

Thiago Machado

**Análise da biocompatibilidade e do reparo ósseo em
defeito crítico de calvária de ratos machos Wistar
utilizando substituto ósseo particulado bifásico associado
ou não ao Trióxido Mineral Agregado**

**ARAÇATUBA - SP
2024**

Thiago Machado

**Análise da biocompatibilidade e do reparo ósseo em
defeito crítico de calvária de ratos machos Wistar
utilizando substituto ósseo particulado bifásico associado
ou não ao Trióxido Mineral Agregado**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia.
Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial).

Orientador: Prof. Assoc. Idelmo Rangel Garcia Jr.

**ARAÇATUBA - SP
2024**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M149a Machado, Thiago.
Análise da biocompatibilidade e do reparo ósseo em defeito crítico de calvária de ratos machos Wistar utilizando substituto ósseo particulado bifásico associado ou não ao Trióxido Mineral Agregado / Thiago Machado. - Araçatuba, 2024

79 f. : il. ; graf.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Substitutos ósseos 2. Regeneração óssea 3. Sobre-
vivência celular 4. Ratos I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dedico esse trabalho, inicialmente à **Nzambi**, e a todos os **Orixás, Nkisis, Voduns, Encantados, Entidades e Espíritos Elevados**, que a mim me guiam e auxiliam cada passo e decisão.

À minha mãe **Regina Célia Machado** que desde o princípio incentivou cada passo e cada escolha por mim feita, permitindo que eu pudesse trilhar meu destino de forma serena pois a certeza de seu esteio me fez pisar mais firme a cada passo, sem medo de quedas, sempre a me sentir seguro e com a clareza de não estar jamais sozinho e perseverar.

À minha avó **Profa. Dra. Maria Regina Rodrigues Machado** (*in Memoriam) que dedicou sua vida a formar e cuidar de pessoas, não apenas como professora e cirurgiã-dentista, mas também como mãe e avó. Transmitindo conhecimento, valores morais e éticos, alegria, vontade de viver e sempre em busca de seus sonhos sem esmorecer jamais! Marcou a vida de um sem número de pessoas por onde andou, e fez surgir em mim desde pequeno o amor pela odontologia, profissão que sigo como sacerdócio em dedicação ao bem comum. A perseverança de seus sonhos me guiou e me guiará até meu último suspiro.

Dedico, também, esta obra à minha irmã **Patrícia Machado** e meu irmão **Emiliano Machado**, que me acompanham desde o princípio de minha jornada neste mundo, dando carinho amor e atenção que apenas as pessoas que sabem o significado do verdadeiro amor fraternal podem transmitir. Minha irmã uma artista por natureza contagia a todos com sua alegria sempre será um grande exemplo como pessoa. Meu irmão, assim como eu também é cirurgião-dentista, a quem me espelho com o trato com os pacientes e a capacidade como profissional, espero poder um dia ser 1% do profissional que você é meu irmão.

Às minhas tias **Maria Emília Machado Nunes Adão**, **Lúcia Helena Machado** e aos meus tios **José Machado Filho** (*in Memoriam) e **Antônio Nunes Adão** por terem auxiliado em minha trajetória, ensinando e educando, além de ser um porto seguro a cada aperto.

Às minhas primas **Beatriz**, **Débora**, **Eliza**, **Karina**, **Yasmin** e ao pequeno **Levi**, por todo o carinho que temos uns com os outros e por cada minuto de companheirismo que sempre tivemos.

À minha cunhada **Andréa** e minha sobrinha **Ana Carolina** por toda a dedicação e carinho.

Aos demais familiares, todos os agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer ao meu orientador **Prof. Assoc. Idelmo Rangel Garcia Jr.** Por todos os momentos em que compartilhamos experiências. Pelo acolhimento e respeito dispensado a mim e aos demais orientados. Por ser uma pessoa e profissional exemplar a quem todos deveriam ter como modelo de capacidade e retidão. Por aconselhar e guiar minhas escolhas profissionais e pessoais e por permitir o meu desenvolvimento como Cirurgião Bucomaxilofacial e docente neste período em que estivemos lado a lado como orientador e orientado.

Ao meu Orientador de Iniciação Científica e Mestrado **Prof. Titular Wirley Gonçalves Assunção**, que me recebeu como orientado no ano de 2012 me abrindo as portas de seu laboratório, encorajando a colocar ideias em prática e ajudando a manter os pés no chão, muito obrigado por cada palavra, bronca, puxão de orelha, por toda a paciência e por mostrar que sempre podemos mais.

Agradeço também ao **Prof. Assoc. Eder Ricardo Biasoli** por compartilhar seu conhecimento e paixão pela Odontologia e pela Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, sob sua tutela tive inestimável aprendizado que me permitiu uma escolha segura pela especialidade onde seus ensinamentos premeiam minha prática clínica em busca de uma excelência cirúrgica.

Ao **Prof. Dr. Elias Nahin Kassis** por me ensinar a arte da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e por ser um conselheiro e um grande incentivador pessoal e profissional, um grande exemplo de pessoa, com uma história de vida impressionante e reputação que o precede.

Ao **Prof. Dr. Igor Mariotto Benetti** por sempre me incentivar e por toda a dedicação ao ensinar os caminhos da CTBMF com tanta propriedade e capacidade.

Ao **Prof. Dr. André Luís da Silva Fabris** pela amizade e por todo o incentivo dentro da CTBMF e da Implantodontia. Um grande contador de “causos”, um grande amigo e um excelente preceptor. Um dia espero poder ter um pouco da sua capacidade.

Ao **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza** que por tantas vezes compartilhou momentos, guiou plantões com maestria, também um grande contador de “causos”, fez com que vários momentos se tornassem mais leves e menos estressantes.

Aos demais professores das disciplinas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia, **Oswaldo, Alessandra, Ana Paula, Daniela** agradeço a dedicação com os alunos e por mostrarem os caminhos da docência superior.

Ao **Prof. Assoc. Celso Koogi Sonoda** que por vezes mostrou a simplicidade da odontologia bem executada, que ensinou e ensina cada aula que esteve sob sua tutela o valor do respeito ao paciente e da odontologia baseada em evidências. Cada conselho e dica levo ainda hoje comigo como verdadeiras leis de como se praticar uma odontologia de excelência

Ao **Prof. Dr. Gustavo Sivieri Araújo** um grande amigo e incentivador, grande companheiro de jornada que mostra desprendimento e preocupação verdadeira com seus amigos e de uma forma peculiar compartilha experiências e aconselha. Um muito obrigado por tudo!

À **Profa. Titular Sandra Helena Penha de Oliveira**, por me orientar tanto na vida como na academia, uma pessoa

irreverente e zelosa, que aos poucos conquista a todos. Uma professora exemplar e uma pesquisadora de impressionante capacidade! Seu coração enorme me permitiu desenvolver grande parte deste trabalho em seu laboratório, fornecendo todo o suporte necessário para que tudo corresse bem e o objetivo final fosse alcançado. Suas aulas de farmacologia, que me botavam medo, na graduação hoje fazem uma diferença enorme dentro da minha prática clínica tanto ambulatorial como hospitalar. Não tenho palavras para agradecer!

À **Profa. Assoc. Roberta Okamoto**, por sempre ser um ombro amigo e um exemplo de como um professor e um orientador deve agir frente aos desafios da docência. Sua excelência acadêmica e científica é inspiradora.

À **Profa. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto**, por compartilhar seu conhecimento e auxiliar no desenvolvimento deste trabalho. Sua ajuda foi fundamental para a realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Titular João Eduardo Gomes-Filho**, que nos momentos em que a ideia desta pesquisa ainda era apenas uma possibilidade, ajudou a formatar e apontou caminhos e colocou toda a estrutura de pesquisa do departamento de Odontologia Restauradora da FOA-Unesp à disposição, atitudes estas que foram fundamentais para a realização do trabalho.

À **Profa. Dra. Índia Olinta de Azevedo Queiróz** uma incentivadora das mais importantes, sempre viu além daquilo que eu quis mostrar e me impulsionou para bem além do que eu poderia imaginar alcançar dentro da pós-graduação.

À **Profa. Dra. Melyna Marques de Almeida** que desde os tempos de graduação é uma verdadeira amiga em que compartilhamos momentos divertidos e de grande aprendizado

também como colegas de pós-graduação. Acompanhamos os passos um do outro tanto nos bons como nos maus momentos e conseguimos crescer e perseverar.

Às colegas e amigas da Pós-graduação **Marina** e **Ana Maria** e à Cirurgiã-Dentista **Camila**, que tanto me ajudaram em um período conturbado como o mestrado, obrigado por cuidarem dos animais nos momentos em que precisei me ausentar, obrigado por terem despendido tempo e esforço para que este trabalho pudesse ser concluído.

Às alunas de iniciação científica **Maria** e **Sara** que tanto contribuíram para que este trabalho fosse executado, permitindo que todos os experimentos fossem feitos com maestria e que prontamente me ajudaram em cada momento de necessidade.

À **Profa. Me. Natália Sanches** uma amiga que fiz durante o doutorado, pau para toda obra. Me ajudou em inúmeros momentos permitindo a realização de todos os projetos em que estivemos envolvidos.

Ao amigo **Prof. Dr. André Hergesel de Oliva**, um amigo que a graduação me trouxe e que sabe o verdadeiro valor da amizade, uma pessoa que me ensinou muito nesses anos e que tenho enorme dívida de gratidão, obrigado por tudo!

Ao amigo **Prof. Dr. Gustavo Antonio Correa Momesso**, outro amigo que a graduação me proporcionou conhecer e que durante nosso início de caminhada dividíamos estágios e treinamentos para iniciação científica. Um grande amigo que sempre me acompanha, muito obrigado!

Aos demais amigos que conheci com a graduação e que tem um espaço especial na minha história, **Anelise, Úrsula, Ronaldo, Sílvio, Gabriela, Tatiane, Gustavo Fabri, Marcelo,**

Marcelo Montanare, Paulo Gallo, Nairobi, Igor, Felipe Gatto, Nathalia, Francisco.

Ao amigo da pós-graduação **Ciro Borges Duailibe de Deus** que tantos momentos tivemos de diversão e de trabalho, um grande profissional e muito bom amigo que fez a ponte para que eu pudesse receber o material utilizado na pesquisa, um enorme obrigado!

Aos demais amigos da pós-graduação **Bruna, Laís, Luiza, Caio, Leonardo, Paulo, Cássio, William, Luara, Lara, Guilherme** obrigado por compartilharem momentos e experiências comigo e por todos os momentos que tivemos.

Aos meus amigos de uma vida **Leandro, Diego, Paulo, Paulo Ricardo, Ricardo, Jackson, Nicolas, Felipe Djun, Jefferson, Jeniffer, Marcela, Leandro Teixeira, Amanda, Ana Carolina, Thierry, Larissa, Talita, Flávio, Juliana, Michelle, Angélica, Isabela Dias** e tantos outros por nutrimos uma amizade imprescindível para o que hoje me tornei.

Aos meus companheiros de trabalho do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio por serem uma verdadeira família.

Agradeço às instituições **AEMS, Fait e Ceunsp** que me permitiram crescer como profissional ao exercer a docência, fornecendo-me toda a estrutura necessária para que meus objetivos fossem alcançados. E permitiram que me mantivesse vinculado à FOA-Unesp para que eu pudesse concluir este doutoramento.

A todos os meus alunos da **AEMS, Fait e Ceunsp**.

À Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa do seu Diretor, **Prof. Tit.**

Alberto Carlos Botazzo Delbem pela oportunidade de realização do curso de Doutorado em Odontologia.

Aos professores **Christiane, Cláudio, Maria Lúcia, Luíz Fernando** que de maneiras e em momentos diferentes impactaram minha trajetória e me mostraram que sonhar é possível. Exercer a docência com tamanha maestria é para poucos e sempre me espelharei em vocês para que eu possa não apenas um dia ensinar, mas formar cidadãos conscientes de seu papel para com a sociedade.

Aos funcionários e amigos do laboratório do prédio 5, o secretário **Renato de Oliveira**, agradeço por todo apoio e ao **Marco Ianner** e **Paulo Gratão**, sou muito grato por vocês terem me ensinado sobre os processamentos laboratoriais.

Ao **João Correa** e **Camilo Venâncio** por cuidarem tão bem dos animais dos experimentos, ajudando durante todo o processo, organização do biotério, cirurgias e eutanásia.

À todos os funcionários da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Santa Casa de Misericórdia de Birigui, UNIMED – Araçatuba.**

Aos **pacientes** atendidos por confiarem suas vidas e permitirem novos aprendizados para que pudéssemos cada vez mais implementar técnicas que trouxessem benefício ao maior número de pessoas possível.

Aos **animais** que serviram ao propósito como modelo de estudo e permitem que novas tecnologias sejam aplicadas em prol do desenvolvimento da ciência e da sociedade.

À **Einco Biomaterial** por fornecer o substituto ósseo utilizado neste trabalho.

'Exu matou um pássaro ontem com uma pedra que só jogou hoje'

Ditado Yorubá

RESUMO

Machado T. Análise da biocompatibilidade e do reparo ósseo em defeito crítico de calvária de ratos machos wistar utilizando substituto ósseo particulado bifásico associado ou não ao trióxido mineral agregado [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2024.

O presente estudo tem como objetivo a investigação do uso combinado de MTA Angelus Branco® e o substituto ósseo bifásico Osteosynt® para regeneração óssea. O MTA, amplamente utilizado em endodontia, é conhecido por sua biocompatibilidade e capacidade de induzir a mineralização tecidual. Já o Osteosynt®, composto por hidroxiapatita e β - tricálcico fosfato, oferece uma estrutura osteocondutora que facilita a formação de novo tecido ósseo. Para avaliar a pertinência dessa combinação, foram conduzidos experimentos in vitro e in vivo, usando como modelos experimentais defeito crítico em calvária de ratos Wistar e cultura celular com a linhagem Saos-2. A associação entre os biomateriais testados ocorreram em duas concentrações de MTA (5% e 10%), com análises em períodos de 28 e 45 dias. As avaliações incluíram viabilidade celular, resposta inflamatória e regeneração óssea. Os resultados sugerem que as combinações de Osteosynt® com 5% e 10% de MTA mostraram uma boa biocompatibilidade. Bem como, ambas as concentrações indicaram uma resposta favorável na regeneração óssea ao longo dos períodos analisados. Onde o MTA pode ter contribuído para a indução de células osteoprogenitoras e diferenciação celular, enquanto o Osteosynt® fornece a estrutura necessária para a neoformação óssea. Em conclusão, a combinação de MTA com substitutos ósseos bifásicos pode ser uma estratégia promissora para acelerar a regeneração óssea. No entanto, estudos complementares, como investigações microbiológicas e ensaios clínicos, são recomendados para avaliar a eficácia clínica e a segurança de longo prazo dessa abordagem para futuras aplicações em reabilitações maxilofaciais.

Palavras chave: substitutos ósseos; regeneração óssea; sobrevivência celular; ratos.

ABSTRACT

Machado T. Analysis of biocompatibility and bone repair in critical calvarial defect in male wistar rats using biphasic particulate bone substitute with or without mineral trioxide aggregate [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2024.

The present study aims to investigate the combined use of White MTA Angelus® and the biphasic bone substitute Osteosynt® for bone regeneration. MTA, widely used in endodontics, is known for its biocompatibility and ability to induce tissue mineralization. Osteosynt®, composed of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate, offers an osteoconductive structure that facilitates the formation of new bone tissue. To assess the efficacy of this combination, in vitro and in vivo experiments were conducted using critical calvarial defects in Wistar rats and cell cultures with the Saos-2 lineage as experimental models. The tested biomaterial associations included two concentrations of MTA (5% and 10%), with analyses conducted over 28 and 45 days. The evaluations included cell viability, inflammatory response, and bone regeneration. The results suggest that the combinations of Osteosynt® with 5% and 10% MTA demonstrated good biocompatibility. Both concentrations also indicated a favorable response in bone regeneration over the analyzed periods. MTA may have contributed to the induction of osteoprogenitor cells and cell differentiation, while Osteosynt® provided the necessary structure for new bone formation. In conclusion, combining MTA with biphasic bone substitutes may be a promising strategy to accelerate bone regeneration. However, further studies, such as microbiological investigations and clinical trials, are recommended to evaluate this approach's clinical efficacy and long-term safety for future applications in maxillofacial rehabilitation.

Keywords: bone substitutes; bone regeneration; cell viability; rats.

