



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

SUELEN SIMÕES AMARAL

**REGENERAÇÃO ÓSSEA INDUZIDA POR SCAFFOLD β -
TCP/S53P4 PRODUZIDO POR GEL CASTING: estudo *in vitro* e
*in vivo***

SUELEN SIMÕES AMARAL

**REGENERAÇÃO ÓSSEA INDUZIDA POR SCAFFOLD β -TCP/S53P4
PRODUZIDO POR GEL CASTING: estudo *in vitro* e *in vivo***

Tese 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 DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Patologia e Diagnóstico Bucal. Linha de pesquisa: Inflamação e reparação tecidual.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. 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).

Amaral, Suelen Simões

Regeneração óssea induzida por scaffold B-TCP/S53P4 produzido por gel casting: estudo in vitro e in vivo / Suelen Simões Amaral. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
82 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.
Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos .

1. Biomaterial. 2. Biocerâmica. 3. Biovidro. 4. Osteogênese. 5. Neoformação óssea. I. Vasconcellos , Luana Marotta Reis de, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

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

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Newton Soares da Silva

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Instituição de Pesquisa e Desenvolvimento

Campus Urbanova

Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci

Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp)

Campus de Ribeirão Preto

Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Elis Andrade de Lima Zutin

Faculdade Santo Antônio

Campus de Caçapava

São José dos Campos, 25 de outubro de 2021.

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho à minha amada família,
em especial à minha mãe, Rose.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, na pessoa de coordenador Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio para a realização deste trabalho - Código de Financiamento 001, no período de 07/08/2018 a 31/10/2021.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal.

À professora Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, minha orientadora, pela oportunidade, apoio, encorajamento e disponibilidade em todos esses anos. Por todas as sugestões que enriqueceram este trabalho.

Aos colegas da pós-graduação, por sempre incentivarem e caminharmos juntos durante esta jornada.

A todos os amigos e familiares, agradeço pelo carinho, pelo encorajamento, por toda a paciência nas minhas ausências, amo vocês!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3 PROPOSIÇÃO	18
3.1 Objetivos gerais.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1.1 Preparo do pó	19
4.1.2 Obtenção dos scaffolds β -TCP pelo método de gel casting	19
4.1.3 Preparo do biovidro S53P4.....	20
4.2 Caracterização das amostras	21
4.2.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	21
4.2.2 Análise por Difração de Raios-X (DRX)	21
4.3 Grupos experimentais.....	22
4.4 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	23
4.4.1 Cultura de células.....	23
4.4.2 Citotoxicidade celular (MTT).....	24
4.4.3 Análise da interação celular	25
4.4.4 Análise da morfologia celular por fluorescência direta	25
4.4.5 Conteúdo de proteína total	26
4.4.6 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)	26
4.4.7 Análise da formação de nódulos de mineralização e quantificação de cálcio	26
4.4.8 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real	27
4.4.8.1 Extração do RNA	28
4.4.8.2 Síntese de DNA complementar	29
4.4.8.3 Amplificação gênica por RT-PCR.....	29
4.5 Ensaios biológicos <i>in vivo</i>	30
4.5.1 Procedimento cirúrgico	30
4.5.2 Processamento e análise histológica descritiva	32
4.5.3 Análise histomorfométrica	33

4.6 Ensaio de atividade antibiofilme	34
4.6.1 Cepas de micro-organismo	34
4.6.2 Crescimento, manutenção e preparo dos micro-organismos	34
4.6.3 Ensaio.....	35
4.7 Análise dos resultados	35
5 RESULTADO	36
5.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	36
5.2 Análise por Difração de Raio-X (DRX)	37
5.3 Citotoxicidade celular	38
5.4 Interação celular	39
5.5 Análise da morfologia celular por fluorescência direta	40
5.6 Conteúdo de proteína total	41
5.7 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	42
5.8 Análise da formação de nódulos de mineralização e quantificação de cálcio	43
5.9 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real	45
5.10 Análise histológica descritiva	48
5.11 Análise histomorfométrica.....	52
5.12 Ensaio de atividade antibiofilme	53
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO.....	82

RESUMO

Amaral SS. Regeneração óssea induzida por *scaffold* β -TCP/S53P4 produzido por *gel casting*: estudo *in vitro* e *in vivo* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

Os materiais biocerâmicos são promissores em cirurgias de substituição óssea, tanto para aplicações odontológicas quanto ortopédicas. Estes materiais apresentam excelente compatibilidade biológica, osteocondutividade, degradação, além de exibirem atividade antimicrobiana. Neste presente trabalho, o objetivo foi avaliar *in vitro* a efetividade de *scaffolds* β -fosfato tricálcico (β -TCP) incorporado com biovidro (S53P4), produzidos por meio do processo de *gel casting*, na atividade celular, diferenciação osteoblástica e ação antibacteriana sobre biofilmes monotípicos, e avaliar *in vivo* seu efeito sobre a neoformação óssea. Os *scaffolds* foram confeccionados com diferentes materiais: a) β -TCP; b) β -TCP incorporado com biovidro. Na etapa *in vitro*, foram realizados os testes de MTT, proteína total, atividade de fosfatase alcalina, nódulos de mineralização, interação celular e expressão dos genes relacionados à osteogênese por RT-PCR. Na etapa *in vivo*, dois *scaffolds* de cada biomaterial foram implantados nas tíbias direita e esquerda de coelhos. Após 21 dias, os animais foram eutanasiados e a neoformação óssea foi avaliada por meio de análise histológica e análise histomorfométrica. Por fim, avaliou a formação de biofilmes em cepas de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados *in vitro*, mostraram que os *scaffolds* β -TCP/S53P4 não apresentaram efeito citotóxico e permitiram a interação de células de aspecto alongado sobre os *scaffolds*. Na avaliação da proteína total os *scaffolds* β -TCP/S53P4 apresentaram valores mais altos, sendo significativamente maior em comparação ao β -TCP ($p < 0,05$) no período de 7 dias. Na atividade de fosfatase alcalina, os *scaffolds* foram semelhantes estatisticamente ($p > 0,05$). Na quantificação de nódulos de mineralização, os *scaffolds* β -TCP/S53P4 expressaram maior quantidade de nódulos de mineralização com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com os *scaffolds* β -TCP. No período de 7 dias, os genes osteopontina (Osp), fator relacionado ao Runt (Runx2), osteocalcina (Bglap), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-csf), prostaglandina E2 (PgE₂), osteonectina (Osn) e fator de crescimento de transformador Beta (Tgf- β 1) foram expressos em todos os *scaffolds*, sem diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Contudo a expressão de integrina β 1 (Itg β 1) no *scaffold* β -TCP foi maior do que no *scaffold* β -TCP/S53P4, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$), houve maior expressão de colágeno I (Col-1) em β -TCP/S53P4 com diferença estatística ($p < 0,05$). Os defeitos preenchidos por β -TCP/S53P4 tiveram maior formação e preenchimento por tecido ósseo neoformado ($p < 0,05$) conforme a análise histomorfométrica. β -TCP/S53P4 inibiu o crescimento bacteriano e fúngico em comparação ao β -TCP ($p < 0,05$). Desse modo, os resultados confirmam a capacidade osteogênica da cerâmica β -TCP e sugere que após a incorporação do biovidro S53P4, pode reduzir infecções microbianas. O novo biomaterial demonstrou-se um excelente material para aplicação na engenharia de tecido ósseo.

Palavras-chave: biomaterial; biocerâmica; biovidro; osteogênese; neoformação óssea.

ABSTRACT

Amaral SS. Bone regeneration induced by β -TCP/S53P4 scaffolds produced by gel casting: in vitro and in vivo study [doctoral thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

Bioceramic materials are promising in bone replacement surgeries, both for dental and orthopedic applications. These materials have excellent biological compatibility, osteoconductivity, degradation, in addition to exhibiting antimicrobial activity. The objective of this study was to investigate the effects of bioglass (S53P4) incorporated into β -tricalcium phosphate (β -TCP) scaffolds on cell activity, osteoblast differentiation and antibacterial activity in monotypic biofilms in vitro, and to evaluate the influence of this new biomaterial on in vivo bone neoformation. The scaffolds were made with different materials: a) β -TCP; b) β -TCP incorporated with bioglass. MTT test, total protein, alkaline phosphatase activity, mineralization nodules, cell interaction and expression of genes related to osteogenesis by RT-PCR were performed. Two scaffolds of each biomaterial were implanted in the right and left tibiae of rabbits. After 21 days, the animals were euthanized and bone neoformation was evaluated through histological and histomorphometric analysis. Finally, the formation of biofilms in Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus strains. The in vitro results showed that the β -TCP/S53P4 scaffolds did not show cytotoxic effect and allowed the interaction of elongated cells on the scaffolds. In the evaluation of total protein, the β -TCP/S53P4 scaffolds showed better results, being significantly higher compared to β -TCP ($p < 0.05$) in the 7-day period. In alkaline phosphatase activity, the scaffolds were statistically similar ($p > 0.05$). In the quantification of mineralization nodules, the β -TCP/S53P4 scaffolds expressed a greater amount of mineralization nodules with a significant difference ($p < 0.05$) with the β -TCP scaffolds. Within 7 days, genes *Osp*, *Runx2*, *Bglap*, *M-csf*, *PgE2*, *Osn* and *Tgf- β 1* were expressed in all scaffolds, with no significant difference between groups ($p > 0.05$). The expression of *Itg β 1* in the β -TCP scaffold was higher than in the β -TCP/S53P4 scaffold, differing statistically ($p < 0.05$), but there was a higher expression of *Col-1* in β -TCP/S53P4 with statistical difference ($p < 0.05$). In the histological analysis, neoformed bone tissue filling the defect was observed in both scaffolds, but greater formation was observed in β -TCP/S53P4 ($p < 0.05$). β -TCP/S53P4 inhibited bacterial and fungal growth compared to β -TCP ($p < 0.05$). Thus, the results confirm the osteogenic capacity of the β -TCP ceramic and suggest that after its incorporation into the S53P4 bioglass, it can prevent microbial infections. An excellent biomaterial for application in bone tissue engineering.

Keywords: biomaterial; bioceramic; bioglass; osteogenesis; bone neoformation.

1 INTRODUÇÃO

“Fosfato tribásico de cal” foi o primeiro termo usado para identificar as conhecidas cerâmicas α - fosfato tricálcico (α -TCP) e β -fosfato tricálcico (β -TCP) no ano de 1832 (Eliaz, Metoki, 2017). Contudo, somente em 1973 o β -TCP foi introduzido pela primeira vez como um biomaterial para tratar defeitos ósseos por Thomas Driskell (Driskell, 1973).

As cerâmicas de fosfato de cálcio são os biomateriais sintéticos mais usados e eficazes como substitutos ósseos (Guillaume, 2017). Ressalta-se ainda que o β -TCP é um biomaterial cerâmico que vem sendo utilizado tanto na área da odontologia e como na medicina (Ana et al., 2018; Chung et al., 2019; Gaasbeek et al., 2005; Jasser et al., 2021).

Como substitutos ósseos os *scaffolds* de β -TCP são atrativos pois possuem biocompatibilidade, apresentam equilíbrio na absorção, degradação e neoformação óssea (Kato et al., 2014; Lu et al., 1998; Yamada et al., 2007). Além disso, o β -TCP é considerado osteocondutor e osteoindutor podendo provocar a precipitação de camada de apatita durante incubação com soluções iônicas (Eliaz, Metoki, 2017). Estudos anteriores relataram sucesso a partir da implantação cirúrgica *in vivo* de biomateriais produzidos com a cerâmica β -TCP (Chatterjea et al., 2014; Titsinides et al., 2020; Xie et al., 2019).

No final da década de 1960, outro biomaterial cerâmico foi desenvolvido por Larry Hench, o biovidro 45S5 (*Bioglass*®), sendo considerado um material promissor por se ligar quimicamente ao tecido ósseo (Hench, 2006). A propriedade osteoindutiva do biovidro também foi observada e foi descrita como sendo a capacidade de dissolução do vidro, em sílica solúvel e íons de cálcio que possibilita a estimulação de células osteogênicas a produzirem matriz óssea (Jones, 2013).

Após 60 anos da descoberta do biovidro 45S5, outros novos biovidros foram sintetizados e são citados em pesquisas, tais como 77S (Bosetti, Cannas, 2005), 46S6 (Oudadesse et al., 2011), 70S30C (Midha et al., 2013), BGS-7 (Lee et al., 2013), 1393 (Hoppe et al., 2014), 63s (Shuai et al., 2015), 0106-B1 (F Westhauser et al., 2019), ICIE16 (Westhauser et al., 2020), 58S (Rastegar Ramsheh et al., 2021), F18 (Marin et al., 2021) e o S53P4 (Steinhausen et al., 2021).

O biovidro S53P4 ocupada posição de destaque na pesquisa científica, na aplicação prática clínica, sendo sua atuação mais ressaltada do que o seu precursor, o biovidro 45S5 (Jones, 2015) devido aos seus bons resultados (Drago et al., 2018, 2013; Lindfors et al., 2017; Romanò et al., 2014; Thijssen et al., 2020). Destaca-se ainda por sua propriedade antimicrobiana (Drago et al., 2013).

Atualmente muitos estudos relatam a eficiência na combinação de compósitos de biovidro (Bortolin et al., 2018; Cunha et al., 2018; Drago et al., 2018; Thijssen et al., 2020; Zhu et al., 2020). Dessa maneira, devido ao potencial apresentado pelas cerâmicas β -TCP e o biovidro S53P4, eles se tornam biomateriais de escolha na produção de *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo, onde atuam como substitutos ósseos, no reparo e substituição de tecidos danificados. Espera-se que os *scaffolds* auxiliem na proliferação e diferenciação celular. Como também, na difusão de nutrientes celulares e exerçam influências mecânicas e biológicas benéficas nas células (Rouwkema et al., 2009; Sabree et al., 2015; Zhao et al., 2013). Estudos sugerem que a incorporação de biovidro em *scaffolds* de β -TCP aumenta a resistência mecânica (Cai et al., 2009; Lopes et al., 2016), bem como a capacidade osteoestimulante e osteocondutor do biovidro (Ciraldo et al., 2018; Kastrin et al., 2021; Vallittu et al., 2015) interferindo positivamente na bioatividade do *scaffold* β -TCP.

Para proporcionar uma estrutura adequada nos *scaffolds*, a porosidade, tamanho dos poros e poros interconectados são características importantes para permitir adequada osteogênese (Karageorgiou, Kaplan, 2005; Marew, Birhanu, 2021; Yoshikawa et al., 2009). A otimização desses parâmetros pode ser obtida na fabricação de *scaffolds* cerâmicos porosos pela técnica *gel casting* (Abbas et al., 2015; Kokabi et al., 2006; Lopes et al., 2016).

Sendo assim, objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade de *scaffolds* β -TCP incorporados ou não com biovidro S53P4 produzidos pelo processo de *gel casting*. *In vitro* foi realizado em células de linhagem celular de osteoblastos humano (MG63) cultivadas sobre os *scaffolds* e *in vivo* os *scaffolds* foram implantados em tíbias de coelho. Os *scaffolds* foram testados utilizando-se uma seleção de cepas-padrão ATCC bacteriana e fúngica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A engenharia de tecidos é a área de pesquisa multidisciplinar que é responsável pelo desenvolvimento de materiais para a reparação e reconstrução de lesões ósseas, sendo que sua finalidade é solucionar as limitações dos diferentes tipos de defeitos ósseos (Henkel et al., 2013). O tecido ósseo é conhecido pelas suas capacidades de crescimento, regeneração e remodelação. A remodelação ocorre por meio de uma sequência complexa e ordenada de atividades, que resulta na troca de tecido primário pelo secundário, seguido de uma contínua renovação deste (Owen, Reilly, 2018). A regeneração óssea é um processo fisiológico complexo e bem orquestrado subsequente à um dano, que envolve vários tipos de células e vias de sinalização molecular intracelular e extracelular (Romagnoli et al., 2013).

Para acelerar a osteogênese e favorecer a neoformação óssea são produzidos *scaffolds*, objetos tridimensionais, que exibem poros interconectados controlados quanto ao tamanho e forma. A utilização dos *scaffolds* serve como suporte e guia no crescimento celular e estes também visam reproduzir o microambiente do osso e facilitar a sua regeneração (Bružauskaitė et al., 2016). Estes *scaffolds* podem ser produzidos a partir de diferentes materiais como cerâmica, titânio ou polímero (Albulescu et al., 2019; Filippi et al., 2020; Vasconcellos et al., 2008).

O fosfato tricálcico é um biomaterial cerâmico que exhibe composição próxima à fase mineral óssea, por isso, vem sendo muito pesquisado atualmente (Sun et al., 2019; Wang et al., 2019; Westhauser et al., 2019), uma vez que há uma busca por materiais inovadores na engenharia tecidual óssea visando suprir as necessidades em aplicações odontológicas e ortopédicas. Estudos *in vitro* analisaram a influência de cerâmicas de cálcio na osteogênese, e os autores observaram um efeito positivo, sendo este um material com potencial para o uso clínico (Gao et al., 2016; Xidaki et al., 2018).

Cerâmicas a base de fosfato tricálcico são materiais sintéticos promissores em cirurgias de substituição óssea devido a excelente compatibilidade biológica, osteocondutividade e reabsorção. Além de apresentarem grande semelhança de sua

composição com a hidroxiapatita (HA), integram-se facilmente aos tecidos e principalmente possuem boa relação de custo-benefício, devido seu baixo custo de produção (Costa et al., 2016; Lowe et al., 2019; Park et al., 2012). Dentre os quatro tipos de cerâmicas de fosfato tricálcico, os polimorfos mais comumente estudados são α -fosfato tricálcico (α -TCP) e β -fosfato tricálcico (β -TCP). No entanto, o β -TCP (β -Ca₃(PO₄)₂), apresenta o efeito de estimular a proliferação celular e formação óssea comparada à cerâmica de α -TCP (Best et al., 2008; Park et al., 2012; Yuan et al., 2001). Safronova et al. (2020), estudaram *in vitro* a biocompatibilidade de cerâmicas bifásicas de α e β -TCP sobre células-tronco da polpa dentária humana. Os autores concluíram que, a acidificação de α -TCP, suprimiu a atividade celular, devido a sua rápida dissolução.

O β -TCP é um material aloplástico e apresenta propriedade de biodegradação, de forma relativamente lenta. Após sua implantação, o material é absorvido ou fagocitado e transformado pelo organismo em tecido ósseo natural (Kato et al., 2014). Em particular o β - fosfato tricálcico, apresenta maior solubilidade do que HA, proporcionando melhor condição para o crescimento celular, devido a sua propriedade bioabsorvível e degradação biológica pelos osteoclastos. Bem como, apresenta excelente microporosidade, permitindo adequada vascularização (Bose, Tarafder, 2012; Ishida et al., 2019; Lu et al.; 2020). Inclusive no estudo de Chatterjea et al. (2014) foi relatado o potencial osteoindutivo significativamente maior da cerâmica β -TCP em relação a HA, devido a capacidade aumentada da formação óssea quando implantadas em fêmures de ratos.

Para entender o processo de osteogênese e manutenção do tecido ósseo é necessário compreender os eventos relacionados à produção das proteínas, que estão relacionadas com o reparo e a remodelação óssea, tais como: colágeno I (Col-1), fator de crescimento transformador Beta (Tgf- β 1), integrina β 1 (Itg β 1), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-csf), osteonectina (Osn), osteocalcina (Bglap), osteopontina (Osp), prostaglandina E2 (PgE₂) e fator relacionado ao Runt (Runx2) entre muitos outros.

