



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

RAQUEL BARROSO PARRA DA SILVA

**Avaliação do reparo de defeitos críticos em calvária de
ratos preenchidos com a vitrocerâmica Biosilicato®
sintetizada pelo processamento sol-gel: análises histológica
e imuno-histoquímica**

Araçatuba- SP

2019

RAQUEL BARROSO PARRA DA SILVA

**Avaliação do reparo de defeitos críticos em calvária de
ratos preenchidos com a vitrocerâmica Biosilicato®
sintetizada pelo processamento sol-gel: análises histológica
e imuno-histoquímica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Implantodontia.

Orientadora: Prof^a Assoc Mariza Akemi Matsumoto

Coorientador: Prof. Assoc. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Joel Santiago Ferreira Júnior

Araçatuba

2019

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586a Silva, Raquel Barroso Parra da.
Avaliação do reparo de defeitos críticos em calvária de ratos preenchidos com a vitrocerâmica Biosilicato® sintetizada pelo processamento sol-gel : análises histológica e imuno-histoquímica / Raquel Barroso Parra da Silva. – Araçatuba, 2019
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Coorientador: Prof. Joel Santiago Ferreira Júnior

1. Imuno-histoquímica 2. Materiais biocompatíveis
3. Regeneração óssea 4. Substitutos ósseos I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dedicatória

Eu dedico esta conquista com muita alegria, satisfação em primeiro lugar a Deus e a minha família em especial aos meus pais Marli e José que são a minha base de existência, minha fonte de inspiração

Ao meu pai José Aparecido minha maior fonte de inspiração, respeito e amor. Desde pequena admiro o seu respeito a sua profissão e hoje posso dizer que tenho meu maior exemplo, quero sempre seguir os seus passos. Te amo demais pai. Obrigada por tudo que faz por mim.

A minha mãe Marli obrigada por ser meu exemplo de mulher guerreira, de amor incondicional, mãe, amiga. Agradeço todos os dias por você ter me escolhido como filha. Te amo muito e obrigada por tudo que faz por mim todos os dias da sua vida.

Ao meu irmão Rafael obrigada por seu carinho, amizade e parceria. Agradeço todos os dias a Deus pela sua existência, continue levando a vida com seu jeito único e honesto de ser, você é e será sempre um exemplo para mim.

A minha grande amiga Isabel, A sua vontade de vencer as batalhas da vida é incentivadora. Sua garra me faz lembrar que desistir não é uma opção. Obrigada por toda amizade, carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente agradeço à Deus, pois só com a suas bênçãos e infinito amor por seus filhos os sonhos podem se tornar realidade. Obrigada Senhor por me proporcionar tanta coisa que nunca nem imaginava que aconteceria. Agradeço por ter cumprido mais este objetivo na minha vida, onde por muitas vezes achei que fosse desistir. Obrigada Senhor!

A minha orientadora Prof^a. Dra Mariza Akemi Matsumoto sem palavras para agradecer toda dedicação da senhora para comigo, eu realmente posso dizer que tenho uma orientadora que ensina, conduz, faz a gente trilhar no caminho correto. Eu só tenho a agradecer por todo ensinamento, amizade, respeito e carinho. A senhora é uma mulher incrível.

A Prof^a Dra Roberta Okamoto obrigada por toda a sua amizade, humildade e por toda a sua competência. Obrigada por todo carinho e respeito que tem por mim.

Ao Prof. André Fabris por aceitar com prontidão o convite para participar da banca examinadora. Agradeço de coração sua amizade, atenção, disponibilidade, o meu muito obrigada.

A Profª Dra Ana Paula F. Bassi Obrigada por seu um exemplo de profissional, de professora, sua amizade é muito especial para mim. O meu muito obrigada sempre!

As minhas amigas da graduação **Renata S. Scatolin, Renata Colturato Gatto, Camila Santana, Lídia Hidalgo** obrigada pelo carinho e amizade de sempre, vocês são especiais em minha vida.

A minha amiga Joana B. Nasser, agradeço pela sua amizade, por confiar e reconhecer algo bom em mim, meu muito obrigada pela sua amizade. Um exemplo de pessoa do bem e que faz o bem e que quero levar sempre em minha vida.

A minha amiga Paula Caetano Araújo, umas das pessoas mais especiais que já conheci, uma pessoa iluminada. Obrigada pelo carinho e amizade de sempre.

As minhas amigas que a pós-graduação me trouxe **Luara Colombo e Lara Cervantes:** meninas o meu muito obrigada sempre. Obrigada por estarem comigo em muitos momentos me ensinando, orientando e pela parceria de vida. Obrigada por tudo!

A minha amiga Juliana Zorzi. Obrigada por toda a sua amizade e parceria. Uma parceria que vai para a vida. Deus abençoe demais a sua vida e que realize sempre todos os seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP -

Na pessoa do diretor Prof. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. João Eduardo Gomes Filho pela, e do Coordenador do programa de pós-graduação Prof. André Luiz Fraga Briso.

À Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe-UNESP) pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao prédio 40, representados pelos docentes Prof. Dr Cláudio Aparecido Casatti, Prof. Dr. Edilson Ervolino, Prof^ª. Dra. Alaíde Gonçalves e Prof^ª Dra Mariza Akemi Matsumoto, Prof. Dr. José Américo de Oliveira, Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Prof^ª. Dra. Roberta Okamoto. Obrigada por cada momento vivido neste departamento, o qual me acolheu de forma tão agradável e especial.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa 2016/03762-7

À Universidade Sagrado Coração pela utilização de suas dependências para o desenvolvimento da minha pesquisa, agradecendo a Comissão de Ética no Uso de Animais em nome da coordenadora Prof.^a Dulce Helena J. Constantino.

Ao laboratório de Histologia da Universidade Sagrado Coração, universidade colaboradora do meu trabalho em nome de Maira Cristina Rondina Couto.

A Prof.^a Claudia Cristina Bigueti obrigada por toda ajuda e ensinamentos no decorrer desses anos.

Ao Prof.^o Dr. Renato Luiz Siqueira o meu agradecimento em especial pelos conhecimentos que pude adquirir através dos seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Salles Muneratto por toda ajuda e ensinamento na execução do meu projeto de pesquisa.

As alunas de iniciação científica Ana Cláudia Rodrigues, Elisa Furquim, Ana Carolina Zucom Bacelar, Gustavo Baroni Simionato. Agradeço muito a vocês por toda a ajuda e por todos os momentos de aprendizagem que tivemos juntos.

Ao Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, representado pelos docentes da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Osvaldo Magro filho, Prof. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Prof. Dra. Daniela Ponzoni, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza e Prof. Dr. Leonardo Faverani, obrigada por todo ensinamento e convivência nesses anos. Vocês são meus maiores exemplos.

Aos meus amigos de pós-graduação Lara Cervantes, Luara Colombo, William Phillipis, Thiago Machado, Laís Sara Egas, Guilherme Ramires, Cássio Messias Figueiredo, Rodrigo Capalbo, Henrique Hadad, Breno Fernandes, Bruna Junger, Yasmim Bantin, Bruno Coelho, Rames Hassan Mahmoud, Ana Flávia Carolina Chepernat- meu muito obrigada por toda a convivência e por cada momento agradável vivido.

A todos os colegas do Mestrado e Doutorado, eu só tenho a agradecer por todos os momentos vivenciados na pós-graduação.

Aos funcionários e amigos da FOA-UNESP, pelo trabalho extremamente competente que desempenharam. A vocês o meu carinho e eterna admiração.

À secretaria da pós-graduação em nome de Valéria, Lilian e Cristiane, Pela disponibilidade, atenção e educação.

Obrigada por me ajudarem com tanta dedicação e competência.

Epígrafe

*“Enquanto houver vontade de lutar, haverá esperança de
vencer.”*

Santo Agostinho

Parra da Silva, R.B. Avaliação do reparo de defeitos críticos em calvária de ratos preenchidos com a vitrocerâmica Biosilicato® sintetizada pelo processamento sol-gel: análises histológica e imuno-histoquímica. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2019.

RESUMO

Os materiais vítreos podem ser processados por diferentes rotas, dentre elas a convencional por fusão e solidificação ou por rota sol-gel, o que melhora sua bioatividade. O objetivo do presente estudo foi o de avaliar o comportamento biológico da vitrocerâmica Biosilicato® sintetizada pelo processamento sol-gel durante o processo de reparo ósseo em modelo animal. Para tanto, foram utilizados 30 ratos Albinus Wistar, machos, com cerca de três meses de idade e pesando em média 450 gramas. Os mesmos foram submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de um defeito de 5mm de diâmetro no osso parietal direito e divididos em 2 grupos, de acordo com o biomaterial estudado: Grupo BS – defeitos preenchidos com Biosilicato® particulado convencional (180-212 μm), e Grupo BG – defeitos preenchidos com Biosilicato® particulado produzido via rota sol-gel (180-212 μm). Após os períodos de 7, 21 e 45 dias, os animais foram submetidos à eutanásia para remoção dos espécimes para serem preparados e submetidos para análise microscópica morfológica e imuno-histoquímica. Aos 7 dias do grupo BS observaram-se partículas do biomaterial circundadas por tecido de granulação, no centro do defeito próximo e tecido ósseo neoformado próximo as suas paredes. Aos 21 dias, presença marcante de CGMs em contato com o biomaterial e aos 45 dias, biomaterial ora substituído por leucócitos MNs e CGMs ora circundado por tecido conjuntivo. Já no grupo BG aos 7 dias observaram-se numerosas partículas arredondadas do biomaterial circundadas por tecido de granulação. Aos 21 dias, presença de CGMs em contato com o material e/ou em processo de fagocitose e aos 45 dias, eventuais partículas do biomaterial, em sua maioria substituído por leucócitos MNs e CGMs e presença de tecido conjuntivo. Para a quantificação de células positivas marcadas para os marcadores F4/80 (A), CD206 (B), TGF β (C) e iNOS (D), considerando-se o número absoluto das células imunomarcadas houve diferença significativa entre os grupos BS ($6,5 \pm 3,33$) e BG ($20 \pm 7,55$) aos 21 dias para o marcador TGF β . Concluiu-se que a rota sol-gel para síntese da vitrocerâmica testada modificou suas propriedades físico-químicas sem, no entanto, incitar um processo imune-inflamatório deletério, sendo necessários estudos futuros para associar estes resultados às propriedades de bioatividade e osteocondução para atestar sua capacidade de substituto ósseo.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica. Materiais biocompatíveis. Regeneração óssea. Substitutos ósseos.

