

Maria Juliana Sismeiro Dias Morabito

Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos tratados com biomateriais nanocompósitos de poliamida 6 e nanopartículas detrimetafosfato decoradas com nanopartículas de prata: estudo histomorfométrico, microtomográfico e imunoistoquímico em calvárias de ratos

Araçatuba

2021



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

### Maria Juliana Sismeiro Dias Morabito

Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos tratados com biomateriais nanocompósitos de poliamida 6 e nanopartículas detrimetafosfato decoradas com nanopartículas de prata: estudo histomorfométrico, microtomográfico e imunoistoquímico em calvárias de ratos

> Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campusde Araçatuba, para obtenção de título de Mestre em Ciência Odontológica - Área de Concentração: Saúde Bucal da Criança.

> > Orientador: Prof<sup>®</sup>. Titular. Alberto Carlos Botazzo Delbem Coorientador: Prof<sup>a</sup> Associada Maria José Hitomi Nagata

### Catalogação-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - FOA / UNESP

	Morábito, Maria Juliana Sismeiro Dias.
M827a	Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos tratados
	com biomateriais nanocompósitos de poliamida 6 e nanopar-
	tículas de trimetafosfato decoradas com nanopartículas de
	prata : estudo histomorfométrico, microtomográfico e
	imunoistoquímico em calvárias de ratos / Maria Juliana
	Sismeiro Dias Morábito – Aracatuba 2021
	$43 \text{ f} \cdot \text{il } 11 \cdot \text{tab}$
	+5 1 II. 11 , tub.
	Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
	Paulista, Faculdade de Odontologia de Aracatuba
	Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem
	Coorientadora: Profa Maria Iosé Hitomi Nagata
	Coorientadora. 1 Tora: Maria José Tritonii Magada
	1 Nanocompostos 2 Fosfatos 3 Prata 4 Nanopartículas
	5 Imuno-histoquímica I T
	5. muno-mstoquimea 1. 1.
	Black D27
	CDD 617 645
	CDD 017.045

Claudio Hideo Matsumoto - CRB-8/5550

# Dedicatória

Dedico este trabalho,

### Aos meus pais Júlio César e Maria Cristina

Por ssempre acreditarem em mim, serem meus maiores incentivadores e me apoiarem durante esta trajetória. Vocês são os melhores presentes de Deus na minha vida e todas as minhas conquistas serão sempre dedicadas a vocês!

# Agradecimentos Especiais

### A Deus

O responsável por me sustentar até aqui e por abrir meu coração, durante essa desafiadora trajetória, para vivenciar uma fé até então desconhecida por mim, por ter ouvido e acolhido, com muito carinho, cada prece por mim realizada. Obrigada por me ajudar a compreender e confiar nos seus planos, por cada sussurro de coragem proclamado nos meus ouvidos, por me permitir te sentir a cada oração e por cuidar, com tanto zelo, de cada passo do meu caminho. O Senhor me deu muito mais do que eu merecia e, então, encerro essa jornada com a certeza de que o controle de todas as situações sempre está em suas mãos e de que sou uma filha muito querida e abençoada.

"Portanto, eu digo: Tudo o que vocês pedirem em oração, creiam que já o receberam, e assim sucederá" (Marcos 11:24)

### Aos meus pais

À minha mãe, Maria Cristina, pelo seu infinito amor por mim, por nunca ter perdido a paciência, mesmo sem compreender, muitas vezes, os motivos da minha ansiedade e desespero nos momentos de maiores dificuldades. Obrigada por me encorajar, por me apoiar em todas as minhas decisões, por ensinar a me dedicar à carreira que escolhi, por me ajudar a acreditar na minha capacidade e por ser meu ponto de paz e equilíbrio nos momentos de crise.

Ao meu pai, Júlio, por nunca medir esforços para que os meus sonhos se realizassem. Obrigada por sempre acreditar em mim muito mais do que eu mesma acredito, por ter me ensinado a ir em busca dos meus sonhos e me mostrado que as melhores conquistas são frutos do nosso sacrifício. Mesmo com seu jeito "durão" de ser, consigo sentir, em cada gesto, o seu amor por mim e pelo meu irmão e sua preocupação em sempre nos conduzir pelo caminho do bem e da honestidade. Você é um exemplo de dedicação e cuidado à família e desejo que, um dia, eu possa retribuir tudo o que fez e faz por nós.

Vocês me deram asas muito cedo, me ensinaram que sou capaz de voar e pousar onde quer que eu deseje. Mas, acima de tudo, me mostraram que o meu refúgio sempre será em vossos colos e vossas palavras sempre serão minha motivação e combustível para alçar novos voos!

### Ao meu irmão, Júlio

Irmãos são dádivas de Deus. Obrigada por dividir, comigo, os maiores tesouros de nossas

vidas. Mesmo com a distância que nos separou por muito tempo, sei do seu carinho e torcida para que as coisas sempre dessem certo para mim. Sou muito grata por ter com quem contar para sempre.

# À toda minha família

Por mais que as circunstâncias dos últimos dois anos tenham impedido de estarmos tão juntos quanto gostaríamos, nos meus momentos de maior dificuldade, quando eu fechava os olhos e me lembrava da presença de cada um de vocês em minha vida, eu só conseguia agradecer. Obrigada por serem os melhores possíveis, por estarem sempre ao medo lado e por sempre torcerem por mim. Ainda temos muito o que viver e celebrar juntos!

"Pois onde estiver o seu tesouro, aí também estará o seu coração" (Mateus 6:21)

# À minha avó Maria (in memorian)

Minha maior inspiração de vida, sinônimo de coragem e determinação... Como eu queria estar dividindo minhas conquistas com a senhora e, ao final de tudo, ganhar um beijo de batom vermelho nas minhas bochechas! Obrigada por ser minha estrela guia, por se comunicar comigo, todos os dias, através dos mais lindos gestos da vida e da natureza. Obrigada por sempre guiar os meus caminhos e iluminar meus pensamentos, mesmo nos momentos de maiores dificuldades, por me dar forças e não permitir que eu desista dos meus sonhos... A senhora é minha maior saudade e o meu desejo é que esteja orgulhosa, onde quer que esteja. Você partiu, mas deixou muito de você aqui conosco!

# À minha avó Ataíde

Obrigada por cada ligação e mensagem, sempre se preocupando com meu bem-estar e me colocando em suas orações diárias. Que ainda possamos viver muitas alegrias na presença da senhora!

# À minha tia Ana Maria

Sou muito grata pela sua vida, por todo cuidado, amor e dedicação com a nossa família e, principalmente, por ter aceitado a missão de ser minha "dinda" e estar presente em cada conquista da minha trajetória. Sou muito abençoada por ter uma "segunda mãe" tão especial como você!

## Aos meus primos Samuel, Davi, Sarah e Anne

Vocês trouxeram luz e alegria para a nossa família e mostraram, nos momentos mais

difíceis, que a chuva não dura para sempre e, ao final, o sol volta a brilhar ainda mais forte! Obrigada por ajudarem a despertar, em mim, a paixão pelo cuidado com as crianças e por me arrancarem os melhores sorrisos e gargalhadas, cada um com seu jeitinho único e espontâneo de ser. Vocês são os pequenos grandes amores da minha vida e eu estarei sempre aqui para vocês!

## Aos meus padrinhos Dênis e Christiane

Obrigada por todo amor e carinho que sempre demonstraram por mim. Mesmo que a distância nos impeça de estarmos juntos sempre, sei o quanto torcem e oram por mim.

## Ao meu orientador, professor Alberto Delbem

Obrigada por ter aceitado o desafio de me orientar na realização desse trabalho, pela confiança e liberdade durante toda a condução do meu projeto e por ser solícito aos meus pedidos. Admiro sua dedicação à Faculdade e, em especial, ao nosso departamento. Serei eternamente grata e orgulhosa por ter sido sua orientada.

# À professora Maria José

Obrigada por todos os ensinamentos desde a iniciação científica por ter me apresentado ao "mundo" da pesquisa e me encorajado a seguí-lo.

# Ao professor Edilson Ervolino

Obrigada por sua dedicação em nos ajudar sempre com perfeição e por me socorrer em momentos em que eu me via sem saber a quem recorrer e como proceder.

# Ao meu amigo Gabriel Nunes

Palavras nunca serão suficientes para demonstrar toda a minha gratidão pela sua amizade. Você foi o meu anjo da guarda durante essa trajetória da minha vida, esteve presente e me ajudou, arduamente, em cada etapa para que esse trabalho fosse realizado e concluído. Obrigada por ter enfrentado novos desafios comigo, me ajudado a superar cada dificuldade e me ensinando a celebrar cada pequena conquista. Muitas vezes, te vi abdicando de seus compromissos para ajudar o próximo e isso fez com que minha admiração e respeito por você só aumentassem. Sou muito grata por termos estreitado nosso laço de amizade durante essa trajetória. Essa conquista é nossa, obrigada por ter segurado na minha mão até o fim!

# À minha amiga Rafaela Laruzo

Obrigada por estar comigo desde o início da nossa graduação, por ser minha companhia para tudo, desde as missas até as festas da faculdade, e se tornar parte da minha família. Obrigada por me ouvir e amparar nos momentos de dificuldade e por se alegrar comigo nos momentos mais felizes. Sua amizade é um dos maiores presentes que a vida me deu e o caminho até aqui teria sido muito mais difícil sem você ao meu lado.

