



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

**HANNA FLAVIA SANTANA DOS SANTOS**

**INTERAÇÕES BIOLÓGICAS DE CIMENTOS ÓSSEOS A BASE DE  
SILICATO DE CÁLCIO COM DIFERENTES SOLUÇÕES  
ATIVADORAS: estudo *in vitro* e *in vivo***

2020

**HANNA FLAVIA SANTANA DOS SANTOS**

**INTERAÇÕES BIOLÓGICAS DE CIMENTOS ÓSSEOS A BASE DE SILICATO DE CÁLCIO COM DIFERENTES SOLUÇÕES ATIVADORAS: estudo *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Estudos microbiológicos e imunológicos relacionados a biomateriais.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. 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).

Santos, Hanna Flavia Santana Dos

Interações biológicas de cimentos ósseos a base de silicato de cálcio com diferentes soluções ativadoras : estudo in vitro e in vivo / Hanna Flavia Santana Dos Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.  
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

1. Biocerâmica. 2. Reparo ósseo. 3. Diferenciação osteoblástica. 4. Biofilme. 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.

## **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. Renata Falchete do Prado**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**André Diniz Rosa da Silva**

Academia da Força Aérea (AFA)

Subseção de Apoio ao Ensino da Secretaria da Divisão

Pirassununga

São José dos Campos, 19 de fevereiro de 2020.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Adriana Moreira de Santana** e **Flávio Malaquias dos Santos**, por todo aprendizado que me transferiram ao longo da minha vida, pelo suporte, dedicação e carinho. Todas as minhas conquistas dedico a vocês, pois sem os valores essenciais, como respeito e responsabilidade, que me ensinaram eu não conquistaria nada.

Ao **João Rafael Herreira** que foi em todos os momentos meu suporte para conquistar meus objetivos, com muita paciência e amor, me incentivou. Sua companhia contribuiu para que minha jornada fosse mais calma e branda. Sou grata pela sua compreensão com as minhas horas de ausência.

Dedico este trabalho de pesquisa a minha amiga **Daphne de Camargo Reis Mello** que foi uma fonte inesgotável de apoio técnico durante todo o processo. Obrigado por tudo.

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus, meu pai Celestial, que esteve do meu lado em todos os momentos me protegendo e guiando meus passos, seus planos são incríveis e eu em momento nenhum poderia deixar de exaltar sua importância em minha vida.*

*Aos meus pais por todo o suporte que me deram, são extremamente importantes em minha vida.*

*A minha grande família, minhas tias e tios, que estão no meu coração e agradeço por existirem.*

*Ao meu companheiro e amigo que secou minhas lágrimas, que me ouviu e além de tudo me ajudava a abstrair problemas que pareciam tão grandes e que na verdade eram pequenos demais para importância que eu os dava.*

*Agradeço imensamente ao apoio da minha companheira de laboratório que me ensinou tudo que eu precisei para desenvolver esse trabalho com muito zelo e paciência, Daphne, você tecnicamente e psicologicamente foi uma figura essencial na minha jornada. Pude aprender muito mais que protocolos com você, minha eterna gratidão.*

*À Renata Ribas agradeço à dedicação, atenção e paciência por me ajudar ao longo do projeto respondendo prontamente às minhas dúvidas de maneira clara e coesa, com muita paciência e afeto. Agradeço ao laço que criamos, com certeza tudo seria muito mais difícil sem você.*

*À Keila que esteve presente em minha vida desde muito antes do processo seletivo e que eu tive imensa gratidão em ter me aproximado, tornou-se alguém que eu quero ter ao meu lado como amiga para todas as outras jornadas.*

*A Simone Biazzi de Lapena que foi um anjo que a UNESP me deu de presente, minha mãe de coração, alegrou muito meu ano de 2018, foi minha companheira nos créditos e nos trabalhos desenvolvidos em nosso primeiro ano na instituição. Obrigada pelos conselhos, caronas, críticas e por ter me ajudado a evoluir como profissional e como pessoa. Você foi um anjo de luz!*

*Aos meus amigos da salinha que tenho profunda gratidão, ajudaram a minha jornada a ter muito amor e sorrisos. Keila, Jaqueline, Anderson, Nayara, Bruna,*

*Renata, Cheyenne e Noala obrigada por fazerem parte da minha jornada, com certeza vocês foram essenciais no meu dia-a-dia.*

*Aos meus colegas que tive imenso prazer de conhecer. Mariana, Marianne, Suellen, Lígia, Juliani, Carla, Karen, Felipe, Maíra, Evelin, Rodnei, Pâmela, Thais C, Thais, Liliane, Jessica, Lívia, Patrícia, Taciano e Raquel.*

*Agradeço a equipe técnica, em especial ao Toninho que meu deu grande suporte no Biotério. À Carla, Walter, Salete, Ana Lourdes, André, Sérgio e Domingos.*

*À Carol, veterinária responsável pelo biotério.*

*Aos animais que foram utilizados para que a pesquisa fosse realizada, pois cada um representa uma vida.*

*À professora Renata Falchete do Prado que contribui na minha vida acadêmica desde 2017, com muita inteligência e dedicação.*

*À Profa. Associada Luana, pela dedicação, pela amizade e pela paciência sempre. Por ter sido uma orientadora flexível, atenciosa, compreensiva, comunicativa, resolutiva, prestativa e por sua extrema competência. Meu carinho, por você, principalmente por ter me acolhido de braços abertos confiando em mim. Sem você, eu não estaria aqui e nada disso teria sentido. Gratidão define.*

*Ao professor Ivan de bioestatística que foi peça fundamental para o desenvolvimento dos resultados, me explicou com detalhes e me ajudou a criar o raciocínio necessário para desenvolvimento da dissertação. Obrigada pela atenção e pelas horas que se dispôs a me ajudar.*

*Aos colegas da UNIP que me deram apoio durante o ano de 2019, em especial a Viviane Bório, Vivian Hyodo, Bruno Costa, Flávia Vilaça, Wendel Simões, Aline Neves, Adriano Moraes, Fernanda Tomé, Fernanda Siqueira e Ana Luiza.*

*A toda equipe da portaria, em especial ao Gilson e ao Renato, à equipe de serviços gerais pela simpatia e educação.*

*E a toda equipe do LAPP, em especial a Professora Marianne Spalding, pelo desenvolvimento profissional adquirido em todos eventos coordenados pelo laboratório e toda experiência adquirida.*

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Cláudio Antonio Talge Carvalho.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Associada Luciane Dias Oliveira.*

*Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.*

*À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas.*

*Ao Laboratório de Biotecnologia do ITA pelo desenvolvimento dos materiais e suporte, especialmente a Renata Ribas, Gilmar, Thiago Moreira e à Thais.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Concessão de Bolsa CAPES/FAPESP – 88882.441646/2019-01 com vigência de 01/03/2018 a 29/02/2019.*

*Sobretudo, acredito que eu tenho muito a agradecer por tudo que vivi e aprendi!*

*Minha eterna gratidão ao ICT, à Unesp, aos colegas que fiz e aos amigos que ficarão, sobretudo, às experiências vividas que agregaram e me fizeram evoluir!*

*“Water does not resist. Water flows. When you plunge your hand into it, all you feel is a caress. Water is not a solid wall, it will not stop you. But water always goes where it wants to go, and nothing in the end can stand against it. Water is patient. Dripping water wears away a stone. Remember that, my child. Remember you are half water. If you can't go through an obstacle, go around it. Water does.” — Margaret Atwood, The Penelopiad*

## SUMÁRIO

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO .....                                                             | 10 |
| ABSTRACT .....                                                           | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                       | 12 |
| 2 PROPOSIÇÃO .....                                                       | 18 |
| 2.1 Objetivo geral.....                                                  | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                           | 18 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                | 20 |
| 3.1 Aspectos éticos .....                                                | 20 |
| 3.2 Confeção e caracterização dos cimentos .....                         | 20 |
| 3.2.1 Análise de superfície com microscopia eletrônica de varredura..... | 24 |
| 3.3 Ensaios biológicos <i>in vitro</i> .....                             | 25 |
| 3.3.1 Cultura celular .....                                              | 25 |
| 3.3.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade) .....         | 28 |
| 3.3.3 Conteúdo de proteína total .....                                   | 29 |
| 3.3.4 Atividade de fosfatase alcalina .....                              | 30 |
| 3.3.5 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização .....        | 30 |
| 3.3.6 Análise da morfologia celular por fluorescência direta .....       | 32 |
| 3.3.7 Avaliação da formação de biofilme microbianos .....                | 32 |
| 3.4 Ensaios <i>in vivo</i> .....                                         | 34 |
| 3.4.1 Procedimento cirúrgico .....                                       | 34 |
| 3.4.2 Análise histológica.....                                           | 37 |
| 3.4.3 Análise histomorfométrica .....                                    | 38 |
| 3.4.4 Teste de flexão de três pontos .....                               | 38 |
| 3.5 Análise estatística .....                                            | 40 |
| 4 RESULTADOS.....                                                        | 42 |
| 4.1 Topografia superficial dos cimentos .....                            | 42 |
| 4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade) .....           | 44 |
| 4.3 Conteúdo de proteína total .....                                     | 46 |
| 4.4 Atividade de fosfatase alcalina .....                                | 47 |
| 4.5 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização .....          | 49 |

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| 4.6 Morfologia celular por fluorescência direta .....   | 53 |
| 4.7 Formação de biofilme.....                           | 54 |
| 4.7.1 Biofilme monotípico de <i>C. albicans</i> .....   | 54 |
| 4.7.2 Biofilme monotípico de <i>S. aureus</i> .....     | 55 |
| 4.7.3 Biofilme monotípico de <i>P. aeruginosa</i> ..... | 56 |
| 4.7.4. Comparação de biofilmes monotípicos.....         | 57 |
| 4.8 Análises <i>in vivo</i> .....                       | 60 |
| 4.8.1 Análise histológica.....                          | 60 |
| 4.8.2 Análise histomorfométrica .....                   | 65 |
| 4.8.3 Análise da biomecânica .....                      | 65 |
| 5 DISCUSSÃO .....                                       | 68 |
| 6 CONCLUSÃO .....                                       | 77 |
| REFERÊNCIAS.....                                        | 78 |
| ANEXO.....                                              | 87 |

Santos HFS. Interações biológicas de cimentos ósseos a base de silicato de cálcio com diferentes soluções ativadoras: estudo *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

## RESUMO

Os cimentos de silicatos de cálcio ( $\text{CaSiO}_3$ ) podem ser utilizados em tratamentos de reparo ósseo, tanto para aplicações médicas quanto odontológicas. A fim de atender às necessidades da engenharia de tecidos e aprimorar o leque de opções foram produzidos três cimentos de silicatos de cálcio utilizando  $\alpha$ -wollastonita como precursora, juntamente com soluções ativadoras com potencial hidrogeniônico neutro, com três diferentes cátions,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ . A topografia superficial dos cimentos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (MEV-FEG). Estudos *in vitro*, *in vivo*, relacionados a capacidade de interação com microrganismos e testes biomecânicos foram realizados para avaliar a influência de diferentes soluções ativadoras de fosfato e carbonato nos cimentos produzidos. Nos testes *in vitro* foram utilizadas células mesenquimais provenientes de fêmures de ratos. Após períodos pré-determinados foram realizados os testes de viabilidade celular, conteúdo de proteína total (PT), atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formação de nódulos de mineralização. Para análise da interação microbiana a formação dos biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foi mensurada. Posteriormente, os cimentos obtidos, a base de silicato de cálcio, foram submetidos ao estudo *in vivo* utilizando 20 ratos *Wistars* que passaram por procedimento cirúrgico para confecção de um defeito crítico de 3,0 mm nas tíbias direita e esquerda. Após a eutanásia, as peças foram submetidas a análise histológica, histomorfométrica e ao teste biomecânico de flexão de três pontos. Os dados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste Anova um e dois fatores, com nível de significância de 5%. Foi possível analisar que nenhum cimento se mostrou citotóxico, e todos permitiram a adesão e proliferação celular. As células em contato com os cimentos e meios de cultura se mostraram metabolicamente ativas pela expressão de proteínas total, porém, o grupo G- $\text{NH}_4$  obteve destaque devido a expressão superior de fosfatase alcalina, demonstrando maior indução de diferenciação celular. Na análise histológica observou-se proliferação óssea em todos os grupos, sem diferença estatística entre os grupos. Na mensuração de força máxima e força de ruptura observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo G- $\text{NH}_4$  e os demais grupos. Sendo assim, o silicato de cálcio produzido com solução ativadora de fosfato de amônio bifásico, na fase  $\alpha$ -wollastonita, se mostrou promissor para engenharia de materiais para regeneração tecidual óssea.

Palavras-chave: Biocerâmica. Reparo ósseo. Diferenciação osteoblástica. Biofilme.

Santos HFS. Biological interactions of calcium silicate-based bone cements with different activate solutions: in vitro and in vivo study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

## ABSTRACT

Calcium silicate cements ( $\text{CaSiO}_3$ ) can be used in bone repair treatments, both for medical and dental applications. In order to meet the needs of tissue engineering and improve the range of options, three calcium silicate cements were produced using  $\alpha$ -wollastonite as a precursor, with an activating solution of neutral potential hydrogen ionic, made of three different cations  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{NH}_4^+$ . A superficial topography of the cements was analyzed by Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy (SEM-FEG). In vitro, in vivo studies related to the ability to interact with microorganisms and biomechanical tests were carried out to evaluate the influence of different phosphate and carbonate activating solutions in the cements produced. In in vitro tests, mesenchymal cells from rat femurs were used. After predetermined periods, cell viability tests, total protein content (PT), alkaline phosphatase activity (ALP) and formation of mineralization nodules were performed. For the analysis of microbial interaction, the formation of monotypic biofilms from *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* was measured. Subsequently, the obtained cements, based on calcium silicate, were subjected to an in vivo study using 20 Wistars rats that underwent a surgical procedure to make a 3.0 mm critical defect in the right and left tibiae. After euthanasia, the pieces were submitted to histological, histomorphometric analysis and biomechanical flexion test of three points. The data obtained were statistically analyzed by the Anova test, one and two factors, with a significance level of 5%. It was possible to analyze that no cement was shown to be cytotoxic, and all allowed cell adhesion and proliferation. The cells in contact with the cements and culture media were shown to be metabolically active by the expression of total proteins, however, the  $\text{G-NH}_4$  group was highlighted due to the superior expression of alkaline phosphatase, demonstrating greater induction of cell differentiation. In the histological analysis, bone proliferation was observed in all groups, with no statistical difference between groups. In measuring the maximum strength and tensile strength it showed a statistically significant difference between the  $\text{G-NH}_4$  group and the other groups. Thus, the calcium silicate produced with a biphasic ammonium phosphate activating solution, in the  $\alpha$ -wollastonite phase, proved to be promising for engineering materials for bone tissue regeneration.

Keywords: Bioceramics. Bone repair. Osteoblastic differentiation. Biofilm.

## 1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida global revelou ter passado por mudanças significativas desde o século XX, com o advento tecnológico houve contribuições positivas para melhora das condições de vida e consequentemente da saúde populacional (Camargos et al., 2019; Lima et al., 2016).

Em decorrência do envelhecimento da população, e consequente aumento da expectativa de vida, doenças relacionadas a estrutura óssea tornaram-se um problema de saúde pública, gerando assim, um aumento substancial nas despesas econômicas ligada as fraturas ósseas. Os problemas ósseos geram grandes transtornos ao paciente, além de gastos com o tratamento e diminuição de sua qualidade de vida e bem-estar (Brotto, Bonewald, 2015; Dai, Koh, 2015).

Pesquisas recentes demonstram que fraturas ósseas relacionadas à idade aumentarão nos Estados Unidos e na Europa, estimando-se que cerca de 1 milhão de pessoas sofrerão fraturas anualmente. Consequentemente, os avanços recentes da ciência sobre o papel estrutural, biofísico e bioquímico dos biomateriais, e do tecido ósseo, contribuem para a ascensão de pesquisas sobre cimentos visando a regeneração óssea (Yu et al., 2015). Além de evidenciarem a necessidade eminente do desenvolvimento de novos tratamentos, eficazes e compatíveis para lesões ósseas (Hernlund et al., 2013; Lopes et al., 2018; Quarto, Giannoni, 2016).

A demanda por novos materiais e aprimoramento dos existentes a serem utilizados nas áreas médico-odontológicas é grande, afinal têm-se buscado melhora na qualidade de vida (Guastaldi, Aparecida, 2010). Com isso, a busca por um biomaterial ideal tem sido alvo de pesquisas há várias décadas (Brow, Chow, 1986; de Aza et al., 1996; Kawachi et al., 2000; Pattanayak, 2009; Wu, Chang, 2013; Samavedi et al., 2013; Yu et al., 2015; Aly et al., 2016; Villalpando-Reyna et al., 2019; Wang et al., 2019; Weichhold et al., 2019)

Brown e Chow (1986) desenvolveram o primeiro cimento de fosfato de cálcio. A partir da sua formulação, observaram que a precipitação de finos cristais de hidroxiapatita ocorre devido à dissolução dos fosfatos de cálcio, cujo arranjo proporciona a resistência mecânica do material com diversas utilidades na área

odontológica, especialmente para remineralização óssea. Esses fosfatos de cálcio elaborados por Brown e Chow (1986) apresentaram-se como os principais materiais estudados e empregados para a reposição e regeneração do tecido ósseo em finalidades clínicas. Estes materiais exibem como principais características a semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados, biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (Bouler et al., 2017; Guastaldi, Aparecida, 2010; Kawachi et al., 2000; Samavedi et al., 2013).

A formulação de cimento de fosfato tricálcico (TCP)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  patenteado por Brown e Chow (1986) é o mais utilizado, sendo a razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo de 1,5. E podem ocorrer quatro formas alotrópicas ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). O  $\beta$  - fosfato tricálcico ( $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\beta$ -TCP) é o mais difundido até hoje, por apresentar bom comportamento mecânico e, principalmente, devido à maior bioatividade em consequência do arranjo estrutural desta fase, possibilitando maior troca de íons,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , com o meio biológico (Arbez et al., 2019; Barbosa et al., 2019; Gu et al., 2019; Guastaldi, Aparecida, 2010; Ito et al., 2019; Kakuta et al., 2019; Kawachi et al., 2000; Pitkänen et al., 2019). De acordo com Samavedi et al. (2013) e Guastaldi e Aparecida (2010) o  $\beta$ -TCP foi usado mais extensivamente na regeneração óssea que o  $\alpha$ -TCP (Weichhold et al., 2019).

Devido ao seu comportamento biodegradável, o TCP nas formas alotrópicas  $\alpha$  e  $\beta$  têm-se tornado objeto de interesse na área de cimentos, sendo utilizado na ortopedia e odontologia como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos, além da fixação de tecidos moles (Bouler et al., 2017; Guastaldi, Aparecida, 2010). De acordo com Bouler et al. (2017), os cimentos compostos de fosfatos de cálcio e fosfato de cálcio dibásico têm eficácia comprovada em indicações clínicas, pois sua relação HA / TCP regulam a reabsorção progressiva e o processo de substituição óssea (Carrel et al., 2016; Kakar et al., 2017; Kamal et al., 2019; Nery et al., 2017).

Com o advento tecnológico, além da metodologia utilizada por Brown e Chow (1986), outras possibilidades foram encontradas para produzir um cimento ósseo. Por exemplo, o protocolo descrito sobre o processo de dissolução do silicato de cálcio em uma solução de fosfato, precipitando hidroxiapatita e formando um silicato vítreo

descrita por Mosselmans et al. (2007). Esta técnica mostrou que na presença de ácido fosfórico, o silicato de cálcio ( $\text{CaSiO}_3$ ) ou wollastonita, formava um novo material composto por um fosfato de cálcio hidratado (hidroxiapatita) e sílica gel (fase vítrea). A formação dessas fases torna esse material notável, uma vez que ele pode apresentar uma fase cristalina, composta de fosfato de cálcio e uma fase vítrea rica em silício, combinando características de dois materiais muito utilizados para reparação óssea: os TCPs e os biovidros. A fase rica em silício pode apresentar grupos silanóis que são capazes de adsorver proteína e favorecer a adesão celular melhorando a sua bioatividade, como os biovidros, aumentando a sua capacidade de regeneração óssea (Jones, 2012).

No entanto, a produção de cimentos a base de silicato de cálcio para utilização clínica não pode ser usada apenas com a mistura do silicato com ácido fosfórico, devido ao baixo potencial hidrogeniônico (pH) do ácido fosfórico, que danificaria o tecido no qual o biomaterial fosse empregado. Como alternativa de produção do cimento de silicato de cálcio, utiliza-se uma solução tampão (pH $\approx$ 7), composta por ácido fosfórico e uma base a fim de obter uma mistura composta por fosfato e cátions de pH semelhante ao dos tecidos (Jones, 2012).

Analogamente, esse mesmo recurso pode ser usado nos cimentos de silicato de cálcio como uma alternativa para melhorar suas características. O geopolímero é um material com comportamento e processo de obtenção parecido ao cimento de silicato de cálcio. Este material é formado pela condensação de sílica e alumina, formando uma fase vítrea. Ambos são formados por um silicato que ao ser misturado com uma solução ativadora, solução tampão, produz uma reação química de condensação, formando um material coeso. Durante o processo de cura, o geopolímero sofre a influência dos cátions usados na solução ativadora, que mudam o tempo de pega e coesão desses materiais. Após a cura, as variações causadas pela mudança de composição alteram a resistência química e mecânica desses materiais. A alteração das características mecânicas é causada pela alteração no arranjo dos átomos na estrutura vítrea. Já a modificação química, é causada pela formação de ligações que podem alterar sua solubilidade em água, favorecendo a degradação desses materiais. A solução ativadora pode ser usada para controlar a composição do geopolímero influenciando as suas propriedades mecânicas e químicas

(Davidovits, 2015).

Assim, o diferencial do material utilizado no presente estudo, com o  $\alpha$ -TCP, é a presença dessa fase vítrea, semelhante ao geopolímero que é um dos fatores que podem determinar a resistência desse material. Em um estudo semelhante foi sintetizado um cimento usando o silicato de cálcio e um tampão de fosfato e amônio e obteve boas características biológicas, tornando-se muito promissor (Ding et al., 2009). Entretanto, mostraram uma resistência inferior quando comparados com os cimentos obtidos por TCP (Ding et al., 2009). Esse resultado pode justificar-se pela falta de uma fase pura de silicato de cálcio e pela composição da solução ativadora, que podem ter influenciado a estrutura química da fase vítrea, resultando na alteração das suas propriedades mecânicas.

Ding et al. (2009) realizaram estudo *in vitro* com células de osteossarcoma humano com cimento de silicato de cálcio com solução de fosfato de amônio, avaliaram a proliferação destas células, bem como a expressão de mRNAs relacionados a osteoblastos. Os autores concluíram que o material além de bioativo, aprimorou a proliferação e diferenciação das células.

