



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

DEPARTAMENTO DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS E PRÓTESE

**HISKELL FRANCINE FERNANDES E OLIVEIRA**

**Avaliação dos efeitos de novas hidroxiapatitas e suas modificações  
superficiais utilizadas para regeneração óssea**

**Araçatuba**

2021

**HISKELL FRANCINE FERNANDES E OLIVEIRA**

**Avaliação dos efeitos de novas hidroxiapatitas e suas modificações  
superficiais utilizadas para regeneração óssea**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, para a obtenção do título de Doutora em Ciência Odontológica – Área de Concentração em Biomateriais.

Orientador: Prof. Associado Fellippo Ramos Verri

Coorientadora: Prof. Ass. Dra. Ana Paula Ramos

Coorientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

**Araçatuba**

2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48a Oliveira, Hiskell Francine Fernandes e.  
Avaliação dos efeitos de novas hidroxiapatitas e suas modificações superficiais utilizadas para regeneração óssea / Hiskell Francine Fernandes e Oliveira. - Araçatuba, 2021  
79 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Fellippo Ramos Verri

Coorientadora: Profa. Ana Paula Ramos

Coorientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

1. Nanopartículas 2. Substitutos ósseos 3. Osteoblastos  
4. Regeneração óssea I. T.

Black D15

CDD 617.695

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

## *Dados Curriculares*

### **Hiskell Francine Fernandes e Oliveira**

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Nascimento</b> | 22/01/1991 – Ipuã / São Paulo  |
| <b>Filiação</b>   | Amâncio de Oliveira<br>Helenice Fernandes e Oliveira   |
| <b>2010-2014</b>  | Graduação em Odontologia<br>Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP   |
| <b>2015-2017</b>  | Pós-graduação stricto sensu em Ciência Odontológica (Mestrado),<br>área de concentração em Biomateriais Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).  |
| <b>2017-2019</b>  | Pós-graduação lato sensu em Prótese Dentária (Especialização)<br>Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)  |
| <b>2017-2021</b>  | Pós-graduação stricto sensu em Ciência Odontológica (Doutorado),<br>área de concentração em Biomateriais Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). |

# *Dedicatória*

## *À Deus*

Primeiramente gostaria de dedicar e demonstrar a minha gratidão à Deus por me abençoar com mais esta conquista, por renovar a cada dia minha esperança e minha fé para continuar lutando por meus objetivos. Por me amparar nos momentos mais difíceis, me iluminar para ter sabedoria e discernimento nas decisões importantes, e por estar sempre presente em minhas orações, guiando para me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Gratidão ao Senhor, que tenho certeza que sem Sua benção nada disso seria possível.

## *A minha família*

Aos meus pais **Amâncio de Oliveira** e **Helenice Fernandes e Oliveira**, pelo amor incondicional à nossa família, por serem exemplos de determinação, caráter, honestidade e generosidade; por enfrentarem o mundo para presentear a mim e ao Rômulo com a oportunidade do estudo integral, por me apoiarem e viverem comigo todos os meus sonhos, as vezes deixando os de vocês de lado. Sou muito abençoada e grata por ser filha de vocês, e essa conquista não seria possível se eu não os tivesse ao meu lado. Amo vocês.

Ao meu irmão **Rômulo Luiz Fernandes e Oliveira**, meu primeiro e melhor amigo, admiro muito seu jeitinho clássico e peculiar de ser, obrigada por sempre estar ao meu lado, até brigando as vezes, sem você com certeza minha vida não seria completa, te amo.

Ao meu cãozinho **Toy**, meu anjinho de quatro patas, que é alegria e leveza nos meus dias, meu companheiro inseparável de todas as horas, impossível mensurar o sentimento que tenho por você. Te amo marronzinho.

Aos meus avôs maternos **Oswaldo Fernandes e Elza Fernandes** (in memorian), são minhas estrelas guias, minha maior saudade, eu sei que ai desse lugar lindo que vocês estão, nunca deixaram de olhar por mim e me proteger. Aos avôs paternos **Margarida Nardi** e **Deoclides de Oliveira**, obrigada por serem sempre presentes e especiais na minha vida. Amo vocês.

Ao meu namorado **Rodrigo Capalbo da Silva**, que sorte a minha ter meu melhor amigo e meu amor na mesma pessoa, com certeza sem você ao meu lado a caminhada teria sido mais árdua. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por segurar minhas mãos nos momentos difíceis e por estar sempre na primeira fila me aplaudindo, torcendo por mim e apoiando meus sonhos. Me faltam palavras pra te agradecer e demonstrar meu amor por você, te amo.

# *Agradecimentos*

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP representado pelo seu coordenador **Prof. Ass. Juliano Pelim Pessan**, pela competência e qualidade na condução do programa de pós-graduação.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)**, por ter concedido a minha bolsa de doutorado (Processo [141960/2019-1]) e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** por ter fomentado meu maior sonho, que era o de fazer pesquisa no exterior, mesmo que por um pequeno espaço de tempo, por meio da bolsa estágio de pesquisa no exterior (Processo 88887.467272/2019-00).

Agradeço a empresa **DSP biomedical**, em nome do senhor William por nos ter cedido trefinas cirúrgicas para o ensaio experimental in vivo. Ao **IPEN-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, pela disponibilidade do seu Irradiador Multipropósito de Cobalto – 60, para esterilização por radiação gama das nossas partículas.

Ao meu orientador **Prof. Ass. Fellippo Ramos Verri**, por ter me aceitado como aluna desde 2012 na iniciação científica, aberto as portas e oportunidades pra mim desde então no curso de mestrado, especialização, estágio no exterior e doutorado. Sou muito grata pela liberdade que o senhor sempre nos deu para escolher quais caminhos trilhar, com o seu apoio e orientação. Obrigada pela paciência, por sempre me apoiar no desenvolvimento científico e clínico. Obrigada pelo tratamento odontológico que o senhor proporcionou aos meus pais na disciplina de Reabilitação oral, admiro muito sua competência, determinação e caráter. Agradeço também a sua esposa **Ana Caroline Gonçalves Verri**, pelo carinho e por participar sempre ativamente na nossa orientação.

Ao meu coorientador **Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**, sou grata por ter aceito me coorientar nessa pesquisa, pela disponibilidade, carinho e amizade. Por ter nos cedido grande parte do material durante a cirurgia dos animais. Gostaria de aproveitar para agradecer seu orientado e meu amigo **William Phillip Pereira da Silva**, pela

amizade, parceria, por ter participado ativamente da cirurgia dos animais, operado com todo carinho para nós, transferido seus conhecimentos, sou muito grata pela sua amizade will.

A minha coorientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ramos**, por abrir as portas do seu laboratório pra mim, contribuindo com todo seu conhecimento, e abraçar esta pesquisa com toda sua equipe. Aproveito para agradecer a sua equipe que me recebeu sempre de braços abertos, nos tornamos amigos e me ensinaram muito sobre química e usos do laboratório; agradeço ao **Marcos Antônio Eufrásio Cruz**, verdadeiro amigo, parceiro, que pegou na minha mão para me ensinar tudo que aprendi nesse estágio em Ribeirão Preto e a distância também, ao **Lucas Fabrício Bahia Nogueira** e a **Larissa Tomazella**, por serem sempre solícitos e amigos queridos pacientemente não mediram esforços para me auxiliar, sou muito grata a vocês e desejo todo sucesso do mundo. Agradeço também ao **Prof. Tit. Pietro Ciancaglini**, parceiro da prof<sup>a</sup> Ana, que disponibilizou seu laboratório para nosso cultivo celular.

To **Prof Owen Addison**, thank you for hosting and supporting me during my quick period of sandwich PhD in London, to open your lab at King's College London for me, and also helping me win a grant from Royal Society to try to return to London. I have no words to show my gratitude for the opportunity to make part of my dream come true.

A **Prof<sup>a</sup>. Ass. Roberta Okamoto**, obrigada por me acolher no momento em que eu estava pensando até em mudar de projeto, por melhorar o delineamento da nossa pesquisa, por colaborar com várias análises presentes nesse estudo, admiro muito você e sua carreira, você é um exemplo de pesquisadora. Sou muito grata por você ter participado do meu exame geral de qualificação e agora como banca da minha defesa, muito obrigada professora. Agradeço também a ajuda do seu aluno de Pós-doutorado **Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira**, por me orientar nas análises de cortes calcificados, obrigada pela por sempre ceder um pouco do seu tempo para me ensinar e ajudar, todo sucesso do mundo pra você.

Ao **Prof. Tit. Márcio Mateus Beloti**, primeiramente obrigada por ter aceito o convite para participar da minha banca examinadora. Por ter aberto as portas das disciplinas da pós-graduação de biologia oral durante meu “sanduiche” em Ribeirão, sou muito grata por ter tido a oportunidade de conhecer você e o prof **Adalberto Luiz Rosa**, que são renomados pesquisadores e excelentes pessoas, participar da disciplina de vocês me engrandeceu muito pesquisadora, fez pensar fora da “caixinha”, obrigada pela disponibilidade, gentileza e carinho.

A **Profª. Ass. Débora Barros Barbosa**, obrigada profa por ter aceitado o convite para minha banca examinadora, desde a graduação sempre te admirei como professora, e ao entrar na pós e conhecê-la melhor, como pesquisadora e como pessoa. Você é um exemplo de vitória do espaço das mulheres na ciência, obrigada por estar sempre disposta a ajudar, incentivar e enaltecer nossas pesquisas.

Ao **Prof. Dr. Cleidiel Aparecido Araújo Lemos**, é uma honra ter você, que foi meu amigo de pós-graduação, neste dia tão especial, como professor da minha banca examinadora. Obrigada pela amizade, pelo empenho em nos ajudar a sempre ser melhores, pelos puxões de orelha acadêmicos e ombro amigo na salinha do chefe. Admiro muito você e sua trajetória excepcional, conte sempre comigo amigo.

Ao **Prof. Ass. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, por disponibilizar os equipamentos do laboratório de endodontia para que eu pudesse realizar grande parte desta pesquisa, também pelo auxílio em todos os momentos oportunos durante sua gestão como coordenador do programa.

A **Profª. Tit. Sandra Helena Penha de Oliveira**, por ter se tornado minha grande amiga durante esse período de estudos e viagens, e por ser exemplo de mulher e pesquisadora para todos nós. Você é uma inspiração para mim, te admiro muito e amo você. Muito obrigada por disponibilizar seu laboratório para obtenção dos meus resultados, agradeço também seu aluno **Victor Balera Brito**, pelo carinho e disponibilidade.

A **Profa. Ass. Ana Paula Farnezi Bassi**, pelo carinho e todos os conhecimentos compartilhados, por ser um exemplo de pessoa e profissional. Ao seu aluno **Vinicius Ferreira Bizelli** pela disponibilidade em ajudar no finalzinho dessa pesquisa, sou muito grata.

Gostaria de agradecer imensamente a três grandes amigos que fazem parte da minha vida pessoal e acadêmica; ao **Renan Dal Fabbro**, meu amigo desde os primeiros dias de aulas da graduação em 2010, trilhamos juntos essa grande jornada acadêmica até agora, sou muito grata pela sua amizade, sempre foi essencial na minha vida, e eu não tenho palavras pra agradecer sua participação na minha pesquisa de doutorado, com certeza sem sua ajuda e ensinamentos tudo seria mais difícil. Ao **Leopoldo Cosme Silva**, relação que começou de uma competição acirrada pela bolsa de doutorado, e que Deus me presenteou com uma bela e grande amizade, muito obrigada pela parceria, e também por toda ajuda na minha pesquisa. À **Letícia Cabrera Capalbo**, amiga querida de todas as horas que me acompanhou em todos os momentos dentro e fora da pós, sempre com palavras doces

e acolhedoras, obrigada por ser ombro amigo e abraço quentinho em todas as horas, agradeço por sempre me permitir fazer parte da sua família linda. Amo vocês, que vocês almejem todo sucesso do mundo, sempre estarei torcendo por vocês.

**João Pedro Justino de Oliveira Limírio**, obrigada pela sua amizade sincera, verdadeira e necessária de todas as horas, por ser meu ponto de equilíbrio quando tudo parece desabar, você é luz nos meus dias mais lindos e mais cinzentos. Sou infinitamente grata por ter sua amizade mineira, gêmeos de sotaque e de costumes, quando eu botei meus olhinhos em você entrando no departamento, tinha certeza que seríamos grandes amigos, você é uma pessoa muito especial na vida de todos que te cercam, te amo.

**Jessica Marcela de Luna Gomes**, ai amiga, foram tantas batalhas juntas desde que você chegou na pós-graduação, mas nossa união com certeza nos fez mais fortes, sou muito grata por sua amizade, carinho e cuidado, sei que sempre poderemos contar uma com a outra, amo você.

Ao meu amigo querido e conterrâneo **Henrique Hadad**, nossa amizade começou através do Rodrigo, e quando vi você já era meu amigo querido e inseparável, obrigada por se fazer sempre presente, por não medir esforços para ajudar, por tornar sua família tão próxima e querida. Você foi essencial no desenvolvimento da minha pesquisa, muito obrigada por ter se disposto a reincluir todos os meus 150 blocos de calvaria comigo, por me ensinar tudo que sabe, com certeza você será um grande orientador, te amo.

**Fernanda Costa Yogui**, obrigada por ter entrado no mestrado como aluna do prof Fellippo, por construirmos uma bela amizade, por ser essencial companheira de pesquisa, de cuidar dos nossos animas, de análises, e de todas as horas, sua presença e dedicação sempre me motivaram muito e facilitaram muito o decorrer das nossas pesquisas, que andaram juntinhas como nós. Sou muito grata pela sua amizade ferzinha, sinto muita saudade de você no dia a dia, amo você.

**Barbara Ribeiro Rios**, minha amiga, que topou uma grande empreitada que foi ser aluna de IC da minha pesquisa, estudiosa, dedicada, conseguiu uma bolsa **FAPESP**, que também foi essencial para o financiamento das nossas análises. Obrigada por confiar em mim, por se dedicar tanto a esta pesquisa e por caminhar junto comigo.

**Ronaldo Silva Cruz**, gostaria de agradecer em especial a você pela amizade e parceria durante todo período de nossa pós, mestrado e doutorado que iniciamos sempre juntos, você é merecedor de todo sucesso do mundo, te admiro muito pela sua garra e humildade. Conte sempre comigo amigo.

Ao **Prof. Dr. Victor Eduardo de Souza Batista**, também meu amigo querido que esteve presente desde o início da minha IC, obrigada por ser sempre alegre e brincalhão em todos os momentos, por nunca medir esforços pra ajudar e pelas palavras amigas, sou muito grata pela sua amizade, admiro muito sua trajetória.

A **Profa Dra. Carolina dos Santos Santinoni**, obrigada pela amizade e por todo carinho que tem por mim, que é recíproco, pelas escritas científicas dos nossos artigos, e por toda paciência durante os ensinamentos, te admiro muito como pessoa, professora e pesquisadora.

Ao **Prof. Tit. Eduardo Piza Pellizzer**, pela amizade e acolhimento. Quando conheci o senhor na graduação, morria de medo de falar com você, ai logo que entrei no mestrado e começamos ter contato diário, percebi o quão enorme é seu coração e construímos um carinho enorme um pelo outro. Obrigada por ser tão querido, por todas as oportunidades que o senhor abriu pra mim e por sempre fazer questão da minha presença junto aos seus orientados, estará sempre no meu coração.

A minha tia **Maria Alice de Oliveira** e minha prima **Cláudia de Oliveira**, por me receberem de braços abertos na casa delas em Ribeirão Preto, durante quase 6 meses do meu doutorado sanduíche na USP. Amo muito vocês e sou muito grata pelo carinho que tem por mim.

A família do Rodrigo; **Jorge Viera, Erica Capalbo e Rafael Capalbo**, por me acolherem e sempre cuidarem tão bem de mim, tenho muita sorte de ter vocês por perto, agradeço também a toda Família Capalbo que eu amo conviver.

As minhas amigas de infância que eu conheci em Londres, **Silvia Mesquita e Lilian Carvalho**, durante nosso doutorado sanduíche, construímos uma rede de apoio enorme e uma amizade indescritível, e desde então vocês se tornaram pessoas essenciais no meu dia a dia. Obrigada por compartilharem comigo as conquistas e as dores que foram esse período, vocês são pessoas incríveis que eu quero pra sempre na minha vida, amo vocês.

A minha prima **Lucineia Costa** e ao **Marcílio Vazzoler**, minha família londrina, foram essenciais na minha recepção em Londres, obrigada por terem me acolhido e cuidado tão carinhosamente de mim, sem vocês por perto com certeza Londres teria sido mais cinza, saudade de vocês e de todas as nossas aventuras pela cidade.

A **Gabriela Baesteiro Baldessim**, amizade que dividia a vida e o dia a dia comigo, podemos passar dias ou semanas sem nos falar e quando nos encontramos é tudo

igualzinho sempre foi, a mesma e incrível sintonia, tenho certeza que nossa amizade é de outras vidas, obrigada por cuidar tão bem do Toy, te amo.

A **Jéssica Antonini Troiano**, que hoje divide apartamento comigo e também se tornou uma amiga muito querida e especial, muito obrigada pelo carinho e reciprocidade.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – **Magda Requena, Marco Borges, Daléte Cobo, Jander de Carvalho Inácio, Eduardo Rodrigues Cobo e Carlos Alberto Gonçalves** pela amizade, paciência, e toda ajuda necessária a mim prestada durante o mestrado e doutorado.

Aos funcionários da Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Lillian Sayuri Mada e Cristiane Regina Lui Matos**, pela eficiência e profissionalismo.

Ao senhor **João Batista Alves Correia**, que sempre esteve presente e disposto a ajudar, sua contribuição foi essencial. Aos senhores **Marcos Ianner e Paulo**, técnicos do prédio 5 também sempre dispostos a ajudar e ensinar no processamento laboratorial.

Finalizo agradecendo aos professores do departamento **Humberto Gennari Filho, Paulo Renato Junqueira Zuim, Aimee Maria Guiotti, Karina Helga Turcio de Carvalho, Adriana Zavanelli, José Vitor Mazaro, Daniela Micheline dos Santos, Aldiéris Alves Pesqueira, Marcelo Coelho Goiato, Maria Cristina Rosifini Alves Rezende, Paulo Henrique dos Santos e Wirley Gonçalves Assunção**, que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da minha formação, agradeço pelo carinho, atenção, amizade e convívio por esses anos todos.

## *Epígrafe*

*Coincidências são pequenos milagres onde Deus  
prefere não aparecer*  
Provérbio Árabe

Oliveira, HFF. **Avaliação dos efeitos de novas hidroxiapatitas e suas modificações superficiais utilizadas para regeneração óssea** . 79 f. 2021. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

## **Resumo**

O objetivo deste estudo foi sintetizar um substituto ósseo a base de Hidroxiapatita (HAp), modificá-lo superficialmente com hexametáfosfato (HMP) e colágeno tipo I (COL) e analisar o comportamento *in vitro* e *in vivo*. A síntese de HAp foi realizada pelo método de coprecipitação controlada a partir de  $H_3PO_4$ ,  $CaCl_2$  e  $NH_4OH$ . Após processamento foram realizadas as modificações superficiais em soluções de HMP e COL. As partículas de hidroxiapatita e suas modificações foram caracterizadas através das técnicas de potencial-zeta ( $\zeta$ ), tamanho de partícula, espectroscopia de infravermelho com transformada Fourier (FTIR) e difração de raios X (DRX), as quais evidenciaram alta semelhança química com a HAp biológica. A morfologia foi avaliada através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual mostrou que as nanopartículas de HAp obtidas possuíam aproximadamente 130 nm, pode ser visualizada uma película recobrando as superfícies modificadas com HMP e COL. Foi realizada cultura de células MC3T3, com análises de MTT, ALP e nódulos de mineralização. Nas análises *in vivo*, foram realizados defeitos críticos em calvaria de 150 ratos, divididos em 5 grupos (GC:autógeno; G1:HAp; G2:HMP; G3:COL; G4:BioOss) e submetidos a eutanásia após 7,14,30,60 dias. Os espécimes foram avaliados em cortes calcificados MicroCt e confocal, apresentando fechamento do defeito e formação óssea significativa em G1,G3 e G4. Portanto conclui-se que G1 e G3 apresentaram comportamento favorável e viável na neoformação óssea comparado ao G4 substituto ósseo comercialmente disponível, tornando-se uma futura alternativa para regeneração óssea.