### Aos meus amigos Mauro, Ana Laura, Gustavo, Maristella, Tamie

Meus amigos de longa data, que estiverem comigo em muitos momentos importantes de minha vida, sejam eles bons ou ruins. Mesmo sem termos contato diariamente, estamos sempre torcendo pelo sucesso do outro. Obrigada por acreditarem em mim, por cada palavra de carinho e de ânimo durante essa minha jornada, e por estarem presentes nas conquistas de minha vida. Vocês fazem parte da minha história e de quem eu me tornei. Amo cada um de vocês de todo o meu coração!

### Aos meus amigos Heitor, Laís, Letícia, Luanna, Luis Felipe e Mariana

### e Paulo

Mesmo com o término das nossas graduações e com a distância física de alguns, pude perceber que as verdadeiras amizades permanecem. Obrigada por, mesmo de longe, estarem sempre comigo e por tornarem essa minha caminhada um pouco mais leve, vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Eu amo vocês e os guardarei para sempre em meu coração.

# Aos colegas da pós-graduação

Agradeço a todos que fazem parte dos laboratórios de Odontopediatria e de Periodontia, pela disponibilidade em me ajudarem e por terem me acolhido tão bem.

## Aos professores e alunos da Universidade Federal de São Carlos

Obrigada pela síntese e caracterizações do biomaterial utilizado em nosso estudo. A ajuda de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Célio Percinoto, Prof. Robson Frederico Cunha, Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Juliano Pelim Pessan e Profa. Cristiane Duque pela agradável convivência, paciência e por todos os conhecimentos transmitidos durante minha graduação e pósgraduação.

aceitado o convite de participação na minha banca de defesa de Dissertação. Os senhores são exemplos e referências, para mim, na Odontopediatria. Me sinto extremamente grata e feliz por poder contar com vossas presenças em um momento tão importante de minha vida.

# Às professoras Aimée Maria Guiotti e Cristiane Duque

Pela participação na minha banca no Exame Geral de Qualificação e por todas as considerações que contribuíram, de maneira significativa, para a melhora do nosso trabalho.

# Aos professores Robson Frederico Cunha e Daniela Rios

Agradeço por, prontamente, terem aceitado o convite de participação na minha banca de defesa de Dissertação. Os senhores são exemplos e referências, para mim, na Odontopediatria. Me sinto extremamente grata e feliz por poder contar com vossas presenças em um momento tão importante de minha vida.

# À Natália Campos

Obrigada por nunca ter medido esforços e estar sempre disposta a me ajudar. Mesmo não estando mais na Faculdade, se disponibilizou a me ensinar as técnicas cirúrgicas e prontamente, sempre que preciso, tira todas as minhas dúvidas. Obrigada por me salvar desde a graduação! Que Deus sempre a preserve com esse coração generoso e essa bondade sem tamanho.

# À Elisa Kumiko Nackachima

Por ser minha primeira inspiração na Odontopediatria e por sempre ter cuidado de mim, como paciente e como "filha", com tanto carinho, dedicação, cuidado e paciência.

# À Maria Áurea

Obrigada por cada palavra, cuidadosamente, dirigida a mim, por sempre se colocar à disposição para me ajudar, por me socorrer nos momentos de crise e por exercer sua profissão com tanta dedicação e amor. A senhora foi fundamental para que eu conseguisse

vencer os meus medos, acreditar na minha capacidade e superar os desafios para a chegada até aqui. Serei eternamente grata por todo o seu apoio.

### Ao Pe. Orivaldo

Que, por meio de suas palavras, fortaleceu a minha fé e me aproximou de Deus. Cada lágrima derramada durante suas celebrações deixava o meu coração mais leve e me ajudava a sair da igreja com a certeza de que Deus estava guiando cada passo meu.

"Pregue a palavra, esteja preparado a tempo e fora de tempo, repreenda, corrija, exorte com toda a paciência e doutrina" (Timóteo 4:2)

# À Faculdade de Odontologia de Araçatuba

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, por ter aberto as portas para mim durante quase oito anos e me permitido vivenciar experiências que me fizeram crescer e amadurecer como profissional e ser humano.

# Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Representado pelo seu coordenador Prof. Assoc. Juliano Pelim Pessan, pela competência e qualidade na condução do programa de pós-graduação.

Aos funcionários da Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação da

## Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada , pela eficiência e por estarem sempre dispostas a nos ajudar.

# Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de

### Araçatuba

Ao Sr. João Batista, pela prontidão em me ajudar todas as vezes que precisei! Ao funcionário Arnaldo pela a ajuda e eficiência na manutenção dos animais deste estudo.

### Aos animais

Que, não tendo escolha, simplesmente dispõem-se.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de Financiamento 001; e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP – Processo 2019/09287-7).

Pela concessão dos recursos destinados à realização deste trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia

(MUBIO, FOAUNESP e a Financiadora de Estudos e Projetos FINEP,

FINEP/CT-INFRA - Convênio FINEP: 01.12.0530.00 -

PROINFRA 01/2011).

Por permitir o uso do sistema de microtomografia computadorizada de alta resolução (ACO APARTIZATIVA DE PROPOSITO DE COBALTO-60 DO CETER/IPEN

Pela colaboração prestada por esta instalação.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, minha gratidão!

# Epígrafe

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a

caminhada. Caminhando e semeando, no fim,

terás o que colher.

Cora Coralina

# Resumo

Morabito, MJSD. Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos tratados com biomateriais nanocompósitos de poliamida 6 e nanopartículas de trimetafosfato decoradas com nanopartículas de prata: estudo histomorfométrico, microtomográfico e imunoistoquímico em calvárias de ratos. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2021.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de materiais nanocompósitos, obtidos a partir da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMP) decoradas com nanopartículas de prata a 2,5% (AgNP) em matrizes poliméricas de poliamida-6 (Pa6), no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos. Trinta ratos Wistar machos foram divididos em três grupos, de acordo com o tratamento: Grupo Controle (C) - coágulo sanguíneo; Pa6-AgNP; e Pa6-TMP-AgNP. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente, e nos outros grupos com scaffolds com Pa6-AgNP e Pa6-TMP-AgNP. Os animais foram eutanasiados aos 30 dias pósoperatórios. As Análises microtomográfica, histomorfométrica eimunoistoquímica foram realizadas. Assim, a área de osso neoformado (AON) foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original, e imunomarcações para TGF $\beta$ -1, BMP-2/4 e OCN foram determinadas. A partir da análise intergrupos, observou-se que o Grupo Pa6-TMP-AgNP apresentou maior área óssea neoformada e, o Grupo Pa6-AgNP apresentou AON superior ao grupo controle (P <0,05). A imunohistoquímica revelou que os grupos Pa6-TMP-AgNP e Pa6-AgNP apresentaramalta e moderada imunomarcação para TGFβ-1 e OCN, respectivamente. O Pa6-TMP-AgNP apresentou um maior número de células BMP-2/4 positivas em comparação aos demais grupos (p <0,001). A partir desses resultados, podemos concluirque Pa6-TMP-AgNP proporciona resposta biológica de neoformação óssea, assimcomo comportamento osteoindutor e osteocondutor quando utilizado para preencher defeitos críticos criados em calvária de ratos.

Palavras-chave: Nanocompostos; Fosfatos; Prata; Nanopartículas; Imuno-histoquímica

# **Abstract**

Morabito, MJSD. Evaluation of bone repair of critical defects treated with polyamide 6 nanocomposite biomaterials and trimetaphosphate nanoparticles decorated with silver nanoparticles: histomorphometry, microtomographic and immunohistochemical study in rat calvaria. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2021.

The aim of this study was to evaluate the influence of nanocomposite materials obtained from the incorporation of sodium trimetaphosphate (TMP) nanoparticles decorated with 2.5% silver nanoparticles (AgNP) in polymeric matrices of polyamide-6 (Pa6), in bone repair of surgically created critical size defects (CDA) in rat calvaria. Thirty male Wistar rats were divided into three groups, according to treatment: Control Group (C) - blood clot; Pa6-AgNP; and Pa6-TMP-AgNP. A 5mm diameter DTC was created on the calvaria of each animal. In Group C, the defect was filled with blood clot only, and in the other groups with scaffolds with Pa6-AgNP and Pa6-TMP-AgNP. The animals were euthanized 30 days after surgery. Microtomographic, histomorphometric and immunohistochemical analyzes were performed. Thus, the area of neoformed bone (AON) was calculated as a percentage of the total area of the original defect, and immunostaining for TGF<sub>β</sub>-1, BMP-2/4 and OCN was determined. From the intergroup analysis, it was observed that the Pa6-TMP-AgNP Group had a larger neoformed bone area, and the Pa6-AgNP Group had higher AON than the control group (P < 0.05). Immunohistochemistry revealed that the Pa6-TMP-AgNP and Pa6-AgNP groups showed high and moderate immunostaining for TGFβ-1 and OCN, respectively. Pa6-TMP-AgNP had a higher number of BMP-2/4 positive cells compared to the other groups (p < 0.001). From these results, we can conclude that Pa6-TMP-AgNP provides biological response to bone neoformation, as well as osteoinductive and osteoconductive behavior when used to fill critical defects created in rat calvaria.

Keywords: Nanocomposite; Phosphates; Silver; Nanoparticle; immunohistochemistry

### 1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecido ósseo é uma abordagem promissora para o tratamento da perda óssea resultante de trauma ou doenças ósseas [Burg et al., 2000; Milan et al., 2021]. Com o avanço tecnológico e o advento da nanotecnologia e dos nanocompósitos, tem sido impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de novos biomateriais sintéticos que atuam sobre os processos de biomineralização para a osteocondução em dispositivos implantáveis [Olszta et al., 2007], de modo que o papel dos materiais poliméricos tem sido ampliado para aplicações nas distintas áreas do conhecimento [Jancar et al., 2010]. Nos últimos anos, vários estudos empregaram materiais poliméricos, na forma de substratos tridimensionais porosos (*scaffolds*), para atuarem como matriz extracelular no crescimento, proliferação e suporte para a formação de novos tecidos vivos [Gu et al., 2013; Shrestha et al., 2016; Weng et al., 2020]. Os mesmos têm sido utilizados na engenharia tecidual, por apresentarem propriedades físico-químicas e mecânicas, como resistência mecânica à flexão e porosidades adequadas para o processo regenerativo [Engel et al., 2008; Okamoto & John, 2013].