Ensaio *in vitro* com células humanas derivadas de ossos também foram realizados com silicato de cálcio e demonstraram resultados positivos. Os autores afirmaram que a modificação da cerâmica com a incorporação de um cátion, além de diminuir o pH do meio, melhorou as propriedades físicas e biológicas da cerâmica pura. Assim, os autores concluíram que a cerâmica ( $\text{CaSiO}_3$ ) pode ser considerada um material com potencial para a regeneração óssea (Wu et al., 2007). De Aza et al. (2013) investigaram o papel do silício dos TCP ( $\alpha$  e  $\beta$ ) sobre propriedades mecânicas e proliferação de células mesenquimais, bem como, sua diferenciação osteoblástica e mineralização. Os autores concluíram que a incorporação de íons silicatos na cerâmica promoveu processos de remodelação óssea na interface osso / cerâmica, com taxa de solubilidade diminuída.

Outra característica que deve ser considerada é a capacidade de interação do biomaterial com os microrganismos que pode favorecer a formação de biofilme e a ocorrência de infecções, neste caso em tecido ósseo é conhecida como osteomelite. Logo, o combate a infecções provenientes da formação de biofilmes em implantes pode trazer complicações no sucesso do implante (Ford, Cassat, 2017). Biofilmes são

comunidades de microrganismos unidas a uma superfície de grande importância na persistência de infecções Rabin et al. (2015). Os microrganismos dentro de um biofilme exibem várias ordens de grandeza mais resistentes a antibióticos comparadas com bactérias planctônicas (Oliveira et al., 2015; Rabin et al., 2015). Devido a isso, complicações pós-cirúrgicas decorrem da formação de colônias de bactérias na superfície dos implantes. Microrganismos com diferentes características e relevância clínica foram analisados em estudos prévios sobre o potencial antimicrobiano de biomateriais.

Estudos avaliaram o crescimento do biofilme de *Staphylococcus aureus* em cimentos e compósitos com utilização médico-odontológico (El-Wassefy et al., 2018; ElReash et al., 2019; Russo et al., 2019; Zhang et al., 2020). El-Wassefy et al. (2018) concluíram que a incorporação de partículas de prata no cimento limitou a formação do biofilme de *S. aureus*, sem efeito significativo em suas propriedades mecânicas nem influência notável em sua coloração.

ElReash et al. (2019) compararam *in vitro* o efeito antimicrobiano correlacionando com pH de dois cimentos de silicato de cálcio e uma resina. Concluíram que cimentos à base de silicato de cálcio mostram potencial atividade antimicrobiana devido à sua alta alcalinidade e questiona o efeito antimicrobiano de cimentos de silicato de cálcio contra espécies bacterianas estritamente anaeróbicas. Abou ElReash et al. (2019) utilizaram os mesmos cimentos do estudo de ElReash et al. (2019) em modelos animais, e conseguiram demonstrar biocompatibilidade para os tecidos subcutâneos com a utilização do Agregado de Trióxido Mineral (Angelus PR, Brasil), iRoot BP Plus (BioCeramix Inc., Vancouver, BC, Canadá) e Resina Restauradora Bioativa (ACTIVA, MA, Pulpdent, EUA).

Russo et al. (2019) destacaram as características mecânicas, biológicas e antibacterianas contra cepas bacterianas de *P. aeruginosa* e *S. aureus* do cimento cirúrgico modificado. Recentemente Zhang et al. (2020) estudaram cimentos bioativos à base de silicato de cálcio para suprimir infecção, sendo promissor para terapia periapical ou reparo de defeito ósseo alveolar. O potencial antimicrobiano destes cimentos foi testado em cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Concluiu-se que o potencial antibacteriano é apreciável a longo prazo, além de, ter confirmado o aprimoramento da regeneração óssea em defeito ósseo maxilofacial de coelhos.

A *Candida albicans* (Gulati et al., 2016; Willems et al., 2016) tem como mecanismo de resistência a capacidade de formação de biofilmes, sendo muito presente na cavidade oral, com pH médio, com produção de ácido láctico e liberação de cálcio da hidroxiapatita. A espécie foi avaliada quanto seu crescimento microbiano em biomateriais particulados e em superfícies (Villard et al., 2015; Yahia et al., 2017; ElReash et al., 2019). Villard et al. (2015) concluíram que o revestimento de sílica e a silanização modificaram a capacidade do biomaterial estudado em inibir a formação de biofilme de *C. albicans*, e o mesmo comportamento foi observado no estudo realizado por ElReash et al. (2019).

A inibição do crescimento microbiano pode ser justificada devido a influência entre o biomaterial e o microrganismo. Após o contato do cimento de silicato de cálcio com a saliva humana, há formação de uma camada de apatita, resultante da bioatividade do material (Biswas et al., 2018 *apud* Wu, Chang, 2013). Essa interação promove a geração de cargas que são capazes de formar espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente as hidroxilas ( $\text{OH}^\cdot$ ), que de acordo com Samanta et al. (2017) são as principais espécies responsáveis por danos oxidativos a lipídios, proteínas e a parede celular bacteriana. Dessa forma a capacidade antibacteriana, bem como a capacidade de inibir o crescimento de biofilmes, estão relacionadas com a capacidade dos biomateriais de induzirem a formação de ERO.

Tendo em vista a complexidade das propriedades de um cimento, são necessários estudos que abranjam desde o desenvolvimento de um biomaterial até a sua utilização, uma vez que suas implicações em processos biológicos e a toxicidade do biomaterial dependem das suas características físico-químicas (Chatterjee et al., 2014). Dessa forma, é importante salientar que um biomaterial deve, além de promover interações positivas ao sistema biológico no qual é inserido, suas propriedades mecânicas devem ser adequadas. Por isso, a base de silicato tem sido muito explorada, a fim de desenvolver um cimento com propriedades mecânicas e biológicas aperfeiçoadas para utilização em procedimentos odontológicos e ortopédicos.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo neste trabalho foi avaliar a influência de diferentes soluções ativadoras de fosfato de amônio e carbonato de sódio e potássio, utilizadas para a confecção de um novo cimento a base de silicato de cálcio, na osteogênese de células mesenquimais, na neoformação óssea de defeitos críticos em tíbias de ratos e na formação de biofilmes monotípicos, visando o desenvolvimento de cimentos com propriedades biológicas aprimoradas.

### 2.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos analisar *in vitro*:

- a) a caracterização da topografia dos cimentos confeccionados por MEV-FEG;
- b) a citotoxicidade, a adesão e a proliferação celular;
- c) o conteúdo de proteína total e a atividade da fosfatase alcalina;
- d) a formação de nódulos de mineralização;
- e) a formação de biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *C. albicans* e *P. aeruginosa* sobre os cimentos estudados.

Também foram objetivos específicos avaliar *in vivo*:

- f) a qualidade do tecido ósseo neoformado na interface com os diferentes materiais;
- g) a quantidade de neoformação óssea na interface com os diferentes

materiais;

h) a resistência do reparo ósseo obtido a partir do preenchimento com os diferentes cimentos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos / Unesp e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) protocolado sob o número 16 / 2018 (Anexo A) e sob as diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (Kilkenny et al., 2010).

#### 3.2 Confeccção e caracterização dos cimentos

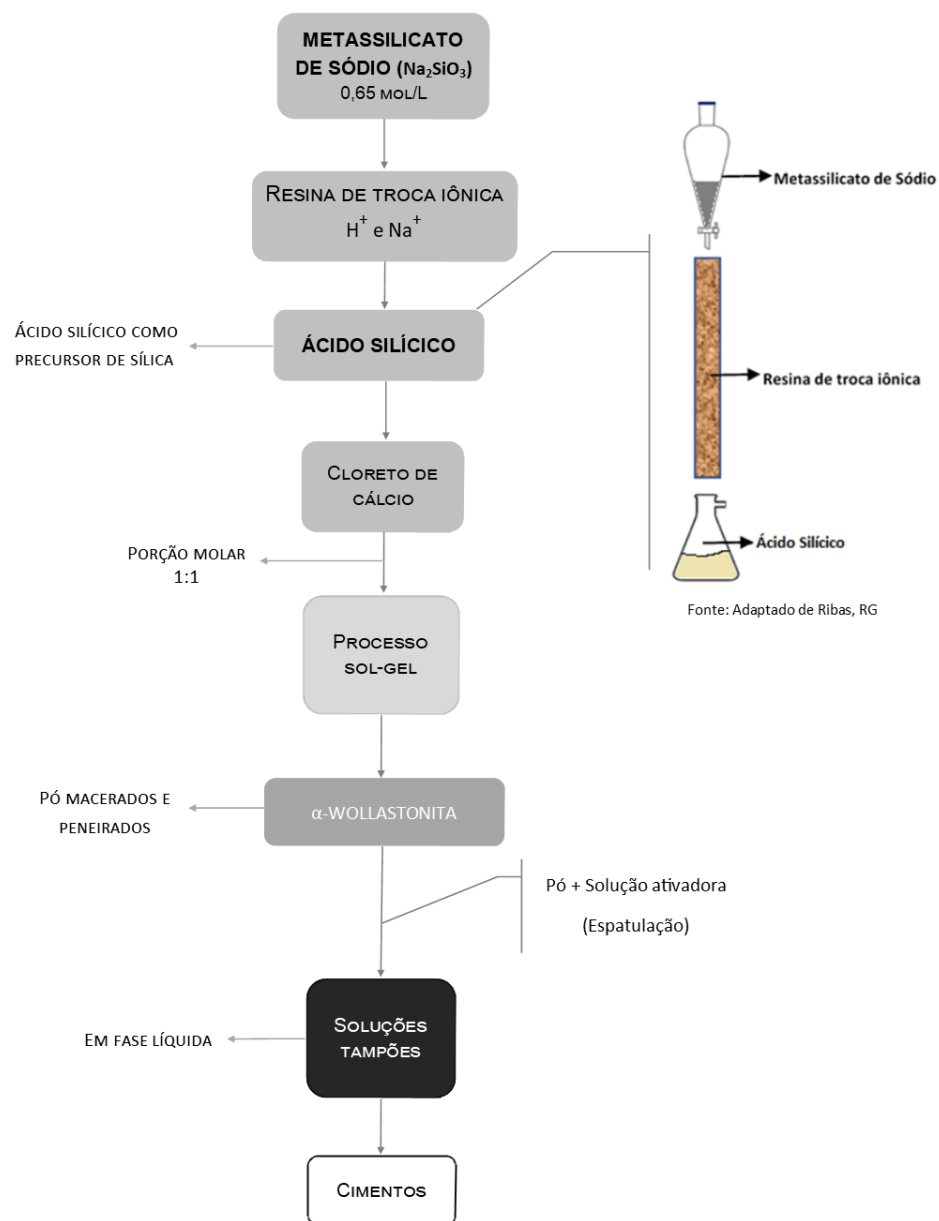
Foram confeccionados para o presente estudo três tipos de cimentos produzidos a partir da  $\alpha$ -wollastonita (silicato de cálcio). Sua produção foi realizada em etapas, sendo elas, a preparação do ácido silícico, a preparação do pó de  $\alpha$ -wollastonita a partir do método de sol-gel e a formulação dos cimentos propriamente ditos.

Para a preparação dos silicatos de cálcio, primeiramente foi produzida a solução de 0,65 mol/L de metassilicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  – Dinâmica), que foi adicionada à resina de troca iônica (IR120 – Rohm, Haas), na qual ocorre a troca entre os íons  $\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+$ , para obtenção final do ácido silícico, fundamental para produção do cimento. Com base na solução aquosa do ácido silícico foi realizada uma mistura na proporção molar de  $1\text{CaO}:1\text{SiO}_2$  com um sal de cálcio, o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), para síntese da cerâmica a partir metodologia do sol-gel.

O processo de sol-gel consiste na produção do sol, dispersão coloidal com partículas nanométricas estáveis em um líquido, que pelo processo de crescimento e agregação causa a mistura dessas partículas dispersas e ocasiona a desestabilização

do coloide, que tem como resultado, a formação de géis e precipitados (Klein, 1985; Pierre, 1998; Dimitriev et al., 2009). Sendo assim, o cloreto de cálcio misturado ao ácido silícico forma o sol, por método físico forma o gel e por fim, após o processo de secagem gera o pó de wollastonita para produção dos cimentos (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática da obtenção dos cimentos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o preparo do pó de  $\alpha$ -wollastonita, foram produzidas as soluções ativadoras com diferentes íons, a fim de estudar a influência dos mesmos. Essas soluções ativadoras são soluções tampões, na fase líquida, com potencial hidrogeniônico neutro, que é misturada ao pó para produção dos cimentos, cimentos esses, que liberam cátions que podem influenciar a regeneração tecidual. A fim de obter-se os diferentes cimentos, foram utilizadas três soluções tampões na fase líquida. A solução utilizada para produção do cimento a partir do sal de fosfato de amônio dibásico ( $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ) foram formulações otimizadas dos estudos de Irie (2017) que demonstraram resultados promissores. Enquanto os sais de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) foram utilizados com base na composição de biovidros, como o *Bioglass 45S5*<sup>®</sup>, já que o sódio e potássio existem em suas formulações (Bellucci et al., 2010; Bellucci et al., 2014; Lopes et al., 2016; Moazzami et al., 2016; Cozza et al., 2018; Villalpando-Reyna et al., 2019). Sendo eles, acrescentados aos cimentos a fim de otimizar suas propriedades mecânicas e biológicas (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição das soluções ativadoras de cada cimento a ser confeccionado

| Sais                         | $\text{H}_3\text{PO}_4$<br>(mL) | $\text{H}_2\text{O}$<br>(mL) | $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$<br>(g) |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ | 0,4                             | 7,0                          | 6,010                                |
| $\text{Na}_2\text{CO}_3$     | 1,0                             | 4,0                          | -                                    |
| $\text{K}_2\text{CO}_3$      | 1,0                             | 5,0                          | -                                    |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a manufatura dos cimentos, o pó de wollastonita e a solução ativadora foram misturados nas razões mencionadas no Quadro 1 pela técnica de espátulação manual. O objetivo foi produzir um cimento homogêneo e disperso, em que pequenas porções do pó foram misturadas ao líquido em intervalos de tempo pré-determinados. Dessa forma, a solução ativadora produzida, descrita no Quadro 1, foram misturadas com porções do pó como descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – Composição dos cimentos

| Sais           | $\alpha$ -Wollastonita (g) | $K_2CO_3$ (g) | $Na_2CO_3$ (g) | Solução ativadora (mL) |
|----------------|----------------------------|---------------|----------------|------------------------|
| $(NH_4)_3PO_4$ | 1,9047                     | -             | -              | 1,0                    |
| $Na_2CO_3$     | 0,8558                     | 0,3964        | -              | 1,0                    |
| $K_2CO_3$      | 0,7143                     | -             | 0,2519         | 1,0                    |

Fonte: Elaborado pelo autor.

No caso do fosfato de amônio, a solução foi produzida, já com o sal, e misturada a wollastonita. Já para a manufatura dos cimentos com os sais carbonatos, modificou-se a metodologia, em razão de que, os mesmos reagem com o ácido fosfórico impedindo que a reação ocorra entre o sal e a wollastonita. Posto isso, os sais de carbonato, em pó, foram previamente misturados ao pó de wollastonita e posteriormente adicionada a solução ativadora.

Por conseguinte, o método proposto utilizou, o silicato de cálcio (fase  $\alpha$ -wollastonita) que reage com a solução ativadora de escolha e por meio da reação de hidrólise e condensação forma uma fase rica em fosfato e outras fases vítreas ricas em sílica (Ding et al., 2009). Os materiais foram produzidos no Laboratório de Nanotecnologia do Instituto Tecnológico de Aeronáutica.

Sendo assim, para a confecção do corpo de prova foi misturada a solução ativadora com o silicato de cálcio e colocada em um molde de 3,5 mm de largura por 3,5 mm de altura, mantido em estufa a 36,5 °C a 100% de umidade durante 24 horas. O corpo de prova foi obtido com tamanho final de 3 mm por 3 mm em decorrência da contração do processo de endurecimento do cimento. Os cimentos foram separados por grupos de acordo com a composição da solução ativadora como descritos na Figura 2. Todos os cimentos foram previamente esterilizados em luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos anteriormente aos testes *in vitro*, microbiológico e *in vivo*.

Figura 2 – Descrição dos grupos de acordo com a produção dos cimentos



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.1 Análise de superfície com microscopia eletrônica de varredura

Para analisar a topografia superficial das amostras foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL / JSM-5310, Tóquio, Japão) com canhão de emissão de campo “*Field Emission Gun*” (FEG) (Tescan / Vega 3, Brno, República Tcheca) instalados no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS / INPE). Para isso, as amostras foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (*stub*) e metalizadas com uma camada fina de ouro (80 Å), que foi depositado por meio de vaporização iônica (*sputtering*) na máquina metalizadora (Emitech SC 7620, Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, Reino Unido) por 130 s com uma corrente de 10-15 mA em vácuo de 130 mTorr e à uma taxa de metalização de 3,5 nm / min. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES), projetados sobre a superfície da amostra; e também por meio do detector de elétron retro espalhado (BSE).

### 3.3 Ensaios biológicos *in vitro*

Todos os procedimentos biológicos *in vitro* foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (Leic). Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia, ambos os laboratórios estão localizados no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Campus de São José dos Campos.

#### 3.3.1 Cultura celular

A obtenção e isolamento das células mesenquimais para cultura celular foi obtida de fêmures de nove ratos *Wistar* pesando cerca de 300 g com 3 meses de idade. Os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico utilizando uma solução intramuscular de Anasedan / Dopalen.

Após a limpeza dos fêmures, no fluxo laminar, as células da medula óssea foram isoladas e inseridas em frascos para cultura celular de 250 mL e 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil) com meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (500 µg / mL) (Gibco), denominado de meio total suplementado (MTS), e incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

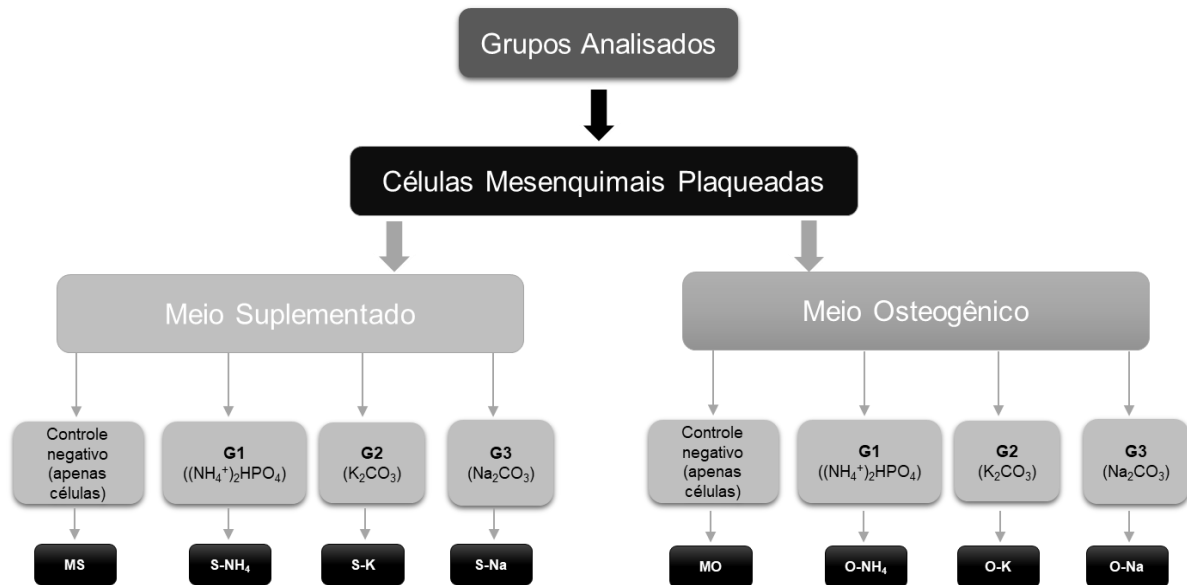
O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). Após a confluência (aproximadamente sete dias), as células foram liberadas enzimaticamente (Rosa et al., 2008) e plaqueadas na densidade de 1x10<sup>4</sup> células viáveis em cada poço da microplaca de 96 poços (Kasvi, Brasil). Os cimentos foram previamente inseridos nos poços (n=5 para cada grupo experimental) e foi acrescentado meio de cultura suplementado (MTS) ou osteogênico (MTS-O) para obtenção do volume final de 250 µL. O meio de cultura osteogênico foi constituído

pelo meio de cultura suplementado acrescido de 5 mg / mL de ácido ascórbico (Neon) e 2,16 g de beta-glicerofosfato (Sigma-Aldrich referência nº 50020), produtos que auxiliam na indução da diferenciação osteogênica.

O objetivo de utilizar diferentes meios de cultura no plaqueamento foi analisar a capacidade dos cimentos em induzir a diferenciação independente do meio de cultura. Os meios de cultura utilizados para o plaqueamento celular foram diferentes quanto ao seu conteúdo, uma vez que no meio de cultura suplementado não foram adicionados os produtos indutores da diferenciação celular, portanto apenas o cimento agiu como agente indutor desta diferenciação. Todos os procedimentos foram realizados de forma idêntica em ambos os meios, para avaliar se a progressão celular foi similar.

De modo que as análises ocorressem de forma reprodutível e sistemática, os cimentos analisados neste estudo foram classificados de acordo com sua composição (Figura 2) e meio de cultura ao qual foram associados, a denominação esquemática dos grupos é demonstrada na Figura 3. Essa denominação descrita dos cimentos foi utilizada apenas nos ensaios *in vitro* de cultura celular, nos demais testes, *in vivo* e microbiológico, a denominação utilizada foi a descrita na Figura 2.

Figura 3 – Denominação dos grupos estudados de acordo com o cimento analisado e meio de cultura utilizado

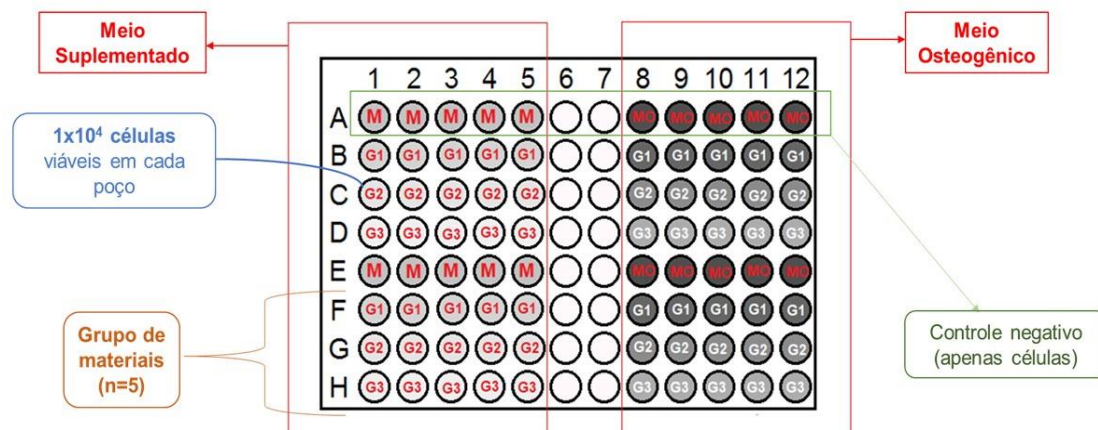


Legenda: MS – meio suplementado; S – representa os grupos de cimentos que entraram em contato com o meio suplementado seguido do íon utilizado na manufatura do cimento; MO - meio suplementado osteogênico; O - representa os grupos de cimentos que entraram em contato com o meio suplementado osteogênico seguido do íon utilizado na manufatura do cimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e mantidas até o momento de cada teste. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993 – 5 e em triplicada, sendo que cada triplicata foi obtida por meio de um *pool* de células provenientes do fêmur de três animais, totalizando assim os nove animais utilizados nessa etapa. As placas tiveram um desenho pré-definido para que houvesse padrão na realização dos testes evitando qualquer conflito na análise dos grupos (Figura 4).