Parra da Silva, R.B. Evaluation of critical calvarial bone defects of rats filled with glass ceramic Biosilicato® synthesized by sol-gel route: histological and immunohistochemical analysis. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2019.

ABSTRACT

The vitreous materials can be processed by different routes, among them the conventional one by fusion and solidification or by route sol-gel, which improves their bioactivity. The objective of the present study was to evaluate the biological behavior of the glass-ceramic Biosilicato® synthesized by sol-gel processing during the bone repair process in animal model. For this, 30 male Albinus Wistar rats were used, about three months old and weighing on average 450 grams. They were submitted to a surgical procedure to make a 5mm diameter defect in the right parietal bone and divided into 2 groups according to the biomaterial studied: BS group - defects filled with conventional particulate biosilicate (180-212 μm), and Group BG - defects filled with particulate Biosilicato® produced via sol-gel route (180-212 μm). After the 7, 21 and 45 day periods, the animals were submitted to euthanasia to remove the specimens to be prepared and submitted for microscopic morphological and immunohistochemical analysis. At 7 days of the BS group biomaterial particles were observed surrounded by granulation tissue, close to the defect wall and noticed if neoformed bone tissue at 21 days, the presence of CGMs in contact with the biomaterial and at 45 days, biomaterial ora replaced by leukocytes MNs and CGMs or surrounded by connective tissue, already in the BG group at 7 days there are numerous rounded biomaterial particles surrounded by granulation tissue at 21 days, presence of CGMs in contact with the material and / or in process of phagocytosis and at 45 days, any particles of the biomaterial, mostly replaced by leukocytes MNs and CGMs and presence of connective tissue. For the quantification of positive cells marked for the markers F4 / 80 (A), CD206 (B), TGF β (C) and iNOS (D), considering the absolute number of the immunolabelled cells there was a significant difference between the BS and BG groups at 21 days for the TGF β marker. It is concluded that the sol-gel route for the synthesis of the glass-ceramic tested modified its physicochemical properties without, however, inciting a deleterious immune-inflammatory process, and future studies are necessary to associate these results with the properties of bioactivity and osteoconduction to attest its capacity of bone substitute.

Key words: Biocompatible materials. Bone regeneration. Bone substitutes. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto morfológico microscópico do grupo BS aos 7, 21 e 45 dias.	33
Figura 2	Aspecto morfológico microscópico do grupo BG aos 7, 21 e 45 dias.	34
Figura 3	Dados quantitativos provenientes da quantificação de parâmetros de reparação das áreas enxertadas nos grupos BS e BG.	38
Figura 4	Dados quantitativos provenientes da quantificação de células positivas para os marcadores F4/80 (A), CD206 (B), TGF β (C) e iNOS (D).	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos anticorpos relacionados aos macrófagos M1 e M2	31
Tabela 2	Média e Desvio Padrão da quantificação dos parâmetros de reparação das áreas enxertadas, considerando-se a densidade de área	35
Tabela 3	Média e Desvio Padrão dos da quantificação de células imunomarcadas para F4/80, CD206, iNOS e TGF β , considerando-se o número absoluto das contagens	37
Tabela 4	Diferenças morfológicas e microscópicas entre BS e BG	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 PROPOSIÇÃO	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Preparo das vitrocerâmicas	25
3.1.1 Preparo das vitrocerâmicas via fusão/solidificação	25
3.1.2 Preparo da vitrocerâmica via sol/gel	25
3.1.3 Animais e procedimento cirúrgico	26
3.1.4 Procedimentos e análises histológicas	28
3.1.5 Análise morfológica microscópica	28
3.1.6 Análise imuno-histoquímica	30
3.1.7 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	47

**Avaliação do reparo de defeitos críticos em calvária de ratos
preenchidos com a vitrocerâmica Biosilicato® sintetizada pelo
processamento sol-gel: análises histológica e imuno-histoquímica**

*Formatado de acordo com as normas da revista **Journal of Materials Science: Materials
in Medicine**

1 INTRODUÇÃO

A comprovada eficácia da reabilitação bucal com próteses dentárias suportadas por implantes osseointegráveis em condições anteriormente consideradas como desfavoráveis pela deficiência anatômica óssea local, tem sido demonstrada pelos resultados satisfatórios de casos reconstruídos com diversos biomateriais substitutos ósseos indicados para este fim, além do tradicional enxerto ósseo autógeno [1,2]. A preferência pelos biomateriais se dá, principalmente pela não necessidade de se intervir cirurgicamente em um segundo sítio, mesmo que este seja da própria região bucal, podendo ou não ser abordado em ambiente ambulatorial ou hospitalar, e que pode causar morbidades que por vezes se sobrepõem ao propósito principal, a reconstrução óssea local [3,4]. Dentre as morbidades mais importantes estão as provenientes das regiões extrabucais, como as parestesias e paralisias da área doadora, especialmente das regiões de crista ilíaca, que podem ou não ser transitórias [5,6].

Vários são os tipos e origens dos biomateriais que podem ser utilizados para substituir os enxertos ósseos autógenos, como ossos de outros indivíduos da mesma espécie (ossos de banco), de espécies diferentes denominados xenoenxertos, ou ainda aqueles produzidos sinteticamente, conhecidos como aloplásticos. Estes últimos são divididos em quatro grandes classes: polímeros, metais, cerâmicas e naturais [7]. Dentre estes, destacam-se os materiais cerâmicos, mais especificamente as cerâmicas bioativas (ou biocerâmicas), assim denominadas devido à sua semelhança estrutural, química e física com a matriz mineral óssea [8] que conferem à elas a propriedade de bioatividade, cujo índice (I_B) pode ser calculado pela seguinte fórmula: $I_B = 100/t_{0,5bb}$ [9] e que corresponde ao tempo em dias para que mais da metade de sua superfície esteja em contato com o tecido no qual foi inserido [10]. As biocerâmicas por sua vez, podem ser de origem natural ou sintética, produzidas na forma de hidroxiapatita (HA), alfa ou beta-tricálcio fosfato, fosfato de cálcio bifásico, vidros bioativos e vitrocerâmicas [10].

Para fins de substituição do tecido ósseo perdido, destacam-se os vidros bioativos devido ao seu alto grau de bioatividade e consequente forte ligação ao tecido ósseo neoformado [11]. O primeiro vidro bioativo foi sintetizado no final da década de 60 pelo pesquisador Larry Hench [9,12] pertencente ao sistema quaternário $45\text{SiO}_2-24,5\text{Na}_2\text{O}-24,5\text{CaO}-6\text{P}_2\text{O}_5$ (45S5 Bioglass), tendo sido preparado pelo método tradicional de fusão sob altas temperaturas (1.400°C). Devido à sua forte ligação com o tecido ósseo do hospedeiro, é considerado como padrão ouro para materiais regenerativos ósseos bioativos [13]. No entanto, a propriedade biomecânica resultante da síntese dos materiais vítreos nem sempre acompanha sua capacidade bioativa sendo que, de modo geral, os vidros bioativos apresentam altos índices de bioatividade, porém, baixas propriedades mecânicas e menor módulo de elasticidade quando comparados à cortical óssea humana [14]. Dentre eles, as cerâmicas e vitrocerâmicas apresentam melhor desempenho mecânico devido à introdução da cristalinidade ao material, o que por sua vez, diminuem seu índice de bioatividade. Devido a isto, na década de 1990, iniciaram-se os estudos sobre uma nova vitrocerâmica pertencente ao sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, denominada Biosilicato® (Patente WO 2004/074199), obtida pelo processo de fusão e solidificação [15], sendo produzida na forma particulada no ano de 2003 [16] no Laboratório de Materiais Vítreos (LAMAV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Desde então, vários estudos vêm sendo realizados, tanto *in vitro* [17,18] como *in vivo*[19-24], revelando resultados bastante interessantes no que diz respeito à reparação óssea. Pensando na capacidade bioativa desta vitrocerâmica, Moura et al. (2007) [17] avaliaram os parâmetros da osteogênese *in vitro* do Biosilicato® foram avaliados utilizando-se células osteogênicas obtidas do osso da calvária de ratos recém-nascidos comparando-o com o Bioglass 45S5 e o “parente glass” Biosilicato®, revelando que a alta cristalinidade do material não prejudicou sua capacidade osteogênica, ao contrário, pareceu melhorar a formação de tecido *bone-like* nos meios de cultura.

Sabe-se que o aumento da área da superfície do material cerâmico melhora as possibilidades de reações que nela ocorrem, melhorando seu I_B , podendo ser alcançado por diferentes rotas de síntese como o método sol-gel, o qual permite a obtenção de materiais com alta pureza e boa homogeneidade química a temperaturas relativamente baixas [25]. Este processamento eleva a bioatividade dos materiais vítreos, possivelmente pela formação de pequenos poros na superfície e alta concentração de grupos silanol, o que aumenta os sítios para nucleação para formação de hidroxiapatita [26]. Em sua dissertação de mestrado, Siqueira (2010) [27] sintetizou e caracterizou pós bioativos vítreos e cristalinos dos sistemas ternário ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$) e quaternário ($\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$) pela rota sol-gel, com atenção ao Biosilicato®. Por esta rota, a área de superfície específica da partícula do biomaterial aumentou de 0,51 para 3,01 m^2/g , o volume dos poros de 0,0005 para 0,0025 cm^3/g , e o diâmetro médio dos poros de 4,31 para 6.16 nm, tornando a superfície hidroxicarbonatada mais disponível. No entanto, ainda não há estudos que avaliem a efetividade deste método em vitrocerâmicas a serem utilizadas como substitutos ósseos.