A poliamida-6 (Pa6) é um polímero sintético que passou a ser estudada em engenharia tecidual óssea, visto que as fibras poliméricas de Pa6 são excelentes biomateriais devido à elevada relação entre sua área superficial e seu volume, à interconectividade de suas fibras e à existência de espaço intersticial, apresentando diferentes aplicações no campo biomédico [Ávila Júnior et al., 2012; Joshi et al., 2016]. No entanto, características como a hidrofobicidade e a baixa funcionalidade da Pa6,

dificultam a sua aplicação como *scaffold* [Pant & Kim, 2013]. Para minimizar ou solucionar este problema, a funcionalização da Pa6 com grupos fosfato tem sido utilizada para iniciar a mineralização *in vitro* de tecidos ósseos e dentários [Wintgens at al., 2013].

Dentre os fosfatos, o trimetafosfato de sódio (TMP) funciona como um iniciador para a nucleação de cristais de apatita e gera depósitos de fosfato de cálcio com uma morfologia que imita os cristais encontrados na frente de mineralização do osso e da dentina [Gu et al., 2010], dessa forma sugere-se sua aplicação em scalffolds regenerativos [Milan et al., 2021; Joglekar et al., 2020], tendo em visto que a biomineralização é um processo essencial para a formação de tecidos duros [Gu e al., 2010], e o scaffold de TMP mostrou ser atóxico, ter boas propriedades mecânicas, de reticulação e favorecer a proliferação celular quando testado *in vitro* [Thébaud et al., 2007; Milan et al., 2021; Joglekar et al., 2020]. Ademais, quando o TMP é impregnado com nanopartículas de prata (AgNP) demonstrou efeito antimicrobiano contra patógenos orais, especialmente *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* [Mendes-Gouvêa et al., 2018].

Atualmente, AgNPs exibem alta reatividade e uma área de superfície relativa maior do que a forma convencional correspondente, têm mostrado eficaz atividade antimicrobiana [Furno et al., 2004; Deng et al., 2017; Takamiya et al., 2021], produção de fatores angiogênicos [kang et al., 2011], atividade osteogênica [Mahmood et al., 2011; Qin et al., 2014; Lu et al., 2016; Liu et al., 2021], capacidade de promover a expressão e mineralização de proteínas osteogênicas em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana, aumentando assim o reparo ósseo de forma eficaz [Zhang et al., 2015; He et al., 2020], além disso, também foi considerada biocompatível e adequada para uso em tratamentos dentários [Takamiya et al., 2021; Wang et al., 2019; Takamiya et al., 2016; Stone et al., 2010]. Dessa forma, possivelmente a associação TMP e prata seja capaz de exibir intumescimento adequado, além de propriedades mineralizadoras e antimicrobianas conforme necessário para a regeneração óssea.

Diante desses achados anteriores da literatura e pensando no desenvolvimento de um novo biomaterial que favoreça a biomineralização óssea e dentária, pode-se supor que a incorporação de nanopartículas de TMP decoradas com AgNPs na poliamida-9 resultaria em um material biocompatível (scaffolds) com propriedades regenerativas para terapias de reparo. Nessa perspectiva, este estudo avaliou a influência de materiais nanocompósitos, obtidos a partir da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio decoradas com nanopartículas de prata a 2,5% em matrizes poliméricas de poliamida-6, no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos. A hipótese nula do estudo foi a de que a incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio decoradas com nanopartículas de prata a 2,5% em matrizes poliméricas de poliamida-6 não mostraria diferença na promoção de área óssea neoformada em comparação com o grupo controle (coágulo).

#### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1 Síntese das nanopartículas de prata

As AgNP foram sintetizadas como proposto por Lee & Oh (2015), utilizando-se o etanol como solvente e agente redutor. O AgNO<sub>3</sub> foi utilizado como precursor e a polivinilpirrolidona (PVP com massa molar de 10000 g.mol-1) foi empregada como agente estabilizador, com relações molares de 1:1, respectivamente. As soluções de AgNO<sub>3</sub> (90 mM) e de PVP (18 mM) foram preparadas isoladamente, com a dissolução

de seus respectivos precursores em 50 mL de etanol anidro. A reação foi mantida sob refluxo e agitação constante durante 4 h em um balão volumétrico de 3 bocas com capacidade volumétrica de 250,0 mL a 80°C.

#### 2.2 Preparação de TMP em escala nanométrica

A metodologia de moagem otimizada por Danelon et al. (2015) foi empregada para a obtenção das nanopartículas de TMP. 70 g de TMP micrométrico comercial (Sigma-Aldrich, 95%) foram adicionados a um frasco de polietileno com 500 g de esferas de zircônia (diâmetro de 2 mm) imersas em 1,0 L de isopropanol. Após 48 horas de moagem, o pó nanométrico foi separado do meio alcoólico, seco em uma estufa com ventilação mantida a 85 °C e, em seguida, o material seco foi desaglomerado em um almofariz de ágata.

### 2.3 Processamento da Pa6 contendo TMP e decoradas com AgNP

As membranas foram produzidas seguindo o proposto por por Andre et al. (2015) e Mi et al. (2014) com adaptações. Amostras de Pa6 (MW= 20000 g.mol<sup>-1</sup>) e de Pa6 contendo TMP (2,5%) foram solubilizadas em ácido fórmico a 15% (m/v) sob agitação magnética constante por 5h a 25°C. As soluções homogeneizadas foram eletrofiadas em um aparelho de *electrospinning* com uma tensão de 25 kV e vazão de 10  $\mu$ L.hora<sup>-1</sup> empregando um substrato coletor a 10 cm de distância da seringa. A concentração de 2,5% de TMP em relação à massa de Pa6 foi estabelecida a partir estudos prévios que avaliaram as propriedades mecânicas do material e concluíram que tal concentração apresenta maior módulo de elasticidade, alongamento na ruptura e resistência à tração, sendo um potencial candidato na área odontológica. Em seguida, foi realizada a adsorção de AgNP nas membranas Pa6 e Pa6-TMP (2,5%), por meio da imersão das mesmas em 15 mL de uma suspensão de AgNP (12 mM) durante 24 h à temperatura ambiente.

### 2.4 Caracterizações do biomaterial

As nanopartículas de TMP, AgNP e as membranas Pa6 e Pa6-TMP foram caracterizadas no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (LIEC/DQ – UFSCar) por: espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX), espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), técnica de espectrofotometria de absorção UV-Vis, técnica de Difração de raio X (DRX) e Soluções em Conversão de Energia (XPS).

#### Análise do reparo ósseo de defeitos críticos em calvárias de ratos

#### 2.5 Modelo experimental

Este estudo foi realizado respeitando-se os princípios éticos para experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e após ser aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP, protocolo 00875-2019. Foram utilizados 30 ratos machos (Rattus norvegicus, albinus, Wistar), pesando entre 300 e 350 g (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - SP). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24°C. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água ad libitum. Os mesmos foram, aleatoriamente, divididos em 03 grupos experimentais (n=10): Controle (Coágulo sanguíneo), Pa6-AgNP (Implante com membrana a 0% de TMP e prata), Pa6-TMP-AgNP (Implante com membrana a 2,5% de TMP e prata); e realizado a eutanásia aos 30 dias pós-operatórios.

### 2.6 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de xilazina (6 mg/kg de peso corporal) e quetamina (70 mg/kg de peso corporal). Após preparação asséptica, com solução de iodopolividona a 10% (Rioquímica Ind. Farmacêutica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil), uma incisão semilunar foi realizada na região anterior da calvária, permitindo que um retalho de espessura total fosse rebatido na direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado com uma trefina acoplada em peça de mão de baixa rotação, sob irrigação constante de solução salina estéril contínua. Extremo cuidado foi tomado para não danificar a dura-máter durante a criação do DTC. O defeito incluía uma porção da sutura sagital. Duas marcações em forma de L foram realizadas, uma 2 mm anterior e outra 2 mm posterior à margem do defeito cirúrgico, utilizando uma broca carbide tronco-cônica e uma sonda periodontal milimetrada. O maior eixo de cada L foi localizado sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividia o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram preenchidas cuidadosamente com amálgama, para permitir a identificação do centro do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e para serem usadas como

referências para localização precisa das margens ósseas originais do defeito durante as análises histológica e histométrica.

No Grupo C, os defeitos cirúrgicos foram preenchidos somente com coágulo sanguíneo; no grupo Pa6-AgNP, os defeitos foram preenchidos com a membrana decorada com nanopartículas de prata; e no grupo Pa6-TMP-AgNP, os defeitos foram preenchidos com a membrana impregnada com nanopartículas de trimetafosfato de sódioa 2,5% e prata. Os tecidos moles foram reposicionados e suturados e cada animal recebeuuma injeção intra-muscular de 24.000 IU de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico\*Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) após a cirurgia.

#### 2.7 Processamento tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em blocos e os mesmos foram fixados em solução de formol tamponado a 4 %, lavados em água corrente e descalcificados em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%. Após uma descalcificação inicial, cada espécime foi dividido longitudinalmente em doisblocos, exatamente ao longo da linha central do defeito cirúrgico original, usando o longoeixo de ambas as marcações em L como referências. Também foram realizados cortes transversais tangenciando o eixo menor de cada marcação em L, de modo que cada espécime se apresentou com 9 mm de extensão no sentido longitudinal, tornando possível a determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original durante a análise histomorfométrica.

