



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MARIANA DE SÁ ALVES

**VALIDAÇÃO BIOLÓGICA DE GRÂNULOS DE VIDRO BIOATIVOS
(COMPOSTOS POR BIOVIDRO 45S5): estudo *in vitro* e *in vivo***

2024

MARIANA DE SÁ ALVES

**VALIDAÇÃO BIOLÓGICA DE GRÂNULOS DE VIDRO BIOATIVOS (COMPOSTOS
POR BIOVIDRO 45S5): estudo *in vitro* e *in vivo***

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Patologia e Diagnóstico Bucal. Linha de pesquisa: Inflamação e Reparação Tecidual.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Alves, Mariana de Sá

Validação biológica de grânulos de vidro bioativas (compostos por biovidro 45S5): estudo in vitro e in vivo / Mariana de Sá Alves. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.

96 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

1. Biomateriais. 2. Biovidro 45S5. 3. Regeneração óssea. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de, orient. II. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. IV. Universidade Estadual Paulista (UNESP). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Com o aumento da expectativa de vida, crescem o número de fraturas ou doenças ósseas complexas de serem tratadas ou até com tratamentos inexistentes. Desta forma, os biomateriais vêm se tornando uma alternativa eficiente para o tratamento destas injúrias, sendo capazes de oferecer suporte estrutural, menores riscos de infecções e regeneração óssea da região impactada. Este estudo foi capaz de validar de forma *in vitro* e *in vivo* um biomaterial sintético que poderá ser utilizado como enxerto ósseo uma vez que foi capaz de promover a regeneração do tecido acometido. Esta é uma pesquisa feita em parceria entre Universidade e Empresa com o intuito de futura produção e comercialização deste biomaterial. Os resultados desta pesquisa mostraram-se satisfatórios devido a biocompatibilidade do material e potencial osteogênico semelhante aos produtos já existentes no mercado. Portanto essa pesquisa contribuiu com a produção de um biomaterial sintético inovador a ser utilizado na prática clínica visando a melhora da qualidade de vida da população.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

As life expectancy increases, the number of fractures or bone diseases that are complex to treat or even require non-existent treatments increases. In this way, biomaterials have become an efficient alternative for the treatment of these injuries, being able to offer structural support, lower risks of infections and bone regeneration in the impacted region. This study was able to validate in vitro and in vivo a biomaterial that could be used as a bone substitute as it was capable of promoting the regeneration of the affected tissue. This is research carried out in partnership between University and Company with the aim of future production and commercialization of this biomaterial. The results of this research were satisfactory due to the material's biocompatibility and osteogenic potential similar to products already on the market. Therefore, this research contributed to the production of an innovative biomaterial to be used in clinical practice aiming to improve the population's quality of life.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Andrea Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Elis Andrade de Lima Zutin

Universidade de Mogi das Cruzes (UMC)

Campus de Mogi das Cruzes

Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 16 de abril de 2024.

DEDICATÓRIA

*Com imensa gratidão e profundo amor, dedico este trabalho aos pilares da minha vida, minha amada família: minha mãe **Adriana**, meu pai **Carlos**, minha irmã **Ana Beatriz** e meu marido **Heitor**. A vocês, que sempre estiveram ao meu lado, que me inspiraram a persistir mesmo nos momentos de dúvida e que iluminaram o caminho com vossos exemplos de caráter e determinação, meu mais sincero agradecimento. Obrigada por serem minha família, meus incentivadores, meu lar e meu eterno porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus, cuja presença foi meu apoio constante nesta jornada. Sem Ele e sem a intercessão de Nossa Senhora meus dias teriam sido muito diferentes. Sua mão poderosa se fez presente em meus sonhos, desafios e em cada novo amanhecer. Obrigada por tudo!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Dr. Cesar Rogério Pucci e da vice-diretora Profa. Dra. Symone Cristina Teixeira.

À minha orientadora, Professora Luana, você sempre foi além do papel de orientadora. Agradeço por estar ao meu lado durante meu desenvolvimento tanto profissional quanto pessoal ao longo desses anos, e por sempre me apoiar. Obrigada por não ter deixado eu desistir e por ter me ensinado tanto.

À empresa SELAZ Indústria e Comércio de Aparelhos Biomecânicos, agradeço pela parceria nesta pesquisa, pela fabricação do biomaterial e por todo o apoio fornecido para o seu desenvolvimento deste estudo.

À Karen Julie Santos Grancianinov Costa e Rayssa do Nascimento Bezerra por todo o apoio e ajuda prestados na realização deste projeto. Sem vocês este projeto não existiria. Ao aluno de mestrado Kennedy Wallace dos Santos e ao pesquisador Tiago Moreira Bastos Campos por todo o auxílio nos testes de caracterização do biomaterial.

A Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira da Universidade do Vale do Paraíba (Univap) por disponibilizar seu laboratório para a realização de parte dos testes de caracterização do material e pelo aceite na banca de defesa.

A Profa. Dra. Lais Morandini Rodrigues e Profa. Dra. Andrea Carvalho de Marco pelas sugestões e ponderações realizadas no Exame Geral de Qualificação.

À minha banca de defesa de doutorado, Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira, Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges, Profa. Dra. Andrea Carvalho de Marco e Profa. Dra. Elis Andrade de Lima Zutin pelos aceites para a participação na banca e pelas considerações realizadas. Meus sinceros agradecimentos por doaram o tempo e conhecimento de vocês para me auxiliarem nesta etapa importante de minha vida.

Aos meus amados pais, Adriana Alexandrina de Sá Alves e Carlos Alberto Alves, aos quais dedico este trabalho com todo o meu carinho. Vocês sempre me guiaram para que eu desbravasse o mundo, incentivando-me a estudar e aprender incessantemente. Nunca duvidaram das minhas capacidades; ao contrário, sempre me apoiaram e me incentivaram a alcançar grandes conquistas. Sou profundamente grata pela educação, respeito e determinação que vocês me ensinaram. Admiro-os imensamente pela família que construíram e pelos valores que nos transmitiram. Cada palavra de encorajamento e cada abraço ao longo desta jornada significaram tudo para mim. Amo vocês infinitamente!

À minha amada irmã, Ana Beatriz de Sá Alves, você é uma verdadeira inspiração para mim! Mesmo sendo mais jovem, sempre admirei sua determinação nos estudos, o que me motivava a não desistir. Nossos encontros semanais eram repletos de conversas intermináveis sobre estratégias de estudo, e hoje percebo como o amor pelos estudos nos une ainda mais. Agradeço por sempre estar ao meu lado, desbravando o mundo juntas, e por ser não apenas minha irmã, mas também minha grande amiga. Meu amor por você é imenso, e minha admiração por tudo que você é, ainda maior!

Ao meu amado marido, Heitor Miranda Moreira, cuja dedicação incansável ao meu lado durante tantas noites foi essencial para a realização deste trabalho. Você não apenas ofereceu ajuda prática, como suas planilhas de Excel e correções de texto, mas também se mostrou um companheiro constante, presente com suas palavras de afeto, encorajamento, fé e abraços reconfortantes. Talvez você não saiba, mas muitas vezes, foram suas gentilezas em casa que me deram a paz necessária para prosseguir. Agradeço por tudo; meu amor por você é imenso!

Às minhas amigas, Juliani, Elisa, Joyce, Winnie, Isabella, Lívia e Marina que se fizeram presentes desde a graduação e estiveram presentes comigo nos momentos mais importantes do meu mestrado e doutorado, muito obrigada por cada ajuda, risada e companheirismo durante essa trajetória.

Aos meus estimados colegas de laboratório, seja no LEIC, no tecido ósseo ou no biotério, sempre pude contar com o apoio de vocês para realizar experimentos ou obter auxílio. Agradeço imensamente a cada um de vocês por sua colaboração e companheirismo ao longo desta jornada. Muito obrigada, Hugo, Sarah, Marina, Juliana Lupp, Juliani, Leonardo Sobral, Vinicius Almeida, Thays, Beatriz, Júlia Andrade, Elisa Freire, Fábria, Leticia, Marilia, Luis Augusto, Brunna e Ana Maria pela excelente convivência, colaboração e comprometimento em todos os momentos, desejo o melhor para todos vocês! Vocês merecem muito sucesso!

Aos funcionários do ICT UNESP, especialmente a todos os professores que não citei aqui, mas que me auxiliaram ao longo desta jornada, meus sinceros agradecimentos. Também agradeço a todos do programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB) que me acompanharam e me auxiliaram durante todo esse período. Aos técnicos que estiveram me auxiliando em cada etapa, em especial à Carla, Carlos Guedes, Carolina, Sandra, Sérgio, Domingos e Valéria pelo suporte no desenvolvimento desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa PIPE (Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas) – Processo 2022/11291-5.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio realizado no desenvolvido desta pesquisa.

À equipe da biblioteca, expresse minha gratidão pela assistência na realização deste projeto, fornecendo acesso ao material bibliográfico e orientando sobre as normas pertinentes.

A todos os animais utilizados nesta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz e os seus planos serão bem-sucedidos”.

Provérbios 16:3

RESUMO

Alves MS. Validação biológica de grânulos de vidro bioativas (compostos por biovidro 45S5): estudo *in vitro* e *in vivo* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

O tecido ósseo, embora tenha a capacidade de regeneração, é limitado em sua eficácia diante de defeitos críticos que impedem a regeneração natural. Dessa forma, materiais como a hidroxiapatita (HA) têm sido considerados promissores na engenharia de tecido ósseo. Contudo, apesar de sua ampla utilização, a hidroxiapatita apresenta desvantagens, como a taxa de reabsorção e remodelação lenta. Em contraste, o biovidro 45S5 se destaca por sua biocompatibilidade, propriedades bioativas e degradabilidade. Este estudo objetivou avaliar o comportamento biológico *in vitro* e *in vivo* de grânulos de vidro bioativas de biovidro 45S5 fabricadas pelo método de fusão. Os biovidros foram caracterizados por meio da difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformação de *Fourier* (FTIR), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e espectrometria de emissão óptica com plasmas indutivamente acoplados (ICP OES). Em seguida, foi realizado o estudo *in vitro*, utilizando células osteoblásticas isoladas de fêmures de ratos, que foram submetidas a análise da morfologia celular (MEV), viabilidade celular (MTT), conteúdo de proteína total (PT), atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formação de nódulos de mineralização. No estudo *in vivo*, foram realizados defeitos ósseos críticos de 7 mm na tíbia de coelhos da raça New Zealand, que foram divididos em dois grupos (n=6) de acordo com o material de preenchimento: hidroxiapatita comercial (HA) e biovidro 45S5 (BG45S5). Após 2, 8 e 12 semanas, os animais foram eutanasiados e as peças ósseas foram submetidas às análises histológicas e histomorfométricas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk* ($p=0,05$) e quando normais realizamos o teste *t* de *student* e quando não normais realizamos o teste de *Mann-Whitney*. Os resultados dos testes físico-químicos mostraram sucesso na produção do novo biomaterial. Nos testes *in vitro*, observou-se que o grupo BG45S5 não apresentou citotoxicidade e mostrou-se promissor com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo hidroxiapatita comercial ($p=0.0263$). Nos testes de PT, ALP e nódulos de mineralização, os grupos não apresentaram diferença estatística entre eles ($p<0,05$). Contudo, o grupo BG45S5 mostrou-se promissor em relação aos outros grupos. Na análise histológica, ambos os grupos apresentaram neoformação óssea nos defeitos após 2, 8 e 12 semanas. Na histomorfometria, observou-se que os grupos BG45S5 e HA apresentaram maior área de neoformação óssea em 12 semanas. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no tempo de 2 semanas, com maior neoformação para o grupo BG45S5. Apesar dos resultados promissores do grupo BG45S5, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$) nos tempos de 8 e 12 semanas. Em resumo, os resultados evidenciaram o sucesso na produção do biomaterial sintético e o potencial do biomaterial BG45S5 como um material promissor para tratamento de defeitos ósseos críticos.

Palavras-chave: biomateriais; biovidro 45S5; regeneração óssea.

ABSTRACT

Alves MS. *Biological validation of bioactive glass granules (composed of 45S5 bioglass): in vitro and in vivo study [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.*

Bone tissue, despite its capacity of regeneration, is limited in its effectiveness when faced with critical defects that prevent natural regeneration. Therefore, materials such as hydroxyapatite (HA) have been considered promising in bone tissue engineering. However, despite its wide use, hydroxyapatite has disadvantages, such as slow resorption and remodeling rates. In contrast, 45S5 bioglass stands out for its biocompatibility, bioactive properties and degradability. This study aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* biological behavior of bioactive 45S5 bioglass beads manufactured by the melt quenched method. The bioglasses were characterized using X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). Following this, an *in vitro* study was conducted using osteoblastic cells isolated from rat femurs, which were subjected to analysis of cell morphology (SEM), cell viability (MTT), total protein content (TP), alkaline phosphatase activity (ALP) and mineralization nodule formation. In the *in vivo* study, critical bone defects of 7 mm were created in the tibia of New Zealand rabbits, which were divided into two groups ($n=6$) according to the filling material: commercial hydroxyapatite (HA) and bioactive glass 45S5 (BG45S5). After 2, 8, and 12 weeks, the animals were euthanized and the bone pieces were subjected to histological and histomorphometric analyses. Data were subjected to the Shapiro-Wilk normality test ($p=0.05$), and when normal, we performed the Student's *t*-test, and when non-normal, we performed the Mann-Whitney test. The results of the physicochemical tests showed success in the production of the new biomaterial. In the *in vitro* tests, it was observed that the BG45S5 group did not present cytotoxicity and showed promise with a statistically significant difference compared to the commercial hydroxyapatite group ($p=0.0263$). In the TP, ALP and mineralization nodule tests, the groups showed no statistical difference between them ($p<0.05$). However, the BG45S5 group showed promise compared to the other groups. In the histological analysis, both groups showed new bone formation in the defects after 2, 8, and 12 weeks. In the histomorphometric analysis, it was observed that the BG45S5 and HA groups presented a larger area of new bone formation at 12 weeks. There was a statistically significant difference between the groups at 2 weeks, with greater new formation for the BG45S5 group. Despite the promising results of the BG45S5 group, there was no statistically significant difference between the groups ($p<0.05$) at 8 and 12 weeks. In summary, the results evidenced the successful production of the synthetic biomaterial and the potential of the BG45S5 bioglass as a promising material for treating critical bone defect.

Keywords: biomaterials; bioactive glass 45S5; bone regeneration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Preparo e síntese do biovidro 45S5.....	24
4.2 Difractometria de raios X (DRX)	25
4.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	25
4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e composição química avaliada por espectrometria de emissão óptica com plasmas indutivamente acoplado (ICP OES).....	25
4.5 Comitê de Ética.....	26
4.6 Grupos Experimentais	26
4.7 Ensaio biológicos <i>in vitro</i>.....	30
4.7.1 Isolamento e cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular	30
4.7.2 Determinação da viabilidade celular (MTT)	35
4.7.3 Análise do conteúdo de proteína total (PT).....	36
4.7.4 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)	37
4.7.5 Análise de formação de nódulos de mineralização e quantificação de cálcio	38
4.8 Ensaio biológicos <i>in vivo</i>.....	39
4.8.1 Procedimento cirúrgico	39
4.8.2 Análise histológica	41
4.8.3 Análise histomorfométrica	42
4.9 Método de análise de dados.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Caracterização físico-química do BG45S5	44
5.1.1 Difractometria de raios x.....	44
5.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier (FTIR)..	45
5.1.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	47

5.1.4 Composição química avaliada por espectrometria de emissão óptica com plasmas indutivamente acoplado (ICP OES)	48
5.2 Análise <i>in vitro</i>	48
5.2.1 Adesão celular (MEV).....	48
5.2.2 Determinação da viabilidade celular (MTT).....	49
5.2.3 Determinação do conteúdo de proteína total (PT).....	50
5.2.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	51
5.2.5 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização	52
5.3 Análise <i>in vivo</i>	54
5.3.1 Análise histológica	54
5.3.2 Análise histomorfométrica	64
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS	94

1 INTRODUÇÃO

A incidência de defeitos ósseos como traumas, osteomielites, tumores, doenças osteoporóticas e outras doenças associadas ao osso; tem apresentado um aumento significativo nos últimos anos associado ao processo de envelhecimento populacional (Ghelich et al.,2022). Com isso, os enxertos ósseos tornam-se um dos transplantes mais realizados nos últimos tempos (Greenwald et al., 2001; Giannoudis et al., 2005; Dimitriou et al.2011; Campanha et al., 2014 e Robbins et al., 2017, Govoni et al., 2021; Xue et al., 2022; Nashi e Kagda, 2023).

O tecido ósseo possui a capacidade da regeneração, contudo, defeitos críticos impedem que tal regeneração aconteça de forma natural (Baldwin et al., 2019). Um defeito crítico é caracterizado por uma dimensão mínima no qual o osso é incapaz de realizar o seu reparo ósseo sem que haja algum tipo de intervenção cirúrgica, são defeitos geralmente maiores de 2,5 cm de diâmetro (Butler et al., 2007; Khan et al., 2005; Baldwin et al., 2019). A fim de promover a regeneração óssea de defeitos críticos, osso autólogo ou aloenxerto ainda são considerados padrão-ouro (Sakkas et al., 2017). Contudo, problemas como morbidade de dois sítios doadores ou disponibilidade limitada de tecido doador como no caso do enxerto autólogo e risco de transmissão de patógenos como no aloenxerto, são alguns dos problemas que tornam os biomateriais ósseos como uma importante alternativa (Miron et al., 2016; Perić Kačarević et al., 2020).

Diversos biomateriais têm sido estudados, tais como metais, biocerâmicas, biopolímeros e compósitos. Sabe-se que cada biomaterial apresentará suas vantagens e desvantagens, contudo, existem alguns critérios que devem ser considerados na escolha do material ideal para cada defeito (Perić Kačarević et al., 2020; Sarkar e Lee, 2015; Yu et al., 2015). A função principal dos biomateriais ósseos é fornecer suporte mecânico para que haja a aderência e crescimento celular na região; o que chamamos comumente de osteocondução. Outra propriedade interessante é a osteoindução, no qual alguns tipos de biomateriais são capazes de induzir a diferenciação das células tronco em células osteogênicas, ocorrendo o processo da osteogênese (G. Daculsi et al., 2013; Carson e Bostrom, 2007; Roberts e Rosenbaum, 2012). Além dessas duas características consideradas ideais para um

biomaterial ósseo sintético, existem propriedades que são consideradas cruciais para um biomaterial. Assim, o biomaterial não deve ser citotóxico, ou seja, deve apresentar biocompatibilidade, pode apresentar bioatividade quando em contato com as células e pode apresentar uma propriedade desejável que é a degradabilidade, uma vez que sua função é permitir que haja a regeneração óssea concomitantemente com o processo de biodegradação do material (Scheinpflug et al., 2018).

As biocerâmicas como a hidroxiapatita (HA), fosfatos de cálcio, vidros bioativos e alguns compósitos são considerados materiais promissores para a engenharia de tecido ósseo (Guarino et al., 2007; Hutmacher et al., 2007). A hidroxiapatita (HA) é o principal sal inorgânico presente nos ossos e dentes, cerca de 70% da constituição óssea (Holmes et al., 1984), sendo um dos biomateriais ósseos mais estudados desde a década de 1970 (Hulbert et al., 1970). A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio bioativo que tem a capacidade de interagir diretamente com o osso após a sua implantação no defeito (Gao et al., 2014; Sheikh et al., 2015), assim pode ser considerado como um material osteofílico, osteocondutor e osteointegrado, pois consegue ligar-se ao osso por meio do mecanismo natural de conversão óssea (Jarcho, 1986). A particularidade deste material é sua semelhança química com a fase mineralizada do osso, atribuindo o papel osteocondutor e biocompatível do biomaterial (Nandi et al., 2008; Ghosh et al., 2008; Erbe et al., 2001). O uso clínico da HA tem apresentado bons resultados em cirurgias odontológicas de implantes, cirurgias craniofaciais e inclusive ortopédicas (Minami et al., 2013; Yanamiya et al., 2008; Moreira-Gonzalez et al., 2003; Itokazu et al., 1996; Abdul et al., 2021). Embora a hidroxiapatita seja um dos materiais mais utilizados, algumas características deste biomaterial não são tão interessantes. Dentre elas pode-se citar, a taxa de reabsorção e remodelação muito lentas (Wolfe et al., 1999; Marković et al., 2011). A problemática da taxa de reabsorção lenta é o fato de o material permanecer no local do defeito por um longo tempo, até mais de um ano e isso implica na possibilidade de uma contaminação local e como consequência a restrição da vascularização e regeneração óssea (Ilan e Ladd, 2003; Janicki e Schmidmaier, 2011).

A composição original do vidro bioativo 45S5 foi descoberta por Larry Hench em 1969 com composições no sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ com 45% de SiO_2 ; 24,5% de Na_2O , 24,5% de CaO e 6% de P_2O_5 (Hench, 2006). Até a atualidade, o biovidro 45S5 é considerado um dos materiais mais atraentes devido a sua alta

biocompatibilidade, bioatividade, capacidade antibacteriana e boa degradabilidade (Sepulveda et al., 2002; Galarraga-Vinueza et al., 2016; Zhang et al., 2010). O biovidro 45S5 é amplamente utilizado em casos de tratamento de defeitos ósseos periodontais na odontologia (Profeta e Prucher, 2015; Jafari et al., 2022) regenerações ósseas na medicina (Hench, 2002; Sergi et al., 2020a; Sergi et al., 2020b), próteses de orelha média (Hench et al., 2006) e até na engenharia tecidual (Boccaccini e Blaker, 2005). Durante a dissolução do biovidro 45S5, os íons de cálcio, sílica, sódio e fosfato são liberados no ambiente e estes interagem com os íons presentes no ambiente, desenvolvendo uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA). Finalmente, esta camada de HCA consegue estabelecer ligações com o osso circundante assim estimula a proliferação de células osteogênicas neste osso ao redor do defeito (Cannio et al., 2021).

Os vidros bioativos podem ser produzidos por diferentes métodos de fabricação, sendo os dois métodos mais comuns a síntese por fusão convencional e método sol-gel (Boccaccini et al., 2021). O método de síntese por fusão foi o utilizado por L. Hench em 1969 e tem sido amplamente utilizado até os dias atuais em composições comerciais o que comprova sua capacidade de regeneração óssea e biocompatibilidade (Hench, 2006). Basicamente o método inclui a fusão de diferentes óxidos, como SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 ; além disso, óxidos de zinco, magnésio, titânio, boro, prata e outros materiais em altas temperaturas entre 1300°C e 1450°C em cadinhos de platina para evitar a contaminação. A segunda etapa do método é o recozimento, ou seja, consiste em aquecer o biovidro com a finalidade de reduzir as tensões internas devido a expansão térmica do material ao mesmo tempo que reduz as tensões, um outro objetivo é reduzir a quantidade de óxidos metálicos voláteis para que favoreçam a precipitação de apatita no vidro ativo (Cannio et al., 2021).

Assim, a formulação do biovidro pela técnica de fusão é considerada padrão ouro na composição comercial desde 1971 sendo comprovada a capacidade de regeneração óssea desta técnica (Hench, 1971), por conseguinte esta foi a técnica adotada para a confecção do biovidro deste trabalho. O objetivo deste trabalho foi a validação do biomaterial ósseo sintético através de testes laboratoriais *in vitro* e *in vivo* do biovidro 45S5 que foi confeccionado por uma empresa parceira da Unesp.

Sabemos que o biovidro 45S5 já é um produto comercializado no mercado internacional, contudo também sabemos da importância de termos mais empresas

nacionais desenvolvendo o mesmo produto, dentre as principais razões podemos citar: a concorrência saudável, ou seja, quanto mais empresas competem para oferecer o mesmo produto, mais inovação e aprimoramento contínuo há de ter o produto, melhorando para que atenda as demandas do mercado (Zelga, 2017). Com o aumento do biovidro 45S5 para o consumidor, novas regulamentações podem ser criadas e melhores padrões de qualidade e segurança podem ser desenvolvidos, ou seja, a possibilidade de novas empresas desenvolverem o produto possibilita vantagens para os consumidores e para as empresas. Outro ponto importante é a parceria que existiu entre Empresa e Universidade, possibilitando a criação de pesquisas científicas que contribuíram para o desenvolvimento de um produto que estará futuramente no mercado, algo que sempre foi incentivado e enfatizado, devido a importância da pesquisa acadêmica aplicada as necessidades do mercado (D'Este e Lammarino. 2010; Mihaela et al., 2015).