De modo importante, destaca-se que a chave do sucesso de um biomaterial em seu sítio de implantação se encontra na sua biocompatibilidade, a qual depende basicamente de sua natureza físico-química que provocará uma reação imuno-inflamatória do hospedeiro, sendo que uma resposta favorável do mesmo guiará o processo para o reparo [28]. Atualmente, a concepção que recai sobre os biomateriais é a de que os mesmos não sejam somente considerados como substitutos de partes de um organismo vivo, mas sim um artifício imunomodulador capaz de controlar o curso do reparo favoravelmente ao que se espera [28].

Assim, o processo inicial de reconhecimento do biomaterial se dá no momento de sua implantação, com a adsorção espontânea de proteínas sobre sua superfície advindas do sangue e do interstício tecidual, como a vitronectina, fibronectina e fibrinogênio, as quais apresentam a sequência peptídica Ar-Gly-Asp reconhecida por uma gama de integrinas leucocitárias [29].

Dentre estas proteínas, destaca-se o fibrinogênio que serve como substrato de adesão para as plaquetas e cuja presença expõe os domínios de integrinas de leucócitos que irão se ligar à esta camada de adsorção. Neste processo os macrófagos exercem papel fundamental, atraídos também pela ativação do sistema complemento, pois expressam integrinas do tipo β_2 , mais especificamente $\alpha M/\beta_2$ (Mac-1, CD11b/CD18) as quais realizam sua adesão às diversas proteínas adsorvidas, promovem ativação celular [30], e direcionam o processo inflamatório [31]. Assim, o reconhecimento inicial dos materiais implantados no hospedeiro será feito pelos macrófagos, células do sistema mononuclear fagocitário pertencentes ao sistema imune inato. As limitadas funções atribuídas a estas células no passado, como fagocitose e defesa imunológica encontram-se superadas, sendo que atualmente sabe-se que os macrófagos são células sentinelas do sistema imune atuando no equilíbrio inflamatório por meio de sua capacidade de se polarizarem, adquirindo fenótipos pró- e anti-inflamatórios (identificadas como M1 e M2, respectivamente) e, deste modo, secretando citocinas e quimiocinas que regem o curso do processo de reparação no local implantado, dependendo das características do biomaterial [32]. A polarização dos macrófagos para a condição M1 ocorre por meio da sua interação com sinais locais pró-inflamatórios como produtos microbianos (LPS) e interferon gama ($\text{IFN-}\delta$) [34]. Os macrófagos M2, por sua vez, são ativados por moléculas secretadas pelas plaquetas, produtos do próprio coágulo e por outros leucócitos, como as interleucinas (IL) IL-4 e IL-13, além de expressarem receptores de manose (CD206) e secretarem interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) [35,36].

Em meio ao processo de reconhecimento, não somente a composição do biomaterial é importante, como também sua dimensão, a fim de que o mesmo possa ser adequadamente degradado, fagocitado e substituído por novo tecido. Dependendo da natureza e dimensão do biomaterial, mediadores como IL-4 e IL-13 são liberados por linfócitos T e mastócitos, respectivamente, que participam na formação das células gigantes multinucleadas tipo corpo

estranho (CGMs) e que caracterizam a reação tipo corpo estranho a um biomaterial [37,38,29,39]. Apesar de as CGMs estarem comumente relacionadas a formação de processo de fibrose e encapsulamento de biomateriais, sabe-se que as mesmas atuam de maneira importante na liberação de fatores anti-inflamatórios como TGF- β e que, em equilíbrio com a área em reparação, pode favorecer a neoformação óssea [40].

No presente estudo, uma nova rota de síntese foi aplicada para a produção da vitrocerâmica Biosilicato®, com a finalidade de se melhorar sua propriedade bioativa e deste modo, abrir uma possibilidade para um novo material nacional a ser utilizado para fins de reconstruções ósseas. Deste modo, antes de sua capacidade bioativa e osteocondutora, propôs-se analisar se seu comportamento imune-inflamatório em modelo de defeito em osso intramembranoso em ratos.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o processo de reparo de defeitos críticos em calvária de ratos preenchidos com a vitrocerâmica Biosilicato® particulada sintetizada pela rota sol-gel comparando-o ao Biosilicato® produzido por método convencional através das análises histológica e imunohistoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação das vitrocerâmicas

3.1.1 Preparo da vitrocerâmica via fusão /solidificação

Para a preparação de 20 g do Biosilicato®, vitrocerâmica bioativa com cristalinidade de ~ 99,5 % e composição $49,16\text{SiO}_2-25,79\text{CaO}-23,33\text{Na}_2\text{O}-1,72\text{P}_2\text{O}_5$ (% em mol%) [41], inicialmente 9,71 g de sílica (SiO_2 99,9%, Sigma-Aldrich), 8,48 g de carbonato de cálcio (CaCO_3 99,9%, J. T. Baker), 6,93 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3 99,9%, J. T. Baker) e 1,60 g de hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4 99,9%, J. T. Baker) foram misturados e devidamente homogeneizados em um frasco plástico. Em seguida, a mistura reacional foi fundida em cadinho de platina a 1350 °C por ~ 4 h em um forno elétrico. O material fundido foi vertido formando placas de vidro que posteriormente foram cristalizadas sob tratamentos térmicos conforme descrito por Zanotto e colaboradores [42]. O material final foi submetido a moagem manual em almofariz de ágata para obtenção de pós com tamanho de partícula entre 180 e 212 μm , granulometria especificada para o estudo.

3.1.2 Preparo da vitrocerâmica via sol/gel

Para a obtenção de 20 g de um material similar via sol-gel, a síntese envolveu reações de hidrólise e policondensação de uma mistura contendo 36,41 mL de tetraetoxissilano

($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ 99%, Sigma-Aldrich) e 1,92 mL de trietilfosfato ($\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 99,8%, Merck) com 13,16 g de nitrato de sódio (NaNO_3 99%, Sigma-Aldrich) e 20,20 g de nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 99%, Sigma-Aldrich), seguindo com adaptações, a metodologia de um estudo prévio [43]. A hidrólise do $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ e $\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ foi catalisada por uma solução de ácido nítrico (HNO_3 70%, Sigma-Aldrich) a $0,1 \text{ molL}^{-1}$, sendo usada a seguinte relação molar: $[\text{H}_2\text{O} + \text{HNO}_3] / [\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4 + \text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3] = 24$. Partindo-se da hidrólise do $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, os demais reagentes foram sendo adicionados com intervalos de 60 min, permanecendo a mistura reacional sob constante agitação. Antes de atingir o ponto de gel, o sol foi vertido em um tubo plástico e mantido em repouso por 3 dias. Após esse período, o gel formado foi seco em estufa por 7 dias, à temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$, com adicional de mais 2 dias na temperatura de $150 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalizada a etapa de secagem, o gel foi triturado manualmente em almofariz de ágata e submetido a tratamento térmico ($700 \text{ }^\circ\text{C} / 3 \text{ h}$) em forno elétrico para mineralização. Após resfriamento natural, o material foi desaglomerado, sendo selecionado pós com a mesma granulometria (180 e $212 \mu\text{m}$) para fins de comparação.

Para a formulação das misturas reacionais, foi utilizado o *software* GlassPanacea[®] [44], ferramenta gratuita e bastante útil para agilizar essa etapa inicial de preparo dos materiais.

3.1.3 Animais e Procedimento cirúrgico

Para este estudo, foram utilizados 30 ratos albinos Wistar machos com idade aproximada de três meses, peso médio de 450 gramas, a serem divididos em dois grupos distintos e analisados em três períodos experimentais ($n=5$ por grupo e período). Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, recebendo água a vontade e ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson &

Clayton S.A.) sem restrição. Os procedimentos de manejo animal foram realizados sob a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC - Protocolo n° 2664030417) (Anexo A). As cirurgias foram realizadas entre 8h e 12h com ratos aleatoriamente designados para grupos. Antes dos procedimentos, os ratos foram anestesiados utilizando a combinação do sedativo cloridrato de quetamina (75mg/kg - Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) e do relaxante muscular xilazina (5mg/kg - Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA). Na calvária do animal foram feitas a tricotomia e antissepsia com polivinilpirrolidona 1% tópica (PVPI) (Dermoidine® - Gessy Lever Industrial Ltda.). Os animais foram mantidos sob anestesia durante a preparação e procedimentos cirúrgicos. A anestesia local administrada por infiltração subcutânea em linha, no plano sagital mediano do crânio, utilizando cloridrato de mepivacaína a 2% em associação com adrenalina 1:100.000 (Mepiadre, DFL Indústria e Comércio S.A., Brasil).

A incisão na pele foi realizada no sentido da sutura sagital do crânio com extensão de aproximadamente 2,5 cm, seguida de nova incisão dos tecidos subcutâneos e divulsão. Na sequência, foi realizada incisão no periósteo 3 mm à esquerda da linha de sutura sagital com 2 cm de extensão, para o descolamento e exposição do tecido ósseo da calvária. O defeito crítico circular foi realizado utilizando motor elétrico (Vector DTCEB, Bauru, Brasil) em 1.200 rpm e irrigação abundante com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (Linhamax®, Eurofarma Laboratórios S.A. São Paulo, Brasil) utilizando uma broca trefina (Neodent®, JJGC Ind e Com. de Mat. Dentários S.A., Brasil) com diâmetro externo de 5 mm na região central do osso parietal direito. O bloco de enxerto foi então removido sendo mantida a meninge dura-mater.