### 2.8 Análise microtomográfica

Após a eutanásia (30 dias) e retirada da calvária, as mesmas foram fixadas em paraformaldeído e, antes do processamento laboratorial para obtenção das lâminas histológicas, três amostras de cada grupo foram submetidas à avaliação por meio de microtomografia computadorizada (µCT; Bruker micro CT, Skyscan 1272). O microtomógrafo foi operado a 70 kV e 142 µA, com filtro de alumínio a 0,5 mm, resolução espacial a 8 µm, passo de rotação a 0,400°, com tempo de aquisição de 29 minutos. As projeções das imagens foram reconstruídas utilizando o software NRecon (versão 1.6.10.2, Skyscan1272, Bruker Micro-CT) com suavização a 5, correção de artefato de anel a 8, correção de endurecimento de feixe a 60%. Após a reconstrução da

imagem, cortes virtuais de duas dimensões (2D) no plano transversal foram obtidos usando o software Data Viewer (Skyscan1272). A quantidade de osso neoformado foi determinada utilizando o software CT Analyser (versão 1.15.4.0, SkyScan 1272, Bruker microCT) pelo cálculo da porcentagem do volume de tecido ósseo neoformado.

#### 2.9 Análise histomorfométrica

Após descalcificação, as peças foram processadas e incluídas em parafina.Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 5 µm de espessura, iniciados a partirdo centro do defeito cirúrgico original, e os mesmos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para a análise histomorfométrica. Critérios baseados no estudo de Messora et al. (2008) foram utilizados para a análise histomorfométrica. Quatro cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original, foram selecionados para as análises histológica e histométrica, a fim de aumentar a confiabilidade dos dados usados na análise estatística. A análise histomorfométrica foi realizada por um examinador previamente treinado e cego ao estudo. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera digital acoplada a microscópio de luz e mensurações padronizadas foram determinadas com auxílio do software ImageJ (version 1.47, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA). A imagem composta foi criada baseada em estruturas anatômicas de referência (ex. vasos sanguíneos e trabeculado ósseo) dentro de cada corte histológico. A área total do defeito cirúrgico original foi determinada pela identificação das superfícies externa e interna da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico e, em seguida, conectando-as com linhas desenhadas seguindo suas respectivas curvaturas. Considerando o comprimento total do espécime histológico, 2 mm foram medidos das bordas direita e esquerda do espécime em direção ao centro, a fim de determinar as margens do defeito cirúrgico original (Binzejima et al., 2016). A área de osso neoformado (AON) foi determinada dentro das margens da área total. A AT foi medida em mm<sup>2</sup> e considerada a 100% da área analisada. A AON também foi medida em mm<sup>2</sup> e calculada como uma porcentagem da área total: AON = (AON\*100) / AT).

### 2.10 Análise imunoistoquímica

Série adicional de cortes histológicos foi submetida a imunoperoxidase indireta para detecção de fator de crescimento transformador beta 1 (TGFβ1), proteína

morfogenética óssea tipo 2 (BMP 2/4) e osteocalcina (OCN). Os cortes histológicos foram clarificados em xileno e hidratados em uma série graduada de etanol (100°-100°-100° -95° -70° GL). Os cortes histológicos foram submetidos ao método de recuperaçãode epítopo induzida por calor (HIER) utilizando tampão citrato (Diva decloaker, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) e câmara de pressão (Decloaking camera, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95 °C por 20 min. Em seguida, os cortes histológicos foram lavados em PBS 0,1 M, pH 7,4 e realizados o bloqueio da peroxidase endógena e sítios de ligação não específicos usando peróxido de hidrogênio 3% por 1h e albumina sérica bovina 1% por 12 h, respectivamente. Cortes histológicos de cada grupo foram divididos em quatro conjuntos, e cada conjunto foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-TGFβ1 de camundongo (SC-130348, Santa Cruz Biotechnology®, TX, EUA), anti-BMP 2/4 de coelho (SC-9003, Santa Cruz Biotechnology®) e anti-OCN de cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology®). Em seguida, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 90 min e, posteriormente, com estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano (HRP) por 90 min (Kit Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin, Dako Laboratories, CA, EUA). A imunoperoxidase foi desenvolvida utilizando tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB chromogen Kit, Dako Laboratories, CA, EUA). As lâminas imunomarcadas foram contrastadas com hematoxilina de Harris. Por fim, os cortes histológicos foram desidratados em etanol, limpos em xileno e cobertos com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, EUA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos mesmos procedimentos, suprimindo-se a utilização de anticorpo primário.

Os cortes histológicos foram analisados sob iluminação de campo claro com um microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Tóquio, Japão) por um investigador cego para os grupos experimentais. A imunocoloração foi definida como presença acastanhada no citoplasma das células e / ou matriz extracelular. Em cada animal, todo o comprimento do defeito ósseo foi analisado com uma ampliação de  $100 \times$ . O critério para o estabelecimento dos escores foi adotado daqueles estabelecidos com alguma modificação, onde 0 = ausência de imunomarcação; 1 = baixo padrão de imunocoloração; 2 = padrão moderado de imunocoloração; 3 = alto padrão de imunocoloração; e = 4

#### <u>2.11 Análise estatística</u>

Os valores de AON para cada animal foram representados pela porcentagem média dos cortes histológicos (histometria) e análise por microtomografia. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk com teste post hoc de Tukey para comparações individuais ( $p \le 0,05$ ). Os dados relacionados a análise imunoistoquímica foram submetidos a teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ( $p \le$ 0,05). As análises foram realizadas utilizando o software SigmaPlot (versão 12.0).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Síntese das nanopartículas de prata

Para a confirmação da formação dos coloides de prata, a técnica de espectrofotometria de absorção UV-Vis tem sido utilizada por ser sensível à formação dos mesmos. As nanopartículas de prata exibem um pico de absorção intenso em função dos plasmas de superfície. A Figura 1A mostra os espectros de UV-Vis dos coloides de prata no intervalo de 300 nm - 800 nm.



**Figura 1:** (A) Espectro de UV-Vis das partículas de prata. (B) Difratograma de raios X das partículas de prata.

#### 3.2 TMP em escala nanométrica

A Figura 2 mostra o difratograma de raios X das amostras de TMP após 48 h submetidas ao processamento de moagem. A obtenção de TMP, cuja fórmula empírica é  $(Na_3P_3O_9)$ , foi evidenciada pela comparação entre os 33 padrões de reflexões obtidos experimentalmente e a ficha cristalográfica correspondente (PDF#72-1628).



**Figura 2:** (A) Difratograma de raios X do TMP sem e com moagem por 48h. (B) Espectro survey de XPS da amostra de TMP moída por 48h. (C) Espectro de XPS em alta-resulução (O 1s). (D) Espectro de XPS em alta-resulução (P2p).

### 3.3 Caracterização morfológica da Pa6 e de seus nanocompósitos

Para obtenção de nanofibras uniformes de Pa6 / TMP, os parâmetros de eletrofiação foram otimizados através da variação da vazão, tensão aplicada, concentração dos materiais e distância de coleta. As imagens de MEV (Figura 3) mostram que foram obtidas fibras homogeneas, sem porosidade e defeitos superficiais.



**Figura 3:** Imagens de MEV das fibras de Pa6 e de seu nanocompósito. A: Fibra de Pa6. B: Nanocompósito Pa6-TMP-2,5%.

Os elementos químicos sódio (Na) e fósforo (P) e prata (Ag) foram detectados pela análise do EDX (Figura 4).



Figura 4. Histogramas de EDX das fibras de Pa6 e de seu nanocompósito.

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho mostrou a presença das bandas características das ligações C-O, N-H e C-H da Pa6, bem como, uma banda 1100 cm<sup>-1</sup>, característica do estiramento simétrico (P-O-P) em fosfatos, mostrando a incorporação do TMP nas fibras de PA6 (Figura 5).



Figura 5. Espectro de FTIR das amostras de Pa6, TMP e de seu nanocompósito

### 3.4 Análise Microtomográfica

As médias e desvios-padrão de %AON para cada grupo, bem como a comparação entre os grupos e ilustração das imagens reconstruídas pelo Micro-CT, após 30 dias do operatório estão ilustrados na figura 6. Aos 30 dias do pós-operatório, o Grupo Pa6-TMP-AgNP apresentou formação óssea significativamente maior do que o grupo controle) e o grupo Pa6-AgNP (p<0.0001).



Controle Pa6-AgNP Pa6-TMP-AgNP



**Figura 6.** (A) Porcentagem média de área óssea recém-formada (AON) dentro da área do defeito criado cirurgicamente avaliado por μCT com comparação entre os grupos, após 30 dias do operatório. Imagens reconstruídas da calvária dos animais de acordo os grupos experimentais: (B) Grupo Controle; (C) Grupo Pa6-AgNP; (D) Grupo Pa6-TMP-AgNP.

### 3.5 Análise histométrica

As médias e desvios-padrão de %AON para cada grupo, bem como a comparação entre os grupos, a 30 dias pós-operatórias estão ilustrados na figura 8. Aos 30 dias do pós-operatório, o Grupo Pa6-TMP-AgNP apresentou formação óssea significativamente maior (40,35%  $\pm$  6,93) do que o grupo controle (14,18%  $\pm$  4,47) e o grupo Pa6-AgNP (26,03%  $\pm$  7,92).