**Descritores:** Nanopartículas, Substitutos ósseos, Osteoblastos, Regeneração óssea

Oliveira, HFF. **Evaluation effects of new hydroxyapatites and their surface modifications used for bone regeneration.** 79 f. 2021. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

### **Abstract**

The aim of this study was to synthesize a bone substitute based on Hydroxyapatite (HAp), superficially modify it with hexametaphosphate (HMP) and collagen type I (COL) and analyze its behavior in vitro and in vivo. The synthesis of HAp was carried out by the controlled co-precipitation method from  $H_3PO_4$ ,  $CaCl_2$  and  $NH_4OH$ . After processing, surface modifications were performed in HMP and COL solutions. HAp particles and their modifications were characterized using the techniques of zeta-potential ( $\zeta$ ), particle size, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD), which showed high chemical similarity with the Biological HAp. The morphology was evaluated using the technique of scanning electron microscopy (SEM), which showed that the HAp nanoparticles obtained had approximately 130 nm, a film covering the modified surfaces with HMP and COL can be visualized. Culture of MC3T3 cells was performed with analysis of MTT, ALP and mineralization nodules. In the in vivo analysis, critical calvarian defects were performed in 150 rats, divided into 5 groups (GC:autogenous bone; G1:HAp; G2:HMP; G3:COL; G4:BioOss) and euthanized after 7,14,30,60 days. The specimens were evaluated in calcified MicroCt and confocal sections, showing defect closure and significant bone formation in G1,G3 and G4. Therefore, it is concluded that G1 and G3 presented favorable and viable behavior in bone neoformation compared to the commercially available G4 bone substitute, becoming a future alternative for bone regeneration.

**Key-words:** Nanoparticles, Bone substitutes, Osteoblasts, Bone regeneration

## *Lista de Figuras*

|                    |  |           |
|--------------------|--|-----------|
| <b>Figura 1 -</b>  | Síntese e modificações superficiais de HAp                                   | <b>21</b> |
| <b>Figura 2 -</b>  | Representação esquemática dos grupos e tempos experimentais                  | <b>25</b> |
| <b>Figura 3 -</b>  | Representação esquemática das referências do defeito crítico                 | <b>26</b> |
| <b>Figura 4a-</b>  | Representação dos procedimentos executados nas cirurgias experimentais       | <b>27</b> |
| <b>Figura 4b -</b> | Representação dos procedimentos executados nas cirurgias experimentais       | <b>27</b> |
| <b>Figura 5 -</b>  | Representação dos procedimentos executados na cirurgia para teste subcutâneo | <b>28</b> |
| <b>Figura 6 -</b>  | Gráfico de difração de raio -X piloto  | <b>33</b> |
| <b>Figura 7 -</b>  | Gráfico de difração de raio -X experimental                                  | <b>34</b> |
| <b>Figura 8 -</b>  | Gráfico de FTIR  | <b>34</b> |
| <b>Figura 9 -</b>  | Gráficos representativos das respectivas medidas de potenciais-zetas         | <b>37</b> |
| <b>Figura 10 -</b> | Titulação de potencial-zeta em função do pH das amostras                     | <b>38</b> |
| <b>Figura 11 -</b> | EDS das partículas   | <b>40</b> |
| <b>Figura 12 -</b> | Microscopia eletrônica de varredura  | <b>42</b> |
| <b>Figura 13 -</b> | Culturas de célula (MTT) e (ALP)   | <b>43</b> |
| <b>Figura 14 -</b> | Nódulos de mineralização   | <b>43</b> |
| <b>Figura 15 -</b> | microscopia confocal dos osteoblastos após 72h                               | <b>44</b> |
| <b>Figura 16 -</b> | Resultado subcutâneo H&E   | <b>44</b> |
| <b>Figura 17 -</b> | Reconstrução das imagens de MicroCt das calvárias                            | <b>45</b> |
| <b>Figura 18 -</b> | Gráficos representativos das análises de MicroCt                             | <b>47</b> |
| <b>Figura 19 -</b> | Reconstrução das imagens de microscopia confocal a laser                     | <b>48</b> |
| <b>Figura 20 -</b> | Gráfico representando a microscopia confocal a laser                         | <b>48</b> |
| <b>Figura 21 -</b> | H&E das lâminas histológicas   | <b>51</b> |
| <b>Figura 22 -</b> | Gráfico representativo da análise de H&E                                     | <b>52</b> |
| <b>Figura 23 -</b> | Lâminas com a coloração estevenel blue e vermelho de alizarina               | <b>52</b> |
| <b>Tabela 1 -</b>  | Tamanho das partículas   | <b>35</b> |
| <b>Tabela 2 -</b>  | Potencial Zeta das partículas  | <b>36</b> |

## *Lista de abreviaturas*

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>HAp</b>                         | Hidroxiapatita  |
| <b>HMP -</b>                       | Hexametáfosfato   |
| <b>COL</b>                         | Colágeno tipo I   |
| <b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b> | Ácido Fosfórico   |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>            | Cloreto de Cálcio   |
| <b>NH<sub>4</sub>OH</b>            | Hidróxido de amônia                                       |
| <b>FTIR</b>                        | Espectroscopia de infravermelho com transformada Fourier  |
| <b>DRX</b>                         | Difração de Raios X                                       |
| <b>MEV</b>                         | Microscopia Eletrônica de varredura                       |
| <b>COD</b>                         | Crystallography Open Database                             |
| <b>EDS</b>                         | Espectroscopia de energia dispersiva por raios-X          |
| <b>MTT</b>                         | 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium |
| <b>ALP</b>                         | Fosfatase Alcalina  |

# *Sumário*

|                               |  |           |
|-------------------------------|--|-----------|
| <b>Introdução</b>             |  | <b>17</b> |
| <b>Proposição</b>             |  | <b>19</b> |
| <b>Materiais e métodos</b>    |  | <b>19</b> |
| <b>Resultados e Discussão</b> |  | <b>33</b> |
| <b>Conclusão</b>              |  | <b>55</b> |
| <b>Referências</b>            |  | <b>56</b> |
| <b>Anexo A</b>                | Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA)                      | <b>64</b> |
| <b>Anexo B</b>                | Author Guidelines for Publishing in archives of oral biology | <b>65</b> |

## 1. Introdução

Biomateriais tem sido amplamente utilizados na odontologia como substitutos ósseos, em defeitos ósseos causados por trauma, doenças periodontais e durante a instalação de implantes osseointegrados. (Mazok et al., 2004) Ao longo dos anos com o avanço da tecnologia e melhor entendimento da biologia, foram evoluindo; porém questionamentos quanto ao seu potencial osteoindutivo e osteocondutivo são discutidos (Miron et al., 2016), mantendo assim o enxerto autógeno como padrão ouro na regeneração óssea, devido a excelente combinação dos três fatores importantes para a osseointegração: a osteocondução, a osteoindução e osteogenese, que são importantes para a promover a formação óssea. (Mazok et al., 2004, Miron et al., 2011, Miron et al., 2016).

Apesar das vantagens oferecidas na regeneração óssea, o enxerto autógeno apresenta algumas desvantagens principalmente relacionados à sua obtenção, como por exemplo a necessidade de um segundo sítio cirúrgico, morbidade pós-operatória e complicações durante o procedimento (Nkenke et al., 2004; Mazok et al., 2004; Al-Nawas et al., 2014; Gali et al., 2017). Portanto substitutos de diferentes origens como alógenos, xenógenos e enxertos ósseos sintéticos são investigados e desenvolvidos pela engenharia tecidual como alternativa ao exerto autógeno, incluindo cerâmicas, proteínas colágenas e não colágenas, vidros bioativos e polímeros biodegradáveis (Muzio et al, 2015; Gali et al., 2017).

Neste contexto, a utilização de substitutos ósseos tal como a hidroxiapatita, tem sido amplamente discutida na literatura com excelentes propriedades osteocondutoras (Lohmann et al., 2017). A hidroxiapatita apresenta destaque por ser o biomaterial mais utilizado para produzir revestimentos ósseos, uma vez que é um composto inorgânico encontrado em vários tecidos mineralizados, obtendo assim resultados que sobressaem aos outros biomateriais. (Cruz et al., 2016) Entretanto, em função de características como a reabsorção lenta e a sua fragilidade em meio biológico (Gali et al., 2017; Morisue et al., 2006; Al-Nawas et al., 2014), ainda se fazem necessárias novas investigações para o desenvolvimento da melhoria das propriedades osteocondutoras para aproximar o seu potencial de formação óssea ao enxerto autógeno (Miron et al., 2016, Lambert et al., 2016; Lohmann et al., 2017).

A hidroxiapatita (HAp) de origem bovina em sua forma inorgânica é frequentemente utilizada, sendo considerada a principal alternativa ao exerto ósseo

autógeno em efetividade e biocompatibilidade, como substituto ósseo em tratamentos onde regenerações ósseas se fazem necessárias (Jensen et al., 2013; Lambert et al., 2016; Cordaro et al., 2008; Trubiani et al., 2010). Estudos comparando diferentes tipos de HAps, de diferentes origens (natural e sintética), demonstraram melhor efetividade pelo uso da forma comercial “Bio-Oss” quando comparada a outros tipos de substitutos ósseos, evidenciando em estudos “*in vitro*” (Trubaine et al., 2010) e “*in vivo*” o maior contato da HAp com o osso natural e melhores propriedades osteocondutoras (Orsini et al., 2005; Lambert et al., 2016). Porém, este substituto comercialmente disponível apresenta de custo elevado, impossibilitando o uso em algumas situações clínicas devido ao poder socioeconômico de alguns países.

Assim, substitutos nacionais têm sido desenvolvidos objetivando a redução dos custos em relação ao produto tido como a principal referência internacional em reconstruções ósseas, e que apresentem propriedades semelhantes. A utilização de substitutos nacionais economicamente mais viáveis e com a mesma efetividade poderiam viabilizar a execução de mais procedimentos regenerativos e, por consequência, melhoria dos fatores bucais associados à reabilitação oral da população brasileira, trazendo uma maior previsibilidade a estes tratamentos.

A incorporação de nanopartículas aos materiais gera grandes expectativas na comunidade científica e clínica, com objetivo de melhorar as propriedades de um material, como por exemplo a modificação de superfície de implantes melhorando o processo da osseointegração (Rosales-Leal et al., 2010), ou em dentifrícios para diminuir o potencial de desmineralização e aumentar o potencial de remineralização dos tecidos dentais, obtendo resultados satisfatórios (da Camara et al. 2014, da Camara et al. 2015). Dentre estas nanopartículas o hexametáfosfato (HMP) tem se destacado, sendo um fosfato cíclico inorgânico, este composto apresenta alta afinidade e se liga a íons como  $\text{Ca}^{2+}$ , formando  $\text{HMP-Ca}^{2+}$  no esmalte (Kulaev et al., 2005). Em estudos *in vivo*, os polifosfatos mostraram um potencial aumento na neoformação óssea (Bae et al., 2016). Por sua vez, o colágeno tipo I, uma proteína, é um dos principais constituintes da matriz extracelular do tecido ósseo, facilitando a ação de fatores de crescimento, a migração de osteoblastos e células sanguíneas, promovendo angiogênese e neoformação óssea (Salamanca et al., 2018; Tovani et al., 2016).

Portanto, tendo em vista a necessidade de melhorar as propriedades osteocondutoras dos substitutos ósseos atrelados aos resultados encorajadores do comportamento biológico e potencial reparador do tecido ósseo das nanopartículas,

realizou-se a produção de nanopartículas de hidroxiapatita modificadas com HMP e colágeno tipo I. É razoável se esperar que possa haver uma correlação positiva entre o uso do HMP de sódio e Col na disponibilidade celular de compostos para a formação óssea, por conseguinte, haja maior e/ou melhor formação de hidroxiapatita orgânica, melhorando assim a regeneração óssea local.

## **2. Proposição**

O objetivo deste trabalho foi realizar a síntese e caracterização de um biomaterial a base de hidroxiapatita (HAp) e sua posterior modificação superficial com nanopartículas de HMP e colágeno tipo I; e avaliar seu potencial através de testes de comportamento *in vitro* (por meio de cultura de células pré-osteoblásticas) e *in vivo*.

## **3. Materiais e Métodos**

Este estudo foi dividido em duas etapas, sendo na primeira etapa realizado testes *in vitro* em colaboração com a Profa. Dra. Ana Paula Ramos para síntese da hidroxiapatita e suas modificações superficiais, e o grupo do Prof. Dr. Pietro Ciancaglini (DQ-FFCLRP/USP) para os testes em cultura de células de osteoblastos. E na segunda etapa foram realizados testes *in vivo* em defeitos críticos de calvária de ratos, que foram desenvolvidos na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, em colaboração do Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani (Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada), coorientador da pesquisa e da Profa. Ass. Roberta Okamoto (Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada).

### **3.1.1. Síntese das nanopartículas de Hidroxiapatita (HAp)**

Diferentes métodos são descritos na literatura para o preparo de nanopartículas de HAp, dentre eles o método de coprecipitação a partir de soluções contendo fosfatos de cálcio em meio básico é o mais citado (Costa ACFM 2009, Bigi A 2007). Neste projeto foram utilizados como precursores polifosfato de sódio e soluções contendo ácido fosfórico, cloreto de cálcio e hidróxido de amônio utilizando-se o método de coprecipitação controlada.

A síntese de HAp foi realizada a partir de soluções com as concentrações calculadas semelhantes as encontradas na HAp ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}$ ) do tecido ósseo humano, divididas em diferentes etapas de processamento.

(1) Preparação das soluções: em um balão volumétrico foi preparado 50 mL de uma solução aquosa contendo 0,743g de  $\text{CaCl}_2$  dissolvido [0,1 mol/L], no segundo balão preparou-se 50mL de solução aquosa contendo 156  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  [0,06 mol/L], e em 250mL de solução aquosa foi acrescentado 8,9mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  [0,5 mol/L].

(2) Síntese: as soluções preparadas previamente foram colocadas na seguinte ordem  $\text{CaCl}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{OH}$  em um Becker sob agitação de 22000rpm/1min com um Ultra Turrax<sup>®</sup> IKA T18 Basic, durante 5 minutos para precipitação rápida das partículas de HAp. Após precipitadas elas são deixadas em agitação durante 30 minutos, o pH da solução é de 6,67.

(3) Preparo da HAp: nesta etapa a solução com HAp foi deixada para decantação da solução das partículas, então foi removido o sobrenadante e a solução foi colocada para centrifugação de 7000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação foi realizada lavagem do pellet com água Milli-Q<sup>®</sup>, e secagem com acetona, a solução foi colocada em placas de petri e secadas em estufa a 40°C por 10 horas.

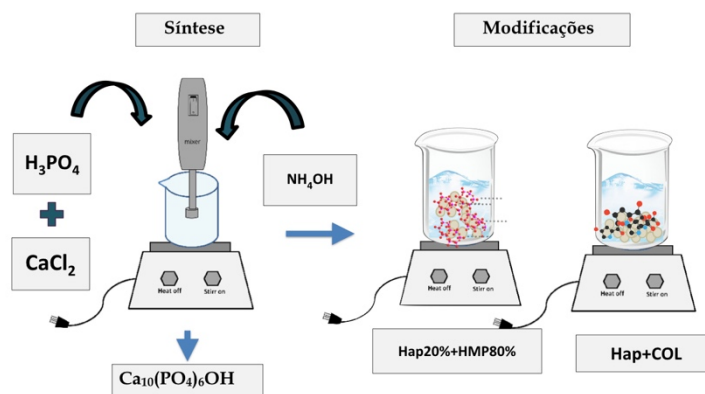
(4) Armazenamento das partículas: cada síntese produz aproximadamente 0,5g de partículas com característica de grânulos de HAp, que foram divididas e individualizadas em 0,05g por ependorf, para posteriormente serem esterilizadas por radiação Gama (25kGy) para o armazenamento e utilização nos experimentos *in vitro* e *in vivo*

### 3.1.2. Modificação superficial de HAp

(1) HMP: Foram imersas 20% (p/V) de HAp em 80% (p/V) de solução de HMP (Sodium hexametaphosphate, 65-70%  $\text{P}_2\text{O}_5$  basis- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), e mantidas sob agitação por 72 horas para a modificação superficial. A solução foi filtrada e seca em estufa. Partículas recobertas superficialmente com HMP foram produzidas, e apresentaram grânulos mais refinados como a característica do HMP.

(2) Col: foi realizada extração de colágeno tipo I de tendões de rabos de ratos seguindo o protocolo da metodologia utilizada por Rajan N et al., . 2006. Após a extração do Col, o mesmo foi armazenado em solução de ácido acético 0,5 mol/L com concentração de 10 mg/mL. Portanto foi preparada em um becker uma solução de 10 mL de Col para 100 mL de água ultra pura +3,5g de HAp, a solução foi deixada sob agitação

durante 12 horas, conforme o estudo de Tovani et al., . 2016. A solução de H<sub>2</sub>O+Col apresentava valor de pH: 4,47, acrescida de HAp, o pH inicial: 6,15 e final: 5,97. Em seguida, a solução foi centrifugada em 7000 rpm durante 5 minutos, lavadas com água e secas em estufa a 25°C para evitar que o Col fosse degradado. Também foram pesadas e armazenadas em ependorfs para esterilização. Como pode ser observado na figura 1.



**Figura1:** Síntese e modificações superficiais de HAp

Após a síntese e modificação superficial das partículas, as mesmas foram armazenadas como citado anteriormente, dosadas em 0,05g por ependorf, embaladas e identificadas. Proseguiu-se com a esterilização das amostras que foi realizada por radiação gamma em colaboração com o IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- São Paulo –SP), a partir de um Irradiador Multipropósito de Cobalto -60 (Centro de Tecnologia das Radiações – CTR/IPEN/CNEN/SP), em uma frequência de 25kGy, que é a quantidade de radiação descrita na literatura para esterilização de biomateriais a base de apatitas (Nguyen H et al., 2007).

### 3.1.3. Caracterização físico-química das partículas de HAp e HAp modificadas superficialmente

As partículas foram caracterizadas com relação à sua composição por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos através da utilização de um espectrofotômetro de infravermelho (IR-Prestige 21 Shimadzu) (Laboratório de Atividade Biológica e Química Supramolecular de Compostos de Coordenação-DQ-FFCLRP).

Também foram caracterizadas com relação a cristalinidade das partículas por meio de difração de raios-X (DRX) com um difratômetro (Bruker-AXS D5005 - DQ/FFCLRP), tendo como fonte um tubo selado de Cu (2,2kW), com um filtro

monocromador de níquel cuja radiação gerada possui  $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ . Padrões de difração das fases cristalinas em estudo foram obtidos usando o banco de dados Crystallography Open Database (COD)(Downs & Hall-Wallace 2003).