Figura 4 – Desenho de placa de 96 poços utilizada nas análises *in vitro* com cultura celular

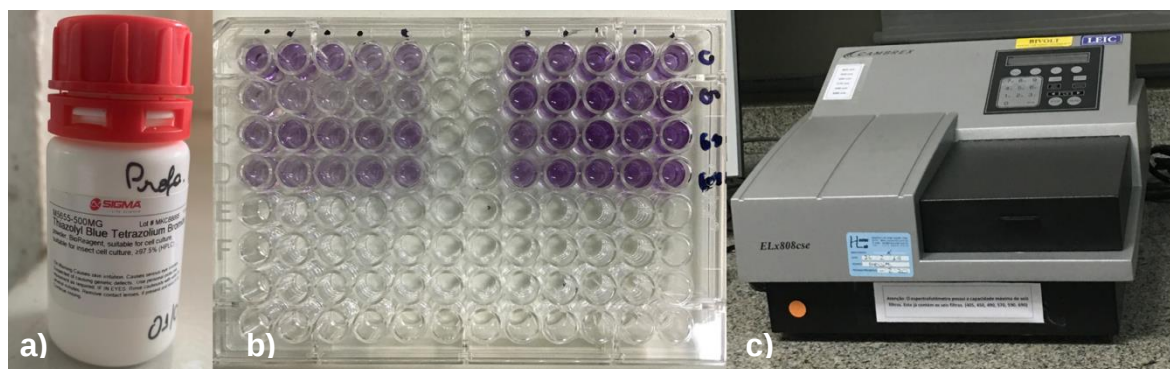


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Para determinação da viabilidade celular, que também pode ser chamada de citotoxicidade, foi realizada avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico pela incubação com o corante MTT [brometo de 3-4,5-dimetiltiazol] (Sigma Aldrich) na concentração de 0,5mg/mL. O sal foi incubado em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas, protegido de luz, a célula foi lisada com DMSO para quantificação dos cristais de formazan e foi realizada a análise espectrofotométrica do corante incorporado. Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas após os períodos de 07 dias, utilizando medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek – EL808IU, USA) (Figura 5). Os dados foram aferidos como absorbância e expressos como porcentagem calibrada a partir do grupo controle (poço somente com células).

Figura 5 – Procedimento de avaliação de citotoxicidade



Legenda: a) sal MTT; b) placa 96 poços com as alíquotas para leitura; c) leitor de microplaca.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.3 Conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total (PT) foi calculado após 10 dias de cultura de acordo com o método modificado de Lowry (1951). Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com PBS a 37 °C, e preenchidos com 250  $\mu$ L de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma Chemical, CO., St. Louis, MO, USA), para extração das proteínas. Após 30 minutos, 100  $\mu$ L da solução de cada poço foi misturado com 100  $\mu$ L da solução de Lowry (Sigma Chemical, CO., St. Louis, MO, USA) e deixado por 20 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi diluído em reagente de Folin e Ciocalteau (Sigma Chemical, CO., St. Louis, MO, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a absorbância foi aferida espectrofotometricamente a 680 nm (Biotek – EL808IU, USA) e o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em  $\mu$ g/mL.

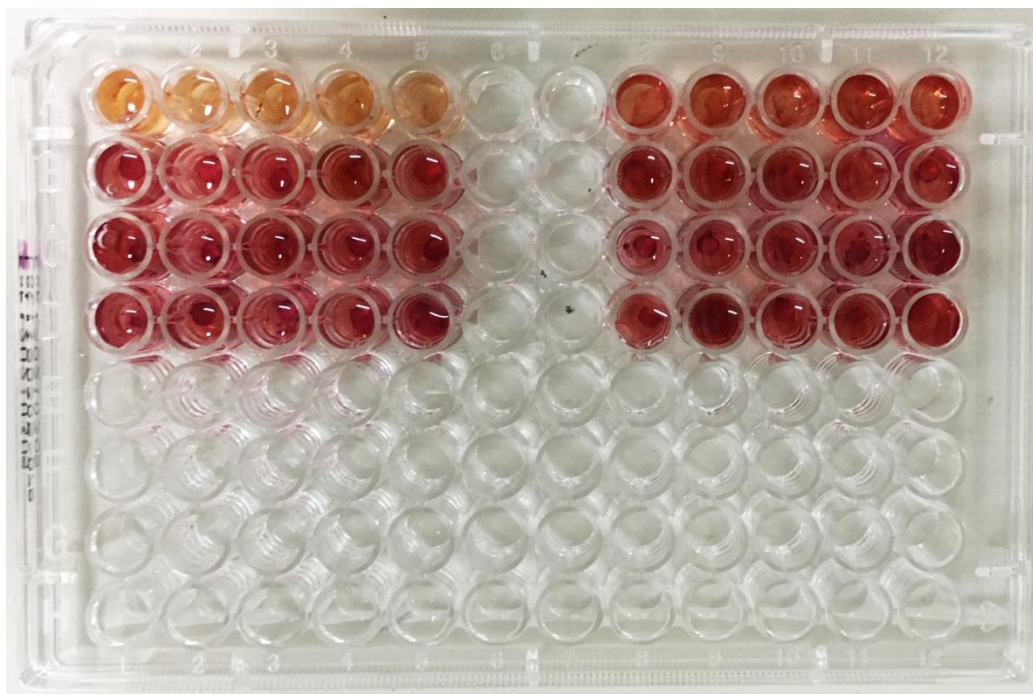
### 3.3.4 Atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi avaliada a partir dos mesmos lisados no qual se avaliou a PT. Sua determinação ocorreu 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, referência 40), no período de 10 dias após o plaqueamento celular. Inicialmente, 5 µL de timolftaleína monofosfato foram misturados com 50 µL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1, a 37 °C. A solução foi acrescentada à alíquota de 5 µL dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37 °C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 200 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Biotek – EL808IU, USA) 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.

### 3.3.5 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 14 dias de cultura nos poços controles e nos poços com os cimentos a fim de comprovar a diferenciação celular das células mesenquimais. Para tanto, as células aderidas foram fixadas em solução de formol 10% por 2 horas à temperatura ambiente. Após fixação, as amostras foram desidratadas com uma série gradual de álcool e coradas com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Brasil), pH 4,2 por 10 minutos. O corante vermelho de Alizarina S cora áreas que são ricas em cálcio (Figura 6).

Figura 6 – Placa de 96 poços durante o processo de coloração dos nódulos de mineralização com Alizarina S 2%



Fonte: Elaborado pelo autor.

A quantificação das formações mineralizadas foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004). Para tanto, 280  $\mu$ l de ácido acético 10% foi adicionado a cada um dos poços contendo as amostras e incubados em temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Todo conteúdo de cada um dos poços foi transferido para microtubos de centrífuga e agitados em vórtex (Vórtex QL – 901) por 30 segundos. Os microtubos foram levados ao banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA095/CF) e aquecidos por 10 minutos, a 85°C sendo posteriormente transferidos para um Becker com gelo por 5 minutos. A seguir foram centrifugados (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K) por 20 minutos e 100  $\mu$ l dos sobrenadantes foram transferidos para placa de 96 poços. Em cada poço foram acrescidos 40  $\mu$ l de hidróxido de amônia a 10%, para neutralização do ácido. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (Biotek – EL808IU, USA), sob o comprimento de onda de 405 nm.

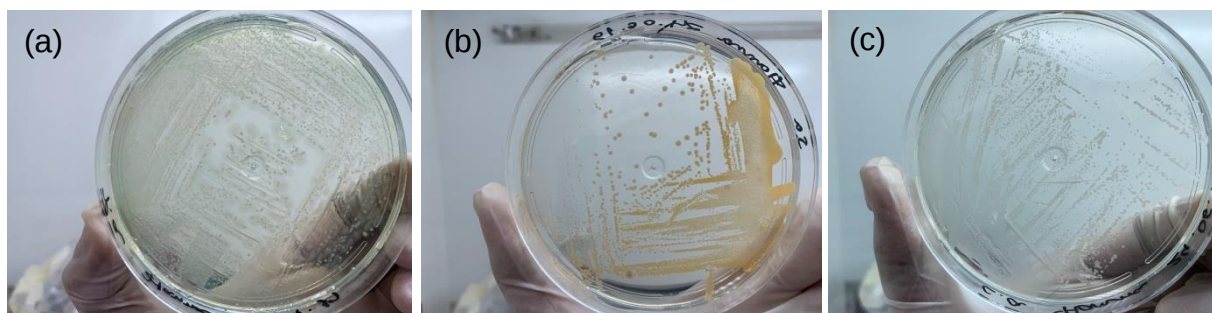
### 3.3.6 Análise da morfologia celular por fluorescência direta

Para análise da morfologia celular do citoesqueleto de actina e dos núcleos de células aderidas à superfície, as culturas crescidas sobre as amostras após 7 dias foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (Synth, São Paulo, Brasil) em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,2, por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram rotineiramente processadas para fluorescência, como descrito detalhadamente em Oliveira e Nanci (2004). A permeabilização da membrana citoplasmática foi realizada com solução de Triton X-100 0,5% (Sigma Aldrich, St Louis, USA) em PBS, por 5 minutos, seguida por duas lavagens com PBS. A incubação com albumina bovina a 1% (Sigma Aldrich, St Louis, USA) foi realizada em PBS, durante 30 minutos e posteriormente adicionado Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen Eugene, Oregon, USA) por 20 minutos a temperatura ambiente, seguida por duas lavagens com PBS. As análises foram realizadas nas células do poço que estavam em contato com as amostras no microscópio de fluorescência (Microscópio Carl Zeiss Microimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany). Ao fim do procedimento foi adicionado *Fluoroshield* com DAPI (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). As imagens digitais foram visualizadas pelo *software* Axio Vision 7.0.

### 3.3.7 Avaliação da formação de biofilme microbianos

Foram utilizadas cepas de referência (ATCC - American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Candida albicans* (ATCC 18804), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT – Unesp. As cepas foram cultivadas em meio sólido (*Brain Heart Infusion* – BHI para bactérias e levedura) e posteriormente em meio líquido (BHI) por 24 horas cada a 37 °C (Figura 7). Em seguida, cada caldo foi centrifugado (2000 rpm / 10 min), o sobrenadante descartado e o *pellet* suspenso em meio líquido (BHI).

Figura 7 – Colônias de microrganismos semeados em meio BHI



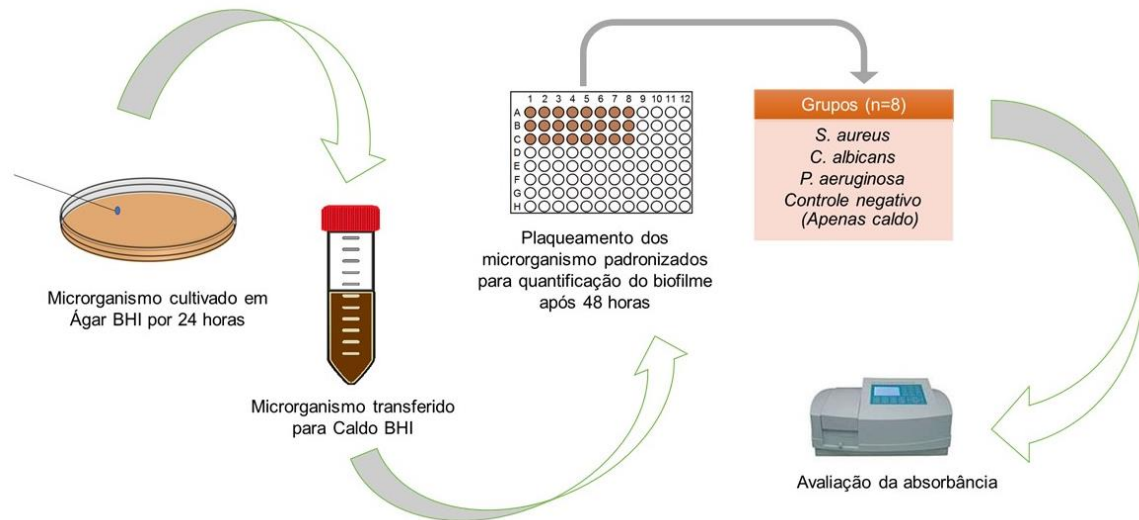
Legenda: a) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442); b) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); c) *Candida albicans* (ATCC 18804).

Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras esterilizadas pertencentes aos grupos descritos na Figura 2 foram distribuídas em poços de placas de 96 poços (n=08 para cada grupo experimental). A seguir, foram adicionados 100 µl / poço de caldo BHI e 100 µl de suspensão microbiana padronizada a  $10^6$  UFC / ml em espectrofotômetro (Micronal, AJX-1900, São Paulo, Brasil) para que houvesse formação de biofilmes monotípicos de *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; e *Candida albicans* em contato com os grupos experimentais em cada poço, o meio de cultura foi trocado após 24 horas em estufa.

Após 48 horas de incubação (37 °C) o meio foi retirado e adicionado 200 µl de MTT [brometo de 3-4,5-dimetiltiazol] (Sigma Aldrich) na concentração de 0,5 mg / ml de PBS e após 1 h de incubação na estufa a 37 °C, sob proteção da luz esta solução foi removida e foram adicionados 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma Aldrich) que permaneceu nos poços por 10 min sob incubação em estufa a 37 °C. Pelo mesmo período a placa foi levada para agitação em mesa orbital. Alíquotas de 200 µl de cada poço foram transferidas para outra placa de 96 poços (Greiner) e em leitor de microplaca ( $\lambda = 570$  nm - Biotek EL808IU) foram verificados os valores de absorbância de cada poço. Os testes para formação de biofilme foram realizados em duplicata.

Figura 8 – Etapas para a avaliação da formação de biofilmes monotípicos em contato com os grupos de cimentos estudados



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.4 Ensaios *in vivo*

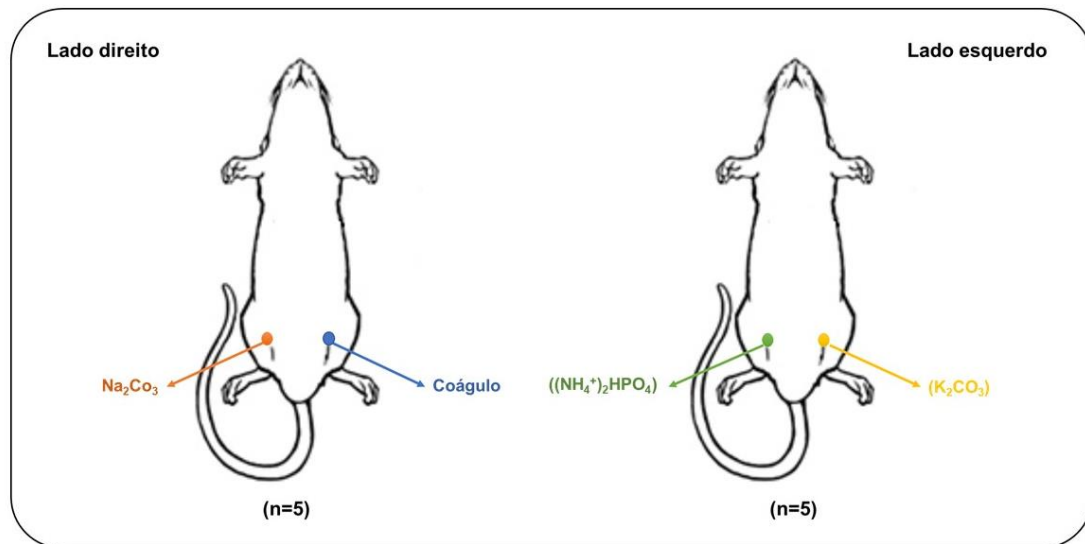
#### 3.4.1 Procedimento cirúrgico

Vinte ratos com 90 dias e pesando cerca de 300 g, foram usados para o estudo *in vivo*. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Unesp, situado em Botucatu e permaneceram durante o experimento no Biotério do ICT / Unesp em gaiolas (n=6) onde receberam água e ração *ad libitum*. O ambiente foi cuidadosamente monitorado para manter a temperatura em torno de 20 °C e a umidade em 55%.

Após 30 dias de adaptação ao ambiente, com ciclos diários alternando 12 horas correspondentes ao período de luz e ao período noturno, foi iniciado este experimento. Nas tíbias direita e esquerda dos 20 animais foram realizados defeitos ósseos críticos monocorticais de 3,0 mm (Hoerth et al., 2014; Prado et al., 2006) os

quais foram preenchidos com os três materiais experimentais e com o coágulo considerado grupo controle (n=5 para cada grupo experimental), como ilustrado esquematicamente na Figura 9. Dentre os 20 animais utilizados, 10 foram submetidos ao teste mecânico e 10 foram encaminhados para as análises histológicas e histomorfométrica, a escolha dos animais para cada preenchimento e análise ocorreu de maneira aleatória.

Figura 9 – Grupos de ratos *Wistar* utilizados no procedimento cirúrgico



Fonte: Adaptado de Uvin et al., 2012.

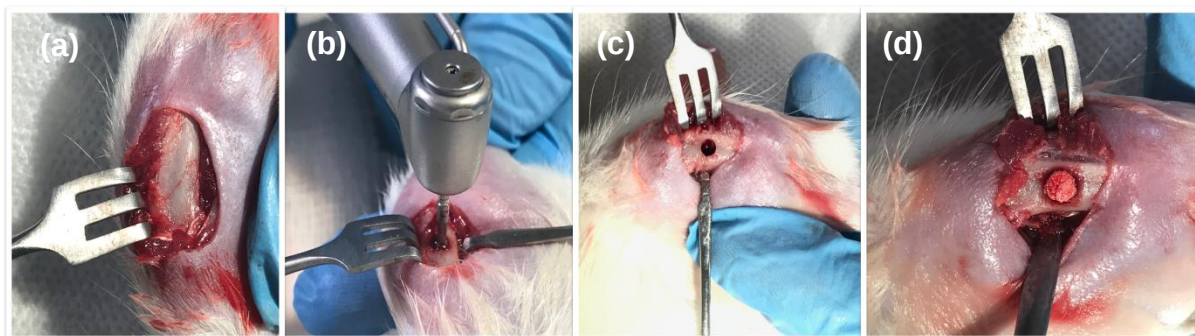
Previamente à cirurgia, os animais foram pesados e anestesiados. Os fármacos utilizados nos procedimentos anestésicos e suas respectivas concentrações foram: cloridrato de xilazina 2,3 g / 100 mL (Anasedan® - Vetbrands, Jacaréí - Brasil), substância sedativa e relaxante muscular; e cloridrato de ketamina 1,16 g / 10 mL (Dopalen® – Vetbrands, Jacaréí – SP - Brasil), um anestésico geral.

Inicialmente, foi preparada uma solução contendo a mistura de 5 mg / kg de cloridrato de xilazina e 75 a 95 mg / kg de cloridrato de ketamina. Em seguida, para promover uma anestesia geral, cada animal recebeu, por via intramuscular a solução previamente preparada, de forma que um animal pesando 300 g recebeu 0,38 ml de

cloridrato de ketamina e 0,1 ml de cloridrato de xilazina. Após a anestesia dos animais, os locais cirúrgicos das tíbias direita e esquerda foram submetidos à tricotomia e à antissepsia com solução de álcool iodado.

A incisão foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região correspondente a face medial das tíbias. Os músculos e periósteo foram divulsionados para expor a cortical onde foi realizado o defeito crítico com broca cilíndrica de 3,0 mm sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, visando evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso. Posteriormente, as amostras foram adicionadas e os tecidos foram reposicionados e a camada muscular e a pele foram suturadas com fio de seda nº 4 (Ethicon / Johnson & Johnson) como ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Procedimento cirúrgico



Legenda: a) incisão; b) realização do defeito ósseo; c) músculos e periósteo divulsionados; d) posicionamento dos materiais em tíbias de ratos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao término da cirurgia, foram administrados fármacos analgésicos, anti-inflamatórios não-esteroides e antibiótico de amplo espectro como descrito no Quadro 3 (Carpenter, 2010; Viana, 2017). Após a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas, com ração e água *ad libitum*, em ambiente com exaustão do ar, e monitorados até o prazo da eutanásia de 21 dias.

Quadro 3 – Descrição dos medicamentos utilizados após a cirurgia das tíbias dos ratos

| <b>Medicamentos</b>          | <b>Via de Administração</b> | <b>Protocolo de medicação</b>                                       |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Dipirona monoidratada        | Oral                        | 1 gota a cada 12 horas durante 5 dias.                              |
| Tramal suspensão 100 mg / ml | Oral                        | 1 gota a cada 24 horas durante 5 dias.                              |
| Pentabiótico pequeno porte   | Intramuscular               | Aplicação de 0,01 ml a cada 100 g no dia da cirurgia e 5 dias após. |
| Meloxicam 0,2%               | Subcutânea                  | 0,08 ml uma vez por dia durante 3 dias.                             |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a realização da eutanásia, foi utilizado o triplo da dose anestésica seguida da decapitação. Antes do procedimento foi realizado o teste de sensibilidade a dor.

### 3.4.2 Análise histológica

As amostras foram preparadas para análise histológica convencional pelo método de descalcificação após o período mínimo de fixação da peça no formol a 10% por 48 horas. A seguir, foram colocados no ácido fórmico a 20% por cerca de 40 dias para que ocorresse a desmineralização. Posteriormente foram lavadas em água corrente por 20 minutos, e submetidas a concentrações crescentes de álcool (70%, 90% e 100%), em seguida foram imersas em xilol para o processo de diafanização. Finalmente as peças, previamente identificadas, foram incluídas em parafina utilizando moldes individuais. Posteriormente, as peças foram submetidas a cortes

semi-seriados de 5 µm com o micrótomo automático, situado no laboratório Centro de Biociências Aplicado a Pacientes com necessidades Especiais (Cebape) no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (ICT / Unesp). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, e para finalização foram selados com *entellan* e lamínula no Laboratório de Tecido Ósseo, também situado no mesmo Instituto e Departamento.