Ma et al. (2017) desenvolveram nanopartículas de sílica com nanocristais de prata e observaram aumento dos marcadores relacionados com os genes Alp, Bglap, Osp, Runx2, fator de crescimento endotelial vascular (Vegf), no período de 3 a 7 dias em células do estroma da medula óssea (BMSCs). Fielding et al. (2019)

demonstraram uma regulação positiva de marcadores osteogênicos, entre eles Runx2 e β -actina, na diferenciação de estágio tardio, períodos de 21 e 28 dias em *scaffolds* de Si-TCP e Zn-TCP. O mesmo resultado de regulação positiva, embora com diferentes genes e período de tempo, foi observado por Wang et al. (2019), quando avaliaram a expressão dos genes Alp, Osp, Runx2, Bglap em *scaffolds* de fosfato de cálcio bifásico (BCP) revestido com nHA nos períodos de 4 e 7 dias. Ravichandran et al. (2013) observaram o aumento do pico da expressão gênica de Col-1, Bglap e Osp em 7 dias, quando avaliaram células MG63 em monocamadas de nanofibras de sílica mesoporosas comparado a nanofibras de sílica mesoporosas multicamadas. Li et al. (2015) demonstraram em amostras compostas em várias concentrações de hidroxiapatita fluoretada, de origem porcina (FPHA), onde a expressão de Runx2, Bglap e Col-1 em células MG63, foram maior no período de 7 dias para os grupos FPHA 0,25 e FPHA 0,50 comparado a FPHA 0,75.

Apesar do β -TCP apresentar propriedades positivas na osteogênese, este material apresenta fragilidade mecânica, limitando a sua utilização em algumas aplicações (Shuai et al., 2014). Assim, quando reforçado com biovidro 45S5, há melhora nas propriedades mecânicas quando comparados aos *scaffolds* β -TCP puros (Cai et al., 2009; Lopes et al., 2016). Os biovidros (BAG) geram um interesse significativo devido a sua excelente bioatividade e biocompatibilidade (Aguilar-Reyes et al., 2012). Por outro lado, Seidenstuecker et al. (2018) que também testaram a biocompatibilidade da combinação de biovidro (47,3%SiO₂-28,6%CaO-15,2%P₂O₅-4,9%Na₂O-2,5%MgO-1,5%F) com β -TCP, nas razões de 50/50 e 70/30, produzidos em impressora 3D, observaram que nos ensaios *in vitro* em cultura celular de MG63, houve efetividade para aplicação em preenchimento ósseo, porém estes mostraram-se ineficaz para o suporte de carga, no teste de resistência mecânica. Segundo os autores, isso se justifica devido aos parâmetros no processo de impressão na fabricação dos *scaffolds*, os quais não possuíam partículas menores e interconectadas entre si, características que promoveriam maior resistência mecânica durante fabricação de *scaffolds*.

O biovidro amplamente utilizado é o 45S5 devido a sua bioatividade, osteoestimulação, osteocondução entre outras propriedades importantes para a regeneração óssea (Albulescu et al., 2019; Cai et al., 2009; Ioannou et al., 2015; Lopes et al., 2016). Contudo, outras formulações estão sendo pesquisadas visando

melhorar as propriedades osteogênicas e antimicrobianas dos biovidros (Jones, 2015; Lu et al., 2016). Entre os vários tipos investigados, o biovidro S53P4 (53% de dióxido de silício, 23% de óxido de sódio, 20% de óxido de cálcio e 4% de pentóxido de fósforo), destaca-se por ser um substituto ósseo osteocondutor biocompatível, possuir propriedades antibacterianas, osteoestimulantes e angiogênicas (Coraça-Huber et al., 2014; Malat et al., 2018).

Embora, os mecanismos antibacterianos dos biovidros ainda não sejam completamente conhecidos, seus componentes químicos fundamentam possíveis mecanismos antibacterianos. A propriedade antibacteriana do biovidro é expressa quando, este material entra em contato com os fluídos corporais e desencadeia uma série de mecanismos desfavoráveis para a bactéria (Drago et al., 2018). Os íons sódio, liberados na superfície do biovidro por exemplo, elevam o pH prejudicando a colonização de patógenos. Os íons cálcio, fósforo e silício, criam um ambiente inviável para o crescimento bacteriano, quando liberados na superfície do biovidro, bem como aumentam a pressão osmótica sobre a estrutura da membrana celular (Coraça-Huber et al., 2014).

A atividade antimicrobiana do biovidro foi observada contra várias bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Atualmente é considerada uma solução promissora, capaz de atuar em defeitos ósseos, como também, em tratamentos de infecções ósseas (Drago et al., 2018). Drago et al. (2013), demonstraram, *in vitro*, que o biovidro S53P4, possui atividade contra cepas de espécies bacterianas multirresistentes comuns na osteomielite. Também, a partir de estudos clínicos *in vivo*, evidenciaram a redução de infecção em 88,9% dos pacientes com osteomielite submetidos a procedimentos cirúrgicos com o uso do biovidro S53P4. Posteriormente, Bortolin et al. (2016), concluíram que o biovidro S53P4 foi capaz de reduzir o biofilme produzido por *S. epidermidis*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* em discos de titânio. Cunha et al. (2018), estudaram a atividade antibacteriana de grânulos do biovidro S53P4 em comparação com os antibióticos gentamicina e/ou vancomicina associado ao polimetilmetacrilato (PMMA) sobre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e também em cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina (MR-CoNS), cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* (MDR-Pa) e cepa controle de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) que produzem osteomielite. Os autores concluíram que o biovidro

S53P4 apresentou propriedade antibacteriana tanto quanto ao PMMA carregado com antibiótico. Thijssen et al. (2020) avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes formulações contendo biovidro S53P4, em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, cultivados em caldo *Müller-Hinton*. Observaram por meio da contagem de unidade formadoras de colônias (UFC), redução na contagem de UFC/mL para *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, porém sem a eliminação completa de patógenos.

Atualmente a elaboração de novos biomateriais é desenvolvida aplicando técnicas de nanotecnologia e microtecnologias e são motivos de grande destaque no meio científico, pelo fato de melhorarem técnicas clássicas e consequentemente induzirem melhor resposta biológica de biomateriais para reparo e regeneração óssea. São exemplos, técnicas de fabricação de *scaffolds* tridimensionais, processo *sol-gel*, lixiviação de partículas, *electrospinning* e *gel casting* (Zhang et al., 2006; Zhu et al., 2020).

O método de produção por *gel casting* é uma técnica de processamento coloidal, que consiste na obtenção de cerâmicas por meio da geleificação de uma emulsão cerâmica. Esse processo ocorre devido a polimerização *in situ* dos monômeros orgânicos presentes na emulsão. Além de permitir ajustes nas vias de produção de novas composições, a principal vantagem deste processo é a possibilidade de fabricação de materiais utilizando uma rota precisa, a qual permite controlar a porosidade do material, assim como, o tamanho dos poros (Abbas et al., 2015; Sousa et al., 2011).

Investigando os *scaffolds* β -TCP incorporados com biovidro S53P4, como um potencial biomaterial para uso na neoformação óssea, neste presente estudo enfatiza-se a aplicação experimental em modelo animal a partir da regeneração óssea de tíbia de coelhos. Kakuta et al. (2019) implantaram cilindros de β -TCP com diferentes microporosidades em fêmur de coelhos e após 8 e 12 semanas observaram nova formação óssea por meio de análise histológica e histoquímica utilizando a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). A formação óssea foi significativamente maior no cilindro de β -TCP suplementado com BMP-2, em relação aos demais grupos β -TCP. Previamente, Nandi et al. (2018), avaliaram implantes de TCP/Si/Zn em tíbias de coelhos, os quais mostraram aumento na formação óssea

em relação TCP puro, a partir da análise de micrografias da marcação de fluorocromo, após 4 meses da implantação. Ángeles Sánchez-Garcés et al. (2020), testaram o potencial de regeneração óssea de β -TCP revestidos com fibronectina em modelo experimental em calvária de ratos e verificaram a eficácia do revestimento de fibronectina apenas no período de 2 semanas, uma vez que em 6 semanas não houve diferença entre os grupos. Recentemente, Kim et al. (2020), demonstraram maior capacidade regenerativa óssea em *scaffolds* 3D de HA/TCP em cães, comparado ao controle OSTEON 3, Genoss®.

Até o presente momento não foram reportadas na literatura avaliações biológicas sobre o desenvolvimento e fabricação de um biomaterial, produzido por meio do processo de *gel casting*. Neste estudo, foi avaliado *in vitro*, a efetividade dos *scaffolds* β -TCP incorporados ou não com biovidro S53P4, sobre a atividade celular, diferenciação osteoblástica e atividade antibacteriana sobre biofilmes monotípicos, e avaliar a neoformação óssea *in vivo*.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

O objetivo desse estudo foi investigar a efetividade de *scaffolds* β -fosfato tricálcico (β -TCP) e β -TCP incorporado com biovidro (S53P4), produzido por meio do processo de *gel casting*, na atividade celular, diferenciação osteoblástica e atividade antibacteriana sobre biofilmes monotípicos *in vitro*, e avaliar *in vivo* a influência na neoformação óssea em animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em parceria com a Universidade Federal do Estado de São Paulo (Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFESP), departamento de Engenharia de Materiais (Laboratório de Biocerâmicas – BIOCERAM, Unidade Talim, ICT/UNIFESP) sob a responsabilidade da professora Dra. Eliandra de Sousa Trichês.

4.1.1 Preparo do pó

O pó de β -TCP foi obtido por reação no estado sólido de CaHPO_4 e CaCO_3 a uma razão molar de 2:1. Em seguida essa mistura foi calcinada a 1050°C com taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ e tempo de permanência de 360 minutos em um forno tipo mufla (EDG 3P-S/ 1300°C). Após síntese e calcinação o β -TCP foi moído em moinho de bolas por 24 horas.

4.1.2 Obtenção dos *scaffolds* β -TCP pelo método de *gel casting*

Para fabricação dos *scaffolds*, suspensões cerâmicas com teor de sólidos de 30% -vol. foram preparadas pela dispersão do pó de β -TCP em uma solução aquosa contendo os monômeros orgânicos N,N,N',N'- hidroximetilacrilamida (HMAM), metacrilamida (MAM) e metilenobisacrilamida (MBAM), em uma proporção molar de 3:3:1 (HMAM:MAM:MBAM). Em seguida, poliacrilato de amônio foi adicionado para dispersão da suspensão e uma moagem de homogeneização foi realizada em moinho de bolas por 20 minutos. A suspensão homogeneizada foi então dividida em alíquotas nas quais foi adicionado 0,5% (em relação à massa da alíquota) de agente espumante (Lutensol ON-110, BASF). Esta foi então espumada com um mixer de baixa potência por 3 minutos e rapidamente adicionados 2,5% (em relação à

alíquota) de persulfato de amônio (iniciador) e tetrametiletilenodiamina (catalizador) em uma razão molar de 1:1. Após rápida homogeneização, a espuma foi vertida em moldes cilíndricos de PVC (Policloreto de Vinila). Os *scaffolds* foram mantidos a temperatura ambiente por 24 horas e secos em estufa a 50°C e a 100°C também por 24 horas. Por fim foram calcinados a 1200°C, com taxa de aquecimento de 5°C/min e permanência de 2 horas nesta temperatura.

4.1.3 Preparo do biovidro S53P4

O biovidro S53P4 (53%SiO₂-23%Na₂O-0%CaO-4%P₂O₅) foi sintetizado utilizando o processo *sol gel*. Resumidamente, a síntese foi realizada pela adição dos precursores: H₄SiO₄, (NH₄)₃PO₄, NaNO₃, Ca(NO₃)₂.4H₂O em um béquer contendo uma solução de ácido silícico (H₄SiO₄) com concentração de 0,5 mol/L. O ácido silícico foi obtido por uma reação de troca iônica entre uma solução de Na₂SiO₃ e resina catiônica. Conforme descrito previamente por Spirandeli et al.(2020). Os precursores utilizados foram adicionados separadamente em intervalos suficientes para completa dissolução e após a última adição foram agitados por 30 minutos.

Ao final do procedimento obteve-se um *sol gel* transparente que foi utilizado para incorporação do biovidro nos *scaffolds* β-TCP. O procedimento de incorporação foi realizado a partir da imersão dos *scaffolds* na solução de *sol gel* para impregnar ao biovidro, durante o período de 30 minutos, posteriormente, os *scaffolds* permaneceram em estufa a 100°C por 24 horas.

4.2 Caracterização das amostras

4.2.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi realizada a análise morfológica da superfície dos *scaffolds* produzidos pela técnica *gel casting* a partir de imagens obtidas por MEV (FEI, modelo Inspect S50). O equipamento está situado no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), São José dos Campos, SP.

O tamanho médio dos poros foi determinado a partir de medições de imagens em MEV, com o auxílio do *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Foi analisada 1 imagem para cada *scaffold*, no qual foram obtidas a média de 15 medições referente aos poros em (μm). A porosidade representada em porcentagem foi determinada a partir do método geométrico, com base na fórmula 1 e 2:

$$\% \text{ Porosidade (P)} = [1 - (d_{\text{Scaffold}} / d_{\text{Teórica}})] \times 100 \quad (1)$$

$$d_{\text{Scaffold}} = (m_{\text{Scaffold}} / v_{\text{Scaffold}}) \quad (2)$$

Onde, $d_{\text{Teórica}}$ corresponde a densidade teórica de β -TCP ($3,07\text{g/cm}^3$), m_{Scaffold} e v_{Scaffold} são a massa medida em (g) e o volume calculado em (cm^3) dos *scaffolds*. A média de 6 amostras de cada um dos *scaffolds* foram pesados e medidos com os instrumentos, balança analítica (Shimadzu, AUY 220) e paquímetro digital (Mitutoyo, Digimatic Absolute SD).

4.2.2 Análise por Difração de Raios-X (DRX)

A determinação das fases cristalinas presentes nos *scaffolds*, foi realizada utilizando um difratômetro de raio X (*Panalytical X'Pert* PRO MPD 3060, Almelo,

Holanda) equipado com detector *X'celerator* e operando com 40kV e 30mA e radiação CuK α . Foram coletados os padrões de 20° a 40° no eixo 2 θ . Em temperatura ambiente, os *scaffolds* foram previamente macerados até a formação de um pó e secas em dessecador por 24h. Esta análise foi realizada no Laboratório de Difração de Raios X – Unifesp, São José dos Campos, SP.

4.3 Grupos experimentais

Após a confecção, os *scaffolds* foram divididos em grupos de acordo com a sua composição final, β -TCP e β -TCP incorporado com biovidro (β -TCP/S53P4). *Scaffolds* de diferentes dimensões foram produzidas para os testes *in vitro* e *in vivo* (Figura 1). Nos testes *in vitro*, os *scaffolds* foram produzidos nas dimensões aproximadas de 7,0mm de diâmetro por 2,0mm de altura, com exceção dos *scaffolds* utilizadas no teste de PCR, cuja a dimensão foi 12mm de diâmetro por 2,0mm de altura. Nos testes *in vivo*, os *scaffolds* utilizados possuíam 4,0mm de diâmetro por 8,0mm de altura.

Figura 1 – Foto dos *scaffolds* β -TCP/S53P4



Legenda: Aspecto final dos *scaffolds*: a) *Scaffolds* utilizados para a etapa *in vitro*. b) *Scaffolds* utilizados exclusivamente nos testes de PCR. c) *Scaffolds* utilizados na etapa *in vivo*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Ensaios biológicos *in vitro*

Todos os procedimentos biológicos *in vitro* foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC) localizado 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. Previamente ao procedimento celular (*in vitro*), os *scaffolds* foram esterilizados, em luz ultravioleta (UV) em fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil) por 30 minutos.

4.4.1 Cultura de células

A linhagem celular de osteoblastos humano (MG63) foram obtidas do banco de células da Associação Técnico Científica *Paul Ehrlich* (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em frascos de cultura celular de 250mL e 75cm² (Sarstedt®, Numbrecht, Alemanha) com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Cultilab, São Paulo, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Cultilab, São Paulo, Brasil) e gentamicina (10mg/mL) (Gibco™, São Paulo, Brasil). As garrafas foram mantidas em estufa a temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, até a confluência celular, caracterizada pela ocupação de mais de 80% do frasco. Nesse período, o meio de cultura foi trocado totalmente a cada 48 horas e o desenvolvimento das células foi avaliado em microscópio óptico (modelo Axioskop 40, marca Carl Zeiss, Alemanha). Após a confluência celular, as células foram transferidas para outro frasco de cultura celular para serem subcultivadas. Neste momento, o meio de cultura foi descartado e foi realizada a lavagem com PBS (Gibco-Life Technologies). Após, foi adicionada tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies), afim de que as células se desprendessem do fundo do frasco de cultivo celular. Em seguida, o conteúdo de todo o frasco foi transferido para um tubo falcon e centrifugado em 3000rpm por 5 minutos à temperatura de 25°C (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, EUA). O

sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado no fundo do tubo falcon, foi ressuspensionado com meio de cultura novo (DMEM) e depositados em um novo frasco de cultivo celular.

Após o subcultivo das células e da expansão celular, realizou-se o plaqueamento das células, no qual foi necessário, repetir o procedimento acima descrito. Contudo, após a formação do *pellet*, as células foram quantificadas manualmente em câmara de Neubauer (hemocitômetro) (Prolab, São Paulo, Brasil) e plaqueadas em placas de 48 poços (Sarstedt®, Numbrecht, Alemanha) na densidade celular de 15.000 células/poço para os testes descritos a seguir, exceto para o teste de expressão gênica. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-5, com três repetições dos experimentos e cinco *scaffolds* para cada teste, em cada repetição.

4.4.2 Citotoxicidade celular (MTT)

A citotoxicidade celular foi determinada pela avaliação da quantificação de células vivas, após a incubação com o corante MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Após períodos de 3 e 7 dias, alíquotas de MTT a 0,5 mg/mL em meio DMEM foram preparadas, e foi realizada a incubação das células plaqueadas com os *scaffolds* com esta solução por 4 horas. Posteriormente, as culturas foram lavadas com PBS e foi adicionado DMSO (Dimethyl Sulfoxide) em cada poço, sob agitação, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 100µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Costar Corning®, EUA) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (EL808IU Biotek Instruments, Winooski, EUA). As densidades ópticas obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular.

4.4.3 Análise da interação celular

A interação entre os *scaffolds* e as células foi avaliada pela análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após o período de 5 dias de cultura, os *scaffolds* foram fixados com a solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5%, tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.4) à temperatura ambiente durante 2 horas, posteriormente os *scaffolds* foram desidratadas nas seguintes concentrações de etanol (30%, 40%, 50%, 70% e 100%). Previamente a análise, os *scaffolds* foram revestidos com uma fina camada de ouro por meio de metalização, em seguida, a interação entre os *scaffolds* e as células foram analisadas e fotografadas pelo microscópio da marca Zeiss, modelo EVO MA10 da Universidade do Vale do Paraíba/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (UNIVAP-IP&D).