Portanto, os resultados obtidos neste estudo fornecem uma perspectiva promissora quanto à capacidade de regeneração óssea dos biomateriais testados, tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*. A observação do início de formação de ponte óssea, a presença de tecido conjuntivo adjacente aos grânulos, a formação de tecido ósseo neoformado nos indicam uma resposta positiva à presença dos biomateriais, sugerindo potencial indução de osteogênese e osteoindução. Esses achados são significativos, pois destacam o potencial terapêutico dos biomateriais em questão e sua relevância para aplicações clínicas futuras. Dessa forma, este estudo contribuiu para o avanço contínuo no desenvolvimento de produtos biomédicos com potencial impacto na regeneração óssea, oferecendo uma base sólida para aprimoramentos futuros e atendendo às demandas do mercado por soluções eficazes e inovadoras em saúde.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A engenharia tecidual emerge como uma alternativa promissora na restauração de tecidos, incluindo o tecido ósseo. Através da implantação de biomateriais, busca-se promover o crescimento tecidual desejado, proporcionando assim uma recuperação eficaz (Khademhosseini e Langer, 2016). A engenharia tecidual ou medicina regenerativa teve seu surgimento por volta dos anos 90 com a criação do termo engenharia tecidual pelo pesquisador estadunidense Joseph Vacanti. Seu objetivo era desenvolver avanços significativos na área médica através da aplicação de biomateriais, células tronco ou enxertos que promovessem a recuperação tecidual de pacientes lesionados. Este é um campo interdisciplinar no qual a engenharia atua juntamente com a biologia para o desenvolvimento de substitutos funcionais para os tecidos danificados (Langer, Vacanti, 1993). O objetivo principal da medicina regenerativa é tratar as lesões e propiciar melhor qualidade de vida aos pacientes.

O tecido ósseo é juntamente com o fígado, um dos únicos órgãos capazes de se regenerar após lesões, assim ele permite que haja a sua reconstrução em forma, tamanho e força semelhante ao anteriormente a lesão (Roberts e Rosenbaum, 2012). Contudo, existem alguns casos nos quais ocorrem os chamados “defeitos ósseos críticos”, ou seja, o defeito ósseo torna-se grande o suficiente para que não ocorra a regeneração espontânea. Este fato é comum em casos de malformações, ressecção de tumores, lesões traumáticas extensas, infecções como as osteomielites e diversos outros tipos de lesões que impossibilitam a reconstrução da área de forma natural (Crane et al., 1995; Koons et al., 2020).

Diante destes casos, torna-se mister o desenvolvimento de biomateriais que realizem a substituição óssea ou que promovam a regeneração óssea do defeito crítico, visto as desvantagens associadas aos enxertos ósseos alogênicos e autógenos, como possíveis infecções bacterianas, morbidade do sítio doador, resposta imunológica exagerada, fratura ou mesmo a não união do osso doado com o paciente (Moore, Graves, Bain, 2001; Delloye et al., 2007). Assim, biomateriais osteoindutivos seriam os mais apropriados para a reparação de um defeito crítico,

uma vez que eles são capazes de induzir a diferenciação na linhagem osteogênica de células tronco locais (Habibovic e Groot, 2007).

Para que haja a osteoindução é necessária a implantação de um material bioativo, ou seja, aquele que é capaz de induzir a regeneração óssea, ao contrário de materiais bioinertes, como é o caso do titânio que não é capaz de induzir a diferenciação na linhagem osteogênica (Majidinia et al., 2018). O primeiro material bioativo que formou uma ligação com o osso foi o Bioglass® (Biovidro 45S5). Este material foi capaz de formar uma camada de hidroxiapatita biologicamente ativa sob a superfície óssea ao redor do defeito, assim, as células são capazes de responder como se a camada de hidroxiapatita fosse um osso recém-mineralizado e com isso a mineralização segue adiante até que haja a cicatrização do defeito (Hench, 1971).

O professor Hench desenvolveu o biovidro 45S5 na Universidade da Flórida através de uma conversa com um coronel recém-chegado da guerra do Vietnã o qual perguntou-lhe se poderia existir um material capaz de sobreviver ao ambiente do corpo humano e que não fosse bioinerte como o titânio (Hench, 2006). Diante dessa problemática, Hench desenvolveu o biovidro 45S5, que não apenas formou uma forte ligação óssea, mas também se revelou um material bioativo. Essa característica bioativa significa que o material tem a capacidade de estimular o crescimento tecidual quando em contato com o tecido do hospedeiro. Assim, o biovidro 45S5 se destaca como um material ósseo bioativo, conforme demonstrado por Hench em seu estudo de 1971.

O primeiro vidro bioativo comercializado e aplicado na área médica foi o Bioglass® através da substituição do ouvido médio para tratamento de uma perda auditiva em 1985 (Hench, 2006). Essa substituição foi possível porque embora o vidro bioativo tenha sido descoberto em 1969 por Hench, somente em 1981 é que foi descoberta a sua capacidade de ligar-se aos tecidos duros e moles ao mesmo tempo, tornando possível uma ligação estável entre estes tecidos (Wilson et al., 1981). Na época, a maior parte das próteses de ouvido médio eram perdidas após alguns anos, enquanto as do Bioglass® permaneceram por mais de 10 anos (Rust et al., 1996). Também foi observado um sucesso na manutenção de rebordos mandibulares na implantação do Bioglass® na área odontológica, com sucesso a longo prazo de mais de 10 anos mantendo a espessura do osso alveolar (Wilson et al., 1993; Stanley et al., 1997).

Através deste estudo foi possível a aprovação do FDA para o uso das partículas de vidro bioativo em reparo periodontal e assim surgiu o Perioglass (Wilson e Low, 1992), um produto particulado 45S5 Bioglass[®] que atualmente é vendido pela NovaBone Products LLC, Alachua, Flórida e em mais de 35 países pelo mundo. O Perioglass é utilizado para tratamento de defeitos ósseos dentários, orais, craniomaxilofaciais (Jones, 2015). Além do Bioglass[®], temos atualmente um concorrente direto que é o Biogran[®] vendido pela BIOMET 3i, Flórida, ele tem a mesma composição do 45S5, sua única diferença é o tamanho da partícula que é de 300-360 μm , enquanto a do Perioglass é de 90–710 μm . Além destes produtos, em 2006 na Finlândia, foi aprovado para uso ortopédico o vidro bioativo BonAlive[®] (BonAlive Biomaterials, Turku, Finlândia), este foi o primeiro vidro bioativo na composição de S53P4 a ser comercializado. A implantação do BonAlive juntamente com um implante dentário permitiu o reparo das trabéculas ósseas maxilares em um tempo de reparo mais rápido do que o autoenxerto isoladamente (Turunen et al., 2004).

Além das formas comerciais citadas acima, um outro tipo de vidro bioativo na composição de 45S5 é comercializado desde 2004 no mercado odontológico, o NovaMin[®] (NovaMin Technology, FL; agora propriedade da GlaxoSmithKline, Reino Unido). Este material foi desenvolvido especificamente para tratar a hipersensibilidade dentinária e, portanto, possui um tamanho de partícula pequena, cerca de 18 μm , o que facilita a sua inserção na composição de determinados cremes dentais ou também produtos para clareamento dentário, todos com a finalidade de tratar a hipersensibilidade dentinária (Jones, 2015). Basicamente, as partículas de vidro bioativo 45S5 presentes são capazes de aderir à dentina e formar uma camada de hidroxiapatita carbonatada de composição semelhante ao esmalte dentário e com isso bloqueiam os túbulos dentinários aliviando a dor do paciente por um período (Gillam et al., 2002).

Oonishi et al. (2000) estudaram o crescimento ósseo de três diferentes tipos de biomateriais: o biovidro 45S5, vitrocerâmica AW e hidroxiapatita. Foi possível perceber neste estudo que existem duas classes de bioatividade dos materiais, classificados em materiais de classe A e materiais de classe B. Materiais de classe A são capacitados para promover a osteocondução e a osteoindução. Esta osteoindução é resultado de rápidas reações de superfície destes biomateriais através

da liberação de íons como Si, Ca, P e Na que produzem reações intracelulares e extracelulares com o meio biológico. Enquanto materiais de classe B possuem apenas o efeito da osteocondução, o que permite que as reações de crescimento ósseo ocorram apenas diretamente na interface do defeito ósseo, ao invés das reações no meio biológico como acontece nos materiais de classe A. Consequentemente materiais de classe B possuem as reações mais lentas. O biovidro 45S5 é classificado como material de classe A, enquanto a hidroxiapatita é um material de classe B.

Ilharreborde et al. (2008) realizaram um estudo comparativo dos desempenhos do autoenxerto versus o vidro bioativo da NovaBone (Perioglass) em tratamento de escoliose idiopática e observaram que o desempenho do biomaterial superou as expectativas do estudo, demonstrando menor riscos de infecções (2% de risco com o uso do vidro bioativo contra 5% do autoenxerto) e menor taxa de falhas mecânicas (2% no uso do vidro bioativo contra 7,5% do autoenxerto).

Schepers et al. (1991) realizaram um estudo em cães, a fim de avaliar os grânulos de vidro bioativo 45S5 da marca comercial BioGran® (BIOMET 3i™) como preenchedor de lesões ósseas mandibulares e compará-los com dois grânulos de hidroxiapatita comerciais (Calcite® e Interpore 200®) e o grupo controle coágulo. O estudo mostrou um crescimento ósseo osteocondutor mais acentuado em regiões ao redor dos grânulos de vidro bioativo quando comparado aos materiais compostos por hidroxiapatita. Outro fato constatado no estudo foi que o biovidro promoveu inicialmente o crescimento de osso trabecular, enquanto nos grânulos de HA os autores observaram a formação inicial de tecido conjuntivo. As trabéculas ósseas são importantes porque é através delas que as células mesenquimais conseguem formar um ambiente de estímulo para se diferenciarem em osteoblastos. No caso do tecido conjuntivo presente entre as partículas de hidroxiapatita, existe o risco deste tecido ser rodeado por células gigantes e sofrer uma desintegração.

Em 1998, Schepers et al. voltaram a estudar o efeito do Biogran® na remodelação óssea. Sabe-se que um dos grandes desafios e que traz altas taxas de insucesso na colocação de implantes dentários é a má qualidade e quantidade óssea ao redor dos implantes. Assim, foi realizado um estudo em cães beagles no qual foi comparado implantes orais em alvéolos com a implantação do Biogran® versus implantes dentários sem o uso do biomaterial. A análise qualitativa e quantitativa dos grupos revelou maior atividade de remodelação óssea em áreas com a presença do

vidro bioativo associado com presença de maior tecido ósseo em comparação as regiões que não receberam o biomaterial.

Furusawa et al. (1998) realizaram um estudo em mandíbula de ratos e realizaram a eutanásia destes animais em 4 períodos: 1, 3, 4 e 16 semanas. Foi possível observar que o preenchimento do Biogran[®], após 1 semana já era possível observar células osteoblásticas ao redor dos grânulos do vidro bioativo. Após 3 semanas observaram que o centro do defeito já estava preenchido por células osteoblásticas. Em 4 semanas, havia a formação da matriz osteóide e em 16 semanas observou-se a formação de tecido ósseo.

Em 2001, Vogel et al. estudaram os vidros 45S5, 54S e 55S em relação ao potencial de degradação destes biomateriais ao longo do tempo após a sua implantação em tíbia de coelhos. Eles observaram que a regeneração ocorreu da periferia do defeito em direção ao centro e que o vidro 45S5 mostrou os melhores resultados de incorporação com o tecido ósseo e de reabsorção, evidenciando a capacidade de formação óssea deste vidro bioativo 45S5 assim como demonstrado em outras pesquisas da área (Jones et al., 2016; Oonishi et al. 1997).

Além dos testes clínicos e *in vivo*, testes *in vitro* realizados com o vidro 45S5 mostram bons resultados em relação a este biomaterial. Silver et al. (2001) avaliou a viabilidade celular, proliferação e diferenciação celular do Bioglass 45S5, 58S e 77S. O Bioglass 45S5 foi o que não foi capaz de afetar a sua viabilidade, proliferação e diferenciação osteoblástica. Outro estudo também analisou esses mesmos 3 vidros bioativos e demonstraram que o vidro bioativo 45S5 e o 77S foram capazes de induzir a diferenciação osteoblástica, enquanto o 58S mostrou um efeito elevado na mineralização celular em relação aos outros biomateriais (Bosseti e Cannas, 2005).

De acordo com a literatura apresentada, observou-se que o reparo ósseo associado ao emprego do vidro bioativo é relevante justificando novos estudos e possível uso clínico. No entanto, tornou-se evidente a escassez de trabalhos recentes que comparam os novos produtos de biovidro 45S5 com o biomaterial hidroxiapatita. Ademais, pode-se observar que há discrepâncias na fabricação desses biomateriais, como a forma dos grânulos, o tamanho das partículas, o grau de pureza do material são fatores cruciais que influenciam a resposta tanto *in vitro* quanto *in vivo* desses vidros bioativos (Daculsi et al., 1998; Fulmer et al., 2002). Assim, a realização deste estudo se fez imprescindível para avaliar os efeitos do vidro bioativo produzido em

colaboração com a empresa, tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*. Essa avaliação foi crucial para o aprimoramento da evolução desse biomaterial, visando o tratamento de defeitos ósseos críticos com menor incidência de intercorrências clínicas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral foi avaliar o comportamento biológico *in vitro* e *in vivo* dos grânulos de vidro bioativos compostos por biovidro 45S5. Para isso, os testes foram realizados considerando a comparação entre o biovidro 45S5 e a hidroxiapatita comercial, utilizada como biomaterial de referência.

Os objetivos específicos foram:

- a) fornecimento de detalhes sucintos sobre o processo de fabricação dos grânulos de vidro bioativos (compostos por biovidro 45S5) manufaturado pela empresa;
- b) caracterização da microestrutura e as propriedades físico-químicas dos grânulos de vidro bioativos (compostos por biovidro 45S5);
- c) avaliação da atividade e da diferenciação celular *in vitro*;
- d) realização da análise histológica e histomorfométrica do tecido ósseo neoformado no defeito crítico *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais desenvolvidas neste projeto interdisciplinar foram realizadas em diversos laboratórios. A síntese e caracterização do biovidro foi realizada nas dependências do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) e na empresa parceira desta pesquisa, localizados na Universidade do Vale do Paraíba, em São José dos Campos, SP. Os testes de validação biológica (testes *in vitro* e *in vivo*) foram realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT UNESP) do campus de São José dos Campos, SP.

4.1 Preparo e síntese do biovidro 45S5

Os materiais usados como precursores nesta investigação para sintetizar o BG-45S5 são reagentes de alta pureza: SiO₂ (99,8%, Sigma-Aldrich); CaO (carbonato de cálcio, CaCO₃, 99,95%, Sigma-Aldrich), Na₂O (carbonato de sódio, Na₂CO₃, 99,95%, Sigma-Aldrich) e fosfato de sódio (SP, Na₂HPO₄, 99%, Dinâmica).

Inicialmente, as misturas foram preparadas pesando quantidades estequiométricas de SiO₂, CaO, Na₂O e Na₂HPO₄, conforme dado pela composição nominal para a composição BG-45S5 (45% de SiO₂; 24,5% de Na₂O, 24,5% de CaO e 6% de Na₂HPO₄). Esses compósitos foram homogeneizados em um moinho de bolas a seco usando bolas de zircônia de 9,5 mm de diâmetro em um frasco de polipropileno por 1 hora. Depois de homogeneizadas, as misturas foram utilizadas para a fabricação de pastilhas em prensa hidráulica e colocadas em cadinhos. Os cadinhos foram colocados em estufa e a fusão ocorreu a 1400°C ao ar (20°C/min). Posteriormente, os fundidos foram vazados em chapa de grafite e posteriormente foram recozidos a 500°C por 12 horas em mufla. A faixa granulométrica das partículas de biovidro obtidas após a moagem em moinho de facas ficou em torno de 500 µm.

4.2 Difractometria de raios X (DRX)

Os materiais obtidos foram moídos em moinho de bolas por 1 hora e caracterizados quanto à presença de fases cristalinas por meio da técnica de Difração de Raios X (DRX) usando o equipamento Difratorômetro de Raios X (Shimadzu, XRD-6000), varredura 2θ de 10 a 80° utilizando uma fenda de 0.3.

4.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A presença de grupos químicos característicos do vidro bioativo 45S5 foi analisada utilizando o espectrômetro de infravermelho por transformação de Fourier (FT-IR) usando um espectrômetro PerkinElmer, Spectrum 400 operando no modo de refletância com resolução de 4 cm^{-1} na região de $525\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e composição química avaliada por espectrometria de emissão óptica com plasmas indutivamente acoplado (ICP OES)

Em relação ao seu comportamento térmico, foi realizado a análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), até 1000°C com uma rampa de $20^\circ\text{C}/\text{min}$. O método avalia a pureza do composto por meio de uma análise do pico de fusão obtido. Basicamente, o DSC mede a diferença da energia fornecida para determinada composição, no nosso caso o biovidro 45S5, quando submetidos a um controle de temperatura. No nosso estudo, o objetivo era obter a temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de cristalização (T_c). Com estes dados foi possível observar a estabilidade do material e conseqüentemente comparar sua identificação com os valores já encontrado na literatura a fim de averiguar a confecção deste material. A respeito do ICP OES, as análises foram realizadas em um laboratório contratado para

este fim (laboratório Exata, Itapeva, SP) com a finalidade de identificação da composição química do material e comparação com a composição nominal.

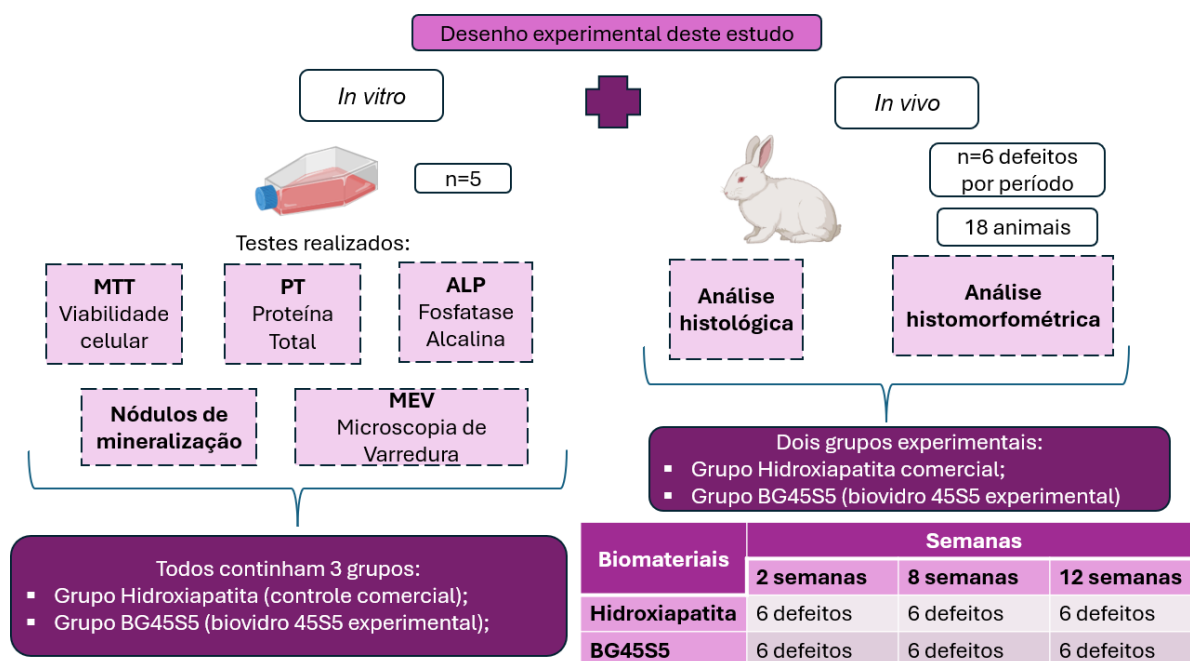
4.5 Comitê de Ética

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP conforme detalhado no anexo A deste trabalho. Os Princípios Éticos para a Experimentação Animal foram adotados de acordo com as especificações do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Esse trabalho também segue as diretrizes preconizadas pelo ARRIVE (*Animal Research Reporting of In Vivo Experiments*) (Percie Du Sertid et al., 2020).

4.6 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram divididos de acordo com os testes que foram realizados nas etapas *in vitro* e *in vivo*. A Figura 1 é um esquema dos principais testes que foram realizados com os grupos experimentais.

Figura 1 – Desenho experimental do estudo



Fonte: Elaborada pela autora.

A etapa *in vitro* contou com os seguintes grupos experimentais: Grupo biovidro (BG45S5) e grupo hidroxiapatita comercial (HA). Os testes *in vitro* estão organizados de acordo com o Quadro 1 a seguir:

Quadro 1 – Grupos experimentais para os ensaios biológicos com seus principais testes

Ensaio	Objetivo dos testes	Tipo de placa celular utilizada	Biovidro 45S5 (na presença de células)	Hidroxiapatita (material comercial) (na presença de células)	Quantidade de células por cada poço
Citotoxicidade Celular (MTT)	Avaliar a Viabilidade Celular	Placa 96 Poços	0,030g	0,030g	10.000
Conteúdo de Proteína Total e Atividade de Fosfatase Alcalina (PT/ALP)	Avaliar a proliferação e diferenciação das células osteoblásticas	Placa 96 Poços	0,030g	0,030g	10.000
MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura)	Avaliar a interação das células com o biomaterial	Placa de 24 Poços com lamínula de vidro	0,045g	0,045g	20.000
Nódulos de mineralização (NÓDULOS)	Avaliar a formação da matriz mineralizada	Placa 24 Poços com <i>transwell</i>	0,045g	0,045g	20.000

Fonte: Elaborado pela autora.

Nos testes *in vitro* foram realizados três grupos controle com a finalidade de observar se durante os testes não havia variáveis que pudessem atrapalhar o andamento dos nossos testes. Abaixo temos a descrição destes grupos:

- a) Grupo controle células: grupo composto apenas por células e meio de cultura;
- b) Grupo controle látex; controle negativo, ou seja, o látex é capaz de promover a morte das células do poço e por isso foi utilizado como controle negativo;

- c) Grupo controle meio de cultura: não havia células nestes poços, apenas meio de cultura.

Apesar de existirem três grupos controle, somente o grupo controle comercial (hidroxiapatita) foi considerado para fins estatísticos. Essa decisão foi baseada em pesquisas recentes, nas quais os pesquisadores utilizam o produto já comercializado como referência para testar outros materiais, conforme descrito em estudos anteriores (Söhling et al., 2022; Wu et al., 2022; Anesi et al., 2023; Cichos et al., 2023 e Park et al., 2024).

Os testes *in vivo* foram realizados em coelhos na região da tíbia destes animais. Estes são os seguintes grupos para o estudo da implantação *in vivo*:

- a) Grupo Experimental: Biovidro 45S5;
- b) Grupo Controle: Hidroxiapatita Comercial.

Os animais foram eutanasiados em 3 diferentes períodos, a fim de observar a neoformação óssea destes animais ao longo das semanas: 2 semanas (2s), 8 semanas (8s) e 12 semanas (12s) após a implantação dos biomateriais na região da tíbia destes animais. Foram realizados 6 defeitos para cada período e cada biomaterial (cada grupo). Utilizou-se as tíbias esquerdas dos animais para a implantação do BG45S55 experimental; enquanto o lado direito foi utilizado para a implantação da hidroxiapatita comercial. Assim, totalizou-se 18 animais, sendo 6 animais para cada um dos períodos citados (3 períodos) conforme ilustrado na Figura 1 acima.

4.7 Ensaio biológicos *in vitro*

4.7.1 Isolamento e cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular

Os biomateriais foram avaliados biologicamente, a partir de experimentos em culturas de células que foram desenvolvidos no Laboratório de Estudos Interdisciplinar em Células (LEIC), do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) – UNESP São José dos Campos – SP.

Nove ratos pesando cerca de 300 g com 90 dias de idade foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico utilizando uma solução intramuscular de cloridrato de xilazina 2% 2 g/100 mL (Xilazin[®] - Syntec do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba/SP – Brasil), substância sedativa e relaxante muscular, e cloridrato de cetamina 10% 10 g/100mL (Cetamin[®] - Syntec do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba/SP – Brasil). As células foram obtidas dos fêmures desses ratos de acordo com Maniapoulos et al. (1988). Após a limpeza dos fêmures, esses foram colocados em solução de transporte contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutaminha (α -MEM – Gibco-Life Technologies, NY, USA), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco- Life Technologies, NY, USA).