As medidas em relação ao tamanho e potencial zeta, que mede a estabilidade eletrostática da partícula, foram avaliadas por espelhamento dinâmico de luz utilizando um ZetaSizer Nano ZS-Malvern (Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Coloides- FFCLRP/USP). Além disso, faz-se necessário mensurar o ponto isoelétrico da nanopartícula de HAp e suas modificações superficiais, para isso a partícula foi solubilizada em água e em diferentes valores de pH através de um titulador automático MPT-2 acoplado ao ZetaSizer.

A quantificação de Ca e P foi obtida pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva por raios-X (EDS) , e calculada a razão Ca/P em um equipamento IXRF system 500 Digital Processing acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) Carl Zeiss EVO 50 (DQ-FFCLRP). Por se tratar de material biológico as amostras de partículas foram metalizadas e recobertas por um fino filme de ouro formado a partir de pulverização catódica (Bal-Tec SCD-50 Sputter Coater). A caracterização quanto a morfologia e organização das partículas foi realizada por MEV (Shimadzu Super Scan-SS550 e Carl Zeiss EVO).

#### **3.1.4. Cultura de osteoblastos in vitro**

Este procedimento, tal como os demais envolvendo viabilidade do crescimento de células osteoblásticas foram desenvolvidos em colaboração com o Laboratório de Nanobioténologia Aplicada: Sistemas miméticos de biomembranas sob supervisão Prof. Tit. Pietro Ciancaglini (DQ- FFCLRP/USP).

Foram utilizadas células pré-osteoblásticas eternizadas de linhagem murina MC3T3-E1 (American Type Culture Collection-ATCC™) que foram inicialmente cultivadas em meio essencial mínimo ( $\alpha$ -MEM, Gibco) suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% (v/v) de penicilina e estreptomicina. Após a confluência as células foram tripsinizadas, ressuspensas em  $\alpha$ -MEM e pipetadas em placas de 24 poços em uma densidade de  $2 \times 10^4$  célula/poço, e posteriormente foram encubadas em  $37^\circ\text{C}$ , 5% de pressão  $\text{CO}_2$  e 95% de ar atmosférico. O meio osteogênico foi produzido por ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato, que são responsáveis pela diferenciação celular. O meio foi trocado de 2-3 vezes por semana. As células foram deixadas por 24 horas aderindo a superfície da placa e por fim, foram tratadas com as partículas em uma concentração final

de 0,4 ou 0,04 mg/mL.

A metodologia para os testes de viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium) nos períodos de 7 e 14 dias. Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células, como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

O método do MTT é simples e confiável e produz resultados reprodutíveis. A componente chave é o corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium) ou MTT. Soluções de MTT dissolvidas em meio ou em soluções salinas, balanceadas na ausência de indicador vermelho de fenol, são de cor amarelada. A dehidrogenase mitocondrial das células viáveis atua sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazan de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa. Os cristais são então dissolvidos em isopropanol acidificado. O produto obtido é monitorado espectrofotometricamente em 560 e 690 nm através de um sistema Elisa de análise de multiplaca (Freshney, 1986). Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazan formado, indicando assim o grau de citotoxicidade. Cada teste deve incluir um branco, contendo meio completo sem células.

Inicialmente, as células devem ser lavadas com tampão Hank's e adicionados 80  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (5 mg/ml em Hank's) em 420  $\mu\text{L}$  de meio de cultura sem soro fetal bovino. As células devem ser incubadas por 4h, então retira-se a solução de MTT e adiciona-se 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol acidificado ( $\text{HCl } 0,004 \text{ mol.L}^{-1}$ ) para completa solubilização do formazan formado, utilizando a técnica descrita por Mosmann et al., . 1983 e modificada por Faria et al., . 2015. A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem da média em triplicata em comparação com o controle (poço limpo) em cada dia de cultura (100%). As comparações estatísticas foram realizadas por ANOVA dois fatores seguida pelo teste de Bonferroni para todos os conjuntos de dados comparados ao controle.

Determinação da atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi realizada em triplicata pela obtenção da fração da membrana plasmática das células após 7 e 14 dias de cultura, conforme protocolo adaptado de Simão et al., 2007. A atividade da ALP foi determinada por sua ação no substrato p-nitrofenilfosfato (PNPP) e foi expressa como U/mg do conteúdo total de proteína e uma unidade da enzima (U) é definida como a quantidade de enzima que hidroliza 1,0 nmol de substrato por minuto a 37° C por mg de proteína. O conteúdo total de proteínas foi determinado pela metodologia Hartree na presença de 2%

em peso de SDS e a albumina sérica bovina foi usada como padrão (Hartree 1972).

A quantificação da formação dos nódulos de mineralização sobre as células osteoblasticas foram analisadas após 14 dias de cultura, utilizado o método de coloração com vermelho de alizarina (Gregory et al., 2004). Nessa metodologia, os nódulos são fixados com formalina (10%) a 37°C, por 24 horas. Em seguida, são desidratados por um gradiente de concentração de etanol e secos à temperatura ambiente. Então adiciona-se o corante vermelho de alizarina (2%) para a coloração dos nódulos ricos em  $Ca^{2+}$ . Após completa lavagem para retirada do corante não-ligado, os nódulos são solubilizados com solução de ácido acético. A solução resultante é então neutralizada com solução de NaOH e a absorbância registrada em 405 nm.

A microscopia confocal foi aplicada para investigar a morfologia celular; foi empregado um microscópio Leica TCS SP5. As células foram tratadas com partículas a uma concentração final de 0,04 mg / mL. Os osteoblastos foram corados com acridina laranja (5 µg/mL), um fluoróforo que fornece uma imagem de contraste pela ligação aos ácidos nucleicos dos osteoblastos (RNA em vermelho; DNA em verde) (Jones et al., 2005). Para visualizar o DNA, a amostra foi excitada com a linha de 488 nm de um laser de argônio e a emissão foi coletada entre 499 e 541 nm. O RNA foi visualizado excitando a amostra com a linha de 458 nm de um laser de argônio e a emissão foi coletada entre 642 e 682 nm (Tovani et al., 2016, Shi et al., 2009).

### **3.2. Desenho experimental do trabalho *in vivo***

O protocolo experimental foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo FOA nº: 00142-2018), dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Todas as etapas deste trabalho seguiram rigorosamente o protocolo originalmente proposto.

Foram utilizados para a realização deste estudo 150 (cento e setenta e cinco) ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), machos, adultos, com peso corporal entre 450 e 500g. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP onde foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e alimentados com ração sólida padrão e água “ad Libitum”, durante todo o experimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos equitativos que compuseram a amostra do trabalho (Figura 2):

**Grupo controle (GC):** defeito de tamanho crítico preenchido com osso autógeno, que foi removido durante a preparação do defeito, foi submetido a um processamento de trituração manual e inserido novamente no defeito (Lohmann P et al., 2017).

**Grupo 1 (G1):** defeitos de tamanho crítico preenchidos hidroxiapatitas sintéticas (HAp).

**Grupo 2 (G2):** defeitos de tamanho crítico preenchidos hidroxiapatitas sintéticas (HAp) com modificação superficial das nanopartículas de hexametáfosfato (HMP) (Sigma-Aldrich Chemistry, UK).

**Grupo 3 (G3):** defeitos de tamanho crítico preenchidos hidroxiapatitas sintéticas (HAp) com modificação superficial de colágeno.

**Grupo 4 (G4):** defeitos de tamanho crítico preenchidos hidroxiapatitas bovinas pura (Bio-Oss, Geistlich AG, Wollhusen, Switzerland).

Cada grupo foi avaliado em nos períodos de 7, 14, 30 e 60 dias



Figura 2: Representação esquemática dos grupos e tempos experimentais utilizados

### 3.2.1. Cirurgia dos grupos experimentais

Após jejum de 8 horas os animais foram submetidos à sedação, por meio da administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge,

Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brasil), na dosagem de 50 mg/Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Após indução anestésica, foi realizada tricotomia na região fronto-parietal, posicionamento do animal em decúbito ventral, anti-sepsia da área com polivinilpirrolidona (PVPI) tópico e aposição de campos estéreis, e submetidos a anestesia local com Mepivacaína com Epinefrina (Anestésico Mepiadre 2% 1:100.000 - Nova DFL). Em seguida foi realizado o acesso cirúrgico por incisão em formato semilunar. O retalho total foi rebatido e realizado o afastamento com os descoladores para exposição do osso parietal de ambos os lados.

Com uma trefina cirúrgica de diâmetro interno de 4.1 mm e externo de 5.1 mm doadas pela empresa DSP-Biomedical, e com auxílio de um motor de baixa rotação foi realizada a osteotomia na região do lado osso parietal direito até a cortical interna, desviando da sutura mediana (Hatakeyama et al., 2019). O osso parietal osteotomizado foi removido e a dura-máter mantida intacta, deixando um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5.1mm de diâmetro (Hudieb et al., 2021).

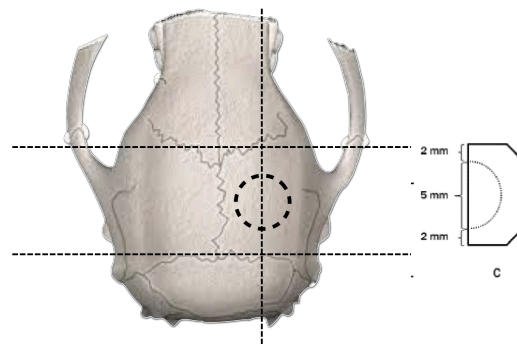


Figura 3: Representação esquemática das referências do defeito crítico

O defeito ósseo foi realizado nos 150 animais, divididos em 5 grupos, e preenchidos com: GC-osso autógeno, G1-HAp, G2-HAp+HMP, G3-HAp+Col e G4-Bio-oss; para cada animal foi aberto um esparadrapo estéril e com a dosagem de 0,05g do respectivo material, como citado na sessão 3.1.2. Os animais receberam uma dose de 0,2ml de Pentabiótico Veterinário 2.400.000 UI (Zoetis Brasil ©) no pós-operatório. Finalizado o enxerto, o retalho total foi reposicionado, a sutura foi realizada com fio de Nylon 4-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

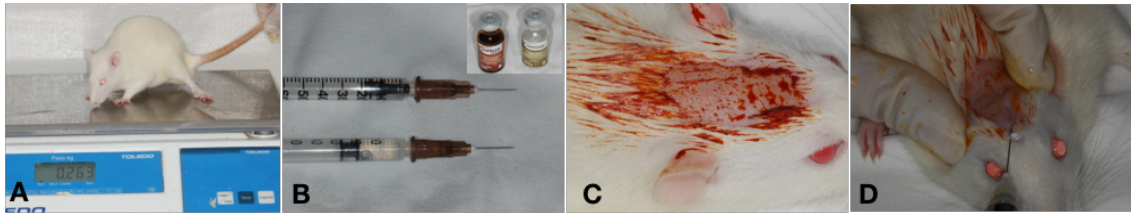


Figura 4a: A- Pesagem dos animais; B- Anestésicos Utilizados; C- Tricotomia e antisepsia; D- Anestesia local

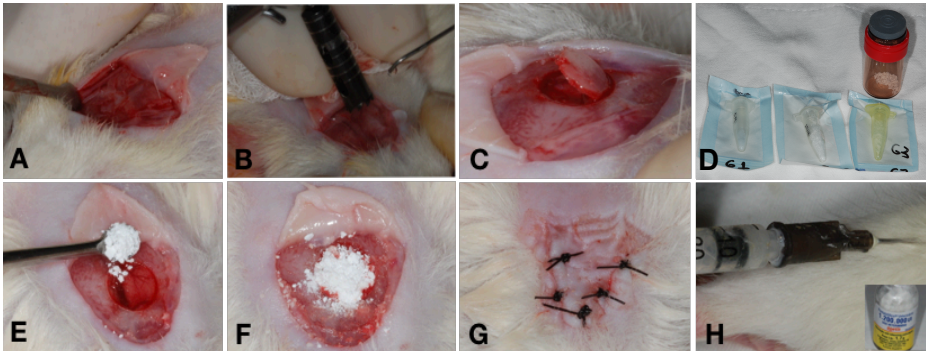


Figura 4b: A- Incisão semilunar e exposição do osso parietal; B- Osteotomia com trefina em abundante irrigação; C- Remoção da cortical óssea; D- Doses dos materiais utilizados; E, F- Aplicação do material no defeito crítico; G- Suturas; F- Aplicação do Pentabiótico.

### 3.2.2. Teste de biocompatibilidade e análise de resposta inflamatória *in vivo*

Após as cirurgias do defeito de calvária os animais foram submetidos a testes de biocompatibilidade tecidual, por meio da metodologia de implantação em tecidos subcutâneos de ratos (Gomes-Filho et al., 2007). Apesar de ter sido avaliada neste estudo a biocompatibilidade a partir de cultura de células (sessão 3.1.4), realizamos este procedimento para avaliar o nível da resposta inflamatória causada pelos biomateriais por nós desenvolvidos, em diferentes tecidos.

Portanto, foram utilizados tubos de polietileno (Abbot Labs of Brazil, São Paulo, Brazil), 1.0mm de diâmetro interno, 1.6mm de diâmetro externo e 1.0mm de comprimento (ISO 10993-6:2007), esterilizado por oxido de etileno (ISO 10993-7:1995). Foram inseridos dois tubos em cada animal, um vazio sendo este usado como controle, e um preenchido com os biomateriais G1-G4, exceto GC, cada animal recebeu o tubo preenchido com o respectivo material usado para preencher seu defeito crítico.

O procedimento cirúrgico foi realizado de acordo com estudos anteriores (Cintra et al., 2017), os ratos já se encontravam anestesiados, foi realizada a tricotomia de 4.0 cm do dorso e foi feita uma incisão de 2.0 cm na orientação cabeça-cauda com lâmina 15 (Solidor, São Paulo, Brazil). A pele foi divulsionada cuidadosamente para formar um bolso do lado direito onde foi inserido o tubo controle; e outro no lado esquerdo onde foi inserido de cada grupo a ser testado. Ambos os bolsos foram feitos na região das patas anteriores, para evitar o deslocamento do tubo durante as movimentações dos ratos. Após a implantação dos tubos nas bolsas, a pele foi suturada com fio de Nylon 4-0 (ETHILON

Nylon Suture<sup>®</sup>, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

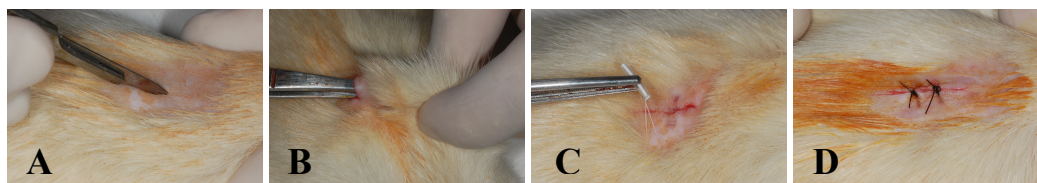


Figura 6: A- Incisão no dorso do animal; B- divulsão dos tecidos para formar bolsa; C- Inserção do tubo preenchido com biomaterial; D- Sutura

### 3.2.3. Aplicação de fluorocromos

Foram destinados 5 animais de cada um dos grupos nos tempos de 30 e 60 dias para a realização de análises em tecidos calcificados. Portanto para o período de eutanásia de 30 dias todos os animais foram pesados previamente a aplicação e foi dosada a quantidade de 20 mg/kg para cada fluorocromo a ser aplicado nos animais (Ramalho-Ferreira et al., 2015); foi aplicado por via intramuscular aos 14 dias fluorocromo de calceína (CAS Number 154071-48-4 Sigma-Aldrich) e aos 20 dias o fluorocromo de alizarina (CAS Number: 130-22-3- Sigma-Aldrich); e para o período de eutanásia de 60 dias foi aplicado calceína aos 24 dias e alizarina aos 44 dias.

### 3.2.4. Eutanásia dos grupos experimentais

A eutanásia dos espécimes foi realizada nos períodos de 7, 14, 30 e 60 dias. A eutanásia foi por dose excessiva de anestésico tiopental sódico 1g (Thiopentax, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, São Paulo – SP), foi removido o osso parietal com margem de no mínimo 3mm de tecido ósseo ao redor do defeito, foram removidos os tubos dos implantes subcutâneos com uma margem de tecido espessa ao redor de cada tubo, armazenados em cassetes e fixado em formol neutro a 10% tamponado, durante 48h.

O primeiro período analisado nesta proposta (7 dias), justifica-se por reunir neste momento do reparo ósseo normal, a estabilização do coágulo e desenvolvimento do tecido conjuntivo na maior parte do defeito crítico e nas margens do defeito, a deposição de tecido osteoide (Perri de Carvalho; Okamoto, 1987). Sendo assim, nesta fase inicial, foi possível identificar a magnitude do comportamento biológico dos diferentes biomateriais que preencheram o defeito ósseo e os tecidos subcutâneos, inclusive se houver maior intensidade do processo inflamatório causado pela interação dos biomateriais.

Prosseguindo nestas primícias, os demais períodos experimentais (14, 30 e 60 dias), possibilitaram notar o comportamento osteocondutor dos biomateriais no defeito crítico.

Após a fixação de 48h em formol os espécimes foram lavados em água corrente pelo período de 24h para dar continuidade ao processamento laboratorial de cada uma das seguintes análises.

### **3.2.5. Análise por microtomografia computadorizada**

Após a fixação das calvárias em álcool 70, as peças do período de 30 e 60 dias de cada um dos grupos (GC, G1, G2, G3 e G4) previamente ao processamento laboratorial para obtenção das lâminas histológicas, foram submetidas à avaliação em microtomógrafo, computadorizado (Bruker micro CT, Skyscan 1174, Be, da Faculdade de Odontologia de Bauru-FOB-USP), em que foram avaliados parâmetros como volume ósseo (BV/TV) e espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), por meio dos softwares CTan / CTvol (Skyscan, Be). As peças foram escaneadas com 2 µm de espessura (50 kV, 800 µA), com um filtro de Al de 0,5 mm e etapa de rotação de 0,5 mm, colunas 1304 × 1024 por linhas, exposição de 1600 ms e tempo de aquisição de 40min e 37 segs. As imagens obtidas foram reconstituídas, e a área de interesse determinada pelo software NRecon, (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com suavização de 5, correção de anéis de artefato de 7, correção de endurecimento de feixe de 40% e imagem intervalo de conversão de 0,017–0,280. No software Data Viewer (SkyScan, versão 1.4.4 64 bits), as imagens foram alinhadas e um novo conjunto de dados foi salvo. Esse conjunto de dados foi então usado no software CTAnalyser (CTAn; 2003-11, SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) para avaliar a região central do defeito em 50 cortes. Os padrões percentuais de volume ósseo (BV / TV) e espessura trabecular óssea (Tb.Th) foram então definidos para realizar a reconstrução 3D com o software CTvox (SkyScan, Versão 2.7) (Bouxsein et al., 2010; Gomes-Ferreira et al., 2020). Os valores obtidos dos parâmetros avaliados foram submetidos a análise de variância anova dois fatores, teste de normalidade Shapiro-Wilk, foram considerados significantes valores de  $p < 0,05$ , com o auxílio do software SigmaPlot® (Versão 12.5.0.38-2013 Systat Software Inc -UK)

### 3.2.6. Análise por microscopia confocal à laser

Após a finalização dos escaneamentos das peças em microtomógrafo, as peças do período de 30 e 60 dias os espécimes foram submetidos a desidratação, a partir de uma sequência crescente de álcool 70%, 80%, 90% e 100%, onde foram embebidos e infiltrados em solução de acetona e metilmetacrilato MMAL (Clássico, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brazil) em proporção de 1:1, seguido de três banhos de metilmetacrilato. Peróxido de benzoíla (1%, Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover, Germany) foi adicionado apenas no último banho.