### 3.4.3 Análise histomorfométrica

As medidas histomorfométricas foram obtidas a partir de fotomicrografias que foram realizadas na área do defeito, no aumento de 10x. As imagens foram obtidas com um microscópio de luz Axiophot2 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) que transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2. Como padronização, a área analisada foi somente a área do defeito ósseo, considerando sempre como limite a área de delimitação entre tecido ósseo preexistente e neoformado, visando a contagem apenas do tecido neoformado.

Após obtenção das imagens, a análise histomorfométrica foi realizada por um único examinador previamente calibrado, utilizando o programa computacional *Image J* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para Windows. A área do osso neoformado na região fotografada foi calculada em pixels.

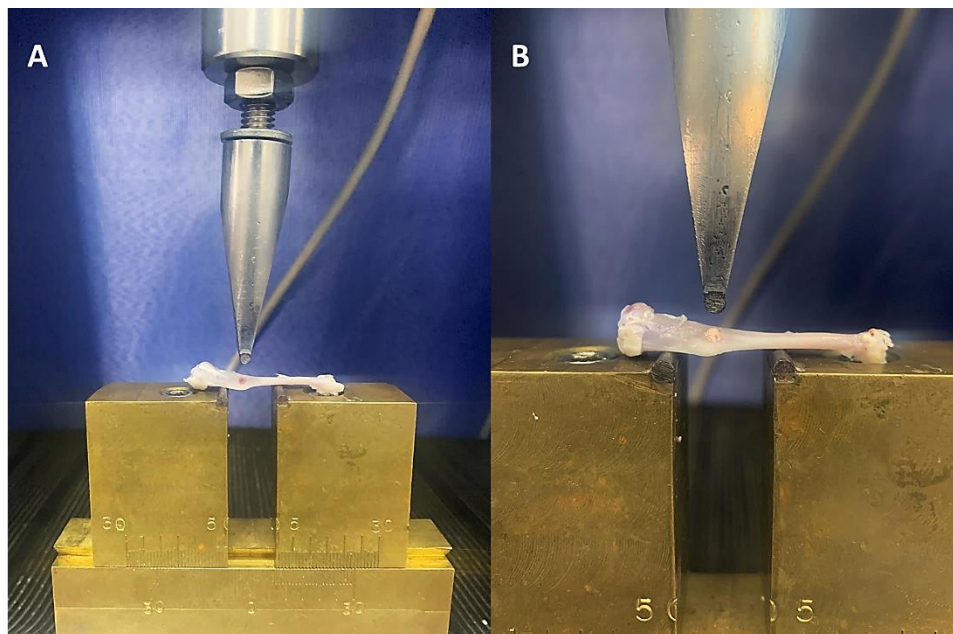
### 3.4.4 Teste de flexão de três pontos

Após a eutanásia, 05 tíbias de cada um dos quatro grupos foram mantidas em solução de Ringer a -20 °C, até o momento das análises que foi realizada no laboratório de Pesquisa em Materiais Odontológicos e Prótese do ICT/Unesp. Para a

manutenção dos espécimes em equilíbrio térmico com o meio ambiente, 12 h antes da realização dos ensaios, as tíbias foram retiradas do *freezer* para que pudessem descongelar de forma gradativa, evitando assim microfraturas.

Durante o teste, cada espécime foi colocado centralizado, ao longo de seu comprimento, sobre um suporte contendo dois apoios (distantes 15 mm um do outro), com sua face anterior voltada para baixo. A carga foi aplicada transversalmente ao longo eixo da tíbia sobre sua face posterior em um ponto médio entre os dois apoios. O suporte de aplicação da carga e os apoios utilizados apresentaram forma cilíndrica com um diâmetro de 3mm. O ensaio foi conduzido em uma máquina universal de ensaios (Emic® - modelo DL 200 MF, Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais - Brasil), que proporcionou uma força de 50 kgf com uma velocidade constante de aplicação de 5.08mm/min até a falha do espécime (Figura 11). Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente, sendo os espécimes mantidos úmidos em solução de Ringer.

Figura 11 - Teste de flexão de três pontos: força sendo aplicada sobre tíbia em posição



Legenda: a) Tíbia em posição em uma peça do grupo coágulo; b) Tíbia em posição em uma peça do grupo dos cimentos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Previamente ao teste, com auxílio de um paquímetro digital (Starret 727, Itu, São Paulo) foi realizada a mensuração do comprimento e espessura médio-lateral e largura antero-posterior da região mediana da diáfise das tíbias para determinar os valores que compõem as propriedades extrínsecas das mesmas que foram utilizadas na fórmula a seguir para determinar a força de ruptura do espécime:

$$\sigma_R = \frac{3FI}{2bd^2}$$

A fórmula foi utilizada para determinar a força de ruptura do espécime após o teste de flexão de 3 pontos, na qual F é o valor de força em Newton obtido no teste, I é a largura média das tíbias em mm, b representa a base de distância entre os pontos (mm), sendo 15 mm, e d o diâmetro da tíbia (mm).

### 3.5 Análise estatística

Os dados *in vitro* foram analisados por meio do teste de homogeneidade de variância de Barlett (Barlett, 1937) e Brown-Forsythe (Brown, Forsythe, 1974) e também pela análise descritiva dos dados, que foram posteriormente submetidos aos testes paramétricos, como o teste de variância Anova um fator e complementado pelo teste de Dunnett a fim de comparações múltiplas dos grupos testes em relação ao grupo controle. Para uma análise detalhada, os dados obtidos nos experimentos, foram submetidos ao modelo estatístico da análise de variância dois fatores, após serem avaliadas as suposições do modelo de análise de variância a fim de comparar os materiais entre si sob os diferentes meios em que foram expostos, e quando necessário foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey e Sidak. Para todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5%.

As análises estatísticas dos dados obtidos nos testes *in vivo* seguiram um protocolo semelhante ao *in vitro*, sendo submetidas ao teste de homogeneidade de variância de Barlett e Brown-Forsythe e a análise descritiva.

Avaliadas posteriormente por intermédio do teste de variância Anova um fator e pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, com o objetivo realizar a comparação dos grupos entre si e entre o controle, diferentemente do teste de Dunnett que comparou os grupos de cimento somente com o controle.

## 4 RESULTADOS

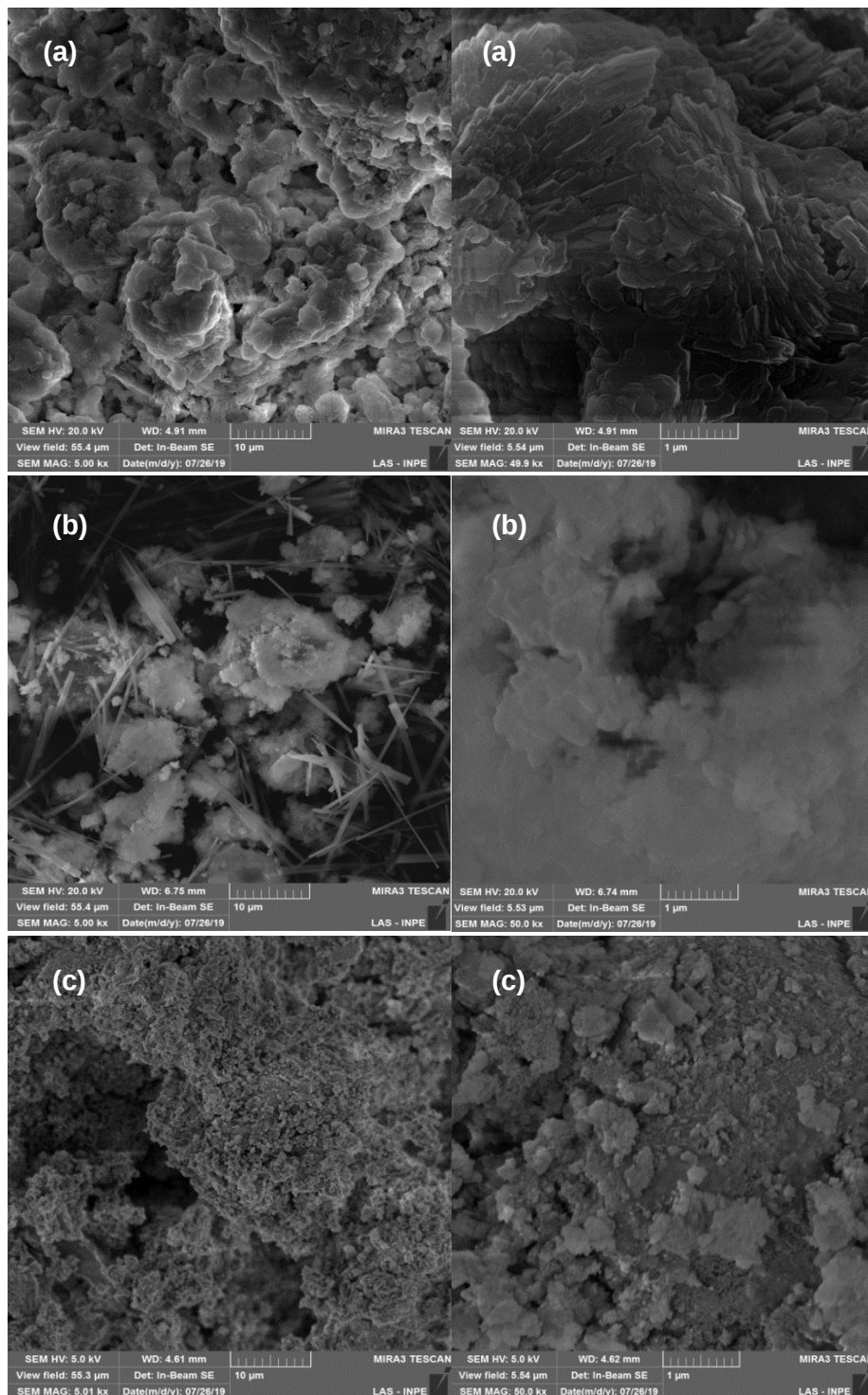
As hipóteses estatísticas foram avaliadas previamente à análise estatística. Os resultados indicaram que os dados apresentaram uma distribuição normal e, por meio da representação gráfica, a uniformidade foi verificada, sendo que nenhum dos pressupostos Anova foram violados.

Os resultados das análises *in vitro* foram agrupados em dois grupos distintos a fins de comparação, como descrito no Capítulo 3.3.1 na Figura 3, sendo um grupo de amostras G-NH<sub>4</sub>, G-K e G-Na cultivados com meio suplementado (MTS) e outro cultivados com o meio osteogênico (MTS-O).

### 4.1 Topografia superficial dos cimentos

As arquiteturas estruturais dos cimentos foram obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (MEV-FEG) e foi avaliada a morfologia da superfície de fratura. Foi possível constatar que no grupo G-K houve a formação de uma estrutura porosa, entretanto, quando observada em maior aumento foi possível notar a formação de placas em sua superfície. Em G-Na, observou-se a formação de estruturas com formas de agulhas e estrutura planares. Ademais, em G-NH<sub>4</sub> foi possível observar uma estrutura porosa em forma de esferolitas, semelhante a hidroxiapatita, sendo essa fase importante pois é possível correlacioná-la a formulação dos ossos. Os resultados podem ser observados na Figura 12.

Figura 12 – Arquitetura estrutural dos diferentes grupos de estudos



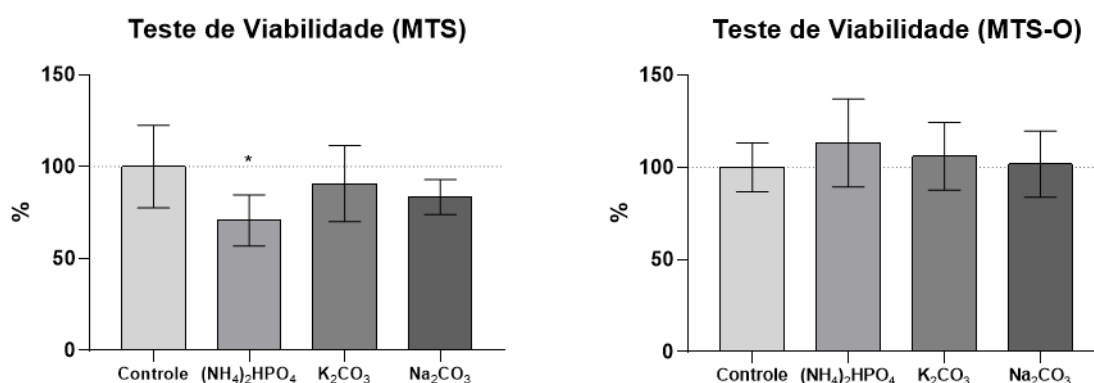
Legenda: Micrografia em MEV-FEG: (a) em G-K foi possível observar a formação de placas em aumento de 5x e 50x; (b) em G-Na observa-se a formação de agulhas em 5x e 50x de aumento; (c) em G-NH<sub>4</sub> pode-se observar uma superfície porosa em aumento de 5x e 50x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Os dados de viabilidade celular obtidos a partir da média dos valores de triplicata nos três diferentes grupos de amostras possibilitaram identificar que os materiais não foram citotóxicos, independente da solução ativadora utilizada. A partir das absorbâncias obtidas foi possível mensurar pela análise estatística descritiva, de forma proporcional ao grupo controle considerado 100%, que a viabilidade dos grupos exibiu viabilidade superior a 70%. Contudo, constatou-se que em células expostas ao MTS houve diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo S-NH<sub>4</sub> e o controle ( $p < 0,008$ ), sendo que o grupo do cimento exibiu viabilidade menor. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos em comparação ao controle nas células expostas ao MTS-O, como visto na Figura 13, de acordo com os resultados da análise dos testes por meio do Anova um fator e teste de comparações múltiplas de Dunnett.

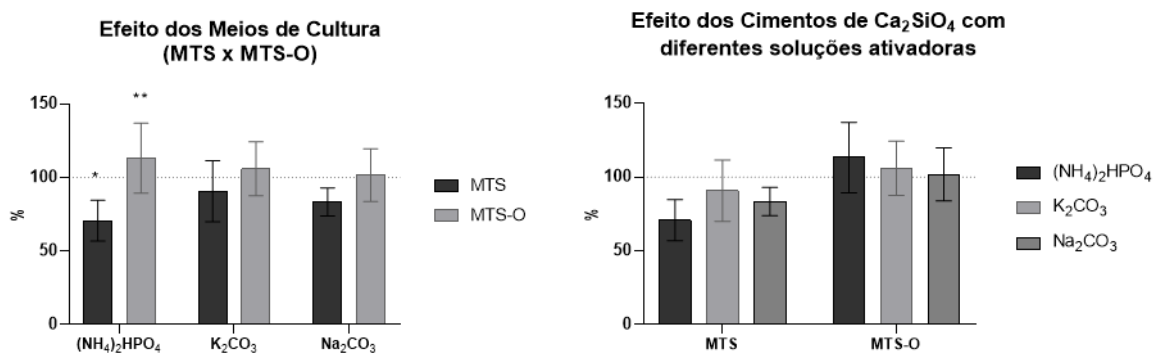
Figura 13 – Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) de viabilidade celular dos grupos de materiais submetidos a diferentes meios de cultura



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para finalizar a análise do comportamento dos cimentos e dos meios de cultura utilizados, os dados da viabilidade celular foram submetidos ao teste de variância Anova dois fatores. O intuito foi observar e comparar os meios MTS e MTS-O em relação aos cimentos e comparar os resultados dos cimentos entre si, constatou-se que houve diferença estatisticamente significativa no cimento do grupo G-NH<sub>4</sub> entre os meios de cultura nos quais foi submetido, MTS e MTS-O ( $p < 0,0001$ ). Porém, ao comparar os meios, MTS e MTS-O os resultados não demonstraram diferença estatística significativa ( $p > 0,5480$ ), como demonstrado na Figura 14.

Figura 14 – Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) da análise por Anova dois fatores para avaliar os cimentos entre si e comparação dos meios de cultura celular utilizados



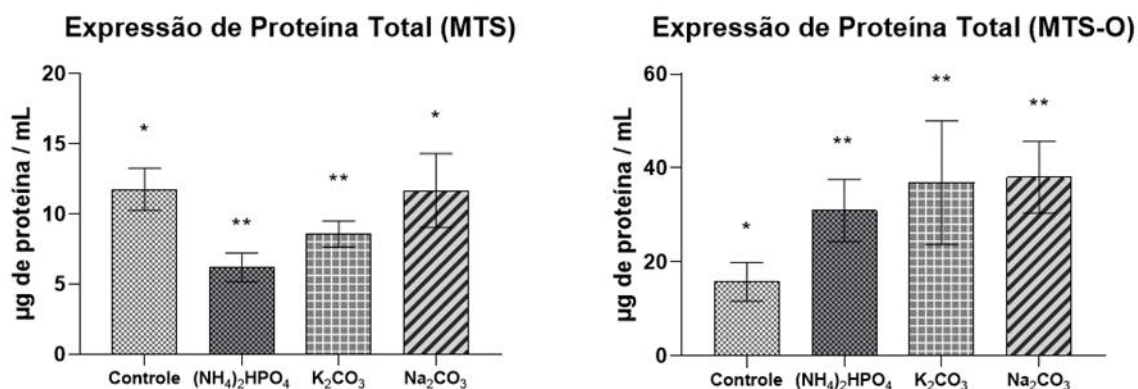
Fonte: Elaborado pelo autor.

Baseado na análise de variância dois fatores pode-se concluir que não existe uma interação significativa entre os cimentos e os meios de culturas no teste de viabilidade celular já que o valor de  $p$  foi igual a 0,755, apesar dos meios de cultura ter influenciado de maneira significativa em contato com G-NH<sub>4</sub>.

### 4.3 Conteúdo de proteína total

Os valores de proteína total foram expressos em  $\mu\text{g}$  de proteína / mL demonstrando a produção de proteína total pelas células cultivadas em contato com os materiais de estudo. Os dados foram analisados por meio do teste estatístico Anova um fator e teste de comparações múltiplas de Dunnett. No meio de cultura MTS os resultados demonstraram diferença estatística significativa entre o controle e os grupos S-NH<sub>4</sub> e S-K ( $p < 0,0001$ ), porém S-Na não demonstrou diferença significativa em relação ao controle ( $p > 0,9988$ ). Em relação ao MTS-O a expressão de proteína total evidenciou diferença estatística significativa em todos os cimentos comparado ao controle ( $p < 0,0001$ ), como mostra a Figura 15.

Figura 15 – Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) de conteúdo de proteína total dos grupos de materiais submetidos a diferentes meios de cultura

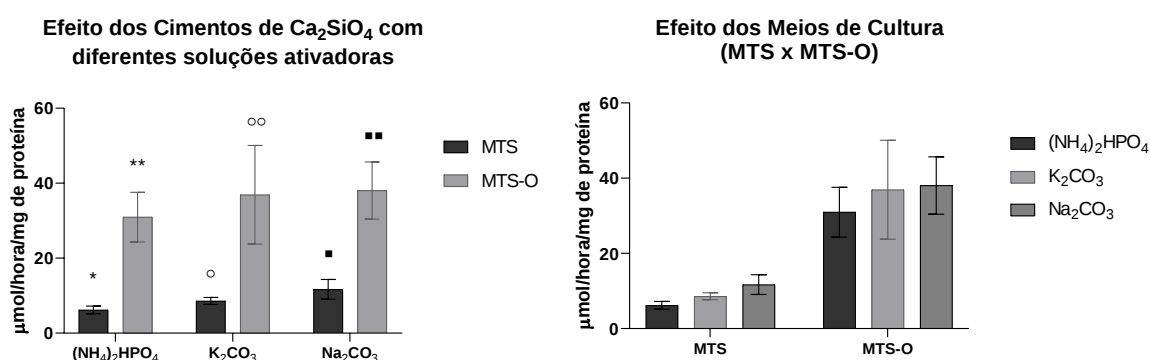


Legenda: O símbolo (\*) foi utilizado para representar graficamente as diferenças estatísticas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após análises realizadas por Anova, foi possível constatar dois fatores que houveram diferenciação estatística na produção de proteína total em relação aos meios de cultura celular utilizados de acordo com o teste de múltiplas comparações de Sidak. Foi possível observar que houve uma expressão de proteína total

significativamente maior em meio osteogênico (MTS-O) em comparação ao meio suplementado (MTS). Contudo, em relação aos cimentos testados não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de proteína total entre os cimentos testados submetidos em MTS ( $p > 0,4933$ ) e em MTS-O ( $p > 0,3765$ ), resultado obtido por meio do teste de múltiplas comparações de Tukey (Figura 16).

Figura 16 – Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) sobre a expressão de proteína total por meio de Anova dois fatores para análise dos materiais entre si e comparação dos meios de cultura celular utilizados



Legenda: Os símbolos utilizados para representar graficamente as diferenças estatísticas de cada cimento sendo (\*) para  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , (o) para  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e (■)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  submetidos aos diferentes meios de cultura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

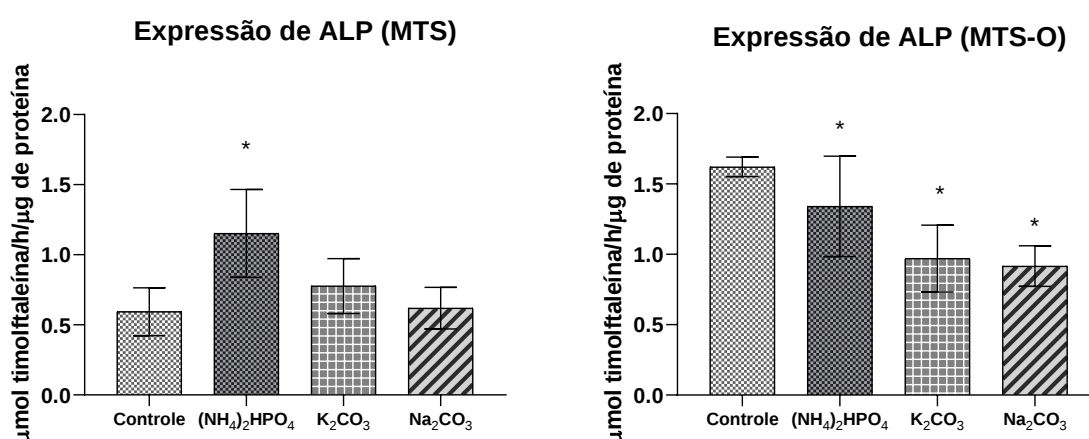
O valor de  $p$  igual a 0,7117 obtido na análise de variância dois fatores demonstra que o valor de proteína total não sofre a interferência dos dois fatores se analisados em conjunto, ou seja, não há correlação entre os fatores meio de cultura e cimentos.