4.4.4 Análise da morfologia celular por fluorescência direta

As células foram incubados por 3 dias em meio DMEM. As células foram fixadas e bloqueadas com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os filamentos de actina foram corados por Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen Eugene, Oregon, EUA), durante a incubação de 20 minutos ao abrigo da luz. Os núcleos das células foram contrastados com Fluorshield com DAPI (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). As imagens foram capturadas por filtros do microscópio de fluorescência (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axionvert 40C, Alemanha).

4.4.5 Conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi determinado a partir do método modificado de Lowry et al. (1951). Aos 7 e 14 dias de cultura, lisados de células foram adicionados aos reagentes de Lowry (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). A absorbância correspondente as proteínas foram medidas a 690 nm em leitor de microplaca (EL808IU Biotek Instruments, Winooski, EUA). Os dados foram expressos como a densidade óptica.

4.4.6 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada após 7 e 14 dias de cultura celular, nos mesmos lisados utilizados para quantificar a proteína total, 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). A absorbância foi medida em leitor de microplaca (EL808IU Biotek Instruments, Winooski, EUA) utilizando comprimento de onda de 590 nm.

4.4.7 Análise da formação de nódulos de mineralização e quantificação de cálcio

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 14 dias de cultura de células. Previamente, as células foram lavadas com solução de Hank's (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e fixadas com álcool 70% durante 1 hora à 4°C. Após remoção do álcool, os poços foram corados durante 15 minutos, com o corante vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), pH 4,2, o qual cora áreas ricas em cálcio. Avaliou em microscópica óptica, de luz invertida, a formação

de nódulos de mineralização (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Alemanha).

A quantificação das formações mineralizadas foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004). No qual, após 24h ao procedimento anterior, foram adicionados sobre aos poços, a solução de ácido acético e posteriormente hidróxido de amônia 10%. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (EL808IU Biotek Instruments, Winooski, EUA), sob o comprimento de onda de 405 nm.

4.4.8 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

As células foram plaqueadas na densidade de 100.000 células/poço, sobre a superfície dos *scaffolds* posicionados no interior dos poços de placas de 6 poços. Em cada poço foram adicionadas quatro unidades dos *scaffolds* nos quais foram cultivadas no período de 7 dias, em duplicata. Para a análise de expressão gênica foram utilizados genes envolvidos na osteogênese, conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1 – Descrição das sequências dos *primers foward/reverse* dos genes

(continua)

Genes	Sequência foward/reverse	TM (°C)	PB	Ref. Fast Pubmed
Actβ	F: AAAGTGGAAACGGTGAAGGTG	54.4	206	NM_001101.3
	R: GTGGACTTGGGAGAGGACTG	57.2		
Bglap	F: GAGTCAACGGATTTGGTCGT	52.5	201	NM_002046.6
	R: TGGGATTTCCATTGATGAAC	48.7		
Col-1	F: ACAGCCGCTTCACCTACAGC	60.1	85	NM_000088.3
	R:GTTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC	55.0		

Quadro 1 – Descrição das sequências dos *primers forward/reverse* dos genes

(conclusão)

Genes	Sequência forward/reverse	TM (°C)	PB	Ref. Fast Pubmed
Itg β1	F: TTCTTCCTGGACTATTGAAAT R: AGAAACTCTCATCATGCTCATT	48.9 51.9	100	NM_002211.3
M-csf	F: GAGCTGCTTCACCAAGGATTATG R: TCTTGACCTTCTCCAGCAACTG	55.9 56.9	92	NM_172211.3
Osn	F: ACTGGCTCAAGAACGTCCTGGT R: TCATGGATCTTCTTCACCCGC	60.7 57.1	97	NM_003118.3
Osp	F: AGACACATATGATGGCCGAGG R: GGCCTTGTATGCACCATTCAA	56.7 55.9	154	NM_001251830.1
PgE₂	F: GAAGAAGGCCTTTGCCAA R: GGAAGACCAGGAAGTGCA	53.2 54.6	200	NM_004878.4
Runx2	F: GAACTGGGCCCTTTTTCAGA R: CACTCTGGCTTTGGGAAGAG	55.3 55.6	208	NM_001015051
Tgf-β1	F: TTTGATGTCACCGGAGTTGTG R: GCGAAAGCCCTCAATTTCC	55.4 54.6	63	NM_000660.4

Legenda: Act β : β actina. TM: Temperatura de *Melting*. PB: Tamanho do produto (pares de base).
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.8.1 Extração do RNA

Para a extração do RNA total destas células foi utilizado 1 mL de Trizol (Ambion®, Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California, EUA), e o protocolo foi realizado conforme as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA foi armazenado a -80°C.

As concentrações e purezas das amostras de RNA posteriormente foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro *Nano Drop 2000* (Thermo Fisher Scientific Inc. - Wilmington, DE 19810, EUA). Assim como, a qualidade e a integridade do RNA foram avaliadas em gel de agarose (*Ultrapure Agarose* Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 0,5x TBE por eletroforese, corado com brometo de etídeo (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

4.4.8.2 Síntese de DNA complementar

A síntese de cDNA foi realizada com reações de transcrição reversa seguindo instruções do fabricante do Kit comercial *SuperScript™ III, First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen Life Technologies Corporation-Van Allen Way, Carlsbad, California, EUA). Foram utilizados 500ng de RNA total, 1µL de *random hexamers* 50ng/µL, 1µL de *annealing buffer* e água DPEC para completar volume de 8µL. Incubação por 65°C por 5 min e imediata incubação em gelo por 1 min. Então foi adicionado 10µL de *2X First-Strand Reaction Mix* e 2µL de *SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix*, homogeneização em vórtex, rapidamente centrifugação e incubação por 5 min à 25°C e 50 min à 50°C. Para finalizar, incubação à 85°C por 5 min e armazenamento do cDNA a -20°C.

4.4.8.3 Amplificação gênica por RT-PCR

O cDNA foi utilizado para o RT-PCR com o sistema de termociclador detecção *Step One Plus Time PCR System* (Thermofisher Scientific Inc Waltham, Massachusetts, EUA) utilizando o sistema *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen Life Technologies Corporation-Van Allen Way, Carlsbad, California, EUA). *Primers* específicos e 2µL de cDNA foram utilizados em cada reação. Cada amostra foi avaliada em duplicata. As condições padronizadas da RT-PCR foram otimizadas com as curvas de eficiência, sempre baseadas nas sugestões do

fabricante do *SYBR Green* e nas temperaturas de *melting* dos *primers* com uma amostra calibrador. As amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase em tempo real para o gene constitutivo proposto, Beta-actina.

Após determinação dos padrões da RT-PCR, os valores de Ct das amostras foram utilizados nos cálculos a seguir (Livak & Schmittgen 2001). A média das duplicatas biológicas de cada gene foi calculada para todas as amostras e subtraído o Ct do gene constitutivo: $\Delta Ct = Ct(\text{gene}) - Ct(\text{constitutivo})$. O ΔCt subtraído da amostra calibrador resultando em $\Delta\Delta Ct$: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct(\text{calibrador})$. Então a quantificação relativa (RQ - *Relative Quantification*) foi calculada para cada gene em cada amostra com base na seguinte fórmula:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.5 Ensaios biológicos *in vivo*

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos/Unesp (ANEXO A), e foi desenvolvido de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA). Os realizados nos procedimentos para o estudo *in vivo* seguiram as diretrizes ARRIVE (Percie Du Sertid et al., 2020).

4.5.1 Procedimento cirúrgico

Para este estudo foram utilizados 5 coelhos albinos, machos, da raça Nova Zelândia, pesando cerca de 4,0kg, com 5 meses de idade, os quais receberam dois *scaffolds* em cada tíbia, divididos de acordo com o material de fabricação: a) β -TCP; b) β -TCP incorporado com biovidro.

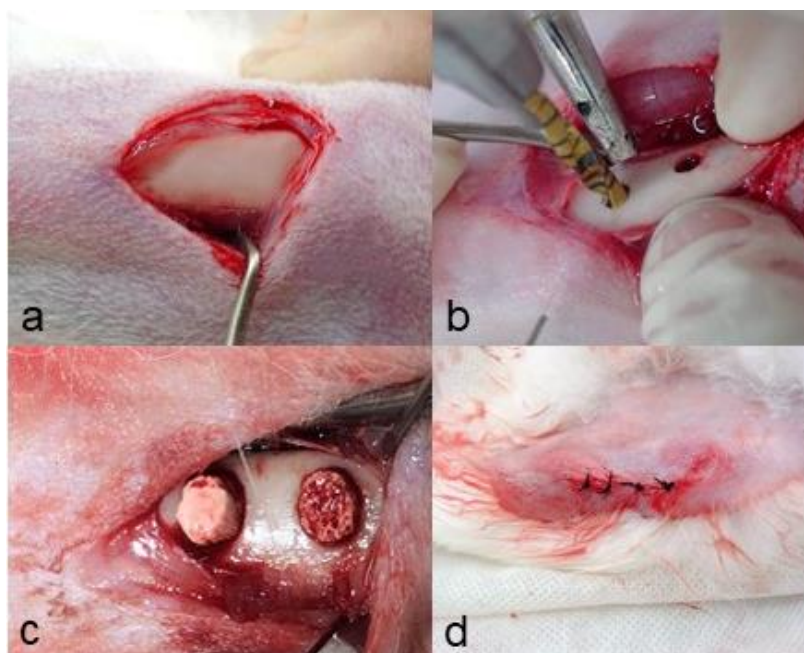
As cirurgias foram realizadas em sala cuidadosamente limpa, com álcool etílico na concentração de 70%; com instrumentos devidamente esterilizados. O cirurgião e auxiliares utilizaram aventais esterilizados e materiais descartáveis (máscaras, luvas estéreis). Os animais foram pesados e anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina a 2% (2mg/100mL) - (Anasedan® - Vetbrands, Jacaréi - Brasil) e cloridrato de ketamina 1,16g/10mL (Dopalen® – Vetbrands, Jacaréi - Brasil). Após anestesia e antissepsia, com solução de álcool iodado, na região medial da tíbia dos coelhos, a cirurgia para instalação dos *scaffolds* foi iniciada. A incisão foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região correspondente à face medial da tíbia em seu terço proximal. Conforme demonstrada na (Figura 2), a cortical da tíbia foi exposta e foram realizadas as lojas cirúrgicas. A perfuração para instalação dos *scaffolds* foi realizada com a sequência de brocas até o diâmetro final de 4,0mm. Durante todo este procedimento foi mantida irrigação abundante com cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, visando evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso. Foram realizadas duas perfurações de 4,0mm em cada tíbia, totalizando 04 perfurações por animal, sendo que as tíbias esquerdas receberam os *scaffolds* β -TCP e as tíbias direitas receberam os *scaffolds* β -TCP incorporado com biovidro.

Após o procedimento cirúrgico de colocação dos *scaffolds*, o tecido muscular e a pele foram suturados com fio de seda nº4 (Ethicon/Johnson & Johnson) e novamente foi realizada antissepsia com álcool iodado. Os animais receberam terapia antibiótica, por meio da administração da solução composta por Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica, Diidroestreptomicina base (sulfato) e Estreptomicina base (sulfato), em ampola de 6.000.000UI (Pentabiótico® Veterinário Reforçado – Fort Dodge), por via intramuscular na dose de 1,35mL/kg, no pós-operatório imediato. Os animais também receberam medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos por 5 dias. Foram administrados o anti-inflamatório meloxicam e o analgésico opioide cloridrato de tramadol, 1 vez via subcutânea e 2 vezes ao dia via oral, respectivamente.

Após a cirurgia, os coelhos foram colocados em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum* e monitorados até o prazo da eutanásia de 21 dias. Para a eutanásia, os animais foram submetidos à anestesia geral profunda e posterior

sangria. As tíbias foram retiradas e imediatamente fixadas em formol tamponado para serem submetidas à análise histológica e histomorfométrica.

Figura 2 – Procedimento cirúrgico nos animais



Legenda: Procedimento cirúrgico: a) cortical óssea da tíbia do coelho; b) confecção das perfurações na cortical óssea utilizando broca cirúrgica; c) *Scaffolds* já implantados na região do defeito ósseo; d) região cirúrgica suturada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.2 Processamento e análise histológica descritiva

Após as eutanásias, as peças foram fixadas em formol tamponado por um período mínimo de 48 horas e submetidas à descalcificação com ácido fórmico a 20%, por cerca de 4 meses no laboratório de Tecido Ósseo do ICT/Unesp. Inicialmente, os espécimes contendo a área do defeito ósseo preenchida com os *scaffolds* foram seccionados em fragmentos simétricos no seu longo eixo e estes foram incluídos em blocos de parafina, totalizando dois blocos (a e b) de cada espécime. Em seguida, os blocos foram submetidos às técnicas laboratoriais de rotina para o preparo das lâminas histológicas. Em cada bloco foram realizados

cortes semi-seriados 5µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina.

Para análise histológica descritiva foram selecionadas duas lâminas representativas de cada grupo. A captura das imagens das lâminas foi realizada em microscópio de luz Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss do Brasil), com câmera digital acoplada Canon, modelo *Power Shot A640*, foram realizadas montagens de micrografias em forma de fotografias panorâmicas, por meio do programa computacional AxioVision Release 4.7.2. Na análise histológica descritiva, foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, avaliando-se a formação do tecido de granulação, a neoformação óssea, o arranjo de trabéculas ósseas imaturas e a maturação óssea até a remodelação final.

4.5.3 Análise histomorfométrica

Foram analisadas 50 lâminas histológicas para cada *scaffold*, totalizando 100 lâminas histológicas. Foi utilizado o microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha). Foram obtidas imagens digitais (formato JPEG) com aumento de 5X na região do defeito, como critério de padronização, a região localizada logo abaixo das corticais pré-existentes do defeito ósseo do osso da tíbia, foi pré-estabelecida. Um observador, devidamente calibrado, identificou as áreas de neoformação, por análise cega dos grupos.

A área preenchida pelo tecido de reparação óssea neoformado, foi quantificada usando o programa de processamento de imagem de domínio público *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Foi calculada a média da neoformação óssea (em μm^2) ocorrida nas áreas dos blocos (a e b). Resultando na média da neoformação óssea em cada um dos grupos pertencente aos *scaffolds*. Os dados obtidos foram plotados usando o software *GraphPad Prism8*[®].

4.6 Ensaio de atividade antibiofilme

4.6.1 Cepas de micro-organismo

Foram utilizadas cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *C. albicans* (ATCC 18804), *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *S. aureus* (ATCC 6538), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia (ICT – UNESP), São José dos Campos, SP, que estavam armazenadas em freezer -80°C.

4.6.2 Crescimento, manutenção e preparo dos micro-organismos

Para ativação desses micro-organismos, as cepas foram cultivadas em ágar *Brain Heart Infusion* - BHI (Himedia, Mumbai, Índia) com 24h de incubação à 37°C. Posteriormente, a partir de culturas crescidas, foram preparadas as suspensões microbianas. As colônias foram diluídas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e padronizadas a 10^7 de UFC/mL em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil), de acordo com o comprimento de onda e densidade óptica de cada micro-organismo.

Previamente a formação do biofilme monomicrobiano de *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, os *scaffolds* foram esterilizados em luz UV em fluxo laminar e distribuídos em cada poço da placa de 48 poços (Kasvi, Paraná, Brasil), sendo n=05 por grupo experimental. Foi realizado um grupo controle de crescimento de cada um dos micro-organismos, sem a presença dos *scaffolds*. Foram adicionados 150 µL/poço de cada suspensão microbiana padronizada e nutridos com 150 µL/poço de caldo BHI. O meio de cultura foi renovado em 24h. Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48h.

4.6.3 Ensaio

Após quarenta e oito horas de incubação, o meio de cultura foi removido e os *scaffolds* lavados com NaCl 0,9%, a fim de eliminar as células não aderidas ao biofilme. Em seguida, sobre a camada de biofilme aderente que se formou, foi adicionado à solução de MTT 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Após 1h de incubação, sob proteção da luz, esta solução foi removida e, adicionado DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), onde, permaneceu em agitação em mesa orbital por 10 min. Em seguida foram transferidas, para placa de 96 poços (Costar Corning®, EUA), alíquotas de 100 µL de cada poço e realizada leitura da absorbância em um leitor de microplacas (Biotek, modelo ELx808cse), em 570 nm.

4.7 Análise dos resultados

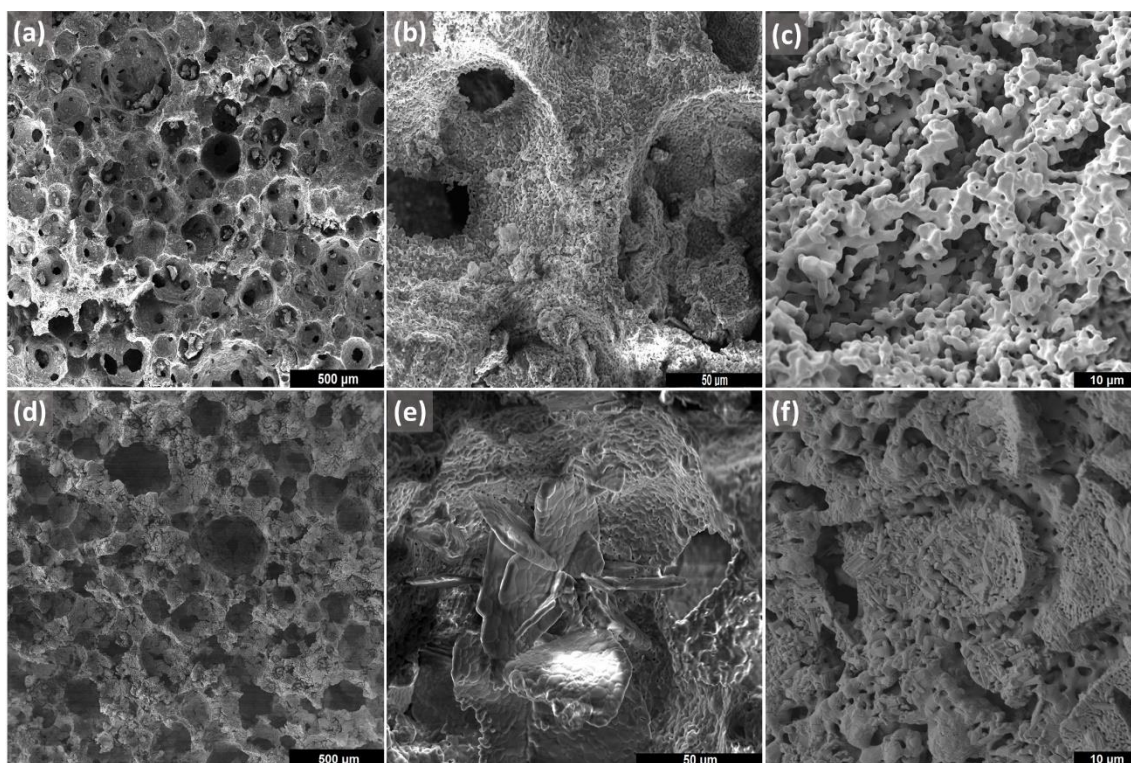
Os dados obtidos nesta pesquisa foram analisados estatisticamente pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e passaram no teste de normalidade. Os resultados para o ensaio de viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina, quantificação de cálcio, análise de expressão gênica por RT-PCR e análise histomorfométrica dos dois diferentes *scaffolds*, β -TCP e β -TCP incorporado ao biovidro S53P4, foram feitas por meio do teste t *Student* para amostras independentes. No ensaio de atividade antibiofilme os resultados foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey. Para todos os testes, foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). A elaboração dos gráficos, foram realizados a partir do software *GraphPad Prism8*®.