**Figura 7.** Porcentagem média de área óssea recém-formada (AON) dentro da área do defeito criado cirurgicamente avaliado por histomorfometria com comparação entre os grupos, após 30 dias do operatório

#### <u>3.6 Análise histológica</u>

No grupo controle (Fig. 7A), aos 30 dias pós-operatórios, a quase totalidade dos defeitos ósseos se apresentava preenchida por um tecido conjuntivo denso altamente vascularizado. Neste tecido, uma grande quantidade de fibras colágenas, orientadas paralelamente à superfície do defeito ósseo, abrigava poucascélulas inflamatórias egrande quantidade de fibroblastos. Uma faixa muito estreita de tecido ósseo neoformadoestava presente exclusivamente nas margens dos defeitos ósseos. O grupo Pa6-AgNP (Fig.7B) apresentava características histológicas muito simulares aquelas apresentadas pelo grupo controle, todavia, a faixa de tecido ósseo neoformado mostrou-se mais avantajada.Já o grupo Pa6-TMP-AgNP (Fig. 7C), aos 30 dias pós-operatórios, grande parte do defeito ósseo se mostrou ocupada por uma delicada rede de trabéculas de osso imaturo, entremeadas por amplos espaços medulares. As vertentes ósseas voltadas para o centro do defeito mostraram-se repletas de grande quantidade de osteoblastos demonstrando características morfológicas de intensa atividade. Na parte central da ferida, foi observada um tecido conjuntivo fibroso intensamente vascularizado constituído de grande quantidade de fibras colágenas, moderada quantidade de fibroblastos e poucas células inflamatórias.



**Figura 8.** Imagens histológicas da calvária dos grupos avaliados após 30 dias do operatório. A) Grupo Controle; B) Grupo Pa6-AgNP; C) Pa6-TMP-AgNP. (Hematoxilina-Eosina; ampliação de 50×).

### 3.7 Análise imunoistoquímica

### <u>3.7.1 Imunomarcação de TGFβ-1</u>

Em relação ao número de células TGF $\beta$ -1 positivas, o grupo Pa6-TMP-AgNP apresentou maior número de células TGF $\beta$ -1 positivas em relação aos grupos controle (p = 0.0047) e Pa6-AgNP (p = 0.0403) aos 30 dias de pós-operatório (Figura 9).



**Figura 9:** Padrão de imunomarcação para TGF $\beta$ -1 no defeito ósseo crítico. (a) Gráfico apresentando a distribuição dos escores para TGF $\beta$ -1 nos diferentes grupos experimentais. (b - d) Fotomicrografia evidenciando o padrão de imunomarcação para TGF $\beta$ -1 em defeitos ósseos nos grupos controle (b), Pa6-AgNP (c) e Pa6-TMP-AgNP (d). Abreviações e símbolos: †, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo 1; ‡, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo 2; \*, imunomarcação presente na matrizextracelular; setas, células TGF $\beta$ 1-positivas; tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo. Aumento original: 1000x. Barra de escala: 30 µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

### 3.7.2 Imunomarcação de BMP 2/4

Considerando a expressão de BMP 2/4, observou-se que o grupo Pa6-TMP-AgNP apresentou expressão superior ao grupo controle (p = 0.008), e similar ao grupo Pa6-AgNP (p = 0.11) (Figura 10).



**Figura 10:** Padrão de imunomarcação para BMP2/4 no defeito ósseo crítico. (a) Gráfico apresentando a distribuição dos escores para BMP2/4 nos diferentes grupos experimentais. (**b** - **d**) Fotomicrografia evidenciando o padrão de imunomarcação para BMP2/4 em defeitos ósseos nos grupos controle (b), Pa6-AgNP (c) e Pa6-TMP-AgNP (d). Abreviações e símbolos: †,diferença estatisticamente significante em relação ao grupo 1; \*, imunomarcação presentena matriz extracelular; setas, células BMP2/4-positivas; tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo. Aumento original: 1000x. Barra de escala: 30 μm. Contra-coloração: Hematoxilinade Harris.

### 3.7.3 Imunomarcação de OCN

A imunomarcação para osteocalcina (OCN) está presente em osteoblastos, osteócitos e matriz extracelular. Os padrões foram estatisticamente maiores no grupo Pa6-TMP-AgNP do que nos grupos controle (p = 0.0072) e Pa6-AgNP (p = 0.0216)(Figura 11).



Figura 11: Padrão de imunomarcação para OCN no defeito ósseo crítico.

(a) Gráfico apresentando a distribuição dos escores para OCN nos diferentes grupos experimentais. (b - d) Fotomicrografia evidenciando o padrão de imunomarcação para OCN em defeitos ósseos nos grupos controle (b), Pa6-AgNP (c) e Pa6-TMP-AgNP (d). Abreviações e símbolos: †, diferençaestatisticamente significante em relação ao grupo 1; ‡, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo 2; \*, imunomarcação presente na matriz extracelular; setas, células OCN-positivas; tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo. Aumento original: 1000x. Barra de escala: 30 µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

### 4. DISCUSSÃO

Este estudo utilizou o modelo clássico de defeito em calvária [Messora et al., 2008] para avaliar, do ponto de vista histomorfométrico, imunoistoquímico e microtomográfico, o efeito de nanocompósitos obtidos a partir da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio a 2,5% decoradas com nanopartículas de prata em matrizes poliméricas de poliamida-6, nos processos de consolidação óssea de DTCs criados cirurgicamente e tratados com os biomateriais propostos. No presente estudo, após 30 dias do procedimento cirúrgico, o grupo Pa6-TMP-AgNP apresentou maior neoformação óssea quando comparado ao grupo Pa6-AgNP, e ambos os grupos demonstraram maior neoformação óssea que o grupo C (controle). Assim, a hipótese nula de que esses nanocompósitos não promoveria atividade no processo de formação óssea foi rejeitada.

O modelo de defeito ósseo da calvária é apropriado para a análise da regeneração óssea maxilar por causa de suas várias semelhanças com a área maxilofacial [Brunel et al., 1996; Lim et al., 2000]. Anatomicamente, a calvária consiste em duas lâminas corticais separadas por osso reticulado, como a mandíbula; fisiologicamente, o padrão de cicatrização também é semelhante ao dos maxilares [Frame, 1980]. Em termos de morfologia e embriologia, a calvária se desenvolve a partir de uma membrana precursora, como os ossos da face, incluindo a maxila e a mandíbula [Bosch et al., 1998]. Esse processo é denominado formação óssea intramembranosa, porque ocorre no interior das membranas do tecido conjuntivo frouxo e não em um molde cartilaginoso, o que caracteriza a ossificação endocondral [Bone Nanci, 2008]. Uma vez que o enxerto é colocado dentro do defeito cirúrgico da calvaria, as partículas do material são imersas por um coágulo sanguíneo. Isso fornece as proteínas / fatores de crescimento necessários para iniciar o processo de adesão celular e, finalmente, a reconstrução e reparo do osso [Almeida et al., 2015].

Entretanto, os defeitos ósseos de tamanho crítico não conseguem se regenerar espontaneamente ao longo da vida do animal, ou seja, sem o auxílio de um biomaterial ou de uma membrana para osteocondução. Portanto, o uso de biomateriais e / ou enxertos auxilia no reparo ósseo, portanto, esse reparo será significativamente superior quando comparado a um reparo utilizando apenas o coágulo [de Almeida et al., 2015]. O defeito ósseo criado neste estudo, medindo 5 mm de diâmetro externo, é considerado crítico, e corroborado pelos resultados aqui apresentados, uma vez que foi possível verificar tanto pela análise histológica quanto pela análise histométrica que o defeito não poderia ser reparado sem uma intervenção. Assim, a utilização de um grupo controle negativo (coágulo sem o biomaterial) visa estabelecer como ocorre o reparo de forma padronizada; ou seja, essa formação óssea está restrita às margens dos defeitos e o centro é preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Fig. 8A).

Para o tratamento de defeitos ósseos, as propriedades mecânicas dos scaffolds como substituto ósseo são parâmetros muito importantes. Em ensaios e testes prévios (dados não mostrados) ao procedimento cirúrgico, descobrimos que as propriedades mecânicas do scaffold de poliamida com a concentração de 2,5% de TMP nanoparticulado decorado com nanopartículas prata eram relativamente ideais, destacando o aumento no módulo de elasticidade e a resistência à tração, por isso a eleição dessa concentração do sal de fosfato no desenvolvimento do biomaterial. A presença de Pa6-TMP-AgNP mostrou a maior formação óssea nos defeitos críticos (p<0.001)

(Fig. 6). Tomados em conjunto, o uso de TMP nano e AgNP demonstra um efeito sinérgico na regeneração óssea sem uma resposta inflamatória excessiva e barreira fibrosa no local do enxerto (Fig. 8C). Em geral, como explanado anteriormente, ossos cranianos planos ocorrem na formação óssea intramembranosa. Com foco na cirurgia craniofacial, o scaffold utilizado foi desenvolvido como um possível agente especializado para o sistema de formação óssea intramembrana. A este respeito, a configuração experimental tem limitações em termos de sua aplicação a outros defeitos ósseos ou fraturas.