Feito isso, as amostras foram inseridas em tubos de vidro e mantidos em uma temperatura de 37° por 5 dias até a polimerização da resina. Esses blocos foram reduzidos com o auxílio de broca “Maxicut“ montada em motor elétrico (Strong 210, São Paulo, SP, Brazil), além da realização de um progressivo desgaste manual em politrix (ECOMET 250PRO/AUTOMET 250, Buchler, Lake Bluff, Illinois) com papéis de lixa (Granulações de 120, 300, 400, 600, 800 e 1200; Carbimet 2, Buchler, Lake Blunff, Illinois) sob luz fluorescente, até alcançar a espessura de 100 µm. Tais desgastes foram feitos de acordo com o longo eixo do plano sagital das calvarias, e posteriormente, tiveram suas espessuras conferida através de um paquímetro digital (Mitutoyo, Pompeia, SP, Brazil).

Os cortes histológicos obtidos nesse processo foram montados em lâminas e imersos em óleo mineral (Petrolato líquido, Maantecor, Taquara, RJ, Brazil), e, para prevenir o extravasamento e fixadas com esmalte. O escaneamento longitudinal das amostras foi realizado no LMMC- Laboratório Multiusuário Microscopia Confocal – FMRP-USP em microscópio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), utilizando objetiva 10x (aumento original de 10x), acoplado em um computador, e o programa utilizado foi a LAS AF.

A área avaliada foi a porção central do defeito ósseo das calvárias, as imagens foram obtidas em 32 cortes, com fatias de 2 µm de espessura, totalizando 64 µm analisados. As imagens tiveram a dimensão de 1,55x1,55 mm<sup>2</sup>, correspondente a imagens de 1024 pixels (1,5136 µm/pixel), o tempo de escaneamento foi de 8 minutos. Para a Calceína foi configurada/padronizada a excitação em 488nm e a detecção em 534 (faixa de detecção entre 510 – 550nm) e para a Alizarina a excitação foi de 543nm e a detecção em 627 (577 – 580nm).

As imagens foram reconstruídas pela junção dos cortes com o software Image J® (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA, versão 3.1) salvas em JPEG. As

intensidades dos fluorocromos foram quantificadas, com a ferramenta Threshold, todos os parâmetros foram mensurados em  $\mu\text{m}^2$  por meio dos valores iniciais dos fluorocromo Calceína e Alizarina (superfície ativa de mineralização). Foram submetidos a análise de variância anova três fatores, teste de normalidade Shapiro-Wilk, foram considerados significantes valores de  $p < 0,05$ , com o auxílio do software SigmaPlot<sup>®</sup> (Versão 12.5.0.38-2013, Systat Software Inc -UK).

Após a análise em microscópio confocal as lâminas foram coradas com azul de estevenel e vermelho de alizarina, onde azul representa os tecidos moles e o vermelho cora tecidos mineralizados (Gomes-Ferreira et al., 2020)

### **3.2.7. Análise histológica**

As peças de tecidos subcutâneos e as calvárias foram então fixadas em formalina tamponada neutra a 10% (Reagentes Analíticos<sup>®</sup>, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltd., Catanduva, SP, Brasil) e apenas as calvárias foram descalcificadas em EDTA 20% (ácido etilenodiaminotetramérico, Merck, Kenilworth, NJ, EUA) dissolvidas em água Milli-Q, com trocas semanais por um período de cerca de 14 semanas em temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi desidratado em sequência crescente e gradativa de álcool (70, 90, 95 e 100), trocando-se a solução a cada hora. Após essas etapas, os espécimes foram diafanizados com xilol e incluídos em parafina para obtenção de cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura adequados para coloração com hematoxilina e eosina (HE) (Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, EUA).

A análise semi-quantitativa foi realizada em todas as amostras: o tecido em contato com o material na abertura do tubo foi avaliado pela contagem do número médio de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, células plasmáticas e macrófagos) através de escores 0 (ausente para poucas células inflamatórias), 1 (menos de 25 células e reação leve), 2 (entre 25 e 125 células inflamatórias e reação moderada) e 3 (125 ou mais células e reação grave), com aumento de 40x por um histologista certificado (treinado e calibrado) cego para a condição experimental (Dal-Fabbro et al., 2019). A presença de biomineralização foi determinada por presente e ausente. Após o teste de Kruskal Wallis, utilizando o software GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA). Um  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

A avaliação histométrica das calvárias foi feita usando ImageJ<sup>®</sup> (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), versão 3.1, e a área do osso neoformado foi expressa em micrômetros e convertida em porcentagem como a razão da área do osso

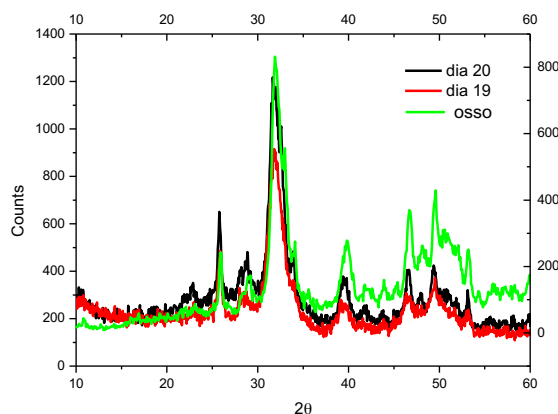
neoformado/total área x 100. As medidas foram realizadas em microscópio óptico (Olympus BX53®) acoplado a uma câmera Olympus XC50 cellSens Software e conectado a um microcomputador Intel core i5 (Dell Computadores do Brasil Ltda, Hortolândia), SP, Brasil).

As lâminas foram fotomicrografias ampliadas dos originais em 40×. As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos no formato JPEG e analisadas usando as ferramentas “mãos livres” do ImageJ® (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) e, em seguida, a área do osso neoformado foi selecionada dentro das áreas dos cotos e área central do defeito calvarial, mesmo na área de tecido conjuntivo ou biomaterial (Schmidt et al., 2019). Os valores obtidos dos parâmetros avaliados foram submetidos a análise de variância anova dois fatores, teste de normalidade Shapiro-Wilk, foram considerados significantes valores de  $p < 0,05$ , com o auxílio do software SigmaPlot® (Versão 12.5.0.38-2013 Systat Software Inc -UK).

#### 4. Resultados e Discussão

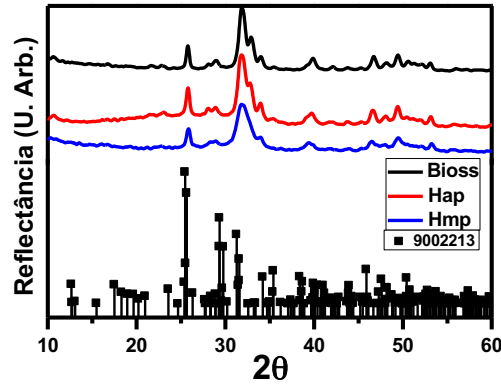
A literatura descreve o uso de polifosfatos como aceleradores da proliferação de osteoblastos *in vitro* e estimulantes de regeneração óssea *in vivo* (Mahamid et al., 2011). Porém, pouco ou nenhum controle a respeito da síntese e caracterização físico-química dessas partículas são encontrados. Devido a diversos trabalhos na literatura mostrarem que HAp sintética é obtida sob altas temperaturas e em pH básico (Markovic et al., 2004, Bakhtiari et al., 2016, Kumara et al., 2018) inicialmente, neste trabalho, foram realizados testes da metodologia para o desenvolvimento da síntese de HAp.

Portanto, foi realizado a síntese como descrita na sessão 3.1.1, na qual foram misturadas previamente as soluções de  $\text{CaCl}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$ , deixado sob agitação até que a temperatura se estabilizasse em  $60^\circ\text{C}$ , e quando a mistura atingiu essa temperatura foi acrescentado a solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , sob a mesma agitação vigorosa, o que ocasionou a precipitação de HAp, nomeada HAp2. Para tanto as partículas obtidas (HAp1 e 2) foram submetidas a testes iniciais de DRX e comparadas ao osso humano (Figura 6).



**Figura 6:** DRX dos resultados preliminares de HAp, linha em verde representa HAp do osso humano, linha em vermelho HAp1 e linha em preto HAp2 (aquecida).

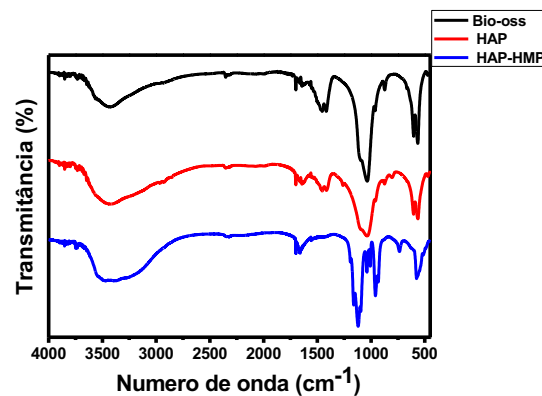
Em vista destes resultados preliminares podemos notar que HAp1 e HAp2 não apresentaram diferenças na cristalinidade das amostras, portanto optamos pela síntese em temperatura ambiente, sem aquecimento, pela facilidade e por mostrar-se tão eficaz quanto em temperaturas elevadas. Além disso a comparação com HAp presente no osso humano, onde os picos de difração de raios-X são coincidentes, mostraram a efetividade previa desta síntese.



**Figura 7:** DRX comparativa de Bio-Oss em preto, HAp em vermelho e HAp+HMP em azul, na parte inferior da imagem está o padrão da HAp na literatura e seu número de referência na legenda.

Estudos demonstram que a HAp inorgânica de origem bovina Bio-Oss apresentam propriedades químicas e físicas semelhantes ao osso humano (Osniri et al., 2005; Mladenović et al., 2013). A partir desse presuposto, optamos por analisar e comparar os resultados dos biomateriais desenvolvidos nessa pesquisa com esse substituto ósseo, que é considerado padrão ouro na engenharia tecidual (Jensen et al., 2013; Lambert et al., 2016; Cordaro et al., 2008; Trubiani et al., 2010).

Portanto, após a síntese e modificação superficial de HAp com HMP, foi realizado DRX das amostras, representado pela figura 7. Podemos observar no difratograma que os picos de difração de raios-X das amostras (Bio-Oss representado pela linha preta, HAp pela linha vermelha e HAp-HMP pela linha azul) coincidem com os picos do padrão de difração correspondente a hidroxiapatita (9002213), obtido através do Crystallography Open Database (COD). Picos menos definidos puderam ser observados nas partículas de HAp recobertas por HMP. Difração de raios-X para as partículas recobertas por colágeno não foi realizada uma vez o colágeno não é um cristal, e portanto, não possui picos de difração.



**Figura 8:** Espectros de absorção na região do infravermelho

Buscando corroborar com os resultados obtidos no DRX, foram realizadas as análises de FTIR (figura 8). Os espectros obtidos revelam grupos químicos característicos da HAp, comuns nas três amostras analisadas. De acordo com a literatura, as bandas características de HAp nas regiões de  $\sim 1090$ ,  $1040$ ,  $961$ ,  $567$  e  $603\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ . Por sua vez, bandas em torno de  $\sim 1410$  e  $1450\text{cm}^{-1}$  devem ser atribuídas ao grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ , indicando a presença de íons carbonato provenientes da atmosfera (Ma MG 2012; Zhou et al., 2017). Por fim, as bandas nas regiões de  $\sim 1630$  e  $3409\text{cm}^{-1}$  são atribuídos a grupamentos hidroxila referentes a água adsorvida (Zhou et al., 2017).

Estudos recentes em biomineralização apontam que partículas cristalinas e em escala nanométrica desempenham um papel importante na formação de tecidos duros, estimulando a atividade de osteoblastos e consequentemente levando ao crescimento ósseo (Balasundaram et al., 2006; Dorozhkin 2010). Ainda, estudos *in vitro* mostraram que partículas de HAp em escala nanométrica ( $\sim 31\text{nm}$ ) apresentam melhorias em suas propriedades superficiais quando comparadas a HAp de tamanhos convencionais ( $\sim 7400\text{nm}$ ), podendo influenciar positivamente nas interações iniciais das mesmas com o meio aumentando a adesão celular, proliferação osteoblásticas e aumento da atividade de fosfatase alcalina (Chan et al., 2006; Dorozhkin 2010).

| <b>Amostra</b> | <b>Tamanho médio (nm)</b> | <b>Largura a meia altura (nm)</b> | <b>Índice de Polidispersão</b> |
|----------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| <b>Bio-Oss</b> | <b>0,65</b>               | <b>0,08</b>                       | <b>0,684</b>                   |
|                | <b>2,038</b>              | <b>0,33</b>                       |                                |
|                | <b>299,2</b>              | <b>93,18</b>                      |                                |
| <b>HAp</b>     | <b>360</b>                | <b>124</b>                        | <b>0,461</b>                   |
| <b>HAp+HMP</b> | <b>433,6</b>              | <b>142</b>                        | <b>0,379</b>                   |
| <b>HAp+Col</b> | <b>0,669</b>              | <b>0,11</b>                       | <b>0,227</b>                   |

**Tabela 1.** Tamanho (nm) das partículas

Os resultados do tamanho das partículas sintetizadas neste trabalho estão demonstrados na Tabela 1. Na amostra de Bio-Oss podemos observar a presença de 3 medidas de tamanho de partícula, o que significa que durante a análise, a amostra apresentava 3 populações de partículas diferentes, variando os tamanhos das mesmas em

escala nanométrica. Além disso, também pode-se observar que a amostra era polidispersa, o que explica a presença de diferentes populações dentro da mesma.

As amostras de HAp apresentaram tamanhos de partículas de ~360nm, com 100% da sua população em número possuindo este tamanho, o que indica uma amostra mais monodispersa e com um mesmo padrão. As partículas de HAp modificadas com HMP e Col também seguiram os mesmos padrões de medidas e monodispersividade que HAp. As amostras de HMP se apresentaram maiores que as demais devido ao recobrimento superficial das partículas de HAp, e da quantidade de HMP usada nessa modificação. Portanto, esses resultados seguem o padrão nanométrico descrito na literatura (Chan et al., 2006; Dorozhkin, 2010), sendo mais desejáveis quando comparadas as convencionais, pois mimetizam as apatitas presentes no processo de biomineralização do osso apresentando maior biocompatibilidade em meios biológicos.

Outro fator de extrema importância durante a síntese de novos biomateriais é a carga superficial que os mesmos apresentam após sua síntese, também conhecido como medidas potencial-zeta ( $\zeta$ ), pois pode ser um fator determinante nos potenciais osteocondutivos e osteoindutivo dos biomateriais. É descrito na literatura que partículas com cargas negativas quando em contato com o tecido ósseo aceleram a cascata de crescimento, além de serem favoráveis para adesão e proliferação de células ósseas (Smeets et al., 2009), enquanto partículas carregadas positivamente inibem esses comportamentos de adesão e proliferação celular (Ohgaki et al., 2001). Essas variações de potenciais negativos e positivos ocorrem devido as diferenças nas metodologias de preparo. Vale a pena ressaltar que o potencial encontrado para o osso é descrito em -75mV (Smith et al., 2004; Smeets et al., 2009).

| <b>Amostra</b> | <b><math>\zeta</math>- potencial (mV)</b> | <b>Desvio Padrão (nm)</b> |
|----------------|---|---------------------------|
| <b>Bio-Oss</b> | <b>-8,99</b>                              | <b>4,61</b>               |
| <b>HAp</b>     | <b>-6,08</b>                              | <b>4,48</b>               |
| <b>HAp+HMP</b> | <b>-44,8</b>                              | <b>6,92</b>               |
| <b>HAp+Col</b> | <b>-3,24</b>                              | <b>4,12</b>               |

**Tabela 2.** Potencial zeta (mV) das partículas sintetizadas

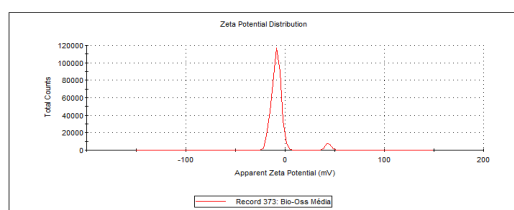
Potenciais-zetas negativos foram obtidos para todas as partículas deste estudo, corroborando com a literatura e demonstrando um potencial favorável para os testes *in vitro* e *in vivo*, entretanto, o menor valor encontrado foi para as amostras de HMP (-44,9mV) (tabela 2). Quando comparado o valor de potencial-zeta da partícula de HAp com o valor obtido para a partícula de HAp modificada com HMP, podemos observar uma grande diminuição deste. Isto indica que houve o recobrimento das partículas de HAp com o HMP, uma vez que este último é formado por íons fosfato, os quais são negativamente carregados.

Bio-Oss e HAp apresentaram potenciais similares de -8,99 mV e -6,08 mV, também corroborando com os resultados de HAp alógenas segundo a literatura -9,25 mV (Doostmohammadi et al., 2012). Os resultados de Col também são satisfatórios e sua diferença com o de HAp, mostram que a modificação superficial foi efetiva para esse grupo.