Os biomateriais para enxertia (0,02g), foram pesados utilizando balança semi-analítica de precisão e acomodados ao defeito das calvárias conforme os grupos. Os tecidos foram reposicionados e suturados com fio de nylon 6.0 (Ethicon®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil)¹. Após 48h da primeira dose de benzilpenicilina benzatina

(Pentabiótico® Veterinário de Pequeno Porte, Forte Dodge Saúde Animal LTDA, Brasil) foi administrada dose adicional de 40.000UI da benzilpenicilina benzatina por via intramuscular no músculo semi-membranoso do membro posterior esquerdo. Todos os passos da cirurgia foram realizados segundo Munerato [30]

3.1.4 Procedimentos e análises histológicas

Os animais foram eutanasiados nos tempos de 7, 21 e 45 dias e as calotas foram lavadas em água corrente por cerca de seis horas e foram acondicionados em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10% tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana por 20 dias aproximadamente, até que não apresentassem resistência ao corte com navalha. As amostras foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Histosec® Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido sagital, utilizando-se micrótomo Leica RM. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), tricrômico de Goldner (TG) e cortes de 3 µm de espessura para técnica imuno-histoquímica.

3.1.5 Análise morfológica microscópica

A análise quantitativa foi feita em todos os cortes corados com hematoxilina e eosina (HE) considerando-se o padrão do infiltrado inflamatório, agudo ou crônico, tendo-se como parâmetro a morfologia de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e mononucleares (linfócitos e plasmócitos), bem como a presença de CGMs tipo corpo estranho, remodelação e viabilidade óssea, interação tecido ósseo/biomaterial bem como as características morfológicas dos biomateriais. A partir das lâminas confeccionadas, foi realizada a análise quantitativa dos leucócitos. Foram capturados e registrados três campos em objetiva de 40x abrangendo duas áreas periféricas e um central do defeito, a fim de se proceder

a morfometria das células utilizando software ImageJ (Schneider et al., 2012). Na aba *Plugins* foi utilizada a ferramenta *Grid* para a confecção de um retículo contendo 398 pontos. Com a ferramenta *Cell counter* foram contabilizadas somente as células que coincidiam com a intersecção das cruces, denominados de pontos. A soma dos três campos resultaram no total de leucócitos e CGM de cada animal.

3.1.6 Análise imuno-histoquímica

Para a determinação dos padrões moleculares da região de reparo ósseo foram padronizados os anticorpos para caracterização dos macrófagos M1 e M2 apresentados na Tabela 1. Para tanto, cortes de 3 μ m foram tratados com proteinase K por 30 minutos em temperatura ambiente. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 2% por 10 minutos e lavados em PBS (Phosphate buffer solution). Após este período, foram utilizados os anticorpos primários policlonais indicados na tabela 1, em ambiente refrigerado por 1 hora, e lavados com PBS por 30 minutos, por três vezes. Após isto, os cortes incubados com anticorpos primários anti-rabbit foram incubados com o polímero-HRP (Easy Link One, EasyPath, Immunobioscience Corp., EUA) por 10 a 25 minutos e em seguida, corados com o DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contra-corados com Hematoxilina de Harris. Os cortes incubados com anticorpos primários anti-goat foram incubados com polímero Immpress/HRP (Vector Labs, Southfield, EUA). Para controle negativo será omitido o anticorpo primário. Uma vez realizadas as marcações, foram registrados 5 campos dos cortes centrais da área de todos os defeitos em aumento de 20x em microscópio óptico de luz (Nikon Eclipse, Tokyo, Japão) possibilitando a contagem das células imunomarcadas pelos anticorpos propostos.

Tabela 1 – Relação dos anticorpos relacionados aos macrófagos M1 e M2

Anticorpos	M1	M2
Caracterização		
F4/80 (SC-26643-R)*	x	x
iNOS2 (SC-649)*	x	
CD206 (SC-34577)*		x
TGF (SC-7892)*		x

*Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA)

3.1.7 Análise estatística

Cálculo do número absoluto

Após obtenção dos valores quantificados para cada campo (células ou parâmetros coincidentes com pontos do retículo) o número total obtido pela contagem das células imunomarcadas foi submetido aos testes estatístico.

Cálculo da densidade de área

Após obtenção dos valores quantificados para cada campo (células ou parâmetros coincidentes com pontos do retículo), os valores absolutos de cada campo foram convertidos em densidade de área (%), de modo que os 391 pontos do retículo utilizado para as contagens foram considerados como 100% do campo. Dessa forma, utilizou-se a fórmula:

$$\frac{100 \times \text{Valor do parâmetro}}{391}$$

391

Os dados provenientes das análises quantitativas foram inicialmente analisados quanto a sua distribuição de normalidade por meio do teste Shapiro Wilk. Para as amostras dentro da distribuição da normalidade, foi aplicado o teste ANOVA seguido de Tukey para comparações múltiplas. Para análises entre apenas dois grupos dentro da distribuição da normalidade, foi

utilizado o teste T, enquanto amostras não-normais foram analisadas pelo teste Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test). A análise comparativa entre os grupos BS e BG foi realizada dentro de um mesmo período experimental, por exemplo, BS 7d vs BG 7d. Os grupos foram ainda analisados em relação a diferenças entre períodos (7, 21 e 45 dias) dentro de um mesmo grupo, por exemplo, BS 7d vs BS 21d. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0.05$) e os testes foram aplicados por meio dos programas GraphPadInStat e Prism6 (GraphPad, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4.1 Análise morfológica microscópica

Grupo BS – Aos 7 dias observam-se partículas de biomaterial, grandes em sua maioria, birrefringentes e irregulares permeadas por tecido de granulação ricamente vascularizado, discretamente infiltrado por leucócitos mononucleares e eventuais polimorfonucleares neutrófilos. Em contato com as partículas do biomaterial notam-se células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CGMs), predominantemente finas e alongadas. Observa-se discreta atividade osteogênica focal, na periferia do defeito. Aos 21 dias, as partículas do biomaterial apresentam sinais de degradação pela perda de contorno definido das mesmas e acúmulo de células mononucleares e de CGMs. Após 45 dias observam-se maior acúmulo de CGMs e leucócitos mononucleares em íntimo contato com as partículas do biomaterial (**Fig 1**)

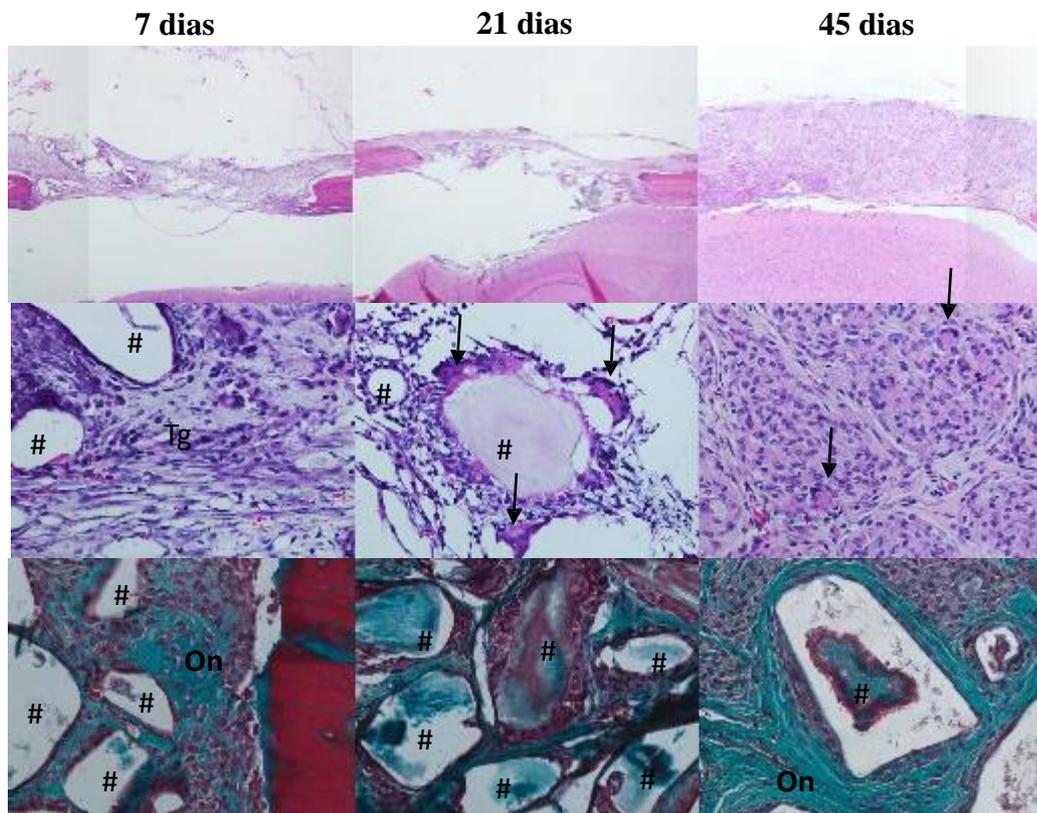


Fig 1 – Aspecto morfológico microscópico do grupo BS aos 7, 21 e 45 dias. Aos 7 dias observam-se partículas do biomaterial (#) circundadas por tecido de granulação (Tg) eventualmente, próximo a parede do defeito observou-se tecido ósseo neoformado (On). Aos 21 dias, presença marcante de CGMs (setas) em contato com o biomaterial (#). Aos 45 dias, biomaterial ora substituído por leucócitos MNs e CGMs (setas) ora circundado por tecido conjuntivo (Tc) (HE; aumento original 4x e 20x e tricrômico de Goldner (TG))

Grupo BG – Aos 7 dias notam-se fragmentos arredondados birrefringentes do biomaterial, menores em comparação com o Grupo BS. De permeio tem-se predominância de tecido conjuntivo frouxo e leucócitos mononucleares, além de CGMs pequenas e arredondadas. Após 21 dias, há um aumento de CGM associadas ao biomaterial, o qual se encontra em fase avançada de reabsorção, bem como numerosos leucócitos mononucleares. No período de 45 dias, nota-se número reduzido das partículas do biomaterial envoltas ou substituídas por CGMs e

leucócitos mononucleares. Discretos pontos de osteogênese são visualizados. Nos períodos de 21 e 45 dias, chama a atenção a morfologia das CGMs, as quais apresentam-se semelhantes às células de Langerhans, cujos núcleos organizam-se em paliçada próximos à membrana citoplasmática, deixando uma área central de citoplasma onde, por vezes, observam-se partículas do biomaterial (Fig 2)