LISTA DE FIGURAS

- Fig 1. Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados, que serão divididos igualmente (n=5) em dois tempos de eutanásia 28 e 45 dias 26
- Fig 2. Representação esquemática das referências do defeito crítico 28
- Fig 3. A- Tricotomia; B- Degermação com PVPI; C- Acesso cirúrgico em “V” em região fronto-parietal; D- Descolamento dos tecidos; E- Trefinamento com copiosa irrigação; F- Defeito ósseo criado ocupado pelo coágulo G- Defeito ósseo criado preenchido pelo MTA; H- Defeito ósseo criado ocupado por substituto ósseo particulado; I- Sutura por pontos simples interrompidos 29

CAPÍTULO 1

- Fig 1. Representative images of the inflammatory infiltrate; a: group Clot 28 days; b: group Osteosynt 28 days; c: group MTA 28 days; d: group Osteosynt + 5% MTA 28 days; e: group Osteosynt + 10% MTA 28 days; f: group Clot 45 days; g: group Osteosynt 45 days; h: group MTA 45 days; i: group Osteosynt + 5% MTA 45 days; j: group Osteosynt + 10% MTA 45 days 50

CAPÍTULO 2

- Fig 1. Representative histology of the different groups tested. A: Clot at 28 days; B: Osteosynt at 28 days; C: MTA at 28 days; D: Osteosynt+5%MTA at 28 days; E: Osteosynt+10%MTA at 28 days; F: Clot at 45 days; G: Osteosynt at 45 days; H: MTA at 45 days; I: Osteosynt+5%MTA at 45 days; J: Osteosynt+10%MTA at 45 days 69
- Fig 2. Representative images of coronal sections to verify structures. A: Clot at 28 days; B: Osteosynt at 28 days; C: MTA at 28 days; D: Osteosynt+5% MTA at 28 days; E: Osteosynt+10% MTA at 28 days; F: Clot at 45 days; G: Osteosynt at 45 days; H: MTA at 45 days; I: Osteosynt+5% MTA; J: Osteosynt+10% MTA 69
- Fig 3. Representative images captured at 40X magnification to verify cell morphology after direct contact between cells and material 70

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 1

Graph 1a. Comparative chart between groups and periods related to the eluents released by the tested materials present in the used extracts	50
Graph 2a. Descriptive chart of the inflammatory infiltrate	51

CAPÍTULO 2

Graph 1a. Comparative chart between groups and periods for the evaluation of bone neoformation	70
Graph 2a. Comparative chart between groups and periods for the evaluation of resorption and dimensional maintenance of biomaterials	71
Graph 3a. Chart of the mean bone volume values for the two periods	71
Graph 4a. Chart of the mean percentage bone volume values for the periods of 28 and 45 days	72
Graph 5a. Chart of the mean trabecular bone thickness values for the two periods	72
Graph 6a. Chart of the mean trabecular separation values for the periods of 28 and 45 days	73
Graph 7a. Chart of the mean trabecular number values for both periods	73
Graph 8a. Comparative chart between groups and periods for direct cell-biomaterial contact	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BV	Volume ósseo
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
EDTA	Ácido etileno tetra-acético
HÁ	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e eosina
MTA	Agregado Trióxido Mineral
ROI	Região de interesse
Si-CAP	Fosfato de cálcio modificado com silício
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação de trabéculas
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
β -TCP	Beta-tricálcio-fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 OBJETIVO	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Ética em Estudo Animal	22
3.2 Materiais Experimentais	22
3.3 Cimento Reparador MTA Angelus Branco®	22
3.4 Osteosynt® (40:60)	23
3.5 Ensaio In Vitro	23
3.5.1 Cultura de Células	23
3.5.2 Avaliação da Morfologia Celular por Meio do Contato Direto	23
3.5.3 Determinação da Viabilidade Celular	24
3.5.4 Preparação e Avaliação dos Eluentes	24
3.5.5 Avaliação da Viabilidade Celular	25
3.6 Ensaio In Vivo	25
3.6.1 Animais	25
3.6.2 Anestésico	27
3.6.3 Procedimento Cirúrgico	27
3.6.4 Procedimento de Preenchimento e Sutura	28
3.6.5 Análise Microtomográfica	29
3.6.6 Parâmetros de Escaneamento	30
3.6.7 Processamento das Imagens	30
3.6.8 Análise Tridimensional e Reconstrução	31
3.6.9 Parâmetros Microtomográficos	31
3.6.10 Histometria	32
3.6.11 Análise Histomorfométrica	32
3.6.12 Planejamento Estatístico	33
4 CAPÍTULO 1 - INTEGRATION OF WHITE MTA AND BIPHASIC BONE SUBSTITUTES FOR ENHANCING BONE REGENERATION: A PRECLINICAL STUDY ON BIOCOMPATIBILITY	35
4.2 Introduction	36
4.3 Objective	37
4.4 Materials and Methods	37

4.4.1 Animal Ethics	38
4.4.2 Animals	38
4.4.3 Experimental Materials	38
4.4.4 MTA Angelus Branco®	39
4.4.5 Osteosynt® (40:60)	39
4.4.6 Anesthesia	39
4.4.7 Surgical Procedure	39
4.4.8 Euthanasia	40
4.4.9 Histometric	40
4.4.9.1 Histomorphometric Analysis	41
4.4.10 Cell Culture	41
4.4.11 Cell Viability Determination	41
4.4.12 Preparation and Evaluation of Extracts	42
4.4.13 Exposure of Cells to Extracts	42
4.4.14 Cell Viability Evaluation	42
4.4.15 Statistical Planning	43
4.5 Results	43
4.6 Discussion	44
4.7 Conclusion	45
4.8 References	46
5 CAPÍTULO 2 - ADVANCEMENTS IN BIPHASIC BONE SUBSTITUTE BIOMATERIALS: INTEGRATING MTA FOR ENHANCED BONE REPAIR	52
5.1 Abstract	52
5.2 Introduction	53
5.2 Objective	54
5.3 Materials and Methods	55
5.3.1 Animal Ethics	55
5.3.2 Animals	55
5.3.3 Experimental Materials	55
5.3.4 MTA Angelus Branco®	56
5.3.5 Osteosynt® (40:60)	56
5.3.6 In Vitro Assay	56
5.3.6.1 Cell Culture	56

5.3.6.2 Assessment of Cellular Morphology through Direct Contact	57
5.3.6.3 Cell Viability – MTT Assay	57
5.3.7 In Vivo Assay	57
5.3.7.1 Animals and Surgical Procedure	57
5.3.7.2 Filling and Suturing Procedure	57
5.3.7.3 Microtomographic Analysis	57
5.3.7.4 Evaluated Parameters	58
5.3.7.5 Histometric	58
5.3.7.6 Statistical Analysis	58
5.4 Results	59
5.5 Discussion	62
5.6 Conclusion	64
5.7 References	64
6 CONCLUSÃO GERAL	75
ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO GERAL*

O estudo do processo de reparo ósseo e o desenvolvimento de biomateriais para recuperar o volume ósseo perdido, seja por trauma ou por processos fisiológicos, como a perda dentária, constituem um dos principais focos da pesquisa científica em odontologia no mundo. A busca por estratégias que acelerem e otimizem o reparo ósseo é um desafio constante para pesquisadores e clínicos. A modulação desse processo é essencial não apenas para restabelecer a função, mas também para garantir maior previsibilidade em procedimentos odontológicos e ortopédicos.

No campo da reconstrução maxilofacial, o enxerto autógeno é amplamente reconhecido como o “padrão ouro” devido à sua biocompatibilidade e capacidade osteoindutora. No entanto, o uso de enxertos homólogos, xenólogos e aloplásticos tem se mostrado uma alternativa promissora, reduzindo a necessidade de múltiplos procedimentos cirúrgicos, minimizando o tempo de recuperação e proporcionando uma reabilitação mais rápida [1,2]. Esses biomateriais têm contribuído para o sucesso clínico por meio da osseointegração, conceito amplamente desenvolvido desde a descoberta por P.I. Branemark, que revolucionou a implantodontia moderna [3].

A incorporação de biomateriais em procedimentos de enxertia óssea tem evoluído significativamente, permitindo o desenvolvimento de técnicas avançadas de regeneração. No entanto, alguns desafios ainda persistem, como atrasos na formação óssea, complicações relacionadas à manipulação cirúrgica inadequada e limitações dos próprios materiais. Problemas como estabilidade primária deficiente, desprendimento do enxerto e baixa taxa de contato entre osso e implante podem comprometer o sucesso da intervenção [4,5].

A biologia do tecido ósseo envolve múltiplos fatores para que ocorra o reparo, o tecido ósseo é classificado como um tecido conjuntivo altamente especializado, com um turnover dinâmico regulado por interações complexas entre fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. A diferenciação osteoblástica é controlada por hormônios, citocinas e fatores de transcrição, como Runx-2, osteocalcina e

* Lista de referências no Anexo A

osteopontina, que desempenham papéis centrais na formação e remodelação óssea [6]. A Runx-2, por exemplo, é um fator de transcrição multifuncional que regula a expressão de genes da matriz extracelular, sendo essencial para a diferenciação de osteoblastos e condrócitos [7-9].

O uso de materiais para a regeneração óssea envolve biomateriais como o β -fosfato tricálcico (β -TCP) são amplamente utilizados devido às suas propriedades osteocondutoras, promovendo a adesão e proliferação de células ósseas em sua superfície. Alternativas mais recentes, como o fosfato de cálcio modificado com silício (Si-CAP), mostraram alta bioatividade e maior capacidade de reabsorção, equilibrando suporte mecânico e integração biológica [10-12].

Os biomateriais bifásicos, como a combinação de hidroxiapatita (HA) e β -TCP, oferecem vantagens significativas. Essa combinação proporciona estabilidade mecânica e reabsorção adequada, permitindo que o osso substitua progressivamente o material enxertado. A inclusão de íons terapêuticos, como magnésio e estrôncio, pode melhorar as propriedades osteoindutoras e osteocondutoras dos substitutos ósseos bifásicos [10,12]. No entanto, uma das limitações desses materiais é a diferença nas taxas de degradação entre seus componentes, que pode interferir na remodelação óssea adequada [13].

Entre os biomateriais odontológicos, o Agregado Trióxido Mineral (MTA) um cimento reparador em endodontia tem sido utilizado para selamento de perfurações patológicas e iatrogênicas [14]. Suas propriedades biocompatíveis e antimicrobianas também permitiram sua aplicação em procedimentos como pulpotomias, apicificações e capeamentos pulpares diretos [15,16].

O potencial do MTA como indutor de regeneração óssea foi demonstrado por Vidovic Zdrilic e Azevedo Queiroz, ao avaliarem o efeito do MTA em células do ligamento periodontal e do osso alveolar usando um modelo transgênico com mapeamento Cre-LoxP, indicando sua eficácia na regeneração tecidual [17].

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do MTA Angelus Branco® (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Brasil) na citotoxicidade, na resposta tecidual e no reparo ósseo quando associado a um substituto ósseo bifásico.

Avaliar e quantificar as diferenças entre as porcentagens de mistura entre os biomateriais em cada tempo experimental e produzir uma robusta literatura indicando a vanguarda do desenvolvimento de biomateriais que possibilitem um reparo ósseo superior em curto, médio e longo prazos.

Definir quais as porcentagens indicam melhor resposta tecidual e se há a possibilidade de diferentes indicações clínicas para o uso de cada porcentagem da mistura entre MTA e substituto ósseo bifásico.

Avaliar e definir caminhos para pesquisas clínicas visando a futura aplicabilidade do novo material proposto e assim cumprir o papel da pesquisa odontológica em benefício da população.

3 MATERIAIS E MÉTODOS[†]

3.1 Ética em Estudo Animal

Antes do início do experimento, o projeto foi submetido à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o processo nº 402-2023 (Anexo B), garantindo a conformidade com as diretrizes éticas e regulamentações nacionais para pesquisa com animais.

3.2 Materiais Experimentais

Para este estudo, foram utilizados o cimento reparador MTA Angelus Branco® (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Brasil) e o substituto ósseo Osteosynt® (Eincobio, Belo Horizonte, MG, Brasil)). Os materiais foram preparados de acordo com as instruções específicas de cada fabricante, garantindo a padronização nos procedimentos experimentais.

As diferentes proporções entre os materiais foram obtidas por mensuração precisa em balança analítica, visando assegurar a exatidão nas combinações de MTA com o biomaterial particulado. As proporções testadas foram:

- Proporção 1: 0,95 g de biomaterial particulado + 0,05 g de MTA
- Proporção 2: 0,90 g de biomaterial particulado + 0,10 g de MTA

A manipulação cuidadosa dessas combinações permitiu avaliar o impacto de diferentes concentrações de MTA no reparo ósseo e na resposta tecidual no modelo de defeito crítico em calvária de ratos.

3.3 Cimento Reparador MTA Angelus Branco®

O MTA Angelus Branco® é um cimento composto por óxidos minerais em forma de partículas finamente hidrofílicas, que promovem uma rápida reação com a água para formar uma pasta de alta biocompatibilidade. Sua composição inclui os seguintes óxidos: SiO₂, K₂O, Al₂O₃, Na₂O, Fe₂O₃, SO₃, CaO, Bi₂O₃ e MgO, além de

[†] Lista de referências no Anexo A

resíduos insolúveis de sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfatos de potássio e sódio. Essas propriedades tornam o MTA Angelus Branco® um material ideal para procedimentos reparadores, proporcionando selamento eficiente e indução à formação de tecidos mineralizados [18].

3.4 Osteosynt® (40:60)

O Osteosynt®, composto na proporção 40:60, apresenta propriedades osteocondutivas que favorecem o aumento do osso viável em áreas que requerem reabilitação com implantes. Sua biocompatibilidade e previsibilidade têm se mostrado eficientes em promover uma integração adequada com a matriz óssea, permitindo a formação de osso vital e garantindo a estabilidade a longo prazo [10].

3.5 Ensaio *In Vitro*

3.5.1 Cultura de Células

O ensaio *in vitro* para avaliar os materiais MTA Angelus Branco® e Osteosynt®, e suas associações (Osteosynt® + MTA) em diferentes concentrações foi realizado utilizando células da linhagem Saos-2. Essa linhagem é amplamente empregada em estudos relacionados à diferenciação, proliferação e metabolismo ósseo [19,20].

As células Saos-2 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 50 mg/mL de estreptomicina e 1% de um coquetel antibiótico/antifúngico (300 U/mL de penicilina, 300 mg/mL de estreptomicina e 5 mg/mL de anfotericina B) (Gibco BRL). A cultura foi mantida em condições controladas: 37°C, 100% de umidade, 95% de ar e 5% de CO₂ [20].

3.5.2 Avaliação da Morfologia Celular por Meio do Contato Direto

Para investigar a resposta das células Saos-2 ao contato direto com MTA Angelus Branco®, Geistlich Bio-Oss®, Osteosynt® e associações de Osteosynt® + MTA, as células foram semeadas a uma densidade inicial de 2×10^5 células por lamínula de vidro (13 mm de diâmetro, Deckgläser, Laudakönigshofen, Alemanha). As culturas foram mantidas até atingir a confluência necessária. Posteriormente, as lamínulas contendo as células Saos-2 foram transferidas para placas de cultura revestidas com os materiais testados, onde cada poço recebeu 1 mL de meio fresco.

As células foram incubadas por 24 horas e 48 horas, e um grupo controle foi mantido sem qualquer revestimento no fundo dos poços. As placas de cultura celular utilizadas continham 24 poços, e a face da lamínula contendo as células Saos-2 foi posicionada de modo que permanecesse em contato direto com a superfície do material revestido.

Cada experimento foi realizado em triplicata, e durante o período de incubação, a morfologia celular foi examinada utilizando um microscópio de contraste de fase. As observações foram fotografadas para análise posterior [21].

3.5.3 Determinação da Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade das células Saos-2 após o contato com os materiais, foi utilizado o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromida). Esse método mede a atividade metabólica das células vivas, fornecendo uma estimativa quantitativa da viabilidade celular [22].

3.5.4 Preparação e Avaliação dos Eluentes

Os materiais testados, em suas diferentes proporções, foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante. Para a preparação dos respectivos extratos (eluentes), os materiais foram colocados no fundo dos poços em placas de cultura celular de 24 poços e cobertos com 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As placas foram incubadas em atmosfera controlada e umidificada, contendo 5% de CO₂ a 37°C por um período de 24 horas.

Após esse período, o sobrenadante (meio contendo os extratos liberados pelos materiais) foi coletado e filtrado através de filtros estéreis de 0,22 μm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para garantir a remoção de partículas contaminantes. Os materiais residuais no fundo dos poços foram descartados, e o sobrenadante coletado foi denominado como extrato dos respectivos materiais. Esses extratos foram utilizados em diferentes diluições: 1/1 (não diluído), 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 [21,22].

As células Saos-2 foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade inicial de 10^5 células por poço e incubadas por 24 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 a 37°C , permitindo a formação de um monolayer celular (confluência). Após alcançar a confluência, os extratos dos materiais foram adicionados aos poços correspondentes [22].