5 RESULTADO

5.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias dos *scaffolds* β -TCP e β -TCP/ 53P4 foram obtidas por MEV, (Figura 3) e observou-se em ambos os *scaffolds* uma macroestrutura porosa homogênea formada por uma rede de poros esféricos e interconectados. As estruturas apresentaram porosidade média para β -TCP 76% e 79% em β -TCP/53P4, com tamanhos dos poros variando (195 μ m para β -TCP e 148 μ m para β -TCP/53P4).

Figura 3 – Micrografias obtida por microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds*



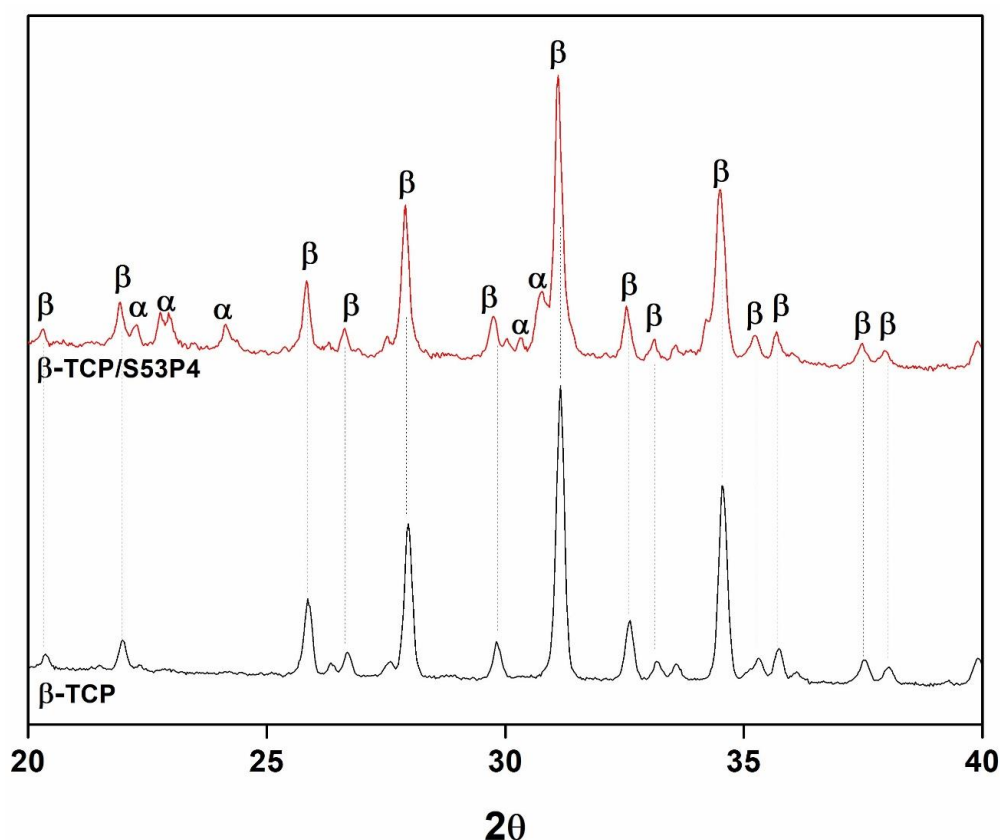
Legenda: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds*: β -TCP – ampliações 100x, 2000x e 5000x (a), (b) e (c); β -TCP/ 53P4 – ampliações 100x, 2000x e 5000x (d), (e) e (f).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Análise por Difração de Raio-X (DRX)

A figura 4 indica que o *scaffold* β -TCP apresentou apenas picos da fase β -TCP (JCPDS 00-009-0169). O difratograma do *scaffold* β -TCP/53P4 apresentou a fase β -TCP e novos picos da fase α -TCP (JCPDS 00-009-0348). Foram encontrados também alguns picos das fases combeíta ($\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2$, JCPDS 00-022-1455) e wollastonita (CaSiO_3 , JCPDS 00-027-0088).

Figura 4 – Difratomogramas dos *scaffolds*: β -TCP e β - TCP/ 53P4

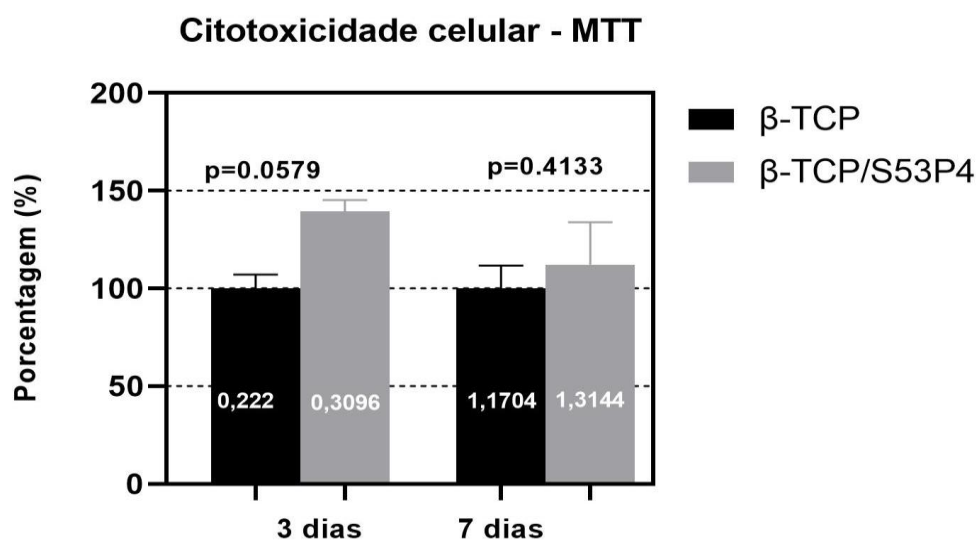


Legenda: Análise por Difração em Raio-X. α : α -TCP; β : β - TCP.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Citotoxicidade celular

A viabilidade celular em células MG63 foi mensurada em diferentes *scaffolds* obtidos dos materiais β -TCP e β -TCP incorporado com biovidro. Na figura 5 observa-se os valores da densidade óptica convertidos em porcentagem após o teste de citotoxicidade celular nos diferentes *scaffolds*. Os *scaffolds* β -TCP/S53P4, não mostraram efeito tóxico na linhagem celular de osteoblastos MG63 em relação ao β -TCP. Contudo, foi verificado aumento da viabilidade celular, a partir, da incorporação do biovidro ao β -TCP, em ambos os períodos, porém sem diferença estatística entre β -TCP e β -TCP/S53P4 ($p > 0,05$).

Figura 5 – Gráfico de média e desvio padrão ($\pm$) dos valores obtidos no teste de citotoxicidade celular em 3 e 7 dias de cultura celular



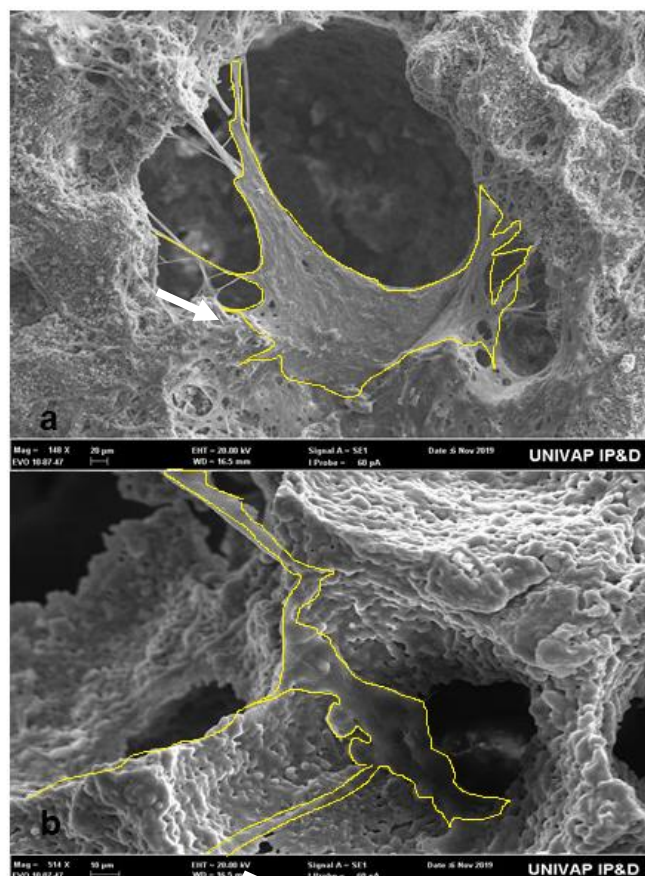
Legenda: Teste t *Student*. ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Interação celular

Após 5 dias de cultivo, a interação das células MG63 com os materiais foi analisada por MEV, a interação celular sobre a superfície dos *scaffolds*, de acordo com a figura 6. Nota-se que as células aderidas aos *scaffolds* exibem morfologia alongada, evidenciando a interação com os *scaffolds*.

Figura 6 – Micrografias MEV da interação da linhagem MG63 em superfície dos *scaffolds*



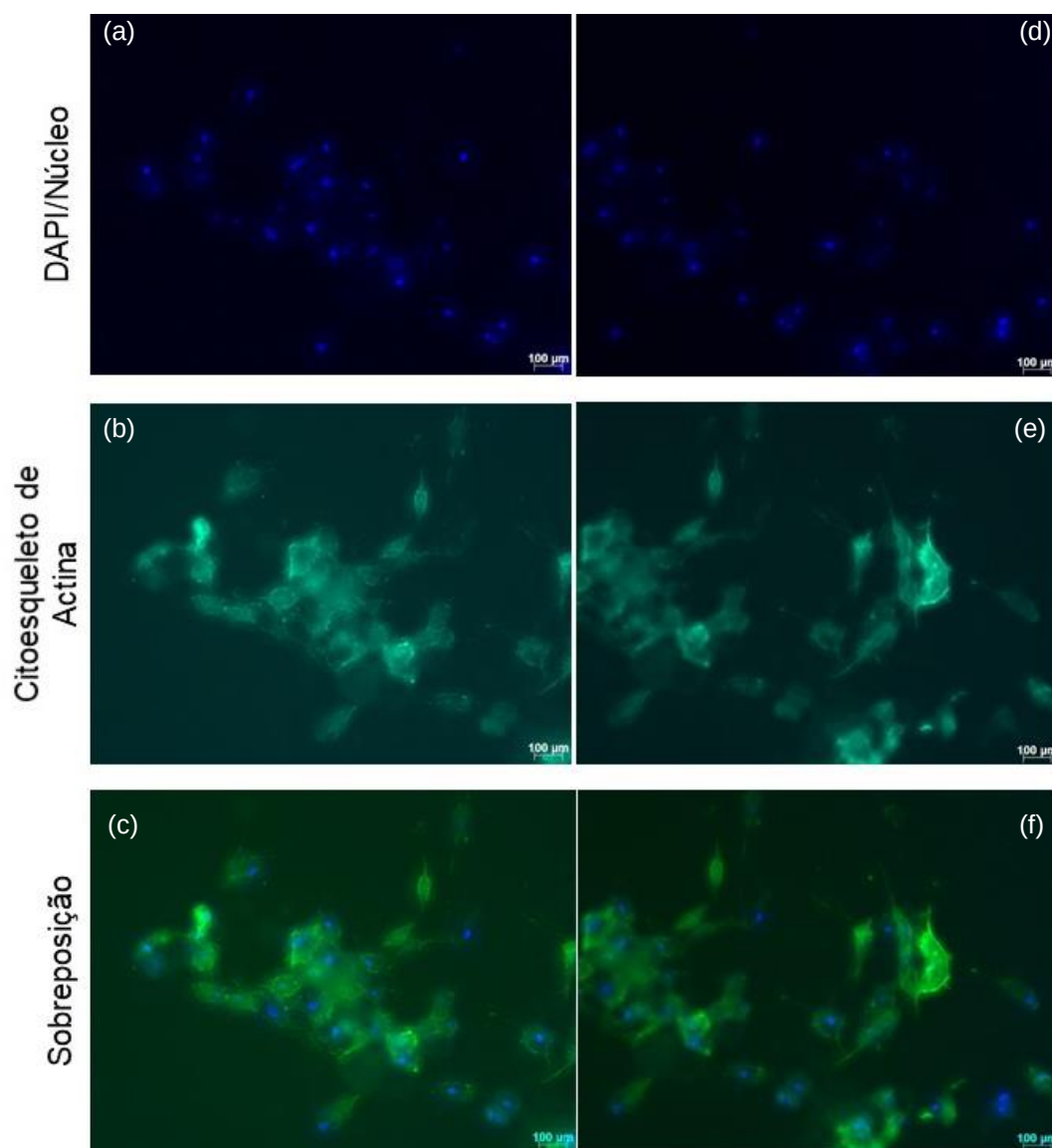
Legenda: Imagens de MEV dos *scaffolds* após interação com as células MG63, período de 5 dias: a) células aderidas à superfície dos *scaffolds* β -TCP - ampliação 140X; b) células aderidas à superfície dos *scaffolds* β -TCP/ 53P4 - ampliação 500x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Análise da morfologia celular por fluorescência direta

Na figura 7 observa-se que as células em contato com os *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4 demonstraram filamentos alongados de actina, confirmando uma condição normal para as células em ambas as amostras testadas.

Figura 7 - Imagem de filamentos de actina com Alexa Fluor 488 Phalloidin e sobreposição de núcleos com DAPI em células MG63



Legenda: (a), (b) e (c) *scaffolds* β -TCP. *Scaffolds* β -TCP/53P4 (d), (e) e (f).

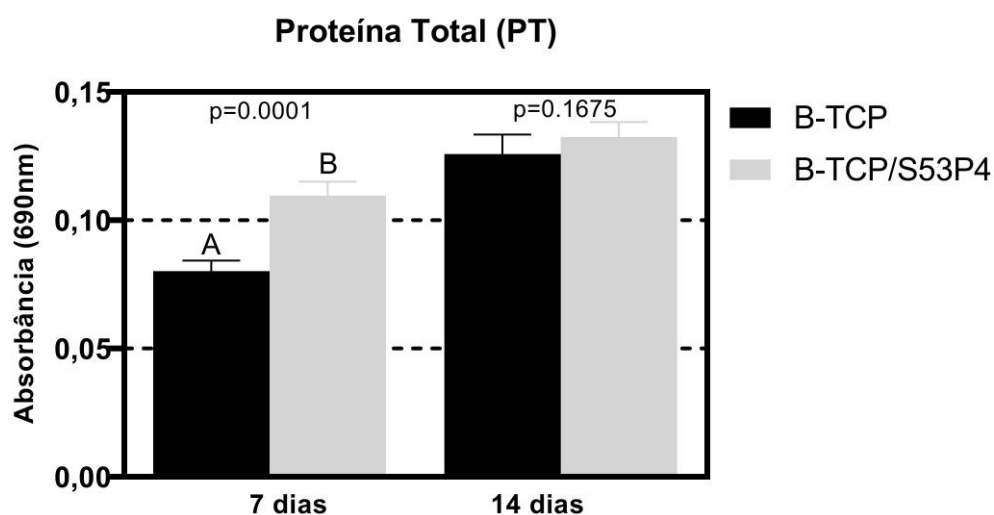
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Conteúdo de proteína total

Após realizar o teste de proteína total, nos períodos de 7 e 14 dias de cultura celular, os valores obtidos em absorbância da concentração de proteínas em células MG63, plaqueadas sobre os *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4, foram submetidos ao

teste estatístico *t Student*. Os resultados mostraram que os *scaffolds* β -TCP/S53P4, expressaram maior produção de proteína total em relação aos *scaffolds* β -TCP no período de 7 dias, sendo significativamente maior ($p < 0,05$). Aos 14 dias, embora o *scaffold* β -TCP/S53P4 tenha exibido novamente maior valor, este não apresentou diferença estatística com o *scaffold* β -TCP ($p > 0,05$), como indica a figura 8.

Figura 8 – Gráfico de média e desvio padrão ($\pm$) dos valores obtidos no teste de proteína total (PT) em 7 e 14 dias de cultura celular

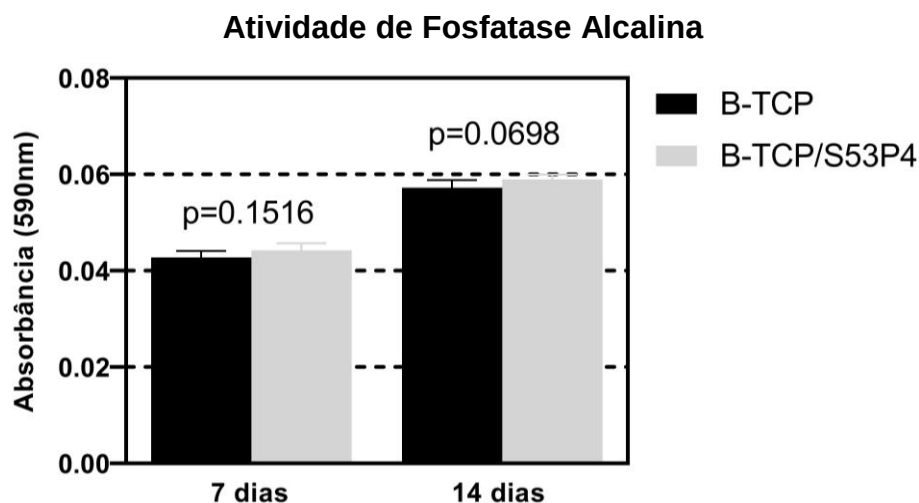


Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Teste *t Student*.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados utilizados na avaliação da proteína total, nos períodos de 7 e 14 dias de cultivo celular (MG63). Os dados expressos na produção da atividade de ALP, estão demonstrados na figura 9. Foi observado que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre β -TCP e β -TCP/S53P4 independente do período de 7 e 14 dias de cultura.

Figura 9 – Gráfico de média e desvio padrão ($\pm$) dos valores obtidos no teste de fosfatase alcalina (ALP) em 7 e 14 dias de cultura celular



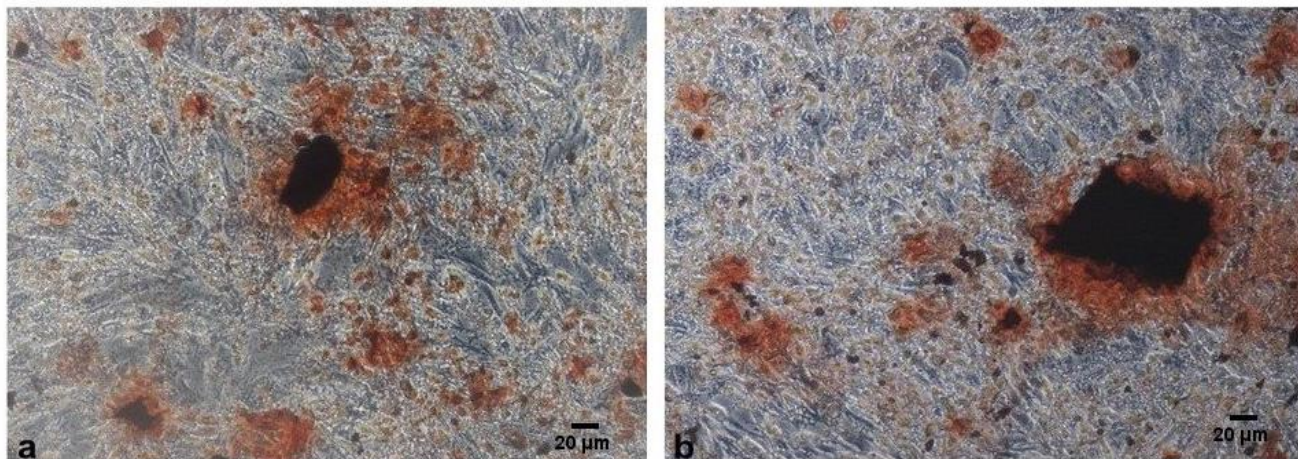
Legenda: Teste t *Student*. ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.8 Análise da formação de nódulos de mineralização e quantificação de cálcio

A figura 10 ilustra a formação de nódulos mineralização em todos os grupos após 14 dias de cultura celular nos *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4. Os nódulos positivos foram corados com vermelho de alizarina e estão circundados por grande quantidade de células. Na figura 10b, podemos observar a estrutura dos nódulos de mineralização de tamanho maior no *scaffold* β -TCP/S53P4 em relação ao β -TCP.