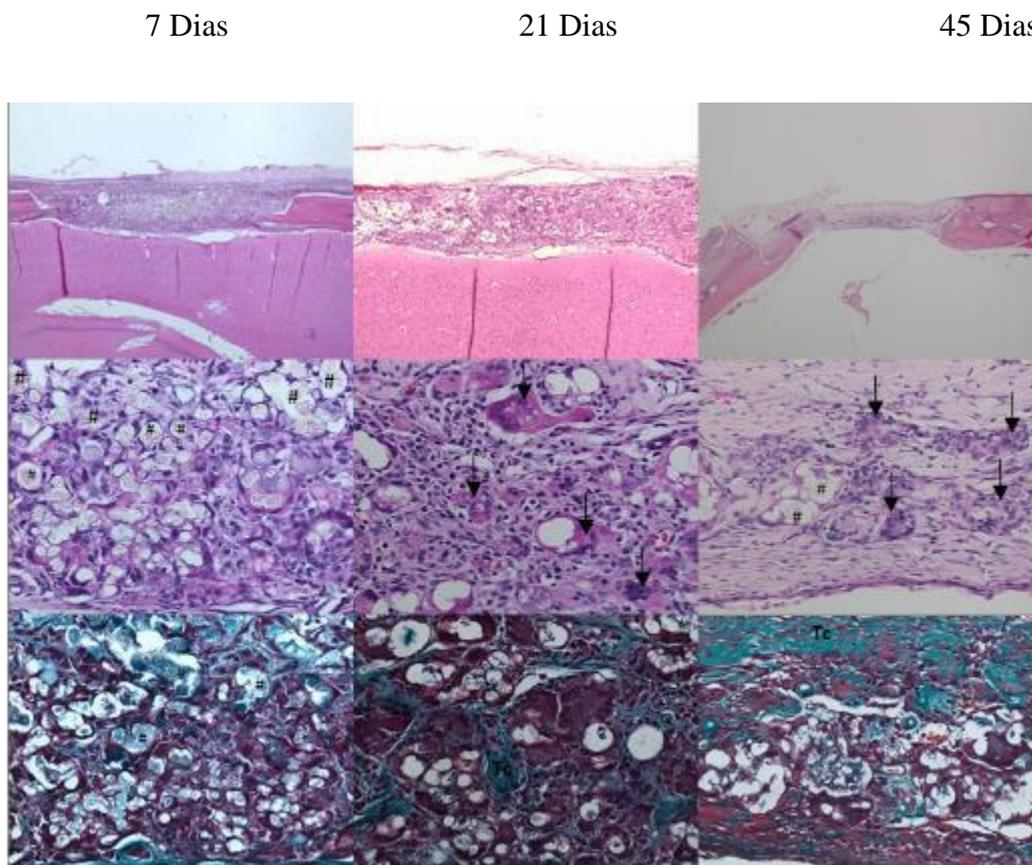


Fig 2 – Aspecto morfológico microscópico do grupo BG aos 7, 21 e 45 dias. Aos 7 dias observam-se numerosas partículas arredondadas do biomaterial (#) circundadas por tecido de granulação (Tg). Aos 21 dias, presença de CGMs em contato com o material e/ou em processo de fagocitose (setas). Aos 45 dias, eventuais partículas do biomaterial (#), em sua maioria substituído por leucócitos MNs e CGMs e presença de tecido conjuntivo (Tc) (HE; aumento original 4x e 20 e tricrômico de Goldner (TG)).

4.2 Análise quantitativa de parâmetros histológicos nas áreas de reparação preenchidas com BS ou BG

Em relação às células inflamatórias PMN, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos BS e BG e períodos experimentais. Já em relação aos leucócitos mononucleares (MN), observaram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos BS e BG nos períodos de 7 dias ($1,61 \pm 0,76$ vs $0,56 \pm 0,46$) e 45 dias ($3,82 \pm 1,16$ vs $2,74 \pm 0,96$), de modo que a densidade de área de MN foi maior no grupo BS em ambos os períodos ($p < 0,05$). Considerando-se a presença de CGM, notou-se densidade significativamente maior no grupo BG ($0,99 \pm 0,86$) comparado ao grupo BS ($0,25 \pm 0,36$) no período de 7 dias ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes considerando-se a presença de biomaterial residual, tecido ósseo neoformado, bem como o parâmetro outros (espaços vazios, fibras e artefatos) (Figura 3, Tabela 2).

Tabela 2. Média e Desvio Padrão dos da quantificação dos parâmetros de reparação das áreas enxertadas, considerando-se a densidade de área

Parâmetros	BS			BG		
	7d	21d	45d	7d	21d	45d
PMN	$0,03 \pm 0,08$	$0,00 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,13$	$0,16 \pm 0,41$	$0,05 \pm 0,22$	$0,20 \pm 0,19$
MN	$1,61 \pm 0,76$	$0,26 \pm 0,45$	$3,82 \pm 1,16$	$0,56 \pm 0,46$	$0,25 \pm 0,28$	$2,74 \pm 0,96$
CGM	$0,25 \pm 0,36$	$0,64 \pm 0,65$	$0,16 \pm 0,21$	$0,99 \pm 0,86$	$0,88 \pm 0,70$	$0,52 \pm 0,22$
BIOMATERIAL	$6,47 \pm 8,91$	$33,32 \pm 46,15$	$8,59 \pm 6,43$	$6,56 \pm 6,17$	$24,55 \pm 12,60$	$7,41 \pm 4,60$
TECIDO						
ÓSSEO	$0,00 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,64$	$0,52 \pm 1,90$	$0,00 \pm 0,00$	$2,03 \pm 4,86$	$0,01 \pm 0,00$
OUTROS	$91,64 \pm 8,81$	$88,22 \pm 54,04$	$86,85 \pm 5,99$	$91,42 \pm 6,55$	$72,42 \pm 12,02$	$89,14 \pm 4,70$