No fluxo laminar, as extremidades foram removidas e culturas primárias de osteoblastos foram isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, utilizando meio de cultura suplementado contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutaminha (α -MEM – Gibco- Life Technologies, NY, USA), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco- Life Technologies, NY, USA). Posteriormente estas células foram distribuídas em frascos para cultura (Kasvi, São Jose dos Pinhais, Paraná, Brasil) e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). A Figura 2 mostra o esquema do isolamento celular das células mesenquimais.

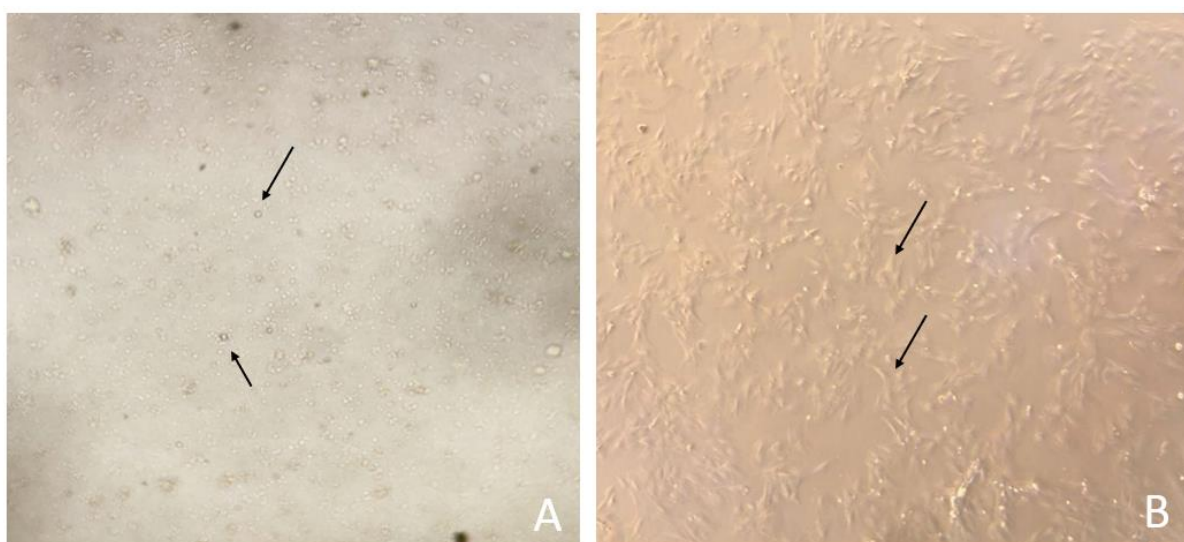
Figura 2 – Isolamento celular das células mesenquimais obtidas dos fêmures de ratos



Fonte: Elaborada pela autora.

Após a confluência, aproximadamente 7 dias, (Figura 3) as células foram liberadas enzimaticamente e plaqueadas na densidade de 1×10^4 células viáveis em poços da microplaca de 96 poços (Kasvi, São Jose dos Pinhais, Paraná, Brasil) para os testes de análise de viabilidade celular (MTT) atividade de fosfatase alcalina (ALP) e proteína total (PT) e na densidade de 2×10^4 células viáveis em poços da microplaca de 24 poços (Kasvi, São Jose dos Pinhais, Paraná, Brasil) para os testes de nódulos de Mineralização e MEV.

Figura 3 – Isolamento celular das células mesenquimais obtidas dos fêmures de ratos

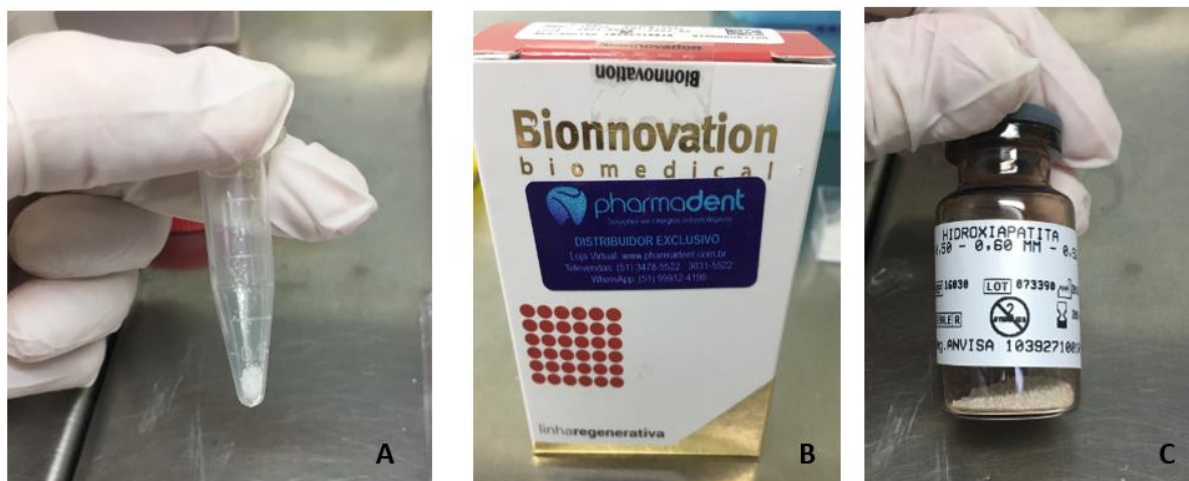


Legenda: A) Aparência inicial das células no momento do isolamento; B) Células após confluência celular, ou seja, cerca de 80% da garrafa ocupada pelas células espalhadas.
Fonte: Elaborada pela autora.

Previamente ao plaqueamento, foram preparadas as amostras dos biomateriais, hidroxiapatita e biovidro 45S5 (Figura 4), as quais foram inseridas no interior dos poços para ocupar a área relativa ao diâmetro do poço. Em seguida, foi acrescentado 200 μ L de meio de cultura osteogênico na placa, que foi produzido a partir da adição de 5 mg/mL de ácido ascórbico (Neon, Suzano, SP, Brasil) e 2,16g de β glicerol-fosfato (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) na solução de 500ml do meio de cultura celular suplementado citado acima. O meio de cultura osteogênico foi trocado a cada 3 dias. Após estes procedimentos, todas as placas foram incubadas a

37°C com 5% de CO₂ e mantidas até o momento dos testes. O procedimento está demonstrado na Figura 5.

Figura 4 – Amostras dos biomateriais dos testes *in vitro*



Legenda: A) BG-45S5; B) Embalagem da hidroxiapatita comercial; C) Hidroxiapatita comercial utilizada no estudo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 – Placa de cultivo celular para os testes *in vitro*

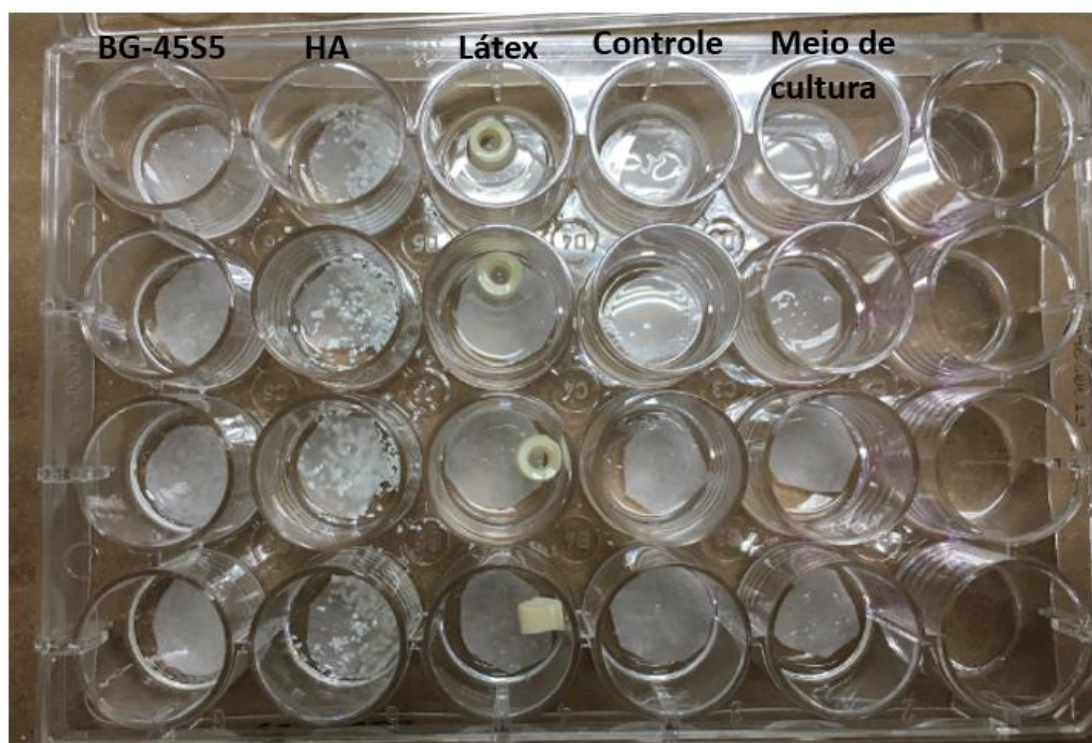
Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-1 e em triplicata, sendo que cada triplicata foi um *pool* de células provenientes dos fêmures de 3 animais de cada grupo. Os procedimentos para as análises propostas a seguir, estão detalhadamente descritos nos artigos prévios do nosso grupo de pesquisa (Andrade et al., 2015; Prado et al., 2018).

Para a realização do teste de MEV, foi necessário preparo prévio das placas de 24 poços para que as amostras pudessem ser retiradas das placas e transportadas para o equipamento. Assim, utilizou-se uma lamínula de vidro redonda que foi posicionada no fundo da placa e colocou-se uma fina camada de papel filtro cortada em formato redondo e estéril sobre a lamínula de vidro. Assim, posteriormente, realizou-se a inclusão dos biomateriais acima desse fundo pré-preparado para que fosse realizado o teste do MEV. Após 7 dias de cultivo das células com os biomateriais, a morfologia celular foi avaliada por FE-SEM (*Field Emission Microscopia Eletrônica de Varredura*) (Zeiss - EVO MA10, São Paulo, Brasil). As amostras foram lavadas três vezes com PBS para remover as células não aderentes e, em seguida, fixadas quimicamente com paraformaldeído a 4% à temperatura ambiente durante 20 minutos conforme mostrada na Figura 6. A seguir, as amostras

foram desidratadas por meio de uma série ascendente de etanol e, antes da análise, foram revestidas com uma fina camada de ouro usando um sistema *sputter-revestimento*.

Figura 6 – Placa de MEV sendo desidratadas pelo etanol



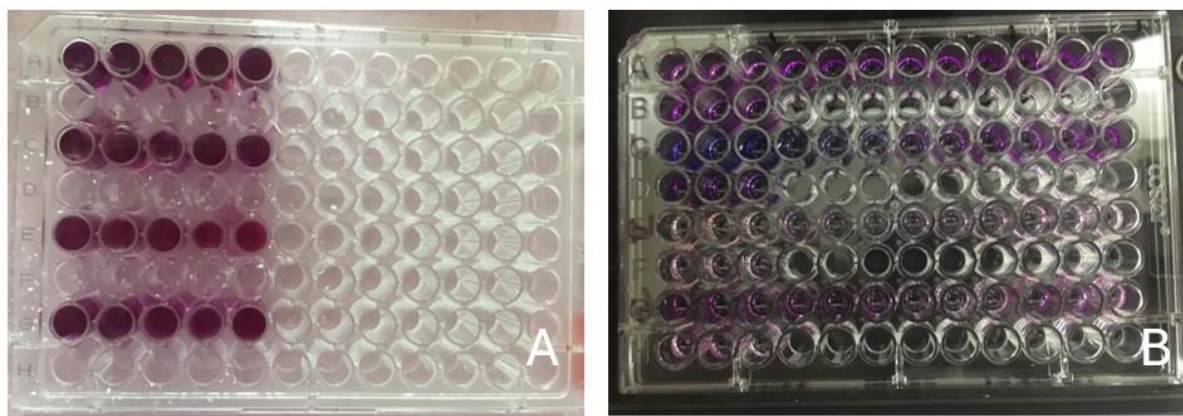
Legenda: BG-45S5 representa o biomaterial de interesse para o teste. HA representa a hidroxiapatita comercial. Látex é o controle negativo. Controle representa as células juntamente com o meio de cultura. Meio de cultura representa somente o meio sem a presença das células.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.2 Determinação da viabilidade celular (MTT)

Foi realizada avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição e incubação com o corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenilacetato] (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) utilizando análise espectrofotométrica do corante incorporado. A Figura 7 mostra a placa com o corante de MTT. Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas após o período

de 7 dias, utilizando medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU). Os dados foram aferidos como absorbância e expressos como porcentagem.

Figura 7 – Placa para avaliação da viabilidade celular com o corante de MTT



Legenda: A) Poços sendo corados com o MTT e posteriormente foram incubados por 4h em estufa a 37°C. B) Placa pronta para ser lida em espectrofotômetro observe que cada poço anterior foi triplicado para que tivéssemos uma margem de erro em relação ao equipamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.3 Análise do conteúdo de proteína total (PT)

O conteúdo de proteína total foi calculado após 07 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). O meio de cultura foi removido após os 7 dias de cultivo e foram lavados 3 vezes com solução de PBS. Posteriormente, os poços foram preenchidos e agitados com o auxílio da pipetadora os 150 μ L de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma Aldrich) para lise das células. Em seguida, adicionamos 100 μ L de Lowry (Sigma Aldrich) e depois acrescentamos 100 μ L de Folin e Ciocalteu (Sigma Aldrich) por poço. Após a finalização do teste, a absorbância foi aferida espectrofotometricamente a 680 nm, sendo que o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em μ g/mL.

4.7.4 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica), utilizando os mesmos lisados do teste da proteína total após o período de 7 dias, e de acordo com Andrade et al. (2015) e Prado et al. (2018). A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva-padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 μmol de timolftaleína/hora/ μg proteína. A Figura 8 mostra o esquema para o teste de fosfatase alcalina.

Figura 8 – Esquema para o teste de fosfatase alcalina



Legenda: A) Kit de teste de fosfatase alcalina (Labtest Diagnóstica) B) Tubos de ensaio já contendo as soluções do teste de fosfatase alcalina. C) Placa para a leitura em espectrofotômetro do teste de ALP. Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.5 Análise de formação de nódulos de mineralização e quantificação de cálcio

Exclusivamente para este teste as amostras foram inseridas no interior de placas *transwell*, e posteriormente foi realizado o plaqueamento com células, as quais foram incubadas a 37 °C/5% de CO₂ por 14 dias. O *transwell* foi necessário para que o biomaterial não fosse corado no momento do teste. Após o período determinado, foi verificada a formação de nódulos de mineralização utilizando a coloração por vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) e observação ao microscópio (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany).

Para a quantificação do cálcio impregnado na matriz mineralizada o método utilizado foi de Gregory et al. (2004). Em cada poço foi adicionado ácido acético 10 % e incubados a temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Toda a solução foi transferida para microtubos de centrífuga e agitados em vórtex (Vórtex QL – 901) por 30 segundos. Os microtubos foram conduzidos ao banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA095/CF) e aquecidos por 10 minutos, a 87,5 °C sendo posteriormente transferidos para uma caixa com gelo e levado ao freezer por 5 minutos. Em seguida, foram centrifugados (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K) por 20 minutos e 100 µL dos sobrenadantes foram transferidos para placa de 96 poços. Em cada poço foram acrescidos 40 µL de hidróxido de amônia a 10%, para neutralização do ácido. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900), sob o comprimento de onda de 405 nm. Os dados foram mensurados no espectrofotômetro a 405nm, de acordo com Andrade et al. (2015). Os valores foram obtidos em absorbância. A Figura 9 mostra o aspecto da placa com o corante vermelho de Alizarina S2% (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA).

Figura 9 – Placa com o corante vermelho de Alizarina para o teste de nódulos de mineralização

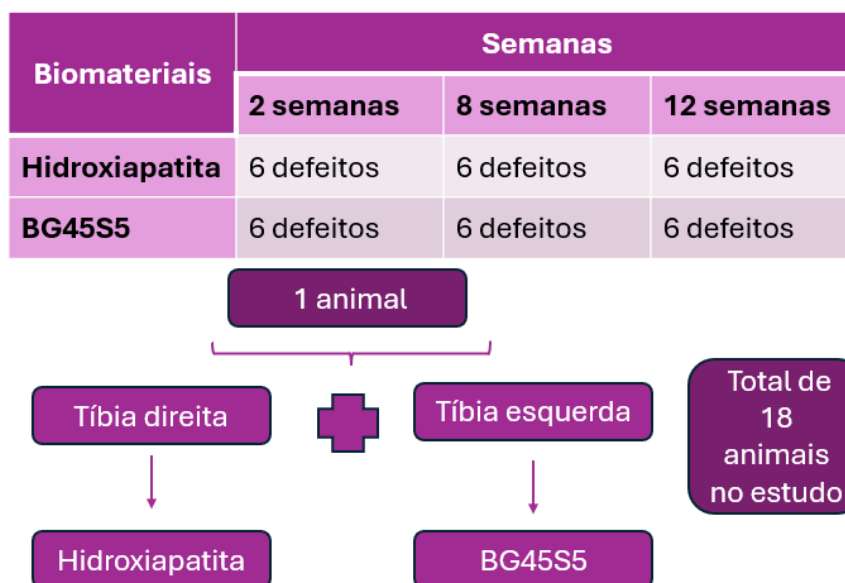


Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 Ensaio biológicos *in vivo*

4.8.1 Procedimento cirúrgico

Para este estudo foram realizadas as cirurgias em coelhos albinos da raça Nova Zelândia, pesando cerca de 4,0 kg, com 5 meses de idade, divididos de acordo com os 2 grupos e 3 períodos de eutanásia apresentados de acordo com a Figura 10 projeto.

Figura 10 – Distribuição esquemática dos animais e defeitos do teste *in vivo*

Fonte: Elaborada pela autora.

As cirurgias foram realizadas em sala cuidadosamente limpa, com álcool etílico na concentração de 70%; com instrumentos devidamente esterilizados. O cirurgião e auxiliares utilizaram aventais esterilizados, e materiais descartáveis (máscaras, luvas estéreis). Os animais foram pesados e anestesiados via intraperitoneal com uma solução de 100mg/kg de Ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.). Primeiramente a mistura dos fármacos foi realizada utilizando 0,5 ml de cloridrato de xilazina e 0,5 ml de cloridrato de Ketamina. Posteriormente, cada animal foi anestesiado via intramuscular utilizando 1ml/1Kg de peso da solução previamente preparada.

As amostras de biomateriais (0,030 g) foram esterilizadas com radiação gama previamente ao procedimento cirúrgico. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral, no campo cirúrgico, para o procedimento de tricotomia na região da tíbia e a antissepsia da área cirúrgica com álcool. A incisão cutânea e muscular foi realizada com aproximadamente 2,5 cm de extensão para a exposição dos ossos, utilizando cabo de bisturi nº 3 com lâmina nº 15. Na sequência os tecidos subcutâneos e musculares foram divulsionados.

Os defeitos críticos foram confeccionados na região da tíbia a partir de uma broca trefina de aço inoxidável de 7 mm sob irrigação salina constante e preenchidos com os seguintes biomateriais: Biovidro 45S5 e hidroxiapatita. Em seguida os tecidos foram reaproximados para a posição inicial com uma sutura simples (com pontos interrompidos), por meio de fio de seda (Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil).

Ao término da cirurgia, foi administrado um fármaco analgésico cloridrato de tramadol, 8-10 mg/kg, por via oral, a cada 12 h, durante 05 dias após a cirurgia. Após a cirurgia, os coelhos foram colocados em gaiolas, com ração e água *ad libitum*, em ambiente com exaustão do ar, e monitorados até o prazo da eutanásia de 2, 8 e 12 semanas.

O método de eutanásia foi por meio de dose excessiva da solução anestésica, na qual foi administrada tripla dose via intramuscular da solução anestésica anteriormente citada seguida de exsanguinação. Após a eutanásia, as tíbias foram removidas e acondicionadas no formaldeído a 10% previamente ao processamento histológico. Os animais foram eutanasiados com 2 semanas, 8 semanas e 12 semanas após a cirurgia e as regiões de interesse foram removidas, limpas e colocadas em solução de formol a 10% por 48 horas. A seguir, as amostras foram inseridas em ácido fórmico por cerca de 40 dias para efetuar o processo de descalcificação. As peças foram monitoradas regularmente até que fosse evidenciada a completa descalcificação das peças para o processamento histológico.

4.8.2 Análise histológica

Após as eutanásias, as peças foram fixadas em formol tamponado por um período mínimo de 48 horas e submetidas à descalcificação com ácido fórmico a 20%, por cerca de 40 dias no laboratório de Tecido Ósseo do ICT/Unesp. Posteriormente, os fragmentos ósseos contendo a área de reparo foram incluídos em blocos de parafina. Previamente, os espécimes foram divididos ao meio no seu longo eixo e, portanto, foram obtidos dois blocos de cada espécie. Então foram submetidos às técnicas laboratoriais de rotina para o preparo das lâminas histológicas, que foram

obtidas a partir de cortes semi-seriados de 5 μ m e posteriormente corados por hematoxilina e eosina (HE).

As imagens das lâminas foram obtidas com um microscópio de luz Axiophot2 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que transmite para o programa computacional Axio Vision Release 4.7.2.

Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, avaliando-se a formação do tecido de granulação, a neoformação óssea, o arranjo de trabéculas imaturas e a maturação até a remodelação final.

4.8.3 Análise histomorfométrica

As medidas histomorfométricas foram obtidas a partir de cinco cortes de cada defeito no aumento de 2.5x. Em cada um dos cinco cortes, na região do defeito, dois campos foram selecionados para as fotomicrografias. Esses dois campos estavam situados nas duas extremidades do defeito, representando toda a área do defeito e o início da ponte óssea. Para padronização, as imagens eram capturadas sempre na mesma posição. As imagens foram obtidas do microscópio de luz Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss do Brasil). A seguir, as imagens foram transferidas em formato JPEG para um computador no qual a análise histomorfométrica foi realizada por dois examinadores previamente calibrados, utilizando o software *Image J* (Image Processing and Analysis in Java, NIH, EUA) para Windows. O parâmetro histomorfométrico calculado foi a área de neoformação óssea por campo em μm^2 .

4.9 Método de análise de dados

Todos os dados obtidos nos testes *in vitro* e *in vivo* foram analisados inicialmente por meio do teste de normalidade visando a aplicação do teste estatístico adequado.

Após a realização dos testes de normalidade, quando os resultados eram normais foi realizado o teste *t* de *student* e quando não normais realizamos o teste de *Mann-Whitney*.

Todos os testes foram realizados com o auxílio do software *GraphPad Prism* 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e foi adotado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

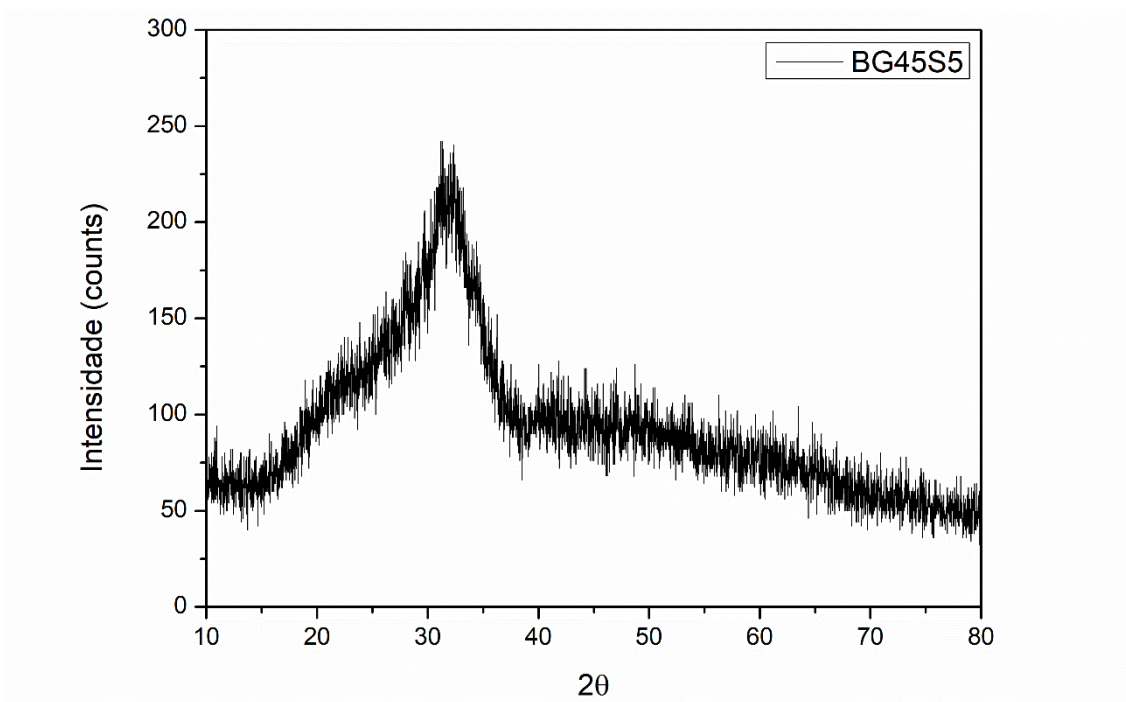
5.1 Caracterização físico-química do BG45S5

5.1.1 Difractometria de raios x

A formação de um material vítreo foi confirmada no difratograma de raios X, onde nenhuma fase cristalina foi observada, exceto uma banda larga entre 15° e 40° (2θ) como apresentado na Figura 11. O pico largo observado indica que não há ordem de repetição de longo alcance nas estruturas dos materiais produzidos. Normalmente, vidros bioativos apresentam um halo amorfo centrado em aproximadamente 30° ; sendo esta característica típica de materiais de silicato vítreo.