#### Bio-Oss

|                               | Mean (mV)     | Area (%) | St Dev (mV) |
|-------------------------------|---------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): -7.04    | Peak 1: -8.99 | 95.9     | 4.61        |
| Zeta Deviation (mV): 6.88     | Peak 2: 43.4  | 4.1      | 2.59        |
| Conductivity (mS/cm): 0.00990 | Peak 3: 0.00  | 0.0      | 0.00        |

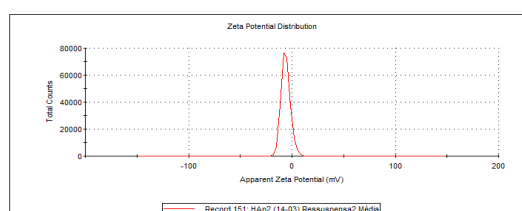
Result quality : Good



#### Hap

|                              | Mean (mV)     | Area (%) | St Dev (mV) |
|------------------------------|---------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): -6.20   | Peak 1: -6.08 | 99.7     | 4.48        |
| Zeta Deviation (mV): 45.1    | Peak 2: 121   | 0.2      | 2.76        |
| Conductivity (mS/cm): 0.0154 | Peak 3: -145  | 0.0      | 1.57        |

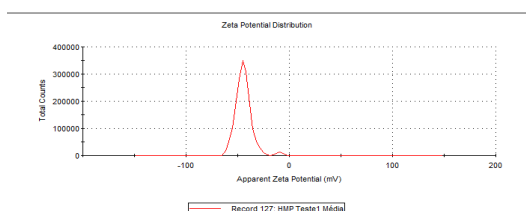
Result quality : See result quality report



#### HAp+HMP

|                              | Mean (mV)     | Area (%) | St Dev (mV) |
|------------------------------|---------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): -44.2   | Peak 1: -44.9 | 98.3     | 6.92        |
| Zeta Deviation (mV): 7.71    | Peak 2: -9.08 | 1.7      | 2.38        |
| Conductivity (mS/cm): 0.0641 | Peak 3: -9.49 | 4.7      | 2.54        |

Result quality : Good



#### HAp+Col

|                               | Mean (mV)     | Area (%) | St Dev (mV) |
|-------------------------------|---------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): -4.62    | Peak 1: -3.24 | 94.7     | 4.12        |
| Zeta Deviation (mV): 5.75     | Peak 2: -27.1 | 5.3      | 3.83        |
| Conductivity (mS/cm): 0.00320 | Peak 3: 0.00  | 0.0      | 0.00        |

Result quality : Good

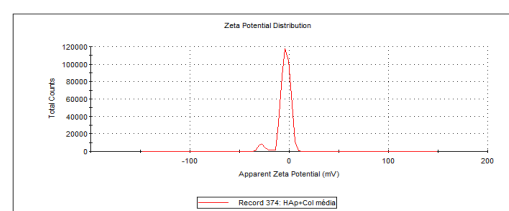


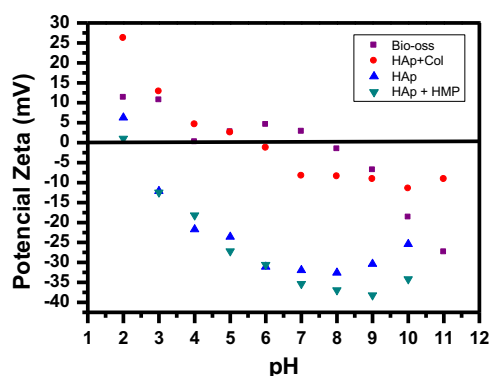
Figura 9: Graficos representativos das respectivas medidas de potenciais-zetas

Foi analisado também o comportamento da carga das partículas submetidas a análise de potencial-zeta em diferentes valores de pH. Com este fim, um titulador automático foi acoplado, e as mudanças de pH ocorreram a partir da adição de soluções ácidas e básicas. A partir dessa avaliação podemos mensurar o ponto de carga zero dessas

partículas, o qual é o ponto em que estas apresentam carga superficial igual a zero. Além do mais, pode-se determinar qual será a carga superficial das partículas no pH desejado de análise. No caso desta pesquisa, deseja-se saber a carga superficial das partículas no pH do corpo humano, o qual é 7,4 (Doostmohammadi et al., 2012).

Portanto, na figura 10 podemos observar que o Bio-Oss apresenta seu ponto de carga zero em  $\sim 7,83$ , a partir do qual as partículas começam a apresentar carga eletronegativa. Por sua vez, HAp apresenta ponto de carga zero em pH  $\sim 2,26$ , possuindo portanto uma carga superficial de  $-30\text{mV}$  em pH 7,4. Por fim, as amostras de HMP tem seu ponto de carga zero em  $\sim 2,11$ , e no pH de interesse elas apresentam uma carga superficial de  $\sim -35\text{mV}$ .

A titulação de Col foi feita em duas etapas, sendo que na primeira foi realizada medidas de titulação para o colágeno extraído dos tendões de ratos, conforme a metodologia citada na sessão 3.1.2, e na segunda das partículas modificadas com esse colágeno preparado. O pI do colágeno foi em  $\sim 7,84$ , apresentando carga superficial positiva no pH do corpo humano, por sua vez, o ponto de carga zero das partículas com Col foi em  $\sim 5,61$ , sendo que em pH 7,4 a carga superficial destas é  $-10\text{mV}$ .



**Figura 10:** Titulação de potencial-zeta em função do pH das amostras. A faixa representa o ponto de carga zero das partículas.

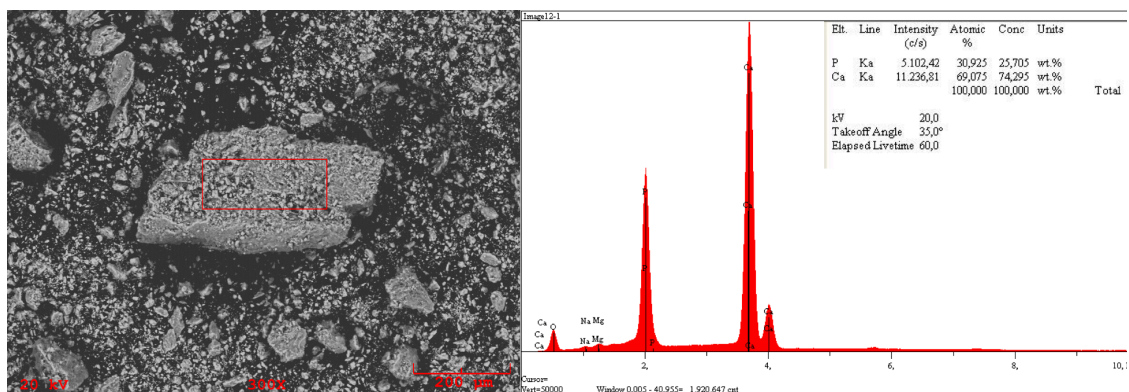
Foi confirmado por espectroscopia FTIR e análise de DRX que as partículas de HAp derivadas das sínteses e modificações superficiais apresentam características de hidroxiapatita cristalina. A partir da técnica de espectroscopia de energia dispersiva por raios-X (EDS), foi quantificada a proporção de cálcio e fósforo (razão Ca/P) das amostras, para diferenciar HAp em relação a outros fosfatos. A razão Ca/P e os traços de outros elementos presentes na HAp desempenham um papel vital na determinação de seu desempenho biológico, pois o tecido ósseo contém vestígios de Mg, Zn, Sr, K, Na,

carbonato e entre outros elementos (Kumar et al., 2018). Também vale ressaltar que a literatura aponta que a razão Ca/P da HAp natural possui valor de 1,67 que apresenta sua fórmula  $10\text{Ca}/6\text{P}$  ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (Balasundaram et al., 2006; Doostmohammadi et al., 2012; Kumar et al., 2018).

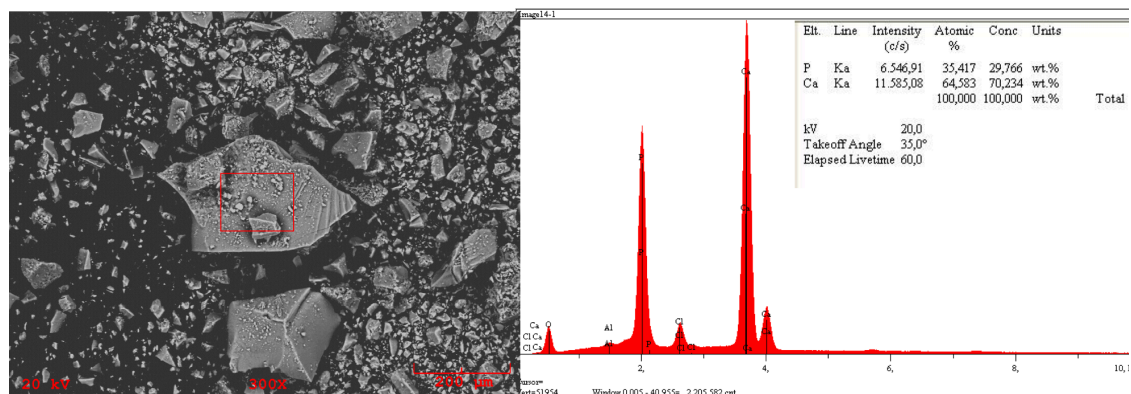
Portanto, pode ser observado na figura 11 os MEVs das amostras e a quantificação dos elementos pertencentes as mesmas. A amostra de Bio-Oss obteve razão  $\text{Ca}/\text{P}=2,2$ , sendo também possível observar a presença de pequenas quantidades de Mg. Estudos vêm demonstrando a presença de outros elementos estruturais dos tecidos ósseos, e acredita-se que vestígios de Mg derivados de HAp de osso bovino influenciam diminuindo a solubilidade das partículas quando comparadas a HAp pura (Doostmohammadi et al., 2012; Kumar et al., 2018).

A proporção Ca/P das amostras de HAp foram as que mais se aproximaram da natural com o valor de 1,8. Também foi possível observar a presença de vestígios de outros elementos como Cl. Estes dados sugerem que devido a composição e maior pureza dessas amostras quando comparadas a Bio-Oss, estas seriam mais facilmente solubilizadas por apresentarem valor de razão Ca/P mais próximo das apatitas naturais. Além do mais, isto sugere que podem apresentar sua reabsorção pelas células ósseas *in vivo* ligeiramente mais rápidas do que HAp derivadas de ossos bovinos (Doostmohammadi et al., 2012). Nas amostras de HMP, não pode ser quantificado essa proporção de Ca/P uma vez que a modificação superficial da partícula de HAp com hexametáfosfato de sódio aumentou a quantidade do elemento fósforo na superfície. Entretanto, este aumento na quantidade deste elemento prova mais uma vez a modificação desta partícula.

Bio-Oss:  $\text{Ca}/\text{P}= 2,2\pm 0,2$



HAp: Ca/P= 1,8+-0,2



HAp+HMP

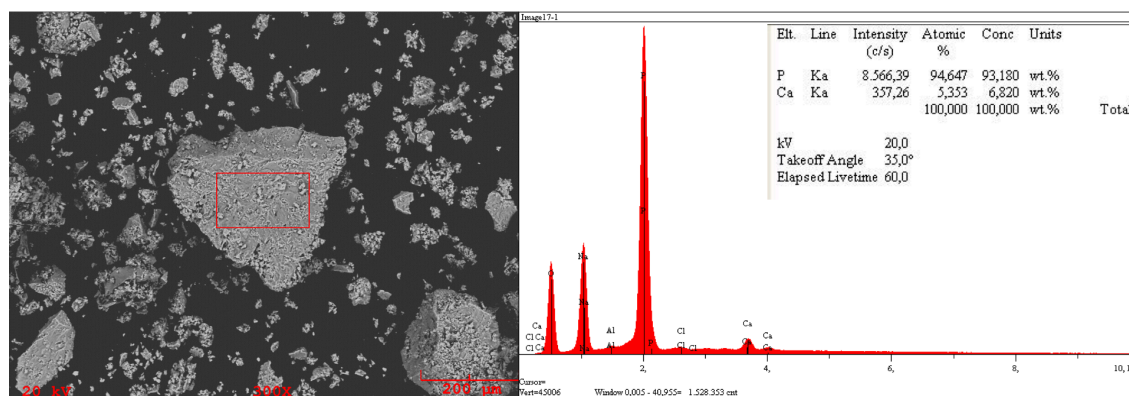


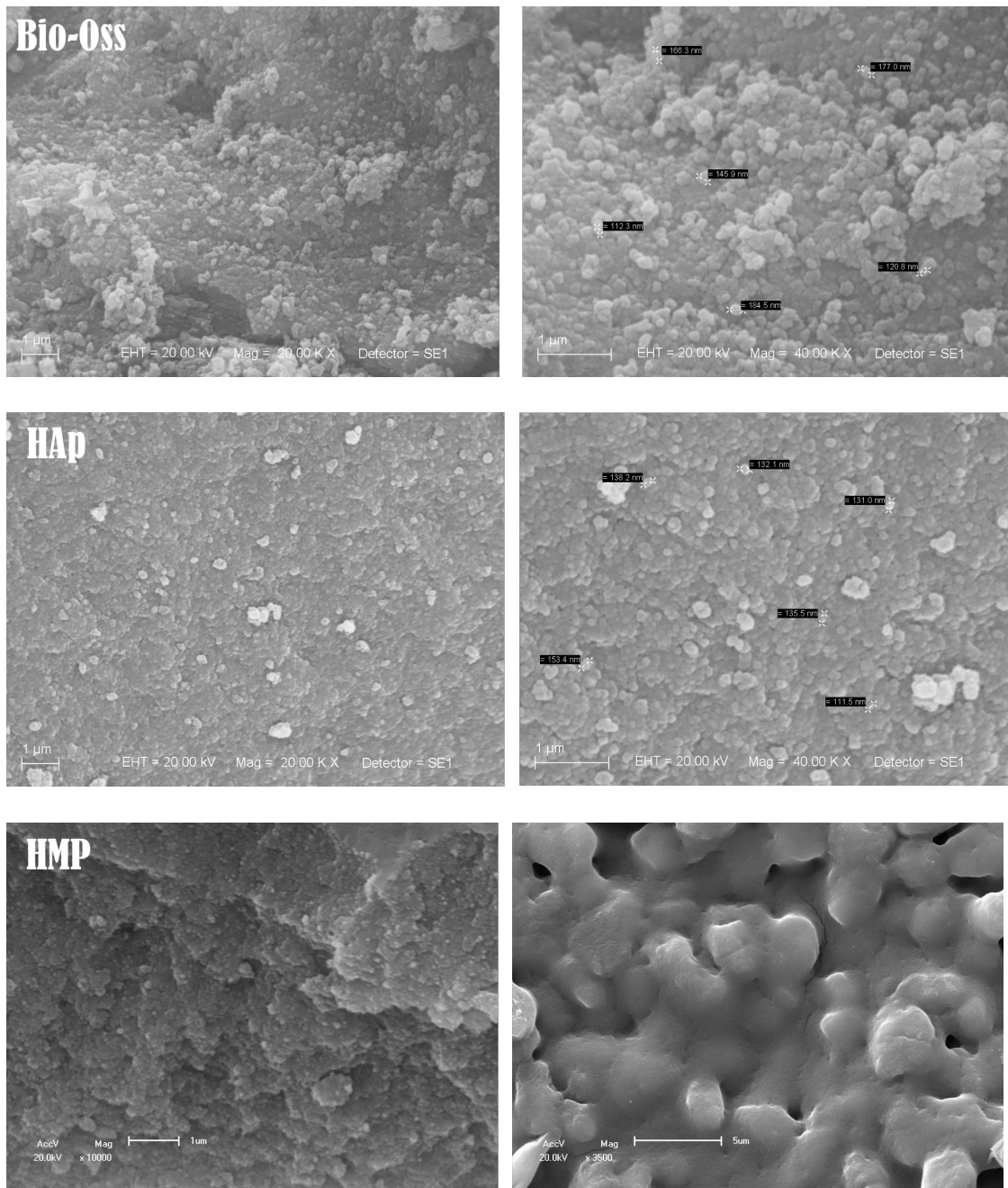
Figura 11: EDS das partículas, a foto de microscopia representa a porção das partículas que foi analisada

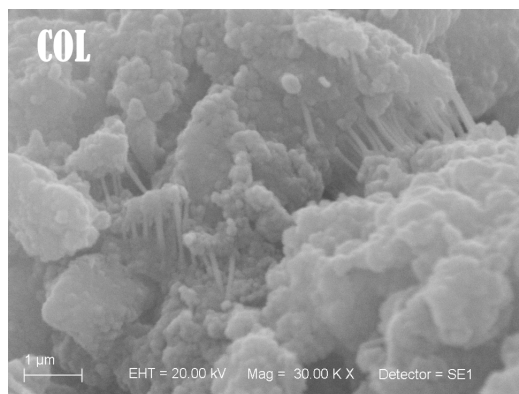
Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) na figura 12, evidenciam a morfologia esférica das partículas e comprovam os resultados das medidas de tamanho realizadas no ZetaSizer em escala nanométrica. Bio-Oss e HAp apresentam partículas de morfologia semelhante, agregação e comportamento das mesmas são similares e suas medidas variam entre ~112nm- 184nm e ~111nm-153nm respectivamente.

São relatadas HAPs de diversas morfologias na literatura, assim como o potencial-zeta das partículas varia dependendo da síntese da qual elas são obtidas, a morfologia também sofre essa variação. Sadat-Shojai et al., relata que síntese aquosas, a altas temperaturas e pH elevado precipitam partículas esféricas, o que corrobora em partes com nosso estudo, visto que mesmo testando a síntese sob temperatura elevada, a mesma sob temperatura ambiente também produziu partículas de formato esférico e em escala nano. Autores sugerem que a morfologia esférica das partículas pode levar ao aumento da adesão celular (Balasundaram et al., 2006).

Na amostra de HMP podemos observar um fino filme recobrendo as partículas de HAp, que também comprova sua modificação superficial. E as amostras de colágeno

tambem comprovam a modificação superficial, podemos observar fibrilas de col recobrendo as partículas na figura 12.





**Figura 12:** Microscopia eletrônica de varredura

O comportamento biológico e a resposta celular das partículas após sua caracterização foi testado por meio de cultura *in vitro* de células osteoblasticas MC3T3-E1 (American Type Culture Collection-ATCC™) cada amostra com duas concentrações diferentes (0,4 mg/mL e 0,04 mg/mL). A viabilidade celular após 7 e 14 dias mostrou que não houve morte celular na presença das amostras de HAp, HMP e Bio-Oss em ambas as concentrações, indicando a segurança das partículas quanto a sua toxicidade (Figura 9). A viabilidade celular foi expressa em relação às células cultivadas na ausência das partículas (Ct). Como mostrado na Figura 13, o tratamento das células com as partículas de HAp não alterou a viabilidade celular após 7 e 14 dias de cultivo, indicando a não toxicidade dessas partículas na faixa de concentração utilizada nesse estudo. Na amostra Bio-Oss2 houve um discreto aumento em 7 dias comparado a Ct corroborando com estudo de Mladenovi et al., 2013 que testou diferentes concentrações de Bio-Oss *in vitro*, demonstrando a viabilidade e o crescimento celular na presença das partículas. No caso da partículas de HAP modificadas com HMP observa-se um decréscimo na viabilidade celular, indicando que essa modificação alterou a proliferação das células, resultando em redução significativa da viabilidade celular após 7 dias. Todavia, observou-se a recuperação da viabilidade celular após 14 dias para as células cultivadas na presença das partículas modificadas com HMP, mesmo que ainda inferior ao controle. Diferente do que Bae et al., 2016 apontou testando diferentes concentrações de HMP puro que aumentou a viabilidade celular, portanto isso pode ser justificado por que HMP estaria recobrando as partículas de HAp.

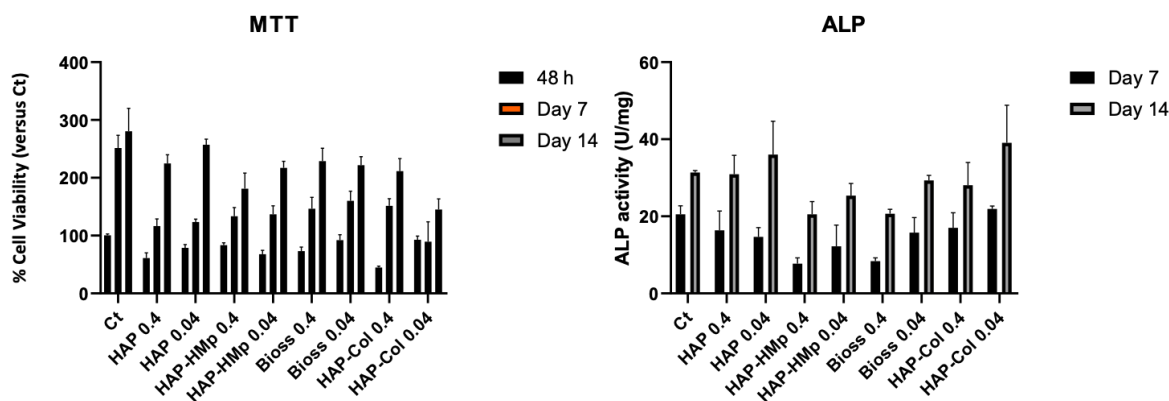


Figura 13: Culturas de célula análise de viabilidade celular (MTT) e atividade da fosfatase alcalina (ALP) aos 7 e 14 dias.