Figura 10 – Imagens dos nódulos de mineralização

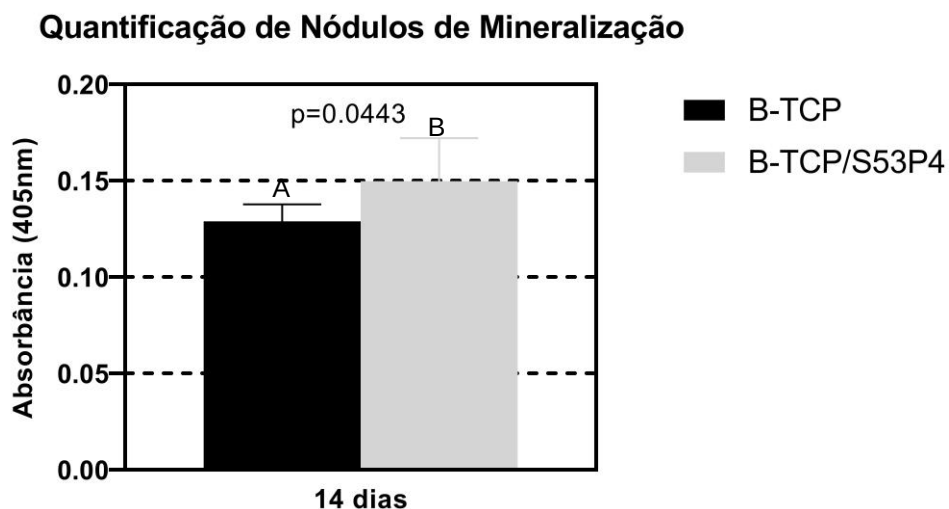


Legenda: a) β -TCP. b) β -TCP/S53P4.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a avaliação da formação de nódulos, que confirma a diferenciação celular e caracteriza o processo de mineralização, avaliou-se posteriormente a quantificação do cálcio presente nesses nódulos. O resultado desta quantificação foi obtido pela mensuração do corante extraído, pelo ácido acético expresso em absorbância. Foram comparados entre si os valores de cada um dos *scaffolds* por meio do teste t de *Student*. Como demonstrado na figura 11, os *scaffolds* β -TCP/S53P4, apresentaram maior quantidade de mineralização, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os *scaffolds* β -TCP.

Figura 11 – Gráfico de média e desvio padrão ($\pm$) dos valores obtidos no teste de nódulos de mineralização em 14 dias de cultura celular

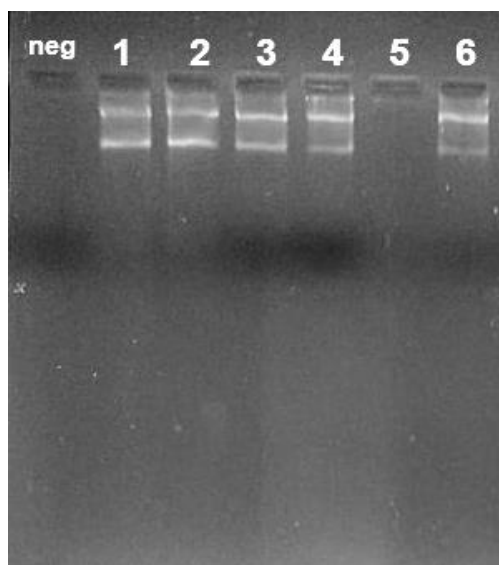


Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Teste t de *Student*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.9 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

Foi verificada a qualidade e a integridade do RNA em gel de agarose (Ultrpure Agarose Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por eletroforese, como representada na figura 12.

Figura 12 – Gel de agarose 2% corado por brometo de etídio, indicando a integridade do RNA extraído das amostras

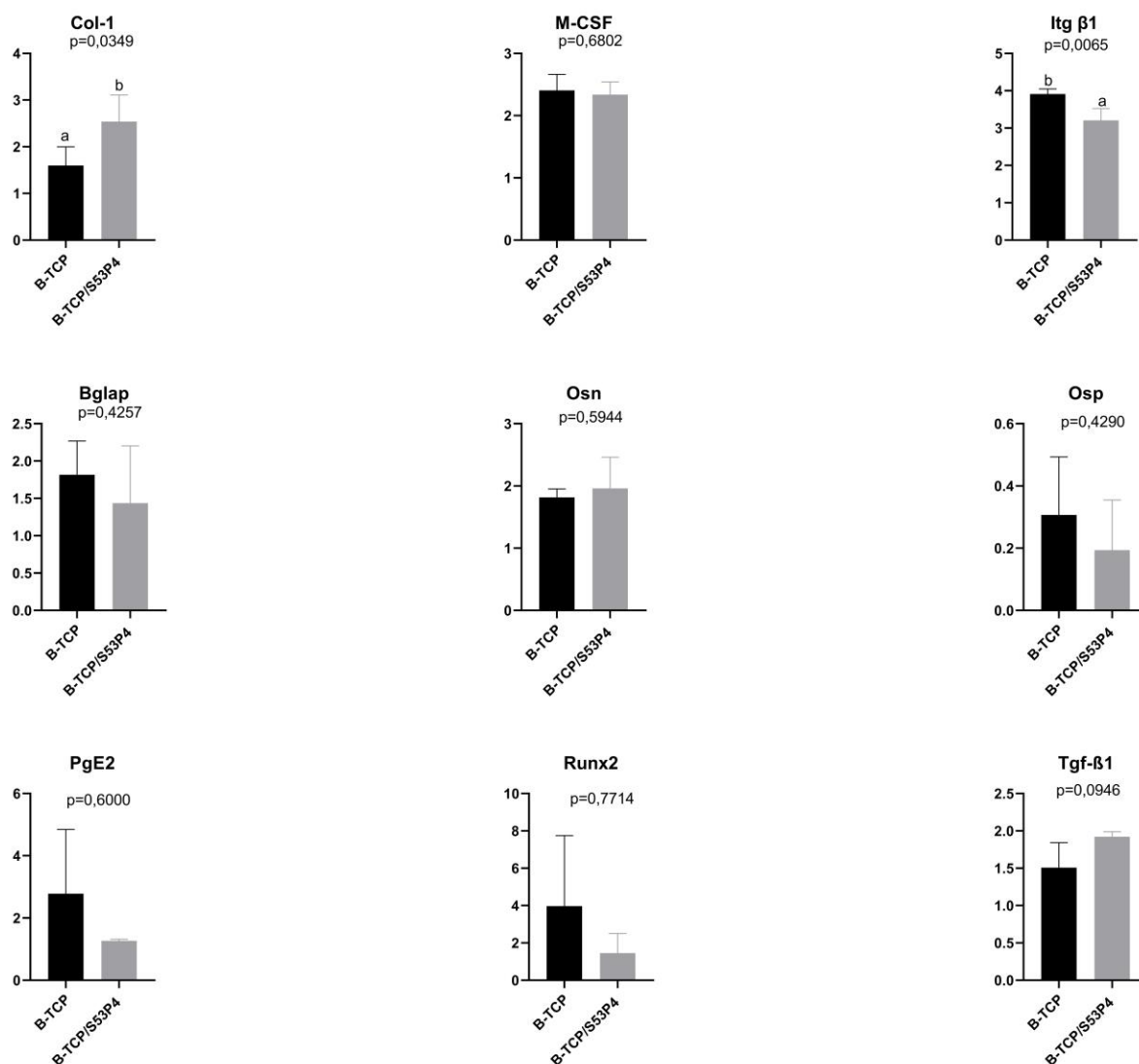


Legenda: Resultado da integridade do RNA total extraído de células MG63 após o cultivo de 7 dias. Neg – controle negativo da reação sem RNA; Amostra 1 – controle (a); Amostra 2 – controle (b); Amostra 3 - β -TCP (a); Amostra 4 - β -TCP (b); Amostra 5 - eliminada (a); Amostra 6 - β -TCP/S53P4 (b).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados da quantificação relativa da expressão gênica foram determinados, com base na fórmula $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ comparando com o gene constitutivo e portanto, menos variável, Beta-actina. A expressão relativa dos genes está demonstrada na figura 13.

Figura 13 – Gráfico de média e desvio padrão ($\pm$) dos valores obtidos no teste da quantificação relativa de cada gene em comparativo de $\Delta\Delta C_t$



Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Teste t de *Student*. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação aos níveis de expressão de Col-1, foi significativamente maior entre as células cultivadas em β -TCP/S53P4 em relação ao β -TCP, com diferença estatística ($p < 0,05$). A expressão dos genes Osn e Tgf- β 1, foi um pouco maior nos *scaffolds* β -TCP/S53P4 em relação aos *scaffolds* β -TCP, porém sem significância estatística ($p > 0,05$).

As células cultivadas em contato com os *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4 não mostraram diferença estatística ($p>0,05$) na expressão dos genes M-csf, Bglap, Osn, PgE₂ e Runx2. Por outro lado, o gene Itg β 1 apresentou maior aumento do nível de expressão em contato com os *scaffolds* β -TCP ($p<0,05$).

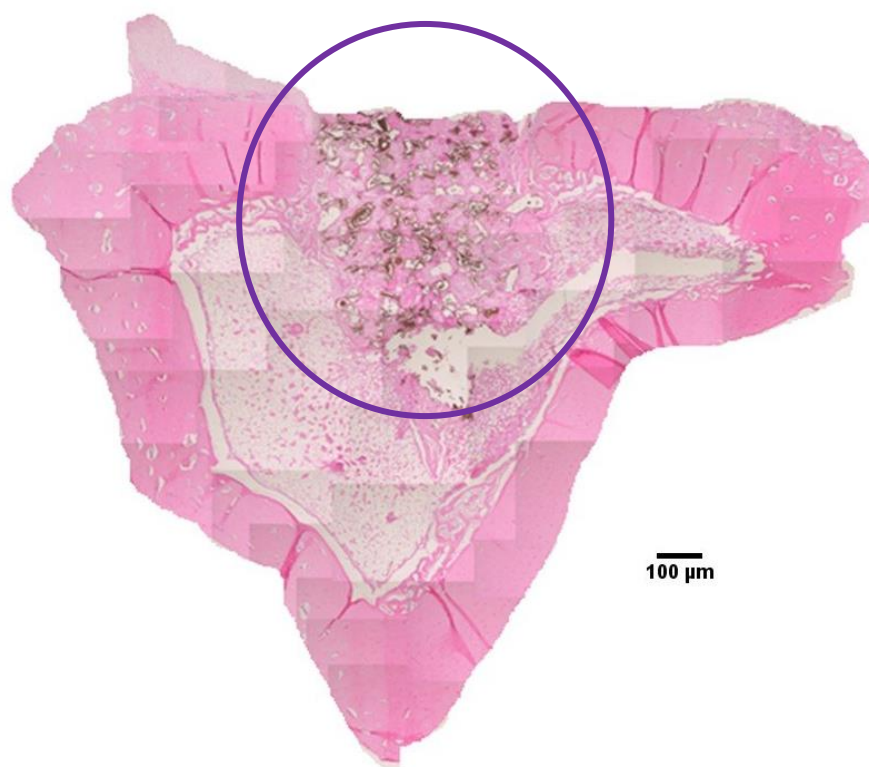
5.10 Análise histológica descritiva

Podemos observar que houve o reparo ósseo ao redor e no interior dos poros presentes nos *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4 (Figura 14-16). Foi demonstrada a formação de osso novo, por trabéculas ósseas na área do defeito ósseo.

Também foi possível observar a presença de espaços vazios, não preenchidos intercalados aos tecidos, que indicam áreas onde o *scaffold* estava presente antes da desmineralização.

Não foi observado infecção do tecido e nenhuma alteração ou reação clínica após a implantação cirúrgica dos *scaffolds* nos animais experimentais.

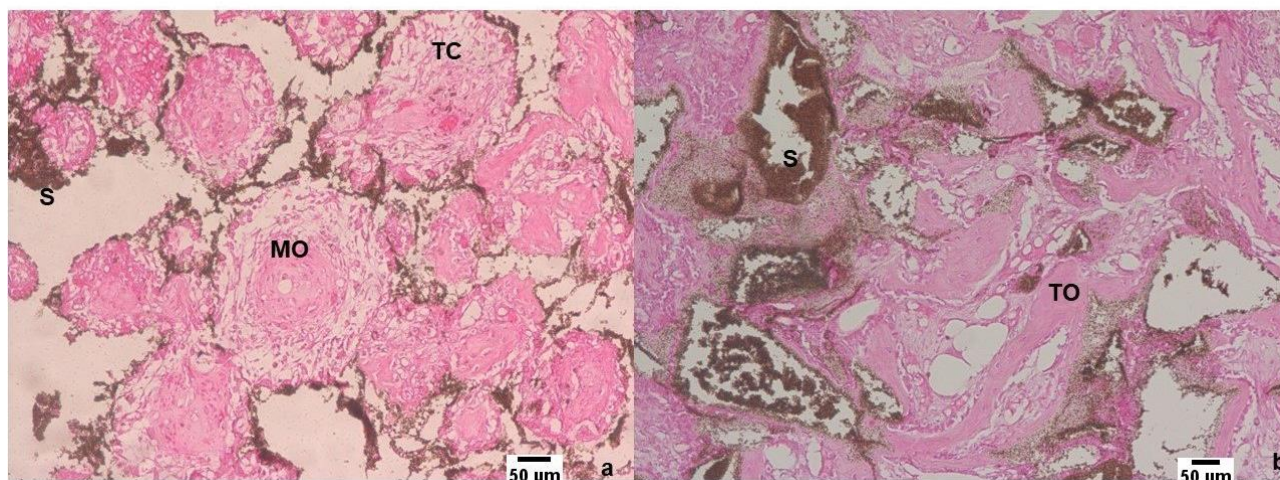
Figura 14 – Corte histológico observado no *scaffold* β -TCP (aumento 5X)



Legenda: Corte panorâmico ilustrando a área do defeito ósseo (área destacada), no qual foi inserido o *scaffold* de grupo β -TCP.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Corte histológico observado no *scaffold* β -TCP (aumento 10X)



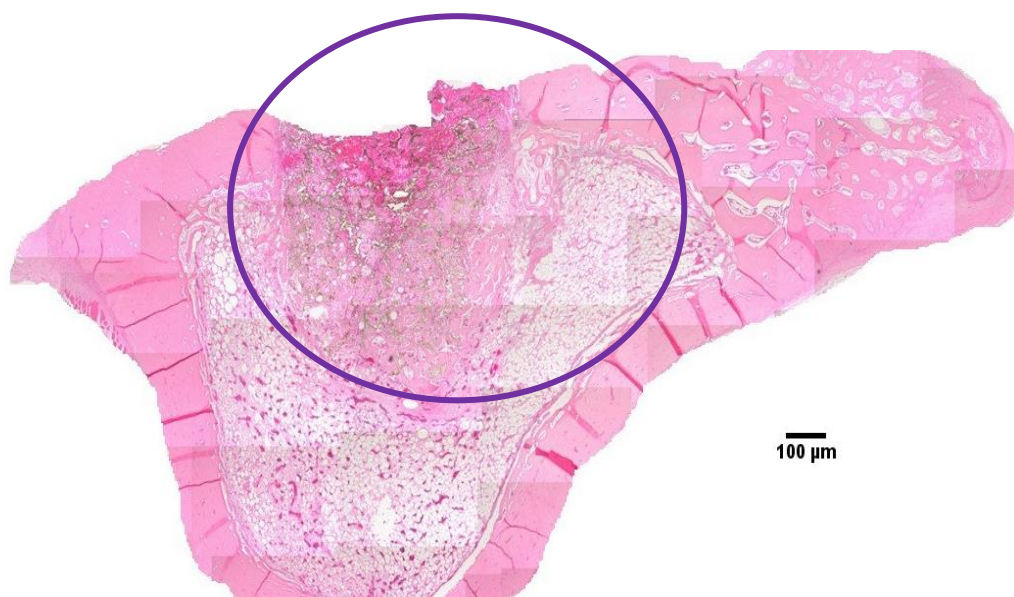
Legenda: Trabécula óssea neoformada (TO). Matriz osteoide (MO). Resíduos do *scaffold* (S). Tecido conjuntivo (TC).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 15a, na região interna do *scaffold* β -TCP verifica-se a deposição de matriz osteoide, formando pequenas ilhas. Observa-se a presença de tecido conjuntivo nos espaços entre o *scaffold* β -TCP. Foi possível notar áreas contendo resíduos do *scaffold*, evidenciada por áreas acastanhadas. Como também, foi possível observar a presença de espaços, representativos das áreas ocupadas pelo *scaffold*. Da mesma maneira, no *scaffold* β -TCP da figura 15b, nota-se a presença de grande quantidade de trabéculas ósseas. Nota-se a presença do *scaffold* envoltos por novo osso formado.

A figura 17, demonstra o contato direto do *scaffold* β -TCP/S53P4 próximo ao novo osso formado. É possível observar íntimo contato entre os espaços previamente ocupados pelo *scaffold* que foi degradado e as células. No interior das trabéculas ósseas neoformadas, há presença de osteócitos dentro das lacunas e na periferia verificam-se os osteoblastos, indicando favorável processo de formação de osso novo.