#### 4.4 Atividade de fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) foi representada em  $\mu\text{mol timolftaleína} / \text{h} / \mu\text{g}$  de proteína demonstrando a produção de fosfatase alcalina baseada na proteína total.

As análises foram baseadas em Anova um fator e teste de comparações múltiplas de Dunnett que demonstraram diferenças estatísticas na atividade de fosfatase alcalina. Em MTS, foi observada diferença estatística significativa apenas entre em S-NH<sub>4</sub> e o controle ( $p < 0,0001$ ), observando resposta superior deste cimento em comparação ao controle. Com relação ao MTS-O pode-se observar diferença estatística significativa na ALP de todos cimentos testados, sendo os resultados inferiores ao controle com o valor de  $p$  menor que 0,0001 (Figura 17).

Figura 17 – Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) de fosfatase alcalina dos grupos de cimentos submetidos a diferentes meios de cultura

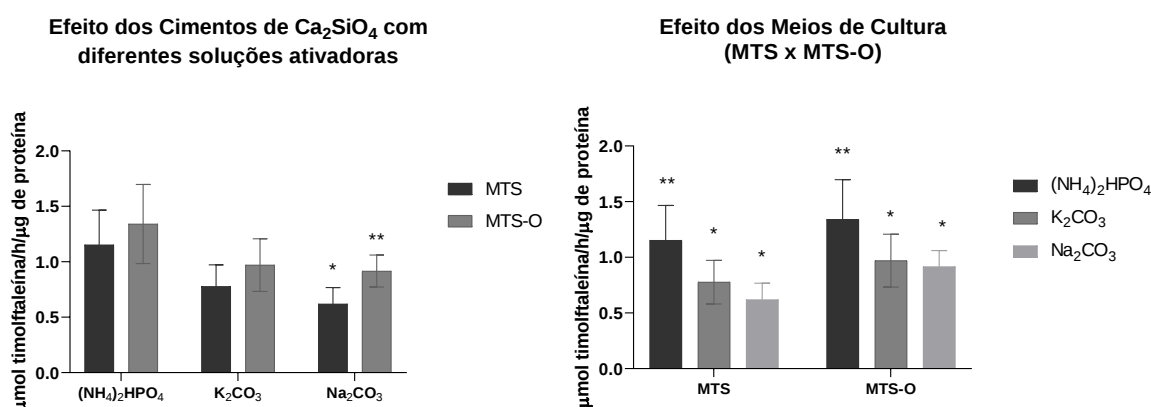


Legenda: O símbolo (\*) foi utilizado para representar graficamente as diferenças estatísticas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

A diferença na expressão de fosfatase alcalina entre os grupos é de extrema relevância, sendo assim, foi aplicado o teste Anova dois fatores, teste de comparações múltiplas de Tukey e Sidak que constatou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes cimentos e entre os meios de cultura utilizados. Quando submetidos à diferentes meios de cultura, MTS e MTS-O, apenas G-Na revelou diferença estatística significativa entre os diferentes meios de cultura ( $p < 0,0277$ ). Em relação a expressão de fosfatase alcalina relacionada aos cimentos, foi possível verificar que em MTS houve diferença estatística significativa entre S-NH<sub>4</sub> e S-K ( $p < 0,0035$ ) e entre S-NH<sub>4</sub>

e S-Na ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, entre S-K e S-Na não foram observadas diferenças estatísticas significantes ( $p > 0,3316$ ). O mesmo comportamento observado em MTS ocorreu em MTS-O, com diferença estatística significativa entre O-NH<sub>4</sub> e O-K ( $p < 0,0039$ ) e entre O-NH<sub>4</sub> e O-Na ( $p < 0,0009$ ), e sem diferenças significativas entre O-K e O-Na ( $p > 0,8769$ ) como visto na Figura 18.

Figura 18 – Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) de expressão de fosfatase alcalina para análise dos materiais entre si e comparação dos meios de cultura celular utilizados



Legenda: O símbolo (\*) foi utilizado para representar graficamente as diferenças estatísticas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

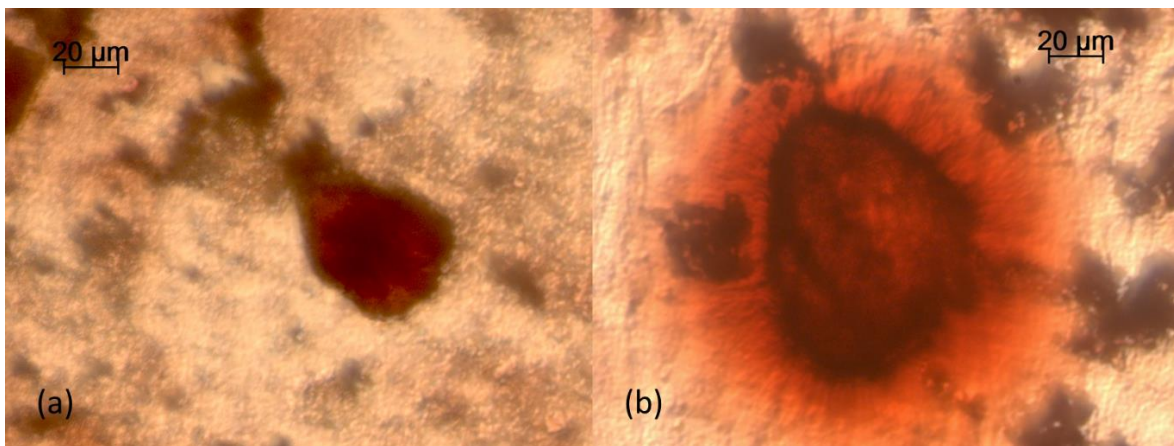
O valor de  $p$  igual a 0,7355 obtido na análise de variância dois fatores demonstra que a expressão de fosfatase alcalina não sofre a interferência dos dois fatores se analisados em conjunto, ou seja, não há interação significativa entre os fatores.

#### 4.5 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização

Por meio do corante de Alizarina S 2% foi possível observar a formação de

nódulos de mineralização tanto nos poços controles quanto nos poços contendo os materiais, independente do meio de cultura, meio suplementado (MTS) ou meio osteogênico (MTS-O), confirmando a diferenciação celular das células mesenquimais. As fotomicrografias dos nódulos foram obtidas do fundo do poço (Figuras 19 e 20).

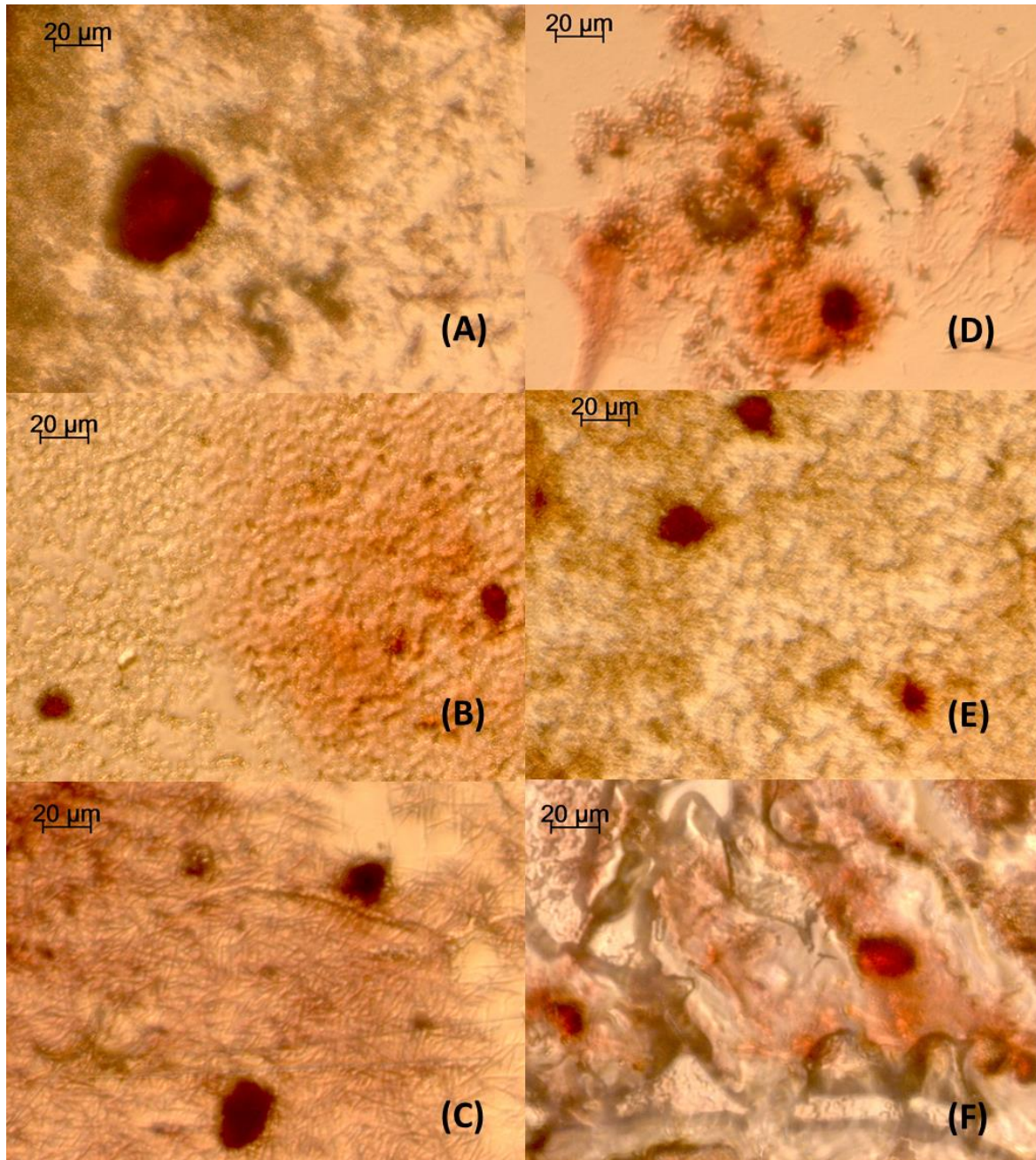
Figura 19 – Fotomicrografias representativas dos nódulos



Legenda: a) nódulo de mineralização formado em fundo de poço controle (somente células) em meio suplementado; b) nódulo de mineralização formado em fundo de poço controle (somente células) em meio osteogênico.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Fotomicrografias representativas dos nódulos de mineralização corados por Alizarina S 2% nos poços de células em contato com cada cimento, com os diferentes meios de cultura, em aumento de 40x

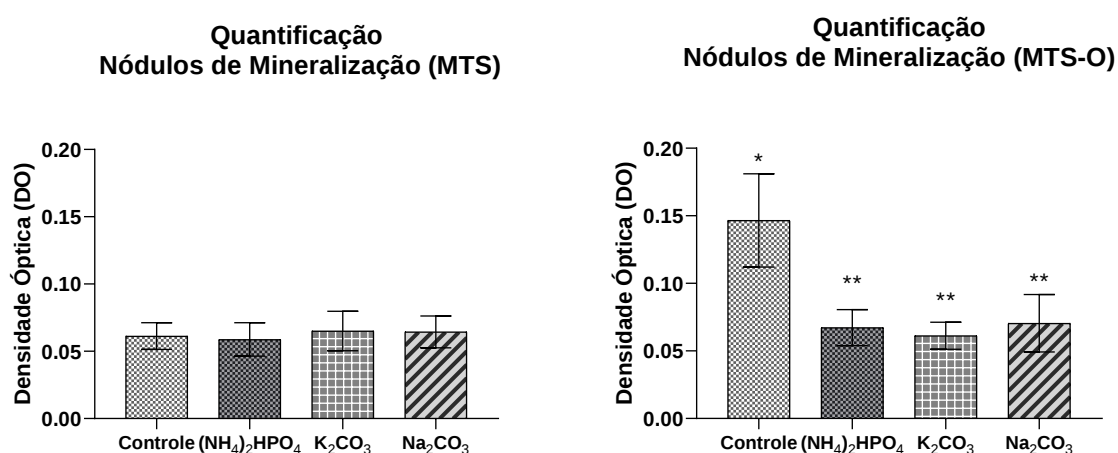


Legenda: a) nódulo de mineralização formado em fundo de poço com meio suplementado (S-NH<sub>4</sub>); b) nódulo de mineralização formado em fundo de poço com meio suplementado (S-K); c) nódulo de mineralização formado em fundo de poço com meio suplementado (S-Na); d) nódulo de mineralização formado em fundo de poço em meio osteogênico (O-NH<sub>4</sub>); e) nódulo de mineralização formado em fundo de poço em meio osteogênico (O-K); f) nódulo de mineralização formado em fundo de poço em meio osteogênico (O-Na).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 21 mostra os dados obtidos após a quantificação dos nódulos, na qual é possível observar que não há diferença estatisticamente significativa dos nódulos quantificados no poço controle em comparação aos poços com os cimentos em MTS ( $p > 0,3917$ ). No entanto, em MTS-O a densidade óptica obtida foi superior no grupo controle e houve diferença estatística entre os grupos dos cimentos em comparação a ele ( $p < 0,001$ ). Os dados foram obtidos a partir do teste Anova um fator e teste de comparações múltiplas de Dunnett.

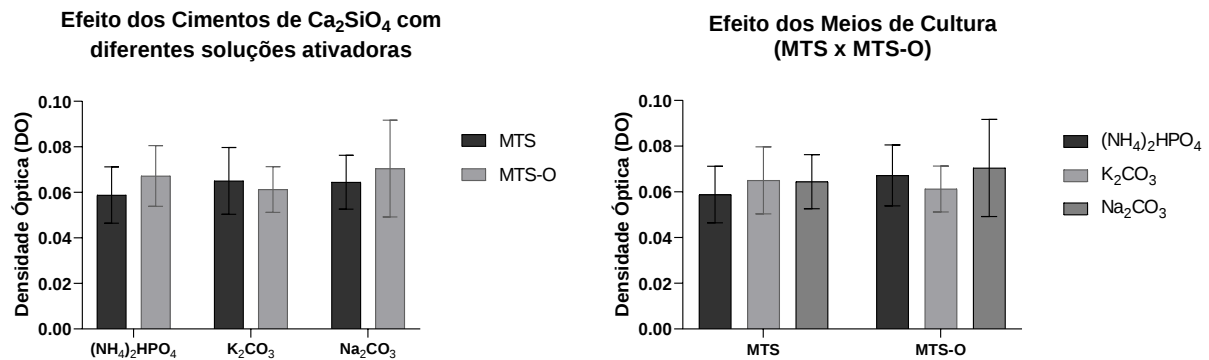
Figura 21 - Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) representativo da quantificação dos nódulos de mineralização



Legenda: O símbolo (\*) foi utilizado para representar graficamente as diferenças estatísticas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação aos cimentos e aos meios utilizados não foi observada diferença estatística de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey e Sidak, sem interação significativa entre os fatores com valor de  $p$  igual a 0,0888 obtido na análise de variância dois fatores, como demonstrado na Figura 22.

Figura 22 - Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) representativo da quantificação dos nódulos de mineralização

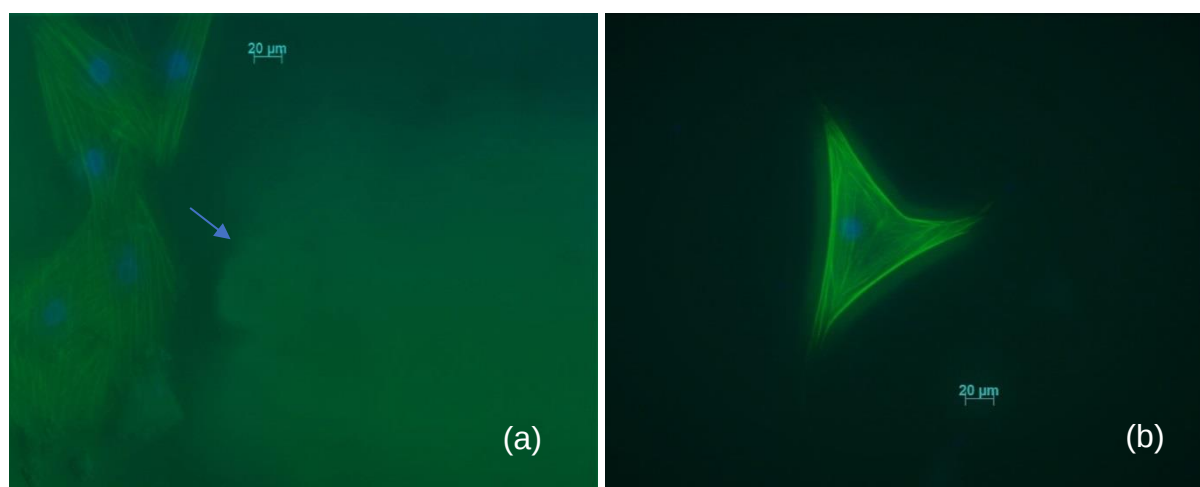


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6 Morfologia celular por fluorescência direta

As células observadas nos poços exibiam morfologia poligonal de forma integra, em sua maioria, evidenciam fibras do citoesqueleto de actina distribuídas pelo citoplasma corados com fluorocromo indicando a adesão celular Figura 23.

Figura 23 – Análise da morfologia celular por fluorescência



Legenda: Micrografia em microscópio de fluorescência: (a) Morfologia celular obtida no aumento de 20x de fundo de placa do grupo S-NH<sub>4</sub> e a seta indica a presença do corpo de prova ao lado das células representativa dos grupos; (b) Morfologia celular obtida no aumento de 20x de fundo de placa do grupo O-NH<sub>4</sub> representativa dos grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 4.7 Formação de biofilme

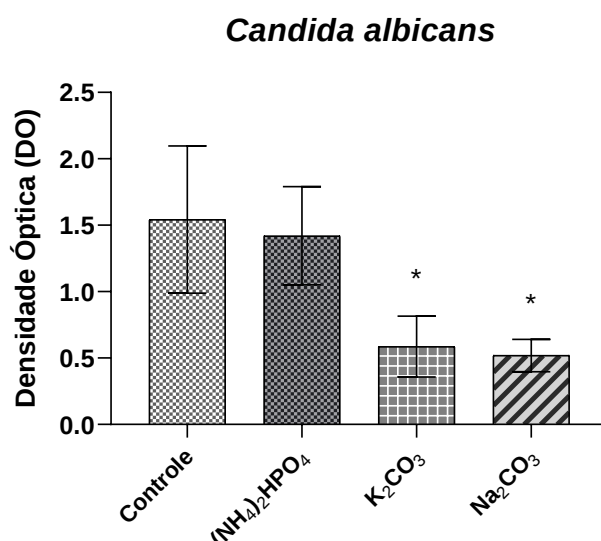
A viabilidade do biofilme monotípico de cada microrganismo foi analisada por Anova um fator para compará-los com o seu controle experimental, poço somente com microrganismo sem a presença de nenhuma amostra. Os resultados são descritos nos tópicos a seguir, representados em densidade óptica (DO) gerados por um leitor de microplaca que demonstra de maneira quantitativa o crescimento microbiano.

### 4.7.1 Biofilme monotípico de *C. albicans*

Os dados obtidos em densidade óptica (DO) foram submetidos ao teste ANOVA um fator com valor de  $p < 0,0001$ , o que indicou diferença estatística extremamente significativa. Diante do resultado, os grupos foram submetidos ao Teste

de comparações múltiplas de Dunnett para identificar a presença de diferença estatisticamente significativa entre os grupos em comparação ao controle. Como resultado constatou-se que não houve diferença estatística entre o controle e o grupo G-NH<sub>4</sub> ( $p > 0,7144$ ), porém foi identificada diferença significativa com G-K ( $p < 0,0001$ ) e G-Na ( $p < 0,0001$ ) comparados ao controle (Figura 24), sendo que os cimentos exibiram menor quantidade de viabilidade do biofilme.

Figura 24 – Gráfico com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) representativo da viabilidade de biofilme monotípico de *C. albicans*



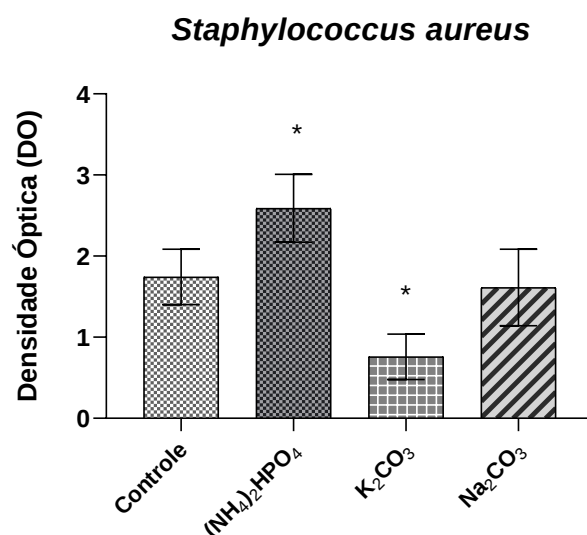
Legenda: O símbolo (\*) foi utilizado para representar graficamente as diferenças estatísticas.  
 Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.7.2 Biofilme monotípico de *S. aureus*

Assim como os dados obtidos em densidade óptica (DO) do biofilme de *C. albicans*, os dados da DO do biofilme monotípico de *S. aureus* também foram submetidos ao teste ANOVA um fator, com valor de  $p < 0,0001$ , o que indicou diferença estatística extremamente significativa. Diante do resultado, os valores de DO dos diferentes grupos foram expostos ao teste de comparações múltiplas de Dunnett para identificar a presença de diferença estatisticamente significativa entre os grupos

comparados ao controle. Os resultados expressaram diferença significativa entre o controle e os grupos G-NH<sub>4</sub> ( $p < 0,0001$ ), que demonstrou resultados superiores e G-K ( $p < 0,0001$ ), que obteve resultados inferiores ao controle. Todavia o grupo G-Na não demonstrou diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,7407$ ), como ilustrado na Figura 25.

Figura 25 – Gráfico com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) representativo da viabilidade de biofilme monotípico de *S. aureus*



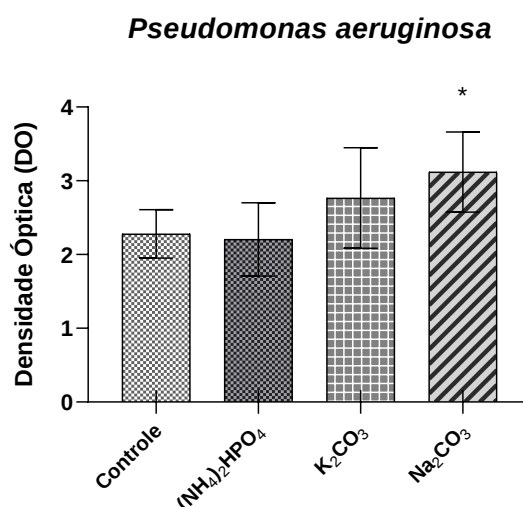
Legenda: O símbolo (\*) foi utilizado para representar graficamente as diferenças estatísticas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.7.3 Biofilme monotípico de *P. aeruginosa*

Os dados obtidos em densidade óptica (DO) do biofilme monotípico de *P. aeruginosa* foi analisado por meio do teste Anova um fator com valor de  $p < 0,004$  e complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett de comparações múltiplas, o que indicou a existência de diferença estatística significativa com valor de  $p$  de 0,0035 entre o controle e o grupo G-Na, com resultados superiores em relação

ao crescimento microbiano em contato com o cimento desse grupo. Entretanto, o crescimento microbiano do grupo G-NH<sub>4</sub> e G-K não diferiu do controle (Figura 26).