Na análise histológica foi observado significativa neoformação óssea próxima às bordas do defeito cirúrgico em comparação ao grupo controle. Nos feitos submetidos a terapia com com Pa6-TMP-AgNP, foi possível observar partículas circundadas por trabéculas ósseas imaturas, amplos espaços medulares, intensa atividade de osteoblastos em vertentes ósseas e fibras de colágeno sem sinais de resposta inflamatória extensa, sugerindo que o biomaterial é biocompatível e, ao mesmo tempo, osteocondutor. Este dado é importante devido a preocupação de possível efeito tóxico das AgNPs, este estudo in vivo é corroborado por modelo in vitro que concluiu que AgNPs não afeta a diferenciação osteogênica [Liu et al., 2014]. Em adição a isso, a angiogênese e a capacidade de vascularização observadas nos defeitos tratados com os scaffolds são importantes para a aplicação prática de enxertos projetados, melhorando o reparo e a regeneração da fratura óssea [Kanczcler et al., 2008]. A análise histológica (Fig. 8) também mostra a presença de vasos sanguíneos e trabéculas em ossos recém- formados. Além disso, para os defeitos tratados com Pa6-TMP-AgNP, a área defeituosa se recuperou em um osso esponjoso, que foi coberto em por uma camada de osso compacto semelhante às características estruturais dos ossos naturais do crânio. Esse sistema composto demonstra o potencial para aplicações de regeneração óssea dos agentes empregados no scaffold.

É sabido que para a regeneração do tecido ósseo, a matriz ideal deve mimetizar o tecido ósseo natural, onde a matriz é composta principalmente de colágeno tipo I e hidroxiapatita. A deposição de apatita ocorre nas fibrilas de colágeno tipo I com a coordenação de múltiplas proteínas que atuam como centros de nucleação para a mineralização [Armentano et al., 2010]. Scaffolds a base de TMP já têm sido avaliados em estudos *in vitro* [Milan et al., 2021; Joglekar et al., 2020], apresentado menor capacidade de absorção de água [Joglekar et al., 2020], mantendo assim a forma e integridade, tornando-os capazes para aplicação como enxertos ósseos para serem implantados em espaços vazios. Ademais, também foi considerado adequado para

engenharia de tecidos, devido ao tamanho dos poros [Milan et al., 2021; Joglekar et al., 2020]. Além disso, como no presente estudo, os scaffolds reticulados com TMP tiveram a maior resistência à compressão e alto módulo de compressão [Joglekar et al., 2020], sendo reconhecido como um suporte promissor para a proliferação celular, como mostrado na análise histomorfométrica, certamente devido a propriedades mecânicas mais adequadas. Uma vez que, o módulo de compressão do Scaffold reflete a deformação sob carga (rigidez) e estudos anteriores sugerem que os osteoblastos respondem à rigidez do Scaffold, que pode ser adaptado para induzir a diferenciação das células [Armentano et al., 2010], levando a mineralização e osteogênese aprimoradas [Milan et al., 2021]. Embora o módulo de compressão dos scaffolds sejam significativamente menores do que os do osso trabecular, estudos aventam que os módulos na faixa quilopascal são apropriados para estimular as células ósseas a sintetizar a matriz óssea mineralizada [Chatterjee et al., 2010; Rath et al., 2008].

Além disso, o tratamento da dentina com TMP leva a precipitação de apatita na superfície e interior dos túbulos dentinários, aumentando o conteúdo mineral da dentina [Favretto et al., 2018], assim como deixa a superfície do substrato com maior quantidade de sítios doadores de elétrons proporcionando uma maior adsorção de fosfato de cálcio na superfície [Neves et al., 2017], de modo a propiciar também uma maior adesão celular [Harnett et al., 2007]. Em adição a isso, o TMP apresenta melhor efeito quando está na escala manométrica [Danelon et al., 2015; Emerenciano et al., 2018; Favretto et al., 2018; Favretto et al., 2021]. Sua aplicação com as AgNPs no biomaterial polimerico torna as nanopartículas distribuídas uniformemente, portanto, possivelmente aumenta a área de superfície da fibra composta e fornece uma certa quantidade de sítios de nucleação heterogêneos que poderiam promover a formação de sais de fosfato de cálcio na superfície da fibra composta por meio da concentração de Ca<sup>2+</sup> na interface [Amaral et al., 2018], o que sugere melhor atividade biológica do material.

Os bons resultados obtidos com os scaffolds com incorporação de AgNP são corroborados por outros estudos conduzidos na literatura [Weng et al., 2020; Chen et al., 2020; Li et al., 2020; Lu et al., 2016], notando não somente um aumento na taxa de regeneração óssea como também uma redução nos níveis de marcadores inflamatórios em defeitos ósseos infectados [Weng et al., 2020]. Além disso, podem não apenas inibir o processo de inflamação, mas também promover a cicatrização óssea induzindo a polarização macrófago fenótipo M2 associada à cicatrização de ferida [Chen et al., 2020]. É importante mencionar que esses macrófagos M2 são induzidos pelas citocinas

IL-4 e IL-10 [Yang et al., 2019], e secretam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, juntamente com vários fatores de crescimento, como fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e proteína morfogenética óssea (BMP) para suprimir a inflamação, promover a reconstrução da matriz extracelular e a consolidação óssea [Chen et al., 2020; Ruytinx et al., 2018; Orecchioni et al., 2019; Lee et al., 2016]. Ademais, a prata pode ajudar a reparar e reconstruir tecidos humanos vitais e promover a regeneração da pele e outros tecidos delicados. Especificamente, pode estimular o crescimento ósseo e melhorar a capacidade de recuperação dos tecidos lesados [Kang et al., 2011]. As nanopartículas de prata são relatadas como hábeis para promover a expressão e mineralização de proteínas osteogênicas em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana, aumentando assim o reparo ósseo de forma eficaz [He et al., 2020]. Assim, é uma abordagem oportuna projetar um scaffold osteoimunomodulador para aproveitar a resposta imune relacionada aos macrófagos e melhorar o desempenho regenerativo ósseo, de modo que esta estratégia possa ser promissora para aplicações clínicas e fornecer novos insights sobre a modificação da superfície de biomateriais.

Em adição a isso, o sucesso dos biomateriais como modelos para regeneração de tecidos é determinado principalmente por sua capacidade de vascularizar rapidamente e é um resultado da entrega eficiente dos nutrientes celulares necessários durante o processo regenerativo [Bostancioglu et al., 2015]. Os resultados encontrados no alto padrão de imunomarcação para TGF $\beta$ -1 (Fig. 9) para o grupo Pa6-TMP-AgNP pode ser relacionado aos achados obtidos pela análise histométrica e microtomográfica, sendo o grupo com maior percentual de área de osso neoformado (Fig. 6; Fig. 7). Essas imunomarcações são importantespara compreender os possíveis mecanismos de atuação deste biomaterial no reparo ósseo.O TGFβ-1 é um polipeptídeo multifuncional responsável por muitas funções celulares, incluindo o controle do crescimento, proliferação e diferenciação celular, especialmente a condrogênese e a osteogênese [Chen et al., 2012]. Ademais, é sabido que o TGFβ-1 pode promover a proliferação de osteoprogenitores e o comprometimento da linhagem osteoblástica via MAPK-Smad 2/3, e pode promover a diferenciação osteoblástica por meio da estimulação da proliferação celular [Chen et al., 2012; Zhang, 2009]; ou via MAPK, a diferenciação de osteoblastos induzida por BMP [Katagiri & Watabe, 2016]. Avia de sinalização do TGFB-1 é necessária para ativar o fator de transcrição Runx-2 (um regulador global da osteogênese) e ambos são significativamente suprarregulados em condições de controle ao longo do reparo ósseo, concomitante com nova diferenciação

deposição óssea [Vieira e al., 2015; Biguetti et al., 2018]. Estudo recente observou que a expressão da proteína TGFβ-1 nos tecidos de ferida no dorso de ratos tratadas com curativo contentdo AgNPs foi significativamente aumentada, sugerindo que a promoção da cicatrização de feridas pode estar relacionada ao aumento da expressão de TGFβ-1 [Jiao et al., 2021].

Vale ressaltar que a BMP-2 desempenha um papel importante no desenvolvimento ósseo, está envolvida na via de sinalização de TGFβ [Bal et al., 2020; Chen et al., 2004], e induz potentemente a diferenciação de osteoblastos em uma variedade de tipos de células [Carreira et al., 2015]. A imunomarcação observada no scaffols analisados justifica maior atividade osteogênica observada em ambos os grupos testes. Histologicamente (Fig. 8), em destaque o scaffold a base de PA6-TMP-AgNP, a neoformação óssea observada também é atribuída a atividade de BMP-2, uma vez que regula a proliferação celular notada, diferenciação e apoptose em osteoblastos de calvária. Além do processo de osteogênese, a atividade biológica aumentada foi determinada atendendo à quantidade de osteoblastos quando Pa6-TMP-AgNP foram usados (Fig. 8C). Anteriormente, foi demonstrado que membranas baseadas em polímero carregadas com AgNP aumentam a proliferação celular / cicatrização de feridas [Liu et al., 2021; Lu et al., 2016]. O uso de AgNP em scaffolds também foi considerado como um promissor osteoimunomodulador com ações na polarização de macrófagos e na diferenciação de células osteogênicas [Li et al., 2020; Xu et al., 2019; Zhang et al., 2017], assim como as propriedades adequadas fornecidas para scaffolds pelo TMP [Milan et al., 2021; Joglekar et al., 2020]. A neoformação óssea sinaliza que as membranas podem induzir o crescimento e a diferenciação de osteoblastos para cobrir ou preencher parcialmente os poros intracorticais por aglomerados de nucleação. Esses primeiros depósitos minerais induzem sua fusão subsequente para produzir fosfato de cálcio e, finalmente, cristais de apatita [Dey et al., 2010], reativando assim as células do revestimento ósseo em osteoblastos percursores da formação óssea. Além disso, foi demonstrado que o TMP protege o colágeno da degradação [Gonçalves et al., 2018] e também influencia a via de sinalização e estimula o efeito metabólico para a mineralização do tecido duro [Gu et l., 2010; Favretto et al., 2018; Favretto et al., 2021].