A cristalização do vidro bioativo resulta em propriedades mecânicas aprimoradas, mas a cerâmica vítrea (cristalina ou semicristalina) pode mostrar menor solubilidade no fluido corporal o que pode afetar o tempo da formação da fase mineral adequada para integração do tecido como a camada de hidroxiapatita carbonatada, semelhante ao componente mineral ósseo.

Figura 11 – Difratoograma de raios X do BG-45S5



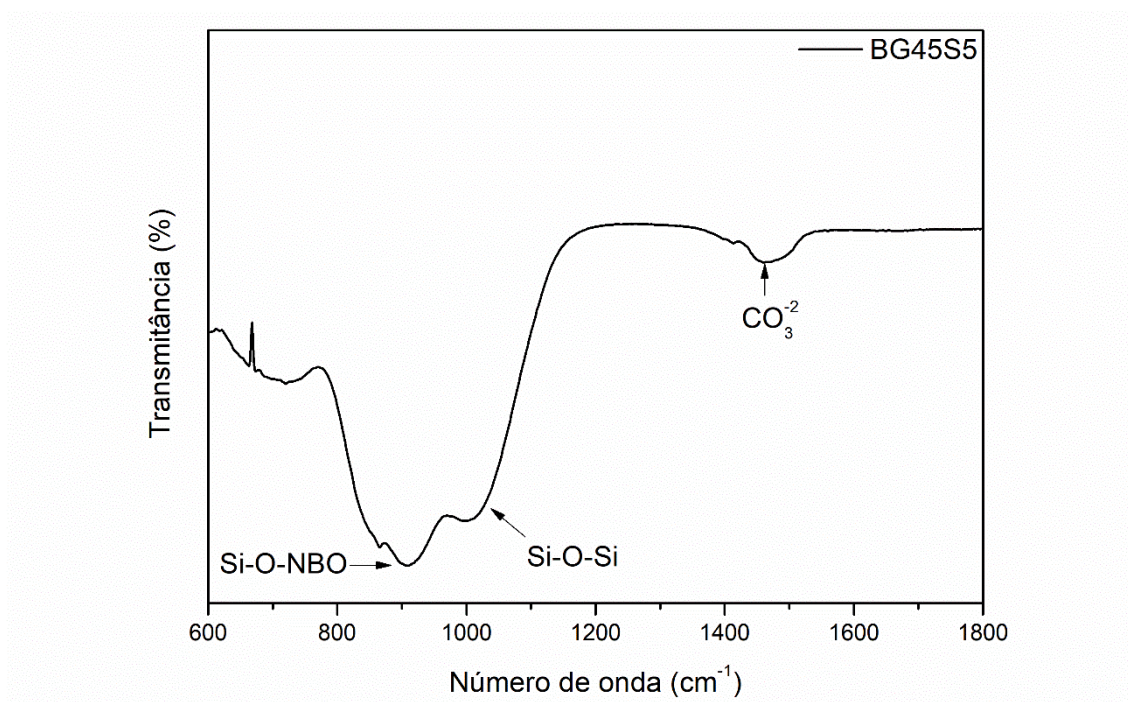
Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier (FTIR)

O espectro FTIR do BG-45S5 é apresentado na Figura 12. Como visto, materiais de sílica heterogêneos são formados pela presença de outros átomos que agem como modificadores de rede, provocando a ruptura da continuidade da rede vítrea devido à quebra das ligações Si–O–Si, levando à formação de espécies de oxigênio não ligados (Si–O–NBO). Pode-se notar no espectro uma pequena banda na posição 700-850 cm^{-1} correspondente ao SiO_4 . Esses tetraedros apresentam quatro átomos de oxigênio ligados a quatro vizinhos de Si e são indicados como Q4(Si). As unidades Q0(Si) não possuem átomos de oxigênio ligado e os tetraedros Q1(Si), Q2(Si) e Q3(Si), são correspondentes a 1, 2 e 3 átomos de oxigênio ligados, respectivamente. A unidade Q2 aparece no espectro de FTIR dos vidros de silicato alcalino na posição 950 cm^{-1} , correspondente as ligações NBO. Picos característicos de CO_3^{2-} em 1420 cm^{-1} ocorrem devido à reatividade dos vidros com o CO_2 da atmosfera (Kalampounias et al., 2011).

Com relação aos processos bioativos, a concentração de grupos Si–O–NBO monitora a taxa de dissolução da sílica por meio da formação de grupos silanol na superfície. Assim, as ligações NBO favorecem o processo bioativo *in vitro*, indicando superior bioatividade.

Figura 12 – Espectro obtido por análise FTIR do BG-45S5

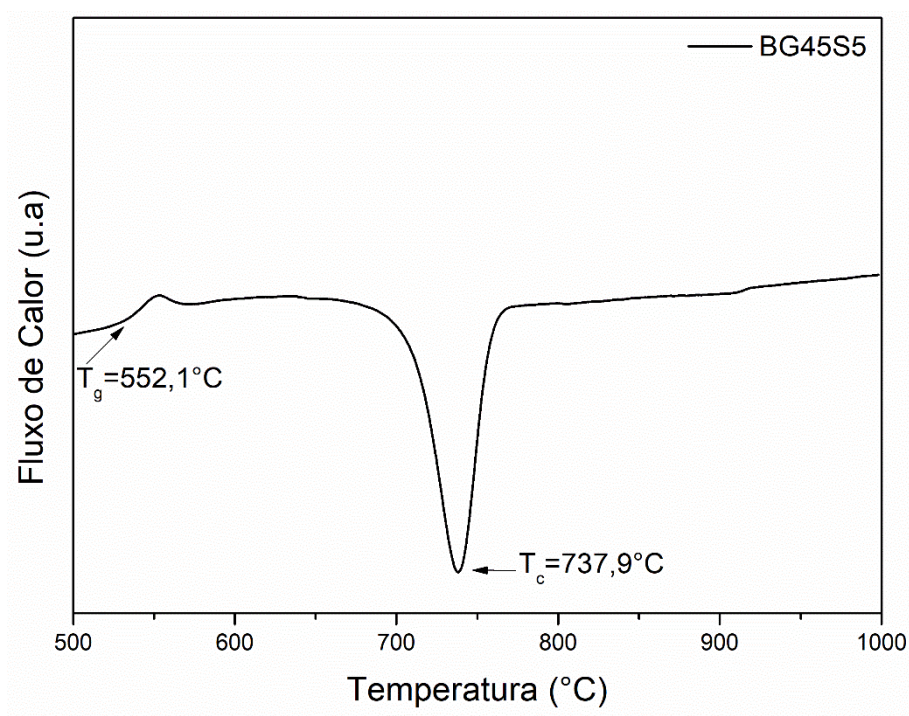


Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

De acordo com a análise de calorimetria, realizada na amostra de BG, foi possível determinar a temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de cristalização (T_c). A lacuna entre T_g e T_c é definida como um critério aproximado para medir a estabilidade térmica do vidro. A amostra de BG45S5 apresentou transição vítrea em $552,1^\circ\text{C}$ e pico de cristalização em $737,9^\circ\text{C}$, conforme mostrado na Figura 13.

Figura 13 – Calorimetria diferencial de varredura (DSC) para o BG-45S5 obtido por fusão



Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.4 Composição química avaliada por espectrometria de emissão óptica com plasmas indutivamente acoplado (ICP OES)

A composição química avaliada por espectrometria de emissão óptica com plasmas indutivamente acoplado (ICP OES) é apresentada na Tabela 1. É possível observar que o BG45S5 apresentou composição química próxima a composição nominal, apresentando variações de composição dentro dos limites aceitáveis para a variação quanto ao teor desses óxidos.

Tabela 1 - Composição química avaliada por espectrometria de emissão óptica com plasmas indutivamente acoplado (ICP OES) para o BG-45S5.

	%SiO ₂	%CaO	%Na ₂ O	%P ₂ O ₅
Composição Nominal	45	24,5	24,5	6
BG-45S5	47,10	23,43	23,22	6,25

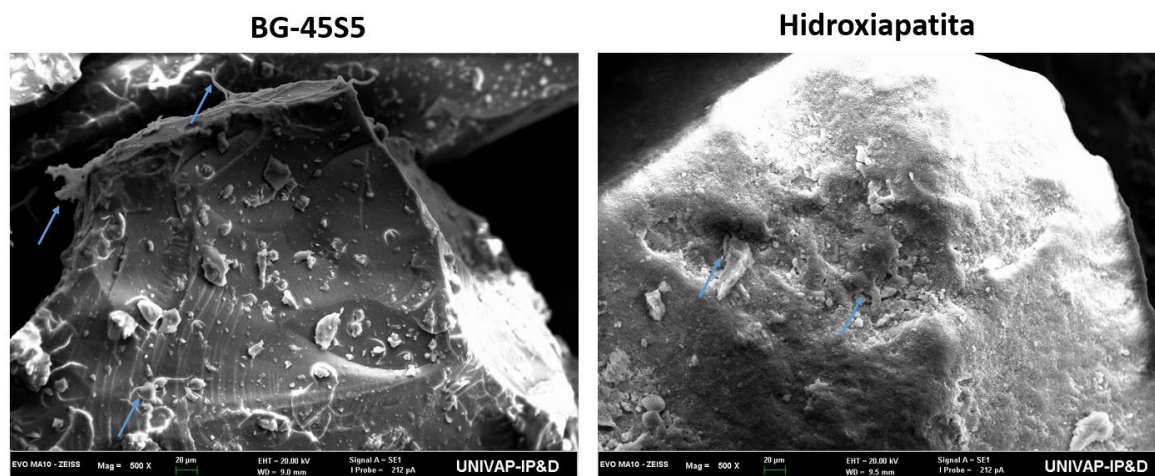
Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Análise *in vitro*

5.2.1 Adesão celular (MEV)

Após 7 dias de cultura, as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para evidenciar a interação celular sobre os biomateriais. Este teste evidenciou que as duas amostras (hidroxiapatita e biovidro 45S5) permitiram o espraiamento celular e adesão celular sobre os materiais, o qual observamos na Figura 14.

Figura 14 – Fotomicrografia da adesão celular (MEV) nas amostras



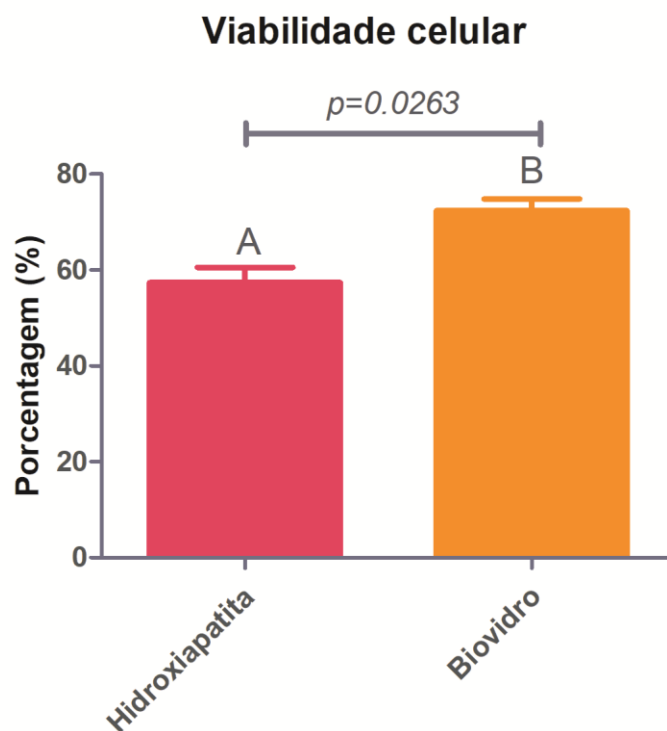
Legenda: a) Grupo BG45S5 com aumento de 500x; b) Grupo hidroxiapatita com aumento de 500x. As setas azuis indicam as células espreiadas sobre os materiais.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.2 Determinação da viabilidade celular (MTT)

No período de 7 dias, foi realizado o teste de determinação da viabilidade celular (MTT). Observa-se que o grupo biovidro apresentou a maior porcentagem de viabilidade celular com diferença estatisticamente significativa entre o grupo hidroxiapatita comercial ($p=0.0263$) conforme mostrado na Figura 15.

Figura 15 – Valores de média e desvio padrão (\pm) da porcentagem de viabilidade celular no período de 7 dias

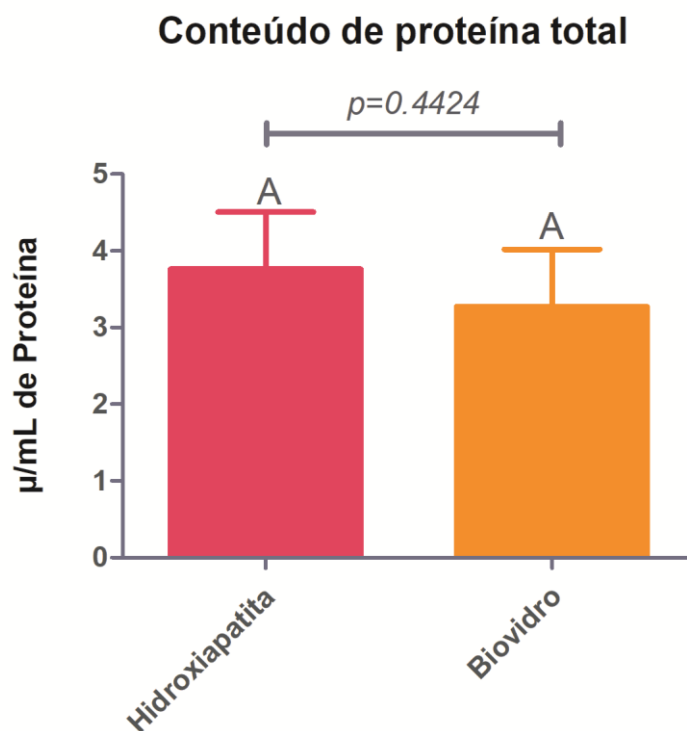


Legenda: Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos.
Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.3 Determinação do conteúdo de proteína total (PT)

A atividade celular metabólica foi avaliada por meio do teste de conteúdo de proteína total. Neste teste foi constatado que os grupos não apresentaram diferença estatisticamente relevante entre si ($p > 0,05$), ou seja, em relação a produção de conteúdo de proteína total, os dois grupos mostram-se similares conforme mostrado na Figura 16.

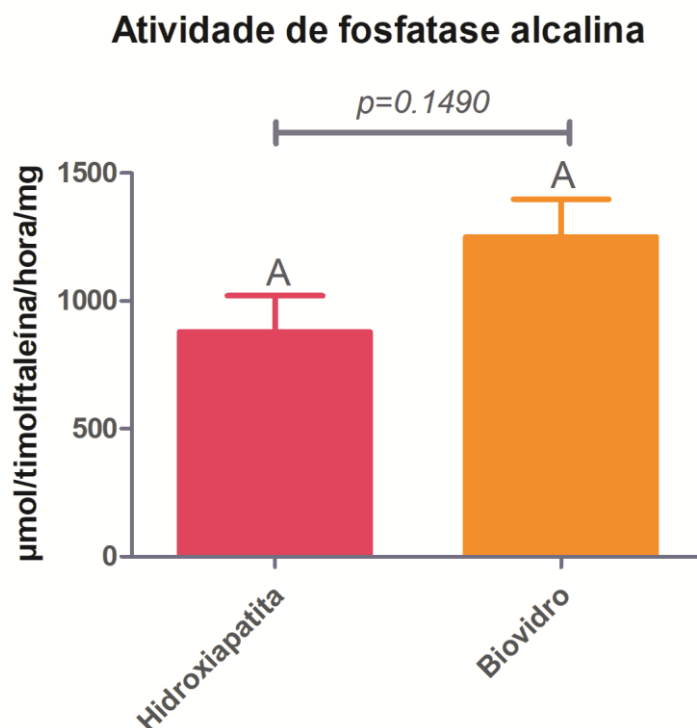
Figura 16 – Valores de média e desvio padrão (\pm) do conteúdo de proteína total durante o período de 7 dias



Legenda: Letras iguais indicam que não houve diferença estatística ($p < 0,05$).
Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Nos mesmos lisados da análise do conteúdo de proteína total, no período de 7 dias, foi mensurada a atividade de fosfatase alcalina. Verificou-se que os grupos hidroxiapatita e biovidro não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$), todavia podemos observar o resultado promissor do biovidro em relação ao grupo hidroxiapatita conforme mostra a Figura 17.

Figura 17 – Valores de média e desvio padrão (\pm) da ALP durante o período de 7 dias.

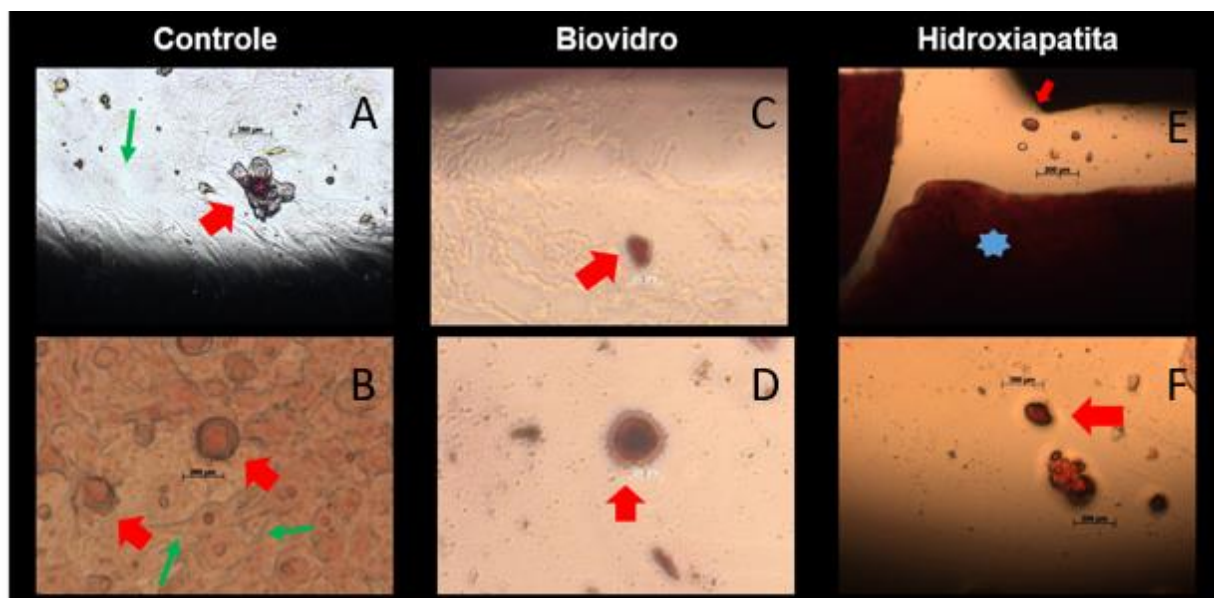
Legenda: Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização

Após 14 dias de cultivo celular foi observada a formação de nódulos de mineralização nos grupos. A Figura 18 representa os nódulos formados nos poços dos grupos experimentais.

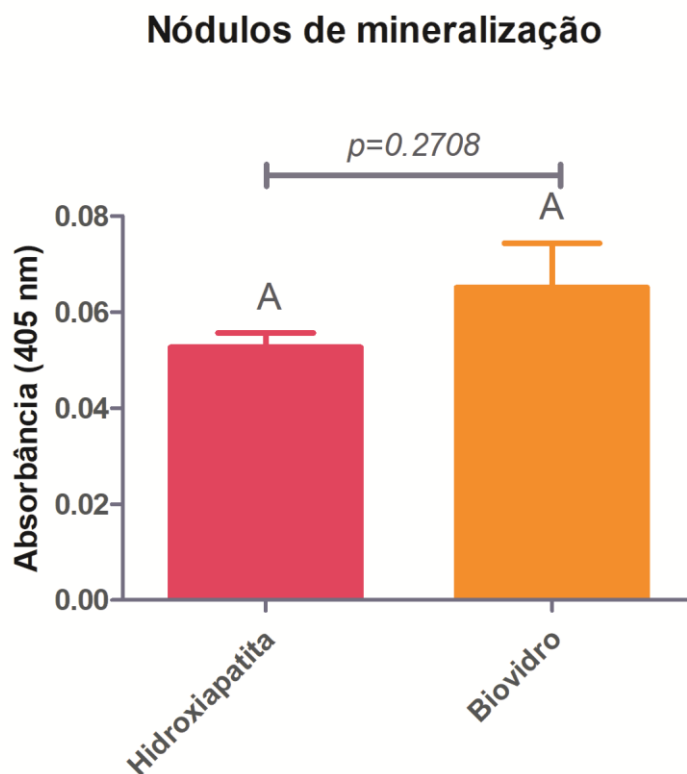
Figura 18 – Nódulos de mineralização em fotomicrografias do fundo das placas de cultivo celular em seus respectivos grupos.



Legenda: Nódulos de mineralização (→) presentes no fundo do poço com os biomateriais ou no grupo controle. Observe os halos ao redor, indicando as zonas de mineralização dos halos. As setas verdes indicam as células mesenquimais presentes no fundo da placa (→). O biomaterial, no caso a hidroxiapatita, também pode ser observado (★). Percebe-se que o tamanho do grânulo de hidroxiapatita é muito superior ao tamanho dos nódulos.
Fonte: Elaborada pela autora.

Após a fotomicrografia dos nódulos, foi realizada a quantificação deles destes em cada grupo analisado. Observa-se na Figura 19 que os grupos biovidro e hidroxiapatita apresentaram a quantificação de nódulos de mineralização sem diferença estatística entre si ($p < 0,05$). Contudo, podemos observar que o grupo biovidro mostrou-se promissor.

Figura 19 – Gráfico da quantificação dos nódulos de mineralização.