Figura 26 – Gráfico com os valores de média e desvio padrão (±) representativo da viabilidade de biofilme monotípico de *P. aeruginosa*



Legenda: O símbolo (\*) foi utilizado para representar graficamente as diferenças estatísticas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.7.4. Comparação de biofilmes monotípicos

Para uma análise detalhada da formação de biofilme em contato com os diferentes cimentos, os dados foram submetidos ao teste Anova dois fatores. Para comparar o efeito dos cimentos sob a DO do biofilme de diferentes espécies microbianas e comparar a DO dos biofilmes entre si, os dados foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey e Sidak.

O contato do cimento do grupo G-NH<sub>4</sub> com a espécie fúngica de *C. albicans* influenciou negativamente seu crescimento, a qual demonstrou resultados inferiores ao crescimento bacteriano, o que resultou em dados com diferença estatística significativa entre a *C. albicans* e *S. aureus* ( $p < 0,0001$ ) e *C. albicans* e *P. aeruginosa*

( $p < 0,0001$ ). Entretanto, não foi constatada diferença estatística significativa entre as espécies bacterianas *S. aureus* e *P. aeruginosa* ( $p > 0,2312$ ).

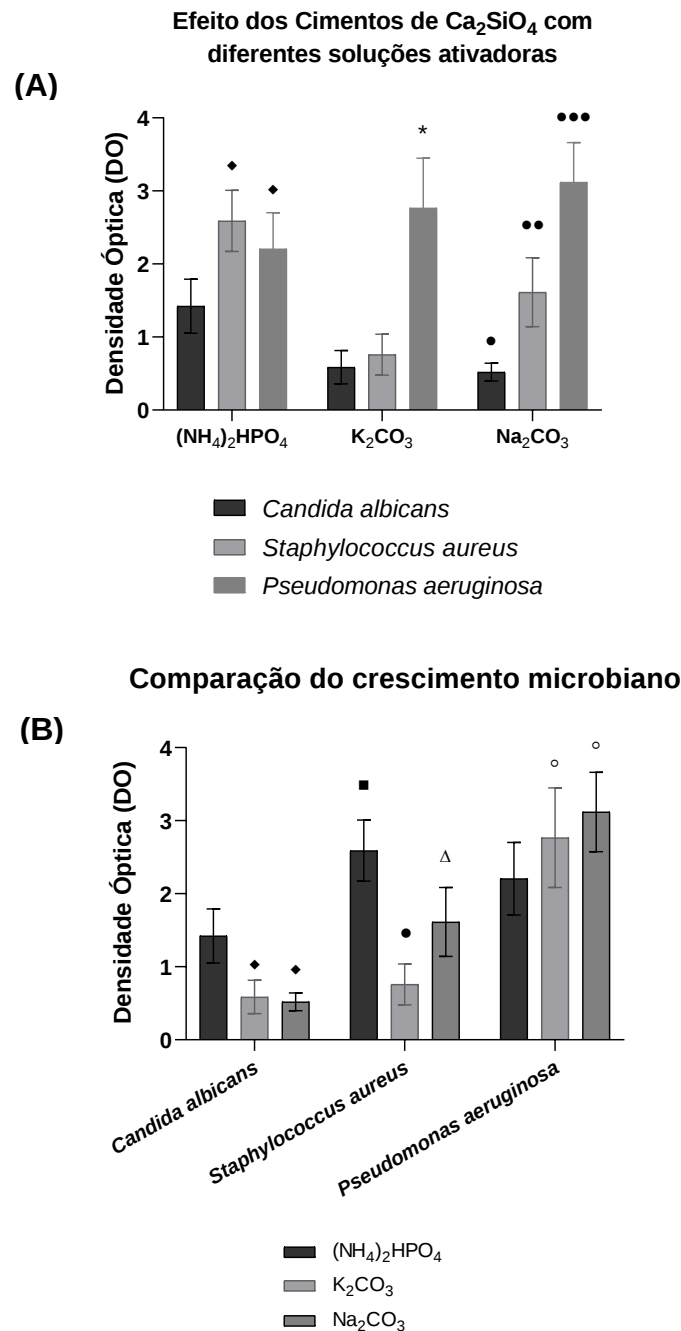
O contato com o cimento do grupo G-K influenciou o crescimento microbiano de *C. albicans* e *S. aureus*, que pôde ser constatado pela redução da formação de biofilme das espécies, sem diferenças estatísticas entre elas ( $p > 0,9607$ ). Todavia, é possível observar o crescimento significativo da *P. aeruginosa*, com diferença estatística significativa entre *C. albicans* ( $p < 0,0001$ ) e *S. aureus* ( $p < 0,0001$ ), com valores absolutos superiores.

Todos microrganismos em contato com grupo G-Na demonstraram diferença estatística significativa comparados entre si. A espécie *C. albicans* teve um crescimento de biofilme menor comparado aos outros microrganismos, com diferença estatística entre *S. aureus* ( $p < 0,0001$ ) e *P. aeruginosa* ( $p < 0,0001$ ). *S. aureus* teve seu crescimento de biofilme superior à espécie fúngica e inferior se comparado a bactéria gram-negativa, mas também, com diferença estatística entre as espécies *C. albicans* ( $p < 0,0001$ ) e *P. aeruginosa* ( $p < 0,0001$ ). *P. aeruginosa* demonstrou maior crescimento microbiano frente as outras espécies, com diferença significativa entre a espécie fúngica ( $p < 0,0001$ ) e entre a bactéria gram-positiva ( $p < 0,0001$ ).

Em relação a *C. albicans* foi observada diferença estatística entre o grupo G-NH<sub>4</sub> e G-Na ( $p < 0,0001$ ), entre G-NH<sub>4</sub> e G-K ( $p < 0,0001$ ), porém entre G-K e G-Na não houveram diferenças estatísticas significantes ( $p > 0,9130$ ), sendo também a DO desses grupos inferior ao grupo G-NH<sub>4</sub>. Quanto ao crescimento microbiano de *S. aureus* pôde-se observar diferença estatística entre todos os grupos de cimento ( $p < 0,0001$ ). Já o que se diz respeito a *P. aeruginosa*, houve diferença estatística entre o grupo G-NH<sub>4</sub> e G-Na ( $p < 0,0068$ ), entre G-NH<sub>4</sub> e G-K ( $p < 0,0001$ ), porém entre G-K e G-Na não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,1284$ ).

Os resultados podem ser observados na Figura 27.

Figura 27 – Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) representativo da viabilidade dos biofilmes monotípicos de *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em contato com os diferentes cimentos



Legenda: (A) comparação entre diferentes microrganismos em contato com um determinado grupo de cimento; (B) comparação do crescimento de um dado microrganismo entre diferentes cimentos. Os símbolos utilizados para representar graficamente as diferenças estatísticas de cada microrganismo sendo (•) para *C. albicans*, (■, • e  $\Delta$ ) para *S. aureus* e (○) *P. aeruginosa*, submetidos aos diferentes meios de cultura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O  $p$ -valor para a interação entre os cimentos e os microrganismos foi de 0.0001, sendo assim, pôde-se concluir que existe uma interação significativa entre cimentos e microrganismos.

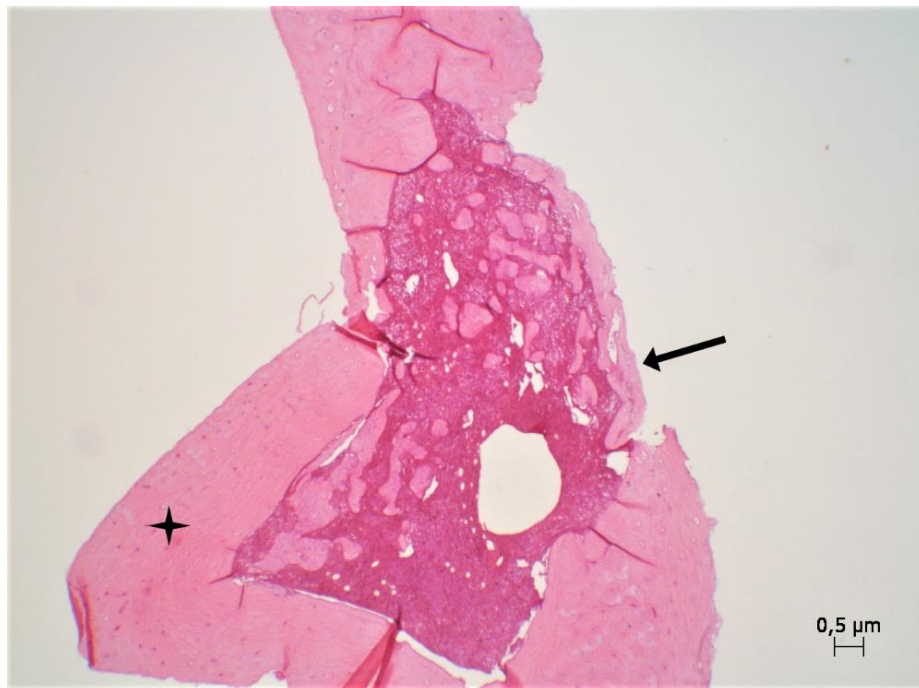
#### **4.8 Análises *in vivo***

Os resultados apresentados descrevem as análises *in vivo* realizadas, que compreendem análises da qualidade do tecido neoformado e quantidade de neoformação óssea por análises histológicas e a resistência do reparo ósseo por análise da biomecânica.

##### **4.8.1 Análise histológica**

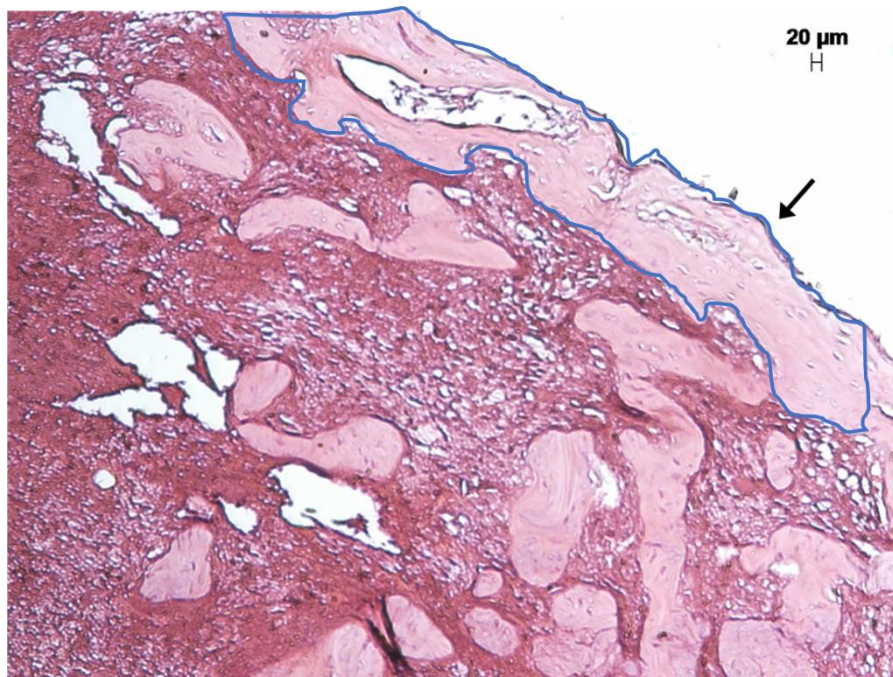
Por meio de análises histológicas, observadas em microscópio óptico (MO), foi possível verificar a neoformação óssea na interface com os diferentes materiais, sendo que este tecido exibia aspecto de normalidade como verificado nas Figuras 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35. Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, constatando-se a neoformação óssea e o arranjo das trabéculas ósseas imaturas constituídas por osteoblastos na periferia e osteócitos preenchendo as lacunas. Notou-se também a presença de linhas reversas que refletem a atividade de remodelação óssea.

Figura 28 – Fotomicrografia em MO observada no grupo coágulo



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: Visão panorâmica da tíbia de rato (+) com ponte óssea neoformada (➡) na região do defeito ósseo.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

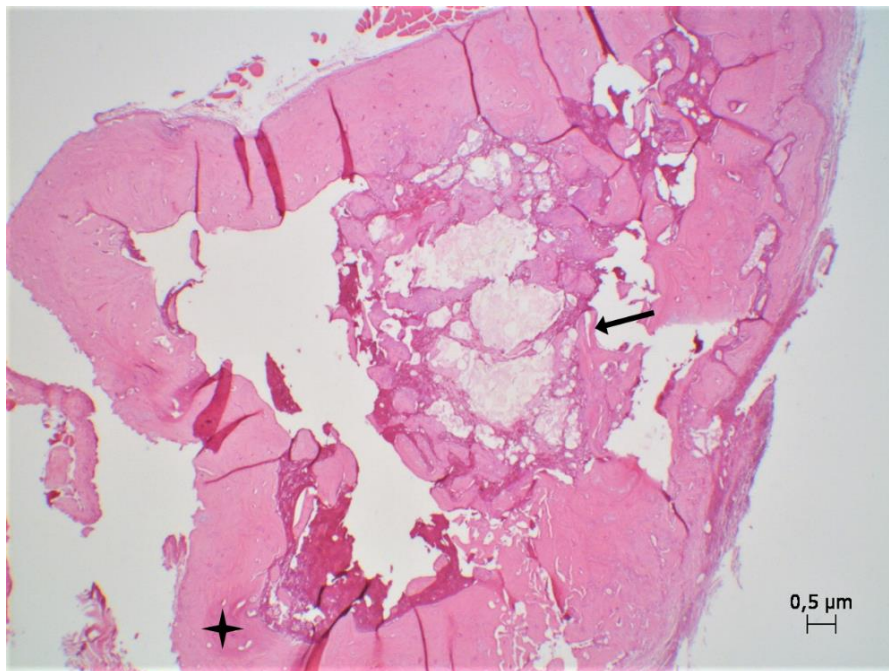
Figura 29 – Fotomicrografia em MO observada no grupo coágulo ampliado 10x



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: tecido neoformado (➡) na região do defeito ósseo.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

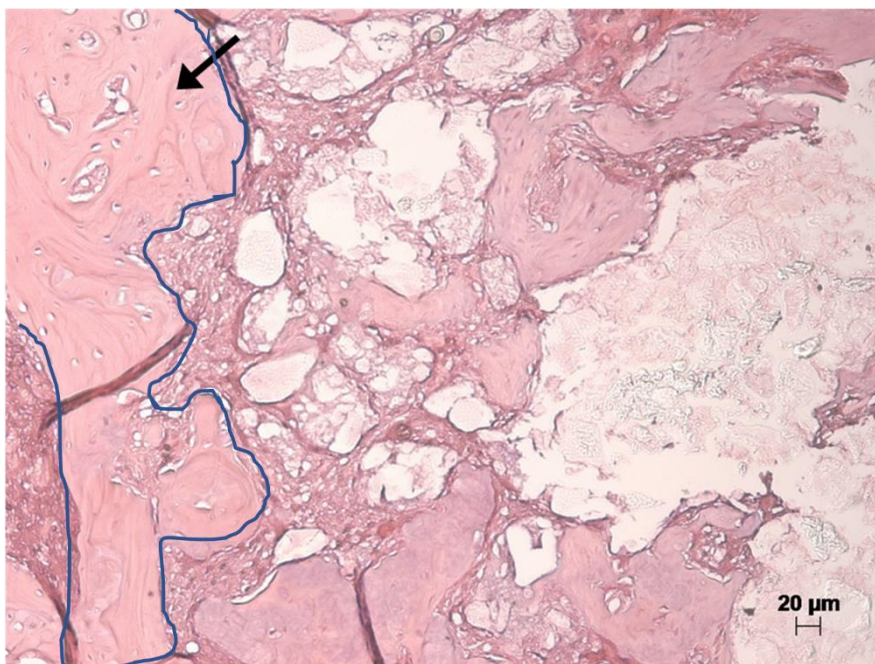


Figura 32 – Fotomicrografia em MO observada no grupo G-NH<sub>4</sub>



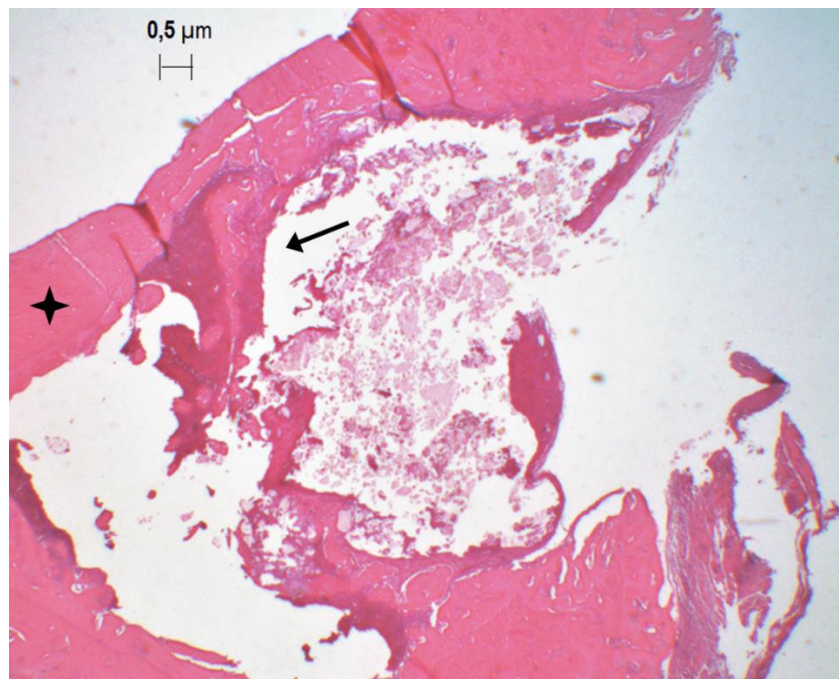
Legenda: Micrografia em microscópio óptico: Visão panorâmica da tíbia de (✦) com ponte óssea neoformada (➡) na região do defeito ósseo.  
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 – Fotomicrografia em MO observada no grupo G- NH<sub>4</sub> ampliado em 10x



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: tecido neoformado (➡) na região do defeito ósseo.  
 Fonte: Elaborado pelo autor.

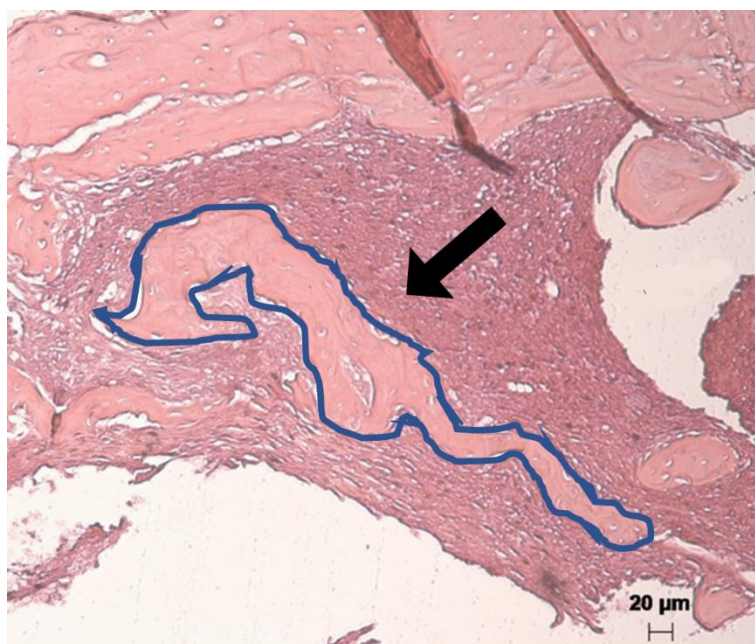
Figura 34 – Fotomicrografia em MO observada no grupo G-Na



Legenda: Micrografia em microscópio óptico: Visão panorâmica da tíbia de rato (★) com ponte óssea neoformada (➡) na região do defeito ósseo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 – Fotomicrografia em MO observada no grupo G-Na ampliado em 10x



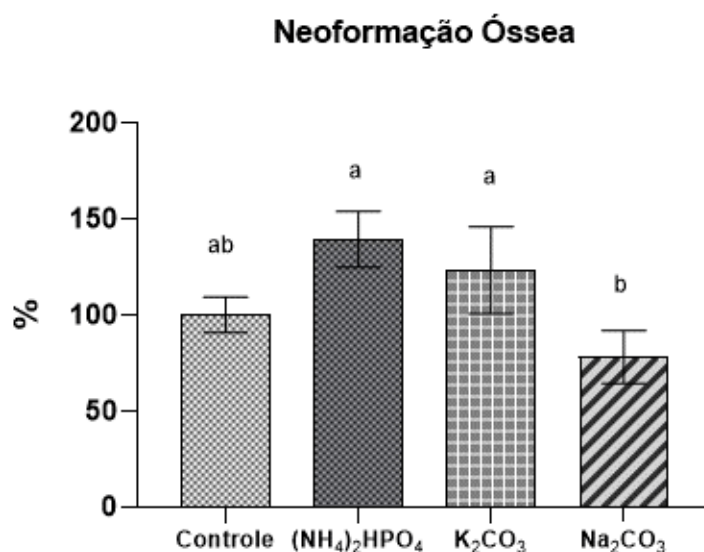
Legenda: Micrografia em microscópio óptico: tecido neoformado (➡) na região do defeito ósseo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.8.2 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada no tecido neoformado que proliferou na região do defeito crítico em que foram inseridos os cimentos com as diferentes soluções ativadoras estudadas. Os resultados mostraram que a neoformação óssea apresentou diferença estatística significativa no grupo G-Na com valores de neoformação óssea inferior aos grupos estudados G-NH<sub>4</sub> e G-K ( $p < 0,006$ ), porém em comparação ao controle não demonstrou diferença significativas ( $p > 0,3856$ ), G-NH<sub>4</sub> e G-K não diferiram entre si ( $p > 0,6219$ ) nem do controle ( $p > 0,1998$ ). Os dados são observados na Figura 36.

Figura 36 – Gráfico quantitativo da neoformação óssea com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ )



Legenda: Os símbolos (a) e (b) foram utilizados para representar graficamente as diferenças estatísticas.