3.5.5 Avaliação da Viabilidade Celular

O grupo controle foi cultivado sem a presença de extratos, para permitir a comparação com os grupos tratados. A solução de MTT (Sigma-Aldrich) foi adicionada às células após 24 e 48 horas de exposição aos extratos. O ensaio de MTT mede a atividade metabólica das células, baseada na conversão do tetrazólio em formazana por enzimas mitocondriais ativas, indicando a viabilidade celular [22].

A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm, para quantificação da viabilidade celular. Todo o experimento foi conduzido em triplicata, assegurando a reprodutibilidade dos resultados [22].

3.6 Ensaio *In Vivo*

3.6.1 Animais

Para trabalho, foram utilizados 50 ratos machos (Wistar), divididos em 5 grupos ($n=10$) e subdivididos em dois tempos experimentais 28 e 45 dias ($n=5$), com

idades aproximadas de 30 dias, pesando aproximadamente 250g, sendo provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP.

Os animais foram mantidos em ambientes com temperatura entre 22°C e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), em gaiolas coletivas, contendo seis ratos por gaiola.

No interior das gaiolas havia cama de serragem, a qual foi trocada diariamente. Esses animais foram alimentados antes e durante todo o período experimental, com ração sólida triturada e água “ad libitum”, exceto nas 12 horas pré e pós-operatórias.

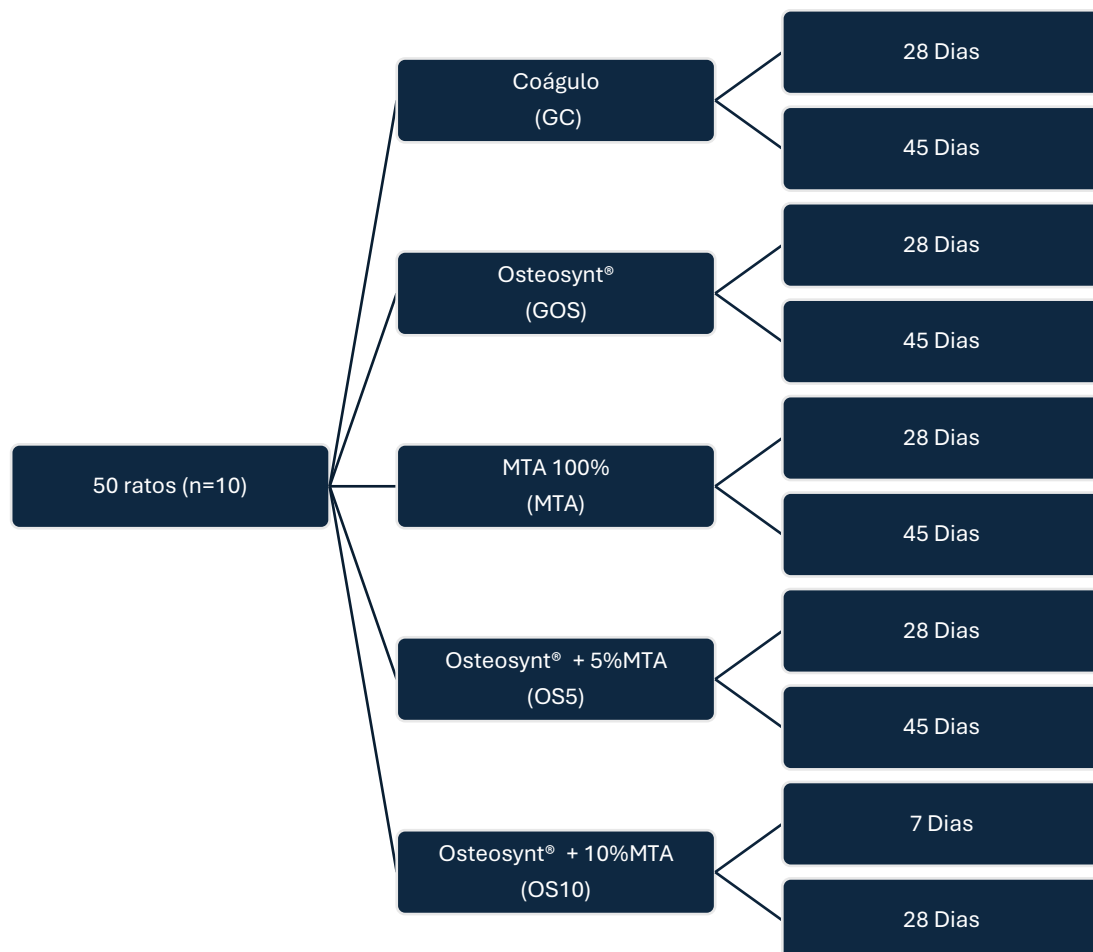


Fig 1. Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados, que serão divididos igualitariamente (n=5) em dois tempos de eutanásia 28 e 45 dias.

3.6.2 Anestésico

Após 12 horas de jejum, os animais foram submetidos à sedação por meio de administração intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brasil), na dosagem de 10 mg/kg, associada ao Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 5 mg/kg[23]. Esta combinação de anestésicos proporciona sedação profunda e analgesia adequada para procedimentos cirúrgicos em modelos animais.

3.6.3 Procedimento Cirúrgico

Após a indução anestésica, foi realizada tricotomia na região fronto-parietal do animal. O animal foi posicionado em decúbito ventral horizontal, e a área cirúrgica recebeu antissepsia com PVPI 10% tópico. Campos estéreis foram cuidadosamente posicionados para garantir a assepsia do procedimento.

Foi feito o acesso cirúrgico por meio de uma incisão em formato de "V" na região do crânio, seguido do descolamento e rebatimento de um retalho total, permitindo a exposição do osso parietal de ambos os lados. O afastamento do retalho foi realizado utilizando descoladores cirúrgicos adequados.

Com uma trefina cirúrgica de 5 mm de diâmetro externo e 4 mm de diâmetro interno, acoplada a um motor de baixa rotação, foi realizada a osteotomia na linha mediana entre os ossos parietais, perfurando até a cortical interna. A remoção do fragmento ósseo expôs a dura-máter, que foi preservada intacta para evitar lesões neurológicas. O procedimento gerou um defeito de tamanho crítico (DTC) com 5 mm de diâmetro, adequado para avaliação da regeneração óssea no modelo experimental [23].

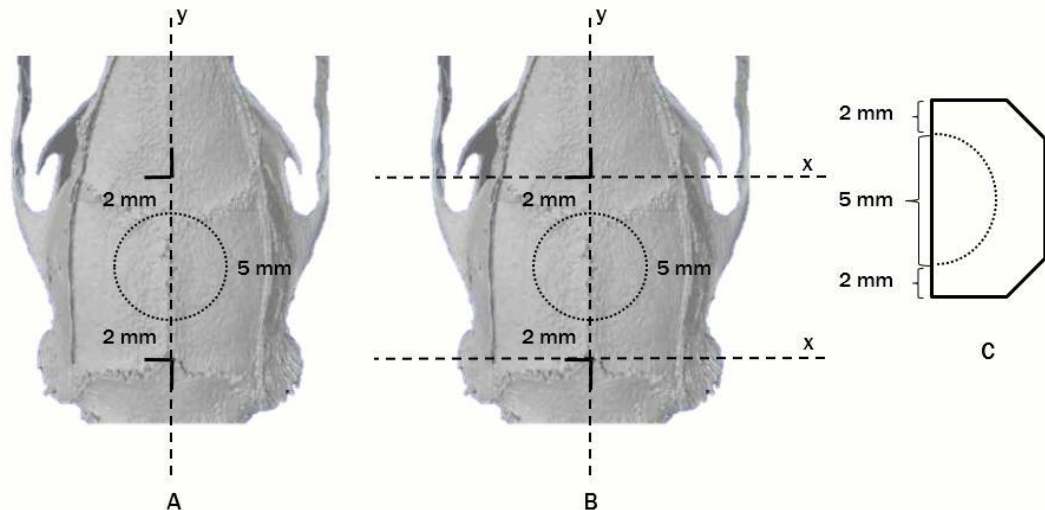


Fig 2. Representação esquemática das referências do defeito crítico.

Imagem adaptada de Luvizuto ER et al. 2011

3.6.4 Procedimento de Preenchimento e Sutura

O defeito ósseo foi realizado em 50 animais, que foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais. Cada defeito foi preenchido conforme a designação do grupo: com coágulo sanguíneo, MTA Angelus Branco®, Osteosynt®, ou uma associação entre MTA e Osteosynt® em duas diferentes concentrações.

Após o preenchimento do defeito com o material correspondente, o retalho total foi reposicionado cuidadosamente sobre a área operada. A sutura foi realizada com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil), utilizando pontos simples interrompidos para garantir a aproximação adequada dos tecidos e promover uma cicatrização eficiente [23].

Esse procedimento padronizado assegura a estabilidade do material enxertado e a proteção do defeito durante o período de recuperação, permitindo a avaliação da eficácia dos materiais testados nos diferentes tempos experimentais

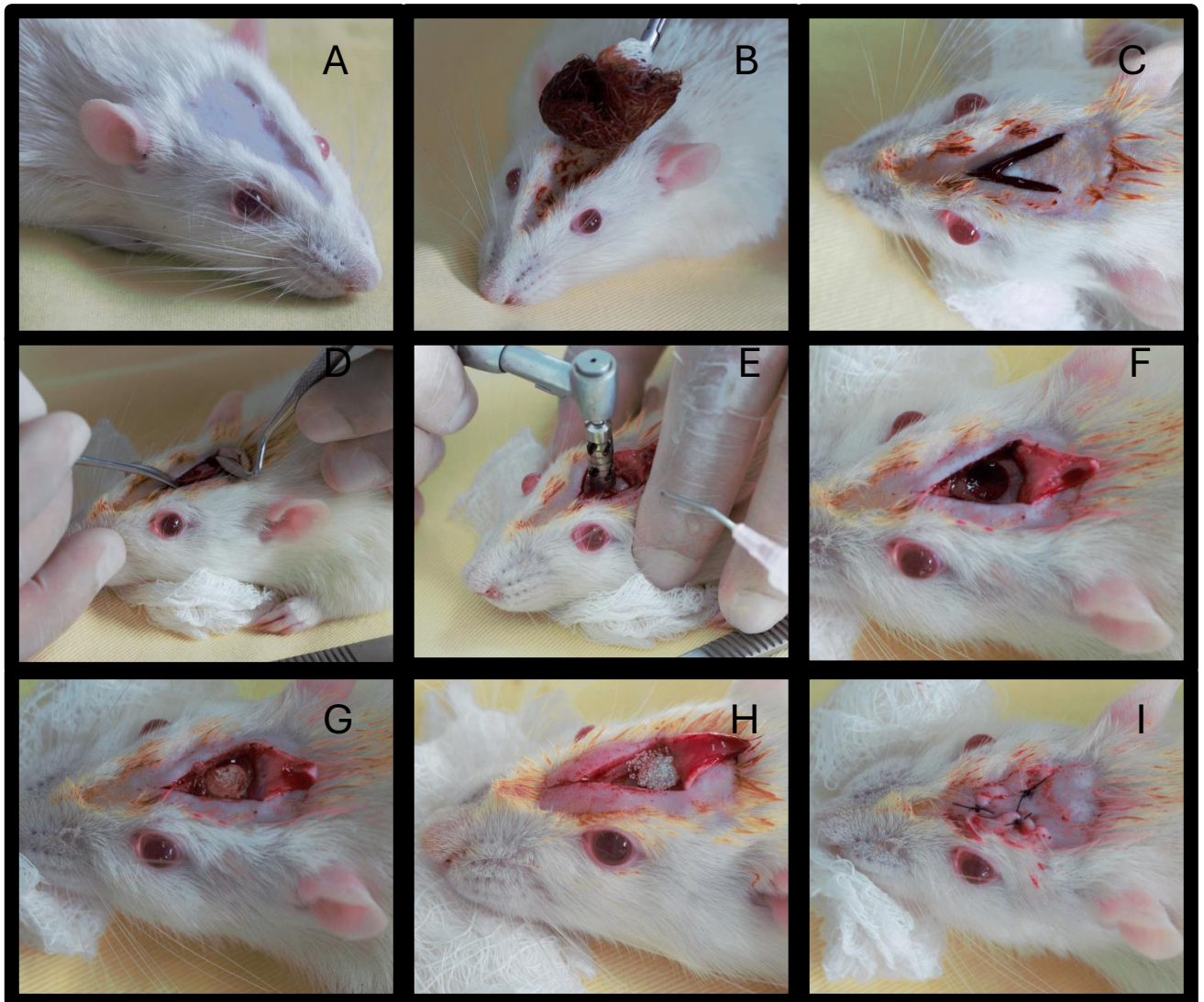


Fig 3. A- Tricotomia; B- Degermação com PVPI; C- Acesso cirúrgico em “V” em região fronto-parietal; D- Descolamento dos tecidos; E- Trefinamento com copiosa irrigação; F- Defeito ósseo criado ocupado pelo coágulo G- Defeito ósseo criado preenchido pelo MTA; H- Defeito ósseo criado ocupado por substituto ósseo particulado; I- Sutura por pontos simples interrompidos.

3.6.5 Análise Microtomográfica

A análise das amostras foi realizada utilizando o microtomógrafo SkyScan 1272 (Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica). Para cada grupo experimental, foram

escolhidas aleatoriamente três amostras, que foram submetidas ao escaneamento microtomográfico para avaliação detalhada do reparo ósseo [24].

3.6.6 Parâmetros de Escaneamento

As peças foram escaneadas com cortes de 11 μm de espessura. A fonte de radiação foi ajustada para operar com uma tensão de 70 kV e corrente de 142 μA , utilizando filtros combinados de Al 0,5 mm e Cu 0,038 mm. A rotação foi configurada em 0,5 mm por passo, com uma resolução de aquisição de 2016×1344 pixels e duas imagens capturadas por passo de rotação.

O tempo total de escaneamento para cada amostra foi de 58 minutos e 30 segundos. As imagens obtidas foram armazenadas no formato TIFF em pastas nomeadas conforme o respectivo grupo experimental. A reconstrução das imagens foi realizada com o software NRecon (SkyScan 2011, versão 1.6.6.0, Bruker, Bélgica) utilizando os seguintes parâmetros [24]:

- Smoothing: 5
- Correção de artefato de anel: 7
- Correção de hardening de feixe: 30%
- Faixa dinâmica da imagem: mínima de 0.0028 e máxima de 0.11

3.6.7 Processamento das Imagens

Com o auxílio do software Data Viewer (SkyScan, versão 1.4.4 64-bit, Bruker, Bélgica), os dados das imagens foram visualizados e emulados nos eixos X, Y e Z. Dessa forma, foi possível observar as orientações coronal (X-Z), sagital (Z-Y) e transaxial (X-Y). As imagens foram então realinhadas em relação ao plano mediano e o novo dataset reorganizado foi salvo em uma pasta nomeada como DV – coronal, destinada à análise da região de interesse (ROI) [24].

Utilizando o software CT Analyser (Bruker MicroCT, versão 1.12.4.0, Bélgica), as imagens foram acessadas para definir a área de interesse. Uma ROI circular com

raio de 3 mm foi posicionada superiormente ao defeito ósseo. Para a análise tridimensional, foram selecionadas 20 slices posicionadas inferiormente, permitindo a interpolação dinâmica da área e uma avaliação volumétrica precisa.

A mensuração central foi realizada utilizando a abertura criada pela trefina de 5 mm de diâmetro, com base no eixo perpendicular ao plano sagital mediano. A análise foi conduzida de acordo com a escala de cinza (threshold) de 31 a 153 tons de cinza, permitindo a obtenção dos parâmetros microtomográficos da área avaliada [24].

3.6.8 Análise Tridimensional e Reconstrução

A reconstrução e manipulação tridimensional (3D) das amostras foi realizada por meio do software CTvox (SkyScan, versão 2.7, Bruker, Bélgica), proporcionando uma visualização didática e detalhada das áreas analisadas [24].

3.6.9 Parâmetros Microtomográficos

Conforme as recomendações das guidelines do Journal of Bone and Mineral Research [24], foram obtidos os seguintes parâmetros para análise da regeneração óssea:

- Volume ósseo (BV)
- Porcentagem do volume ósseo (BV/TV)
- Espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th)
- Separação de trabéculas (Tb.Sp)
- Número de trabéculas (Tb.N) **【33】**

Esses parâmetros permitiram uma avaliação quantitativa e qualitativa do processo de regeneração óssea nos diferentes grupos experimentais.

3.6.10 Histometria

A área do defeito cirúrgico e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco para análise histológica. As amostras passaram por descalcificação inicial durante 8 semanas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%. Após esse período, cada espécime foi seccionado longitudinalmente ao longo do centro do defeito original, dividindo-o em dois blocos.

Cortes transversais foram realizados com base no menor eixo, garantindo a precisão na identificação das margens do defeito durante as análises de imagem. Em seguida, as amostras passaram por mais 3 semanas de descalcificação e foram processadas para inclusão em parafina. Foram produzidos cortes semisseriados com 5 µm de espessura na direção longitudinal, seguidos por coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histomorfométrica [25].