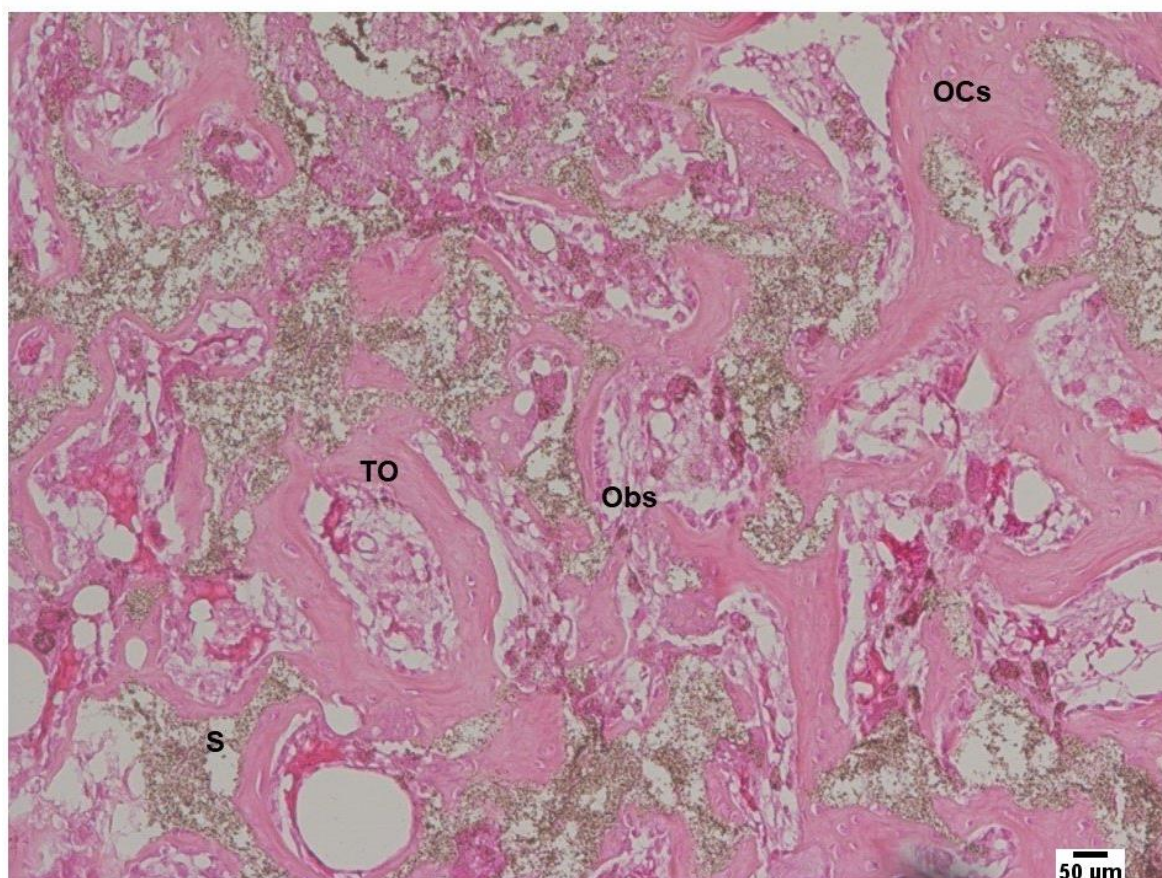
Figura 16 – Corte histológico observado no *scaffold* β -TCP/S53P4 (aumento 5X)



Legenda: Corte panorâmico ilustrando a área do defeito ósseo (área destacada), no qual foi inserido o *scaffold* β -TCP/S53P4.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Corte histológico observado no *scaffold* β -TCP/S53P4 (aumento 10X)



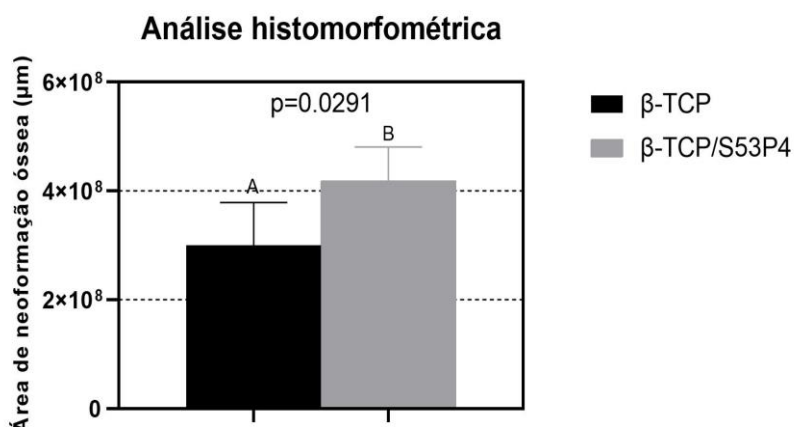
Legenda: Trabécula óssea (TO). Osteoblastos (Obs). Osteócitos (OCs). Resíduos do *scaffold* localizado próximo ao osso neoformado (S).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.11 Análise histomofométrica

O gráfico refere-se as médias dos dados da área de neoformação óssea (mm^2) e desvio-padrão nos diferentes grupos β -TCP e β -TCP/S53P4. Aos 21 dias o grupo β -TCP/S53P4 apresentou maior formação óssea na área do defeito, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao β -TCP.

Figura 18 – Gráfico de média e desvio padrão ($\pm$) dos valores obtidos na análise histomorfométrica (mm^2)



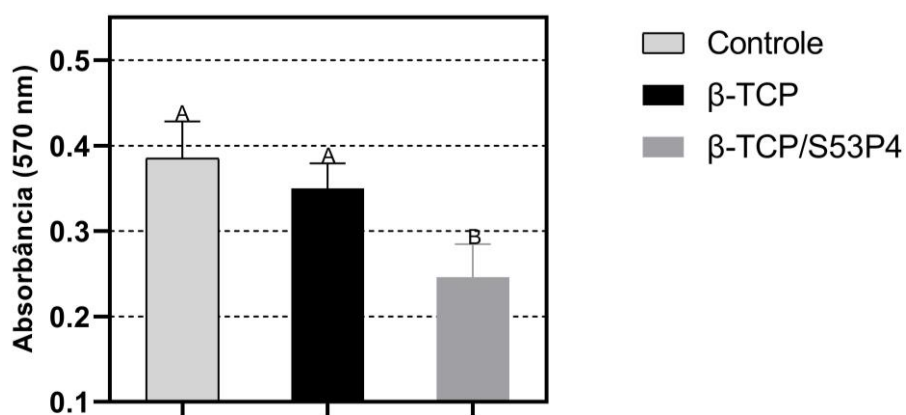
Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Teste t de Student.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.12 Ensaio de atividade antibiofilme

O potencial antibiofilme dos *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4, foi avaliado contra micro-organismos organizados em biofilme pelo método da viabilidade celular, utilizando o corante MTT. Após 48 horas de incubação dos micro-organismos, foi avaliada a viabilidade dos biofilmes formados a partir das cepas de *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* aderidas sobre as amostras (Figura 19-21).

Houve uma redução significativa de biofilme de *C. albicans* quando testados no *scaffold* β -TCP/S53P4 comparado os demais grupos ($p < 0,05$). Por outro lado, o *scaffold* β -TCP não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$) com o controle (Figura 19).

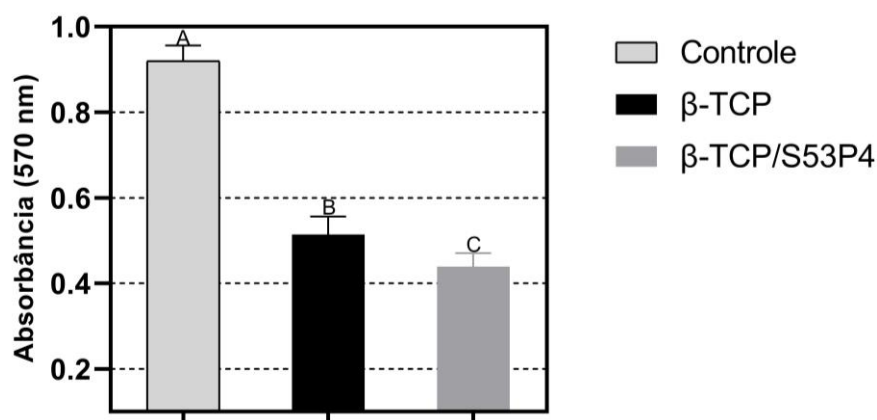
Figura 19 – Gráfico de média e desvio padrão ($\pm$) dos valores obtidos na atividade antibiofilme de *C. albicans* com os *scaffolds* β -TCP, β -TCP/S53P4 e grupo controle



Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). (ANOVA e Tukey test).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi observada a atividade antibiofilme dos *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4, uma vez que houve redução na formação de biofilme bacteriano *P. aeruginosa*, a qual apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao controle (Figura 20). Ao comparar β -TCP e β -TCP/S53P4, este último, aumentou a inibição da formação de biofilme, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

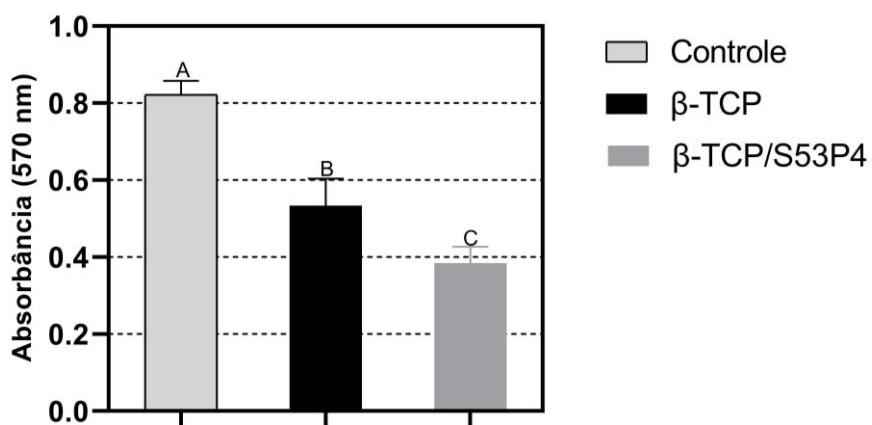
Figura 20 – Gráfico de média e desvio padrão ($\pm$) dos valores obtidos na atividade antibiofilme de *P. aeruginosa* com os scaffolds β -TCP, β -TCP/S53P4 e grupo controle



Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). (ANOVA e Tukey test).
Fonte: Elaborado pelo autor.

O scaffold β -TCP reduziu a formação de biofilme bacteriano *S. aureus*, com diferença estatística em relação aos grupos controle e β -TCP/S53P4 ($p < 0,05$). Ainda assim, o scaffold β -TCP/S53P4 demonstrou maior atividade antibiofilme contra cepa testada de *S. aureus*, sendo observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os scaffolds β -TCP e controle (Figura 21).

Figura 21– Gráfico de média e desvio padrão ($\pm$) dos valores obtidos na atividade antibiofilme de *S. aureus* com os *scaffolds* β -TCP, β -TCP/S53P4 e grupo controle



Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). (ANOVA e Tukey test).
Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Diversos biomateriais que podem ser utilizados como substitutos ósseos estão sendo pesquisados, como por exemplo, polímeros, alumina, biovidro e β -TCP (Camilo et al., 2017; Sarin et al., 2021; Titsinides et al., 2020; Zhao et al., 2021). O biomaterial adequado deve apresentar propriedades compatíveis com o tecido do hospedeiro (Chen, Liu, 2016). Adicionalmente, biomateriais que previnam infecções e possuam potencial antimicrobiano revolucionam pesquisas na engenharia de tecido ósseo.

A cerâmica β -TCP é um biomaterial que se destaca dos demais devido ao seu potencial osteogênico (Safronova et al., 2020; Titsinides et al., 2020). Neste estudo foi comparada a eficiência de *scaffolds* β -TCP e β -TCP/53P4 na osteogênese *in vitro* e na neoformação óssea *in vivo*, como também a influência na formação de biofilmes monotípicos.

Inicialmente, a análise de difração de raios-X viabilizou a identificação das fases presentes nos *scaffolds*. Assim, a interpretação dos difratogramas do *scaffold* β -TCP/53P4 permitiu a constatação além das fases presentes no β -TCP, de novos picos da fase α -TCP (JCPDS 00-009-0348). A formação desta fase pode ser relacionada à ação do biovidro incorporado, que reduz a temperatura de formação da fase α -TCP (Duncan et al., 2014; Pietak et al., 2007; Reid et al., 2005). Os picos encontrados das fases combeíta ($\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2$, JCPDS 00-022-1455) e wollastonita (CaSiO_3 , JCPDS 00-027-0088), são fases características da cristalização dos biovidros contendo Na^+ (Spirandeli et al., 2020). Os resultados deste estudo indicaram que a incorporação do biovidro nos *scaffolds* de β -TCP promoveu alterações na estrutura cristalina, promovendo a formação da fase α -TCP e dos silicatos. Estas alterações foram positivas para a bioatividade e biocompatibilidade dos *scaffolds* de β -TCP, os silicatos são fases cristalinas de elevada bioatividade e que induzem a formação de apatita *in vitro* e *in vivo* (Cacciotti et al., 2012; Juhasz et al., 2003).

A faixa de porosidade e o tamanho dos poros presentes nos *scaffolds* são importantes parâmetros para o osteogênese, uma vez que estão intimamente relacionados ao recrutamento celular, adesão, proliferação celular, assim como, a

permeabilidade dos nutrientes (Marew, Birhanu, 2021). No presente estudo foram identificadas as características morfológicas dos *scaffolds* por MEV, como estrutura altamente porosa e interconectada, semelhante ao osso trabecular. O tamanho dos poros no interior do *scaffold* produzidos neste presente estudo foi na faixa de 148 - 195 μm e podem ser induzidos por diferentes estratégias de produção de *scaffolds*, como liofilização, formação de gás, fundição de solvente/lixiviação de partículas, molde de emulsão e *electrospinning* (Zhao et al., 2020). Neste presente estudo os *scaffolds* foram provenientes da técnica *gel casting*, cujo o método é bastante vantajoso, pois possibilita a fabricação de uma variedade de cerâmicas e pela simplicidade do processo (Omatete et al., 1997). Além disso, esta técnica também permite a produção de elevada porosidade, poros esféricos e interconectados e boa resistência mecânica quando comparada a outros métodos (Abbas et al., 2015; Kokabi et al., 2006; Sousa et al., 2011). Existem relatos conflitantes na literatura sobre o tamanho ideal do poro. Roy et al. (2003), demonstraram adequada osteointegração em defeito de calvária de coelho com *scaffold* de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) e β -TCP com poros de diâmetro médio entre 125-150 μm . Posteriormente, Karageorgiou, Kaplan (2005), relataram que poros >300 μm são os recomendados, pois permitem maior formação de osso novo e de capilares. Contudo, para Murphy e O'Brien (2010), o tamanho ideal de poro para formação óssea entre 85-120 μm . O efeito da porosidade *in vivo* está intimamente ligada a regeneração óssea, sugerindo que a alta porosidade otimiza a osteogênese (Karageorgiou, Kaplan, 2005). Neste presente estudo, os *scaffolds* apresentaram porosidade média de 76% a 79%, estando de acordo com os estudos prévios de Hoover et al. (2017) que desenvolveram *scaffolds* de β -TCP dopado com prata altamente porosos (70% e 79%) e concluíram que a porosidade aumentou a osteocondução e também com o estudo de Seidenstuecker et al. (2017) no qual avaliaram a caracterização de *scaffolds* puros de β -TCP e combinado com biovidro produzidos em impressão 3D, com porosidade entre 63% a 71% e concluíram que o biomaterial de BG/ β -TCP com maior porosidade apresentou alta concentração de células vivas de MG63.

A linhagem humana MG63, é umas das linhagens celulares mais consolidadas em estudos de osteogênese (Gong et al., 2017; Li et al., 2015; Lim et al., 2017; Pandey et al., 2013; Seidenstuecker et al., 2017) e são fundamentais para

fornecer informações sobre a interação célula-biomaterial (Czekanska et al., 2014; Staehlke et al., 2019). Para o desenvolvimento de um novo biomaterial é necessário previamente a fase pré-clínica, estudos iniciais, utilizando ensaios em modelo *in vitro* e posteriormente *in vivo*.

Inicialmente foi avaliado a biocompatibilidade do biomaterial, utilizando a linhagem celular MG63, em resposta aos *scaffolds* cerâmicos. Este estudo verificou a viabilidade celular, por meio do teste de MTT e foi observado que os *scaffolds* β -TCP/S53P4 não apresentam citotoxicidade celular em relação ao β -TCP. Da mesma forma, Tao et al. (2020) relataram que *scaffolds* produzidos a partir de fosfato de cálcio não exibiram toxicidade para células.

Nesta pesquisa, após a fabricação dos *scaffolds* β -TCP foi realizada a incorporação do biovidro aos *scaffolds* via imersão em solução *sol gel*. O mecanismo de dissociação de íons do biovidro em meio condicionado ainda não é um consenso na literatura. É descrito que na superfície do biovidro, pode formar um microambiente em sua superfície, por meio da liberação de íons que provoca o aumento do pH no meio de cultura, o qual segundo os autores pode ser prejudicial às células (Sarin et al., 2021). Contudo, observamos que a incorporação do biovidro não alterou a viabilidade das células, sugerindo ausência de citotoxicidade sobre os osteoblastos. Resultados anteriores fundamentam que estruturas funcionalizados com íons de Ca^{2+} promovem a adesão, proliferação e diferenciação de células MG63 (Lim et al., 2017). O biovidro S53P4 é constituído em sua composição por íons que fornecem propriedades biológicas benéficas que estimulam a osteogênese (Vallittu et al., 2015). Outro produto responsável por aumentar a formação e a calcificação da matriz extracelular quando do uso do biovidro, é o silício, produto da dissolução do biovidro, o qual tem a capacidade de estimular a atividade dos osteoblastos (Cirraldo et al., 2018). Waselau et al. (2012) acompanharam nos períodos de 1, 7 e 14 dias a proliferação celular de células-tronco do tecido adiposo humano, medindo a quantidade de DNA das amostras. Os autores observaram, maior taxa de proliferação celular em grânulos de biovidro S53P4 em relação ao β -TCP.

Neste trabalho, houve uma tendência típica do aumento da expressão de conteúdo de proteína total e da atividade de ALP em decorrência do tempo de cultura. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Pandey et al. (2013), em que materiais cerâmicos à base de zircônia e alumina foram expostos as células

MG63, durante 8 e 16 dias de cultura. No presente estudo, a incorporação do S53P4 em *scaffolds* de β -TCP, teve impacto favorável sobre as culturas celulares, não alterou a viabilidade celular, enquanto aumentou o conteúdo de proteína total e atividade de ALP. ALP é um marcador essencial na diferenciação dos osteoblastos, (Chen et al., 2020; Sharma et al., 2014), sendo que a concentração de fosfatase aumenta conforme ocorre a diferenciação dos osteoblastos, que resulta no processo de formação da matriz e sua calcificação (Prabakaran et al., 2020).

Neste estudo, foi observado em ambos os *scaffolds*, a formação de nódulos mineralizados, porém nos *scaffolds* β -TCP/S53P4 observou-se nódulos de mineralização maiores em comparação ao β -TCP, sugerindo que a incorporação do biovidro ao *scaffolds* β -TCP, favoreceu ainda mais a mineralização da matriz produzidas pelas células MG63. Ao quantificar o cálcio impregnado nos nódulos mineralizados após contato com as amostras analisadas, confirmou-se que os *scaffolds* β -TCP/S53P4 demonstraram melhora na formação de nódulos de osteoblastos, indicando que o aumento na matriz, ocorre devido a incorporação do biovidro pelo efeito maior na mineralização. Estudos anteriores mostraram o aumento na mineralização em materiais com biovidro como os *scaffolds* de biovidro contendo nanopós de grafeno à base de PCL (Deliormanlı e Atmaca 2018). Gong et al. (2017) demonstraram maior formação de nódulos de mineralização em biovidro nanométrico 58S em comparação ao 45S5 cultivadas em células MG63, durante 28 dias. Paramita et al. (2021) mostraram em cerâmicas de nano-biovidro com zinco (Zn-nBGC), a formação de nódulos de mineralização, em células-tronco mesenquimais em ratos, a partir de meio osteogênico ou não. Wang et al. (2021), desenvolveram um novo compósito (n-ACP-cit/PAA) nano-amorfo fosfato de cálcio modificado com citrato impregnado com poli-aminoácidos, e também demonstraram maior formação de nódulos a partir do compósito desenvolvido com semelhante composição inorgânica ao osso natural.