As fosfatases alcalina (ALP) são proteínas ectoplasmáticas que catalisam a formação fosfato inorgânico necessário para a formação de matriz mineralizada do tecido ósseo, além de ser um marcador de diferenciação do fenótipo osteoblástico (Beloti et al., 2007). Estudos apontam que a atividade máxima da ALP se dá após 10 dias de cultura (Choi et al., 1996), enquanto outros relatam ser aos 14 dias (Jaiswal et al., 1997) marcando o início do processo de mineralização. Para o período de 7 dias a atividade de ALP diminuiu em relação a Ct para todos os grupos, porém aos 14 dias HAp1 apresentou aumento de ~15% em relação a Ct e ~25% em relação ao seu período de 7 dias. As outras amostras também aumentaram a atividade de ALP aos 14 dias mas nenhuma superior a HAp1 e Ct, porém entre os próprios períodos de dias das amostras HAp2, HMP e Bio-Oss 1 e 2, houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 7 e 14 dias indicando aumento da atividade de ALP, porém pode ter havido um atraso no processo de diferenciação celular para essas amostras quando comparadas a HAp 1.

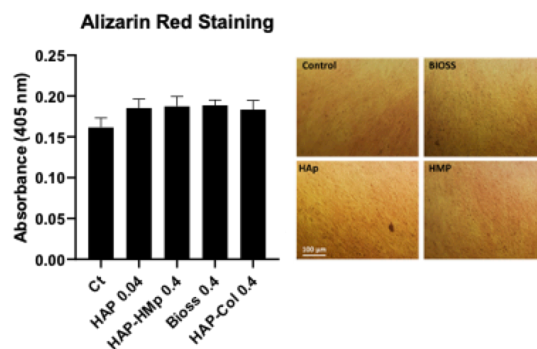
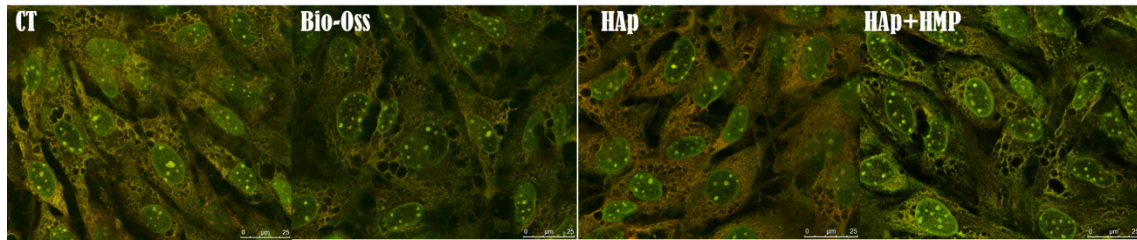
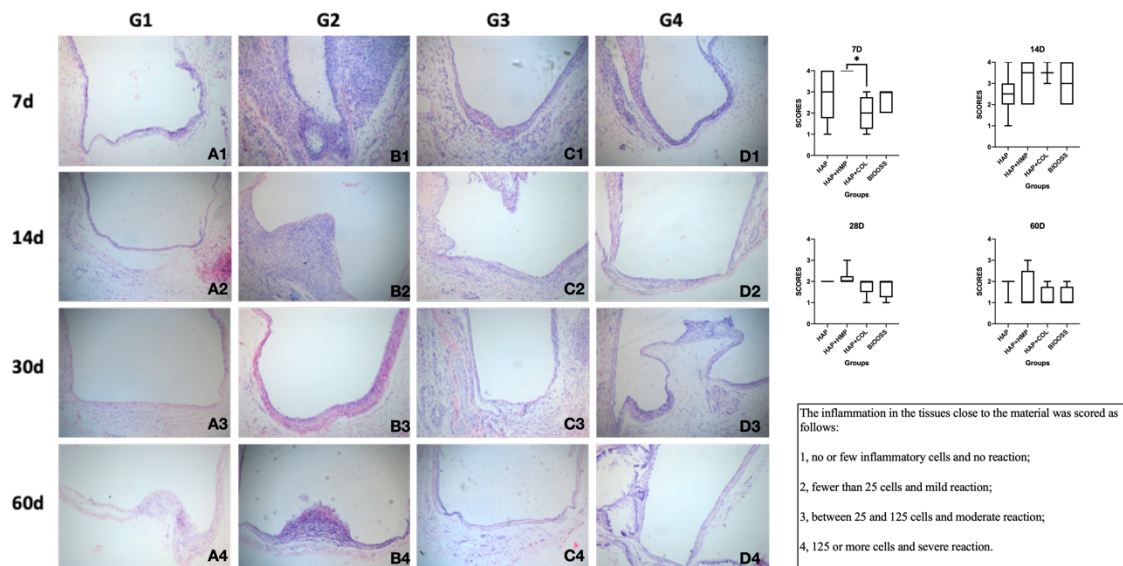


Figura 14: Nódulos de mineralização



**Figura 15:** microscopia confocal dos osteoblastos após 72h na presença das partículas

A quantificação dos nódulos de mineralização (Figura 14) demonstrou que o tratamento das células com as partículas não alteram sua habilidade em formar matriz mineralizada e não observou-se diferença significativa entre a quantidade de nódulos mineralizados formados na presença das partículas e no controle, após 14 dias de cultura. Imagens de microscopia das monocamadas de células coradas com alizarina após 14 dias mostram a formação de nódulos mineralizados, corados em vermelho. Imagens de microscopia confocal dos osteoblastos aderidos sobre as superfícies após 72 h de cultura (Figura 15) indicam que o tratamento das células com as partículas não alteram a adesão dos osteoblastos e a morfologia dos mesmos, que continuaram semelhantes ao controle e as amostras tratadas.



**Figura 16:** imagens representativas coloração H&E das aberturas dos tubos em contato com material testados nos tecidos subcutâneos de cada grupo nos períodos de 7, 14, 30 e 60 dias: G1:HAp; G2: HMP; G3:COL; G4: BIO-OSS. GC não foi testado por ser considerado biocompatível sendo osso autógeno do mesmo animal.

A análise de biocompatibilidade de fez necessária para confirmação da compatibilidade do material em modelos animais e também para a visualização da resposta inflamatórias desses materiais. G1, G3 e G4 apresentaram respostas inflamatórias de

escore 2 a 3 no período de 7 dias, diminuindo a resposta ao longo do tempo e nos 60 dias apresentando escore 1 ou 2 de inflamação, corroborando com estudo de Ghanaati et al., 2012 que mostram que HAp apresenta resposta inflamatória estável em períodos tardios. Enquanto que o G2 apresentou intensa resposta inflamatória desde o período inicial de 7 dias (escore 4) diminuindo para 3 ao longo dos períodos, ou seja HMP apresenta potencial inflamatório maior que as outras amostras, houve diferença estatística entre G2 e G3 apenas no período de 7 dias.

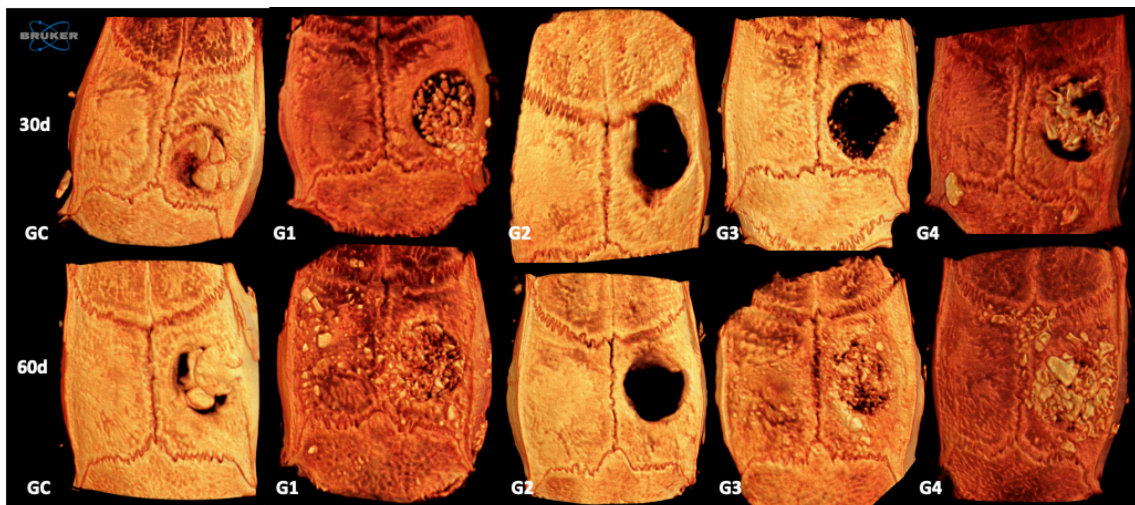


Figura 17: Reconstrução das imagens de MicroCt das calvárias escaneadas nos períodos de 30 e 60 dias

Na análise de MicroCt pode ser observado na figura 17 o preenchimento dos defeitos críticos nos grupos GC, G1 e G4 no período de 30 dias e de GC, G1, G3 e G4 no período de 60 dias. Apenas a amostra de 30 dias do G3 não completou o defeito e ambos os tempos do grupo G2 não obtiveram formação óssea no defeito em ambos os períodos, porém podemos observar em suas bordas um discreto crescimento ósseo, resultados similares foram observados no estudo de Bae et al., 2016, em que as amostras que continham esponja de colágeno impregnadas com HMP também não obtiveram sucesso na formação óssea em defeitos críticos de calvarias de ratos. Divergindo dos resultados *in vitro* presentes neste trabalho, onde houve crescimento e diferenciação osteoblástica nas partículas modificadas com HMP.

Na figura 18 podemos observar no percentagem de volume ósseo (BV/TV) resultados animadores em relação aos grupos experimentais G1:HAp e G3:Col quando comparados ao grupo autógeno GC:Aut e ao G4 (BioOss), tanto no período de 30 quanto de 60 dias G1 e G4 apresentaram percentagens de volume ósseos semelhantes, G3 e G4 foram equivalentes no período de 60 dias. Na análise estatística houve diferença

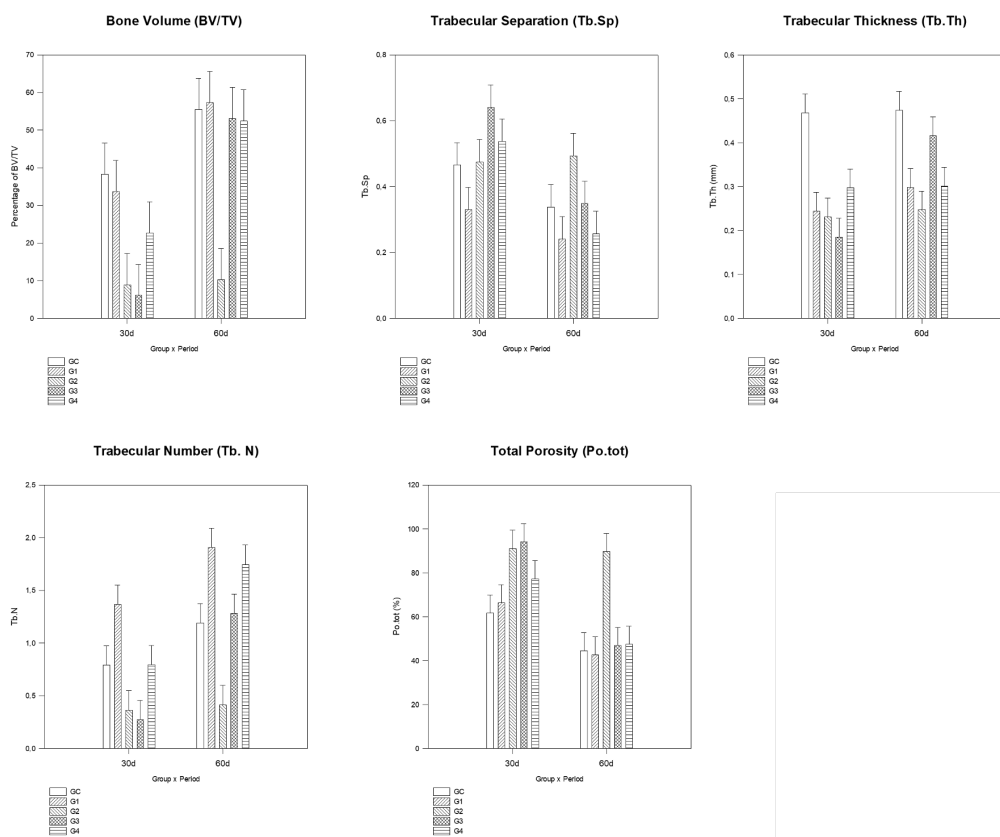
estatisticamente significativa apenas nos grupos G3 e G4 ( $p < 0,001$ ;  $p = 0,020$ ), entre períodos de 30 e 60 dias; na comparação entre os grupos em 30 dias não houve diferença, porém no período de 60 dias GC( $p = 0,005$ ), G1( $p = 0,008$ ), G3( $p = 0,012$ ) e G4 ( $p = 0,014$ ) tiveram resultados estatisticamente significativos quando comparados a G2:HMP.

Em reação a espessura do trabeculado ósseo representado por Tb/Th, número de trabéculas Tb.N e separação das trabéculas Tb.Sp na figura 18, todos os grupos apresentaram resultados similares, havendo diferença em Tb/Th dos grupos entre os tempos apenas para G3, em 30 dias entre GC vs. G3  $p = 0,001$ , GC vs. G2  $p = 0,007$ , GC vs. G1  $p = 0,011$ ; e em 60 dias apenas entre GC vs. G2  $p = 0,010$ . Em Tb.N houve diferença entre os tempos 30 e 60 em G3 e G4, e em 30 dias entre G1 vs. G3  $p = 0,004$  e G1 vs. G2  $p = 0,008$ ; e em 60 dias entre todos os grupos (G1  $p < 0,001$ ; G4  $p < 0,001$ ; G3  $p = 0,024$ ; GC:  $p = 0,050$ ) e G2, semelhante ao BV/TV. Na separação das trabéculas houve diferença entre os tempos para G3 e G4, e em 30 dias G3 vs. G1  $p = 0,030$ , e em 60 dias não houve diferença entre os grupos.

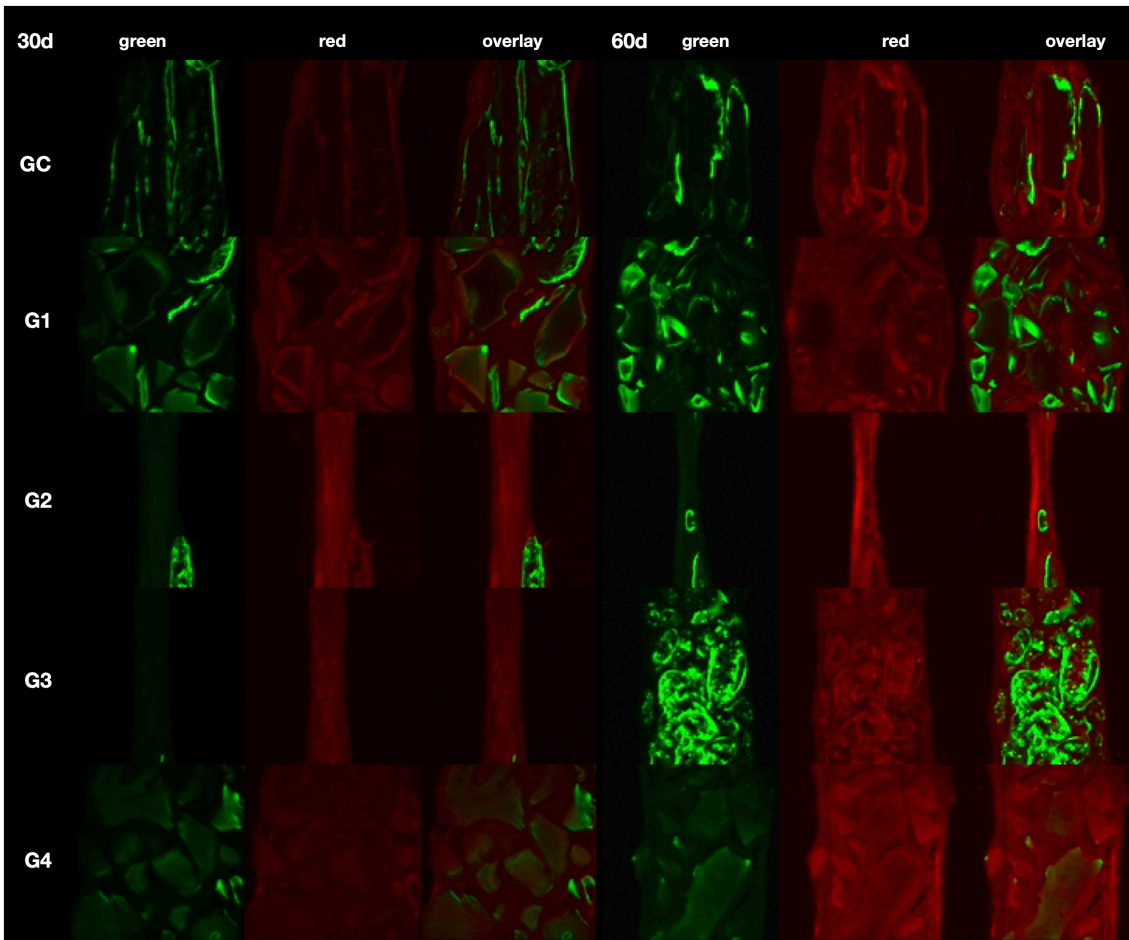
Em relação a porosidade total (Po(tot)) houve diferença entre os grupos G3 e G4, semelhante aos demais, porém a maior diferença foi apresentada em 60 dias entre G2 vs. G1  $p = 0,005$ , G2 vs. GC  $p = 0,008$ , G2 vs. G3  $p = 0,012$ , G2 vs. G4  $p = 0,013$ , havendo inversão dos resultados quando comparados as demais análises em que os demais grupos apresentaram resultados satisfatórios em relação ao grupo G2:HMP.

Vale a pena ressaltar que G2 para 30 e 60 dias não houve preenchimento do defeito ósseo com biomaterial, portanto o resultado mostrado no gráfico pode ter sido considerado pelo vazio existente e não pela espessura de trabéculas. Os resultados desse material foram satisfatórios pois através de sua síntese foi possível garantir que sua composição e estrutura se assemelhassem a hidroxiapatita natural (Balasundaram et al., 2006; Dorozhkin 2010), além disso, garantir a presença de um potencial de carga eletronegativa ao redor da partícula sintetizada (Smeets et al., 2009), o que viabilizou a osteointegração quando testado *in vivo*.

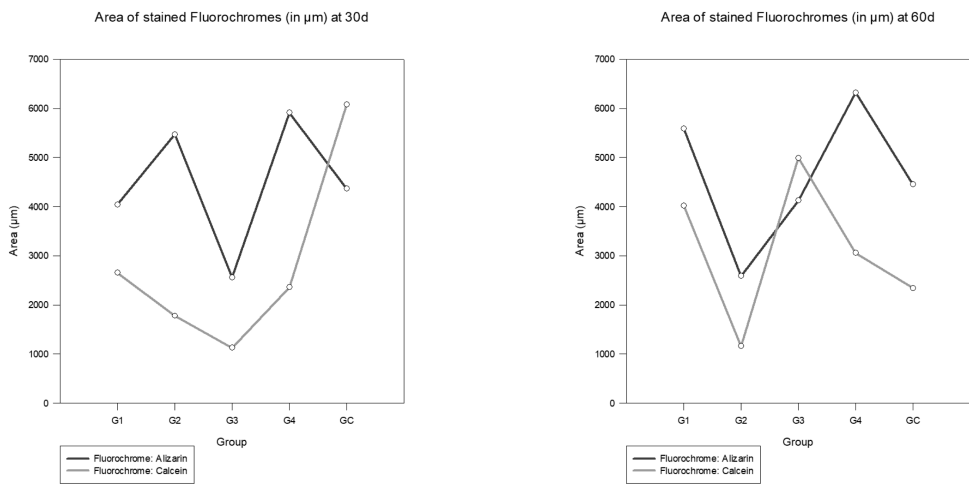
Além disso há relatos na literatura que reiteram que hidroxiapatitas sintéticas apresentam boa biocompatibilidade e bioatividade, além de propriedades mecânicas adequadas quando apresentam composição similar a orgânica (Wang et al., 2019) e dessa forma é um material que melhora a atividade e a viabilidade celular conferindo osteocondutividade e por isso apresentou-se como um excelente biomaterial para regenerações ósseas.