Legenda: Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

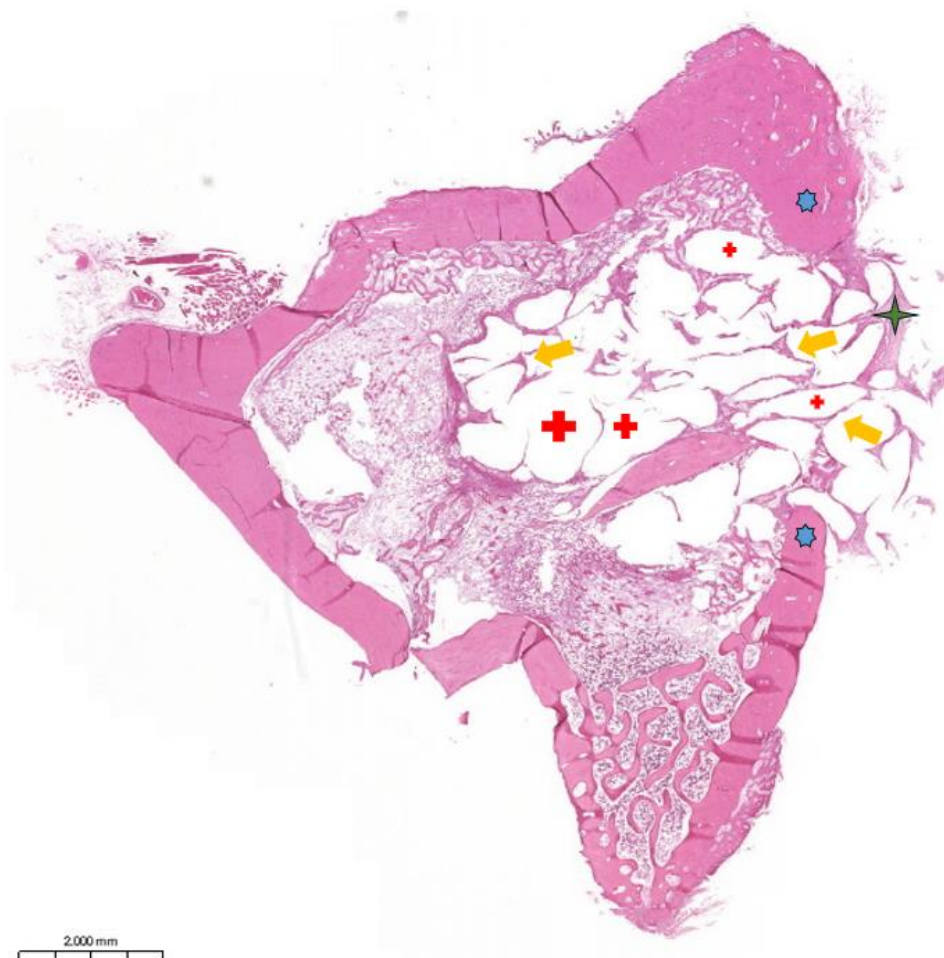
5.3 Análise *in vivo*

5.3.1 Análise histológica

Observando-se o grupo biovidro no tempo de pós-operatório de 2 semanas, foi observado na imagem do defeito em visão panorâmica, que houve neoformação como forma de trabéculas ósseas, ao redor das regiões que continham o biovidro 45S5. Ademais, foi possível observar a presença de áreas compostas por tecido conjuntivo frouxo e delgado. No período de 2 semanas não houve sinais de inflamação

e infecção do tecido e não houve fechamento total da região do defeito ósseo. A Figura 20 é a visão panorâmica do grupo biovidro em 2 semanas.

Figura 20 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada no grupo biovidro 45S5 no tempo de 2 semanas em visão panorâmica do defeito



Legenda: Setas amarelas indicam o tecido ósseo neoformado em volta da área anteriormente ocupada pelos grânulos de biovidro ().

As cruces vermelhas indicam a região no qual estavam os grânulos de biovidro (+). As estrelas verdes indicam as regiões de tecido conjuntivo (*).

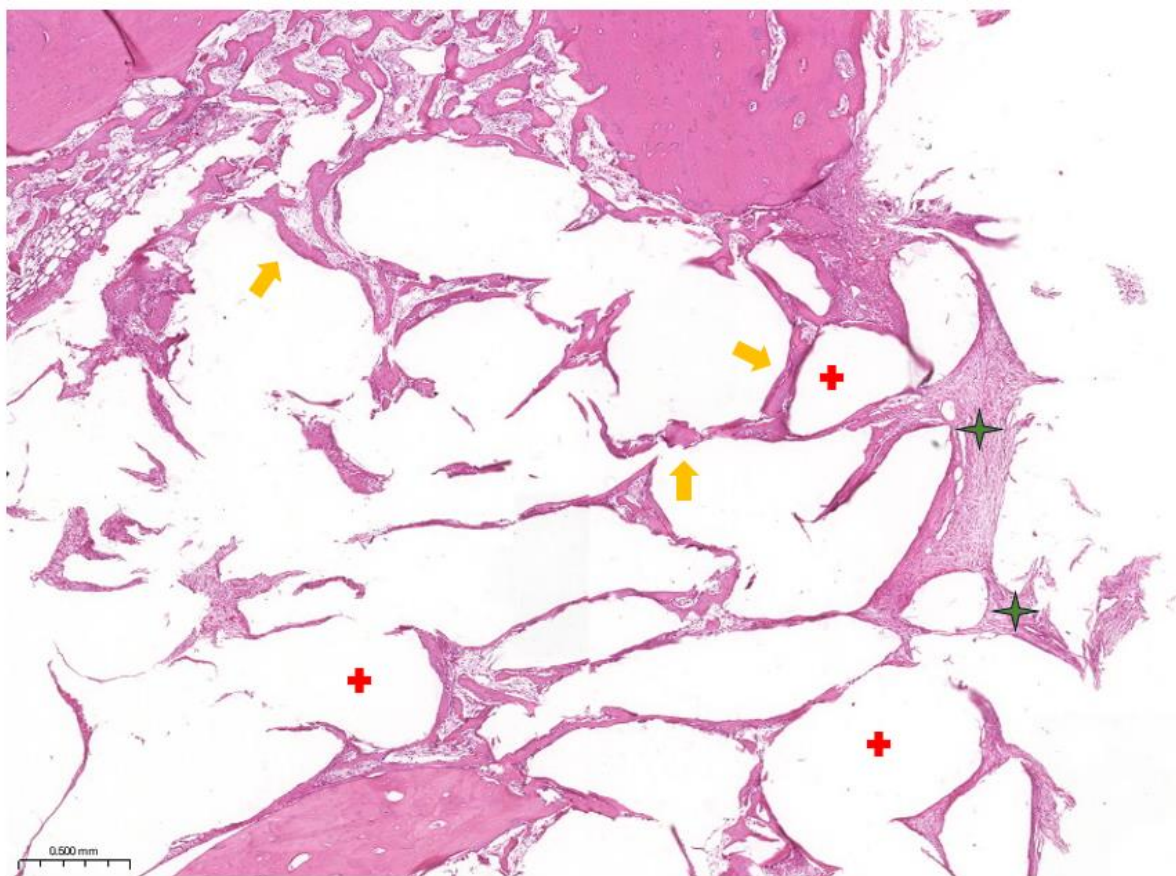
As estrelas azuis indicam as duas extremidades do defeito, ou seja tecido ósseo maduro (*). Figura em aumento de 0.7x.

Fonte: Elaborada pela autora.

Microscopicamente, no período de 2 semanas após a implantação dos biomateriais, foi observado no grupo biovidro um tecido ósseo neoformado ao redor

dos espaços que foram ocupados pelo biomaterial, ou seja, percebeu-se que o biomaterial teve influência na remodelação óssea com proliferação de trabéculas ósseas adjacentes a ele (Figura 21). Observe que as trabéculas ósseas no período de 2 semanas ainda se encontram delgadas e com poucas células, contudo observou-se uma abundância de tecido conjuntivo com células fusiformes. Os espaços vazios e de contorno geométrico representam o espaço no qual o biovidro ocupava anteriormente ao processamento histológico.

Figura 21 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada no grupo biovidro 45s5 no tempo de 2 semanas







Legenda: Setas amarelas indicam o tecido ósseo neoformado em volta da área anteriormente ocupada pelos grânulos de biovidro (). ➡
As cruzes vermelhas indicam a região no qual estavam os grânulos de biovidro (+). As estrelas verdes indicam as regiões de tecido conjuntivo (*). Figura em aumento de 2.5x.
Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto ao grupo hidroxiapatita, também no período de 2 semanas, foi possível notar a presença dos grânulos do biomaterial na lâmina histológica. A hidroxiapatita aparece como um grânulo geométrico circundado por tecido ósseo neoformado. A Figura 22 mostra em visão panorâmica a região do defeito. O tecido ósseo, os grânulos e o tecido conjuntivo frouxo se estendem das duas extremidades do defeito formando o início de uma ponte óssea (Figura 23).

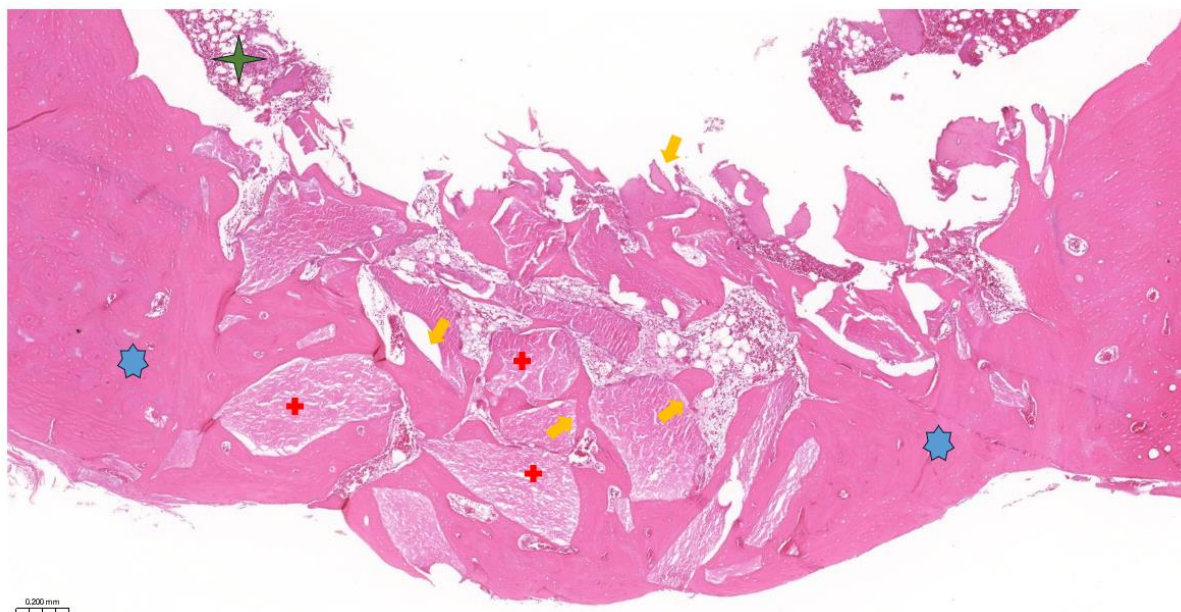
Figura 22 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada no grupo hidroxiapatita no tempo de 2 semanas em visão panorâmica



Legenda: Setas amarelas indicam o tecido ósseo neoformado ao redor dos grânulos de hidroxiapatita (). As cruzes vermelhas indicam os grânulos de hidroxiapatita (). As estrelas verdes indicam as regiões de tecido conjuntivo (). As estrelas azuis indicam as duas extremidades do defeito, ou seja, tecido ósseo maduro (). Figura em aumento de 1,2x.

Fonte: Elaborada pela autora.

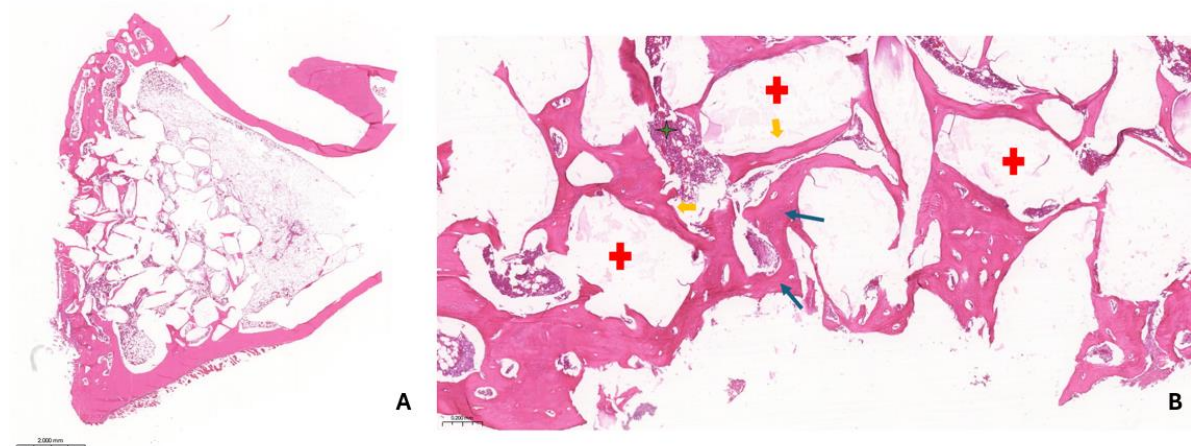
Figura 23 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada no grupo hidroxiapatita no tempo de 2 semanas



Legenda: Setas amarelas indicam o tecido ósseo neoformado ao redor dos grânulos de hidroxiapatita (→). As cruzes vermelhas indicam os grânulos de hidroxiapatita (+). As estrelas verdes indicam as regiões de tecido conjuntivo (★). As estrelas azuis indicam as duas extremidades do defeito, ou seja, tecido ósseo maduro (★). Figura em aumento de 4,3x.
Fonte: Elaborada pela autora.

No período pós-operatório de 8 semanas, foi observado para o grupo biovidro que houve um fechamento mais nítido do defeito através da formação da ponte óssea e sugere-se que houve um aumento da espessura de tecido ósseo neoformado em comparação ao mesmo grupo experimental no tempo de 2 semanas (Figura 24). Também se observou a presença abundante de tecido conjuntivo frouxo dentro da região do defeito, além da presença mais nítida de numerosos vasos sanguíneos dentro das trabéculas ósseas e de osteócitos na mesma região. Há ainda a presença de tecido conjuntivo denso próximo a região da ponte óssea (Figura 25).

Figura 24 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada no grupo Biovidro no tempo de 8 semanas

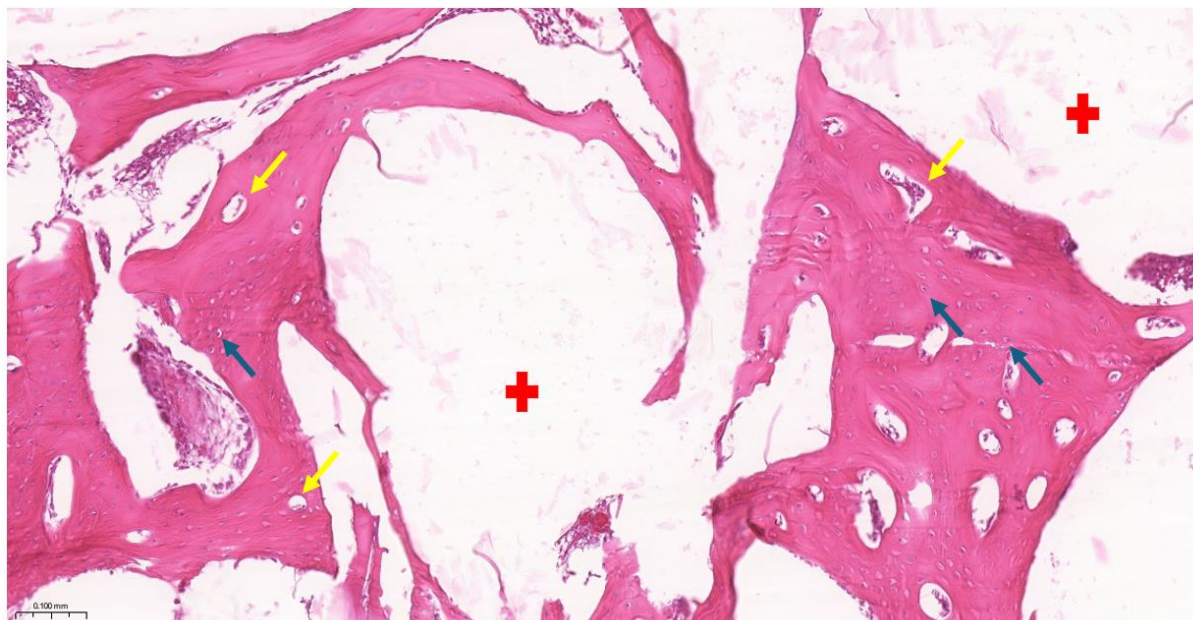


Legenda: Setas amarelas indicam o tecido ósseo neoformado em volta da área anteriormente ocupada pelos grânulos de biovidro ().
 Setas azuis indicam as lacunas com os osteócitos presentes na matriz óssea abundante ().
 As cruzes vermelhas indicam a região no qual estavam os grânulos de biovidro (). As estrelas verdes indicam as regiões de tecido conjuntivo ().

(A) Figura em visão panorâmica com aumento de 0.7x. (B) Figura em aumento de 5x.

Fonte: Elaborada pela autora.

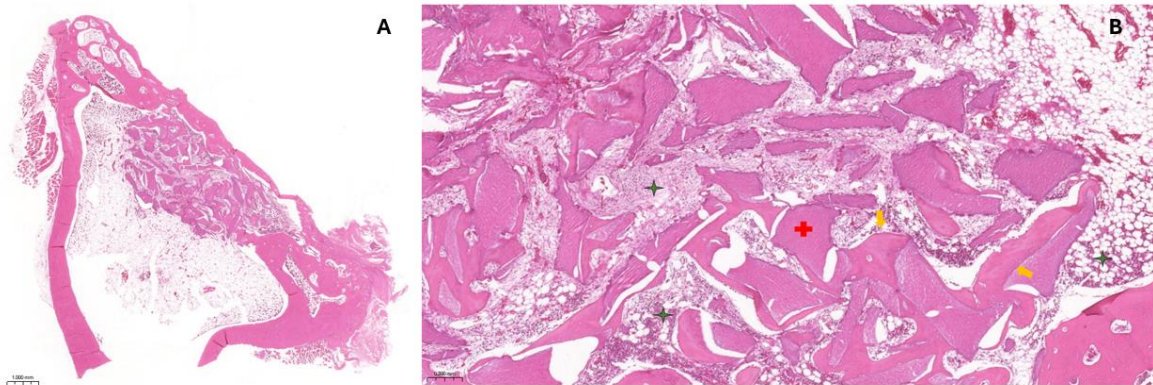
Figura 25 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada em maior aumento com detalhes do grupo Biovidro no tempo de 8 semanas



Legenda: Setas amarelas indicam os vasos sanguíneos presentes no interior da matriz óssea (→). Setas azuis indicam as lacunas com os osteócitos presentes na matriz óssea abundante (→). As cruzes vermelhas indicam a região no qual estavam os grânulos de biovidro (+).
Figura em aumento de 11,5x.
Fonte: Elaborada pela autora.

No grupo hidroxiapatita sugere-se maior espessura de tecido ósseo neoformado ao redor dos grânulos do biomaterial em relação ao tempo de 2 semanas. Além da sugestão do aumento da espessura, é possível notar maior quantidade de trabéculas ósseas. (Figura 26). Os grupos experimentais biovidro e hidroxiapatita apresentaram semelhança entre si com relação ao desenvolvimento do reparo ósseo, no qual foi observado a formação inicial de tecido conjuntivo frouxo que se desenvolve para formar um tecido com aspecto mineralizado que geralmente envolve os grânulos dos dois tipos de biomateriais. A proximidade desse tecido ósseo em relação aos grânulos sugere que ambos os biomateriais testados desempenhem um papel na indução de tecido ósseo. Assim, sugere-se que a osteogênese tenha acontecido em resposta a osteoindução promovida pela presença desses biomateriais.

Figura 26 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada no grupo hidroxiapatita no tempo de 8 semanas



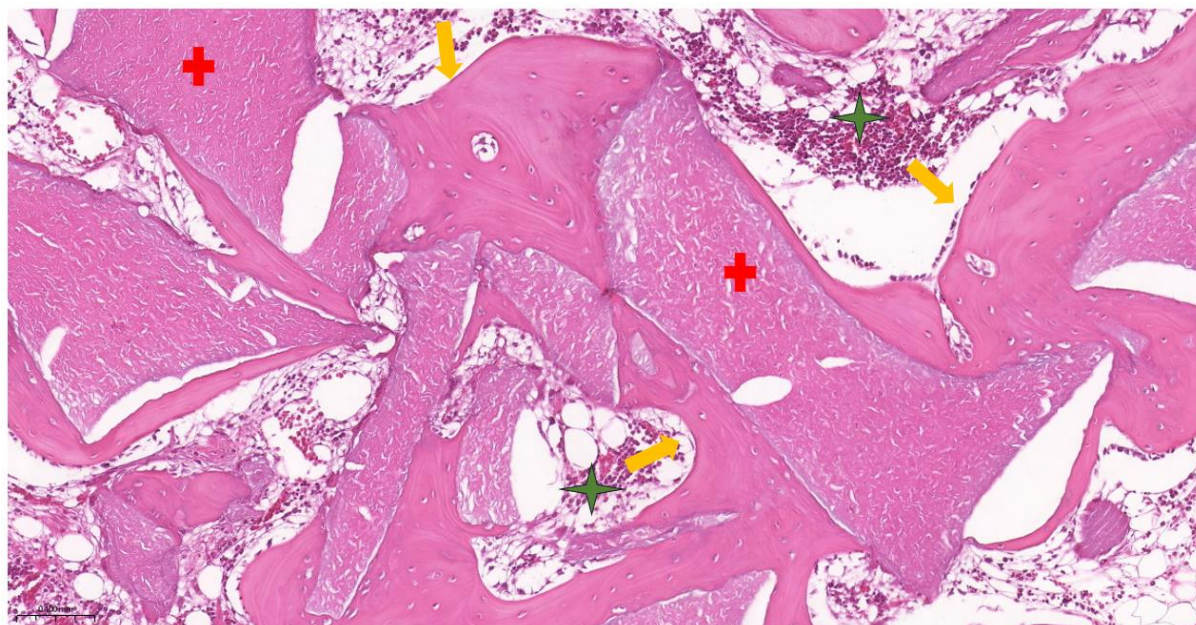
Legenda: Setas amarelas indicam o tecido ósseo neoformado ao redor dos grânulos de hidroxiapatita (→). As cruzes vermelhas são os grânulos de hidroxiapatita (+). As estrelas verdes indicam as regiões de tecido conjuntivo (★).

(A) Figura em visão panorâmica e aumento de 0.8x. (B) aumento de 4.6x.

Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 27 evidencia em detalhes o tecido ósseo neoformado em um aumento de 12,5x. É possível observar a formação de tecido ósseo maduro com a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas concêntricas. O tecido ósseo maduro foi observado nos dois grupos (hidroxiapatita e biovidro).

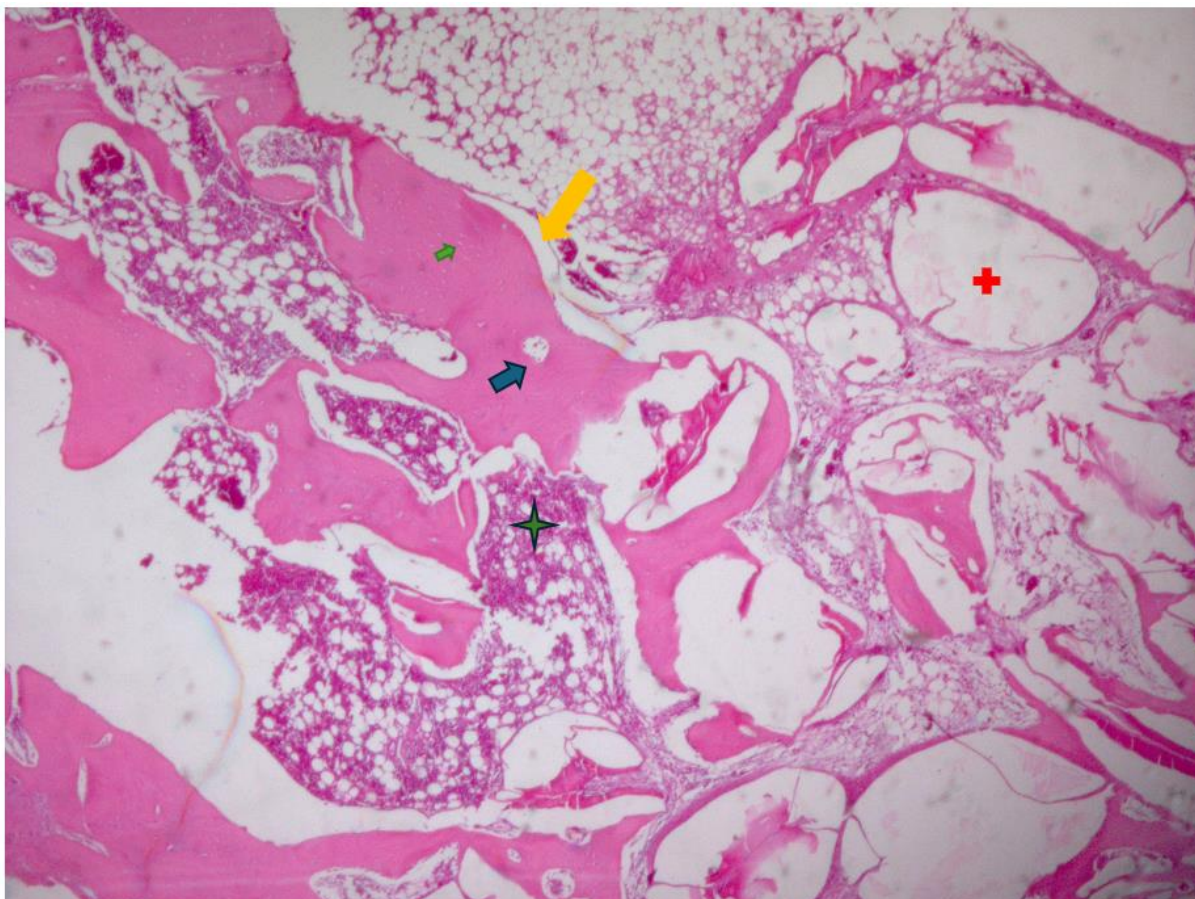
Figura 27 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada no grupo hidroxiapatita no tempo de 8 semanas em maior aumento



Legenda: Setas amarelas indicam o tecido ósseo neoformado ao redor dos grânulos de hidroxiapatita (→). As cruzes vermelhas são os grânulos de hidroxiapatita (+) . As estrelas verdes indicam as regiões de tecido conjuntivo (✦). Aumento de 12,5x.
Fonte: Elaborada pela autora

O último período observado foi o de 12 semanas de pós-operatório, no qual o grupo biovidro foi capaz de promover a neoformação óssea de numerosas trabéculas que envolvem os espaços anteriormente ocupados pelo biomaterial. Essas trabéculas variam de trabéculas mais delgadas até tecido ósseo maduro por meio da constatação de canais de Havers dentro do tecido ósseo. Esses canais são caracterizados por conterem vasos sanguíneos e tecido nervoso em seu interior, trazendo a irrigação que um tecido ósseo maduro necessita (Figura 28). O grupo hidroxiapatita apresentou resultado semelhante ao biovidro, com numerosas trabéculas ósseas ao redor do biomaterial que também continham vasos sanguíneos, presença de tecido conjuntivo frouxo e denso e numerosos osteócitos e osteoblastos (Figura 29). Assim podemos observar que os grupos hidroxiapatita e biovidro se destacaram pela produção óssea ao longo dos três períodos de análise histológica.