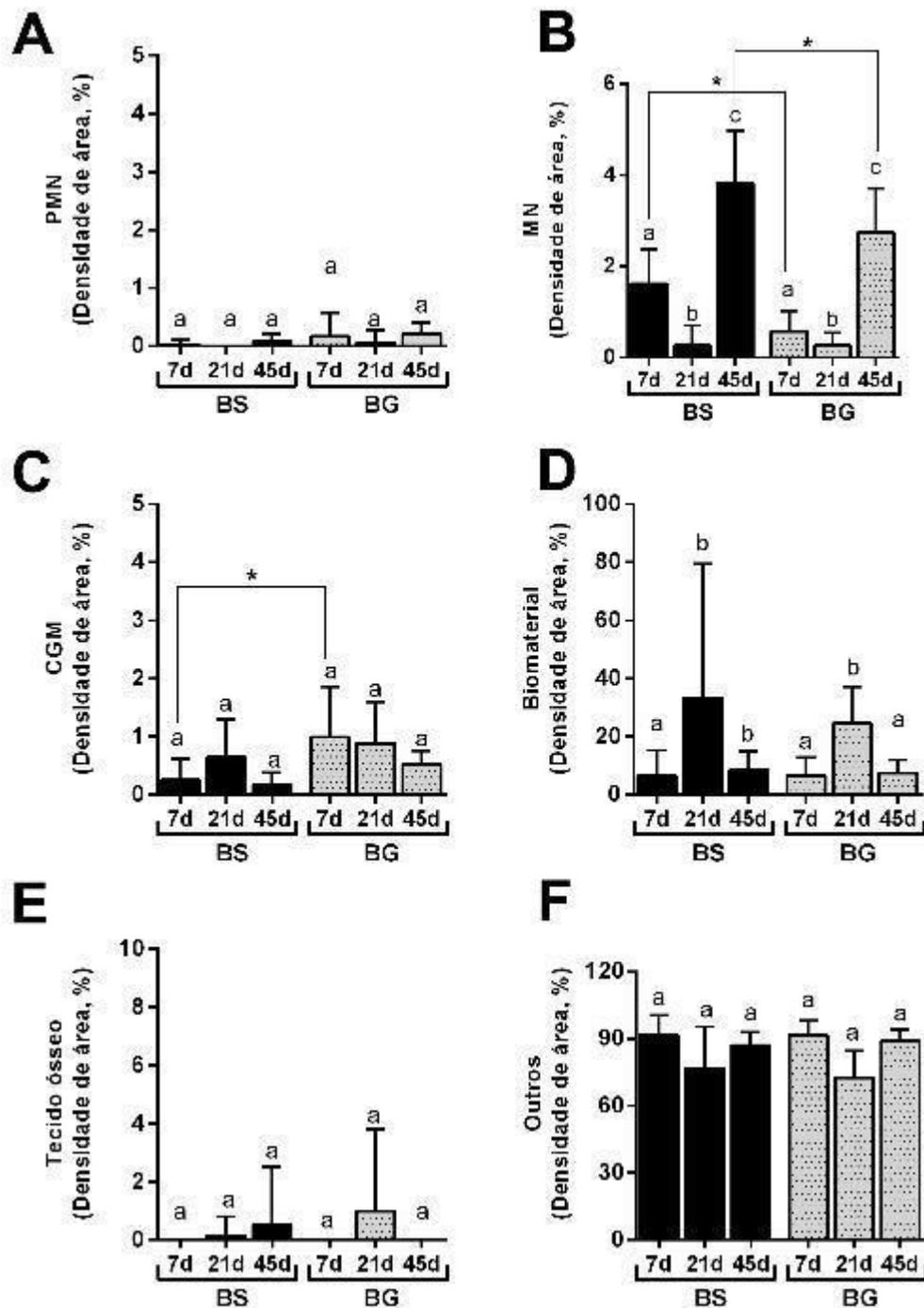


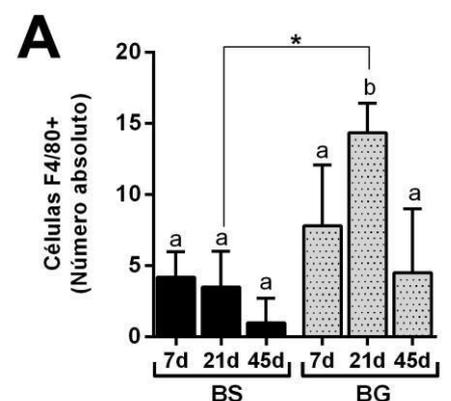
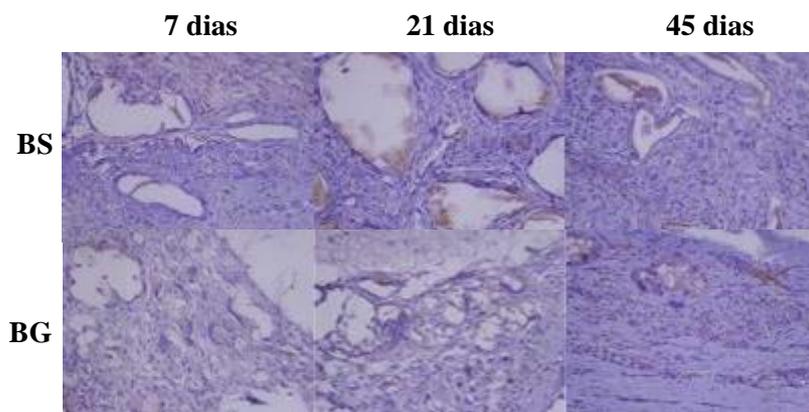
Fig 3 Dados quantitativos provenientes da quantificação de parâmetros de reparação das áreas enxertadas nos grupos BS e BG. Fotomicrografias representativas de 5 campos do defeito de cada espécime foram quantificadas no aumento de 40x com um retículo de 391 pontos, sendo considerados parâmetros histológicos encontrados nas regiões do defeito ao longo do processo de reparo (A- PMN, B- MN, C- CGM, D – Biomaterial, E – Tecido Ósseo, F – Outros). Dados analisados pelo teste ANOVA seguido de Tukey. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de um mesmo grupo ($p < 0,05$). Símbolos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do período experimental. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados.

4.3 Análise quantitativa de células positivas para os marcadores F4/80 (A), CD206 (B), TGF β (C) e iNOS (D) nas áreas de reparação preenchidas com BS ou BG

A quantificação de células imunomarcadas para os diferentes marcadores estão apresentadas como número absoluto (Tabela 3 e Figura 2). Na análise da contagem absoluta, observaram-se diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para o marcador F4/80 (macrófagos) no período de 21 dias entre os grupos BS ($3,5 \pm 2,51$) e BG ($14,33 \pm 2,08$). Da mesma forma, o fator de crescimento TGF β teve imunomarcção significativamente maior no grupo BG ($20 \pm 7,55$) comparado ao BS ($6,25 \pm 3,30$) também no período de 21 dias (Tabela 3, Figura 4).

Tabela 3. Média e Desvio Padrão dos da quantificação de células imunomarcadas para F4/80, CD206, iNOS e TGF β , considerando-se o número absoluto das contagens

Marcador	BS			BG		
	7d	21d	45d	7d	21d	45d
F4/80	4,2 \pm 1,78	3,5 \pm 2,51	1 \pm 1,73	7,8 \pm 4,26	14,33 \pm 2,08	4,5 \pm 4,5
iNOS	29,6 \pm 19,2	15,5 \pm 13,18	9 \pm 7,54	28,75 \pm 19,18	14,67 \pm 4,51	1,32 \pm 1,00
CD206	28,8 \pm 3,49	28 \pm 7,25	58 \pm 5,02	28,2 \pm 11,97	33,33 \pm 14,74	36,75 \pm 11,18
TGF β	9,2 \pm 4,43	6,25 \pm 3,30	9 \pm 4,58	12,75 \pm 5,31	20 \pm 7,55	10,25 \pm 3,94



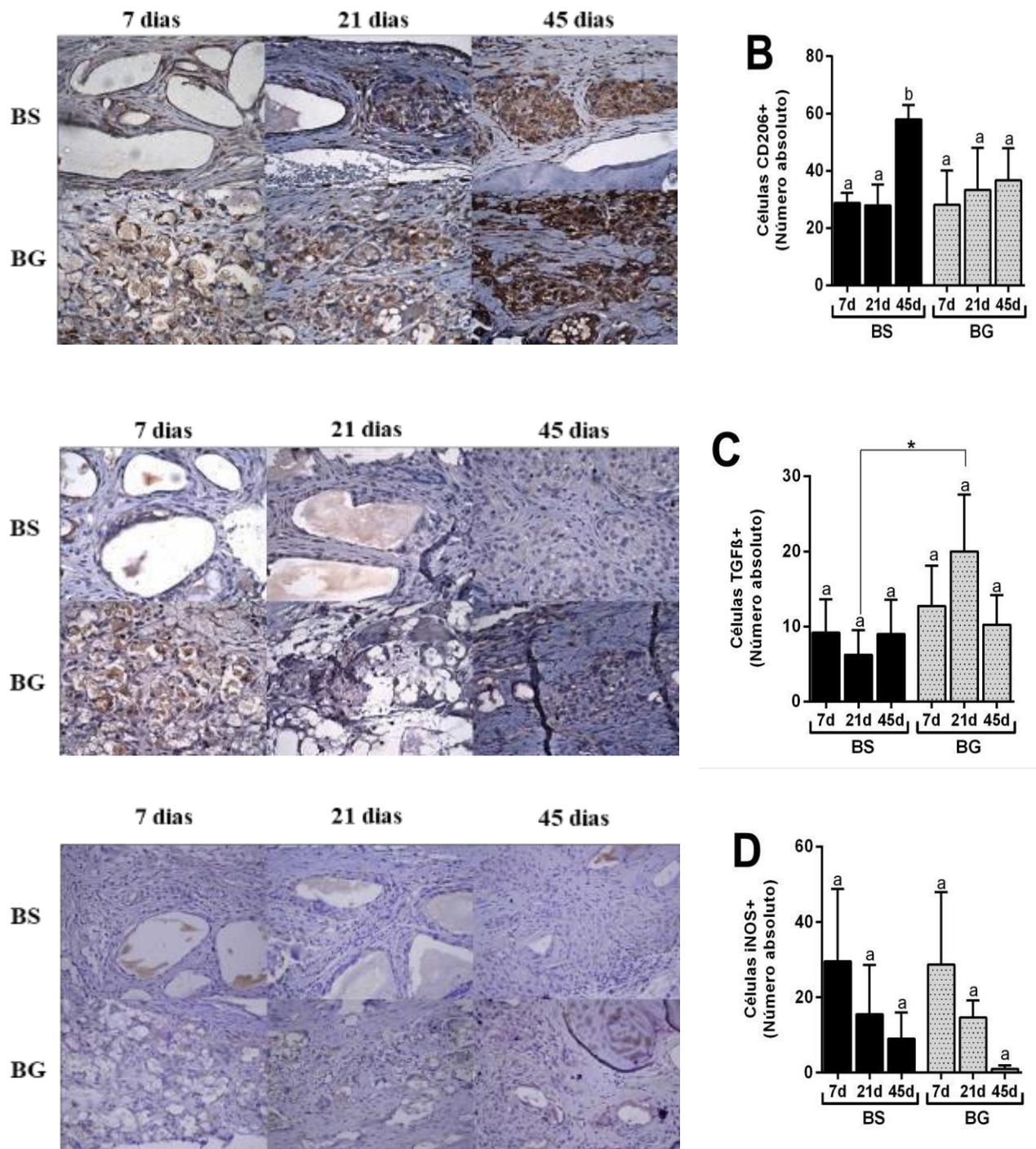


Fig 4 Dados quantitativos provenientes da quantificação de células positivas para os marcadores F4/80 (A), CD206 (B), TGFβ (C) e iNOS (D), considerando-se o número absoluto das células imunomarcadas. Dados analisados pelo teste ANOVA seguido de Tukey. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de um mesmo grupo ($p < 0,05$). Símbolos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do período experimental. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados.

Tabela 4. Diferenças morfológicas e microscópicas entre BS e BG

Biosilicato®	Biosilicato® sol-gel
7 dias	7 dias
<ul style="list-style-type: none"> • Partículas do biomaterial com contornos retangulares bem definidos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas evidentes do biomaterial arredondados e próximos uns dos outros.
<ul style="list-style-type: none"> • Eventual CGMs na superfície do biomaterial. 	<ul style="list-style-type: none"> • Presença numerosa de CGMs na superfície do biomaterial.
<ul style="list-style-type: none"> • Tecido de granulação ao redor das partículas com infiltrado – leucócitos mononucleares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tecido de granulação em meio as partículas do biomaterial com intenso infiltrado por leucócitos mononucleares.
21 dias	21 dias
<ul style="list-style-type: none"> • Partículas do biomaterial no processo de reabsorção por CGMs. 	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas do biomaterial em processo avançado de reabsorção por CGMs
<ul style="list-style-type: none"> • Persistência do tecido de granulação, infiltrado por leucócitos mononucleares. 	<ul style="list-style-type: none"> • CGMs grandes com núcleos localizados na periferia do citoplasma semelhantes a células de langerhans apresentado partículas de biomaterial em seu interior.
	<ul style="list-style-type: none"> • Persistência do tecido de granulação – infiltrado por leucócitos mononucleares.
45 dias	45 dias
<ul style="list-style-type: none"> • Substituição do biomaterial por infiltrado inflamatório mononuclear e CGMs em áreas circundadas por tecido conjuntivo fibroso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Presença de remanescente do biomaterial associado com infiltrado inflamatórios mononuclear e CGMs em meio a tecido conjuntivo fibroso.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelaram a influência do tipo de processamento na síntese de um mesmo material em seu comportamento imune-inflamatório no decorrer do processo de reparo da área reconstruída. Desta forma, destaca-se o método de produção das cerâmicas vítreas pela rota sol-gel que vem sendo utilizado com ênfase na produção de materiais com elevada pureza e homogeneidade a partir de temperaturas mais baixas de processamento (~ 600-800 °C). Além disso, permite certa flexibilidade para a formação das partículas dos biomateriais sendo possível obter-se micro e nanopartículas [46,47,48], bem como a produção de arcabouços (*scaffolds*) para aplicação na engenharia de tecidos com aspecto similar ao do osso trabecular (poroso) [49-51]. O fator determinante das biocerâmicas produzidas pela rota sol-gel, além de sua grande área superficial com ou sem arranjo ordenado de poros, é o aumento da bioatividade por intensificar as reações iniciais para a formação de hidroxicarbonatoapatita [51]. No entanto, antes de sua capacidade osteocondutora ou bioativa, propôs-se a análise de seu comportamento biológico, imune-inflamatório.