**Figura 18:** Graficos representativos das analises de micro ct, BVTV(porcentagem total do volume ósseo); Tb.Sp (separação das trabéculas), Tb/Th (espessura do trabeculado), Tb.N (número de trabéculas), Po.tot (porosidade total)



**Figura 19:** Reconstrução das imagens de microscopia confocal a laser, imagens green representam osso corado com calceína, em vermelho coradas com alizarina, e os overlays são sobreposições das imagens



**Figura 20:** Gráfico representando a microscopia confocal a laser, calceína representa formação óssea nos períodos iniciais, e as de alizarina formação óssea nos períodos tardios.

Podemos visualizar na figura 19 as amostras após aplicação de calceína e alizarina, e suas sobreposições. As imagens em vermelho representam a precipitação de

alizarina e o osso neoformado nos períodos tardios, portanto tanto qualitativamente na figura 19, quanto quantitativamente na figura 20 (Faverani et al., 2018) podemos observar que houve turn over de tecido ósseo em todos os grupos, exceto no G2, onde houve uma pequena formação que não é representada propriamente dita por tecido ósseo, pois não há presença de partículas e nem grânulos, ela representa um tecido conjuntivo que foi corado, que será visualizado nas imagens de H&E. Apenas o fator fluorocromo entre calceína e alizarina teve diferença estatística  $p=0,006$  e G3:COL entre os períodos de 30d e 60d ( $p=0,032$ ) foi estatisticamente significativa entre verde e vermelho.

Os resultados da microscopia confocal corroboram com os dados encontrados nas análises de MicroCT, onde foi possível observar a disponibilidade de tecido ósseo nos grupos GC:AUT, G1:HAp, G3:COL e G4:BIOOSS nos períodos de 30 e 60 dias, e a não formação do mesmo tecido em G2. Diferente do esperado o efeito da incorporação dessa cadeia cíclica de fosfato a estrutura da hidroxiapatita não foi tão efetivo para remineralização óssea quanto é para o esmalte dentário (da Camara et al., 2014), abrindo a hipótese de que a concentração de fosfato utilizada pode ter sido excessiva se comparada a concentração desse íon na hidroxiapatita, provavelmente interferindo assim no metabolismo ósseo e prejudicando o reparo.

Defeitos em modelos de calvária são considerados críticos quando não possuem a capacidade de se regenerar espontaneamente (Danieletto-Zanna et al., 2020), e tem sido amplamente utilizados no desenvolvimento de técnicas regenerativas e biomateriais (Gomes & Fernandes 2011; Hudieb et al., 2021). Há uma gama de estudos que utilizam defeitos críticos de 8mm (Farnezi-Bassi et al., 2020; Schmidt et al., 2019; Messoria et al., 2008), neste estudo foi utilizado um defeito de 5mm, porém na literatura encontra-se controvérsias entre defeitos de 4mm-8mm e muitos pesquisadores têm adotado o tamanho utilizado em nossa pesquisa (Hudieb et al., 2021; Fabris et al., 2018; Luvizuto et al., 2011). Hudieb et al., 2021 analisou em seu estudo defeitos de 3mm, 5mm e 8mm em ratos jovens e idosos, e apenas o defeito de 3mm teve o seu fechamento completo sem auxílio de materiais osteocondutores, e em ratos jovens houve o fechamento de defeitos de 4mm, mas não em ratos idosos.

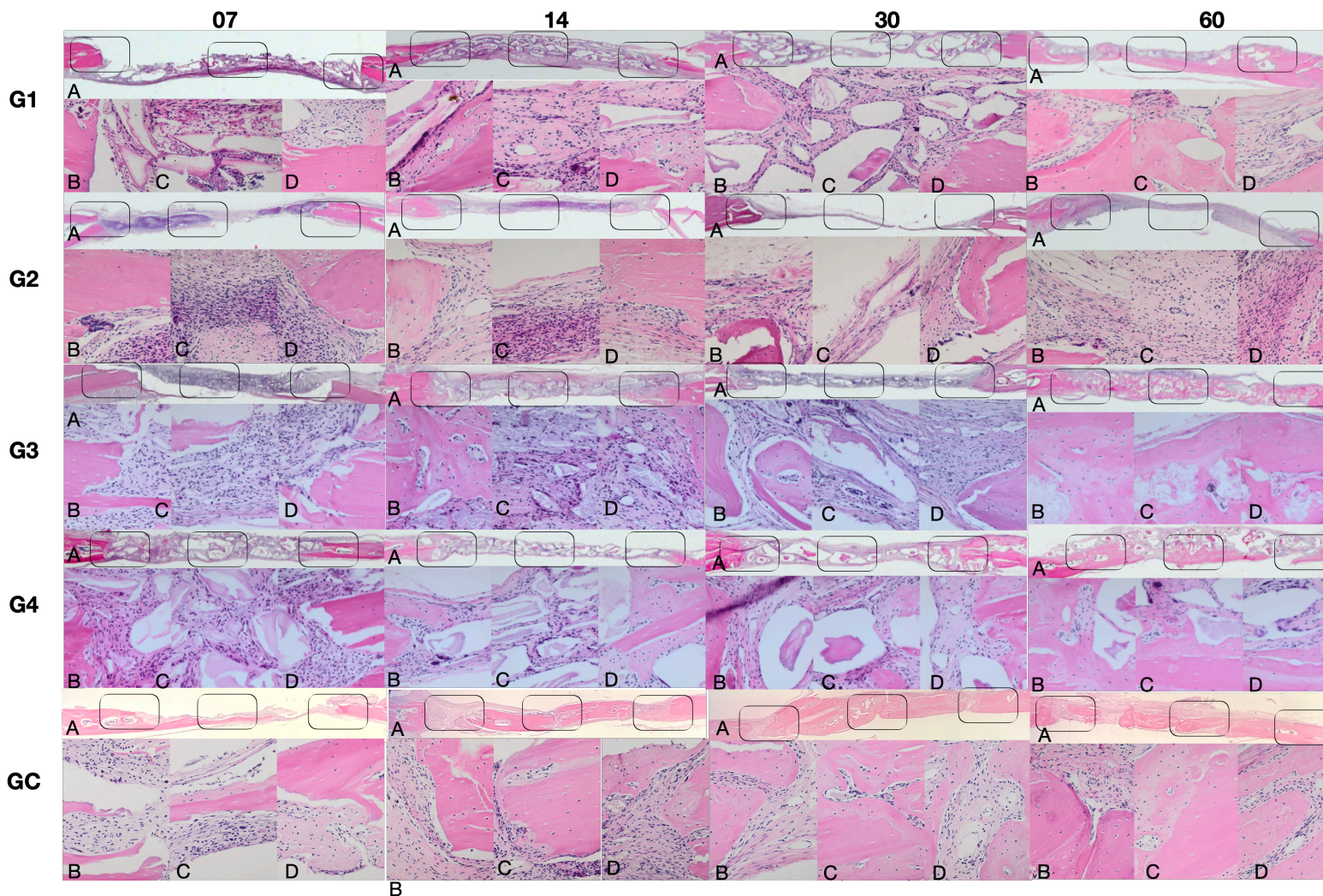
Como resultados da análise dos tecidos desmineralizados e corados em H&E, podemos observar na figura 21, no G1:HAp, podemos observar que as partículas se mantiveram presentes no defeito durante todos os tempos cirúrgicos, nos períodos finais de 30 (42,23%) e 60 (61,07%) dias foi observada formação óssea relevante,

principalmente em 60 dias com o fechamento do defeito, entre os tempos houve diferença estatística quando comparados os períodos de 7 e 60 dias de turnover ósseo ( $p=0,017$ ).

No G2:HMP, como esperado e corroborando com os resultados apresentados anteriormente, não houve fechamento do defeito por tecido ósseo, o mesmo foi fechado com tecido conjuntivo fibroso, apenas pode ser observado alguma formação óssea próxima aos cotos, e em algumas amostras raras ilhas ósseas. Não foi observada presença de partículas de HAp nos defeitos e nos períodos iniciais, houve grande presença de células inflamatórias, se assemelhando com os resultados obtidos pela análise de tecidos subcutâneos. Além foram visualizada maior presença de células sugestivas de osteoclastos nessas amostras, não havendo diferença estatística entre os tempos deste grupo.

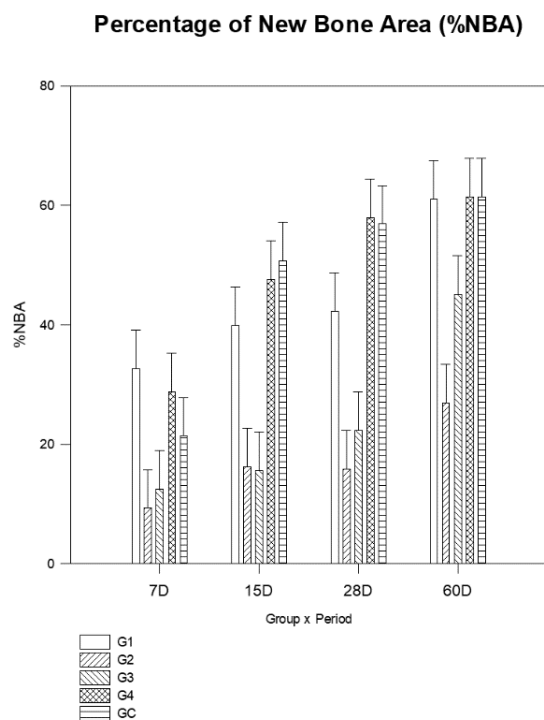
O grupo com colágeno G3, assim como G1, apresentou resultados igualmente promissores em sua capacidade de formação óssea, no período de 60 dias é visualizado o tecido ósseo maduro no fechamento do defeito e de partículas ainda presentes apresentando 45,09% de formação óssea. Houve diferença entre os tempos de 7 vs 60d ( $p=0,005$ ) e 15 vs 60d ( $p=0,013$ ).

Bio-Oss<sup>®</sup> G4, e GC: osso autógeno foram utilizados como controles comparativos neste experimento, sendo um considerado um dos biomateriais comercialmente disponíveis melhores em biocompatibilidade e efetividade (Lambert et al., 2016; Cordaro et al., 2008) e o outro padrão ouro de regeneração óssea (Al-Nawas et al., 2014; Gali et al., 2017) segundo a literatura. Ambos apresentaram resultados esperados e satisfatórios, com disponibilidade de tecido ósseo neoformado e fechamento do defeito. Estatisticamente entre os tempos G4 apresentou diferenças entre 7 vs 60d ( $p=0,005$ ) e 14 vs 60d ( $p=0,014$ ), enquanto GC o período de 7 dias se apresentou diferente dos tempos de 14,30 e 60d ( $p<0,001$ ;  $p=0,013$ ;  $p=0,002$ ).



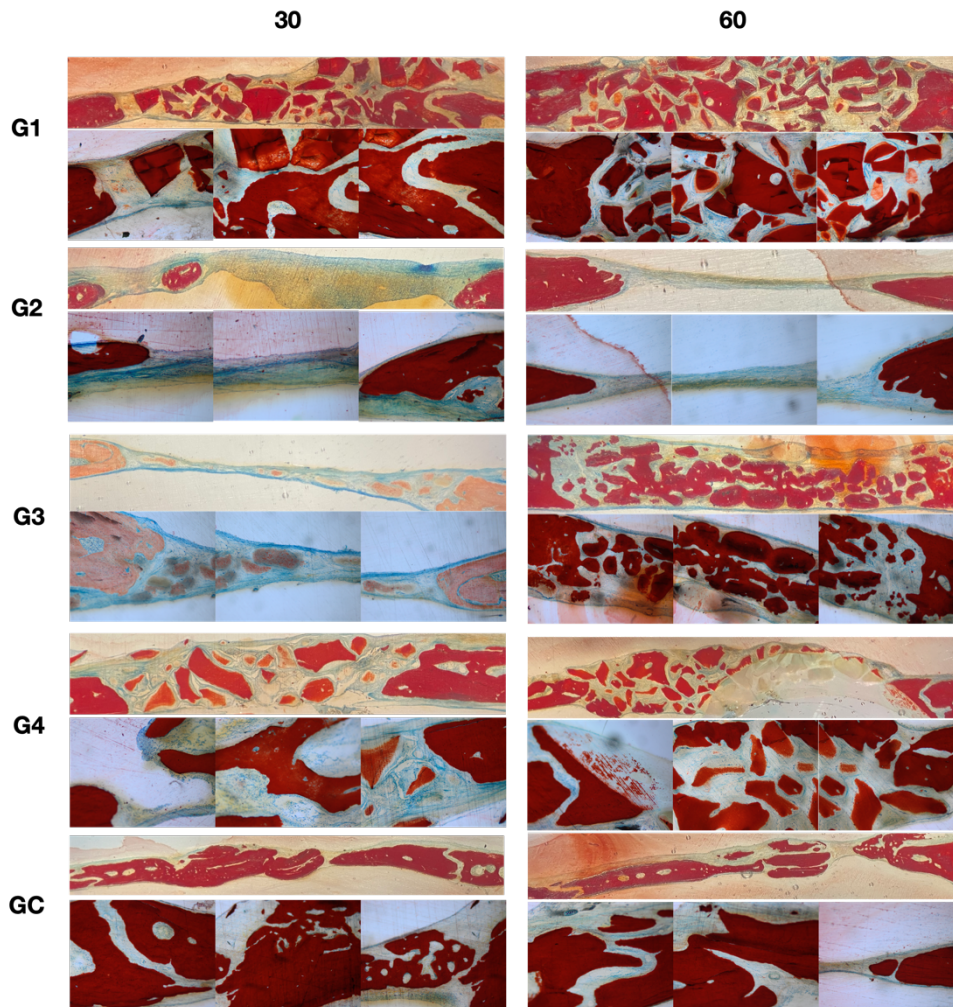
**Figura 21:** H&E das amostras G1: HAp 7,14,28 e 60 dias, G2: HMP 7,14,28 e 60 dias, G3: COL 7,14,30 e 60 dias, G4: BIOOSS 7,14,28 e 60 dias, GC: AUT 7,14,28 e 60 dias, a letra (A) nas imagens representa a foto panorâmica da lâmina, (B) representa o coto1 (C) centro do defeito, (D) coto 2.

Quando comparado o fator tempo entre os grupos, no período de 7d não houve diferença entre os grupos, já no período de 14d GC vs. G3 ( $p=0,004$ ), GC vs. G2( $p=0,004$ ), G4 vs. G3 ( $p=0,010$ ), G4 vs. G2 ( $p=0,011$ ). Durante o tempo de 30d houve diferença entre G4 vs G2 ( $p<0,001$ ) e G3 ( $p=0,003$ ), GC vs G2 ( $p<0,001$ ) e G3 ( $p=0,004$ ) e G1 vs G2 ( $p=0,005$ ). No período tardio de 60d foi estatisticamente significativa as diferenças o G2 e os grupos G4 ( $p=0,005$ ), GC ( $p=0,005$ ) e G1( $p=0,005$ ).



**Figura 22:** Gráfico representivo da análise estatística ANOVA dois fatores das amostras de H&E, G1: HAp 7,14,2 8 e 60 dias, G2: HMP 7,14,30 e 60 dias, G3: COL 7,14,2 8 e 60 dias, G4: BIOOSS 7,14,2 8 e 60 dias, GC: AUT 7,14,2 8 e 60 dias

Compilando todos os resultados descritos a cima, tanto na os obtidos *in vitro* quanto *in vivo*, as partículas de HAp G1 e HAp modificadas com colágeno G3 apresentaram resultados satisfatórios e promissores para a elaboração de um novo biomaterial a ser disponibilizado comercialmente, ambas apresentaram-se estáveis do ponto de vista da caracterização, não tóxicos segundo a análise de cultura de células e potencial neoformação óssea. Nos testes em animais, nos tecidos subcutâneos apresentaram resposta inflamatória satisfatória, e nos tecidos mineralizados e desmineralizados potenciais de neoformação óssea comprovados por esses testes e apresentando resultados equivalentes ao Bio-Oss G4 e autógeno GC.



**Figura 23:** Lâminas com a coloração estevenel blue e vermelho de alizarina, feita em tecidos calcificados após as análises em microscópio confocal, as imagens coradas em vermelhos representam tecido ósseo e partículas, e em azul tecido conjuntivo.

Embora acredita-se que a Hap sintética acelere a diferenciação osteoblástica, há estudos que se aprofundam na metabolização óssea em relação ao fosfato que chamam a atenção da ectoenzima ALP presente na membrana de osteoblastos que é responsável pela regulação do metabolismo do fosfato via hidrólise sendo também um marcador da diferenciação osteoblástica; esse estudo concluiu que em baixas concentrações, há um aumento da atividade da ALP e consequente aumento na diferenciação celular e secreção de colágeno, enquanto que em concentrações maiores, não há efeito significativo, portanto seu resultado pode ser dose-dependente de forma a interferir no grau de absorção, proliferação e diferenciação osteoblástica (Wang et al., 2019).

Portanto especula-se que o G2 pode não ter obtido resultados satisfatórios devido a concentração de HMP ser maior que a de HAp durante sua modificação superficial (80/20 p/v). Por isso faria-se necessária a realização de outros estudos que avaliassem o uso do HMP em diferentes concentrações no reparo ósseo já que, na concentração

utilizada nesse estudo os resultados não foram satisfatórios. Porém quando testados em diferentes concentrações misturados a denfrícios, as maiores concentrações apresentaram dissolução de discos de HAp (do Amaral et al., 2015).

Estudos recentes demonstram HMP pode realmente desencadear dissolução de HAp, sem danificar a matriz colágena, Eisenstein et al., 2016 realizou um experimento utilizando HMP, EDTA, água ultra pura, trimetafosfato e pirofosfato para quantificar a dissolução de HAp nestes meios, e HMP dissolveu 30,2% das partículas de HAp em 504h enquanto EDTA dissolveu 95%, e os outros componentes tiveram resultados irrelevantes. Mas quando extrapolados esses experimentos para nossa modificação superficial, há a possibilidade da solução supersaturada de HMP ter dissolvido grande parte das partículas de HAp que estariam sendo modificadas.