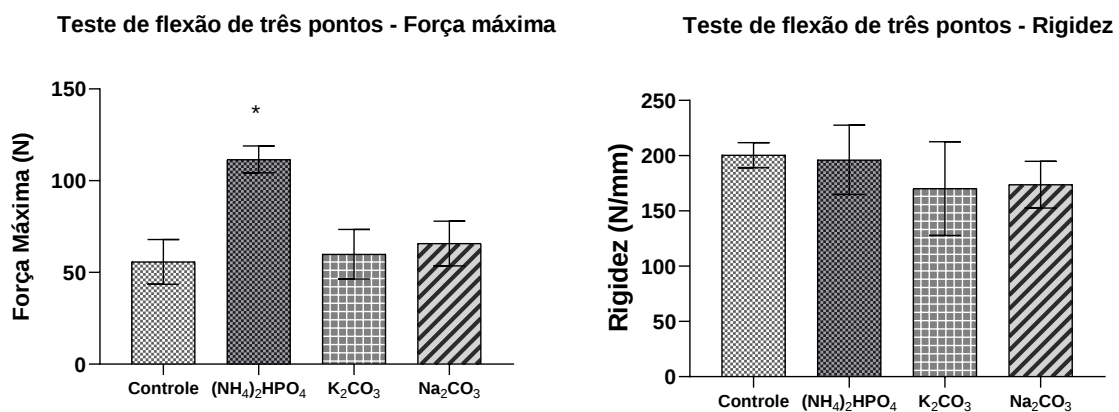
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.8.3 Análise da biomecânica

Foram avaliados por meio do teste de flexão de três pontos, as forças de resistência à flexão (carga/Newton) e a rigidez (N/mm). Os dados obtidos buscaram

avaliar as características teciduais do osso neoformado e foram submetidos ao teste estatístico Anova 1 fator e pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Em relação a força máxima houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo G-NH<sub>4</sub> e os demais grupos ( $p < 0,0001$ ), porém os grupos controle, G-K e G-Na não diferiram entre si ( $p > 0,8873$ ). Os valores de rigidez não apresentaram diferença estatística entre todos os grupos ( $p > 0,4470$ ) como apresentado na Figura 37.

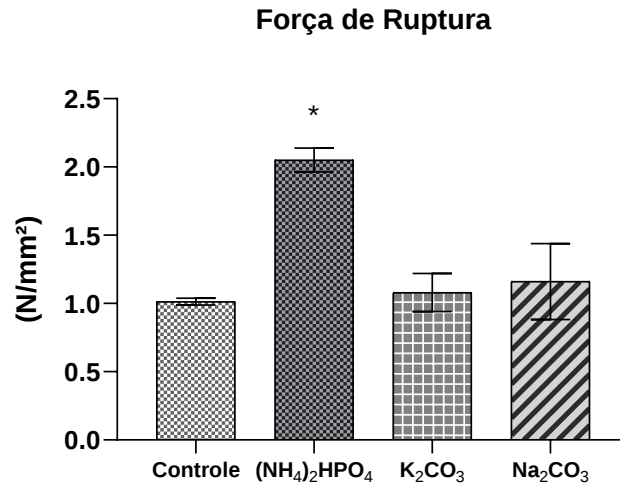
Figura 37 – Gráficos com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) da avaliação da força máxima e rigidez do osso neoformado nos defeitos ósseos



Legenda: O símbolo (\*) foi utilizado para representar graficamente as diferenças estatísticas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi também avaliada a força de ruptura do osso neoformado, no qual se relacionou a força máxima obtida com os dados intrínsecos do osso como seu diâmetro e largura. Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo G-NH<sub>4</sub> e os demais grupos ( $p < 0,0002$ ), porém os grupos controle, G-K e G-Na não diferiram entre si ( $p > 0,8605$ ), como demonstrado na Figura 38.

Figura 38 – Força de ruptura média das tíbias após o teste de flexão de 3 pontos óssea com os valores de média e desvio padrão ( $\pm$ )



Legenda: O símbolo (\*) foi utilizado para representar graficamente as diferenças estatísticas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5 DISCUSSÃO

Cimentos compostos de silicato de cálcio são propostos para diversas situações clínicas, principalmente em aplicações odontológicas, como preenchimento radicular, reparo de perfurações radiculares, capeamento pulpar e apicogênese (Gandolfi et al., 2010). De acordo com Gandolfi et al. (2010) os cimentos de silicato de cálcio podem possuir propriedades de bioatividade quando imersos em soluções à base de fosfato, como fluidos corporais, e são capazes de induzir a formação de apatita na superfície, com a aplicabilidade promissora para a engenharia de tecidos.

A metodologia para confecção de cimentos e cerâmicas incorporados com sais orgânicos vêm sendo desenvolvida também por outros autores (Irie 2007; Ding et al. 2009; Jones, 2012; Müller et al.; 2016). Neste presente estudo, diferentes soluções ativadoras de fosfato e carbonato, foram utilizadas para a confecção de cimentos a base de silicato de cálcio, visando verificar sua influência na diferenciação de células mesenquimais e na neoformação óssea de defeitos críticos em tíbias de ratos. A incorporação de fosfatos nos cimentos teve como objetivo fornecer evidências preditivas de biocompatibilidade da formulação e verificar as melhorias proporcionadas pela solução ativadora na neoformação óssea como observado por Irie (2017) que demonstraram resultados promissores quando utilizou sal de fosfato de amônio dibásico em cimento ósseo a base de  $\alpha$ -wollastonita. Foi desenvolvida neste presente estudo, uma rota de produção de silicato de cálcio pura e com formulações de soluções ativadoras otimizadas, alterando os sais das soluções ativadoras, baseado em Ding et al. (2009). Essa alteração resultará na mudança do cátion do tampão da solução de fosfato, causando uma mudança das ligações químicas desse material, que podem modificar as propriedades mecânicas e biológicas desses materiais.

Os sais de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) foram utilizados com base na composição de biovidros, como o *Bioglass 45S5®*, já que o sódio e potássio existem em suas formulações (Bellucci et al., 2010; Bellucci et al., 2014; Lopes et al., 2016; Moazzami et al., 2016; Cozza et al., 2018; Villalpando-Reyna et al., 2019). Sendo eles, acrescentados aos cimentos a fim de otimizar suas

propriedades mecânicas e biológicas.

Hu et al. (2016) desenvolveram uma pesquisa semelhante ao presente estudo, com objetivo de melhorar o desempenho biológico, a capacidade osteogênica e as propriedades físicas da superfície sob a influência da liberação desses íons, como contribuição de cátions na formulação de silicatos de cálcio. E concluíram que a utilização dos íons no material sintetizado por eles foi crucial, influenciando a diferenciação celular e na indução da mineralização óssea.

Segundo Müller et al. (2016), as macromoléculas fisiológicas exibem importantes funções na mineralização óssea. Principalmente as macromoléculas orgânicas foram consideradas como reguladoras desses processos, já que são capazes de alterar as forças eletrostáticas da superfície, a carga e por consequência sua interação celular e os produtos da reação com substratos orgânicos *in vivo* e *in vitro*, influenciando o processo de diferenciação de osteoblastos e por consequência a neoformação óssea. Dessa forma, considerando a literatura, o cátion oriundo da base presente na estrutura do material, alterando sua composição e, por consequência, influenciando as propriedades mecânicas e biológicas deste material é o ponto relevante da metodologia (Jones, 2012).

A topografia dos materiais é uma característica relevante para suas interações, principalmente, no que se refere a regeneração tecidual devido aos processos biológicos que ocorrem após serem inseridas em um tecido biológico (Wang et al., 2019). A superfície também pode ser correlacionada com a interação entre o biomaterial e as moléculas presentes no meio, Limo et al. (2018) afirma que um fator que altera a interação entre biomoléculas e a sílica ( $\text{SiO}_2$ ) está correlacionado a carga presente em virtude da superfície do material, e podem interagir com proteínas, ácidos nucleicos e até mesmo microrganismos (Cerruti, Sahai, 2006).

Estruturalmente foi possível comprovar observando a topografia da superfície dos cimentos ao MEV, que as diferentes composições resultaram em diferentes arquiteturas estruturais, como placas observadas em G-K, estruturas pontiagudas e fosfatos em G-Na, e esferolitas em G-NH<sub>4</sub>. De acordo com Nothdurft et al. (2014) uma das características importantes para a qualidade de implantes é a topografia da superfície do biomaterial que devem permitir a rápida proliferação e fixação celular,

entretanto deve fornecer um comportamento de redução do biofilme e adesão bacteriana. Wang et al. (2019) afirmaram que o enxerto ósseo biomimético com estrutura trabecular e superfície nanoestruturada tem potencial para aplicações clínicas na regeneração de defeitos ósseos devido sua estrutura porosa, o que concorda com os achados *in vitro* e *in vivo* deste presente estudo, já que o cimento com superfície mais porosa, NH<sub>4</sub>, promoveu resultados mais significativos e a superfície planar, G-Na, não demonstrou resultados promissores.

Os cimentos a base de wollastonita (silicatos de cálcio) podem ser utilizados em tratamentos de reparo ósseo, tanto para aplicações médicas quanto odontológicas (Carolina et al., 2018; Motisuke et al., 2014; Pan et al., 2016; Shao et al., 2018; Wu et al., 2017), devido à sua bioatividade óssea relatada previamente (Chen, Thouas, 2011; Ding et al., 2009; Faure et al., 2015; Liu et al., 2016; Pattanayak, 2009).

Além disso, Wu e Chang (2013) relataram que, em fluídos corporais simulados os silicatos e seus produtos iônicos têm demonstrado aumentar a proliferação, a diferenciação osteogênica e a expressão gênica de células-tronco. Este fato nos fez pensar na utilização de dois diferentes meios de cultura celular para crescimento, proliferação e diferenciação celular. A hipótese testada se baseou na ideia de que um material indutor de neoformação óssea, no caso os cimentos com diferentes soluções ativadoras, possa proporcionar por si só a diferenciação das células mesenquimais em células ósseas, bem como, influenciar de maneira positiva sua proliferação. Dessa forma, para responder esse questionamento, os diferentes cimentos foram expostos a diferentes meios de cultura, sendo um meio básico somente suplementado e outro meio osteogênico, isto é, enriquecido com sais que são importantes indutores de diferenciação celular.

As células de origem mesenquimal em um ciclo normal de vida, após o contato com o biomaterial se aderem à sua superfície, proliferam e posteriormente iniciam o processo de diferenciação (Sista et al., 2011; De Andrade et al., 2015). Neste estudo, o teste de viabilidade celular demonstrou quantas células permaneceram vivas após o contato com os diferentes materiais, esclarecendo se o material em contato foi citotóxico ou não. Neste teste, o alto percentual de células não é sinônimo de que as células se diferenciaram em osteoblasto, apenas apontam a quantidade viável. Os resultados obtidos foram adequados, uma vez que, tanto em

MTS quanto MTS-O as células apresentaram viabilidade superior a 70% e em sua maioria semelhante ao poço controle, com exceção o G-NH<sub>4</sub> que teve diferença estatística significativa, apresentando viabilidade inferior ao controle. Esse resultado de viabilidade celular é satisfatório de acordo com a ISO 9001/2000, que preconiza que a viabilidade celular seja superior a 70%.

Após a confirmação da viabilidade celular foi quantificada a produção de proteína total produzida pelas células, o que evidencia seu processo de metabolização, porém são identificadas neste teste diversas proteínas como de adesão, proliferação, diferenciação e apoptose (Lowry et al., 1951). A partir dos resultados, foi possível observar que em MTS-O a quantidade de proteína produzida nos grupos com cimento apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Em MTS tanto G-NH<sub>4</sub> quanto G-K produziram uma quantidade inferior significativa ao controle. Esses resultados corroboram com os resultados de viabilidade celular, evidenciando a viabilidade e sua capacidade de metabolização proteica.

Entretanto, para caracterizar um biomaterial ideal para regeneração óssea é necessário que em contato com o biomaterial a célula se diferencie em osteoblasto, e para tal, ela expressa fosfatase alcalina. Assim, é preciso identificar a partir da produção de proteína total, o quanto de proteínas está relacionado ao processo de diferenciação. A maior expressão de fosfatase alcalina foi estatisticamente significativa em G-NH<sub>4</sub> em MTS, comprovando que a diferenciação celular foi maior com a utilização desse cimento. A expressão de fosfatase alcalina no meio osteogênico, foi estatisticamente menor nos grupos com cimento, que corrobora com os resultados do meio MTS o qual indicou que o material por si só foi responsável pela diferenciação celular. O cimento G-NH<sub>4</sub> em MTS exibiu os menores valores de viabilidade e produção de proteína total, porém apresentou alta expressão de fosfatase, comprovando que quando em contato com este cimento, as células iniciaram precocemente seu processo de diferenciação celular, o qual é representado por meio da maior expressão de fosfatase alcalina. A atividade da ALP é um indicador precoce da diferenciação dos osteoblastos e sua expressão é considerada um parâmetro funcional, in vitro, refletindo o progresso da diferenciação celular (Sista et al., 2011).

A mineralização da matriz é visualizada por Alizarina, pois segundo Landis (1996) e Hoemann et al. (2009) a fase mineral depositada nas culturas de osteoblastos geralmente é uma hidroxiapatita que é substituída por fosfato de cálcio observado em ossos, cartilagens e dentes. Assim, os nódulos de mineralização são considerados o produto final da diferenciação celular pois refletem a diferenciação celular (Hoemann et al., 2009), os quais foram encontrados em todos os poços, tanto no controle como nos poços com os cimentos, sem diferença estatisticamente significativa em MTS e em MTS-O. Entretanto em MTS-O foi possível constatar diferença estatisticamente significativa no poço controle em relação aos poços em contato com os grupos de cimentos, sendo que foi quantificado um valor superior aos cimentos. Contudo, contrapondo-se ao estudo de De Andrade et al. (2015) também utilizou os nódulos de mineralização como indicador de diferenciação celular, e constatou que a superfície material não a formação dos nódulos de mineralização. Também, não foram encontrados valores proporcionais de ALP em relação aos níveis de mineralização observados, assim como, Hoemann et al. (2009).

Em relação a morfologia celular, foram observadas células espiçadas em todos os grupos, exibindo morfologia poligonal estrelada e espalhamento multidirecional, com fibras de actina do citoesqueleto distribuídas no citoplasma estendendo-se aos limites celulares como também observado em estudos prévios (Sista et al., 2011; De Andrade et al., 2015).

Considerando todos os resultados, observa-se que não houve diferença estatística entre os resultados obtidos entre MTS e MTS-O, logo é possível afirmar que mesmo sem indutor de diferenciação osteoblástica os resultados obtidos em MTS foram equivalentes a MTS-O, nos testes *in vitro*. Apesar da expressão de proteínas totais terem valores absolutos significativamente superior em MTS-O do que em MTS a expressão de fosfatase alcalina demonstrou valores absolutos bem próximos em ambos os meios, apenas G-Na teve diferença significativa se comparado. O mesmo observou-se na análise de mineralização. Logo, é possível afirmar que o material foi um indutor de diferenciação.

Embora os cimentos tenham apresentado efeito positivo no comportamento e diferenciação celular, é necessário avaliar a influência destes na formação de biofilmes. A partir da capacidade de formação de biofilme dos microrganismos em

contato com os cimentos foi possível avaliar a susceptibilidade de proliferação de microrganismos. Ressalta-se que atualmente têm-se pesquisado sobre a capacidade antimicrobiana intrínseca de biomateriais para evitar a associação de antibióticos, que podem contribuir com a resistência bacteriana (Mehrijou et al., 2019), uma vez que as interações moleculares e físicas que regem a adesão bacteriana a biomateriais não estão completamente elucidadas (Katsikogianni, Missirlis, 2004). Turlybekuly et al. (2019) avaliaram a atividade antimicrobiana em nano compósitos de hidroxiapatita em culturas de bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) e Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) após a alteração de cátions na formulação de seu material pelo método de disco-difusão em ágar para comprovar que os componentes do biomaterial poderiam ter propriedades antibacterianas por si só. Concluíram que as partículas nano estruturadas de ZnO presentes na composição de um material compósito à base de hidroxiapatita e alginato demonstraram ação antibacteriana pronunciada, e correlacionou a aderência de bactérias na superfície com a ligação eletroestática com a interação direta dos íons Zn com o microrganismo e a geração de ERO.

Por essa razão foram escolhidos diferentes microrganismos, com diferentes mecanismos de adesão e características estruturais, sendo um fungo, uma bactéria gram-positiva e uma bactéria gram-negativa para o desenvolvimento deste presente estudo.

Após os testes de formação de biofilme foi possível constatar que o biofilme de *C. albicans* foi aquele que exibiu diminuição significativa em todos os cimentos, por vezes com diferença estatística do grupo controle. Infecções por *C. albicans* são associadas à formação de biofilmes na superfície de biomateriais, sua colonização se dá a partir de células de levedura que se aderem a superfícies, a formação de biofilme nesse caso é condicionada pelos fluidos biológicos do meio (Ramage et al., 2001). Dessa maneira, a composição do fluído, considerando a liberação dos íons da solução ativadora, contribuiu para alteração do pH de crescimento desses fungos e podem ter tornado o meio mais ácidos. O que concorda com os experimentos *in vitro* realizados com células, em que foi possível observar que a coloração dos meios de cultura se alterava em contato com o biomaterial, isso se deve ao *Phenol Red* substância presente nos meios, tanto MTS quando MTS-O, para controle de pH, sua

coloração mais alaranjada e menos rosada é o indicativo de um meio ácido.

Dessa forma, podemos concluir que o crescimento de *C. albicans*, bem como dos outros microrganismos, foram influenciados pela alteração de pH, mesmo que a alteração tenha sido diminuta, já que foi observado sua menor proliferação em contato com os cimentos. Isso porque para a virulência da espécie o pH é fundamental e influencia até sua morfologia, sendo que a acidez dificulta a formação de hifas, um dos seus importantes mecanismos de virulência (Vylkova et al., 2011). O que corrobora com os estudos de ElReash et al. (2019), que afirmaram que os cimentos de silicato de cálcio por si só desempenham atividade antimicrobiana em razão de seu pH, no caso a alcalinidade e a acidez afetam o crescimento microbiano, e entre os cimentos estudados por eles o cimento com menor potencial hidrogeniônico diminuiu significativamente o crescimento de *C. albicans* e também *S. aureus*. Yahia et al. (2017) obtiveram sucesso na formulação de nanopartículas de hidroxiapatita, para aplicação em cimentos ósseos, que demonstrou atividade antimicrobiana, principalmente em *C. albicans*.

Já os resultados de viabilidade de *S. aureus* demonstrou diferença estatística em G-K de maneira positiva já que a densidade ótica foi abaixo em relação aos outros cimentos e em G-NH<sub>4</sub> pôde-se observar um crescimento superior, com diferença estatística. *S. aureus* é capaz de aderir às superfícies dos biomateriais e formar biofilmes; relacionada a infecções pós implantes (Katsikogianni, Missirlis, 2004; Benito et al., 2016; Mello et al., 2019). É uma bactéria gram-positiva considerada o patógeno mais comum causador de infecções ósseas crônicas (Inzana et al., 2015).

Ao avaliar a formação do biofilme de *P. aeruginosa*, microrganismo gram-negativo, oportunista, com grande resistência antibiótica, considerado onipresente (Kim, Lee, 2016), apresentou alta DO em contato com os cimentos G-NH<sub>4</sub> e G-K. A *P. aeruginosa* é encontrada de forma recorrente em dispositivos médicos (Pang et al., 2019). Possui requisitos nutricionais mínimos, o que lhe permite sobreviver nos mais diversos ambientes, sendo especialmente conhecido por possuir um genoma caracteristicamente grande com vastas capacidades metabólicas, conseguindo se adaptar ao meio e desenvolver-se (Falkinham et al., 2015). Essa característica, confere à espécie um poderoso mecanismo de resistência, o que pode ser observado nos resultados já que teve uma acentuada capacidade de proliferação em diferentes

superfícies e cimentos.

O processo de adesão celular de microrganismos em superfícies de materiais médico-odontológico pode ser influenciado por diversos fatores como as propriedades bacterianas e as características da superfície do material, além dos fatores ambientais, como o meio (Katsikogianni, Missirlis, 2004). A hipótese sustentada neste presente estudo, é que a superfície dos materiais influenciou a proliferação e adesão dos microrganismos. Em G-K, como mencionado, houve a formação de placas observadas em MEV-FEG, topografia que pode ter dificultado a proliferação microbiológica, com exceção da *P. aeruginosa*. Contudo, o crescimento de *P. aeruginosa* é justificado pelo fato de possuir mecanismos de formação de biofilme mais complexos, facilitando sua proliferação em diferentes superfícies (Falkinham et al., 2015; Rasamiravaka et al., 2015). O que corrobora com os dados de formação de biofilme, já que o G-NH<sub>4</sub> demonstrou maior formação de biofilme de acordo com a DO, e foi o material descrito com superfície material mais rugosa pela presença de diversas esferolitas em sua superfície facilitando a adesão fúngica e bacteriana.

A primeira etapa de estudos baseou-se na ação *in vitro* dos cimentos a ser analisados, após resultados prévios positivos foi realizada a etapa *in vivo*. Embora não tenha apresentado diferença estatística, após análise histomorfométrica, verificou-se maior neoformação óssea no grupo G-NH<sub>4</sub> seguido pelo grupo G-K. O grupo G-NH<sub>4</sub> ainda exibiu os melhores resultados em força máxima e força de ruptura sendo observada diferença com o grupo controle. Estes resultados *in vivo* corroboram com os melhores resultados da fosfatase alcalina que sugere maior diferenciação celular. Contudo, Esteban et al. (2016) descreveram a sensibilidade de organismos vivos ao NH<sub>4</sub>. O cátion pode ser considerado problemático quanto a acidificação do meio ao qual está exposto, o que pode levantar questionamentos em relação ao desempenho do grupo de cimento o qual foi manufaturado a partir de uma solução ativadora composta por ele. Entretanto, o amônio é uma substância volátil, sendo assim, no processo de obtenção do cimento ele é perdido em forma de gás. O cátion compõe a solução ativadora juntamente ao ácido fosfórico e a água, essa solução reage e resulta na formação de fosfatos, sílica e cálcio que são importantes na regeneração do tecido ósseo e são biocompatíveis (Ding et al., 2009)

Portanto, a fim de desenvolver um material com devida importância e utilidade clínica, com interações biológicas positivas, estudos *in vivo*, *in vitro* e relacionados a capacidade de interação com microrganismos foram realizados.

## 6 CONCLUSÃO

Por meio dos testes desenvolvidos ao longo deste trabalho, é possível afirmar que o objetivo foi alcançado. Uma vez que foi possível comprovar a influência das diferentes soluções na diferenciação de osteoblastos *in vitro* e neoformação óssea *in vivo*. Ao final, fica explícito que suas composições afetaram tanto a morfologia superficial dos cimentos como a diferenciação celular, a osteogênese e a formação de biofilme.