Neste estudo foi avaliado *in vitro* a expressão gênica de marcadores relacionados a osteogênese das células MG63 em meio de condicionamento com *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4. Podemos observar no período de 7 dias, semelhanças entre os *scaffolds* estudados, com exceção aos genes Col-1 e Itg β . A M-CSF é uma citocina que regula a proliferação e a diferenciação dos precursores dos osteoclastos, monócitos e macrófagos (Lee et al., 2017; Mattson et al., 2019).

Atua ainda como um agente antiinflamatório e imunossupressor para biomateriais implantáveis (Yang et al., 2020). O gene M-CSF foi expresso nos *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4, porém sem diferença estatística. Com relação as proteínas não colágenas, a Osp é uma glicoproteína adesiva multifuncional contendo arginina-glicina-aspartato (RGD), que atua como ligante de integrina (Gonçalves et al., 2007). Além disso, é uma molécula de adesão, que pode se ligar a múltiplos receptores de superfície celular, envolvida nas interações células-células e matriz celular. É responsável pela regulação de diversos processos fisiológicos, como organização de adesão celular, migração celular, angiogênese e síntese da matriz óssea (Johnson et al., 2014). A Itg β 1 é vital para a reabsorção óssea de osteoclastos e função dos osteoblastos (Carvalho et al., 2020; Rodriguez et al., 2014). As Itg β 1 são moléculas de superfície celular envolvidas em muitos processos biológicos diferentes, migração, crescimento, diferenciação e morte celular (Brakebusch et al., 1997). A Bglap é sintetizada apenas por osteoblastos, é a proteína não colágena mais abundante na matriz extracelular óssea que se liga aos íons de cálcio. Aumento na expressão da Bglap está relacionada com a diferenciação de osteoblastos, portanto é um marcador tardio de mineralização (Ducy et al., 1996; Neve et al., 2013). A Osn é uma proteína expressa em tecido mineralizados e não mineralizados, secretada pelos osteoblastos durante a formação óssea. Ela também é responsável por interações celulares e ligações das células ao cálcio e ao Col-1 (Rosset, Bradshaw, 2016) e pode induzir a angiogênese e a neovascularização (Delany et al., 2000). A Osp, Bglap, Osn e a Itg β 1 foram expressas em todos os *scaffolds*, sendo que apenas a expressão de integrina no *scaffold* β -TCP diferiu estatisticamente do *scaffold* β -TCP/S53P4, sendo mais elevada.

Runx2 é um fator de transcrição expresso pelos osteoblastos, com papel fundamental na diferenciação dos osteoblastos (Komori, 2019). É um marcador muito comum em protocolos de diferenciação osteoblástica, uma vez que é expresso durante a fase inicial, desde pré-osteoblastos do ciclo celular até o início da maturação da matriz (Rutkovskiy et al., 2016). Ke et al. (2019) analisaram *in vitro* a partir da linhagem celular de pré-osteoblastos a expressão do gene Runx2, em disco de β -TCP puro e associados ao estrôncio, sílica, magnésio e óxido de zinco. Observaram expressão positiva em β -TCP puro no terceiro dia e no nono dia regulação negativa. Dessa forma, concluíram que a regulação negativa do Runx2

demonstrava seu papel inibidor no final do estágio de diferenciação osteoblástica. Nesta pesquisa, o gene Runx2 foi positivo no dia 7, e a expressão do gene não foi significativamente diferente entre os *scaffolds*.

O Col-1 é a proteína mais abundante na matriz óssea, cuja a principal função é estrutural (Licini et al., 2019). Foi mostrado que o gene mediado por Runx2, o gene Osterix pode regular positivamente a expressão de *Col1a1* (Guntur, Rosen, 2011). Inicialmente na formação óssea, os osteoblastos produzem matriz osteoide por meio do depósito de colágeno e durante o estágio final, a taxa da síntese de colágeno diminui (Hadjidakis, Androulakis, 2006). No presente estudo verificou-se maior expressão de Col-1 em β -TCP/S53P4 com diferença estatística em relação ao *scaffold* β -TCP.

Fatores de crescimento como Tgf- β podem regular a Osn (Wrana et al., 1988). Nossos resultados demonstraram um padrão da expressão de Osn e Tgf- β 1 sobre os *scaffolds*. Embora sem diferença estatística, o *scaffold* de β -TCP/S53P4 induziu maior expressão dos genes de Tgf- β 1. O fator de crescimento transformado β , corresponde a uma superfamília, no qual contêm mais de 30 membros, incluindo os Tgf- β s, as isoformas Tgf- β 1-3, são essenciais na homeostase óssea, regulam a proliferação, migração e diferenciação da matriz celular (Jann et al., 2020). As Prostaglandinas são reguladores multifuncionais da reabsorção e formação óssea e estão relacionadas à inflamação e consolidação de fraturas ósseas. A PgE₂ está relacionada ao metabolismo esquelético e são expressas abundantemente no tecido ósseo, resultado do estímulo da COX-2 (Blackwell et al., 2010). A PgE₂ foi expressa nos *scaffolds* β -TCP e β -TCP/S53P4 sem diferença estatística.

No presente estudo, foram analisadas as imagens microscópicas de lâminas histológicas obtida de peças ósseas de tíbia de coelhos. Nos estudos histológicos, os *scaffolds* demonstram *in vivo* capacidade de formar osso novo no período de 21 dias. Gunn et al. (2013) também identificaram a formação de trabéculas ósseas e resíduos de grânulos de biovidro S53P4 em 3 semanas após implantação em coelhos. Wilson et al. (2006) demonstraram em cultura de células da medula óssea de ratos contendo osteoclastos, que a degradação do biovidro S53P4 ocorre por reação físico-química e não pela atividade de osteoclastos. A degradação ocorre pela formação de camada de hidroxiapatita e que os íons alcalinos liberados pelo biovidro inibem a atividade de osteoblastos, no entanto, estes amadurecem em

células gigantes multicelulares e degeneraram. No presente estudo constatamos a presença de osteoclastos associados aos fragmentos do *scaffold* contendo o biovidro S53P4.

Este trabalho avaliou a neoformação óssea *in vivo* em defeito ósseo induzido experimentalmente em tíbia em coelhos. Os resultados da análise estatística demonstraram que a reparação óssea do *scaffolds* β -TCP/S53P4 foi maior comparado ao β -TCP, com diferença estatística, demonstrando que a incorporação do biovidro ao *scaffold* β -TCP contribuiu para a reparação óssea nos defeitos ósseos em animais. Estudos anteriores comprovaram a propriedade osteocondutora do biovidro (Aho et al., 2004; Bellato et al., 2021; Eriksson et al., 2021; Kluge et al., 2019).

Logo após a implantação do biovidro S53P4, íons do biovidro entram em contato com os fluídos corporais. Os íons de sódio, sílica, cálcio e fosfato são liberados da superfície e aumentam o pH local e a pressão osmótica. É formada uma camada semelhante ao osso na superfície do biovidro S53P4, de sílica gel e fosfatos amorfos que precipitam nesta camada, essas estruturas amorfas se cristalizam em hidroxiapatita natural, ao passo que inicia a ativação dos osteoblastos para neoformação óssea (Coraça-Huber et al., 2014; van Gestel et al., 2015).

Os sinais de remodelação óssea nos defeitos implantados com o β -TCP que foram observados nesse estudo estão de acordo com pesquisas anteriores. Recentemente, Titsinides et al. (2020) compararam diversos enxertos, como, β -TCP, derivado de osso humano e um xenoenxerto bovino que foram enxertados em calvária suína. A formação óssea foi mais evidente no β -TCP tanto em 8 quanto em 12 semanas, por análise histomorfométrica. No entanto, os resultados foram mais relevantes em 12 semanas, durante a maturação e consolidação óssea. O β -TCP se biodegrada de forma relativamente lenta, ocorre pela absorção de células gigantes multinucleares e também pela dissolução por fluídos corporais (Yamada et al., 2007). No nosso estudo, verificamos maior degradação do *scaffold* β -TCP/S53P4 em relação ao β -TCP. Xie et al. (2019), combinaram BMP-2 e PTH (teriparatida) ao β -TCP, e por meio de avaliação de microCT e testes histológicos, demonstraram a degradação da cerâmica e a formação óssea, melhorando a reabsorção relativamente lenta da cerâmica β -TCP.

O biovidro S53P4 é um substituto ósseo, com propriedades antibacterianas,

osteoestimulante e osteocondutoras. (Kastrin et al., 2021). Assim como, angiogênico, sendo que essa propriedade do biovidro o torna especialmente favorável em ossos com pouca vascularização (Steinhausen et al., 2021). Neste estudo, foi avaliada a atividade antibiofilme do biovidro S53P4, incorporado ao *scaffold* de β -TCP. Sugere-se a aplicabilidade deste material como um dispositivo médico implantado que evite a formação de biofilme, uma vez que micro-organismos que vivem sob a forma de biofilmes apresentam grandes desafios no tratamento clínico. A capacidade de formação de biofilme, torna à bactéria resistente a antibióticos, a pressões externas e ao sistema imunológico do hospedeiro (Uruén et al., 2020). O termo biofilme pode ser definido como uma comunidade de células bacterianas ou fúngicas que incorporadas em uma matriz autoproduzida, adere a superfícies biológicas ou não-biológicas (Hoyle et al., 1990; López et al., 2010). A contaminação microbiana seguida da formação de biofilme causam frequentemente falhas na implantação de dispositivos médicos (Khalid et al., 2020). Foi determinante nesta pesquisa selecionar a cepa bacteriana *S. aureus*, pois a maioria das infecções causadas por dispositivos médicos é decorrente deste patógeno, além disso, é considerado o principal agente infeccioso responsável pelo frequente índice de casos de mortalidade mundial e pode causar uma variedade de doenças (Cheung et al., 2021; Tam, Torres, 2019; Chu et al., 2005). Da mesma forma, o patógeno *P. aeruginosa* também é considerado uma ameaça global. Ambas as bactérias são consideradas multirresistentes e fazem parte do grupo ESKAPE, este grupo é constituído por patógenos que frequentemente estão associados há algum tipo de infecção associado à saúde (IRAS) (Santajit, Indrawattana, 2016). A espécie do fungo *Candida* também é vista com apreensão para a saúde pública global, sendo significativa a mortalidade provocada por infecções na corrente sanguínea e ainda provoca grande ameaça aos pacientes da unidade de terapia intensiva (UTI) (Shirvani et al., 2021). A grande parte das infecções causadas por biofilmes microbianos que colonizam a superfície de dispositivos médicos é decorrente das espécies de *Candida* (Coad et al., 2016), sendo a espécie *C. albicans* a isolada com mais frequência no ambiente hospitalar (Chowdhary et al., 2017).

A principal causa do efeito antimicrobiano do biovidro S53P4 é o aumento do pH, criando um ambiente alcalino, por meio da liberação de íons do biovidro, simultaneamente aumenta a pressão osmótica e causa danos na parede da

membrana da bactéria (Coraça-Huber et al., 2014), cuja a eficácia do tratamento não depende de associações com antibióticos (Bortolin et al., 2018; Geurts et al., 2019; Grønseth et al., 2020; Kastrin et al., 2021; Romanò et al., 2014). Os dados obtidos nesse trabalho demonstraram que o biovidro incorporado ao *scaffolds* β -TCP, obteve efeito inibidor em todas os patógenos testados, teve uma forte atividade inibitória principalmente contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, porém uma menor atividade inibitória foi observada contra *C. albicans*.

A avaliação da atividade antimicrobiana de grânulos do biovidro S53P4 contra diferentes micro-organismos foi demonstrada recentemente no estudo de Gonzalez Moreno et al. (2020), em grânulos do biovidro (500-80 μ m) e pó (<45 μ m), por meio do teste de microcalorimetria isotérmica e UFC em *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *C. albicans*. Grønseth et al. (2020), demonstraram também o efeito antimicrobiano sobre *S. aureus* dos grânulos do S53P4 (<45 μ m), em contato direto com o biofilme bacteriano. Kirchhoff et al. (2020), por meio da MEV, observaram alteração na morfologia do biofilme bacteriano *P. aeruginosa*, sugerindo que essa alteração foi resultante da ação do biovidro, que induziu a redução da densidade da matriz extracelular.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados *in vitro*, observou-se que os *scaffolds* β -TCP incorporados ao biovidro S53P4, não causaram danos aos osteoblastos humanos MG63. Os íons que são liberados pelo biovidro não interferiram na atividade celular, permitiram a diferenciação celular e promoveram a expressão de genes relacionadas a osteogênese.

Complementando os resultados do teste *in vitro*, no teste *in vivo*, observou-se neoformação óssea em ambos os *scaffolds*, porém o *scaffold* β -TCP/S53P4 promoveu maior formação de tecido ósseo do que o β -TCP em 21 dias após implantação.

Em relação à capacidade antibiofilme, foi possível concluir que o *scaffold* β -TCP/S53P4 diminuiu a formação de biofilme monotípico das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e também de células fúngicas, *Candida albicans*. Destacando a propriedade antimicrobiana muito relevante em biomateriais utilizados como substituto ósseo.

Por tanto, comparando os resultados dos testes desta pesquisa, o *scaffold* β -TCP/S53P4 demonstrou os melhores resultados. No qual, ao biomaterial experimental pode ser recomendado a utilização em preenchimento de lesões ósseas. Além disso, como contribuição para pesquisas futuras, sugere-se a realização de ensaios mecânicos do *scaffold*, que poderão contribuir para novas perspectivas de aplicação do biomaterial em reparo ósseo.

REFERÊNCIAS

- Abbas S, Maleksaeedi S, Kolos E, Ruys AJ. Processing and properties of zirconia-toughened alumina prepared by gelcasting. *Mater* (Basel, Switzerland). 2015;8(7):4344–62. doi: 10.3390/ma8074344. PMID: 28793444.
- Aguilar-Reyes EA, León-Patiño CA, Jacinto-Díaz B, Lefebvre L-P. Structural characterization and mechanical evaluation of bioactive glass 45s5 foams obtained by a powder technology approach. *J Am Ceram Soc*. 2012;95(12):3776–80. doi: 10.1111/j.1551-2916.2012.05465.x.
- Aho AJ, Hautamäki M, Mattila R, Alander P, Strandberg N, Rekola J, et al. Surface porous fibre-reinforced composite bulk bone substitute. *Cell Tissue Bank*. 2004;5(4):213–21. doi: 10.1007/s10561-004-0214-0. PMID: 15591824.
- Albulescu R, Popa A-C, Enciu A-M, Albulescu L, Dudau M, Popescu ID, et al. Comprehensive in vitro testing of calcium phosphate-based bioceramics with orthopedic and dentistry applications. *Mater* (Basel, Switzerland). 2019;12(22):3704. doi: 10.3390/ma12223704. PMID: 31717621.
- Ana ID, Satria GAP, Dewi AH, Ardhani R. Bioceramics for clinical application in regenerative dentistry. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1077:309–16. doi: 10.1007/978-981-13-0947-2_16. PMID: 30357695.
- Ángeles Sánchez-Garcés M, Camps-Font O, Escoda-Francolí J, Muñoz-Guzón F, Toledano-Serrabona J, Gay-Escoda C. Short time guided bone regeneration using beta-tricalcium phosphate with and without fibronectin - An experimental study in rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2020;25(4):532–72. doi: 10.4317/medoral.23564.
- Bellato CP, Oliveira DL, Kasaya MVS, Moreira D, Cini MA, Saraiva PP, et al. Effect of S53P4 bioactive glass and low-level laser therapy on calvarial bone repair in rats submitted to zoledronic acid therapy. *Acta Cir Bras*. 2021 Jul 9;36(6):e360603. doi: 10.1590/ACB360603.
- Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: past, present and for the future. *J Eur Ceram Soc*. 2008;28(7):1319–27. doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001.
- Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(5):294–301. doi: 10.1016/j.tem.2009.12.004.
- Bortolin M, Romanò CL, Bidossi A, Vecchi E De, Mattina R, Drago L. BAG-S53P4 as bone graft extender and antimicrobial activity against gentamicin- and vancomycin-resistant bacteria. *Future Microbiol*. 2018;13(5):525–33. doi: 10.2217/fmb-2016-0171.
- Bortolin M, De Vecchi E, Romanò CL, Toscano M, Mattina R, Drago L. Antibiofilm agents against MDR bacterial strains: is bioactive glass BAG-S53P4 also effective? *J Antimicrob Chemother*. 2016 Jan;71(1):123-7. doi: 10.1093/jac/dkv327.

Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomater.* 2012;8(4):1401–21. doi: 10.1016/j.actbio.2011.11.017. PMID: 22127225.

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

Brakebusch C, Hirsch E, Potocnik A, Fassler R. Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J Cell Sci.* 1997;110(23):2895–904. doi: 10.1242/jcs.110.23.2895.

Bružauskaitė I, Bironaitė D, Bagdonas E, Bernotienė E. Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology.* 2016;68(3):355–69. doi: 10.1007/s10616-015-9895-4. PMID: 26091616.

Cacciotti I, Lombardi M, Bianco A, Ravaglioli A, Montanaro L. Sol-gel derived 45S5 bioglass: synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(8):1849–66. doi: 10.1007/s10856-012-4667-6. PMID: 22580755.

Cai S, Xu GH, Yu XZ, Zhang WJ, Xiao ZY, Yao KD. Fabrication and biological characteristics of beta-tricalcium phosphate porous ceramic scaffolds reinforced with calcium phosphate glass. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(1):351–8. doi: 10.1007/s10856-008-3591-2. PMID: 18807260.

Camilo CC, Silveira CAE, Faeda RS, de Almeida Rollo JMD, Purquerio B de M, Fortulan CA. Bone response to porous alumina implants coated with bioactive materials, observed using different characterization techniques. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2017;15(3):e223–35. doi: 10.5301/jabfm.5000347. PMID: 28574101.

Carrodeguas RG, De Aza S. α -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* 2011;7(10):3536–46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.019>

Carvalho MS, Silva JC, Hoff CM, Cabral JMS, Linhardt RJ, da Silva CL, et al. Loss and rescue of osteocalcin and osteopontin modulate osteogenic and angiogenic features of mesenchymal stem/stromal cells. *J Cell Physiol.* 2020;235(10):7496–515. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.29653>.

Chatterjea A, van der Stok J, Danoux CB, Yuan H, Habibovic P, van Blitterswijk CA, et al. Inflammatory response and bone healing capacity of two porous calcium phosphate ceramics in critical size cortical bone defects. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(5):1399–407. doi: 10.1002/jbm.a.34815. PMID: 23733500.

Chen F-M, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci.* 2016;53:86–168. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004.

Chen Y-P, Chu Y-L, Tsuang Y-H, Wu Y, Kuo C-Y, Kuo Y-J. Anti-inflammatory effects

of adenine enhance osteogenesis in the osteoblast-like MG-63 cells. *Life* (Basel, Switzerland). 2020;10(7):116. doi: 10.3390/life10070116.

Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021;12(1):547–69. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.

Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog*. 2017 May 18;13(5):e1006290. doi: 10.1371/journal.ppat.1006290.