Especulando-se assim para a utilização deste composto em diferentes aplicações e novas abordagens de tratamentos, não mais para neoformação óssea, mas para a tratamentos de doenças ósseas ectópicas tanto para prevenir essa comorbidade quanto para reverter o quadro já instalado (Robinson et al., 2020), pois seu mecanismo de ação dissolveria HAp, inibindo sua precipitação através da alteração de pH no local, controlada pela ação da ALP (Eisenstein et al., 2016). E vem sendo estudado com potencial tratamento para dissolução de cálculos renais e prevenção da formação de novos cálculos no organismo (Robinson et al., 2020 b)

## **5. Conclusão**

Diante dos resultados podemos concluir que:

- As partículas sintetizadas e caracterizadas em nosso trabalho apresentam características semelhantes a HAp natural e a comercialmente disponível Bio-Oss; além disso apresentaram-se seguras quanto a sua toxicidade testadas em culturas de células osteoblasticas,
- G1-HAp e G3-HAp+COL apresentaram comportamento favorável e viável na neoformação óssea comparado ao G4-Bio-Oss substituto ósseo comercialmente disponível, tornando-se uma futura alternativa para utilização em regenerações ósseas.

## 6. Referências

1. Aguilar-Carrasco JC, Rodríguez-Silverio J, Jiménez-Andrade JM, Carrasco-Portugal MeC, Flores-Murrieta FJ. (2014) Relationship between blood levels and the anti-hyperalgesic effect of ketoprofen in the rat. *Drug Dev Res.*; 189-94.
2. Al-Nawas B, Schiegnitz E. (2014) Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Oral Implantol.* Summer;7 Suppl 2:S219-34.
3. Bae WJ, Auh QS, Kim GT, Moon JH, Kim EC. (2016) Effects of sodium tri- and hexameta-phosphate in vitro osteoblastic differentiation in Periodontal Ligament and Osteoblasts, and in vivo bone regeneration. *Differentiation.* 257-269.
4. Bakhtiari L, Javadpour J, Rezaie HR, Erfan M, Mazinani B, Aminian A. (2016) Pore size control in the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles: The effect of pore expander content and the synthesis temperature. *Ceramics International.* *Ceramics International.* 11259–11264
5. Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. (2006) Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials.* 2798-805
6. Beloti MM, Martins W Jr, Xavier SP, Rosa AL. (2008) In vitro osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. *Clin Oral Implants Res.* 48-54.
7. Bigi, A.; Boanini, E.; Capuccini, C.; Gazzano, M. (2007) Strontium-Substituted Hydroxyapatite Nanocrystals. *Inorganica Chim. Acta,* 1009–1016.
8. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. 2010. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 25(7):1468-86
9. Camolezi, F. L.; Daghasanli, K. R. P.; Magalhães, P. P.; Pizauro, J. M.; Ciancaglini, P. (2002). Construction of an Alkaline Phosphatase-Liposome System: A Tool for Biomineralization Study. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*1091–1101.
10. Chan CK, Kumar TS, Liao S, Murugan R, Ngiam M, Ramakrishnan S. (2006). Biomimetic nanocomposites for bone graft applications. *Nanomedicine (Lond).* 177-88.

11. Choi, J.Y., Lee, B.H., Song, K.B., Park, R.W., Kim, I.S., Sohn, K.Y., Jo, J.S. & Ryoo, H.M. (1996) Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 609–618.
12. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. (2008). Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 796-803
13. Costa, A. C. F. M.; Lima, M. G.; Lima, L. H. M. A.; Cordeiro, V. V; Viana, K. M. S. (2009). Hidroxiapatita : Obtenção , Caracterização E Aplicações. 29–38.
14. Cruz, M. A. E.; Ruiz, G. C. M.; Faria, A. N.; Zancanela, D. C.; Pereira, L. S.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. Calcium Carbonate Hybrid Coating Promotes the Formation of Biomimetic Hydroxyapatite on Titanium Surfaces. *Appl. Surf. Sci.* 2016, 370, 459–468.
15. Dal-Fabbro R, Marques-de-Almeida M, Cosme-Silva L, Ervolino E, Cintra LTA, Gomes-Filho JE. (2019). Chronic alcohol consumption increases inflammation and osteoclastogenesis in apical periodontitis. *Int Endod J.* Mar;52(3):329-336
16. da Camara DM, Miyasaki ML, Danelon M, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on in vitro enamel demineralization. *J Dent* 42 (2014),pp.256–262
17. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Santos Souza JA, Danelon M, Delbem AC. (2015). Synergistic effect of fluoride and sodium hexametaphosphate in toothpaste on enamel demineralization in situ. *J Dent.* 1249-1254.
18. Danieletto-Zanna CF, Bizelli VF, Ramires GADA, Francati TM, de Carvalho PSP, Bassi APF. (2020)Osteopromotion Capacity of Bovine Cortical Membranes in Critical Defects of Rat Calvaria: Histological and Immunohistochemical Analysis. *Int J Biomater.*
19. de Faria A.N., Zancanela D.C., Ramos A.P., Torqueti M.R., Ciancaglini P. (2015). Estrogen and phenol red free medium for osteoblast culture: study of the mineralization ability, *Cytotechnology.*
20. de Souza, I. D.; Cruz, M. a E.; de Faria, A. N.; Zancanela, D. C.; Simão, A. M. S.; Ciancaglini, P.; Ramos, A. P. (2014). Formation of Carbonated Hydroxyapatite Films on Metallic Surfaces Using Dihexadecyl Phosphate-LB Film as Template. *Colloids Surf. B. Biointerfaces,* 31–40.

21. do Amaral JG, Delbem ACB, Pessan JP, Manarelli MM, Barbour ME. (2015). Effects of polyphosphates and fluoride on hydroxyapatite dissolution: A pH-stat investigation. *Arch Oral Biol.* Mar;63:40-46
22. Doostmohammadi A, Monshia A, Salehic R, Fathia M.H., Karbasid S, Pieles U, Daniels A.U. (2012) .Preparation, chemistry and physical properties of bone-derived hydroxyapatite particles having a negative zeta potential.. *Mater. Chem. Phys.* 446–452
23. Dorozhkin SV. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. (2010). *Acta Biomater.* 715-34.
24. Downs, R. T. & Hall-Wallace, M. (2003). *The American Mineralogist Crystal Structure Database.* 247–250.
25. Eisenstein N , Williams R , Cox S , Stapley S , Grover L. (2016). Enzymatically regulated demineralisation of pathological bone using sodium hexametaphosphate. *J Mater Chem B.*
26. Esteves JC, Borrascia AG, Aranega AM, Garcia Junior IR, Magro Filho O. (2011). Histomorphometric analysis of the repair process of autogenous bone grafts fixed at rat calvaria with cyanoacrylate. *J Appl Oral Sci.* 529-34.
27. Esteves JC, Monteiro JM, Aranega AM, Betoni Junior W, Sonoda CK. (2014). Utilization of ethyl cyanoacrylate and 2-octyl cyanoacrylate adhesives for autogenous bone graft fixation: histomorphometric study in rats. *J Oral Implantol.* 411-7.
28. Farnezi Bassi AP, Bizelli VF, Brasil LFM, Pereira JC, Al-Sharani HM, Momesso GAC, Faverani LP, Lucas FA. Is the Bacterial Cellulose Membrane Feasible for Osteopromotive Property? (2020) *Membranes (Basel).* Sep 12;10(9):230.
29. Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC2, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Luvizuto ER, Gruber R, Okamoto R. (2018). Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig.* 255-265.
30. Freshney R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications,* / R. Ian Freshney. – 7th ed. Includes index. ISBN 978-1-118-87365-6. 1- Tissue culture-Laboratory manuals, 2-Cell culture- Laboratory manuals Title. QH565.2.F74 2016
31. Gali RS, Devireddy SK, Mohan Rao N, Kishore Kumar RV, Kanubaddy SR, Dasari M, Sowjanya K, Pathapati RM. (2017). Autogenous Bone Marrow Aspirate Coated

- Synthetic Hydroxyapatite for Reconstruction of Maxillo-Mandibular Osseous Defects: A Prospective Study. *J Maxillofac Oral Surg.* 71-78.
32. Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, Sader R, Unger RE, Ziegler G, Kirkpatrick CJ. (2012). The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed Mater.*
  33. Gomes-Ferreira PHS, de Oliveira D, Frigério PB, de Souza Batista FR, Grandfield K, Okamoto R. (2020). Teriparatide improves microarchitectural characteristics of peri-implant bone in orchietomized rats. *Osteoporos Int.* 31(9):1807-1815
  34. Gomes PS, Fernandes MH. (2011). Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim .* 14-24
  35. Gregory, C., Gunn, W. G., Peister, A. & Prockop, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: (2004). Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* 77–84
  36. Hartree E.F., (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response., *Anal. Biochem.* 422–427.
  37. Hatakeyama J, Anan H, Hatakeyama Y, Matsumoto N, Takayama F, Wu Z, Matsuzaki E, Minakami M, Izumi T, Nakanishi H. (2019). Cite Share Induction of bone repair in rat calvarial defects using a combination of hydroxyapatite with phosphatidylserine liposomes. *J Oral Sci.;*
  38. Hudieb M, Haddad A, Bakeer M, Alkhazaaleh A, AlKhader M, Taani D, Kasugai S. (2021). Cite Share Influence of Age on Calvarial Critical Size Defect Dimensions: A Radiographic and Histological Study. *J Craniofac Surg.*
  39. International Organization for Standardization. Dentistry - preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials: ISO/TR 7605-1997(E). Switzerland: ISO, 1997.
  40. Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, a I. & Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 295–312

41. Jensen T, Schou S, Gundersen HJ, Forman JL, Terheyden H, Holmstrup P. (2013). Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in mini pigs. *Clin Oral Implants Res.* 635-44.
42. Jones C.W., Smolinski D., Keogh A., Kirk T.B., Zheng M.H., (2005). Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research, *Prog. Histochem. Cytochem.* 1–71.
43. Kulaev IS, Vagabov VM, Kulakovskaya TV. (2005). The biochemistry of inorganic polyphosphates. 2nd ed. John Wiley & Sons; pp. 294.
44. Kumara GS, Karunakaranb G, Girijad EK, Kolesnikovb E, Van Minh N, Gorshenkove MV, Kuznetsovb D. Size and morphology-controlled synthesis of mesoporous hydroxyapatite nanocrystals by microwave-assisted hydrothermal method. *Ceramics International.* *Ceramics International* 44 (2018) 11257–11264
45. Lambert F, Bacevic M, Layrolle P, Schüpbach P, Drion P, Rompen E. (2016). Impact of biomaterial microtopography on bone regeneration: comparison of three hydroxyapatites. *Clin Oral Implants Res.*
46. Lanigan RS. (2001). Final report on the safety assessment of Sodium Metaphosphate, Sodium Trimetaphosphate, and Sodium Hexametaphosphate. *Int J Toxicol.*
47. Lohmann P, Willuweit A, Neffe AT, Geisler S, Gebauer TP, Beer S, Coenen HH, Fischer H, Hermanns-Sachweh B, Lendlein A, Shah NJ, Kiessling F, Langen KJ. (2017). Bone regeneration induced by a 3D architured hydrogel in a rat critical-size calvarial defect. *Biomaterials.* 158-169
48. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. (2011). The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of beta-tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials.* :3855-61.
49. Ma MG. (2012). Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity. *Int J Nanomedicine.*1781–1791.
50. Mahamid, J.; Sharir, A.; Gur, D.; Zelzer, E.; Addadi, L.; Weiner, S. (2011). Bone Mineralization Proceeds through Intracellular Calcium Phosphate Loaded Vesicles: A Cryo-Electron Microscopy Study. *J. Struct. Biol.* 527–535.
51. Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sánchez Mdel P, Okamoto T, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali C. (2015). Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig.* 1319-27.

52. Markovic M, Fowler BO, Tung MS. (2004). Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material. *J Res Natl Inst Stand Technol.* 553-68
53. Mazock JB, Schow SR, Triplett RG. (2004). Proximal tibia bone harvest: review of technique, complications, and use in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 586-93.
54. Messoria MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al., . (2008). Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.;* 723-9.
55. Miron RJ, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D. (2011). Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. *J Dent Res.* 1428-33
56. Miron RJ, Sculean A, Shuang Y, Bosshardt DD, Gruber R, Buser D, Chandad F, Zhang Y. (2016). Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA. *Clin Oral Implants Res.* 668-75.
57. Mladenović Ž, Sahlin-Platt A, Andersson B, Johansson A, Björn E, Ransjö M. (2013). In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. *Clin Oral Implants Res.* 329-35
58. Morisue H, Matsumoto M, Chiba K, Matsumoto H, Toyama Y, Aizawa M, Kanzawa N, Fujimi TJ, Uchida H, Okada I. (2006). A novel hydroxyapatite fiber mesh as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone union in rat posterolateral fusion model. *Spine (Phila Pa 1976).* 1194-200.
59. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays., *J. Immunol. Methods.* 55–63.
60. Muzio G, Martinasso G, Baino F, Frairia R, Vitale-Brovarone C, Canuto RA. (2014). Key role of the expression of bone morphogenetic proteins in increasing the osteogenic activity of osteoblast-like cells exposed to shock waves and seeded on bioactive glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomater Appl.* 728-36.
61. Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR. (2007). Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? *Cell Tissue Bank.* 81-91.

62. Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW. (2004). Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 157-63.
63. Ohgaki, M.; Kizuki, T.; Katsura, M.; Yamashita, K. (2001). Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. p. 2–3.
64. Orsini G, Traini T, Scarano A, Degidi M, Perrotti V, Piccirilli M, Piattelli A. (2005). Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 448-57.
65. Pedrosa WF Jr, Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. (2009). Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res.* 1254-64.
66. Perri de Carvalho, AC; Okamoto T. (1987) .*Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clinica.* Ed. Panamericana,
67. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. (2015). Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt.*
68. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GA, Luvizuto ER, de Oliveira Puttini I, Okamoto R. (2016). Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig.*
69. Robinson TE, Eisenstein NM, Cox SC, Moakes RJA, Thompson AM, Ahmed Z, Hughes EAB, Hill LJ, Stapley SA, Grover LM. (2020). Cite Share Local injection of a hexametaphosphate formulation reduces heterotopic ossification in vivo. *Mater Today Bio.*
70. Robinson TE, Hughes EAB, Wiseman OJ, Stapley SA, Cox SC, Grover LM. (2020). Hexametaphosphate as a potential therapy for the dissolution and prevention of kidney stones. *J Mater Chem B.* (24):5215-5224 (b)
71. Rosales-Leal J.I., Rodríguez-Valverde M.A., Mazzaglia G., Ramón-Torregrosa P.J., Díaz-Rodríguez L., García-Martínez O., (2010). Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.*;365(1–3):222–9.

72. Ruiz GCM, Cruz MAE, Faria AN, Zancanela DC, Ciancaglini P, Ramos AP. (2017). Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*102-110.
73. Sadat-Shojai, M.; Khorasani, M. T.; Dinpanah-Khoshdargi, E.; Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, p. 7591–7621,.
74. Salamanca E, Hsu CC, Huang HM, Teng NC, Lin CT, Pan YH, Chang WJ. (2018). Bone regeneration using a porcine bone substitute collagen composite in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 984.
75. Schmidt LE, Hadad H, Vasconcelos IR, Colombo LT, da Silva RC, Santos AFP, Cervantes LCC, Poli PP, Signorino F, Maiorana C, Carvalho PSP, Souza FÁ. (2019). Critical Defect Healing Assessment in Rat Calvaria Filled with Injectable Calcium Phosphate Cement. *J Funct Biomater.* May 13;10(2):21
76. Shi Z., Huang X., Cai Y., Tang R., Yang D. (2009). Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells, *Acta Biomater.* 338–345.
77. Simão, A. M. S.; Beloti, M. M.; Rosa, A. L.; de Oliveira, P. T.; Granjeiro, J. M.; Pizauro, J. M.; Ciancaglini, P. (2007). Culture of Osteogenic Cells from Human Alveolar Bone: A Useful Source of Alkaline Phosphatase. *Cell Biol. Int.*, 1405–1413.
78. Tovani C. B., Zancanela D. C., Faria A. N., Ciancaglini P., Ramos A. P. (2016). Bio-inspired synthesis of hybrid tube-like structures based on CaCO<sub>3</sub> and type I-collagen. : *RSC Adv.*, ,
79. Trubiani O, Fulle S, Traini T, Paludi M, la Rovere R, Orciani M, Caputi S, Piattelli A. (2010). Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone-arrangement in human osteoblasts seeded on an anorganic bovine bone biomaterial. *Eur Cell Mater.* 72-83.
80. Zancanela DC, de Faria AN, Simão AM, Gonçalves RR, Ramos AP, Ciancaglini P. (2016). Multi and single walled carbon nanotubes: effects on cell responses and biomineralization of osteoblasts cultures. *J Mater Sci Mater Med.*
81. Zancanela DC, Simão AM, Francisco CG, de Faria AN, Ramos AP, Gonçalves RR, Matsubara EY, Rosolen JM, Ciancaglini P. (2016). Graphene oxide and titanium: synergistic effects on the biomineralization ability of osteoblast cultures. *J Mater Sci Mater Med.*

82. Zhou H, Yang M, Hou S, Nif X, Bic Y, Wang W, Kutty MG, Yang L. (2017). Tailoring the morphological features of hydrothermally synthesized mesoporous hydroxyapatite using polyphenols and phosphate sources. *Ceramics International* 12851–12856



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 "Avaliação dos efeitos da incorporação de nanopartículas de hexametáfosfato (HMP) à hidroxiapatitas desmineralizadas na resposta inflamatória e neoformação óssea: Estudo in vivo", Processo FOA nº 00142-2018, sob responsabilidade de Felippo Ramos Verri apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 13 de Abril de 2018.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 14 de Abril de 2020.

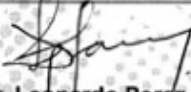
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 14 de Maio de 2020.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the effects of the incorporation of hexamethphosphate nanoparticles (HMP) to the demineralized hydroxiapatites in the inflammatory response and bone neoformation: in vivo study", Protocol FOA nº 00142-2018, under the supervision of Felippo Ramos Verri presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 13, 2018.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** April 14, 2020.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** May 14, 2020.

  
Prof. Ass. Dr. Leonardo Pergz Faverani  
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

## *Anexo B* - Author Guidelines for Publishing in Archives of Oral Biology

### **Types of Contribution**

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

### ***Page charges***

This journal has no page charges.

### **Submission checklist**

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts* (where applicable)

*Highlights* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made

- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements



## Before You Begin

### Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

### Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

## Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck. *Preprints*

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

## Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

## Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

## Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

## ***Changes to Authorship***

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and to provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

## ***Article transfer service***

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

## **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

## ***Author rights***

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

### *Elsevier Researcher Academy*

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.



### **Preparation**

### **Queries**

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

## Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

## REVISED SUBMISSIONS

When submitting the revised manuscript, please make sure that you upload the final version of the paper with the changes highlighted. Please remove the old version(s) of the manuscript before submitting the revised version.

### *Use of word processing software*

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To minimize unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. **Article structure**

### *Manuscript Structure*

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Tables and then Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

### *Introduction*

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The

introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

### ***Materials and Methods***

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

### ***Results or Findings***

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### ***Conclusions***

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

## **Essential title page information**

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### **Structured abstract**

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible. *Acknowledgements* Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the

references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

### ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Bacterial nomenclature**

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

### **Artwork**

#### ***Image manipulation***

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the

following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

### ***Electronic artwork***

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi. **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### *Illustration services*

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables should be placed on separate page(s) towards the end of the manuscript (see Manuscript Structure, above). Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

### *APA (American Psychological Association) 7th Edition*

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.  
*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted

chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.  
*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number: Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, e00205.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book: Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.  
Reference to a website: Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset: [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation: Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

## **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

## **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page. **Data linking** If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#). For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). **Mendeley Data** This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#). **Data statement** To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



## **After Acceptance**

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

## Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

## Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- n values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply n=50 when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that  $P=0.000$  (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is  $P<0.0005$ .