3.6.11 Análise Histomorfométrica

Após a coloração com H&E (Merck & Co., Inc.), as amostras foram analisadas utilizando uma lupa (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Suíça) conectada a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F Microsystems Ltd) e a um microcomputador equipado com o software ImageJ (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canadá). As imagens digitalizadas foram salvas em formato JPEG para posterior análise [23,25].

A análise quantitativa dos defeitos foi realizada em todos os cortes corados, capturando:

- Um campo com objetiva de 10x
- Cinco campos com objetiva de 40x, abrangendo duas áreas periféricas e uma central do defeito.

A contagem morfométrica foi realizada com o software ImageJ, utilizando a ferramenta Grid para gerar um retículo de 130 cruzeiros. Somente as estruturas que coincidiam com as intersecções das cruzeiros (pontos) foram contabilizadas por meio da ferramenta Cell Counter. A média do tecido ósseo neoformado e do biomaterial presente foi obtida a partir da soma dos cinco campos analisados para cada animal.

A análise qualitativa envolveu a descrição dos fenômenos inflamatórios observados nos cortes microscópicos representativos de cada grupo e tempo pós-operatório.

A análise quantitativa do processo inflamatório foi baseada na atribuição de escores que classificaram a intensidade da resposta inflamatória, conforme descrito abaixo [26]:

- 0: Nenhuma ou poucas células inflamatórias; nenhuma reação.
- 1: < 25 células e reação leve.
- 2: Entre 25 e 125 células, com reação moderada.
- 3: 125 ou mais células, indicando uma resposta inflamatória intensa.

3.6.12 Planejamento Estatístico

A análise estatística dos dados quantitativos foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® 7.04 (La Jolla, CA, USA). A homocedasticidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk para distinguir entre dados paramétricos e não paramétricos.

Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância One-Way (ANOVA), aplicada aos valores de:

- Volume ósseo (BV)
- Porcentagem de volume ósseo (BV/TV)
- Espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th)
- Separação de trabéculas (Tb.Sp)
- Número de trabéculas (Tb.N)

O teste de Tukey foi aplicado como pós-teste para comparações múltiplas.

Para a análise dos dados do ensaio de MTT, tanto para contato direto quanto para eluentes, foi aplicada a ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para correções de múltiplas comparações.

Nos casos de dados não paramétricos, como osso neoformado, biomateriais e infiltrado inflamatório, foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em todas as análises, foi considerado um nível de significância de $p < 0,05$.

4 CAPÍTULO 1 - INTEGRATION OF WHITE MTA AND BIPHASIC BONE SUBSTITUTES FOR ENHANCING BONE REGENERATION: A PRECLINICAL STUDY ON BIOCOMPATIBILITY[‡]

4.1 Abstract

This study explores the use of biphasic bone substitutes, particularly Osteosynt®, composed of hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP), combined with White Mineral Trioxide Aggregate (MTA) for bone regeneration in critical defects. Osteosynt® is known for its osteoconductive properties and biocompatibility, with HA providing a stable structure for cell colonization and β -TCP facilitating resorption and angiogenesis.

MTA, a material widely used in endodontics, is valued for its biocompatibility and antimicrobial properties, as well as its ability to stimulate tissue mineralization. The study employed two concentrations of MTA (5% and 10%) in combination with Osteosynt® in critical calvarial defect models in Wistar rats and Saos-2 cell cultures, with analyses performed at 28 and 45 days. Evaluations included cell viability assays, inflammatory response, and histomorphometric analysis.

The results showed that the combinations of Osteosynt® with 5% and 10% MTA demonstrated good biocompatibility, with no statistically significant differences in cell viability compared to the controls. The MTT assay indicated that the tested dilutions did not compromise the metabolic activity of Saos-2 cells, regardless of the exposure time (6, 24, and 48 hours), suggesting that the combination of materials does not negatively impact cell viability.

Regarding the inflammatory response, a more intense reaction was observed in the groups treated only with MTA compared to the blood clot control group, while the groups with Osteosynt® and MTA combinations (5% and 10%) maintained inflammatory response levels considered adequate and similar to each other, demonstrating good tissue tolerance. Histomorphometric analysis showed that both concentrations of MTA combined with Osteosynt® promoted bone neoformation over

[‡] Formatado de acordo com a The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants - <https://www.quintessence-publishing.com/usa/en/journal/the-international-journal-of-oral-maxillofacial-implants#downloads>

the evaluated periods, with a trend toward greater regeneration in the group with 10% MTA after 45 days, suggesting that MTA may have contributed to the induction of osteoprogenitor cells and cellular differentiation.

In conclusion, combining MTA with biphasic bone substitutes shows the potential to promote bone regeneration and minimize undesirable inflammatory reactions, suggesting its efficacy in maxillofacial rehabilitation treatments. Additional studies, including microbiological investigations and clinical trials, are recommended to validate the clinical safety and efficacy of this approach before its application in clinical practice.

Keywords: Bone Substitutes. Bone Regeneration. Cell Viability. Rats.

4.2 Introduction

The challenge of achieving effective bone regeneration remains a critical area in clinical research, particularly when dealing with complex defects or reconstructive surgeries. Conventional bone grafts, though widely used, pose significant limitations, such as donor site morbidity and disponible graft bone, emphasizing the need for synthetic biomaterials. Biphasic bone substitutes have emerged as promising alternatives by combining two calcium phosphate phases, hydroxyapatite (HAP) and β -tricalcium phosphate (β -TCP). This combination ensures both resorption and mechanical support, essential for effective bone regeneration [1,2].

In maxillofacial reconstruction, biphasic bone substitutes offer distinct advantages over autogenous grafts. These substitutes are not only structurally similar to natural bone, and also provide an osteoconductive environment for new bone formation due to their bioactive properties. Their ease of use, along with reduced infection risks and surgical trauma, makes them highly favorable for use in complex facial and cranial surgeries, where precision and reliable healing are critical [2,3].

White Mineral Trioxide Aggregate (MTA) has become a material of interest due to its excellent biocompatibility, anti-inflammatory properties, and ability to induce hard tissue repair. Initially developed for use in endodontics, white MTA has

demonstrated not only an antimicrobial propriety but also a potential to stimulate osteoblast activity, making it highly relevant for bone regeneration applications. Its inflammatory response ensures that it can be a key component in biomaterials intended for challenging reconstructive environments [4,5].

The incorporation of adjuvant components into biphasic bone substitutes is gaining traction for its benefits such as antimicrobial protection. Vancomycin, a potent antibiotic, addresses the critical concern of post-surgical infections, particularly in large defects, post-extraction sites, and areas where infection could compromise the healing process. By combining such antimicrobial agents with biphasic materials, researchers aim to create a biomaterial that ensures both osteointegration and microbiological control [6,7].

. A promising research direction involves the integration of white MTA within biphasic bone substitutes. This approach leverages MTA's antimicrobial and regenerative properties alongside biphasic materials' mechanical stability and resorption characteristics. The combination could result in a multifunctional biomaterial capable of both promoting bone repair and providing long-term microbial resistance, addressing two key clinical challenges simultaneously [5].

. The future of bone regeneration may lie in optimizing the synergy between MTA and biphasic bone substitutes. Further research should focus on understanding their interactions at both cellular and molecular levels under physiological conditions. This innovative combination holds the potential to transform treatments for complex bone defects, providing enhanced outcomes for patients undergoing major reconstructive surgeries [4,8].

4.3 Objective

The present study aimed to verify the biocompatibility of two different mixing ratios between MTA and biphasic bone substitute and their influence on the formation of sterile inflammation

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Animal Ethics

Before the experiment, the project was evaluated and approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA), under protocol No. 402-2023, ensuring compliance with national ethical guidelines and regulations for research involving animals.

4.4.2 Animals

A total of 50 male Wistar rats were used, divided into five experimental groups (n=10). These groups were further subdivided into two analysis periods (28 and 45 days), with five animals per group for each period (n=5). The rats, approximately 30 days old and with an average weight of 250 g, were obtained from the Animal Facility of the School of Dentistry of Araçatuba (UNESP).

The animals were kept in a controlled environment with a temperature between 22°C and 24°C and a 12-hour light/12-hour dark cycle. They were housed in collective cages (six rats per cage) with bedding replaced daily. Throughout the experiment, they received crushed feed and water ad libitum, except for the 12 hours before and after surgery [9].

4.4.3 Experimental Materials

- MTA Angelus Branco® (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Brazil).
- Osteosynt® (Eincobio, Belo Horizonte, MG, Brazil).

The materials were prepared according to the manufacturer's instructions.

The combinations were measured using an analytical balance to ensure precise proportions:

- Proportion 1: 0.95 g of Osteosynt® + 0.05 g of MTA
- Proportion 2: 0.90 g of Osteosynt® + 0.10 g of MTA

These proportions aimed to evaluate the impact of different MTA concentrations on bone regeneration and tissue response in a critical-size calvaria defect model in rats.

4.4.4 MTA Angelus Branco®

MTA Angelus Branco® is composed of hydrophilic mineral oxides that form a biocompatible paste when mixed with water. Its composition includes oxides of silicon, aluminum, sodium, iron, calcium, bismuth, and magnesium, as well as residues of crystalline silica and sulfates. These properties ensure effective sealing and induce the formation of mineralized tissues [10].

4.4.5 Osteosynt® (40:60)

Osteosynt® is an osteoconductive biomaterial that promotes bone formation in areas requiring implant rehabilitation. Its biocompatibility ensures efficient integration with the bone matrix, providing long-term stability [11].

4.4.6 Anesthesia

After 12 hours of fasting, the animals were sedated intramuscularly with [9]:

- 1% Ketamine Hydrochloride (Vetaset®, Fort Dodge, Campinas, SP) – 10 mg/kg
- 2% Xylazine Hydrochloride (Dopaser®, Calier, São Paulo, SP) – 5 mg/kg

This combination provides deep sedation and adequate analgesia for surgical procedures.

4.4.7 Surgical Procedure

After anesthesia, the trichotomy of the frontoparietal region was performed, followed by antisepsis with 10% PVPI. Sterile drapes were placed to ensure asepsis.

A V-shaped incision was made in the skull, exposing the parietal bones on both sides. Using a surgical trephine (5 mm external / 4 mm internal) attached to a low-speed motor, an osteotomy was performed along the midline between the parietal bones, preserving the dura mater. This procedure generated a critical-size defect (CSD), 5 mm in diameter, suitable for assessing bone regeneration [9].

The animals were randomly divided into five groups:

- Group 1: Blood clot
- Group 2: MTA Angelus White®
- Group 3: Osteosynt®
- Group 4: MTA 5% + Osteosynt®
- Group 5: MTA 10% + Osteosynt®

After filling the defect with the corresponding material, the flap was repositioned and sutured with simple interrupted stitches using Nylon 5-0. This procedure ensured stability and protection of the grafted material during the recovery period.

4.4.8 Euthanasia

Euthanasia was performed on 28 and 45 days using an anesthetic overdose. The areas of interest were removed and fixed in 10% buffered formalin for further analysis [9].

4.4.9 Histometric

The samples were decalcified in 10% EDTA for 8 weeks. After longitudinal sectioning of the defect, additional transverse sections were performed to precisely identify the margins. The samples were then embedded in paraffin, and 5 µm thick serial sections were prepared and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) for histomorphometric analysis [9].

4.4.9.1 Histomorphometric Analysis

The analysis was performed using a Leica® DMLB microscope, equipped with a Leica® DC 300F camera, and images were processed with ImageJ® software. The inflammatory response was evaluated using intensity scores [12]:

- 0: No reaction / few inflammatory cells
- 1: < 25 cells / mild reaction
- 2: 25–125 cells / moderate reaction
- 3: > 125 cells / intense reaction

4.4.10 Cell Culture

This *in vitro* study evaluated the materials MTA Angelus Branco®, Osteosynt®, and their combinations (Osteosynt® + MTA) at different concentrations, using Saos-2 cell lines. This lineage is widely used in research involving differentiation, proliferation, and bone metabolism [13,14].

Saos-2 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 50 mg/mL of streptomycin, and 1% of an antibiotic/antifungal cocktail containing 300 U/mL of penicillin, 300 mg/mL of streptomycin, and 5 mg/mL of amphotericin B (Gibco BRL). The culture was maintained under the following controlled conditions [15]:

- Temperature: 37°C
- Humidity: 100%
- Air composition: 95% air and 5% CO₂

4.4.11 Cell Viability Determination

The viability of Saos-2 cells was evaluated after contact with the materials using the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). This method measures the metabolic activity of living cells, providing a quantitative

estimate of cell viability through the conversion of tetrazolium into formazan, an indicator of active metabolism [16].

4.4.12 Preparation and Evaluation of Extracts

a) Preparation of Extracts:

- The materials were prepared according to the manufacturer's instructions and placed at the bottom of 24-well plates.
- Each well was filled with 2 mL of DMEM supplemented with 10% FBS.
- The plates were incubated for 24 hours at 37°C, in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

b) Filtration of Extracts:

- After incubation, the medium containing the extracts was collected and filtered through sterile 0.22 µm filters (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to remove contaminants.
- The filtered supernatant was referred to as the extract of the corresponding material.

c) Dilutions:

- The extracts were tested at different concentrations: 1/1 (undiluted), 1/2, 1/4, 1/8, and 1/16.

4.4.13 Exposure of Cells to Extracts

- Saos-2 cells were seeded in 96-well plates at an initial density of 10⁵ cells per well and incubated for 24 hours to allow the formation of a cell monolayer (confluence).
- Once confluence was reached, the material extracts were added to the respective wells.

4.4.14 Cell Viability Evaluation

- Control Groups: Cells cultured without exposure to extracts were used as controls to allow comparison with the treated groups.
- MTT Assay:
 - MTT solution (Sigma-Aldrich) was added to the cells after 6, 24, and 48 hours of exposure to the extracts.
 - MTT is converted into formazan by active mitochondrial enzymes, indicating cell viability.
- Absorbance Reading:
 - Absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer to provide a quantitative estimate of cell viability.
 - The entire experiment was performed in triplicate to ensure reproducibility of the results.

4.4.15 Statistical Planning

Data were analyzed using GraphPad Prism® 7.04 software. Normality was verified with the Shapiro-Wilk test.

- ANOVA, followed by the Bonferroni test, was used for parametric data (cell viability).
- Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were applied for non-parametric data (inflammatory infiltrate).

The significance level was set at $p < 0.05$.

4.5 Results

The evaluation of cell viability for the different dilutions by the tested biomaterials did not reveal statistically significant differences. The values remained consistent across all tested dilutions, regardless of the evaluation periods at 6, 24, and 48 hours, and among the different experimental groups (Graph 1a).

Regarding the inflammatory infiltrate, the group treated with MTA exhibited a more intense inflammatory response compared to the control group, represented by the clot, in both periods analyzed. Although MTA is considered biocompatible, its interaction with the bone tissue in the critical defect resulted in a more pronounced inflammatory reaction (Fig 1).

In contrast, the other groups showed no statistically significant differences between them. This suggests that the two concentrations of MTA added to Osteosynt maintained good biocompatibility, without triggering an exacerbated inflammatory response in the surrounding tissues (Graph 2a).

These results indicate that the combination of MTA and Osteosynt offers a favorable interaction with tissues, minimizing the risk of undesirable inflammatory reactions. The consistency of the findings further supports the potential application of these materials in contexts that require the preservation of cell viability and the minimization of inflammatory responses.

4.6 Discussion

Hydroxyapatite (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) and tricalcium phosphate (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) in its α and β phases are widely used in maxillofacial rehabilitation due to their surface properties that promote protein adsorption, enhancing their osteoconductive and osteoinductive capacities. Although both TCP phases share similar osteoconductive characteristics, the α phase exhibits higher bioactivity because its structural arrangement facilitates ion exchange with the biological environment [11,17]. Conversely, the β phase is preferred in the biomedical industry due to its lower production cost, while still maintaining good bioactive properties [11].

Calcium phosphates stand out for their physicochemical similarity to the inorganic phase of bone, displaying excellent biocompatibility and bioactivity [2,3,7]. In our experiments, the inflammatory responses observed in both the Osteosynt® group and the groups treated with MTA remained within acceptable biocompatibility levels.

White MTA, widely used as a reparative cement in endodontics, demonstrates good biocompatibility, and antimicrobial activity, and promotes the formation of mineralized tissues [18,19]. However, in our experimental model involving critical defects in the calvaria of rats, MTA triggered a significant inflammatory response at 28 and 45 days. This may be attributed to the size of the defect and the amount of material applied, as confirmed by statistical differences compared to the control group (Clot).