A imunomarcação de osteocalcina (OCN) no tecido ósseo revelou diferenças na qualidade do novo osso durante o processo de reparo. O grupo Pa6-TMP-AgNP apresentou a maior expressão OCN; o grupo Pa6-AgNP menor expressão, no entanto superior ao controle. Dessa forma, as colorações positivas para OCN sugere que esses compostos (Pa6-TMP-AgNP) juntos estimulam melhor a atividade neo-osteogênica do queo tratamento único (Pa6-AgNP) (Fig. 11). A análise quantitativa apoiou ainda mais essas descobertas (Fig. 6). A OCN é uma proteína que caracteriza o fenótipo dos osteoblastos, e a imunomarcação de alto padrão para o grupo Pa6-TMP-AgNP é destacável para aneoformação óssea, uma vez que OCN ocorre principalmente durante o período de mineralização e é considerado um dos marcadores de diferenciação dos osteoblastos parao estágio de mineralização. A literatura já reporta que membranas carregadas com Ag apresenta capacidade de promover a propagação e migração celular de linhagem óssea, sendo um forte indicador da capacidade de indução da osteogênese [Cheng et al., 2016], assim como promoveram significativamente a expressão de OCN, que também é apontado como importante marcador tardio para diferenciação osteogênica [Cheng et al., 2016]. De modo geral, os scaffolds Pa6-AgNP e Pa6-TMP-AgNP avaliados no presente estudoserviram como agentes osteoindutivos, principalmente porque permitiu condições estáveis, livres de pressão e tensão no defeito cirúrgico crítico, características cruciais para regeneração óssea. Portanto, mais regeneração deve ocorrer ao redor da margem dodefeito e menos na região central.

Dessa forma, mais estudos são necessários para compreender os novos padrões de formação óssea em diferentes momentos. Dentro dos limites do presente estudo, a análise histomorfométrica e imunoistoquímica dos tecidos regenerados pode fornecer informações úteis sobre a natureza e a quantidade de osso neoformado dos biomateriais testados. A principal força do estudo é que o Pa6-TMP-AgNP de fato atua como osteoimumodulador bioativo para sinais regenerativos ao defeito subjacente. A perspectiva deste estudo fornece informações científicas importantes para umaabordagem terapêutica para o tratamento de defeitos ósseos, aproveitando o uso da nanotecnologia, fosfatos e nanopartículas de prata para regenerar efetivamente o tecido ósseo. Embora mais investigações sejam necessárias para compreender o potencial total dos agentes empregados, assim como combinações e outras alternativas futuras para trataro osso, acreditamos que esses resultados promovem uma estratégia promissora para o reparo ósseo, que pode abrir mais caminhos para a utilização de tais tecnologias em pesquisas clínicas, odontológicas e ortopédicas aplicadas no futuro. A combinação de terapias com esses biomateriais oferece oportunidades para engenharia de tecidos, bem como o desenvolvimento de terapêuticas para odontologia regenerativa óssea.

### 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados neste estudo, concluiu-se que Pa6-TMP-AgNP proporciona resposta biológica de neoformação óssea, assim como comportamento osteoindutor e osteocondutor quando utilizado para preencher defeitos críticos criados em calvária de ratos.

#### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado (Processo FAPESP #2019/09287-7) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro (CAPES, PROCAD/2013 - Proc. 88881.068437/2014–2001). Ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO, FOA-UNESP) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, FINEP/CT-INFRA – Convênio FINEP: 01.12.0530.00 – PROINFRA 01/2011) por permitir o uso do sistema de microtomografia computadorizada de alta resolução (modelo 1272 SkyScan, Brucker).

#### Referências

Amaral JG, Pessan JP, Souza JAS, Moraes JCS, Delbem ACB. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018;106(7):2553-2564. doi:10.1002/jbm.b.34072.

Andre RS. et al. Improving the electrochemical properties of polyamide 6/polyaniline electrospun nanofibers by surface modification with ZnO nanoparticles. Royal Society of Chemistry Advances 2015; 9(5): 73875-73881.

Ávila Júnior JD, Ávila AF, Triplett MH. Caracterização morfológica de nanomembranas de poliamida-66 dopadas com grafeno obtidas por electrospinning. Polímeros 2012; 23 (1):74-81.

Armentanoa I, Dottoria M, Fortunatia E,Ma ttiolia S, Kenny JM. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. Polymer Degradation and Stability 2010; 95 (11): 2126-2146

Bal Z, Kushioka J, Kodama J, et al. BMP and TGF $\beta$  use and release in bone regeneration. Turk J Med Sci . 2020; 50: 1707-1722 Doi: 10.3906 / sag-2003-127

Biguetti CC, Vieira AE, Cavalla F, Fonseca AC, Colavite PM, Silva RM, et al. CCR2 Contributes to F4/80+ Cells Migration Along Intramembranous Bone Healing in Maxilla, but Its Deficiency Does Not Critically Affect the Healing Outcome. Front Immunol, 2018. 9:1804. pmid:30147688.

Bizenjima T, Takeuchi T, Seshima F, Saito A. Effect of poly (lactide-coglycolide) (PLGA)-coated beta-tricalcium phosphate on the healing of rat calvarial bone defects: a comparative study with pure-phase beta-tricalcium phosphate. Clin Oral Implants Res. 2016;27(11):1360-1367. doi:10.1111/clr.12744

Bone Nanci. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. Elsevier Health Sciences 2008; 108-140.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. J Craniofac Surg. 1998;9(4):310-316. doi:10.1097/00001665-199807000-00004

Bostancioğlu RB, Peksen C, Genc H, Gürbüz M, Karel FB, Koparal AS, Dogan A, Kose N, Koparal AT. Analyses of the modulatory effects of antibacterial silver doped calcium phosphate-based ceramic nano-powder on proliferation, survival, and angiogenic capacity of different mammalian cells in vitro. Biomed Mater. 2015 Aug 26;10(4):045024. doi: 10.1088/1748-6041/10/4/045024.

Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benqué E, Marin P, Zahedi S. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. J Periodontol. 1996;67(12):1342-1348. doi:10.1902/jop.1996.67.12.1342

Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials 2000; 21:2347–2359.

Carreira AC, Zambuzzi WF, Rossi MC, Astorino Filho R, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: promising molecules for bone healing, bioengineering, and regenerative medicine. Vitam Horm. 2015;99:293–322. doi: 10.1016/bs.vh.2015.06.002.

Chatterjee K, Gibson SL, Wallace WE, Parekh SH, Lee YJ, Cicerone MT, et al.

The effect of 3D hydrogel scaffold modulus on osteoblast differentiation and mineralization revealed by combinatorial screening. Biomaterials 2010; 19: 5051–5062.

Chen G Deng C Li Y-P. TGFβ and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. International Journal of Biological Sciences 2012;8:272–288.

Chen Y, Guan M, Ren R, et al. Improved Immunoregulation of Ultra-Low-Dose Silver Nanoparticle-Loaded TiO2 Nanotubes via M2 Macrophage Polarization by Regulating GLUT1 and Autophagy. Int J Nanomedicine. 2020;15:2011-2026. doi:10.2147/IJN.S242919 Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth Factors. 2004;22(4):233-241. doi:10.1080/08977190412331279890

Cheng H, Xiong W, Fang Z, et al. Strontium (Sr) and silver (Ag) loaded nanotubular structures with combined osteoinductive and antimicrobial activities. Acta Biomater. 2016;31:388-400. doi:10.1016/j.actbio.2015.11.046

Danelon M, Pessan JP, Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. J Dent. 2015;43(7):806-813. doi:10.1016/j.jdent.2015.04.010

de Almeida JM, Bosco AF, Faleiros PL, et al. Effects of oestrogen deficiency and  $17\beta$ -estradiol therapy on bone healing in calvarial critical size defects treated with bovine bone graft. Arch Oral Biol. 2015;60(4):631-641. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.01.009.

Deng L, Deng Y, Xie K. AgNPs-decorated 3D printed PEEK implant for infection control and bone repair. Colloids Surf B Biointerfaces. 2017;160:483-492. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.061.

Dey A, Bomans PH, Müller FA, et al. The role of prenucleation clusters in surfaceinduced calcium phosphate crystallization. Nat Mater. 2010;9(12):1010-1014. doi:10.1038/nmat2900.

Emerenciano NG, Botazzo Delbem AC, Pessan JP, et al. In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. Arch Oral Biol. 2018;96:223-229. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.09.019.

Engel E, Michiardi A, Navarro M, Lacroix D, Planell JA. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. Trends Biotechnol. 2008;26(1):39-47. doi:10.1016/j.tibtech.2007.10.005

Favretto CO, Delbem ACB, Moraes JCS, Camargo ER, Toledo PTA, Pedrini D. Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. Clin Oral Investig 2018; 22:3021–3029.

Favretto CO, Delbem ACB, Toledo PTA, Pedrini D. Hydraulic conductance of dentin after treatment with fluoride toothpaste containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. Clin Oral Investig. 2021;25(4):2069-2076. doi:10.1007/s00784-020-03516-w

Furno F, Morley KS, Wong B, et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?. J Antimicrob Chemother. 2004;54(6):1019-1024. doi:10.1093/jac/dkh478

Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. J Oral Surg. 1980;38(3):176-180.

Gonçalves RS, Candia Scaffa PM, Giacomini MC, Rabelo Buzalaf MA, Honório HM, Wang L. Use of sodium trimetaphosphate in the inhibition of dentin matrix metalloproteinases and as a remineralizing agent. J Dent. 2018;68:34-40. doi:10.1016/j.jdent.2017.10.009.

