIRAZI, S.F.S.; BARADARAN, S. MEHRALI,
1605 M.; LATIBARI, S.T.; METSELAAR, H.S.C.; KADRI, N.A.; ZANDI, K.; OSMAR,
1606 N.A.A. Synthesis, mechanical properties, and in vitro biocompatibility with

- 1607 osteoblasts of calcium silicate-reduced graphene oxide composites. **ACS Applied**
1608 **Materials and Interfaces**, v.6, n.6, p.3947–3962, 2014.
- 1609 MELO, M.G.D.; DÓRIA, G.A.A.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de
1610 referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem
1611 Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe.
1612 **Scientia Plena**, v.8, 2012.
- 1613 MIRON, R.J.; ZOHDİ, H.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M. et al. Giant cells around
1614 bone biomaterials: Osteoclasts or multi-nucleated giant cells?. **Acta**
1615 **Biomaterialia**, v.46, p.15-28, 2016.
- 1616 MISRA, S.K.; KONDAIAH, P.; BHATTACHARYA, S.; RAO, C.N.R. Graphene as a
1617 Nanocarrier for tamoxifen induces apoptosis in transformed cancer cell lines of
1618 different origins. **Small**, v.8, p.131–143, 2012.
- 1619 MITTAL, S.; KUMAR, V.; DHIMAN, N.; CHAUHAN, L.K.S.; PASRICHA, R.;
1620 PANDEY, A.K. Physico-chemical properties based differential toxicity of graphene
1621 oxide/reduced graphene oxide in human lung cells mediated through oxidative
1622 stress. **Scientific Reports**. v.6, n.1, p.39548, 2016.
- 1623 MONDAL, D.; GAYEN, A.L.; PAUL, B.K.; BANDYOPADHYAY, P.; BERA, D.;
1624 BHAR, D.S.; DAS, K.; DAS, N.S. Enhancement of β -phase crystallization and
1625 electrical properties of PVDF by impregnating ultra high diluted novel metal
1626 derived nanoparticles: prospect of use as a charge storage device. **Journal of**
1627 **Materials Science: Materials in Electronics**. v.29, p.14535–14545, 2018.
- 1628 MOSS, P.W. Alkaline phosphatase isoenzymes. **Clinical Chemistry**, v.28, p.
1629 2007-2016, 1982.
- 1630 MOSS, D.W.; WHITBY, L.G. A simplified heat-inactivation method for investigating
1631 alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clinica Chimica Acta**, v.61, p.63-71,
1632 1975.
- 1633 MOSHIRI, A.; ORYAN, A.; MEIMANDI-PARIZI, A.; KOOHI-HOSSEINABADI, O.
1634 Effectiveness of xenogenous based bovine derived platelet gel embedded within
1635 a three-dimensional collagen implant on the healing and regeneration of the
1636 Achilles tendon defect in rabbits. **Expert opinion on biological therapy**. v.14,
1637 n.8, p.1065–1089, 2014.
- 1638 NAJJAR, T.; KAHN, D. Comparative study of healing and remodeling in various
1639 bones. **Journal of Oral Surgery**. v. 35 p.375-379, 1977.

- 1640 NETO, P. V.; PECCARO, C. A.; BALDUCCI, E. Z. Análise histomorfométrica do
1641 reparo ósseo em tíbias de ratos castrados submetidos ao efeito do alendronato
1642 sódico. *Revista Gaúcha Odontologia*. V. 56. P491-496. 2010.
- 1643 NICH, C.; TAKAKUBO, Y.; PAJARINEN, J. et al. Macrophages-Key cells in the
1644 response to wear debris from joint replacements. *Journal of Biomedical Materials*
1645 *Research Part A*, v.101, p. 3033-3045, 2013.
- 1646 NIZET, A.; CAVALIER, E.; STENVINKEL, P. et al. Bone alkaline phosphatase: An
1647 important biomarker in chronic kidney disease – mineral and bone disorder.
1648 ***Clinica Chimica Acta***, V.501, p.198-206, 2020.
- 1649 NORAHAN, M.H.; AMROON, M.; GHAREMANZADEH, R.; RABIEE, N.;
1650 BAHEIRAEI, N. Reduced graphene oxide: osteogenic potential for bone tissue
1651 engineering. ***IET Nanobiotechnology***. v.13, n.7, p.720-725, 2019.
- 1652 NUNES, D.C.S.; FAVALI, C.B.F.; SOUZA-FILHO, A.A. et al. Evaluation of cellular
1653 profile and main constituents os the rat and mouse blood from the animal house of
1654 the Federal University of Ceara, brazil. ***Revista Medicina UFC***, v. 34. n.1-2, p. 21-
1655 29, 1994.
- 1656 ORIMO, H.; SHIMADA, T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in
1657 the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in
1658 SaOS-2 human osteoblast-like cells. ***Molecular and Cellular Biochemistry***, v.
1659 315, p. 51-60, 2008.
- 1660 OVALLE, W.K.; NAHIRNEY, P.C. Tecido cartilaginoso e tecido ósseo. In: Ovalle,
1661 W.K.; Nahirney, P.C. ***Netter Bases da Histologia***. 2ºed. Rio de janeiro: Elsevier,
1662 p.131-156, 2014.