Osteosynt® is a bone substitute composed of 40% HA and 60% β -TCP [11]. HA provides a stable scaffold for osteogenic cell colonization, while β -TCP facilitates rapid resorption, induces angiogenesis, and has good osteoconductive potential [11,20]. MTA not only recruits osteoprogenitor cells and induces the differentiation of pluripotent cells but also helps control microbial activity at the surgical site, like the use of vancomycin in previous studies [21].

The adjuvant materials used, such as MTA, in combination with biphasic bone substitutes, demonstrated good biocompatibility, aligning with previous findings on the effectiveness of such materials.

In this study, we employed the SAOS-2 cell line, which is widely used to assess bone cell behavior in response to stimuli and repair processes [13,14]. MTA, when dissolved in water or tissue fluids, increases the local pH and enhances alkaline phosphatase activity through the release of Ca^{2+} ions [22,23]. However, excessive alkalinization can induce oxidative stress, leading to apoptosis [24].

The MTT assay for the eluates did not reveal significant statistical differences between the groups or time points, regardless of the dilution. These results are consistent with previous studies on MTA, HA, and β -TCP, suggesting that the ions released from these materials stimulate cell proliferation and differentiation without compromising biocompatibility [25,26]. Thus, the interaction between the material and tissue fluids promotes the release of ions that stimulate regeneration from a distance [21], aligning with our experimental findings.

4.7 Conclusion

This study presented solid data regarding the biocompatibility of the proposed mixture. The use of strategies that promote bone regeneration and reduce the risk of postoperative infection is essential for the development of biomaterials that ensure clinical success. However, although promising, the approach proposed in this study requires further preclinical investigations and randomized clinical trials.

Additional studies are needed to assess the formulation's ability to inhibit microbial growth, as well as to verify its biocompatibility over the medium and long term. These evaluations are recommended before conducting clinical trials involving the tested concentrations of the Osteosynt and MTA mixture.

In conclusion, the proposed formulation shows promising results in terms of biocompatibility. However, its clinical application will depend on further studies to confirm its effectiveness and safety for patient use.

4.8 References

1. Jin P, Liu L, Cheng L, Chen X, Xi S, Jiang T. Calcium-to-phosphorus releasing ratio affects osteoinductivity and osteoconductivity of calcium phosphate bioceramics in bone tissue engineering. *BioMed Eng OnLine* 2023;22:12.
2. Ren Y, Jung O, Batinic M, Burckhardt K, Görke O, Alkildani S, Köwitsch A, Najman S, Stojanovic S, Liu L, Prade I, Barbeck M. Biphasic bone substitutes coated with PLGA incorporating therapeutic ions Sr^{2+} and Mg^{2+} : cytotoxicity cascade and in vivo response of immune and bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 2024;12:1408702.
3. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res* 2019;23:4.
4. Pushpalatha C, Dhareshwar V, Sowmya SV, Augustine D, Vinothkumar TS, Renugalakshmi A, Shaiban A, Kakti A, Bhandi SH, Dubey A, Rai AV, Patil S. Modified mineral trioxide aggregate-a versatile dental material: an insight on applications and newer advancements. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:941826.
5. Dong X, Xu X. Bioceramics in Endodontics: updates and future perspectives. *Bioengineering* 2023;10:354.

6. Wang SY, Yao RB, Yang KS, Liang HC, Su CY, Fang HW, Lim SW. The efficacy of vancomycin-loaded biphasic calcium phosphate bone substitute in the promotion of new bone growth and the prevention of postoperative infection. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:988436.
7. Williams DF. Biocompatibility Pathways: Biomaterials-Induced Sterile Inflammation, Mechanotransduction, and Principles of Biocompatibility Control. *ACS Biomater Sci Eng* 2017;3:2-35.
8. Zelmer AR, Starczak Y, Solomon LB, Richter K, Yang D, Atkins GJ. Saos-2 cells cultured under hypoxia rapidly differentiate to an osteocyte-like stage and support intracellular infection by *Staphylococcus aureus*. *Physiol Rep* 2023;11:e15851.
9. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials* 2011;32:3855-3861.
10. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31:101-3.
11. Lee JH, Ryu MY, Baek HR, Lee KM, Seo JH, Lee HK. Fabrication and evaluation of porous beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite (60/40) composite as a bone graft extender using rat calvarial bone defect model. *ScientificWorldJournal* 2013;2013:481789.
12. Gomes-Filho JE, Queiroz ÍOA, Watanabe S, Santos LMS, Lodi CS, Okamoto R, Ervolino E, Dezan E Jr, Cintra LT. Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate mineralization. *Dent Traumatol* 2015;31:67-72.
13. Ahmad M, McCarthy MB, Gronowicz G. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 1999;20:211-220.
14. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 1987;47:4961-4966.
15. Gandolfi MG, Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R, Prati C. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *J Biomed Mater Res A* 2008;87:477-486.

16. Takamiya AS, Monteiro DR, Bernabé DG, Gorup LF, Camargo ER, Gomes-Filho JE, Oliveira SH, Barbosa DB. In vitro and in vivo toxicity evaluation of colloidal silver nanoparticles used in endodontic treatments. *J Endod* 2016;42:953-960.
17. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 2010;31:1465-1485.
18. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.
19. Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA. *Acta Odontol Latinoam* 2008;21:147-151.
20. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:796-803.
21. Zdrilic IV, Queiroz IOA, Matthews BG, Gomes-Filho JE, Mina M, Kalajic I. Mineral trioxide aggregate improves healing response of periodontal tissue to injury in mice. *J Periodontal Res* 2017;52:1058-1067.
22. Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga Sde C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:345-347.
23. Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. *J Endod*. 2005;31:376-379.
24. Gomes-Filho JE, Rodrigues G, Watanabe S, Bernabé PFE, Lodi CS, Gomes AC, Faria MD, Santos AD, Moraes JCS. Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cement (CER) and Angelus MTA. *J Endod* 2009;35:1377-1380.
25. Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sánchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regí M, Portolés MT. L929 fibroblast and Saos-2 osteoblast response to hydroxyapatite-betaTCP/agarose biomaterial. *J Biomed Mater Res A* 2009;89:539-549.

26. Müller WEG, Tolba E, Schröder HC, Muñoz-Espí R, Diehl-Seifert B, Wang X. Amorphous polyphosphate-hydroxyapatite: A morphogenetically active substrate for bone-related SaOS-2 cells in vitro. *Acta Biomater* 2016;31:358-367.

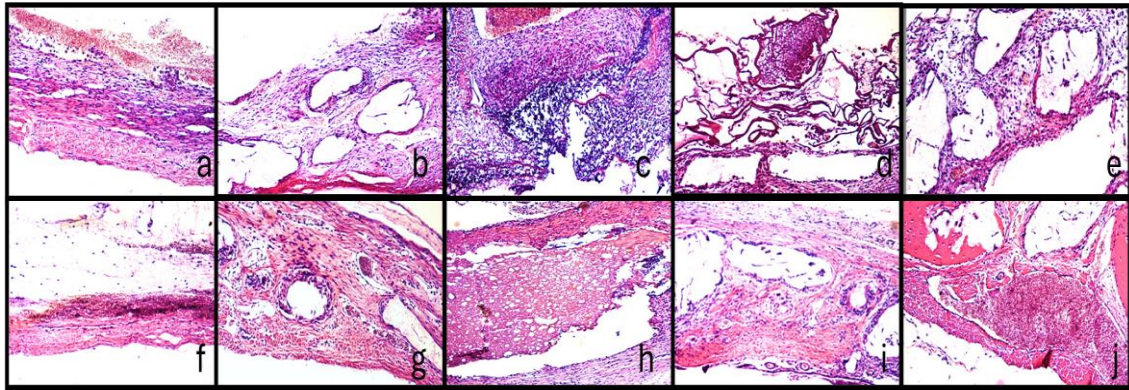
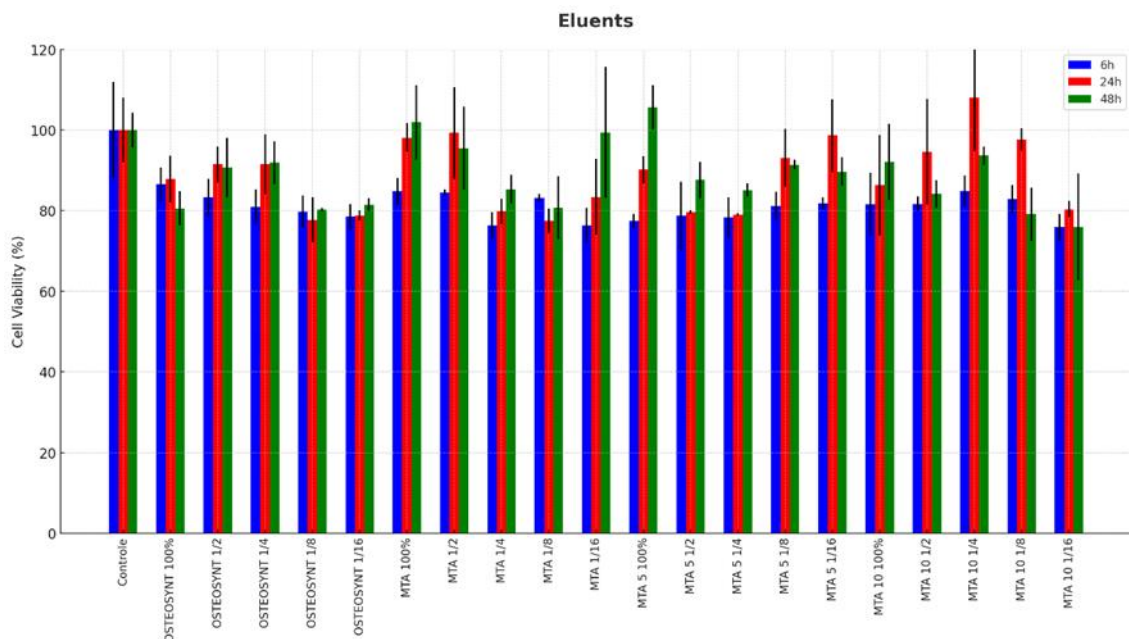
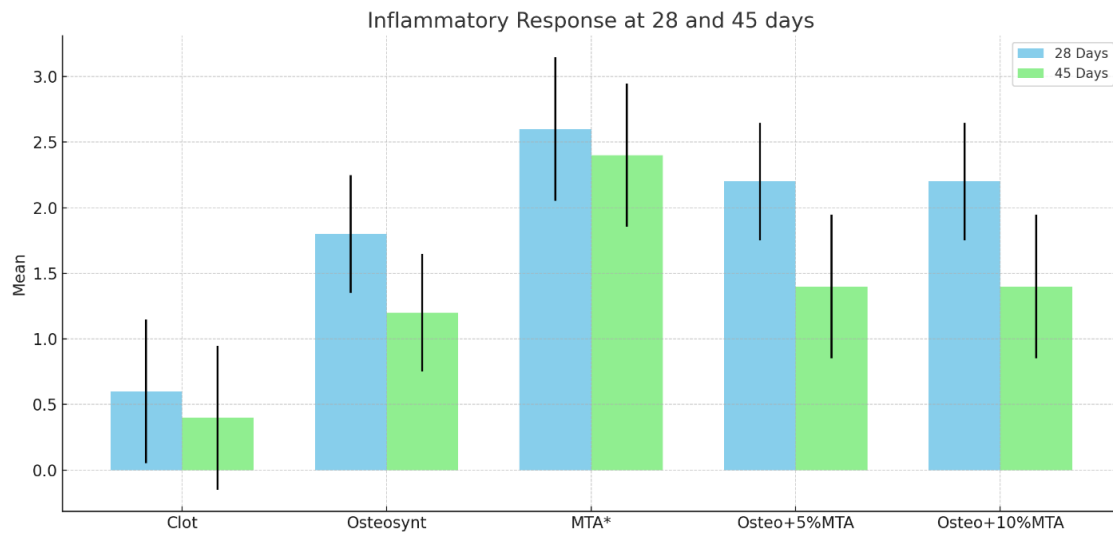


Fig 1. Representative images of the inflammatory infiltrate; a: group Clot 28 days; b: group Osteosynt 28 days; c: group MTA 28 days; d: group Osteosynt + 5% MTA 28 days ; e: group Osteosynt + 10% MTA 28 days; f: group Clot 45 days; g: group Osteosynt 45 days; h: group MTA 45 days; i: group Osteosynt + 5% MTA 45 days; j: group Osteosynt + 10% MTA 45 days.



Graph 1a. Comparative chart between groups and periods related to the eluents released by the tested materials present in the used extracts.



Graph 2a. Descriptive chart of the inflammatory infiltrate.

5 CAPÍTULO 2 - ADVANCEMENTS IN BIPHASIC BONE SUBSTITUTE BIOMATERIALS: INTEGRATING MTA FOR ENHANCED BONE REPAIR[§]

5.1 Abstract

This study investigates the development and efficacy of biphasic biomaterials, specifically the combination of Osteosynt® (composed of hydroxyapatite [HA] and β -tricalcium phosphate [β -TCP]) with White Mineral Trioxide Aggregate (MTA) for bone regeneration in critical defects. HA provides long-term structural support, while β -TCP is quickly resorbable, allowing for new tissue formation. MTA is valued for its antimicrobial and biocompatible properties, promoting tissue mineralization, and making it promising for applications beyond endodontics.

The study utilized two concentrations of MTA (5% and 10%) combined with Osteosynt® in critical calvarial defect models in rats and Saos-2 bone cell cultures, with evaluations conducted at 28 and 45 days. Analyzed parameters included cell viability, inflammatory response, and histomorphometry, with micro-CT and histological analysis to assess bone volume, bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp), and trabecular number (Tb.N).

The results indicated that the combinations of Osteosynt® with MTA maintained good biocompatibility. The cell viability assay (MTT) showed that direct contact with the tested materials reduced Saos-2 cell viability compared to the control group, with the Osteosynt® + 5% MTA group showing better viability performance after 24 hours. In terms of bone formation, micro-CT revealed that the Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA groups showed improved trabecular organization at 45 days, with increased trabecular thickness and density, suggesting superior bone quality.

Histological analysis demonstrated the dimensional stability of the grafted granules, essential for clinical predictability and long-term implant stability. Although no

[§] Formatado de acordo com a The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants - <https://www.quintessence-publishing.com/usa/en/journal/the-international-journal-of-oral-maxillofacial-implants#downloads>

statistically significant differences were observed between groups, the mean values suggest that the MTA groups exhibited higher bone volume and trabecular quality at 45 days. Trabecular thickness was particularly noteworthy for the Osteosynt® + 5% MTA group, which maintained high values across the evaluated periods, indicating the potential to support primary implant stability.

In conclusion, the addition of MTA to biphasic bone substitutes may effectively modulate bone repair by promoting bone formation and density. However, additional studies, including long-term clinical trials, are recommended to assess the clinical efficacy and safety of this combination for future applications in bone and maxillofacial repair surgery.

Keywords: Bone Substitutes. Bone Regeneration. Cell Viability. Rats.

5.2 Introduction

The development of biphasic bone substitute biomaterials presents complex challenges in balancing mechanical stability with biological resorbability. Hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (β -TCP) are often combined to create these materials, leveraging their complementary properties. However, achieving the optimal ratio remains difficult since HA offers long-term stability, while β -TCP degrades faster to support bone in-growth [1,2].

Structural challenges include designing suitable porosity for vascularization without compromising the material's mechanical properties and ensuring consistent ion release to promote tissue regeneration [1,3,4].

Biphasic biomaterials show promising potential for stimulating bone repair by providing osteoconductive and osteoinductive support. Micro-CT imaging and in vivo studies have demonstrated their capacity to serve as scaffolds for bone growth, with β -TCP enabling rapid tissue integration and HA maintaining long-term support. Additionally, incorporating ions like magnesium or strontium can enhance osteogenesis, further improving bone remodeling and mineralization processes [1,4,5].

The inclusion of adjuvants such as antibiotics in biphasic scaffolds offers a dual benefit: facilitating bone regeneration while mitigating infection risks. Vancomycin-loaded calcium phosphate scaffolds have been shown to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections while promoting bone growth, eliminating the need for separate antibiotic treatments [4,5]. These hybrid materials are especially advantageous in orthopedic and maxillofacial surgeries, where reducing infection risk and promoting healing are critical [2,4].

White mineral trioxide aggregate (MTA) is widely used in endodontics, where its biocompatibility, sealing properties, and regenerative potential have made it indispensable. Traditionally employed in procedures like root-end fillings, white MTA is increasingly explored for applications beyond endodontics, including as a pulp-capping material and in apexification treatments [6]. Its ease of handling and ability to regulate inflammation make it a valuable candidate for broader biomedical applications [7].