Figura 28 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada no grupo Biovidro no tempo de 12 semanas



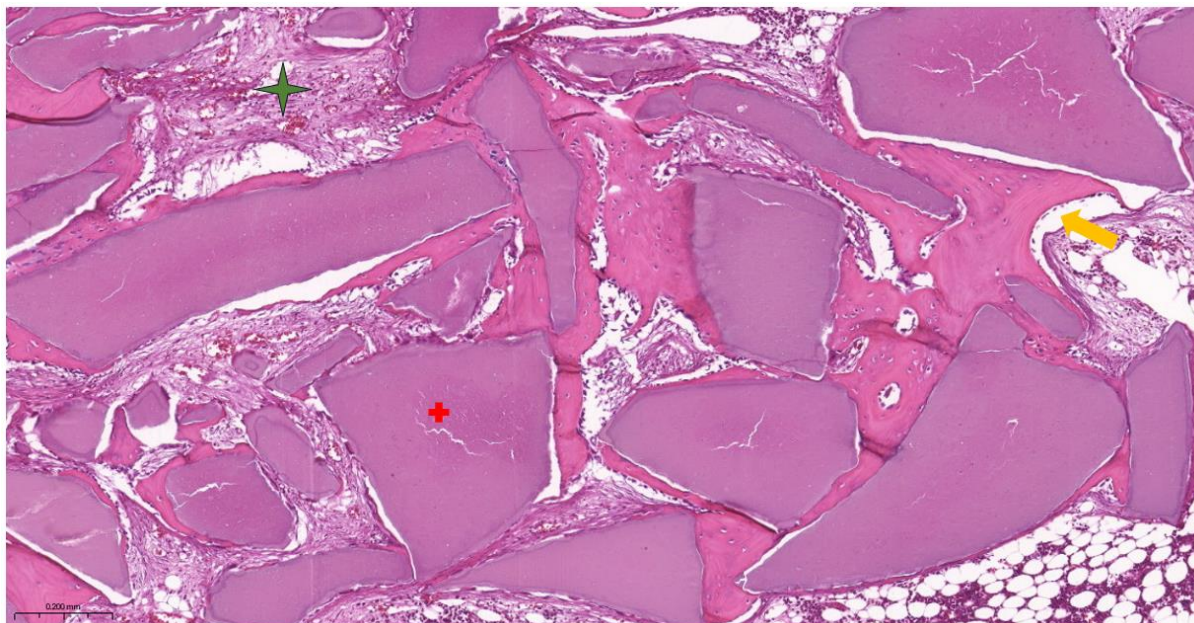
Legenda: Setas amarelas indicam o tecido ósseo neoformado ao redor dos espaços ocupados pelos grânulos de biovidro (→).

As cruzes vermelhas indicam os espaços anteriormente ocupados pelos grânulos de biovidro (⊕). As estrelas verdes indicam as regiões de tecido conjuntivo (★). As setas verdes indicam as lacunas com os osteócitos (↗) e as setas azuis indicam os canais de Havers (→).

Figura em aumento de 10x.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 29 – Fotomicrografia em microscópio óptico observada no grupo hidroxiapatita no tempo de 12 semanas



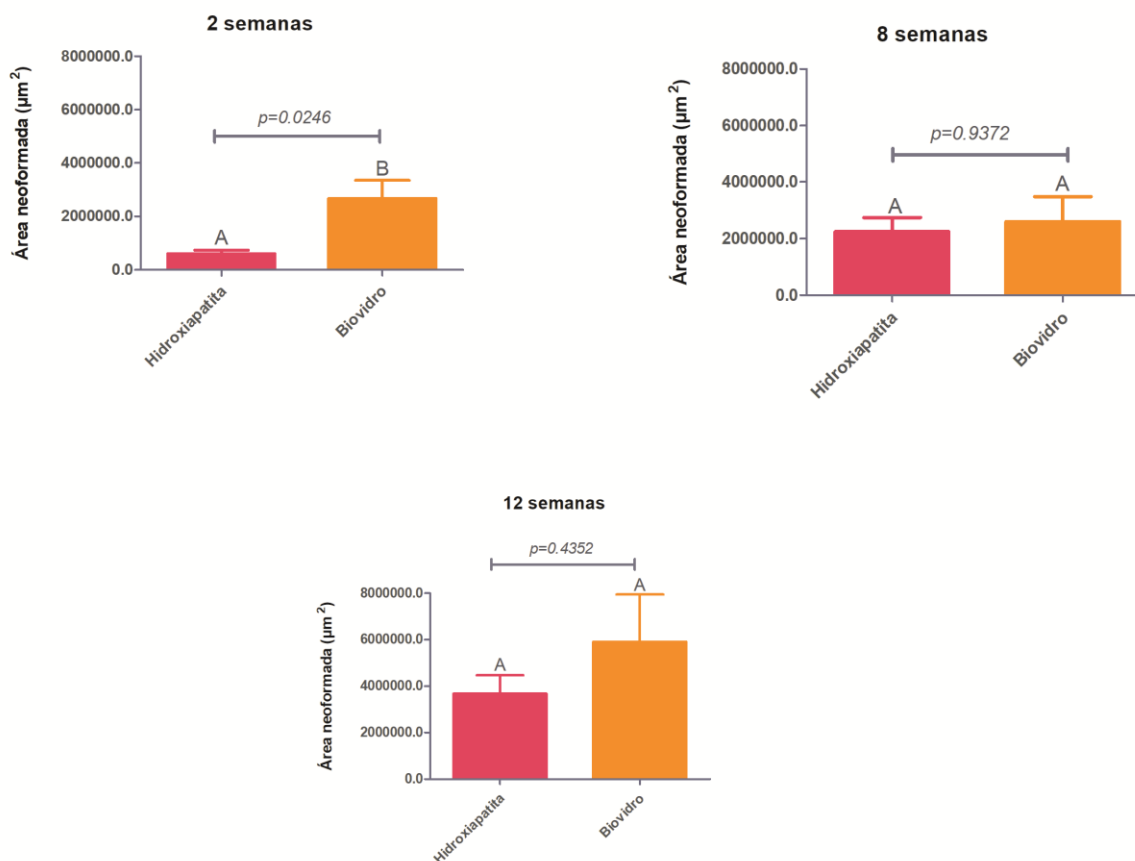
Legenda: Setas amarelas indicam o tecido ósseo neoformado ao redor dos espaços ocupados pelos grânulos de biovidro (→). As cruzes vermelhas indicam os espaços anteriormente ocupados pelos grânulos de biovidro (+). As estrelas verdes indicam as regiões de tecido conjuntivo (✦).
Figura em aumento de 7.9x.

Fonte: Elaborada pela autora

5.3.2 Análise histomorfométrica

Ao comparar os dois grupos (hidroxiapatita e biovidro), observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nos períodos de 8 e 12 semanas. No período de 2 semanas, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$), sugerindo que o grupo biovidro mostrou-se como um material oportuno e propício em relação ao grupo hidroxiapatita. Embora não haja diferença estatística entre os grupos nos períodos de 8 e 12 semanas, ainda assim o grupo biovidro mostrou-se promissor em relação ao grupo hidroxiapatita comercial. O resultado está ilustrado na Figura 30.

Figura 30 – Área de neoformação óssea com os valores de média e desvio padrão (\pm) de cada grupo (hidroxiapatita e biovidro) e período (2, 8 e 12 semanas).

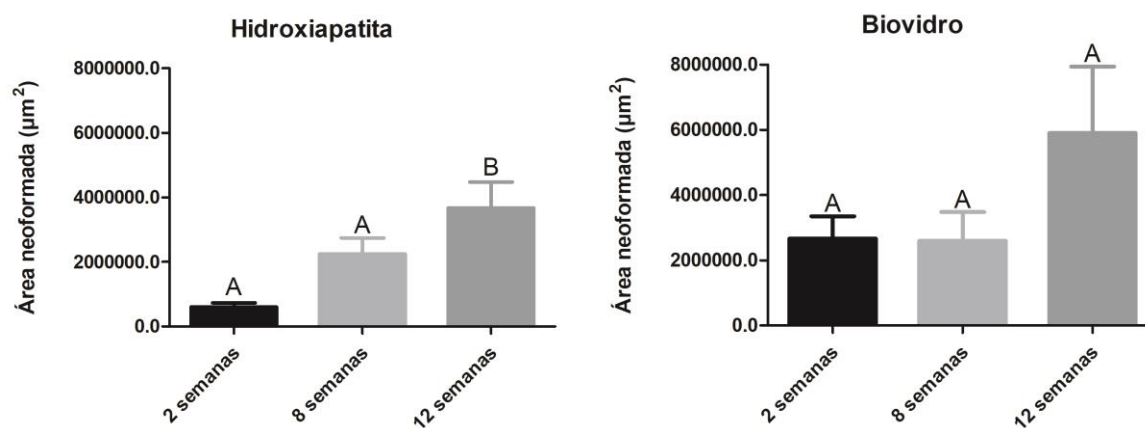


Legenda: letras distintas acima dos gráficos indicam diferença estatística ($p < 0,05$) e letras iguais indicam que não há diferença ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Foi realizada também a estatística avaliando o mesmo material nos diferentes períodos, podemos observar no grupo hidroxiapatita, o tempo de 12 semanas apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com o tempo de 2 semanas, ou seja, houve maior área de neoformação óssea em 12 semanas comparado ao tempo de 2 semanas estatisticamente. Observa-se também que os grupos biovidro e hidroxiapatita apresentaram crescente área de neoformação óssea ao longo dos três períodos avaliados conforme observamos na Figura 31.

Figura 31 – Área de neoformação óssea com os valores de média e desvio padrão (\pm) de cada grupo (hidroxiapatita e biovidro) com a evolução de cada período (2, 8 e 12 semanas).



Legenda: letras distintas acima dos gráficos indicam diferença estatística ($p < 0,05$) e letras iguais indicam que não há diferença ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

A definição de qualidade de vida é relativa para determinadas culturas, uma vez que engloba diferentes fatores emocionais, sociais, bem-estar físico e psicológico de cada indivíduo. Assim, sabemos que a qualidade de vida não se limita apenas ao bem-estar físico; no entanto, para os idosos, essa definição pode estar vinculada a fatores como segurança, longevidade, conforto e saúde, essenciais para que consigam realizar suas atividades diárias (Heide, 2022). Ao pensarmos no cotidiano, imediatamente pensamos no deslocamento diário, e não somente dos idosos, mas também de pessoas que sofreram algum tipo de trauma, doenças ósseas adquiridas ou congênitas que de certa forma afetam o dia a dia desses indivíduos. O osso é uma estrutura anatômica responsável pelos movimentos, proteção e manutenção da estrutura humana e da homeostase mineral (Standring et al., 2008) e, portanto, de grande valia para o corpo humano.

Neste contexto, os biomateriais ósseos desempenham um papel crucial no ramo da medicina regenerativa. Os biomateriais evoluíram ao longo do tempo de materiais de suporte inertes para materiais funcionais, ou seja, capazes de desencadear e promover a regeneração tecidual, ampliando a definição de “biomaterial” para “biomateriais regenerativos” (Cao e Ding, 2022). Atualmente, são capazes de regular vias de sinalização e alterar o comportamento celular para promover a regeneração tecidual (Gao et al., 2022). Assim, os biomateriais atuais têm sido desenvolvidos para servir não apenas como estruturas, mas também como reguladores de vias importantes (Khalil et al., 2014; Dhowre et al., 2015). Percebe-se, portanto, a necessidade constante do conhecimento profundo sobre os biomateriais e os processos fisiológicos humanos para que a regeneração de um tecido danificado seja reestabelecida (Vishwakarma et al., 2016; Gao et al., 2022).

Os fosfatos de cálcio estão entre os biomateriais mais utilizados nas reconstruções ósseas ortopédicas e odontológicas, principalmente devido as características de biocompatibilidade, por serem biodegradáveis, por serem osteocondutores e por promoverem a osteointegração (Bohner et al., 2012; Eliaz e Metoki, 2017). Sabe-se que 70% do osso humano é composto por fosfato de cálcio (CaP) e por isso os biomateriais compostos por CaP são os de primeira escolha para

o reparo ósseo, devido a efetiva estabilidade do material, segurança em uso clínico e baixo custo (Habracken et al., 2016). As biocerâmicas bioativas contém fosfato de cálcio e fazem, portanto, parte da categoria de um dos biomateriais mais utilizados: o biovidro e a hidroxiapatita (Hench e Best, 2013).

A hidroxiapatita é um material de regeneração óssea muito importante devido a sua excelente biocompatibilidade e propriedades osteoindutoras (Poddar et al., 2023; Ran et al., 2023). Contudo, apresenta algumas desvantagens como baixas propriedades mecânicas e lenta degradação; sendo que essa especificidade de lenta degradação do material possibilita a infecção e inflamação do sítio cirúrgico atrasando a remodelação óssea (Rezwan et al., 2006). Neste sentido, os biovidros comerciais apareceram como uma alternativa à hidroxiapatita devido a melhor bioatividade e degradabilidade. O biovidro 45S5 desenvolvido por Hench em 1971, por exemplo, tem sido muito utilizado na odontologia, em casos médicos de regeneração óssea e próteses auriculares com geração de bons resultados (Poh et al., 2013; Mendoza-Cerezo et al., 2023).

Atualmente, os biovidros podem ser fabricados por dois processos diferentes: rota de têmpera por fusão ou pelo processo sol-gel. Ambos os processos levam à produção de vidros bioativos, e a escolha do processo de produção do biomaterial depende do objetivo de cada produto (Fiume et al., 2018). O método de fusão foi escolhido para a produção do biovidro 45S5 neste trabalho, sendo essa a técnica mais comum para a produção deste material, considerada padrão ouro (Hench, 1971; Chen, 2008, Gerhardt e Boccaccini, 2010; Mohamed, 2017). A técnica da fusão envolve óxidos precursores em altas temperaturas, seguida por um rápido resfriamento para obter um material vítreo (Fiume, 2018). Os vidros bioativos produzidos por fusão apresentam propriedades mecânicas superiores àqueles produzidos pela rota sol-gel, o que se alinha com a necessidade de obter um material com boas propriedades mecânicas e padronizado para sua futura comercialização (Kaur et al., 2014; Boulila et al., 2018). No entanto, os biovidros produzidos pela rota sol-gel apresentam porosidade superior e maior área superficial. Dependendo da finalidade do produto, como no caso de biovidros que necessitam ser funcionalizados com algum tipo de material ou medicação, a via sol-gel seria mais indicada (Kaur et al., 2014; Boulila et al., 2018).

Os resultados do biomaterial no tecido têm muitas vezes associação com o entendimento da estrutura deste biovidro, neste sentido, a investigação estrutural por meio dos testes de caracterização é essencial. Um dos primeiros testes realizados neste trabalho foi a difratometria de raios x. Sabe-se que vidros são estruturas consideradas materiais amorfos, ou seja, não apresentam uma imagem característica de difração, contudo podem ocorrer determinadas bandas de intensidade dependendo da estrutura do vidro (Shelby, 2005; Suryanarayana e Norton, 1998). O processo de cristalinização do biovidro é considerado um processo indesejado, uma vez que resultaria em uma superfície heterogênea do biomaterial e assim dificultaria o processo de troca iônica que é muito importante para um material osteoindutor (Tilocca, 2009). De acordo com os nossos resultados, conseguimos promover a formação de um material considerado vítreo, onde nenhuma fase cristalina foi observada, exceto por uma banda larga entre 15° e 40° (2θ) como apresentado na Figura 10 dos resultados desta tese. Contudo, essa banda em torno de 30° já foi relatada como sendo característica dos materiais de silicato vítreo como mencionado por estudos anteriores (Hench e Wilson, 1993; Bretcanu et al., 2009; Lopes, 2010; Matos, 2023). A outra banda em torno de 20° é característica da sílica amorfa e já foi relatada em outros estudos (Bretcanu et al., 2009; Lopes, 2010; Matos, 2023).

As análises de FTIR indicaram grande similaridade estrutural do biovidro 45S5 produzido neste trabalho com os presentes na literatura, no qual identificamos bandas correspondentes as ligações Si–O–NBO que são responsáveis pela taxa de dissolução da sílica (Lopes, 2010; Matos, 2023; Souto, 2021). Sabe-se que as ligações NBO favorecem o processo da bioatividade do biovidro, pois estão interligadas ao processo de formação da camada de hidroxicarbonato de apatita (HCA) na superfície do biovidro que quando entram em contato com o fluido corporal são responsáveis pelas trocas iônicas entre o biovidro e o fluido e assim ocorre o mecanismo de ligação óssea destes materiais (Cerruti et al., 2005; Slosarczyk et al., 2005). Para que ocorra a formação de HCA na superfície do biovidro é necessário que o biovidro entre em contato com os fluidos corporais e assim comece a ocorrer a diminuição de ligações NBO devido a hidrólise do biovidro que forma uma rede de sílica na superfície do biomaterial (Fiume et al., 2018). Portanto, as bandas NBO são necessárias para a dissolução do biovidro e consequente formação da camada de

HCA na superfície do biovidro promovendo a bioatividade local (Anderson et al., 2004).

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSD) é uma técnica no qual se mede as temperaturas e o fluxo de calor que está associado com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Assim, para os biovidros a lacuna entre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de cristalização (T_c) é utilizada como medição para a estabilidade térmica do vidro (Junior, 2017). Nossos resultados mostraram que a amostra de BG45S5 apresentou transição vítrea (T_g) em 552,1°C e pico de cristalização (T_c) em 737,9°C. No trabalho de Bretcanu e colaboradores (2009) os valores foram muito similares aos nossos, foram T_g para o biovidro 45S5 igual a 549°C e pico máximo de cristalização de 676°C. No trabalho de Dechandt, 2021, seu biovidro 45S5 apresentou os valores de T_g e T_x de 545 ° e 686 °C, respectivamente. De acordo com Peitl et al. (2001) a transformação vítrea dos biovidros tem início em torno dos 520°C, sendo que existem diversos trabalhos citados acima, além do trabalho de Granito et al. (2011) que comprova T_g igual a 550 °C, indicando que nossos dados da produção do BG45S5 estão próximos ao que encontramos na literatura, devido ao fato de que um biovidro tem T_g enquanto materiais cristalinos não tem T_g .

A composição química do BG45S5 foi avaliada por espectrometria de emissão óptica com plasmas indutivamente acoplado (ICP OES) uma vez que a análise química quantitativa é essencial para a compreensão e correlação da estrutura com a composição do biomaterial. Ao analisarmos o teor químico das amostras de BG45S5 anteriormente aos testes *in vitro* e *in vivo* (Tsigkou et al., 2014), observamos que a composição química do nosso BG45S5 foi de 47,10% SiO_2 ; 23,43% CaO ; 23,22% Na_2O e 6,25% de P_2O_5 , assim se formos comparar com a composição nominal do Bioglass® que é de 45% de SiO_2 ; 24,5 % de CaO ; 24,5% de Na_2O e 6% de P_2O_5 ; a composição do nosso produto está dentro dos padrões aceitáveis para ser considerado um biovidro 45S5.

Ademais, sabemos de a importância do biomaterial não apresentar efeitos tóxicos para o hospedeiro concomitantemente com a sua capacidade influenciar a diferenciação celular. Deste modo, no presente estudo realizamos testes *in vitro* do biomaterial quando em contato com as células mesenquimais por meio de testes de citotoxicidade (MTT), conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina,

adesão celular (MEV) e formação de nódulos de mineralização com o intuito de observar os efeitos dos biomateriais testados sob as células.

Os testes de citotoxicidade celular são utilizados para avaliar a biocompatibilidade de qualquer biomaterial para uso médico e assim depois de comprovada a sua biocompatibilidade podem dar seguimento os outros ensaios necessários para os testes *in vitro* e *in vivo*, portanto o teste de viabilidade celular é o pioneiro para a decisão da conduta dos estudos biológicos (Rogerio et al., 2003). Os resultados do MTT mostraram que as amostras do grupo BG45S5 apresentaram diferença estatística em relação ao grupo hidroxiapatita, com resultado promissor do grupo BG45S5 em relação a hidroxiapatita. Assim, as amostras de BG45S5 foram consideradas biocompatíveis uma vez que apresentaram resultados semelhantes ao da hidroxiapatita comercial. Estudos relatam que o biovidro 45S5 aumenta rapidamente o pH do meio após 24h de imersão (Chen et al., 2005; Cerruti et al., 2005; Bingel et al., 2015). Este aumento do pH está associado a liberação de íons cálcio e fosfato (Jones et al., 2001). Assim, estes estudos mostram que as células mesenquimais sofrem um período considerado de “stress” momentâneo nos três primeiros dias e posteriormente esta diminuição da viabilidade celular é superada e as células passam a se adaptar ao ambiente (Baino et al., 2016; Fiume et al., 2018). Assim, no 7º dia as células adquirem viabilidade celular com condições satisfatórias, conforme demonstrado no estudo de Godoi (2022) no qual suas células aumentam a viabilidade celular quando analisadas no período de 2 dias para 7 dias de incubação. Fernandes (2023) analisou compósitos a base de polímeros associados a diferentes tipos de biovidro, dentre eles, o biovidro 45S5 e observou também um aumento da viabilidade celular no 7º dia de incubação, o que pode também ser visto nesse trabalho no qual em 7 dias foram obtidos resultados satisfatórios de viabilidade celular para o grupo BG45S5.

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) juntamente com o conteúdo de proteína total são reconhecidos por serem importantes biomarcadores da diferenciação das células osteogênicas (Xynos et al., 2000; Reible et al., 2017). A fosfatase alcalina é uma enzima presente na membrana plasmática dos osteoblastos, sendo responsável pela hidrólise dos íons fosfato, permitindo a formação da camada de hidroxiapatita e conseqüentemente estimulando a mineralização (Trivedi et al., 2020; Maazouz et al., 2021; Reible et al., 2017; Bhattacharjee et al., 2015; Nie e Wang,

2007). Esse estudo mostrou que houve produção de proteínas totais e fosfatase alcalina em ambos os grupos (HA e BG45S5) sugerindo que ambos os materiais permitem a síntese de proteínas que compõe a matriz óssea como osteocalcina, osteopontina, sialoproteínas, colagenase e outras capazes de realizarem este processo de diferenciação celular (Tsigkou et al., 2009). Farmani et al. (2023) observaram que o papel do vidro bioativo foi o responsável pelo aumento da atividade da ALP de forma significativa. Kukulka (2021) realizou um estudo sobre materiais poliméricos de PCL que incorporavam biovidro em sua composição e observaram que os grupos que continham vidro bioativo apresentaram desempenho superior nos testes de ALP e PT em comparação com o polímero puro, que não possuía a adição do biovidro. Avelino (2024) investigou o impacto do revestimento de implantes de zircônia com 45S5 e seus achados se assemelham aos resultados obtidos nesse estudo. Ambos os estudos não identificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados, sendo que o grupo revestido com o biovidro 45S5 apresentou quantidade reduzida de proteínas totais, mas este mesmo grupo demonstrou maior atividade de fosfatase alcalina. Pesquisadores descrevem que partículas de vidro bioativas são responsáveis por aumentarem a síntese de ALP e consequentemente favorecerem os fatores de diferenciação óssea (Ren et al., 2021; Shahin-Shamsabadi et al., 2018; Yuan et al., 2001).