Para este fim, optou-se pelo modelo de confecção defeito crítico em calota em animais que, além de ser indicado para avaliação da propriedade osteocondutora de um biomaterial substituto ósseo, também permite a análise dos eventos biológicos que ocorrem durante o curso do reparo. Uma das consequências indesejáveis das biocerâmicas é a produção de muitas partículas vindas do processo de degradação do biomaterial onde vão interagir com as células imunológicas promovendo sua ativação e liberação de mediadores químicos que podem ser predominantemente pró- ou anti-inflamatórios. Este processo de dissolução das biocerâmicas são conduzidos pelas propriedades químicas da própria cerâmica, onde foi implantado e também pela presença de citocinas [52,53].

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas comparando-se a quantidade de células inflamatórias polimorfonucleadas (PMNs) e mononucleadas (MNs) entre os grupos considerando-se os mesmos períodos. No entanto, chamou atenção a presença aumentada de CGMs no biomaterial produzido pela rota sol-gel aos 7 dias, provavelmente pela visível degradação precoce do biomaterial e pelo tamanho menor de suas partículas. Faz-se importante saber que pelo processamento sol-gel outros reagentes precisam ser incorporados na sua produção, o que pode alterar de maneira significativa o seu comportamento químico sabendo-se que deste modo, a forma sol-gel resulta em um biomaterial mais solúvel [54]. Há pouco tempo a reação tipo corpo estranho caracterizada pela presença das CGMs nas áreas reconstruídas com biomateriais eram sinônimo de fracasso por associá-las ao processo de rejeição [54]. Posteriormente, surgiram dúvidas quanto à natureza das CGMs quando em ambiente ósseo, se macrofágicas ou osteoclásticas. Assim, estudos utilizando marcadores específicos para os dois tipos celulares, como integrina β -3, TRAP, RANKL, MMP9 para osteoclastos e integrina β -2, HLA-DR, CD96 E CD98 para CGMs [55] confirmaram sua natureza macrofágica. Apesar disso, a sua relação com os biomateriais substitutos ósseos ainda permanece obscura. No campo da osseointegração, a reação tipo corpo estranho vem sendo considerada como um evento necessário e favorável se em condições de equilíbrio com a resposta inflamatória, uma vez que aceita-se o conceito de a osseointegração ser uma reação tipo corpo estranho [40,56]. No entanto, a sua real função na presença dos substitutos ósseos ainda permanece obscura, sendo importante a investigação mais aprofundada destas células a fim de se utilizar este conhecimento para o desenvolvimento de materiais mais biocompatíveis.

Apesar disso, o equilíbrio entre CGMs e inflamação parece estar presente no curso do reparo dos biomateriais testados, pois apesar da presença constante e predominante das CGMs aos 7 dias no grupo BG, não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade das células inflamatórias, bem como de iNOS, caracterizando a presença de macrófagos M1.

Entende-se que na presença dos biomateriais ósseos, as CGMs devam se diferir das de tecido mole, por serem necessárias possivelmente auxiliando na degradação e fagocitose do biomaterial favorecendo desta forma a substituição do mesmo pelo tecido ósseo neoformado [58]. Donath e colaboradores (1992) [57] registraram três diferentes tipos de reação tecidual a materiais cerâmicos e implantes de titânio: formação de tecido conjuntivo, contato ósseo direto ou integração óssea, sendo que em todas as CGMs estavam presentes. Assim, considera-se que também estas células apresentem perfis semelhantes aos macrófagos, podendo ser identificadas como CGM1 e CGM2 [59], sendo consideradas um subtipo das tradicionais CGMs [55]. Apesar da pouca neoformação óssea observada no estudo em questão, a maioria das CGMs mostraram-se marcadas pelo anticorpo CD206, especialmente no grupo BG, comprovando seu perfil M2 e reforçado pelo aumento significativo de TGF- β aos 21 dias neste grupo.

6 CONCLUSÃO

Deste modo, conclui-se que a rota sol-gel para síntese da vitrocerâmica testada modificou suas propriedades físico-químicas sem, no entanto, incitar um processo imune-inflamatório deletério, sendo necessários estudos futuros para associar estes resultados às propriedades de bioatividade e osteocondução para atestar sua capacidade de substituto ósseo.

REFERÊNCIAS

1. Esposito M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Jul 16;(3):CD003607.
2. Esposito M, Grusovin MG, Rees J, Karasoulos D, Felice P, Alissa R, Worthington H, Coulthard P. Effectiveness of sinus lift procedures for dental implant rehabilitation: a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol*. 2010 Spring;3(1):7-26.
3. Jakoi AM, Iorio JA, Cahill PJ. Autologous bone graft harvesting: a review of grafts and surgical techniques. *Musculoskelet Surg*. 2015 Dec;99(3):171-8.
4. Zouhary KJ. Bone graft harvesting from distant sites: concepts and techniques. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010 Aug;22(3):301-16
5. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S3-15.
6. Nkenke E, Neukam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol*. 2014 Summer;7 Suppl 2:S203-17.
7. Hoffman AS. Classes of materials used in medicine. In: Ratner BD et al., *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 2nd ed, San Diego: Elsevier, cap. 2, p. 67
8. Sarkar SK, Lee BT. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *Korean J Intern Med*. 2015 May;30(3):279-93.
9. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res*, 5(6):117-141, 1971.
10. CRUZ A .C .C, et al., Utilização de vidros bioativos como substitutos ósseos: Revisão de literatura, *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*, setdez; v.18, n. 3, p. 287-95, 2006.
11. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater*. 2015 Sep;23 Suppl:S53-82.
12. Hench, Larry L. "The story of Bioglass®." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17.11 (2006): 967-978.
13. Kong CH, Steffi C, Shi Z, Wang W. Development of mesoporous bioactive glass nanoparticles and its use in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Nov;106(8):2878-2887.
14. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2161-75.

15. Peitl, O.; Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 1995.
16. Ravagnani, C.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2003.
17. Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, Panzeri H, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *J Biomed Mater Res A*. 2007 Sep 1;82(3):545-57.
18. Fernandes KR, Magri AMP, Kido HW, Parisi JR, Assis L, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA, Martins VC, Plepis AM, Zanotto ED, Peitl O, Renno ACM. Biosilicate/PLGA osteogenic effects modulated by laser therapy: In vitro and in vivo studies. *J Photochem Photobiol B*. 2017 Aug;173:258-265.
19. Granito RN, Ribeiro DA, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Peitl-Filho O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Dec;20(12):2521-6.
20. Roriz VM, Rosa AL, Peitl O, Zanotto ED, Panzeri H, de Oliveira PT. Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Feb;21(2):148-55.
21. Granito RN, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Mochiuti D, Jorgetti V, Driusso P, Peitl O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011 Apr;97(1):139-47.
22. Matsumoto MA, Caviquioli G, Bigueti CC, Holgado Lde A, Saraiva PP, Rennó AC, Kawakami RY. A novel bioactive vitroceramic presents similar biological responses as autogenous bone grafts. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Jun;23(6):1447-56.
23. Azenha MR, de Lacerda SA, Marão HF, Filho OP, Filho OM. Evaluation of crystallized Biosilicate in the reconstruction of calvarial defects. *J Maxillofac Oral Surg*. 2015 Sep;14(3):659-65.
24. Vivian RR, Mecca CE, Bigueti CC, Rennó AC, Okamoto R, Cavenago BC, Duarte MH, Matsumoto MA. Experimental maxillary sinus augmentation using a highly bioactive glass ceramic. *J Mater Sci Mater Med*. 2016 Feb;27(2):41.
25. Gupta, R.;Kumar, A Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology *Biomedical materials* v.3, n.3, .1 1-15 2008
26. Palmer, Jason A., et al. "Macrophage phenotype in response to implanted synthetic scaffolds: an immunohistochemical study in the rat." *Cells Tissues Organs* 199.2-3 (2014): 169-183.