White MTA's ability to support mineralized tissue formation and inhibit bacterial growth makes it an excellent biomaterial for repair scenarios requiring both osteogenic stimulation and antimicrobial action. Studies using SAOS-2 cell models have shown that MTA promotes osteogenesis and controls inflammatory responses effectively. Its combination with nitric oxide-releasing agents has further improved its antibacterial capabilities, positioning it as a dual-functional material for tissue engineering [8-10].

However, combining biphasic biomaterials with adjuvants like white MTA presents new challenges. Researchers must optimize these hybrid materials to balance strength, bioactivity, and infection control. Future work will need to focus on refining the formulation to enhance osteoconductivity while minimizing postoperative complications, ensuring better outcomes in bone repair surgeries and long-term tissue health [5]

5.2 Objective

This study aimed to evaluate the influence of MTA Angelus Branco® (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Brazil) on cytotoxicity, tissue

response, and bone repair when combined with a particulate bone substitute. An experimental model with a 5 mm critical-size defect in the rat calvaria was used, with quantitative and qualitative analyses performed through histological, microtomographic, and cell viability assessments.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Animal Ethics

The project was submitted to and approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) under process no. 402-2023, in compliance with national guidelines and regulations for research involving animals.

5.3.2 Animals

Fifty male Wistar rats were used, divided into five groups (n=10), and evaluated at two experimental time points: 28 and 45 days (n=5 per period). The animals, approximately 30 days old and weighing around 250 g, were obtained from the vivarium of the School of Dentistry of Araçatuba (UNESP). After initial analysis of the calcified specimens, the decalcification process was initiated.

The rats were kept in a controlled environment, with a temperature between 22°C and 24°C, and a 12-hour light/dark cycle. They were housed in collective cages with six animals per cage, containing sawdust bedding that was changed daily. Throughout the experiment, the animals were provided ground solid food and water *ad libitum*, except for the 12 hours before and after surgery [11].

5.3.3 Experimental Materials

The following materials were used:

- MTA Angelus Branco® Repair Cement (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos, Londrina, Brazil)
- Osteosynt® Bone Substitute (Eincobio, Belo Horizonte, MG, Brazil)

The materials were prepared according to the manufacturer's instructions. The combinations between MTA and the particulate biomaterial were measured precisely using an analytical balance. The tested proportions were:

- Proportion 1: 0.95 g of particulate biomaterial + 0.05 g of MTA
- Proportion 2: 0.90 g of particulate biomaterial + 0.10 g of MTA

These combinations were evaluated for their impact on bone repair and tissue response in a critical-sized defect model in rat calvaria.

5.3.4 MTA Angelus Branco®

MTA Angelus Branco® consists of hydrophilic mineral oxides that react with water to form a biocompatible paste. Its composition includes the following oxides: SiO₂, K₂O, Al₂O₃, Na₂O, Fe₂O₃, SO₃, CaO, Bi₂O₃, and MgO, as well as crystalline silica residues and potassium and sodium sulfates. This cement provides effective sealing and promotes the formation of mineralized tissues [6].

5.3.5 Osteosynt® (40:60)

Osteosynt® is composed in a 40:60 ratio and exhibits osteoconductive properties, supporting bone formation in areas requiring implant rehabilitation. Its biocompatibility and predictability ensure proper integration with the bone matrix and long-term stability [12].

5.3.6 In Vitro Assay

5.3.6.1 Cell Culture

The *in vitro* assay used Saos-2 cells, commonly employed in studies on bone differentiation and metabolism. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic/antifungal cocktails. Cultures were maintained at 37°C, with 95% air, 5% CO₂, and 100% humidity [13,14].

5.3.6.2 Assessment of Cellular Morphology through Direct Contact

Saos-2 cells (2×10^5 per glass coverslip) were seeded in culture plates coated with the tested materials. After 24 and 48 hours of incubation, cellular morphology was observed using phase-contrast microscopy and documented with photographs [9].

5.3.6.3 Cell Viability – MTT Assay

Cell viability was assessed using the MTT assay, which measures the conversion of tetrazolium into formazan by metabolically active cells. Absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer. The experiment was conducted in triplicate to ensure reproducibility [15].

5.3.7 In Vivo Assay

5.3.7.1 Animals and Surgical Procedure

The 50 Wistar rats were divided into five groups, evaluated at 28 and 45 days. Anesthesia was administered using ketamine hydrochloride (10 mg/kg) combined with xylazine hydrochloride (5 mg/kg). Following trichotomy and antisepsis, a 5 mm trephine was used to create a critical-sized defect (CSD) in the calvaria. The dura mater was preserved to avoid neurological damage [11].

5.3.7.2 Filling and Suturing Procedure

The defects were filled with MTA Angelus Branco®, Osteosynt®, blood clot, Osteosynt® or combinations of MTA and Osteosynt®. Suture was performed with 5-0 Nylon to ensure proper healing [11].

5.3.7.3 Microtomographic Analysis

Samples were scanned with a SkyScan 1272 micro-CT using 11 μm -thick slices. Scanning parameters included:

- Voltage: 70 kV
- Current: 142 μA
- Filters: Al 0.5 mm and Cu 0.038 mm
- Resolution: 2016 $\times$ 1344 pixels
- Rotation: 0.5 mm per step

The images were processed and analyzed with NRecon and CTvox software, enabling a three-dimensional assessment of the samples.

5.3.7.4 Evaluated Parameters

Following the *Journal of Bone and Mineral Research* guidelines [16], the following microtomographic parameters were assessed:

- Bone volume (BV)
- Bone volume fraction (BV/TV)
- Trabecular thickness (Tb. Th)
- Trabecular separation (Tb. Sp)
- Trabecular number (Tb. N)

5.3.7.5 Histometric

Samples were decalcified in 10% EDTA for eight weeks, sectioned longitudinally, and embedded in paraffin. Sections of 5 μm were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). To ensure accurate counting, quantitative analysis was performed with ImageJ software, using a grid with 130 intersections [11].

5.3.7.6 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® 7.04 software. Data normality was verified using the Shapiro-Wilk test. For parametric data, one-way ANOVA was used, followed by Tukey's post-hoc test. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were applied. A significance level of $p < 0.05$ was adopted.

5.4 Results

Osteosynt® comprises hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP), both calcium phosphates. This combination offers complementary benefits: HA serves as an osteoconductive scaffold, while β -TCP is resorbed, promoting angiogenesis and new bone formation [17,18].

Calcium phosphates are widely used in maxillofacial rehabilitation due to their physicochemical similarity to the inorganic bone matrix, excellent biocompatibility, and bioactivity. These materials support the formation of vital bone and are effective in sinus lift procedures, fracture repair, alveolar ridge preservation, and vertical and horizontal bone augmentation [17,19].

White MTA, commonly used in endodontics as a reparative cement, is also applied in pulpotomies, pulp capping, and apexification due to its biocompatibility, antimicrobial activity, and ability to induce tissue mineralization [6,20]. Studies have shown that MTA stimulates bone regeneration by expanding progenitor cells and osteoblasts [7,8].

The combination of Osteosynt® and MTA was evaluated for its potential to promote bone formation. Osteosynt® (40% HA and 60% β -TCP) offers dimensional stability and osteoconductive potential, while MTA enhances bioactivity by inducing cellular differentiation and recruiting pluripotent cells from the bone marrow and periodontal ligament [8,17,21].

The 28- and 45-day time points were used to assess the kinetics of bone formation with Osteosynt® and MTA at concentrations of 5% and 10%, comparing these groups with controls (Clot and Osteosynt®) [5]. The SAOS-2 cell line, commonly used in studies of bone repair, was employed to evaluate the effects of

MTA. MTA dissolution increases pH and stimulates alkaline phosphatase activity through Ca^{2+} release, but excessive alkalinization may induce oxidative stress and apoptosis, as observed in groups treated with MTA and its combinations (Fig 1) [22-25].

Histological analysis showed that the presence of MTA did not significantly affect the kinetics of bone formation or graft incorporation, aligning with previous studies (Graph 1a and Graph 2a) [23,26]. Imaging analysis confirmed the dimensional stability of grafted granules, essential for clinical predictability and long-term implant placement (Fig 2) [1,19].

The groups Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA demonstrated the potential to accelerate bone repair at 45 days, likely due to the bioactivity of MTA, which promotes mineralized tissue formation and cellular differentiation (Graph 3a) [7,8,27]. Although microtomography (u-CT) initially identified the cement as newly formed bone, histological analysis confirmed only marginal contact between the cement and the bone defect (Graph 3a and Graph 4a) (Fig 2-B) [26,28].

While no statistically significant differences were observed between groups, the average results suggest meaningful trends for future research. Over 45 days, the groups Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA performed best in volumetric parameters (BV, BV/TV, Tb. Th, Tb. Sp, Tb. N), reflecting superior trabecular organization and quality (Graph 3a to Graph 7a) [2,29,30].

Reduced trabecular spacing and increased thickness suggest improved bone density, supporting primary implant stability. At 28 days, the Osteosynt® + 5% MTA group recorded the highest trabecular thickness values, which remained stable at 45 days. The three-dimensional stability of the graft is crucial for structural support and implant placement (Graph 5a and Graph 6a) [1,19].

Studies indicate that bone formed from particulate substitutes reaches structural normality within five years, reproducing the lamellar organization of vital bone [31,32]. Thus, newly formed trabecular bone plays a vital role in the rehabilitation of grafted areas, enhancing clinical predictability and implant stability [12].

The evaluation of cellular viability through the MTT assay (Fig 3) revealed that, after 24 hours of direct contact between the cell culture (SAOS-2) and the tested materials, the Control and Osteosynt groups showed no statistically significant differences. In contrast, the other groups exhibited a marked decrease in cellular viability compared to the Control group. The Osteosynt® + 5% MTA group showed numerically greater cellular viability at 24 hours than the other groups supplemented with MTA. After 48 hours, all groups displayed significantly lower cellular viability values compared to the Control group (Graph 8a) [24,33].

Regarding the analyzed parameters—bone volume (BV), percentage of bone volume (BV/TV), thickness of the bone trabeculae (Tb. Th), trabecular separation (Tb. Sp), and number of trabeculae (Tb. N)—the parameters BV, BV/TV, Tb.Sp, and Tb. N showed no statistically significant differences between the groups. However, a numerical trend favoring the Osteosynt® + 10% MTA group was observed at 45 days, indicating quantitatively superior bone neoformation (Graph 7a) [2].

Quantitatively, at 28 days, the BV parameter was numerically higher in the Clot group, with a mean of 11.521 mm³. However, the lack of statistical difference indicates that there was no modification in the dynamics of bone neoformation when comparing the Osteosynt group with the tested preparations.

Additionally, at 28 days, the Osteosynt® + 5% MTA group exhibited the highest average values of 0.30 mm². At 45 days, this group maintained stable average values compared to the previous period, while the Clot group showed the highest average value for the thickness of the bone trabeculae, measuring 0.32 mm².

At 28 days, the values for trabecular separation ranged from 0.2 mm for the Osteosynt® group to 0.12 mm for the Osteosynt® + 10% MTA group. By 45 days, the average values were 0.25 mm for the Osteosynt® + 5% MTA group and 0.17 mm for the Clot group.

The statistical analysis of the histological findings related to bone neoformation, and the resorption of biomaterials did not show significant differences between the groups and the respective time points. However, numerical trends indicate a possible superiority of bone neoformation in the Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA groups compared to the other groups, corroborating the

u-CT findings regarding the stability of the bone neoformation dynamics among the Osteosynt®, Osteosynt® + 5% MTA, and Osteosynt® + 10% MTA groups. This demonstrates the capacity of bone substitutes to maintain their dimensions, along with a low resorption rate of pure MTA.

5.5 Discussion

Calcium phosphate-based materials are prominent in maxillofacial rehabilitation due to their physicochemical similarities to the inorganic portion of bone. These materials demonstrate good biocompatibility and bioactivity, facilitating the formation of vital bone suitable for implant procedures and filling bone gaps, such as in maxillary sinus lifts, bone fractures, and ridge maintenance after extractions [34].

White Mineral Trioxide Aggregate (MTA) is widely used in endodontics as a repair cement. Since its introduction in the 1990s for sealing perforations, its favorable properties have made it a preferred choice for pulp capping and apexification [6,27]. MTA is known for excellent biocompatibility, antimicrobial activity, and the ability to induce mineralized tissue formation [1,6,8,18,21,27,35].

The bone substitute Osteosynt® consists of hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) in proportions of 40% and 60%, respectively [17]. HA provides a scaffold for osteogenic cell colonization and maintains dimensional stability, while β -TCP is osteoconductive, rapidly resorbable, and induces angiogenesis [11,35]. MTA also enhances mineralized tissue formation by recruiting osteogenic cells and inducing differentiation of pluripotent cells present in the periodontal ligament and bone marrow [8].

The SAOS-2 cell line was employed due to its relevance in evaluating bone cell responses to stimuli and repair [14,25]. MTA, upon dissolution, elevates local pH, increasing Ca^{2+} availability and enhancing alkaline phosphatase activity. However, elevated oxidative stress may lead to apoptosis in some cell populations [36]. This may explain the cytological findings in MTA and Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA groups, which showed a progressive increase in cellular debris after apoptosis [9,25].

The analysis of imaging and histological findings indicated a direct interaction between the tested materials (MTA and Osteosynt®) and their proportions. This allowed for the assessment of bone repair kinetics and the dimensional maintenance of grafted materials, crucial for clinical predictability regarding the bone volume required for dental implants [12]. The bone substitutes showed good dimensional stability even when combined with MTA, particularly in the Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA groups.

Imaging findings aligned with previous studies on particulate bone substitutes, showing maintenance of the critical defect area and some neoformation at 28 days, with increased formation at 45 days. The Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA groups at 45 days exhibited potential for accelerated bone repair, likely enhanced by MTA's Properties [8,36,37]. MTA's imaging and histological findings corroborated earlier studies regarding its behavior at the mineralized tissue-MTA interface [26,28]. However, non-destructive evaluation techniques, such as u-CT, may misinterpret MTA as bone tissue, introducing bias [16,26,28].

While statistical analyses did not show significant differences between groups, mean values of parameters indicate trends that could inform future studies. Bone neoformation was evaluated through microtomographic imaging and parameters including bone volume (BV), percentage of bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), separation, and number of trabeculae (Tb. Sp and Tb. N). At 28 days, the BV parameter was numerically superior in the Clot group, with a mean of 11.521 mm³. At 45 days, the highest values were recorded for Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA. These volumetric characteristics support the literature on the importance of maintaining volume during bone formation with particulate substitutes [1,31,32].

The higher mean values in Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA can be attributed to the osteoconductive properties of HA and the angiogenic properties of β -TCP [30]. The presence of MTA contributes to mineralized tissue formation and the recruitment of osteogenic lineage cells, enhancing neoformed bone quantity [8,26]. Thus, reduced trabecular separation and increased thickness may lead to denser bone, facilitating dental implant placement [2,12].

At 28 days, the Osteosynt® + 5% MTA group showed the highest mean values for Tb.Th (0.30 mm²). At 45 days, this group maintained stable values compared to the previous period, while the Clot group exhibited the highest average trabecular thickness (0.32 mm²). Prior studies indicate that neoformed bone from particulate substitutes exhibits normal characteristics after 5 years, replicating the lamellar organization of vital bone following dynamic equilibrium [12,38]. The trabecular bone structure supports the dimensional stability of grafted biomaterials, crucial for subsequent dental implant placement [2,12]. Thus, neoformed trabecular bone plays a vital role in the rehabilitation of grafted areas [12].

5.6 Conclusion

Based on the findings of this study, it can be concluded that the addition of MTA to bone substitutes represents a promising strategy for modulating bone repair. However, to achieve the goal of benefiting patients who require surgical procedures involving these materials, further research is needed.

It is essential to conduct both preclinical studies and randomized clinical trials that allow for the evaluation of the actual effectiveness of bone repair modulation and the microbiological control of the proposed material. These investigations should encompass both short-term and longer-term periods, such as 1, 3, 5 years, or more.

5.7 References

1. Jin P, Liu L, Cheng L, Chen X, Xi S, Jiang T. Calcium-to-phosphorus releasing ratio affects osteoinductivity and osteoconductivity of calcium phosphate bioceramics in bone tissue engineering. *BioMed Eng OnLine* 2023;22:12.
2. Ren Y, Jung O, Batinic M, Burckhardt K, Görke O, Alkildani S, Köwitsch A, Najman S, Stojanovic S, Liu L, Prade I, Barbeck M. Biphasic bone substitutes coated with PLGA incorporating therapeutic ions Sr²⁺ and Mg²⁺: cytotoxicity cascade and in vivo response of immune and bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 2024;12:1408702.