Gu LS, Kim J, Kim YK, et al. A chemical phosphorylation-inspired design for Type I collagen biomimetic remineralization. Dent Mater. 2010;26(11):1077-1089. doi:10.1016/j.dental.2010.07.008.

Gu L, Gao Y, Qin Y, Chen X, Wang X, Wang F. Biodegradable poly(carbonateether)s with thermoresponsive feature at body temperature. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry 2013; 51(2): 282-289.

Harnett EM, Alderman J, Wood T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. Colloids Surf B Biointerfaces. 2007;55(1):90-97. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.11.021

He W, Zheng Y, Feng Q, Elkhooly TA, Liu X, Yang X, Wang Y, Xie X. Silver nanoparticles stimulate osteogenesis of human mesenchymal stem cells through activation of autophagy. Nanomedicine 2020; 15(4): 337-353.

Jancar J et al. Current issues in research on structure–property relationships in polymer nanocomposites. Polymer 2010; 51 (15): 3321-3343.

Jiao C, Deng M, Ma Y, Hu G. Effect and Repair Mechanism of Nano Ag Sponge Dressing Combined with Gelatin-Bletilla Striata Gum/Salvia Miltiorrhiza on Refractory Orthopedic Wounds. Biomed Res Int. 2021;8872235. doi:10.1155/2021/8872235.

Joglekar MM, Ghosh D, Anandan D, Yatham P, Jayant RD, Nambiraj NA, Jaiswal AK. Crosslinking of gum-based composite scaffolds for enhanced strength and stability: A comparative study between sodium trimetaphosphate and glutaraldehyde. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2020;108(8):3147-3154. doi: 10.1002/jbm.b.34640.

Joshi MK, Tiwari AP, Maharjan B, et al. Cellulose reinforced nylon-6 nanofibrous membrane: Fabrication strategies, physicochemical characterizations, wicking properties and biomimetic mineralization. Carbohydr Polym. 2016;147:104-113. doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.056.

Kanczler J, Oreffo R. Osteogenesis and angiogenesis: The potencial for engineering bone. EUR. Cell Mater. 2008; 15 : 100–114. doi: 10.22203 / eCM.v015a08.

Kang K et al. Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles Toxicol. Lett. 2011; 205 227–34.

Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8(6):a021899. doi:10.1101/cshperspect.a021899.

Lee CH, Kim YJ, Jang JH, Park JW. Modulating macrophage polarization with divalent cations in nanostructured titanium implant surfaces. Nanotechnology. 2016;27(8):085101.

Li D, Qiu Y, Zhang S, Zhang M, Chen Z, Chen J. A Multifunctional Antibacterial and Osteogenic Nanomedicine: QAS-Modified Core-Shell Mesoporous Silica Containing Ag Nanoparticles. Biomed Res Int . 2020; 2020: 4567049. Doi: 10.1155 / 2020/4567049

Lim SC, Lee MJ, Yeo HH. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. Pathol Int. 2000;50(8):594-602. doi:10.1046/j.1440-1827.2000.01089.x

Liu F, Cheng X, Xiao L, Wang Q, Yan K, Su Z, Wang L, Ma C, Wang Y. Insideoutside Ag nanoparticles-loaded polylactic acid electrospun fiber for long-term antibacterial and bone regeneration. Int J Biol Macromol. 2021;167:1338-1348. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.088.

Liu X, He W, Fang Z, Kienzle A, Feng Q. Influence of silver nanoparticles on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Biomed Nanotechnol. 2014;10(7):1277-1285. doi:10.1166/jbn.2014.1824

Lu H, Liu Y, Guo J, Wu H, Wang J, Wu G. Biomaterials with Antibacterial and Osteoinductive Properties to Repair Infected Bone Defects. Int J Mol Sci. 2016;17(3):334. doi: 10.3390/ijms17030334.

Mahmood M, Li Z, Casciano D, Khodakovskaya MV, Chen T, Karmakar A, Dervishi E, Xu Y, Mustafa T, Watanabe F, et al. Nanostructural materials increase mineralization in bone cells and affect gene expression through mirna regulation. J. Cell. Mol. Med. 2011;15:2297–2306. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01234.x.

Mendes-Gouvêa CC, do Amaral JG, Fernandes RA, et al. Sodium trimetaphosphate and hexametaphosphate impregnated with silver nanoparticles: characteristics and antimicrobial. Biofouling 2018;34(3):299-308. doi:10.1080/08927014.2018.1437146.

Messora MR, Nagata MJ, Mariano RC, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. J Periodontal Res. 2008;43(2):217-223. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.01017.x

Mi HY, Palumbo S, Jing X, Turng LS, Li WJ, Peng XF. Thermoplastic polyurethane/hydroxyapatite electrospun scaffolds for bone tissue engineering: effects of polymer properties and particle size. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014;102(7):1434-1444. doi:10.1002/jbm.b.33122.

Milan EP, Rodrigues MÁV, Martins VCA, Plepis AMG, Fuhrmann-Lieker T, Horn MM. Mineralization of Phosphorylated Fish Skin Collagen/Mangosteen Scaffolds as Potential Materials for Bone Tissue Regeneration. Molecules. 2021;26(10):2899. doi: 10.3390/molecules26102899.

Neves JG, Danelon M, Pessan JP, Figueiredo LR, Camargo ER, Delbem ACB, et al. Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium and phosphate. Arch Oral Biol. 2018;90:108–12.

Okamoto M, John B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. Progress in Polymer Science 2013; 38:1487.

Olszta MJ et al. Bone structure and formation: A new perspective. Materials Science and Engineering: R: Reports 2007;58: 77-116.

Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages. Front Immunol. 2019;10:1084. doi:10.3389/fimmu.2019.01084.

Pant HR, Risal P, Park CH, Tijing LD, Jeong YJ, Kim CS. Synthesis, characterization, and mineralization of polyamide-6/calcium lactate composite nanofibers for bone tissue engineering. Colloids Surf B Biointerfaces. 2013;102:152-157. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.08.032

Qin H., Zhu C., An Z., Jiang Y., Zhao Y., Wang J., Liu X., Hui B., Zhang X., Wang Y. Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human urine-derived stem cells at noncytotoxic concentrations. Int. J. Nanomed. 2014;9:2469–2478. doi: 10.2147/IJN.S59753.

Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. Journal of Biomechanics 2008; 41, 1095–1103.

Ruytinx P, Proost P, Van Damme J, Struyf S. Chemokine-induced macrophage polarization in inflammatory conditions. Front Immunol. 2018;9:1930. doi:10.3389/fimmu.2018.01930.

Shrestha BK, Mousa HM, Tiwari AP, Ko SW, Park CH, Kim CS. Development of polyamide-6,6/chitosan electrospun hybrid nanofibrous scaffolds for tissue

engineering application. Carbohydr Polym. 2016;148:107-114. doi:10.1016/j.carbpol.2016.03.094.

Stone V, Nowack B, Baun A, van den Brink N, von der Kammer F, Dusinska M, et al. Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterization. Sci. Total Environ. 2010; 408 (7):1745-1754.

Takamiya AS, Monteiro DR, Bernabé DG, et al. In Vitro and In Vivo Toxicity Evaluation of Colloidal Silver Nanoparticles Used in Endodontic Treatments. J Endod. 2016;42(6):953-960. doi:10.1016/j.joen.2016.03.014

Takamiya AS, Monteiro DR, Gorup LF, Silva EA, de Camargo ER, Gomes-Filho JE, de Oliveira SHP, Barbosa DB. Biocompatible silver nanoparticles incorporated in acrylic resin for dental application inhibit Candida albicans biofilm. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2021;118:111341. doi: 10.1016/j.msec.2020.111341.

Thébaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a prerequisite for vascular tissue engineering. J Mater Sci Mater Med. 2007;18(2):339-45. doi: 10.1007/s10856-006-0698-1.

Vieira AE, Repeke CE, Ferreira Junior Sde B, Colavite PM, Biguetti CC, Oliveira RC, et al. Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. PLoS One, 2015;10(5):0128021.

Wang Y, Qu Q, Gao S, Tang G, Liu K, He S, et al. Biomass derived carbon as binder-free electrode materials for supercapacitors. Carbon 2019; 155:706-726.

Weng W, Li X, Nie W, et al. One-Step Preparation of an AgNP-nHA@RGO Three-Dimensional Porous Scaffold and Its Application in Infected Bone Defect Treatment. Int J Nanomedicine. 2020;15:5027-5042. doi:10.2147/IJN.S241859.

Wintgens V, Dalmas F, Sébille B, Amiel C. Novel phosphorus-containing cyclodextrin polymers and their affinity for calcium cations and hydroxyapatite. Carbohydr Polym. 2013;98(1):896-904. doi:10.1016/j.carbpol.2013.06.073.

Xu Y, Zheng B, He J, Cui Z, Liu Y. Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts by regulating the RhoA-TAZ axis. Cell Biol Int. 2019;43(8):910-920. doi:10.1002/cbin.11180

Yang D, Wan Y. Molecular determinants for the polarization of macrophage and osteoclast. Semin Immunopathol. 2019;41:551-563. doi:10.1007/s00281-019-00754-3.

Zhang R, Lee P, Lui VC, Chen Y, Liu X, Lok CN, To M, Yeung KW, Wong KK. Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model. Nanomedicine. 2015;11(8):1949-59. doi: 10.1016/j.nano.2015.07.016.

Zhang Y, Zhai D, Xu M, et al. 3D-printed bioceramic scaffolds with antibacterial and osteogenic activity. Biofabrication. 2017;9(2):025037. doi:10.1088/1758-5090/aa6ed6

Zhang YE Non-Smad pathways in TGF $\beta$  signaling. Cell Research 2009;19:128–139.