27. Siqueira, Renato Luiz, and Edgar Dutra Zanotto. "Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade." *Quim. Nova* 34.7 (2011): 1231-1241..
28. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 2011 Oct;32(28):6692-709.
29. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*. 2008 Apr;20(2):86-100.
30. Altieri DC, Mannucci PM, Capitanio AM. Binding of fibrinogen to human monocytes. *J Clin Invest*. 1986; 78(4):968-76.
31. Zaveri TD, Lewis JS, Dolgova NV, Clare-Salzler MJ, Keselowsky BG. Integrin-directed modulation of macrophage responses to biomaterials. *Biomaterials*. 2014 Apr;35(11):3504-15.
32. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 Jun;4(3):281-6.
33. Sridharan, Rukmani, et al. "Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles." *Materials Today* 18.6 (2015): 313-325.
34. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003 Feb;73(2):209-12.
35. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958-69.
36. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*. 2011 Jul 11;13:e23.
37. Xia Z, Triffitt JT. A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed Mater*. 2006 Mar;1(1):R1-9.
38. Moreno JL, Mikhailenko I, Tondravi MM, Keegan AD. IL-4 promotes the formation of multinucleated giant cells from macrophage precursors by a STAT6-dependent, homotypic mechanism: contribution of E-cadherin. *J Leukoc Biol*. 2007 Dec;82(6):1542-53.
39. Christo SN, Diener KR, Bachhuka A, Vasilev K, Hayball JD. Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or Foes. *Biomed Res Int*. 2015;2015:342304.
40. Trindade R, Albrektsson T, Wennerberg A. Current concepts for the biological basis of dental implants: foreign body equilibrium and osseointegration dynamics. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2015 May;27(2):175-83.

41. CROVACE, M. C.; SOUZA, M. T.; CHINAGLIA, C. R.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D. Biosilicate[®] – A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. *In vitro, in vivo* and clinical trials. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 432, n. 1, p. 90-110, 2016.
42. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (São Carlos, SP) / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (Ribeirão Preto, SP). RAVAGNANI, C.; PEITL, O.; LARA, E. H. G.; PANZERI, H.; ZANOTTO, E. D. Processo de preparação de biosilicatos particulados bioativos e reabsorvíveis, composições para preparar ditos biosilicatos, biosilicatos particulados bioativos e reabsorvíveis e uso dos mesmos no tratamento de afecções bucais. Patente (INPI), BR 0300644-1, 20 fev. 2003.
43. SIQUEIRA, R. L.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D. Gel-derived SiO₂-CaO-Na₂O- P₂O₅ bioactive powders: synthesis and *in vitro* bioactivity. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 5, p. 983-991, 2011.
44. SIQUEIRA, R. L.; ALANO, J. H.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D. *GlassPanacea*: A user-friendly free software tool for the formulation of glasses, glass-ceramics, and ceramics. **American Ceramic Society Bulletin**, v. 96, n. 01, p. 48-49, 2017.
45. Munerato, MS. Avaliação do reparo de defeitos ósseos em calvárias de ratos preenchidos com diferentes biomateriais e sua influência na qualidade do tecido ósseo neoformado. Análise microtomográfica e histológica. 2016. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biologia Oral, área de Concentração Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, SP.
46. LI, R.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. **Journal of Applied Biomaterials**, v. 2, n. 4, p. 231-239, 1991.
47. VALLET-REGÍ, M.; RANGEL, V. R.; SALINAS, A. J. Glasses with medical applications. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2003, n. 6, p. 1029-1042, 2003
48. VICHERY, C.; NEDELEC, J-M. Bioactive glass nanoparticles: from synthesis to materials design for biomedical applications. **Materials**, v. 9, n. 4, p. 1-17, 2016.
49. JONES, J. R.; EHRENFRIED, L. M.; HENCH, L. L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 7, p. 964-973, 2006.
50. JONES, J. R. New trends in bioactive scaffolds: the importance of nanostructure. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p. 1275-1281, 2009.
51. WU, C.; ZHOU, Y.; FAN, W.; HAN, P.; CHANG, J.; YUEN, J.; ZHANG, M.; XIAO, Y. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 33, n. 7, p. 2076-2085, 2012.
52. SUN, Jui-Sheng et al. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials**, v. 45, n. 4, p. 311-321, 1999.

53. HOTCHKISS, Kelly M.; CLARK, Nicholas M.; OLIVARES-NAVARRETE, Rene. Macrophage response to hydrophilic biomaterials regulates MSC recruitment and T-helper cell populations. *Biomaterials*, v. 182, p. 202-215, 2018.
54. Böstman O, Hirvensalo E, Mäkinen J, Rokkanen P. Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J Bone Joint Surg Br*. 1990 Jul;72(4):592-6.
55. Barbeck M, Motta A, Migliaresi C, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. Heterogeneity of biomaterial-induced multinucleated giant cells: Possible importance for the regeneration process? *J Biomed Mater Res A*. 2016 Feb;104(2):413-8.
56. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014 Apr;16(2):155-65.
57. Donath K, Laass M, Günzl HJ. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;420(2):131-7.
58. Ten Harkel B, Schoenmaker T, Picavet DI, Davison NL, de Vries TJ, Everts V. The Foreign Body Giant Cell Cannot Resorb Bone, But Dissolves Hydroxyapatite Like Osteoclasts. *PLoS One*. 2015 Oct 1;10(10):e0139564.
59. Miron, Richard J., et al. "Giant cells around bone biomaterials: Osteoclasts or multi-nucleated giant cells?." *Acta biomaterialia*46 (2016): 15-28.

ANEXO A



PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do reparo de defeitos críticos em calvária de ratos preenchidos com a vitrocerâmica Biosilicato® funcionalizada pelo processo sol-gel: análises histológica, imunohistoquímica e microtomografia computadorizada", protocolada sob o CEUA nº 2664030417, sob a responsabilidade de **Joel Ferreira Santiago Junior** e equipe: **Guilherme Abu Halawa Kudo; Marcelo Salles Munerato; Mariza Akemi Matsumoto; Raquel Barbosa Parra da Silva; Andreia Aparecida da Silva; Maira Couto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) na reunião de 26/04/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the repair of critical defects in calvary of rats filled with glass-ceramic Biosilicato® functionalized by the sol-gel process: histological analysis, immunohistochemistry and computerized microtomography", utilizing 40 Transgenics rats (40 males), protocol number CEUA 2664030417, under the responsibility of **Joel Ferreira Santiago Junior** and team; **Guilherme Abu Halawa Kudo; Marcelo Salles Munerato; Mariza Akemi Matsumoto; Raquel Barbosa Parra da Silva; Andreia Aparecida da Silva; Maira Couto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 04/26/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2017 a 06/2018

Área: Odontologia

Origem: Biotério Central

Espécie: Ratos transgênicos

sexo: Machos

idade: 12 a 15 semanas N: 40

Linhagem: Albinus Wistar (Rattus Norvegicus)

Peso: 250 a 300 g

Resumo: Os materiais vítreos podem ser processados por diferentes rotas, convencional por fusão e solidificação e por rota sol-gel, o que melhora sua bioatividade. O objetivo do presente estudo é o de avaliar o comportamento biológico da vitrocerâmica Biosilicato® sintetizada pelo processamento sol-gel durante o processo de reparo ósseo em modelo animal. Para tanto, serão utilizados 40 ratos Albinus Wistar, machos, com cerca de três meses e pesando em média 450 gramas. Os mesmos serão submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de dois defeitos nos ossos parietais direito e esquerdo e divididos em 2 grupos, de acordo com o biomaterial a ser estudado, como se segue: Grupo B5 [] defeitos preenchidos com Biosilicato® convencional, e Grupo B5s-g [] defeitos preenchidos com Biosilicato® produzido via sol-gel. Após os períodos de 3, 7, 21 e 45 dias, os animais serão submetidos à eutanásia e as calotas removidas. Os defeitos localizados nos ossos parietais do lado direito serão imediatamente imersos em formalina a 10% para posterior análises em microtomografia computadorizada e procedimentos histológicos para coloração com HE e Tricrômico de Goldner e técnica imunohistoquímica. Os defeitos do lado esquerdo serão imediatamente acondicionados em recipiente contendo nitrogênio líquido para posterior análise pela técnica Western Biot. Os dados obtidos serão submetidos à tratamento estatístico para confecção dos resultados.

Local do experimento: Biotério USC

Bauru, 07 de junho de 2017

Prof. Dra. Dulce Hefena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dra. Andréia Silva
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração

ANEXO B

Normas da revista: **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**

ISSN: 0957-4530 (print version) ISSN: 1573-4838 (electronic version).

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234–5.

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* 2000; <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

- Book chapter

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology.* London: Academic; 1980. pp. 251–306.

- Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects.* Royal Society of Chemistry. 1999. http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document. Accessed 15 Jan 1999.

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 3 kB)

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to

make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

GUIDANCE TO AUTHORS

- The typical length of the article is suggested to be 5 pages of text. However, shorter and longer articles will be considered for publication. An uninterrupted page of text contains approximately 1,300 words. A typical Article contains about 3,000 words of text supplemented by five small display items (figures and/or tables) including their figure caption/table descriptions. References are not included in the maximum 5 pages of text.

Article Structure: new category

- Every article is required to consist of the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, and Acknowledgments.
- Introduction: Offers background information and a statement of the author's hypothesis. An introduction usually describes the theoretical background, indicates why the work is important, states a specific research question, and poses a specific hypothesis to be tested.
- Materials and Methods: The methods section explains exactly how the authors performed the experiment. It describes both specific techniques and the overall experimental strategy used by the scientists.

Results:

- The results section contains the data collected during experimentation. It presents an objective view of the results using appropriate statistical analysis.
- Every article that contains statistical testing should clearly identify the name of the statistical evaluation, the n for each statistical analysis, the comparisons of interest, a justification for the use of that test, the alpha level for all tests, whether

the evaluations were one-tailed or two-tailed, and the actual P value for each test (not merely "significant" or " $P < 0.5$ ").

- **Discussion:** The discussion section explains the authors interpretation of their data and how they connect it to other published works in the field. Authors must use the discussion to describe what their work suggests and how it relates to other studies. In this section, authors can anticipate and address any possible objections to their work. The discussion section is also a place where authors can suggest areas of improvement for future research.
- **Conclusions:** The conclusion section summarizes the fundamental findings of the work in relation to the tested hypothesis and impact to the field of study.
- **Acknowledgments:** Acknowledgments are a brief statement at the end of the references and notes. It should comprise the following:
 - funding information pertinent to the performed work
 - Any clarification regarding conflicts of interest of the authors.
 - An optional note describing the roles or responsibilities of the authors or supporting staff.

ANEXO C