Em relação a atividade e diferenciação celular pôde-se confirmar que nenhuma delas se mostrou citotóxica, e todas permitiram a adesão e proliferação celular. Ressalta-se que apesar das células quando em contato com os grupos de cimento e meios de cultura se mostraram metabolicamente ativas pela expressão de proteínas total, o grupo G-NH<sub>4</sub> obteve destaque devido a expressão superior de fosfatase alcalina, demonstrando maior influência sobre a diferenciação celular. O grupo G-NH<sub>4</sub> apresentou melhor resultado no teste biomecânico e maior tendência a neoformação óssea.

Sendo assim, o silicato de cálcio produzido com solução ativadora de fosfato de amônio bifásico, na fase  $\alpha$ -wollastonita, se mostrou promissor para utilização na regeneração tecidual óssea.

## REFERÊNCIAS\*

- Abou ElReash A, Hamama H, Abdo W, Wu Q, Zaen El-Din A, Xiaoli X. Biocompatibility of new bioactive resin composite versus calcium silicate cements: an animal study. *BMC Oral Health*. 2019 Aug 22;19(1):194. doi: 10.1186/s12903-019-0887-1.
- Aly IHM, Abed Alrahim Mohammed L, Al-Meer S, Elsaid K, Barakat NAM. Preparation and characterization of wollastonite/titanium oxide nanofiber bioceramic composite as a future implant material. *Ceram Int*. 2016;42:11525-34. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.02.060>.
- Arbez B, Manero F, Mabilieu G, Libouban H, Chappard D. Human macrophages and osteoclasts resorb  $\beta$ -tricalcium phosphate in vitro but not mouse macrophages. *Micron*. 2019 Jul 30;125:102730. doi: 10.1016/j.micron.2019.102730
- Barbosa WT, de Almeida KV, de Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, García-Carrodegua R, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ $\beta$ -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Aug 8. doi: 10.1002/jbm.b.34462.
- Bartlett MS. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proc. R. Soc. Lond.* A160268–282; 1997. <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>
- Bellucci D, Cannillo V, Ciardelli G, Gentile P, Sola A. Potassium based bioactive glass for bone tissue engineering. *Ceramics International*. 2010;36:2449–53. doi:10.1016/j.ceramint.2010.07.009.
- Bellucci D, Sola A, Salvatori R, Anesi A, Chiarini L, Cannillo V. Sol-gel derived bioactive glasses with low tendency to crystallize: synthesis, post-sintering bioactivity and possible application for the production of porous scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Oct;43:573-86. doi: 10.1016/j.msec.2014.07.037.
- Benito N, Franco M, Ribera A, Soriano A, Rodriguez-Pardo D, Sorlí L, et al. Time trends in the a etiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Aug;22(8):732.e1-8. doi: 10.1016/j.cmi.2016.05.004.
- Biswas N, Samanta A, Podder S, Ghosh CK, Ghosh J, Das M, et al. Phase pure, high hardness, biocompatible calcium silicates with excellent anti-bacterial and biofilm inhibition efficacies for endodontic and orthopaedic applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018 Oct;86:264-83. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.06.046.
- Brotto M, Bonewald L. Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. *Bone*. 2015 Nov;80:109-14. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.010.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Bouler JM, Pilet P, Gauthier O, Verron E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomaterialia*. 2017;53:1–12. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.076

Brown MB, Forsythe AB. Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association*. 1974;69: 364–67. doi:10.1080/01621459.1974.10482955

Brown WE, Chow LC. A New Calcium Phosphate, Water-setting Cement. *Cem Res Prog*. 1986;352-379. doi: 10.1155/2012/809235

Camargos MCS, Gonzaga MR, Costa JV, Bomfim WC. Disability-free life expectancy estimates for Brazil and Major Regions, 1998 and 2013. *Cien Saude Colet*. 2019;24(3):737-47. doi:10.1590/1413-81232018243.07612017

Carpenter JW. *Formulário de Animais Exóticos*. 3. ed. São Paulo: Editora MedVet; 2010.

Carolina M, Herrera M, Flores-ledesma A, Humberto F, Santana B. Microleakage in MTA-type dental cement modified with wollastonite and bioactive glass. *Revista Odont Mexi*. 2018;22(1):34–8.

Carrel JP, Wiskott A, Moussa M, Rieder P, Scherrer S, Durual S. A 3D printed TCP/HA structure as a new osteoconductive scaffold for vertical bone augmentation. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Jan;27(1):55-62. doi: 10.1111/clr.12503.

Cerruti M, Sahai N. Silicate Biomaterials for Orthopaedic and Dental Implants. *Rev Mineral Geochemistry*. 2006;64(1):283–313. Disponível em: <https://doi.org/10.2138/rmg.2006.64.9>.

Chatterjee K, Sarkar S, Jagajjanani Rao K, Paria S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;209:8-39. doi:10.1016/j.cis.2013.12.008

Chen QZ, Thouas GA. Fabrication and characterization of sol-gel derived 45S5 Bioglass®-ceramic scaffolds. *Acta Biomater*. 2011;7(10):3616–26. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.005>.

Cozza N, Monte F, Bonani W, Aswath P, Motta A, Migliaresi C. Bioactivity and mineralization of natural hydroxyapatite from cuttlefish bone and Bioglass(®) co-sintered bioceramics. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Feb;12(2):e1131-e1142. doi:10.1002/term.2448.

Dai Z, Koh WP. B-vitamins and bone health - a review of the current evidence. *Nutrients*. 2015 May 7;7(5):3322-46. doi: 10.3390/nu7053322.

Davidovits J. *Geopolymer Chemistry and Applications*. 4th ed. Saint-Quentin (France): Institut Géopolymère; 2015.

De Andrade DP, De Vasconcellos LMR, Silva Carvalho IC, De Brito Penna Forte LF, De Souza Santos EL, Do Prado RF, et al. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. *Mater Sci Eng. C*. 2015;56:538–44. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.026.

de Aza PN, Luklinska ZB, Anseau M, Guitian F, de Aza S. Morphological studies of pseudowollastonite for biomedical application. *J Microsc.*1996;182(1):24–31.

de Aza PN, Luklinska ZB, Mate-Sanchez de Val JE, Calvo-Guirado JL. Biodegradation process of  $\alpha$ -tricalcium phosphate and  $\alpha$ -tricalcium phosphate solid solution bioceramics in vivo: a comparative study. *Microsc Microanal.* 2013;19(5):1350-1357. doi:10.1017/S1431927613001864

Dimitriev Y, Ivanova Y, Iordanova R. History of Sol-Gel Science and Technology. *Chem Inform.* 2009; 40:181–92. doi:10.1002/chin.200912249.

Ding S-J, Shie M-Y, Wang C-Y. Novel fast-setting calcium silicate bone cements with high bioactivity and enhanced osteogenesis in vitro. *J. Mater. Chem.* 2009;19(8):1183-1190. doi: 10.1039/B819033J.

ElReash AA, Hamama H, Eldars W, Lingwei G, Zaen El-Din AM, Xiaoli, X. Antimicrobial activity and pH measurement of calcium silicate cements versus new bioactive resin composite restorative material. *BMC Oral Health.* 2019;19(1). doi:10.1186/s12903-019-0933-z

El-Wassefy NA, El-Mahdy RH, El-Kholany NR. The impact of silver nanoparticles integration on biofilm formation and mechanical properties of glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent.* 2018 Mar;30(2):146-52. doi: 10.1111/jerd.12353.

Esteban R, Ariz I, Cruz C, Moran JF. Review: Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Sci.* 2016 Jul;248:92-101. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.04.008.

Falkinham JO 3rd, Hilborn ED, Arduino MJ, Pruden A, Edwards MA. Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Health Perspect.* 2015 Aug;123(8):749-58. doi: 10.1289/ehp.1408692.

Faure J, Drevet R, Lemelle A, Ben Jaber N, Tara A, El Btaouri H, et al. A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst. *Mater Sci Eng. C*. 2015;47:407–12. doi: 10.1016/j.msec.2014.11.045.

Ford CA, Cassat JE. Advances in the local and targeted delivery of anti-infective agents for management of osteomyelitis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017 Sep;15(9):851-60. doi: 10.1080/14787210.2017.1372192.

Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso MV, et al. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dent Mater.*

2010;26(10):974-92. doi:10.1016/j.dental.2010.06.002

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *An Bioch.* 2004;329:77–84. doi: 10.1016/j.ab.2004.02.002.

Gu Y, Zhang J, Zhang X, Liang G, Xu T, Niu W. Three-dimensional Printed Mg-Doped  $\beta$ -TCP Bone Tissue Engineering scaffolds: Effects of Magnesium Ion Concentration on Osteogenesis and Angiogenesis In Vitro. *Tissue Eng Regen Med.* 2019 Jun 17;16(4):415-29. doi: 10.1007/s13770-019-00192-0.

Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como cimentos, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim Nova.* 2010;33(6):1352–8.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016 May;18(5):310-21. doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002.

Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos.* 2013;8(1-2):136. doi: 10.1007/s11657-013-0136-1.

Hoeman, CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie.* 2009;57(4): 318–23. doi:10.1016/j.patbio.2009.06.004

Hoerth RM, Seidt BM, Shah M, Schwarz C, Willie BM, Duda GN, et al. Mechanical and structural properties of bone in non-critical and critical healing in rat. *Acta Biomater.* 2014 Sep;10(9):4009-19. doi: 10.1016/j.actbio.2014.06.003. Epub 2014 Jun 12. PubMed PMID: 24929204.

Hu D, Li K, Xie Y, Pan H, Zhao J, Huang L, et al. Different response of osteoblastic cells to Mg(2+), Zn(2+) and Sr(2+) doped calcium silicate coatings. *J Mater Sci Mater Med.* 2016 Mar;27(3):56. doi: 10.1007/s10856-016-5672-y.

Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials.* 2016;81:58-71. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.12.012

Irie DL. Síntese e Caracterização do Cimento Ósseo a Base de  $\alpha$ -Wollastonita [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2017.

Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2012;9(August):4457–86. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.023.

Kakar A, Rao BHS, Hegde S, Deshpande N, Lindner A, Nagursky H, et al. Ridge preservation using an in situ hardening biphasic calcium phosphate ( $\beta$ -TCP/HA) bone graft substitute-a clinical, radiological, and histological study. *Int J Implant Dent*. 2017 Dec;3(1):25. doi: 10.1186/s40729-017-0086-2.

Kakuta A, Tanaka T, Chazono M, Komaki H, Kitasato S, Inagaki N, et al. Effects of micro-porosity and local BMP-2 administration on bioresorption of  $\beta$ -TCP and new bone formation. *Biomater Res*. 2019 Jul 26;23:12. doi: 10.1186/s40824-019-0161-2.

Kamal M, Andersson L, Al-Asfour A, Bartella AK, Gremse F, Rosenhain S, et al. Bone regeneration in rabbit calvarial critical-sized defects filled with composite in situ formed xenogenic dentin and biphasic tricalcium phosphate/hydroxyapatite mixture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Apr;107(3):773-82. doi: 10.1002/jbm.b.34171.

Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. 2004 Dec 7;8:37-57. Review. PubMed PMID: 15593018.

Kawachi YE, Bertran AC, Reis RR, Alves LO. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*. 2000; 23(4): 518-22. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000400015>.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010;1(2):94-9. doi:10.4103/0976-500X.72351.

Kim SK, Lee JH. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol*. 2016 Feb;54(2):71-85. doi: 10.1007/s12275-016-5528-7. Epub 2016 Feb 2. Review. PubMed PMID: 26832663.

Klein LC. Sol-gel processing. *Ann Rev Mater Sci*. 1985;15:227–48.

Landis WJ. Mineral characterization in calcifying tissues: Atomic, molecular and macromolecular perspectives. *Connect Tissue Res*. 1996;35:1–8.

Lima MG, Belon AP, Barros MB. Happy life expectancy among older adults: differences by sex and functional limitations. *Rev Saude Publica*. 2016;50(0):64. doi:10.1590/S1518-8787.2016050006727

Limo MJ, Sola-Rabada A, Boix E, Thota V, Westcoot ZC, Puddu V, et al. Interactions between Metal Oxides and Biomolecules: from Fundamental Understanding to Applications. *Chem Rev*. 2018;118(22):11118-93. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00660

Liu J, Li J, Ye J, He F. Setting behavior, mechanical property and biocompatibility of anti-washout wollastonite/calcium phosphate composite cement. *Ceram. Int*. 2016;42(12):13670–81. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.05.165>.

Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*. 2018 Dec;185:240-75. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.028

Lopes JH, Magalhães JA, Gouveia RF, Bertran CA, Motisuke M, Camargo SEA, et al. Hierarchical structures of  $\beta$ -TCP/45S5 bioglass hybrid scaffolds prepared by gelcasting. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016 Sep;62:10-23. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.04.028.

Lowry HO, Rosebrough JN, Lewis A, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Readings*. 1951;193(1):265–275.

Mehrjou B, Mo S, Dehghan-Baniani D, Wang G, Qasim AM, Chu PK. Antibacterial and cytocompatible nanoengineered silk-based materials for orthopedic implants and tissue engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Aug 6. doi: 10.1021/acsami.9b09066.

Mello DCR, de Oliveira JR, Cairo CAA, Ramos LSB, Vegian MRDC, de Vasconcellos LGO, et al. Titanium alloys: in vitro biological analyzes on biofilm formation, biocompatibility, cell differentiation to induce bone formation, and immunological response. *J Mater Sci Mater Med*. 2019;30(9):108. Published 2019 Sep 18. doi:10.1007/s10856-019-6310-2

Moazzami SM, Sadid Zadeh R, Kianoush K, Sarmad M, Barani Karbaski F, Amiri Daluyi R, et al. Chemical Stability of Bioglass in Simulated Oral Environment. *J Dent Biomater*. 2016 Sep;3(3):261-8. PMID: 28959752; PMCID: PMC5608061.

Mosselmans G, Biesemans M, Willem R, Wastiels J, Leermakers M, Rahier H, et al. Thermal hardening and structure of a phosphorus containing cementitious model material: PPP Phosphoric acid-wollastonite. *J Therm Anal Calorim*. 2007;88(3):723–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-006-8225-7>.

Motisuke M, Santos VR, Bazanini NC, Bertran CA. Apatite bone cement reinforced with calcium silicate fibers. *J Mater Sci Mater. Med*. 2014;25(10):2357–63. DOI: 10.1007/s10856-014-5280-7.

Müller WEG, Tolba E, Schröder HC, Muñoz-Espí R, Diehl-Seifert B, Wang X. Amorphous polyphosphate-hydroxyapatite: A morphogenetically active substrate for bone-related SaOS-2 cells in vitro. *Acta Biomater*. 2016;31:358-67. doi:10.1016/j.actbio.2015.11.060

Nery JC, Pereira LAVD, Guimarães GF, Scardueli CR, França FMG, Spin-Neto R, et al.  $\beta$ -TCP/HA with or without enamel matrix proteins for maxillary sinus floor augmentation: a histomorphometric analysis of human biopsies. *Int J Implant Dent*. 2017 Dec;3(1):18. doi: 10.1186/s40729-017-0080-8.

Nothdurft FP, Fontana D, Ruppenthal S, May A, Aktas C, Mehraein Y, et al. Differential Behavior of Fibroblasts and Epithelial Cells on Structured Implant Abutment Materials: A Comparison of Materials and Surface Topographies. *Clin*

Implant Dent Relat Res. 2015 Dec;17(6):1237-49. doi:10.1111/cid.12253.

Oliveira NM, Martinez-Garcia E, Xavier J, Durham WM, Kolter R, Kim W, et al. Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. PLoS Biol. 2015 Jul 9;13(7):e1002191. doi: 10.1371/journal.pbio.1002191.

Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials. 2004 Feb;25(3):403-13.

Pan Y, Yin J, Yao D, Zuo K, Xia Y, Liang H, et al. Effects of silica sol on the microstructure and mechanical properties of CaSiO<sub>3</sub>bioceramics. Mater Sci Eng C. 2016;64:336–340. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.109>.

Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019;37(1):177-92. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

Pattanayak DK. Apatite wollastonite-poly methyl methacrylate bio-composites. Mater. Sci Eng C. 2009;29(5):1709–14. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.019>.

Pierre AC. Introduction to Sol-Gel Processing. Boston: Springer US; 1998. doi:10.1007/978-1-4615-5659-6.

Pitkänen S, Paakinaho K, Pihlman H, Ahola N, Hannula M, Asikainen S, et al. Characterisation and in vitro and in vivo evaluation of supercritical-CO<sub>2</sub>-foamed  $\beta$ -TCP/PLCL composites for bone applications. Eur Cell Mater. 2019 Aug 5;38:35-50. doi: 10.22203/eCM.v038a04.

Prado FA, Ambinder AL, Jaime APG, Lima AP, Balducci I, Rocha RF. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. Rev Odontol UNICID. 2006;18(1):7-13.

Quarto R, Giannoni P. Bone Tissue Engineering: Past-Present-Future. Methods Mol Biol. 2016;1416:21-33. doi: 10.1007/978-1-4939-3584-0\_2.

Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Med Chem. 2015;7(4):493-512. doi: 10.4155/fmc.15.6.

Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2001;18(4):163-70.

Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. Biomed Res Int. 2015;2015:759348. doi:10.1155/2015/759348

Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RHC, Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol*. 2008;28(2):205-11. doi: 10.1002/jat.1271.

Russo T, De Santis R, Gloria A, Barbaro K, Altigeri A, Fadeeva IV, et al. Modification of PMMA Cements for Cranioplasty with Bioactive Glass and Copper Doped Tricalcium Phosphate Particles. *Polymers (Basel)*. 2019 Dec 25;12(1). pii: E37. doi: 10.3390/polym12010037. PubMed PMID: 31881672.

Samanta A, Podder S, Ghosh CK, Bhattacharya M, Ghosh J, Mallik AK, et al. ROS mediated high anti-bacterial efficacy of strain tolerant layered phase pure nano-calcium hydroxide. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017 Aug;72:110-28. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.04.004.

Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater*. 2013;9(9):8037-45. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.014

Shao H, Sun M, Zhang F, Liu A, He Y, Fu J, et al. Custom Repair of Mandibular Bone Defects with 3D Printed Bioceramic scaffolds. *J Dent Res*. 2018;97(1):68–76. doi: 10.1177/0022034517734846

Sista S, Wen C, Hodgson PD, Pande G. The influence of surface energy of titanium-zirconium alloy on osteoblast cell functions in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2011;97(1):27-36. doi:10.1002/jbm.a.33013

Turlybekuly A, Pogrebnyak AD, Sukhodub LF, Sukhodub LB, Kistaubayeva AS, Savitskaya IS, et al. Synthesis, characterization, in vitro biocompatibility and antibacterial properties study of nanocomposite materials based on hydroxyapatite-biphasic ZnO micro- and nanoparticles embedded in Alginate matrix. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Nov;104:109965. doi: 10.1016/j.msec.2019.109965.

Uvin P, Everaerts W, Pinto S, Alpízar YA, Boudes M, Gevaert et al. The use of cystometry in small rodents: a study of bladder chemosensation. *J Vis Exp*. 2012;(66):e3869. Published 2012 Aug 21. doi:10.3791/3869

Villalpando-Reyna A, Cortés-Hernández D, Granjeiro J, Prado M, Gorokhovskiy A, Escobedo-Bocardo J, et al. Development of bioactive and biocompatible ceramic composites based on potassium polytitanate. *Proc Appl Ceramics*. 2019;13:149–56. doi:10.2298/pac1902149v.

Viana, FAB. Guia Terapêutico Veterinário. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks; 2014.

Villard N, Seneviratne C, Tsoi JK, Heinonen M, Matinlinna J. Candida albicans aspects of novel silane system-coated titanium and zirconia implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Mar;26(3):332-41. doi: 10.1111/clr.12338.

Vylkova S, Carman AJ, Danhof HA, Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. The fungal pathogen Candida albicans autoinduces hyphal morphogenesis by raising

extracellular pH. *mBio*. 2011;2(3):e00055-e11. Published 2011 May 17. doi:10.1128/mBio.00055-11

Wang J, Wang M, Chen F, Wei Y, Chen X, Zhou Y, et al. Nano-Hydroxyapatite Coating Promotes Porous Calcium Phosphate Ceramic-Induced Osteogenesis Via BMP/Smad Signaling Pathway. *Int J Nanomedicine*. 2019 Oct 3;14:7987-8000. doi: 10.2147/IJN.S216182.

Weichhold J, Gbureck U, Goetz-Neunhoeffler F, Hurle K. Setting Mechanism of a CDHA Forming  $\alpha$ -TCP Cement Modified with Sodium Phytate for Improved Injectability. *Materials (Basel)*. 2019 Jun 29;12(13). pii: E2098. doi: 10.3390/ma12132098.

Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom BP. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathog Dis*. 2016 Jul;74(5). pii: ftw039. doi: 10.1093/femspd/ftw039.

Wu C, Chang J. A review of bioactive silicate ceramics. *Biomed Mater*. 2013 Jun;8(3):032001. doi: 10.1088/1748-6041/8/3/032001.

Wu C, Ramaswamy Y, Kwik D, Zreiqat H. The effect of strontium incorporation into CaSiO<sub>3</sub> ceramics on their physical and biological properties. *Biomaterials*. 2007;28(21): 3171–81. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.002

Wu YF, Wang YM, Jing YB, Zhuang JP, Yan JL, Shao ZK, et al. In vivo study of microarc oxidation coated biodegradable magnesium plate to heal bone fracture defect of 3 mm width. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017;158:147–56. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.06.031.

Yahia IS, Shkir M, AlFaify S, Ganesh V, Zahran HY, Kilany M. Facile microwave-assisted synthesis of Te-doped hydroxyapatite nanorods and nanosheets and their characterizations for bone cement applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Mar 1;72:472-80. doi: 10.1016/j.msec.2016.11.074.

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.

Zhang F, Zhou M, Gu W, Shen Z, Ma X, Lu F, et al. Zinc-/copper-substituted dicalcium silicate cement: advanced biomaterials with enhanced osteogenesis and long-term antibacterial properties. *J Mater Chem B*. 2020 Jan 15. doi: 10.1039/c9tb02691f.

## ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética Animal



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 16/2018, intitulado:- "Interações biológicas de cimentos ósseos a base de silicato de cálcio: Estudo *in vitro* e *in vivo*", sob a responsabilidade de **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, tendo com colaboradora :- Mestranda **HANNA FLAVIA SANTANA DOS SANTOS**, 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 07/12/2018.

|                         |                                                             |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Finalidade              | (   ) Ensino                      ( X ) Pesquisa Científica |
| Vigência da Autorização | 20/01/2019 A 30/07/2019                                     |
| Espécie/linhagem/raça   | Rato heterogênico Wistar                                    |
| Nº de Animais           | 24                                                          |
| Peso/Idade              | 300 grs / 100 dias (12) e 400 grs / 90 dias (12)            |
| Sexo                    | macho                                                       |
| Origem                  | Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP                 |

São José dos Campos, 12 de dezembro de 2018

  
**Profa.Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO**  
 Vice-Coordenadora em exercício