Essa diferenciação celular das células mesenquimais pode ser confirmada com a realização da quantificação dos nódulos de mineralização, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa, observou-se que houve produção de nódulos mineralizados, em especial uma maior quantidade deles no grupo BG45S5. No teste de quantificação dos nódulos de mineralização foi possível evidenciar que houve formação da matriz mineralizada (Reible et al., 2017). Nos estudos de Fernandes (2023) e Rodrigues (2019) observou-se que os grupos que continham biovidro, especialmente o BG45S5 apresentaram maior quantificação de nódulos de mineralização, resultado também encontrado nesse estudo.

Os resultados obtidos nos testes de caracterização físico-químicos e nos testes *in vitro* desempenharam um papel fundamental para a compreensão inicial da biocompatibilidade, segurança, capacidade de diferenciação celular e mineralização do novo biomaterial proposto por este estudo. Contudo, é importante ressaltar que os resultados *in vitro* nem sempre se traduzem no cenário do *in vivo*. O organismo vivo é

complexo e dinâmico, com a resposta imunológica, circulação sanguínea e todos os sistemas agindo conjuntamente. Assim, entendendo a importância do estudo *in vivo*, necessitávamos desta etapa para entendermos de forma mais abrangente e precisa a capacidade de indução óssea do biomaterial. Portanto, realizamos essa etapa em coelhos da raça *New Zealand* para observar de forma histológica e histomorfométrica a capacidade de regeneração óssea do BG45S5 em comparação com o produto HA.

Na análise histológica, observou-se que os dois grupos, HA e BG45S5 não apresentaram resposta inflamatória exacerbada em todos os períodos de eutanásia (2, 8 e 12 semanas), uma vez que não foram observadas células gigantes multinucleadas e células inflamatórias nos tecidos, que são importantes indícios de que não houve inflamação local, favorecendo o sucesso das propriedades mecânicas do biomaterial (Vogel et al., 2001) e confirmando a biocompatibilidade dos materiais.

O tecido ósseo necessita do equilíbrio dinâmico entre os osteoclastos e osteoblastos para que ocorra a remodelação óssea. Além dos fatores vitais, existe uma grande rede complexa de monócitos, neutrófilos, osteócitos, macrófagos e células imunes adaptativas que desempenham o papel da homeostase óssea (Gruber, 2019). Caso haja algum tipo de estresse ósseo desencadeado por inúmeros fatores, a resposta inflamatória é quem dita a capacidade de remodelação óssea (Li et al., 2021).

No período de 2 semanas após a implantação dos biomateriais, não foi possível observar fechamento da região do defeito em nenhum dos grupos experimentais. Bellucci et al. (2017) observaram em seu grupo de biovidro 45S5 que houve uma neoformação óssea ao redor da superfície do biomaterial, assim como em nosso estudo. Ele observou que as células e as fibras colágenas recém depositadas eram paralelas a superfície do biomaterial, além disto ele destaca uma superfície homogênea ao redor do material formando a camada de hidroxiapatita (HCA) como uma importante característica para o alcance da remodelação óssea. Em nossos resultados, observamos que para o mesmo período de análise de 2 semanas, o grupo controle hidroxiapatita também obteve formação de tecido conjuntivo que se estendem das duas extremidades do defeito sugerindo o início de uma ponte óssea. No estudo de Wheeler et al. (2001) os pesquisadores testaram diferentes materiais para o revestimento e melhora dos implantes de titânio. Os materiais de revestimento testados foram: biovidro 45S5 ou hidroxiapatita. Os resultados de 12 e 16 semanas

após a implantação dos biomateriais mostraram que os dois grupos obtiveram neoformação ao redor dos implantes, contudo havia diferenças que foram evidenciadas pelos autores. Dentre elas, podemos citar as trabéculas ósseas serem mais espessas e em maior número no grupo biovidro. Ademais, com o passar do tempo o grupo revestido com HA apresentou um declínio na porcentagem óssea e na espessura trabecular enquanto o grupo 45S5 não obteve esse declínio.

Ao longo de um período de 8 semanas, notamos no grupo biovidro o início da formação da ponte óssea evidentemente. Sugere-se que houve um aumento na espessura do tecido ósseo neoformado ao redor dos grânulos de biovidro, em comparação com o mesmo grupo avaliado após 2 semanas. Não podemos afirmar que realmente houve este aumento de espessura, uma vez que não realizamos este teste, contudo podemos observar isso de forma qualitativa com a observação das imagens histológicas. De forma semelhante, o grupo tratado com hidroxiapatita também demonstrou formação de ponte óssea e incremento na espessura do tecido mineralizado. Ao atingir o período de 12 semanas de observação, identificamos nos dois grupos - tanto no BG45S5 quanto no HA - um tecido ósseo que mostrava tendências de maturidade.

Foi observado nesse estudo que a mineralização ocorreu do centro do defeito em direção a periferia externa do defeito, fato diferente do que foi observado nos estudos descritos por De Mori et al. (2023) e Vogel et al. (2001). Sugere-se que essa mineralização do centro em direção a periferia decorra do fato de o biomaterial estar presente no interior do defeito. Ademais, observou-se em nosso estudo a presença trabéculas ósseas adjacentes ao biomaterial tanto no grupo HA quanto no BG45S5, fato também observado no estudo de De Mori et al. (2023). Apesar de não ter sido evidenciado resultados estatisticamente relevantes entre os grupos avaliados na pesquisa de De Mori et al. (2023), a análise dos dados histológicos deste estudo, revelaram que os *scaffolds* compostos por *Bioglass* exibiram uma melhor formação óssea.

Sugere-se que o BG45S5 desse estudo tenha promovido a formação óssea dos defeitos críticos de coelhos assim como observado no estudo de Moritz et al. (2004) no qual os implantes revestidos com *Bioglass* mostram-se promissores. Nesse estudo, observou-se que a hidroxiapatita apresentou uma lenta taxa de degradação, como evidenciado nas lâminas histológicas. Por outro lado, o biovidro demonstrou

taxas de degradação superiores e uma melhor neoformação óssea. Esses resultados corroboram achados semelhantes relatados por Vogel et al. (2001), onde o material 45S5 exibiu uma regeneração óssea mais significativa e taxas de degradação superiores em comparação com outros tipos de biovidros testados no estudo deles.

Estudos comprovam que um dos principais benefícios do biovidro 45S5 é que a sua dissolução iônica, ou seja, a sua taxa de degradação, seja superior à de alguns biomateriais, tal como a hidroxiapatita. Diante disso, o biovidro 45S5 é capaz de liberar íons (incluindo o íon silício) que são importantes para a formação óssea visto que são responsáveis pela ativação de genes que controlam a osteogênese (Kaur et al., 2019; Krishnan e Lakshmi, 2013; Hench, 2009) e assim proporcionar uma maior taxa de formação óssea comparada a outros biomateriais como a hidroxiapatita (Ghosh et al., 2008).

Nos resultados do trabalho *in vivo*, observou-se uma diferença estatística entre os grupos no período de 2 semanas, com destaque para o grupo biovidro em relação à hidroxiapatita. Esses dados sugerem que, devido à dissolução mais rápida de seus íons, o biovidro tem a capacidade de promover a mineralização mais rapidamente do que a hidroxiapatita. (Almeida, 2013). A camada biologicamente ativa de HCA é um requisito importante para o comportamento bioativo do BG45S5 (Carlo et al., 2007), contudo, estudos têm mostrado que a liberação dos produtos iônicos no ambiente é essencial para induzir a proliferação e diferenciação celular e ativação de genes conhecidos por desempenharem um aumento do metabolismo positivo dos osteoblastos em até 5 vezes (Xynos et al., 2001). Jell et al. (2008) mostrou aumento de biomarcadores osteogênicos, como a fosfatase alcalina (ALP) e sialoproteína óssea (BSP) em osteoblastos que foram condicionados ao meio de cultura contendo biovidro, resultando em maior diferenciação celular. Effah Kaufman et al. (2000) também confirmou observar a expressão de vários genes como osteocalcina, osteonectina e osteopontina em células osteoblásticas, além do aumento da atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formação de colágeno tipo I. De fato, os produtos da dissolução iônica dos biovidros estimulam a osteogênese e a angiogênese através da ativação de genes associados a formação e vascularização óssea (Hoppe et al., 2011).

Foi possível observar em nosso estudo que a interação direta dos biomateriais, como a hidroxiapatita e o biovidro 45S5 com o osso, são capazes de

induzir a neoformação óssea. Estudos da literatura realizam a pesquisa *in vivo* com diferentes tipos de materiais (compósitos ou puros), com diversos tipos de fabricação, diferentes tipos de animais testados e diferentes tempos de análise. O fenômeno da osteointegração é um requisito fundamental para que a remodelação ocorra e o novo biomaterial desenvolvido nesta pesquisa seja futuramente aplicado como substituto ósseo humano. A necessidade de desenvolvimento de diversos substitutos ósseos e com diversas marcas do mercado é algo crucial para que possamos ter uma melhora destes produtos.

Em suma, os resultados dos testes *in vitro* foram favoráveis para a diferenciação das células mesenquimais em células osteogênicas o que pode ser observado também por meio dos testes *in vivo*, no qual nos tempos testados (2, 8 e 12 semanas) observou-se a evolução de um tecido imaturo para um tecido maduro devido a presença dos biomateriais na região do defeito ósseo. O presente estudo sugere que o biovidro 45S5 desenvolvido e avaliado nessa pesquisa, seja um material promissor para a futura utilização em estudos clínicos.

7 CONCLUSÃO

Diante da metodologia realizada e dos testes elaborados nesta tese, podemos afirmar que a metodologia de produção deste biovidro 45S5 obteve sucesso na sua produção, na medida em que foi comprovado eficiência e qualidade do biomaterial ósseo sintético nos testes físico-químicos realizados.

Em relação aos testes *in vitro*, podemos afirmar que o biovidro 45S5 não apresentou citotoxicidade, permitiu a adesão celular, mostrou satisfatórios indicadores de neoformação óssea e diferenciação celular. Nos testes *in vivo*, mostrou ser um material promissor com apropriada formação óssea qualitativamente e quantitativamente, resultados acima da média ou semelhantes aos da hidroxiapatita.

Portanto, os resultados deste estudo mostraram-se promissores para o aprimoramento e estudo contínuo deste biomaterial com o intuito de comercialização para a melhoria dos problemas de regeneração óssea.

REFERÊNCIAS

Abdul Halim NA, Hussein MZ, Kandar MK. Nanomaterials-Upconverted Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering and a Platform for Drug Delivery. *Int J Nanomedicine*. 2021 Sep 21;16:6477-6496. doi: 10.2147/IJN.S298936. PMID: 34584412; PMCID: PMC8464594.

Almeida RDS. Avaliação da implantação de grânulos de β -tcp associado ou não à biovidro fosfatado para regeneração de defeito ósseo [dissertação de mestrado]. Salvador (Bahia); 2013.

Anderson AB, Dallmier AW, Chudzik SJ, Duran LW, Guire PE, Hergenrother RW, et al. Technologies for the surface modification of biomaterials. In: Yaszemski MJ, Trantolo DJ, Lewandrowski KU, Hasirci V, Altobelli DE. *Biomaterials in orthopedics*. Wise DL, editors. 2004. p. 123. ISBN:9780824756864.

Anesi A, Ferretti M, Salvatori R, Bellucci D, Cavani F, Di Bartolomeo M, Palumbo C, Cannillo V. In-vivo evaluations of bone regenerative potential of two novel bioactive glasses. *J Biomed Mater Res A*. 2023 Aug;111(8):1264-1278. doi: 10.1002/jbm.a.37526. Epub 2023 Mar 6. PMID: 36876550.

Anindyajati A, Boughton P, Ruys AJ. Mechanical and Cytocompatibility Evaluation of UHMWPE/PCL/Bioglass® Fibrous Composite for Acetabular Labrum Implant. *Materials (Basel)*. 2019 Mar 19;12(6):916. doi: 10.3390/ma12060916. PMID: 30893909; PMCID: PMC6470684.

Avelino SOM, Alvares Sobral-Silva L, Thim GP, de Almeida-Silva LA, Dos Santos Lupp J, Campos TMB, de Vasconcellos LMR. Development, characterization, and biological study of bioglass coatings 45S5 and BioK on zirconia implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2024 Feb;112(2):e35380. doi: 10.1002/jbm.b.35380. PMID: 38348496.

Baino F, Fiorilli S, Vitale-Brovarone C. Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: Review of recent advances. *Acta Biomater*. 2016 Sep 15;42:18-32. doi: 10.1016/j.actbio.2016.06.033. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27370907.

Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma*. 2019 Apr;33(4):203-213. doi: 10.1097/BOT.0000000000001420. PMID: 30633080.

Bellucci D, Anesi A, Salvatori R, Chiarini L, Cannillo V. A comparative in vivo evaluation of bioactive glasses and bioactive glass-based composites for bone tissue repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Oct 1;79:286-295. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.062. Epub 2017 May 11. PMID: 28629020.

Bhattacharjee P, Kundu B, Naskar D, Maiti TK, Bhattacharya D, Kundu SC. Nanofibrous nonmulberry silk/PVA scaffold for osteoinduction and osseointegration. *Biopolymers*. 2015 May;103(5):271-84. doi: 10.1002/bip.22594. PMID: 25418966.

Bingel L, Groh D, Karpukhina N, Brauer DS. Influence of dissolution medium pH on ion release and apatite formation of bioglass® 45S5. 2015. *Mat Lett* (143) 279–282, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.12.124>.

Boccaccini AR, Blaker JJ. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2005 May;2(3):303-17. doi: 10.1586/17434440.2.3.303. PMID: 16288594.

Boccaccini AR, Brauer DS. *Bioactive Glasses: Fundamentals, Technology and Applications*. London, UK: Royal Society of Chemistry, 2016; ISBN 9781782629764.

Boccaccini, D.; Cannio, M.; Bernardo, E.; Boccaccini, A.R. Glass and Glass-Ceramic Matrix Composites for Advanced Applications: Part I: Properties and Manufacturing Technologies. In *Encyclopedia of Materials: Technical Ceramics and Glasses*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2021.

Bohner M, Galea L, Doebelin N. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. *Journal of the European Ceramic Society*. 2012 (32), 2663–2671.

Bosetti M, Cannas M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(18):3873-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.059. PMID: 15626435.

Boulila S, Oudadesse H, Kallel R et al. The performance of a scaffold bioglass–chitosan in the treatment of bone defect. *Polym. Bull*. 2018. 75, 5567–5586. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2342-x>

Bretcanu O, Chatzistavrou X, Paraskevopoulos K, Conradt R, Thompson I, Boccaccini AR. 2009. Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass® powder. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 29, n. 16, p. 3299–3306.

Butler RJ, Marchesi S, Royer T, Davis IS. The effect of a subject-specific amount of lateral wedge on knee mechanics in patients with medial knee osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2007 Sep;25(9):1121-7. doi: 10.1002/jor.20423. PMID: 17469197.

Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014 Oct;25(10):2445-61. doi: 10.1007/s10856-014-5240-2. Epub 2014 May 28. PMID: 24865980; PMCID: PMC4169585.

Cannio M, Bellucci D, Roether JA, Boccaccini DN, Cannillo V. Bioactive Glass Applications: A Literature Review of Human Clinical Trials. *Materials (Basel)*. 2021 Sep 20;14(18):5440. doi: 10.3390/ma14185440. PMID: 34576662; PMCID: PMC8470635.

Cao D, Ding J. Recent advances in regenerative biomaterials. *Regen Biomater*. 2022 Dec 5;9:rbac098. doi: 10.1093/rb/rbac098. PMID: 36518879; PMCID: PMC9745784.

Carlo, EC. et al. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. *Revista Ceres*. Viçosa. v. 54, n. 316, p. 492-500, 2007.

Carson JS, Bostrom MP. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury*. 2007 Mar;38 Suppl 1:S33-7. doi: 10.1016/j.injury.2007.02.008. PMID: 17383484.

Cerruti M, Greenspan D, Powers K. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5. *Biomaterials*. 2005 May; 26(14):1665-1674. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.009

Chen Q, Roether JA, Boccaccini AR. Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials. 2008. *Topics in Tissue Eng*. 4 (6)1-27.

Chen QZ, Thompson ID, Boccaccini AR. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Apr;27(11):2414-25. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.025. Epub 2005 Dec 5. PMID: 16336997

Cichos S, Schätzlein E, Wiesmann-Imilowski N, Blaeser A, Henrich D, Frank J, Drees P, Gercek E, Ritz U. A new 3D-printed polylactic acid-bioglass composite for bone tissue engineering induces angiogenesis in vitro and in ovo. *Int J Bioprint*. 2023 May 11;9(5):751. doi: 10.18063/ijb.751. PMID: 37457934; PMCID: PMC10339458.

Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG. Bone tissue engineering. *Nat Med*. 1995 Dec;1(12):1322-4. doi: 10.1038/nm1295-1322. PMID: 7489417.

Daculsi G, Fellah B, Miramond T, Durand M. Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes. *IRBM*, Volume 34, Issues 4–5, 2013, Pages 346-348, ISSN 1959-0318 <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2013.07.001>.

Daculsi G, LeGeros RZ, Mitre D. Crystal dissolution of biological and ceramic apatites. *Calcif Tissue Int*. 1989 Aug;45(2):95-103. doi: 10.1007/BF02561408. PMID: 2505900.

Dechandt ICJ. Fadiga e viscosidade de vitrocerâmicas de dissilicato de lítio e propriedades mecânicas de vitrocerâmicas do sistema MgO-Al₂O₃-SiO₂/ZnO [tese de doutorado]. Ponta Grossa (Paraná): Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2021.

Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br*. 2007 May;89(5):574-9. doi: 10.1302/0301-620X.89B5.19039. PMID: 17540738.

De Mori A, Karali A, Daskalakis E, Hing R, Da Silva Bartolo PJ, Cooper G, Blunn G. Poly-ε-Caprolactone 3D-Printed Porous Scaffold in a Femoral Condyle Defect Model

Induces Early Osteo-Regeneration. *Polymers (Basel)*. 2023 Dec 24;16(1):66. doi: 10.3390/polym16010066. PMID: 38201731; PMCID: PMC10780383.

Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 9, 66 (2011). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>

D'Este, P e Iammarino, S. (2010), The spatial profile of university-business research partnerships. *Papers in Regional Science*, 89: 335-350. <https://doi.org/10.1111/j.1435-5957.2010.00292.x>

Dhowre HS, Rajput S, Russell NA, Zelzer M. Responsive cell-material interfaces. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10(5):849-71. doi: 10.2217/nnm.14.222. PMID: 25816884.

Effah Kaufmann EA, Ducheyne P, Shapiro IM. Evaluation of osteoblast response to porous bioactive glass (45S5) substrates by RT-PCR analysis. *Tissue Eng*. 2000 Feb;6(1):19-28. doi: 10.1089/107632700320856. PMID: 10941197.

Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel)*. 2017 Mar 24;10(4):334. doi: 10.3390/ma10040334. PMID: 28772697; PMCID: PMC5506916.

Erbe EM, Marx JG, Clineff TD, Bellincampi LD. Potential of an ultraporous beta-tricalcium phosphate synthetic cancellous bone void filler and bone marrow aspirate composite graft. *Eur Spine J*. 2001 Oct;10 Suppl 2(Suppl 2):S141-6. doi: 10.1007/s005860100287. PMID: 11716011; PMCID: PMC3611552.

Farmani AR, Nekoofar MH, Ebrahimi-Barough S, Azami M, Najafipour S, Moradpanah S, Ai J. Preparation and *In Vitro* Osteogenic Evaluation of Biomimetic Hybrid Nanocomposite Scaffolds Based on Gelatin/Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) and Lithium-Doped 45s5 Bioactive Glass Nanoparticles. *J Polym Environ*. 2023;31(3):870-885. doi: 10.1007/s10924-022-02615-x. Epub 2022 Nov 5. PMID: 36373108; PMCID: PMC9638231

Fernandes MS. Análise comparativa de novos compósitos a base de polímero associado a diferentes vidros bioativos: estudo in vitro e in vivo [dissertação de mestrado]. São José dos Campos (São Paulo); 2023.

Fiume E, Barberi J, Verné E, Baino F. Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies. *J Funct Biomater*. 2018 Mar 16;9(1):24. doi: 10.3390/jfb9010024. PMID: 29547544; PMCID: PMC5872110.

Fischer B. Reduction of platinum corrosion in molten glass, *Platin. Met. Rev.* 36 (1). 1992. 14-25.

Fu Q, Saiz E, Tomsia AP. Direct ink writing of highly porous and strong glass scaffolds for load-bearing bone defects repair and regeneration. *Acta Biomater*. 2011. 7, 3547–3554. doi:10.1016/j.actbio.2011.06.030

Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials*. 2002 Feb;23(3):751-5. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00180-6. PMID: 11771695.

Furusawa T, Mizunuma K, Yamashita S, Takahashi T. Investigation of early bone formation using resorbable bioactive glass in the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998 Sep-Oct;13(5):672-6. PMID: 9796151.

Galarraga-Vinueza ME, Mesquita-Guimarães J, Magini RS, Souza JC, Fredel MC, Boccaccini AR. Anti-biofilm properties of bioactive glasses embedding organic active compounds. *J Biomed Mater Res A*. 2017 Feb;105(2):672-679. doi: 10.1002/jbm.a.35934. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27750384.

Gao C, Deng Y, Feng P, Mao Z, Li P, Yang B, Deng J, Cao Y, Shuai C, Peng S. Current progress in bioactive ceramic scaffolds for bone repair and regeneration. *Int J Mol Sci*. 2014 Mar 18;15(3):4714-32. doi: 10.3390/ijms15034714. PMID: 24646912; PMCID: PMC3975421.

Gao J, Yu X, Wang X, He Y, Ding J. Biomaterial–Related Cell Microenvironment in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Engineering*. Volume 13. 2022. Pages 31-45. ISSN 2095-8099. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.11.025>.

Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 2010 Jul 6;3(7):3867-3910. doi: 10.3390/ma3073867. PMID: 28883315; PMCID: PMC5445790.

Ghelich P, Kazemzadeh-Narbat M, Najafabadi AH, Samandari M, Memic A, Tamayol A. (Bio)manufactured Solutions for Treatment of Bone Defects with Emphasis on US-FDA Regulatory Science Perspective. *Adv Nanobiomed Res*. 2022 Apr;2(4):2100073. doi: 10.1002/anbr.202100073. Epub 2022 Jan 5. PMID: 35935166; PMCID: PMC9355310.

Ghosh SK, Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Roy SK, Basu D. In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Jul;86(1):217-27. doi: 10.1002/jbm.b.31009. PMID: 18161811.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.029. PMID: 16188545.

Gillam DG, Tang JY, Mordan NJ, Newman HN. The effects of a novel Bioglass dentifrice on dentine sensitivity: a scanning electron microscopy investigation. *J Oral Rehabil*. 2002 Apr;29(4):305-13. doi: 10.1046/j.1365-2842.2002.00824.x. Erratum in: *J Oral Rehabil*. 2003 Apr;30(4):446. PMID: 11966962.

Godoi TPM. Efeito de biovidros na adesão, viabilidade e diferenciação osteogênica de células-tronco humanas. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre (Rio Grande do Sul): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2022.

Govoni M, Vivarelli L, Mazzotta A, Stagni C, Maso A, Dallari D. Commercial Bone Grafts Claimed as an Alternative to Autografts: Current Trends for Clinical Applications in Orthopaedics. *Materials (Basel)*. 2021 Jun 14;14(12):3290. doi: 10.3390/ma14123290. PMID: 34198691; PMCID: PMC8232314.

Granito RN, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Mochiuti D, Jorgetti V, Driusso P, Peitl O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011 Apr;97(1):139-47. doi: 10.1002/jbm.b.31795. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21290592.

Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN; American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological Implants. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98-103. doi: 10.2106/00004623-200100022-00007. PMID: 11712842.