- 1663 PANZARINI, E.; VERGALLO, C.; MARIANO, S. A study on Biocompatibility of
1664 Carbon Nanoparticles in HeLa Cells is Dictated by Synthesis and Sterilization
1665 Procedures. ***Nanoscience and Nanometrology***, v.2, n.1, p.1–7, 2016.
- 1666 PARK, S.; RUOFF, R.S. Chemical methods for the production of graphenes.
1667 ***Nature nanotechnology***, v. 4, p.45–47, 2009.
- 1668 PASCHOAL, A.L. **Estudo da viabilidade de aplicação do polímero**
1669 **piezoelétrico fluoreto de polivinilideno (PVDF) entre osso cortical e placa de**
1670 **osteossíntese para estimulação de crescimento ósseo**. 2003. Tese
1671 (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Interunidades em Ciência e
1672 Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- 1673 PEI, S.; CHENG, H. The reduction of graphene oxide. **Carbon**. v.50, n.9, p. 3210-
1674 3228, 2012.
- 1675 PENG, S.; FENG, P.; WU, P.; HUANG, W.; YANG, Y.; GUO, W.; GAO, C.;
1676 SCHUAI, C. Graphene oxide as an interface phase between polyetheretherketone
1677 and hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. **Scientific Reports**, v.7, 2017.
- 1678 PINHEIRO, D.C.S.N.; FAVALI, C.B.F.; FILHO, A.A.S. et al. Parâmetros
1679 Hematológicos de Camundongos e Ratos do Biotério Central da Universidade
1680 Federal do Ceará. Bol. Inf. Cobeia, São Paulo, v. 3, p. 6-9, 1997/98.
- 1681 PINTO, K.N.Z.; TIM, C.R.; CROVACE, M.C. et al. Scaffolds of bioactive glass-
1682 ceramic (Biosilicate®) and bone healing: A biological evaluation in an experimental
1683 model of tibial bone defect in rats. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v.29,
1684 n.5, p.665–683, 2019.
- 1685 PRADO, F.A.; ANBINDER, A.L.; JAIME, A.P.G.; LIMA, A.P.; BALDUCCI, I.;
1686 ROCHA, R.F. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo
1687 experimental. Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo, São
1688 Paulo, v. 18, n. 1, p. 713, Jan/Abr., 2006.
- 1689 PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. Laboratory Methods
1690 in Histotechnology. **American Registry of Pathology**. Armed Forces Institute of
1691 Pathology, Washington, DC. 279p, 1992.
- 1692 RAO, A.J.; GIBON, E.; MA, T. et al. Revision joint replacement, wear particles,
1693 and macrophage polarization. *Acta Biomaterialia*, v.8, p. 2815-2823, 2012.
- 1694 RAJABI, A.H.; JAFFE, M.; ARINZEH, T.L. Piezoelectric materials for tissue
1695 regeneration: A review. **Acta Biomaterialia**. v.24, p.12-23, 2015.
- 1696 RASLAN, A.; DEL BURGO, S.L.; CIRIZA, J.; PEDRAZ, J.L. Graphene oxide and
1697 reduced graphene oxide-based scaffolds in regenerative medicine. **International**
1698 **Journal of Pharmaceutics**. v.580, n.30, 2020.
- 1699 REN, N.; LI, J.; QIU, J.; YAN, M.; LIU, H.; JI, D.; HUANG, J.; YU, J.; LIU, H.
1700 Growth and accelerated differentiation of mesenchymal stem cells on graphene-
1701 oxide-coated titanate with dexamethasone on surface of titanium implants. **Dental**
1702 **Materials**, v.33, n.5, p. 25–535, 2017.
- 1703 RIBEIRO, C.; MOREIRA, S.; CORREIA, V.; SENCADAS, V.; ROCHA, J. G.;
1704 GAMA, F.M.; GÓMEZ RIBELLES, J. L.; LANCEROS-MÉNDEZ, S. Enhanced
1705 proliferation of pre-osteoblastic cells by dynamic piezoelectric stimulation. **RSC**
1706 **Advances**. v.2, p.11504-11509, 2012.

- 1707 RIBEIRO, C.; PARSSINEN, J.; SENCADAS, V.V.; CORREIA, V.V.; MIETTINEN,
1708 S.; HYTONEN, V.P.; LANCEROS-MENDEZ, S. Dynamic piezoelectric stimulation
1709 enhances osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *Journal of*
1710 *Biomedical Materials Research - Part A*. v.103, n.6, p.2172-2175, 2015.
- 1711 ROTTA, M.; ZADOROSNY, L.; CARVALHO, C.L.; MALMONGE, J.A.;
1712 MALMONGE, L.F.; ZADOROSNY, R. YBCO ceramic nanofibers obtained by the
1713 new technique of solution blow spinning. **Ceramics International**. v.42, n.14,
1714 p.16230–16234, 2016.
- 1715 SAMPAIO, A.B.A. **Efeitos de um enxerto biofuncional e da terapia laser de**
1716 **baixa intensidade em defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos**. 2019.