3. Chiu YH, Chen IC, Su CY, Tsai HH, Young TH, Fang HW. Development of injectable calcium sulfate and self-setting calcium phosphate composite bone graft materials for minimally invasive surgery. *Int J Mol Sci.* 2022;23:7590.
4. Moussi H, Weiss P, Le Bideau J, Gautier H, Charbonniera B. Injectable macromolecule-based calcium phosphate bone substitutes. *Mater Adv* 2022;3:6125-6141.
5. Wang SY, Yao RB, Yang KS, Liang HC, Su CY, Fang HW, Lim SW. The efficacy of vancomycin-loaded biphasic calcium phosphate bone substitute in the promotion of new bone growth and the prevention of postoperative infection. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:988436.
6. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.
7. Gomes-Filho JE, Queiroz ÍOA, Watanabe S, Santos LMS, Lodi CS, Okamoto R, Ervolino E, Dezan E Jr, Cintra LT. Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate mineralization. *Dent Traumatol* 2015;31:67-72.
8. Zdrilic IV, Queiroz IOA, Matthews BG, Gomes-Filho JE, Mina M, Kalajzic I. Mineral trioxide aggregate improves healing response of periodontal tissue to injury in mice. *J Periodontal Res* 2017;52:1058-1067.
9. Tsai CL, Ke MC, Chen YH, Kuo HK, Yu HJ, Chen CT, Tseng YC, Chuang PC, Wu PC. Mineral trioxide aggregate affects cell viability and induces apoptosis of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *BMC Pharmacol Toxicol* 2018;19:21.
10. Dong X, Xu X. Bioceramics in Endodontics: updates and future perspectives. *Bioengineering* 2023;10:354.
11. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials* 2011;32:3855-3861.
12. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:796-803.

13. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 1987;47:4961-4966.
14. Anderson HC, Hsu HH, Raval P, Hunt TR, Schwappach JR, Morris DC, Schneider DJ. The mechanism of bone induction and bone healing by human osteosarcoma cell extracts. *Clin Orthop Relat Res* 1995;(313):129-134.
15. Takamiya AS, Monteiro DR, Bernabé DG, Gorup LF, Camargo ER, Gomes-Filho JE, Oliveira SH, Barbosa DB. In vitro and in vivo toxicity evaluation of colloidal silver nanoparticles used in endodontic treatments. *J Endod* 2016;42:953-960.
16. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010;25:1468-1486.
17. Lee JH, Ryu MY, Baek HR, Lee KM, Seo JH, Lee HK. Fabrication and evaluation of porous beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite (60/40) composite as a bone graft extender using rat calvarial bone defect model. *ScientificWorldJournal* 2013;2013:481789.
18. Kurkcu M, Benlidayi ME, Cam B, Sertdemir Y. Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs β -tricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study. *J Oral Implantol* 2012;38:519-526.
19. Botez P, Sirbu P, Simion L, Munteanu FI, Antoniac I. Application of a biphasic macroporous synthetic bone substitutes CERAFORM®: clinical and histological results. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2009;19:387-395.
20. Maroto M, Barbería E, Vera V, García-Godoy F. Dentin bridge formation after white mineral trioxide aggregate (white MTA) pulpotomies in primary molars. *Am J Dent* 2006;19:75-79.
21. Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA. *Acta Odontol Latinoam* 2008;21:147-151.
22. Ahmad M, McCarthy MB, Gronowicz G. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 1999;20:211-220.

23. Gandolfi MG, Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R, Prati C. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *J Biomed Mater Res A* 2008;87:477-486.
24. Zelmer AR, Starczak Y, Solomon LB, Richter K, Yang D, Atkins GJ. Saos-2 cells cultured under hypoxia rapidly differentiate to an osteocyte-like stage and support intracellular infection by *Staphylococcus aureus*. *Physiol Rep* 2023;11:e15851.
25. Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sánchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regí M, Portolés MT. L929 fibroblast and Saos-2 osteoblast response to hydroxyapatite-betaTCP/agarose biomaterial. *J Biomed Mater Res A* 2009;89:539-549.
26. Gandolfi MG, Iezzi G, Piattelli A, Prati C, Scarano A. Osteoinductive potential and bone-bonding ability of ProRoot MTA, MTA Plus and Biodentine in rabbit intramedullary model: Microchemical characterization and histological analysis. *Dent Mater* 2017;33:e221-e238.
27. Gomes-Filho JE, Rodrigues G, Watanabe S, Bernabé PFE, Lodi CS, Gomes AC, Faria MD, Santos AD, Moraes JCS. Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cement (CER) and Angelus MTA. *J Endod* 2009;35:1377-1380.
28. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995;21:295-299.
29. Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998;19:1473-1478.
30. d'Arros C, Rouillon T, Veziers J, Malard O, Borget P, Daculsi G. Bioactivity of biphasic calcium phosphate granules, the control of a needle-like apatite layer formation for further medical device developments. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;7:462.
31. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008;61:577-587.
32. Schmitt CM, Moest T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Anorganic bovine bone (ABB) vs. autologous bone (AB) plus ABB in maxillary sinus grafting. A prospective

non-randomized clinical and histomorphometrical trial. Clin Oral Implants Res 2015;26:1043-1050.

33. Müller WEG, Tolba E, Schröder HC, Muñoz-Espí R, Diehl-Seifert B, Wang X. Amorphous polyphosphate-hydroxyapatite: A morphogenetically active substrate for bone-related SaOS-2 cells in vitro. Acta Biomater 2016;31:358-367.

34. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. Biomaterials 2010;31:1465-1485.

35. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. Biomater Res 2019;23:4.

36. Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga Sde C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003;95:345-347.

37. Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. J Endod. 2005;31:376-379.

38. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J Cell Biochem 2006;99:1233-1239.

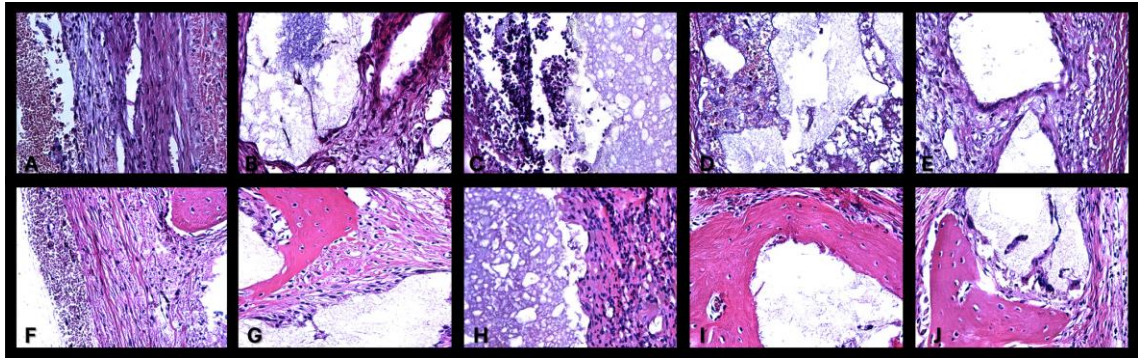


Fig 1. Representative histology of the different groups tested. A: Clot at 28 days; B: Osteosynt at 28 days; C: MTA at 28 days; D: Osteosynt+5%MTA at 28 days; E: Osteosynt+10%MTA at 28 days; F: Clot at 45 days; G: Osteosynt at 45 days; H: MTA at 45 days; I: Osteosynt+5%MTA at 45 days; J: Osteosynt+10%MTA at 45 days.

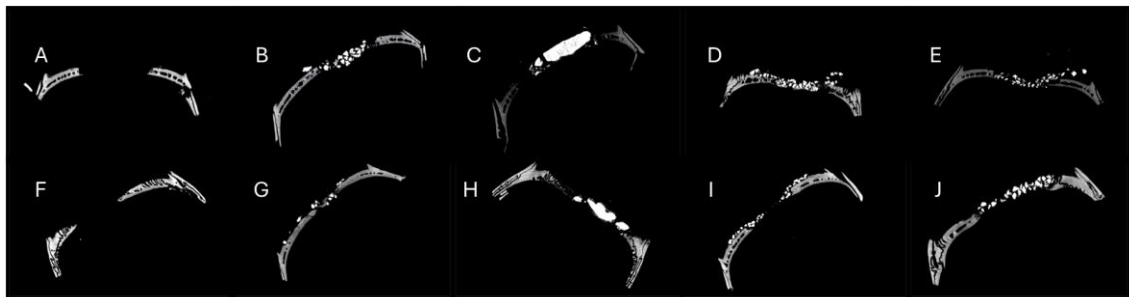


Fig 2. Representative images of coronal sections to verify structures. A: Clot at 28 days; B: Osteosynt at 28 days; C: MTA at 28 days; D: Osteosynt+5% MTA at 28 days; E: Osteosynt+10% MTA at 28 days; F: Clot at 45 days; G: Osteosynt at 45 days; H: MTA at 45 days; I: Osteosynt+5% MTA; J: Osteosynt+10% MTA.

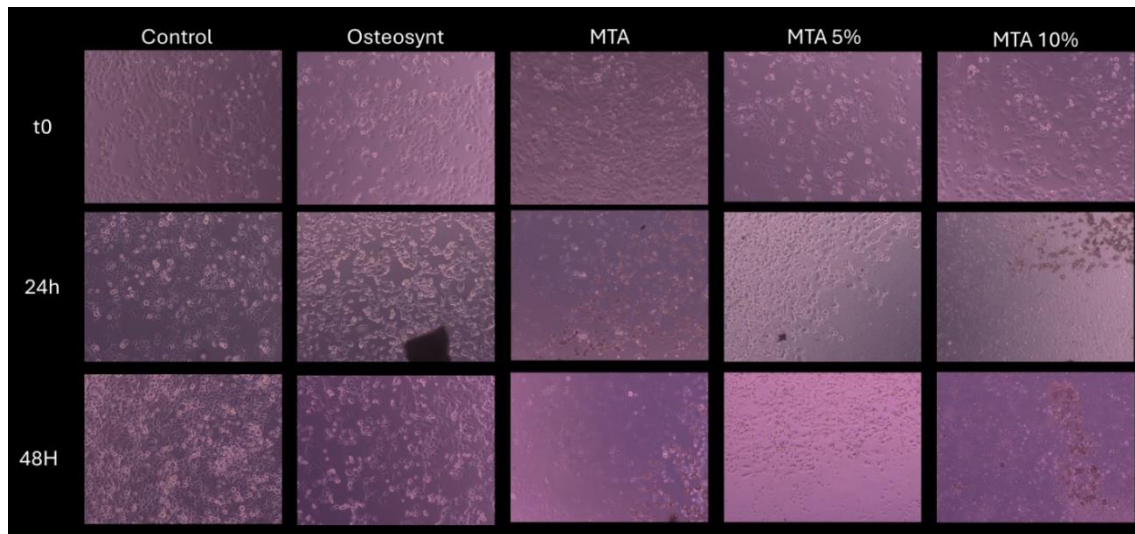
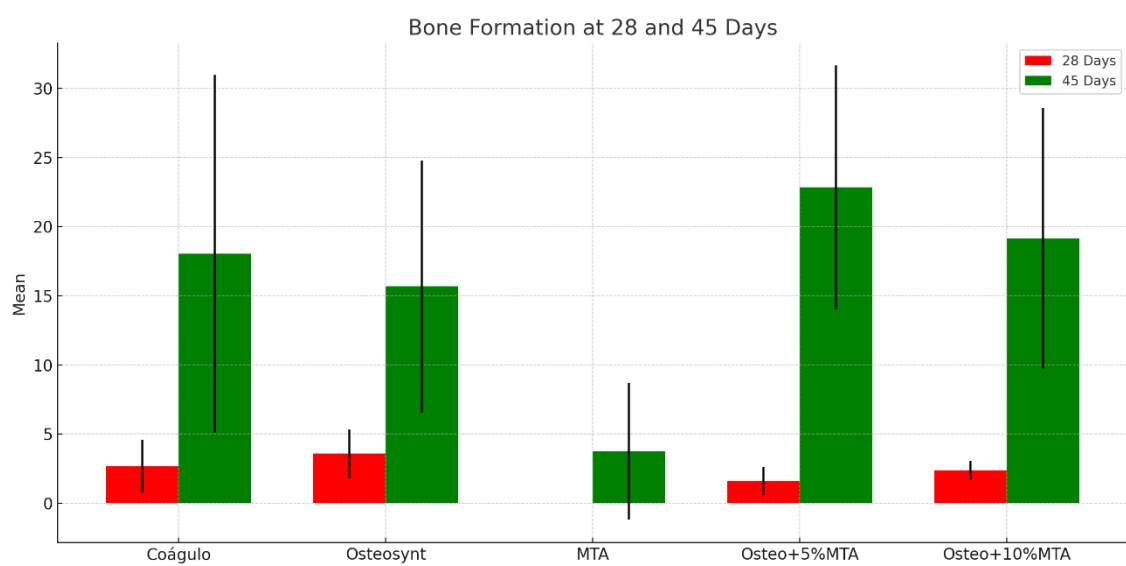
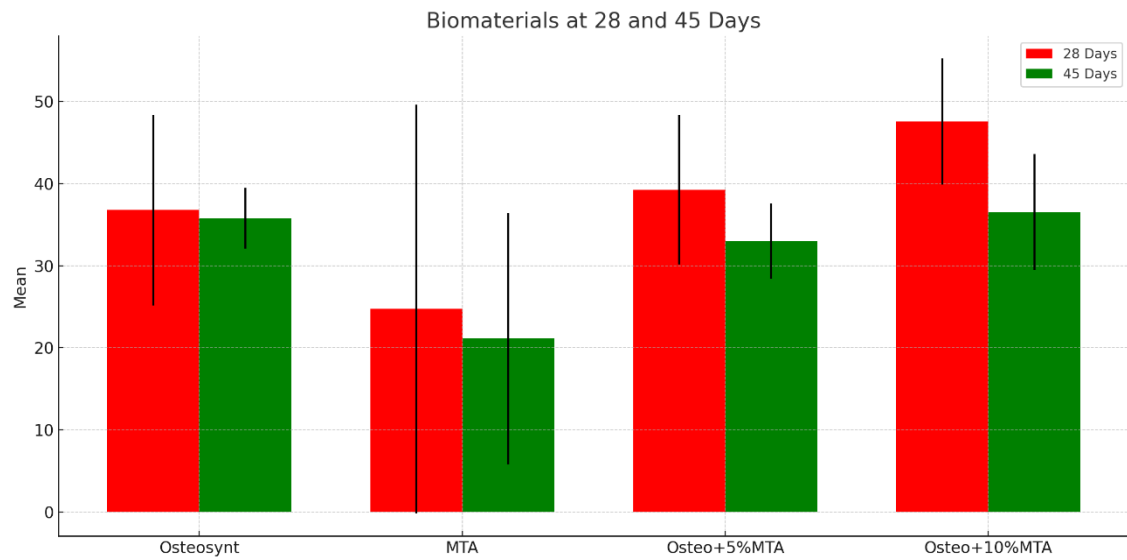


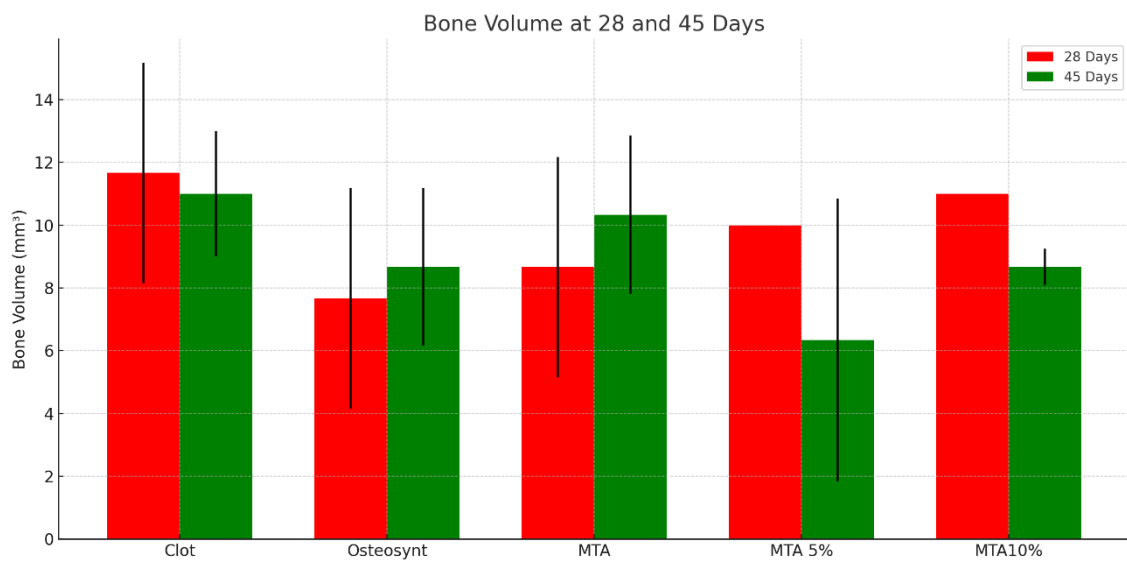
Fig 3. Representative images captured at 40X magnification to verify cell morphology after direct contact between cells and material.