Gruber R. Osteoimmunology: Inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. *J Clin Periodontol*. 2019 Jun;46 Suppl 21:52-69. doi: 10.1111/jcpe.13056. PMID: 30623453.

Guarino V, Causa F, Ambrosio L. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert Rev Med Devices*. 2007 May;4(3):405-18. doi: 10.1586/17434440.4.3.405. PMID: 17488233.

Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jan-Feb;1(1):25-32. doi: 10.1002/term.5. PMID: 18038389.

Habraken W, Habibovic P, Epple M, Bohner M. Alcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?. *Materials Today*. 2016;19(2):69-87.

Heide SK. Autonomy, identity and health: defining quality of life in older age. *J Med Ethics*. 2022 May;48(5):353-356. doi: 10.1136/medethics-2020-107185. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33741678.

Hench LL, Best SM. Chapter I.2.4 - Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics: Basic Principles. Editor(s): Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons. *Biomaterials Science (Third Edition)*. Academic Press. 2013. Pages 128-151, ISBN 9780123746269. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00016-4>.

Hench LL, Jones JR. Bioactive Glasses: Frontiers and Challenges. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015 Nov 30;3:194. doi: 10.3389/fbioe.2015.00194. PMID: 26649290; PMCID: PMC4663244.

Hench, L.L. Genetic design of bioactive glass. *J. Eur. Ceram. Soc*. 2009, 29, 1257–1265.

Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1014-7. doi: 10.1126/science.1067404. PMID: 11834817.

Hench LL, Splinter RJ, Allen WC and Greenlee TK. "Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 2, No. 1, 1971, pp. 117-141. doi:10.1002/jbm.820050611

Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Nov;17(11):967-78. doi: 10.1007/s10856-006-0432-z. Epub 2006 Nov 22. PMID: 17122907.

Hench LL, Wilson J. *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, 1993, 41-75.

Holmes R, Mooney V, Bucholz R, Tencer A. A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report. *Clin Orthop Relat Res*. 1984 Sep;(188):252-62. PMID: 6147218.

Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):2757-74. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.004. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21292319.

Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res*. 1970 Sep;4(3):433-56. doi: 10.1002/jbm.820040309. PMID: 5469185.

Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jul-Aug;1(4):245-60. doi: 10.1002/term.24. PMID: 18038415.

Ilan DI, Ladd AL. 2003. Bone graft substitutes. *Oper Tech Plast Reconstr Surg* 9:151–160.

Itokazu M, Matsunaga T, Ishii M, Kusakabe H, Wani Y. Use of arthroscopy and interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1996;115(1):45-8. doi: 10.1007/BF00453217. PMID: 8775710.

Jafari N, Habashi MS, Hashemi A, Shirazi R, Tanideh N, Tamadon A. Application of bioactive glasses in various dental fields. *Biomater Res*. 2022 Jul 6;26(1):31. doi: 10.1186/s40824-022-00274-6. PMID: 35794665; PMCID: PMC9258189

Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S77-81. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.014. Epub 2011 Jul 2. PMID: 21724186.

Jarcho M. Biomaterial aspects of calcium phosphates. Properties and applications. *Dent Clin North Am*. 1986 Jan;30(1):25-47. PMID: 3514291.

Jell G, Notingher I, Tsigkou O, Notingher P, Polak JM, Hench LL, Stevens MM. Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopic study. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jul;86(1):31-40. doi: 10.1002/jbm.a.31542. PMID: 17941016.

Jones JR, Brauer DS, Hupa L, Greenspan DC. Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare. *Int J Appl Glas Sci*. 2016;7(4):423–34. doi: 10.1111/ijag.12252

Jones JR, Ehrenfried LM, Hench LL. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(7):964-73. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.017. Epub 2005 Aug 18. PMID: 16102812.

Jones JR, Sepulveda P, Hench LL. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(6):720-6. doi: 10.1002/jbm.10053. PMID: 11745526.

Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater*. 2015 Sep;23 Suppl:S53-82. doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.019. PMID: 26235346.

Junior CMS. Síntese simplificada da matriz vítrea LBS (Li₂O - B₂O₃ - SiO₂) [dissertação de mestrado]. Juazeiro (Bahia): Universidade Federal do Vale do São Francisco; 2017

Kalampounias AG. IR and Raman spectroscopic studies of sol–gel derived alkaline-earth silicate glasses. *B. of Mater. Sci*. 2011. 34 (2) 299-303.

Kaur G, Kumar V, Pickrell GR, Mauro JC, Lin Y, Arya SK. Bioactive glasses in gene regulation and proliferation. In *Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses*. 2019. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. pp. 175–200.

Kaur G, Pandey OP, Singh K, Homa D, Scott B, Pickrell G. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Jan;102(1):254-74. doi: 10.1002/jbm.a.34690. Epub 2013 May 7. PMID: 23468256.

Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc*. 2016 Oct;11(10):1775-81. doi: 10.1038/nprot.2016.123. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27583639.

Khalil AS, Xie AW, Murphy WL. Context clues: the importance of stem cell-material interactions. *ACS Chem Biol*. 2014 Jan 17;9(1):45-56. doi: 10.1021/cb400801m. Epub 2014 Jan 3. PMID: 24369691; PMCID: PMC3970235.

Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005 Jan-Feb;13(1):77-86. PMID: 15712985.

Koons GL, Diba M, Miko AG.. Materials design for bone-tissue engineering. *Nat Rev. Mater.* 2020. 5, 584–603. doi: 10.1038/s41578-020-0204-2.

Krishnan V, Lakshmi T. Bioglass: A novel biocompatible innovation. *J Adv Pharm Technol Res.* 2013 Apr;4(2):78-83. doi: 10.4103/2231-4040.111523. PMID: 23833747; PMCID: PMC3696226.

Kukulka EC. Nanofibras de PCL associadas ao biovidro dopado: um novo biomaterial para engenharia tecidual. [dissertação de mestrado]. São José dos Campos (São Paulo); 2023.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993 May 14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529. PMID: 8493529

Li Y, Ling J, Jiang Q. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. *Front Immunol.* 2021 Jun 9;12:691013. doi: 10.3389/fimmu.2021.691013. PMID: 34177950; PMCID: PMC8221428.

Lopes JH. Modificação da superfície de vidros bioativos com íons cálcio e tratamento térmico [Dissertação de Mestrado]. Campinas (São Paulo): Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química – UNICAMP; 2010.

Maazouz Y, Rentsch I, Lu B, Santoni BLG, Doebelin N, Bohner M. In vitro measurement of the chemical changes occurring within β -tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Acta Biomater.* 2020 Jan 15;102:440-457. doi: 10.1016/j.actbio.2019.11.035. Epub 2019 Nov 20. Erratum in: *Acta Biomater.* 2021 Oct 15;134:818. PMID: 31756552.

Maçon AL, Lee S, Poologasundarampillai G, Kasuga T, Jones JR. Synthesis and dissolution behaviour of CaO/SrO-containing sol-gel-derived 58S glasses, *J. Mater. Sci.* 2017. 52. (15) 8858-8870.

Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J Cell Physiol.* 2018 Apr;233(4):2937-2948. doi: 10.1002/jcp.26042. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28590066.

Marković S, Veselinović L, Lukić MJ, Karanović L, Bračko I, Ignjatović N, Uskoković D. Synthetical bone-like and biological hydroxyapatites: a comparative study of crystal structure and morphology. *Biomed Mater.* 2011 Aug;6(4):045005. doi: 10.1088/1748-6041/6/4/045005. Epub 2011 Jun 10. PMID: 21659698.

Matos RC. Estudo da viabilidade de emprego de rota industrial de fusão de vidros para cerâmica tradicional na síntese de biovidro 45S5 [Trabalho de Conclusão de Curso]. Florianópolis (Santa Catarina): Universidade Federal de Santa Catarina; 2023.

Mendoza-Cerezo L, Rodríguez-Rego JM, Soriano-Carrera A, Marcos-Romero AC, Macías-García A. Fabrication and characterisation of bioglass and hydroxyapatite-filled scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2023 Aug;144:105937. doi: 10.1016/j.jmbbm.2023.105937. Epub 2023 Jun 6. PMID: 37307642.

Mihaela D, Amalia D, Bogdan G. (2015). The Partnership between Academic and Business Environment. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*. 180. 298-304. 10.1016/j.sbspro.2015.02.120.

Minami M, Takechi M, Ohta K, Ohta A, Ninomiya Y, Takamoto M, Fukui A, Tada M, Kamata N. Bone formation and osseointegration with titanium implant using granular- and block-type porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA). *Dent Mater J*. 2013;32(5):753-60. doi: 10.4012/dmj.2012-169. PMID: 24088830.

Miron RJ, Sculean A, Shuang Y, Bosshardt DD, Gruber R, Buser D, Chandad F, Zhang Y. Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Jun;27(6):668-75. doi: 10.1111/clr.12647. Epub 2015 Jul 30. PMID: 26227281.

Mohamed, K. Bioceramics for medical applications: a computational view. *Medical Bioceamic Materials*. 2017.

Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. 2001 Jun;71(6):354-61. PMID: 11409021.

Moreira-Gonzalez A, Jackson IT, Miyawaki T, DiNick V, Yavuzer R. Augmentation of the craniomaxillofacial region using porous hydroxyapatite granules. *Plast Reconstr Surg*. 2003 May;111(6):1808-17. doi: 10.1097/01.PRS.0000055432.20074.93. PMID: 12711940.

Moritz N, Vedel E, Ylänen H, Jokinen M, Hupa M, Yli-Urpo A. Characterisation of bioactive glass coatings on titanium substrates produced using a CO₂ laser. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Jul;15(7):787-94. doi: 10.1023/b:jmsm.0000032819.64994.42. PMID: 15387414.

Nandi SK, Kundu B, Ghosh SK, De DK, Basu D. Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. *J Vet Sci*. 2008 Jun;9(2):183-91. doi: 10.4142/jvs.2008.9.2.183. PMID: 18487940; PMCID: PMC2839096.

Nariyal RK, Kothari P, Bisht B. FTIR measurements of SiO₂ glass prepared by sol-gel technique, *Chem. Sci. Trans*. 2014. 3 (3) 1064-1066.

Nashi N, Kagda FH. Current concepts of bone grafting in trauma surgery. *J Clin Orthop Trauma*. 2023 Aug 5;43:102231. doi: 10.1016/j.jcot.2023.102231. PMID: 37636005; PMCID: PMC10448478.

Nie H, Wang CH. Fabrication and characterization of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA. *J Control Release*. 2007 Jul 16;120(1-2):111-21. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.03.018. Epub 2007 Apr 1. PMID: 17512077.

Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Matsuura M, Kin S, Yamamoto T, Mizokawa S. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass,

A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 2000 Jul;51(1):37-46. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(200007)51:1<37::aid-jbm6>3.0.co;2-t. PMID: 10813743.

Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop Relat Res.* 1997 Jan;(334):316-25. PMID: 9005929.

Park SS, Farwa U, Kim HD, Kim YS, Lee BT. Bone formation by Irisin-Poly vinyl alcohol modified bioglass ceramic beads in the rabbit model. *J Mater Sci Mater Med.* 2024 Mar 25;35(1):23. doi: 10.1007/s10856-024-06788-w. PMID: 38526676; PMCID: PMC10963563.

Peitl O, Zanotto ED, Serbena FC, Hench LL. Compositional and microstructural design of highly bioactive P2O5-Na2O-CaO-SiO2 glass-ceramics. *Acta Biomater.* 2012 Jan;8(1):321-32. doi: 10.1016/j.actbio.2011.10.014. Epub 2011 Oct 17. PMID: 22032913.

Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, Retnasingh S, Pejakić M, Schnettler R, Gosau M, Smeets R, Jung O, Barbeck M. An introduction to bone tissue engineering. *Int J Artif Organs.* 2020 Feb;43(2):69-86. doi: 10.1177/0391398819876286. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31544576.

Poddar D, Singh A, Rao P, Mohanty S, Jain P. Modified-Hydroxyapatite-Chitosan Hybrid Composite Interfacial Coating on 3D Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Macromol Biosci.* 2023 Dec;23(12):e2300243. doi: 10.1002/mabi.202300243. Epub 2023 Aug 24. PMID: 37586699.

Profeta AC, Prucher GM. Bioactive-glass in periodontal surgery and implant dentistry. *Dent Mater J.* 2015;34(5):559-71. doi: 10.4012/dmj.2014-233. PMID: 26438980.

Ran L, Liu L, Gao J, Pan Y, Ramalingam M, Du X, Liu Y, Cheng L, Shi Z. Strontium-doped hydroxyapatite and its role in osteogenesis and angiogenesis. *Int J Dev Biol.* 2023;67(4):137-146. doi: 10.1387/ijdb.2300911c. PMID: 37975329.

Reible B, Schmidmaier G, Prokscha M, Moghaddam A, Westhauser F. Continuous stimulation with differentiation factors is necessary to enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in-vitro. *Growth Factors.* 2017; 35(04–06):179–88. <https://doi.org/10.1080/08977194.2017.1401618> PMID: 29228886

Ren J, Blackwood KA, Doustgani A, Poh PP, Steck R, Stevens MM et al. Meltelectrospun polycaprolactone strontium-substituted bioactive glass scaffolds for bone regeneration [published correction appears in *J Biomed Mater Res A.* 2016 Aug;104(8):2109]. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(9):3140-3153. doi:10.1002/jbm.a.34985

Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006

Jun;27(18):3413-31. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039. Epub 2006 Feb 28. PMID: 16504284.

Robbins S, Laurysen C, Songer MN. Use of Nanocrystalline Hydroxyapatite With Autologous BMA and Local Bone in the Lumbar Spine: A Retrospective CT Analysis of Posterolateral Fusion Results. *Clin Spine Surg.* 2017 Apr;30(3):E192-E197. doi: 10.1097/BSD.0000000000000091. PMID: 28323699; PMCID: PMC5367494.

Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis.* 2012 Oct-Dec;8(4):114-24. doi: 10.4161/org.23306. Epub 2012 Oct 1. PMID: 23247591; PMCID: PMC3562252.

Rodrigues C, Naasani LIS, Zanatelli C, et al. Bioglass 45S5: Structural characterization of short range order and analysis of biocompatibility with adiposederived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Oct; 103:109781. doi:10.1016/j.msec.2019.109781

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz, AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research.* 2003; 6(3): 317-320

Rust KR, Singleton GT, Wilson J, Antonelli PJ. Bioglass middle ear prosthesis: long-term results. *Am J Otol.* 1996 May;17(3):371-4. PMID: 8817012.

Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent.* 2017 Dec;3(1):23. doi: 10.1186/s40729-017-0084-4. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28573552; PMCID: PMC5453915.

Sarkar SK, Lee BT. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *Korean J Intern Med.* 2015 May;30(3):279-93. doi: 10.3904/kjim.2015.30.3.279. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25995658; PMCID: PMC4438282

Scheinpflug J, Pfeiffenberger M, Damerau A, Schwarz F, Textor M, Lang A, Schulze F. Journey into Bone Models: A Review. *Genes (Basel).* 2018 May 10;9(5):247. doi: 10.3390/genes9050247. PMID: 29748516; PMCID: PMC5977187.

Schepers E, de Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil.* 1991 Sep;18(5):439-52. doi: 10.1111/j.1365-2842.1991.tb01689.x. PMID: 1666125.

Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *J Biomed Mater Res.* 2002 Feb;59(2):340-8. doi: 10.1002/jbm.1250. PMID: 11745571.

Sergi R, Bellucci D, Cannillo V. A Comprehensive Review of Bioactive Glass Coatings: State of the Art, Challenges and Future Perspectives. *Coatings.* 2020a; 10(8):757. <https://doi.org/10.3390/coatings10080757>

Sergi R, Bellucci D, Cannillo V. A Review of Bioactive Glass/Natural Polymer Composites: State of the Art. *Materials (Basel)*. 2020b Dec 6;13(23):5560. doi: 10.3390/ma13235560. PMID: 33291305; PMCID: PMC7730917.

Shahin-Shamsabadi A, Hashemi A, Tahriri M, Bastami F, Salehi M, Mashhadi Abbas F. Mechanical, material, and biological study of a PCL/bioactive glass bone scaffold: Importance of viscoelasticity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018 Sep 1;90:280-288. doi: 10.1016/j.msec.2018.04.080. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29853093.

Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel)*. 2015 Aug 31;8(9):5744-5794. doi: 10.3390/ma8095273. PMID: 28793533; PMCID: PMC5512653.

Shelby, JE. *Introduction to Glass Science and Technology*. 2ª Edição. Royal Society of Chemistry, 2005.

Slosarczyk A, Paszkiewicz Z, Paluszkiwicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J Mol Struct*. 2005; 744–747:657–61

Söhling N, Al Zoghool S, Schätzlein E, Neijhoft J, Oliveira KMC, Leppik L, Ritz U, Dörsam E, Frank J, Marzi I, Blaeser A, Henrich D. In vitro Evaluation of a 20% Bioglass-Containing 3D printable PLA Composite for Bone Tissue Engineering. *Int J Bioprint*. 2022 Aug 17;8(4):602. doi: 10.18063/ijb.v8i4.602. PMID: 36404794; PMCID: PMC9668481.

Souto JCRA. Influência da funcionalização do biovidro, preparado pela rota sonoquímica, com fármaco teriparatida 10% na resposta celular in vitro e in vivo. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos (SP):Universidade Estadual Paulista (UNESP); 2021.

Standring S, Borley NR e Gray H. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. 40th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier. 2008.

Stanley HR, Hall MB, Clark AE, King CJ 3rd, Hench LL, Berte JJ. Using 45S5 bioglass cones as endosseous ridge maintenance implants to prevent alveolar ridge resorption: a 5-year evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Jan-Feb;12(1):95-105. PMID: 9048461.

Suryanarayana C, Norton MG. *X-Ray Diffraction: A Practical Approach*. 1ª Edição. Springer Science & Business, 1998.

Tilocca, A. Structural models of bioactive glasses from molecular dynamics simulations. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2009, 465, 1003-1021.

Touri R, Moztafzadeh F, Sadeghian Z, Bizari D, Tahriri M, Mozafari M. The use of carbon nanotubes to reinforce 45S5 bioglass-based scaffolds for tissue engineering

applications. *Biomed Res Int.* 2013;2013:465086. doi: 10.1155/2013/465086. Epub 2013 Nov 4. PMID: 24294609; PMCID: PMC3835357

Trivedi S, Srivastava K, Gupta A, Saluja TS, Kumar S, Mehrotra D, Singh SK. A quantitative method to determine osteogenic differentiation aptness of scaffold. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020 Apr-Jun;10(2):158-160. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.04.006. Epub 2020 Apr 16. PMID: 32489814; PMCID: PMC7254472.

Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials.* 2009 Jul; 30(21):3542-50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.019

Tsigkou O, Labbaf S, Stevens MM, Porter AE, Jones JR. Monodispersed bioactive glass submicron particles and their effect on bone marrow and adipose tissue-derived stem cells. *Adv Healthc Mater.* 2014 Jan;3(1):115-25. doi: 10.1002/adhm.201300126. Epub 2013 Jul 5. PMID: 23832877.

Turunen T, Peltola J, Yli-Urpo A, Happonen RP. Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Apr;15(2):135-41. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.00989.x. PMID: 15008925.

Vishwakarma A, Bhise NS, Evangelista MB, Rouwkema J, Dokmeci MR, Ghaemmaghami AM, Vrana NE, Khademhosseini A. Engineering Immunomodulatory Biomaterials To Tune the Inflammatory Response. *Trends Biotechnol.* 2016 Jun;34(6):470-482. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.03.009. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27138899.

Vogel M, Voigt C, Gross UM, Müller-Mai CM. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials.* 2001 Feb;22(4):357-62. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00191-5. PMID: 11205439.

Wheeler DL, Montfort MJ, McLoughlin SW. Differential healing response of bone adjacent to porous implants coated with hydroxyapatite and 45S5 bioactive glass. *J Biomed Mater Res.* 2001 Jun 15;55(4):603-12. doi: 10.1002/1097-4636(20010615)55:4<603::aid-jbm1054>3.0.co;2-n. PMID: 11288089

Wilson J, Low SB. Bioactive ceramics for periodontal treatment: comparative studies in the Patus monkey. *J Appl Biomater.* 1992 Summer;3(2):123-9. doi: 10.1002/jab.770030208. PMID: 10147709.

Wilson J, Pigott GH, Schoen FJ, Hench LL. Toxicology and biocompatibility of bioglasses. *J Biomed Mater Res.* 1981 Nov;15(6):805-17. doi: 10.1002/jbm.820150605. PMID: 7309763.

Wilson J, Clark AE, Hall M, Hench LL. Tissue response to Bioglass endosseous ridge maintenance implants. *J Oral Implantol.* 1993;19(4):295-302. PMID: 8007022.

Wolfe SW, Pike L, Slade JF 3rd, Katz LD. Augmentation of distal radius fracture fixation with coralline hydroxyapatite bone graft substitute. *J Hand Surg Am.* 1999 Jul;24(4):816-27. doi: 10.1053/jhsu.1999.0816. PMID: 10447175.

Wu C, Zhang Y, Ke X, Xie Y, Zhu H, Crawford R, Xiao Y. Bioactive mesopore-glass microspheres with controllable protein-delivery properties by biomimetic surface modification. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Nov;95(2):476-85. doi: 10.1002/jbm.a.32873. PMID: 20648544.

Wu Z, Bai J, Ge G, Wang T, Feng S, Ma Q, Liang X, Li W, Zhang W, Xu Y, Guo K, Cui W, Zha G, Geng D. Regulating Macrophage Polarization in High Glucose Microenvironment Using Lithium-Modified Bioglass-Hydrogel for Diabetic Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2022 Jul;11(13):e2200298. doi: 10.1002/adhm.202200298. Epub 2022 Apr 14. PMID: 35388979.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res.* 2001 May;55(2):151-7. doi: 10.1002/1097-4636(200105)55:2<151::aid-jbm1001>3.0.co;2-d. PMID: 11255166.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Sep 24;276(2):461-5. doi: 10.1006/bbrc.2000.3503. PMID: 11027497.

Xue N, Ding X, Huang R, Jiang R, Huang H, Pan X, Min W, Chen J, Duan JA, Liu P, Wang Y. Bone Tissue Engineering in the Treatment of Bone Defects. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022 Jul 17;15(7):879. doi: 10.3390/ph15070879. PMID: 35890177; PMCID: PMC9324138.

Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H. Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. *J Periodontol.* 2008 May;79(5):811-8. doi: 10.1902/jop.2008.070518. PMID: 18454659

Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5). *J Biomed Mater Res.* 2001 May 1;58(3):270-6. doi: 10.1002/1097-4636(2001)58:33.0.co;2-2. PMID: 11319740.

Yu X, Tang X, Gohil SV, Laurencin CT. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv Healthc Mater.* 2015 Jun 24;4(9):1268-85. doi: 10.1002/adhm.201400760. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25846250; PMCID: PMC4507442.

Zelga, K. "The importance of competition and enterprise competitiveness." *World Scientific News* 72 (2017): 301-306.

Zhang D, Leppäranta O, Munukka E, Ylänen H, Viljanen MK, Eerola E, Hupa M, Hupa L. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *J Biomed Mater Res A*. 2010 May;93(2):475-83. doi: 10.1002/jbm.a.32564. PMID: 19582832.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 018/2020, intitulado:- **ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE ENXERTO ÓSSEO DE BIOVIDRO 58S, OBTIDOS DE DIFERENTES ROTAS DE SÍNTESE**, sob a responsabilidade de **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, tendo como colaboradores:- SARAH DE OLIVEIRA MARCO AVELINO, MARIANA DE SÁ ALVES e BEATRIZ SAMARA DE SOUZA LIMA; e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 22/03/2021 e alterado nas Reunião dos dias 18/10/2021 e 29/07/2022

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/04/2021 a 31/12/2022
Espécie/linhagem/raça	Coelhos
Nº de Animais	36(trinta e seis)
Peso/Idade	90 dias/4 Kgs
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Compromisso/Relatório(s)	Final:- Envio para a CEUA:- 31/01/2023
Alterações	Reunião do dia 18/10/2021 – Exclusão do nome do Colaborador Kennedy Wallace Santos e inclusão do nome de Juliana dos Santos Lupp e prorrogação da vigência de 31/12/2021, para 31/12/2022

CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais



	<p>Reunião de 29/07/2022 – Exclusão do nome da colaboradora Juliana dos Santos Lupp e inclusão das colaboradoras:- Mariana de Sá Alves e Beatriz Samara de Souza Lima.</p>
--	---

São José dos Campos, 29 de julho de 2022

Profa. Dra LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS
Vice-Coordenadora em Exercício