1717 Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e
1718 Zootecnia - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- 1719 SAMUELSON, D.A. Cartilagem e Osso. In: SAMUELSON, D.A. **Tratado de**
1720 **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier, p.97–124, 2007.
- 1721 SILVA, A.M.H. **Análise Morfométrica 2D e 3d DE Amostras de Osso**
1722 **Trabecular Utilizando Microtomografia Tridimensional por Raios-X**. 2009. 77f.
1723 Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Medicina, Universidade
1724 de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- 1725 SILVA, T.B. Caracterização de um modelo animal de doença renal produzida por
1726 isquemia e reperfusão em *Rattus norvegicus* Wistar. 2015.125 F. Tese
1727 (Doutorado) – Programa de pós-graduação em saúde e desenvolvimento na
1728 região centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo
1729 Grande – MS, 2015.
- 1730 STEVEN, R.A.; HENRY, A.S. A review of power harvesting using piezoelectric
1731 materials (2003–2006). **Smart Materials and Structures**. v.16, n.3, p.1-21, 2007.
- 1732 SUPRONOWICZ, P.R.; AJAYAN, P.M.; ULLMAN, K.R.; ARULANANDAM, B.P.;
1733 METZGER, D.W.; BIZIOS, R.J. Novel current-conducting composite substrates for
1734 exposing osteoblasts to alternating current stimulation. **Journal of Biomedical**
1735 **Materials Research**, v.59, n.3, p. 499– 506, 2002.
- 1736 SZEWCZYK, P.K.; METWALLY, S.; KRYSIAK, Z.J.; KANIUK, L.;
1737 KARBOWNICZEK, J.E.; STACHEWICZ, U. Enhanced osteoblasts adhesion and
1738 collagen formation on biomimetic polyvinylidene fluoride (PVDF) films for bone
1739 regeneration. **Biomedical Materials**. v.14, n.6, 2019.

- 1740 TANG, D.; TARE, R.S.; YANG, L.Y.; WILLIAMS, D.F.; OU, K.L.; OREFFO, R.O.C.;
1741 Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone
1742 regeneration. **Biomaterials**, v.83, p. 363-382, 2016.
- 1743 VYAS, C.; RÚBEN, P.; BOYANG, H. et al. Engineering the vasculature with
1744 additive manufacturing. **Current Opinion in Biomedical Engineering**. v. 2, p.1-
1745 13, 2017.
- 1746 YAN, J.; CHEN, L.; HUANG, C.C.; PULMÃO, S.C.; YANG, L.; WANG, W.C.; LIN,
1747 P.H.; SUO, G.; LIN, C.H. Consecutive Evaluation of Graphene Oxide and
1748 Reduced Graphene Oxide Nanoplatelets Immunotoxicity on Monocytes. **Colloids**
1749 **Surfaces B: Biointerfaces**. v.153, p.300 – 309, 2017.
- 1750 YU, J.; NG, Y. H.; WONG R. J.; AMAL, R. Reduced Graphene Oxide: Control of
1751 Water Miscibility, Conductivity, and Defects by Photocatalysis. **ChemCatChem**.
1752 v.5, n.10, p.3060–3067, 2013.
- 1753 WANG, X.; ZHI, L.; MÜLLEN, K. Transparent, Conductive Graphene Electrodes
1754 for Dye-Sensitized Solar Cells. **Nano Letters**. v.8, n.1, p.323–327, 2008.
- 1755 XU, C.; SHI, X.; JI, A.; SHI, L.; ZHOU, C.; CUI, Y. Fabrication and Characteristics
1756 of Reduced Graphene Oxide Produced with Different Green Reductants. **PLOS**
1757 **ONE**. v.10, n.12, 2015.
- 1758 ZADOROSNY, L. **Produção e caracterização de micro e nanofibras de**
1759 **Poli(fluoreto de vinilideno): PVDF obtidos pela técnica de Fiação por Sopros**
1760 **em Solução**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos
1761 Materiais, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira – Sp, 2013.
- 1762 ZANCANELA, D.C.; SIMAO, A.M.S.; FRANCISCO, C.G.; DE FARIA, A.N.;
1763 RAMOS, A.P.; GONÇALVES, R.R.; MATSUBARA, E.Y.; ROSOLEN, J.M.;
1764 CIANCAGLINI, P. Graphene oxide and titanium: synergistic effects on the
1765 biomineralization ability of osteoblast cultures. *Journal of Materials Science:*
1766 *Materials in Medicine*, v.27, n.4, p. 1–9, 2016.
- 1767 ZHANG, Q.; LIU, X.; MENG, H.; LIU, S.; ZHANG, C. Reduction pathway-
1768 dependent cytotoxicity of reduced graphene oxide. **Environmental Scienci:**
1769 **Nano**. v.5, n.6, p.1361 – 1371, 2018.
- 1770 ZHAO, G.; WEN, T.; CHEN, C.; WANG, X. Synthesis of graphene-based
1771 nanomaterials and their application in energy-related and environmental-related
1772 areas. *RSC Advances*. v.2, n.25, p.9286-9303, 2012.