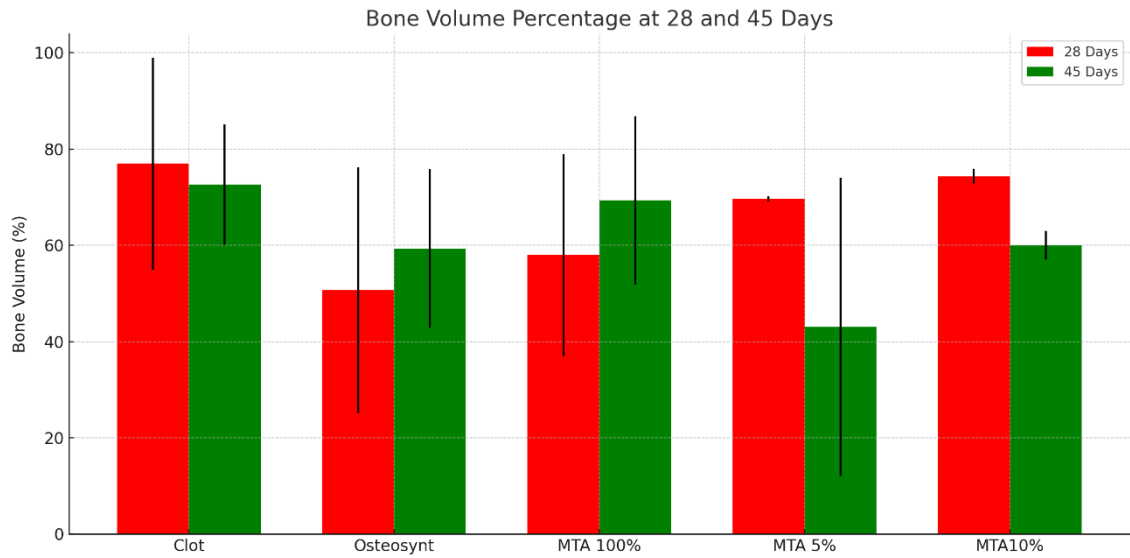
Graph 1a. Comparative chart between groups and periods for the evaluation of bone neoformation.



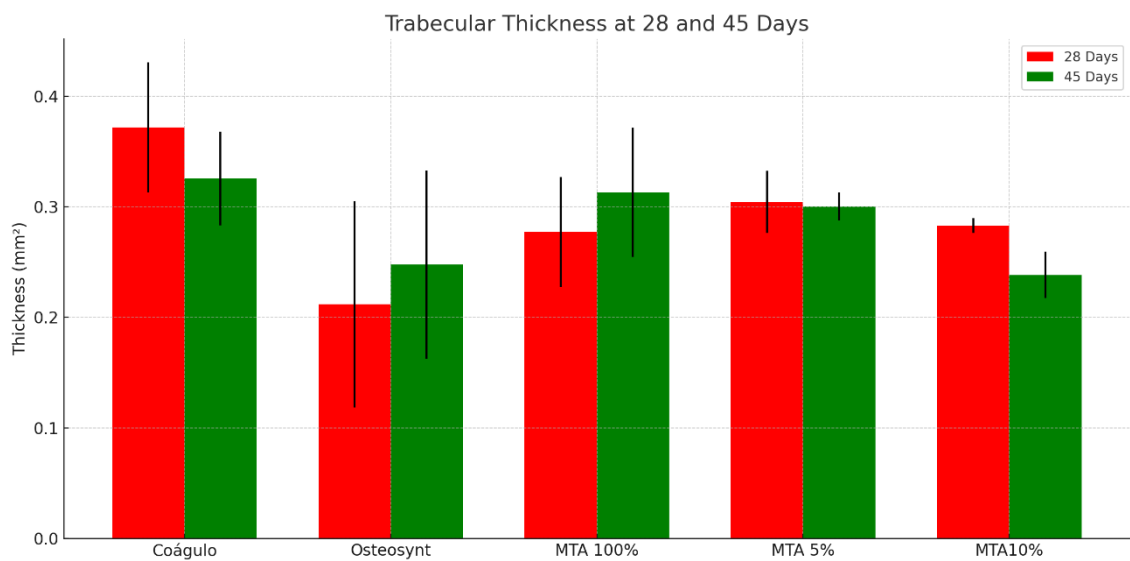
Graph 2a. Comparative chart between groups and periods for the evaluation of resorption and dimensional maintenance of biomaterials.



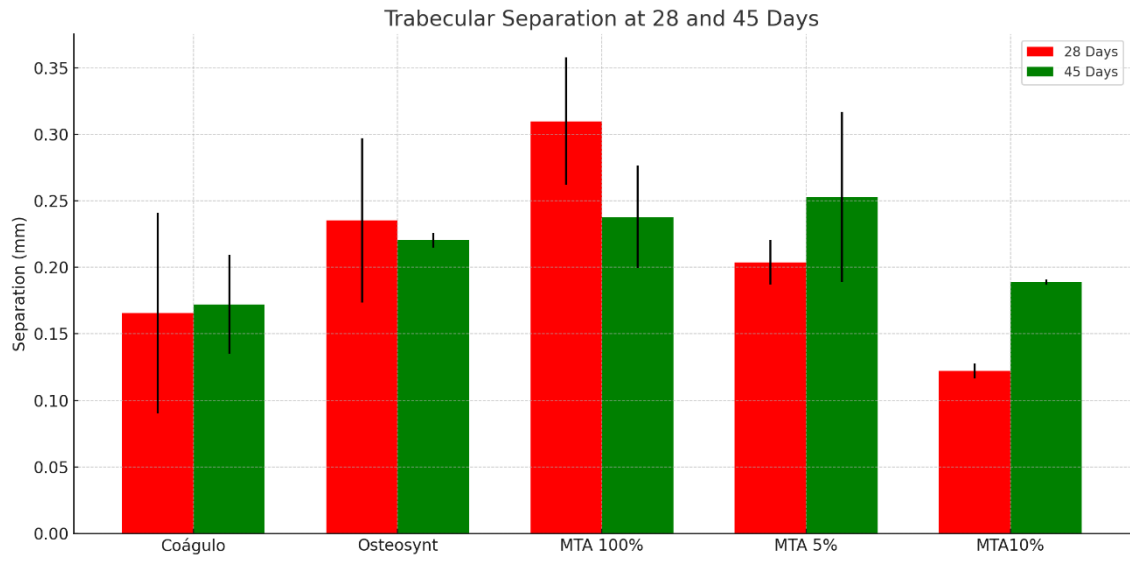
Graph 3a. Chart of the mean bone volume values for the two periods.



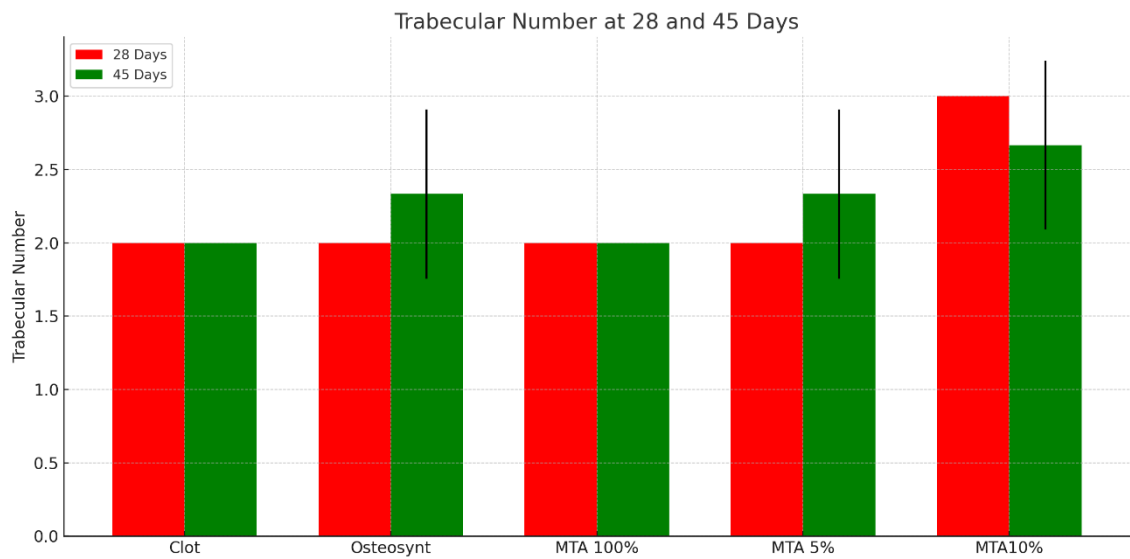
Graph 4a. Chart of the mean percentage bone volume values for the periods of 28 and 45 days.



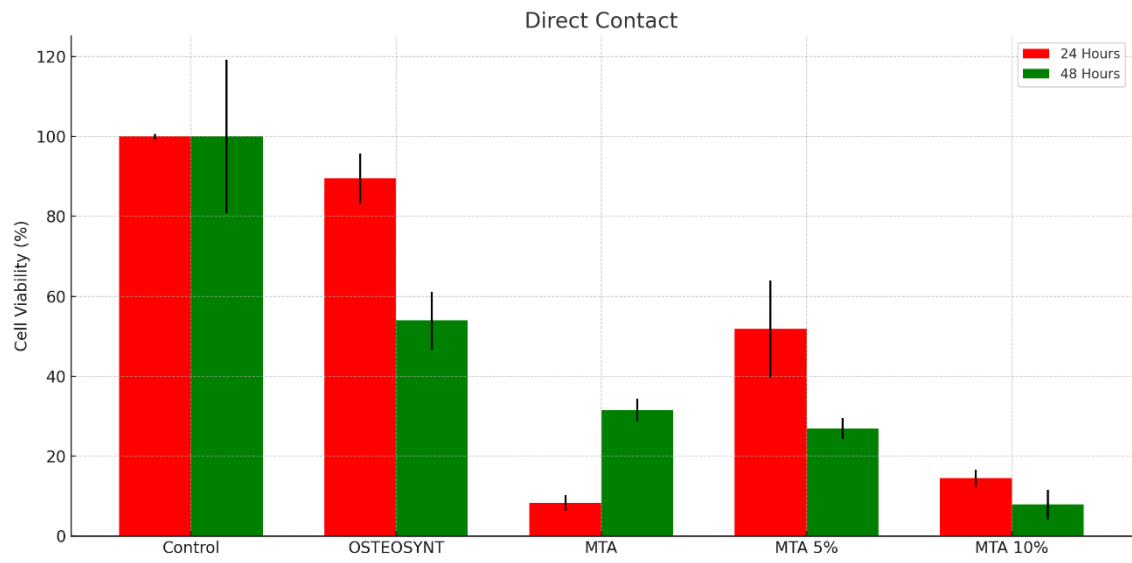
Graph 5a. Chart of the mean trabecular bone thickness values for the two periods.



Graph 6a. Chart of the mean trabecular separation values for the periods of 28 and 45 days.



Graph 7a. Chart of the mean trabecular number values for both periods.



Graph 8a. Comparative chart between groups and periods for direct cell-biomaterial contact.

6 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos achados do presente estudo, é possível afirmar que a utilização do MTA em baixa concentração associado aos substitutos ósseos bifásicos não impactou negativamente a cinética de neoformação óssea.

Desta maneira, apesar de não haver diferenças estatísticas nos parâmetros observados para a comparação dos grupos e tempos, numericamente a mistura representada pelos grupos Osteosynt + 5%MTA e Osteosynt + 10%MTA apresentaram um potencial favorável para o desenvolvimento de um novo biomaterial e novos protocolos para sua utilização.

Onde a atual pesquisa atuou de modo a iniciar estudos acerca da utilização destes dois biomateriais em conjunto. Mas fazem-se necessários estudos em outros campos da ciência biológica para que o material proposto possa demonstrar sua relevância e capacidade de auxiliar o reparo ósseos e mitigar infecções pós-operatórias.

Estudos microbiológicos devem ser feitos, para a verificação da capacidade de inibição do crescimento bacteriano, bem como estudos em modelo animal como Coelhos albinos utilizando defeitos ósseos maiores e verificando sua capacidade de resolução em tempo precoces e tardios. Da mesma maneira estudos clínicos randomizados serão de grande valia para que a proposta atual possa chegar até o paciente impactando positivamente em reabilitações maxilofaciais.

ANEXOS

ANEXO A – Lista de Referências da Introdução Geral; e Materiais e Métodos

1. Chavda S, Levin L. Human studies of vertical and horizontal alveolar ridge augmentation comparing different types of bone graft materials: a systematic review. *J Oral Implantol* 2018;44:74-84.
2. Ahmed W, Asim MA, Ehsan A, Abbas Q. Non-vascularized autogenous bone grafts for reconstruction of maxillofacial osseous defects. *J Coll Physicians Surg Pak* 2018;28:17-21.
3. Raikar S, Talukdar P, Kumari S, Panda SK, Oommen VM, Prasad A. Factors affecting the survival rate of dental implants: a retrospective study. *J Int Soc Prev Community Dent* 2017;7:351-355.
4. Onişor-Gligor F, Rotaru A, Juncar M, Bran S. Studiu clinic privind integrarea grefelor sinusale si a implanturilor in regiunea maxilară posterioară. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2009;113:1141-1145.
5. Elakkiya S, Ramesh AS, Prabhu K. Systematic analysis on the efficacy of bone enhancement methods used for success in dental implants. *J Indian Prosthodont Soc* 2017;17:219-225.
6. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008;61:577-587.
7. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000;21:393-411.
8. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 2006;99:1233-1239.
9. Trubiani O, Fulle S, Traini T, Paludi M, la Rovere R, Orciani M, Caputi S, Piattelli A. Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone-arrangement in human osteoblasts seeded on an anorganic bovine bone biomaterial. *Eur Cell Mater* 2010;20:72-83.

10. Lee JH, Ryu MY, Baek HR, Lee KM, Seo JH, Lee HK. Fabrication and evaluation of porous beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite (60/40) composite as a bone graft extender using rat calvarial bone defect model. *ScientificWorldJournal* 2013;2013:481789.
11. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res* 2019;23:4.
12. Jin P, Liu L, Cheng L, Chen X, Xi S, Jiang T. Calcium-to-phosphorus releasing ratio affects osteoinductivity and osteoconductivity of calcium phosphate bioceramics in bone tissue engineering. *BioMed Eng OnLine* 2023;22:12.
13. Kurkcu M, Benlidayi ME, Cam B, Sertdemir Y. Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs β -tricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study. *J Oral Implantol* 2012;38:519-526.
14. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.
15. Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA. *Acta Odontol Latinoam* 2008;21:147-151.
16. Maroto M, Barbería E, Vera V, García-Godoy F. Dentin bridge formation after white mineral trioxide aggregate (white MTA) pulpotomies in primary molars. *Am J Dent* 2006;19:75-79.
17. Zdrilic IV, Queiroz IOA, Matthews BG, Gomes-Filho JE, Mina M, Kalajzic I. Mineral trioxide aggregate improves healing response of periodontal tissue to injury in mice. *J Periodontal Res* 2017;52:1058-1067.
18. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31:101-3.
19. Ahmad M, McCarthy MB, Gronowicz G. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 1999;20:211-220.

20. Gandolfi MG, Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R, Prati C. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *J Biomed Mater Res A* 2008;87:477-486.
21. Tsai CL, Ke MC, Chen YH, Kuo HK, Yu HJ, Chen CT, Tseng YC, Chuang PC, Wu PC. Mineral trioxide aggregate affects cell viability and induces apoptosis of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *BMC Pharmacol Toxicol* 2018;19:21.
22. Takamiya AS, Monteiro DR, Bernabé DG, Gorup LF, Camargo ER, Gomes-Filho JE, Oliveira SH, Barbosa DB. In vitro and in vivo toxicity evaluation of colloidal silver nanoparticles used in endodontic treatments. *J Endod* 2016;42:953-960.
23. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials* 2011;32:3855-3861.
24. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010;25:1468-1486.
25. Messoria MR, Nagata MJ, Mariano RC, Dornelles RC, Bomfim SR, Fucini SE, Garcia VG, Bosco AF. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res* 2008;43:217-223.
26. Gomes-Filho JE, Queiroz ÍOA, Watanabe S, Santos LMS, Lodi CS, Okamoto R, Ervolino E, Dezan E Jr, Cintra LT. Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate mineralization. *Dent Traumatol* 2015;31:67-72.

ANEXO B - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Tratamento de defeito ósseo crítico em calvária de rato utilizando substituto ósseo particulado associado ou não ao MTA"**, Processo FOA nº 402-2023, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de Abril de 2023.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 31 de Maio de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Julho de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Treatment of critical bone defect in rat calvaria using particulate bone substitute with or without MTA"**, Protocol FOA nº 402-2023, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 25, 2023.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 31, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 01, 2024.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br