Chu VH, Crosslin DR, Friedman JY, Reed SD, Cabell CH, Griffiths RI, et al. *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with prosthetic devices: costs and outcomes. *Am J Med*. 2005;118(12):1416.e19-1416.e24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.06.011>.

Chung H, Kim S, Chung SH. Clinical outcome of beta-tricalcium phosphate use for bone defects after operative treatment of benign tumors. *Clin Orthop Surg*. 2019;11(2):233–6. doi: 10.4055/cios.2019.11.2.233.

Ciraldo FE, Boccardi E, Melli V, Westhauser F, Boccaccini AR. Tackling bioactive glass excessive in vitro bioreactivity: preconditioning approaches for cell culture tests. *Acta Biomater*. 2018;75:3–10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.019>.

Coad BR, Griesser HJ, Peleg AY, Traven A. Anti-infective surface coatings: design and therapeutic promise against device-associated infections. *PLoS Pathog*. 2016 Jun 2;12(6):e1005598. doi: 10.1371/journal.ppat.1005598.

Coraça-Huber DC, Fille M, Hausdorfer J, Putzer D, Nogler M. Efficacy of antibacterial bioactive glass S53P4 against *S. aureus* biofilms grown on titanium discs in vitro. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2014;32(1):175–7. doi: 10.1002/jor.22463. PMID: 24108602.

Costa NMF, Yassuda DH, Sader MS, Fernandes GVO, Soares GDA, Granjeiro JM. Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm® membrane in rat calvarial defect model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;61:63–71. doi: 10.1016/j.msec.2015.12.003. PMID: 26838825.

Cunha MT, Aparecida Murça M, Nigro S, Klautau GB, José M, Salles C. In vitro antibacterial activity of bioactive glass S53P4 on multiresistant pathogens causing osteomyelitis and prosthetic joint infection. *BMC Infect Dis*. 2018 Apr 3;18(1):157. doi: 10.1186/s12879-018-3069-x.

Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res Part A*. 2014;102(8):2636–43. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34937>.

Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest*.

2000;105(7):915–23. doi: 10.1172/JCI7039.

Deliormanlı AM, Atmaca H. Biological response of osteoblastic and chondrogenic cells to graphene-containing PCL/bioactive glass bilayered scaffolds for osteochondral tissue engineering applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018;186(4):972–89. doi: 10.1007/s12010-018-2758-7. PMID: 29797300.

Drago L, Romanò D, De Vecchi E, Vassena C, Logoluso N, Mattina R, et al. Bioactive glass BAG-S53P4 for the adjunctive treatment of chronic osteomyelitis of the long bones: an in vitro and prospective clinical study. *BMC Infect Dis*. 2013 Dec 10;13:584. doi: 10.1186/1471-2334-13-584

Drago L, Toscano M, Bottagisio M. Recent evidence on bioactive glass antimicrobial and antibiofilm activity: a mini-review. *Materials (Basel)*. 2018 Feb 24;11(2):326. doi: 10.3390/ma11020326.

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996;382(6590):448–52. doi: 10.1038/382448a0.

Duncan J, Hayakawa S, Osaka A, MacDonald JF, Hanna J V, Skakle JMS, et al. Furthering the understanding of silicate-substitution in α -tricalcium phosphate: an X-ray diffraction, X-ray fluorescence and solid-state nuclear magnetic resonance study. *Acta Biomater*. 2014;10(3):1443–50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.11.014>

Eliaz N, Metoki N. Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials (Basel)*. 2017 Mar 24;10(4):334. doi: 10.3390/ma10040334.

Eriksson E, Björkenheim R, Strömberg G, Ainola M, Uppstu P, Aalto-Setälä L, et al. S53P4 bioactive glass scaffolds induce BMP expression and integrative bone formation in a critical-sized diaphysis defect treated with a single-staged induced membrane technique. *Acta Biomater*. 2021;126:463–76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.035>.

Fielding GA, Sarkar N, Vahabzadeh S, Bose S. Regulation of Osteogenic Markers at Late Stage of Osteoblast Differentiation in Silicon and Zinc Doped Porous TCP. *J Funct Biomater*. 2019 Nov 5;10(4):48. doi: 10.3390/jfb10040048.

Filippi M, Born G, Chaaban M, Scherberich A. Natural polymeric scaffolds in bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:474. doi: 10.3389/fbioe.2020.00474.

Gaasbeek RDA, Toonen HG, van Heerwaarden RJ, Buma P. Mechanism of bone incorporation of β -TCP bone substitute in open wedge tibial osteotomy in patients. *Biomaterials*. 2005;26(33):6713–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.056>.

Gao P, Zhang H, Liu Y, Fan B, Li X, Xiao X, et al. Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone

tissue engineering in vivo. *Sci Rep.* 2016;6:23367. doi: 10.1038/srep23367. PMID: 27000963.

van Gestel NAP, Geurts J, Hulsen DJW, van Rietbergen B, Hofmann S, Arts JJ. Clinical applications of S53P4 bioactive glass in bone healing and osteomyelitic treatment: A literature review. *Biomed Res Int.* 2015;2015:684826. doi: 10.1155/2015/684826.

Geurts J, van Vugt T, Thijssen E, Arts JJ. Cost-effectiveness study of one-stage treatment of chronic osteomyelitis with bioactive glass S53P4. *Mater (Basel, Switzerland).* 2019;12(19):3209. doi: 10.3390/ma12193209.

Gonçalves RF, Wolinetz CD, Killian GJ. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (α V and α 5) and osteopontin on bovine sperm–egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology.* 2007;67(3):468–74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.013>.

Gong W, Dong Y, Wang S, Gao X, Chen X. A novel nano-sized bioactive glass stimulates osteogenesis via the MAPK pathway. *RSC Adv.* 2017;7(23):13760–7. doi: 10.1039/C6RA26713K.

Gonzalez Moreno M, Butini ME, Maiolo EM, Sessa L, Trampuz A. Antimicrobial activity of bioactive glass S53P4 against representative microorganisms causing osteomyelitis - Real-time assessment by isothermal microcalorimetry. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020;189:110853. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110853. PMID: 32058256.

Gregory CA, Grady Gunn W, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004;329(1):77–84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.002>.

Grønseth T, Vestby LK, Nesse LL, von Unge M, Silvola JT. Bioactive glass S53P4 eradicates *Staphylococcus aureus* in biofilm/planktonic states in vitro. *Ups J Med Sci.* 2020;125(3):217–25. doi: 10.1080/03009734.2020.1765908.

Guillaume B. Filling bone defects with β -TCP in maxillofacial surgery: a review. *Morphologie.* 2017;101(334):113–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2017.05.002>

Gunn JM, Rekola J, Hirvonen J, Aho AJ. Comparison of the osteoconductive properties of three particulate bone fillers in a rabbit model: allograft, calcium carbonate (Biocoral®) and S53P4 bioactive glass. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(5):1238–42. doi: 10.3109/00016357.2012.757642. PMID: 23294163.

Guntur AR, Rosen CJ. The skeleton: a multi-functional complex organ: new insights into osteoblasts and their role in bone formation: the central role of PI3Kinase. *J Endocrinol.* 2011;211(2):123–30. doi: 10.1530/JOE-11-0175. PMID: 21673026.

Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1092(1):385–96. doi: <https://doi.org/10.1196/annals.1365.035>.

Hench LL. The story of bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(11):967–78. doi: [10.1007/s10856-006-0432-z](https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z). PMID: 17122907.

Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions - A 21st century perspective. *Bone Res*. 2013;1(3):216–48. doi: [10.4248/BR201303002](https://doi.org/10.4248/BR201303002). PMID: 26273505.

Hoover S, Tarafder S, Bandyopadhyay A, Bose S. Silver doped resorbable tricalcium phosphate scaffolds for bone graft applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;79:763–9. doi: [10.1016/j.msec.2017.04.132](https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.132).

Hoppe A, Jokic B, Janackovic D, Fey T, Greil P, Romeis S, et al. Cobalt-releasing 1393 bioactive glass-derived scaffolds for bone tissue engineering applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(4):2865–77. doi: [10.1021/am405354y](https://doi.org/10.1021/am405354y). PMID: 24476347.

Hoyle BD, Jass J, Costerton JW. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J Antimicrob Chemother*. 1990;26(1):1–5. doi: [10.1093/jac/26.1.1](https://doi.org/10.1093/jac/26.1.1).

Ioannou AL, Kotsakis GA, Kumar T, Hinrichs JE, Romanos G. Evaluation of the bone regeneration potential of bioactive glass in implant site development surgeries: a systematic review of the literature. *Clin Oral Investig*. 2015;19(2):181–91. doi: [10.1007/s00784-014-1376-1](https://doi.org/10.1007/s00784-014-1376-1). PMID: 25471690.

Ishida H, Haniu H, Takeuchi A, Ueda K, Sano M, Tanaka M, et al. In vitro and in vivo evaluation of starfish bone-derived β -tricalcium phosphate as a bone substitute material. *Mater (Basel, Switzerland)*. 2019;12(11):1881. doi: [10.3390/ma12111881](https://doi.org/10.3390/ma12111881). PMID: 31212709.

Jann J, Gascon S, Roux S, Faucheux N. Influence of the TGF- β superfamily on osteoclasts/osteoblasts balance in physiological and pathological bone conditions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7597. doi: [10.3390/ijms21207597](https://doi.org/10.3390/ijms21207597).

Jasser R Al, AlSubaie A, AlShehri F. Effectiveness of beta-tricalcium phosphate in comparison with other materials in treating periodontal infra-bony defects around natural teeth: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2021;21(1):219. doi: [10.1186/s12903-021-01570-8](https://doi.org/10.1186/s12903-021-01570-8).

Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. Osteopontin: a leading candidate adhesion molecule for implantation in pigs and sheep. *J Anim Sci Biotechnol*. 2014;5(1):56. doi: [10.1186/2049-1891-5-56](https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-56).

Jones JR. Reprint of: review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater*. 2015;23 Suppl:S53-82. doi: [10.1016/j.actbio.2015.07.019](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.019). PMID: 26235346.

Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2013;9(1):4457–86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>.

Juhasz JA, Best SM, Bonfield W, Kawashita M, Miyata N, Kokubo T, et al. Apatite-forming ability of glass-ceramic apatite-wollastonite - polyethylene composites: effect of filler content. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14(6):489–95. doi: [10.1023/a:1023499728588](https://doi.org/10.1023/a:1023499728588). PMID: 15348432.

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 β -TCP and new bone formation. *Biomater Res.* 2019 Jul 26;23:12. doi: [10.1186/s40824-019-0161-2](https://doi.org/10.1186/s40824-019-0161-2).

Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(27):5474–91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.

Kastrin M, Urbančič Rovar V, Frangež I. Possible advantages of S53P4 bioactive glass in the treatment of septic osteoarthritis of the first metatarsophalangeal joint in the diabetic foot. *J Clin Med.* 2021;10(6):1208. doi: [10.3390/jcm10061208](https://doi.org/10.3390/jcm10061208).

Kato E, Lemler J, Sakurai K, Yamada M. Biodegradation property of beta-tricalcium phosphate-collagen composite in accordance with bone formation: a comparative study with Bio-Oss Collagen® in a rat critical-size defect model. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014;16(2):202–11. doi: [10.1111/j.1708-8208.2012.00467.x](https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2012.00467.x). PMID: 22809239.

Ke D, Tarafder S, Vahabzadeh S, Bose S. Effects of MgO, ZnO, SrO, and SiO₂ in tricalcium phosphate scaffolds on in vitro gene expression and in vivo osteogenesis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;96:10–9. doi: [10.1016/j.msec.2018.10.073](https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.073).

Khalid S, Gao A, Wang G, Chu PK, Wang H. Tuning surface topographies on biomaterials to control bacterial infection. *Biomater Sci.* 2020;8(24):6840–57. doi: [10.1039/D0BM00845A](https://doi.org/10.1039/D0BM00845A).

Kim J-W, Yang B-E, Hong S-J, Choi H-G, Byeon S-J, Lim H-K, et al. Bone regeneration capability of 3D printed ceramic scaffolds. *Int J Mol Sci Artic Int J Mol Sci.* 2020;21(14):4837. doi: [10.3390/ijms21144837](https://doi.org/10.3390/ijms21144837).

Kirchhoff L, Arweiler-Harbeck D, Arnolds J, Hussain T, Hansen S, Bertram R, et al. Imaging studies of bacterial biofilms on cochlear implants-Bioactive glass (BAG) inhibits mature biofilm. *PLoS One.* 2020;15(2):e0229198. doi: [10.1371/journal.pone.0229198](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229198)

Kluge A, Neudert M, Kunert-Keil C, Lailach S, Zahnert T, Kemper M. The obliteration of noncritical size bone defects with bone dust or bone replacement material (Bioactive Glass S53P4). *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc [and] Eur Acad Otol Neurotol.* 2019;40(4):e415–23. doi: [10.1097/MAO.0000000000002178](https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000002178). PMID: 30870376.

Kokabi M, Babaluo AA, Barati A. Gelation process in low-toxic gelcasting systems. *J Eur Ceram Soc.* 2006;26(15):3083–90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2005.08.020>.

Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1694. doi: 10.3390/ijms20071694.

Kumar Nandi S, Fielding G, Banerjee D, Bandyopadhyay A, Bose S. 3D printed β -TCP bone tissue engineering scaffolds: Effects of chemistry on in vivo biological properties in a rabbit tibia model HHS Public Access. *J Mater Res.* 2018;33(14):1939–47. doi: 10.1557/jmr.2018.233.

Lee JH, Seo J-H, Lee KM, Ryu H-S, Baek H-R. Fabrication and evaluation of osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells on novel CaO-SiO₂-P₂O₅-B₂O₃ glass-ceramics. *Artif Organs.* 2013;37(7):637–47. doi: 10.1111/aor.12027. PMID: 23560457.

Lee K, Kim MY, Ahn H, Kim H-S, Shin H-I, Jeong D. Blocking of the ubiquitin-proteasome system prevents inflammation-induced bone loss by accelerating M-CSF Receptor c-Fms degradation in osteoclast differentiation. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2054. doi: 10.3390/ijms18102054.

Li Z, Huang B, Mai S, Wu X, Zhang H, Qiao W, et al. Effects of fluoridation of porcine hydroxyapatite on osteoblastic activity of human MG63 cells. *Sci Technol Adv Mater.* 2015;16:035006. doi: 10.1088/1468-6996/16/3/035006.

Licini C, Vitale-Brovarone C, Mattioli-Belmonte M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;49:59–69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.09.001>.

Lim SS, Chai CY, Loh H-S. In vitro evaluation of osteoblast adhesion, proliferation and differentiation on chitosan-TiO₂ nanotubes scaffolds with Ca²⁺ ions. *Mater Sci Eng C.* 2017;76:144–52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.075>.

Lindfors N, Geurts J, Drago L, Arts JJ, Juutilainen V, Hyvönen P, et al. Antibacterial bioactive glass, S53P4, for chronic bone infections - a multinational study. *Adv Exp Med Biol.* 2017;971:81–92. doi: 10.1007/5584_2016_156. PMID: 28050878.

Lopes JH, Magalhães JA, Gouveia RF, Bertran CA, Motisuke M, Camargo SEA, et al. Hierarchical structures of β -TCP/45S5 bioglass hybrid scaffolds prepared by gelcasting. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;62:10–23. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.04.028. PMID: 27161958.

López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(7):a000398. doi: 10.1101/cshperspect.a000398.

Lowe B, Ottensmeyer MP, Xu C, He Y, Ye Q, Troulis MJ. The Regenerative Applicability of Bioactive Glass and Beta-Tricalcium Phosphate in Bone Tissue

Engineering: A Transformation Perspective. *J Funct Biomater*. 2019 Mar 22;10(1):16. doi: 10.3390/jfb10010016

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75. PMID: 14907713.

Lu H, Liu Y, Guo J, Wu H, Wang J, Wu G. Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. *Int J Mol Sci*. 2016 Mar 3;17(3):334. doi: 10.3390/ijms17030334.

Lu J, Wang Q-Y, Sheng J-G, Guo S-C, Tao S-C. A 3D-printed, personalized, biomechanics-specific beta-tricalcium phosphate bioceramic rod system: personalized treatment strategy for patients with femoral shaft non-union based on finite element analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020 Jul 1;21(1):421. doi: 10.1186/s12891-020-03465-1.

Lu JX, Gallur A, Flautre B, Anselme K, Descamps M, Thierry B, et al. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J Biomed Mater Res*. 1998;42(3):357–67. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19981205)42:3<357::AID-JBM3>3.0.CO;2-I.

Ma C, Wei Q, Cao B, Cheng X, Tian J, Pu H, et al. A multifunctional bioactive material that stimulates osteogenesis and promotes the vascularization bone marrow stem cells and their resistance to bacterial infection. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172499. doi: 10.1371/journal.pone.0172499. PMID: 28358890.

Malat T Al, Glombitza M, Dahmen J, Hax P-M, Steinhausen E. The use of bioactive glass S53P4 as bone graft substitute in the treatment of chronic osteomyelitis and infected non-unions - a retrospective study of 50 patients. *Z Orthop Unfall*. 2018;156(2):152–9. doi: 10.1055/s-0043-124377. PMID: 29665602.

Marew T, Birhanu G. Three dimensional printed nanostructure biomaterials for bone tissue engineering. *Regen Ther*. 2021;18:102–11. doi: 10.1016/j.reth.2021.05.001.

Marin CP, Santana GL, Robinson M, Willerth SM, Crovace MC, Zanutto ED. Effect of bioactive Biosilicate(®) /F18 glass scaffolds on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2021;109(8):1293–308. doi: 10.1002/jbm.a.37122. PMID: 33070474.

Mattson AM, Begun DL, Molstad DHH, Meyer MA, Oursler MJ, Westendorf JJ, et al. Deficiency in the phosphatase PHLPP1 suppresses osteoclast-mediated bone resorption and enhances bone formation in mice. *J Biol Chem*. 2019;294(31):11772–84. doi: 10.1074/jbc.RA119.007660.

Midha S, Kim TB, van den Bergh W, Lee PD, Jones JR, Mitchell CA. Preconditioned 70S30C bioactive glass foams promote osteogenesis in vivo. *Acta Biomater*. 2013;9(11):9169–82. doi: 10.1016/j.actbio.2013.07.014. PMID: 23891811.

Murphy CM, O'Brien FJ. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in

collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adh Migr*. 2010;4(3):377–81. doi: 10.4161/cam.4.3.11747.

Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol*. 2013;228(6):1149–53. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.24278>.

Omatete OO, Janney MA, Nunn SD. Gelcasting: from laboratory development toward industrial production. *J Eur Ceram Soc*. 1997;17(2):407–13. doi: [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(96\)00147-1](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(96)00147-1).

Oudadesse H, Dietrich E, Bui X V, Le Gal Y, Pellen P, Cathelineau G. Enhancement of cells proliferation and control of bioactivity of strontium doped glass. *Appl Surf Sci*. 2011;257(20):8587–93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.05.022>.

Owen R, Reilly GC. In vitro Models of bone remodelling and associated disorders. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:134. doi: 10.3389/fbioe.2018.00134.

Pandey AK, Pati F, Mandal D, Dhara S, Biswas K. In vitro evaluation of osteoconductivity and cellular response of zirconia and alumina based ceramics. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(7):3923–30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.032>.

Paramita P, Ramachandran M, Narashiman S, Nagarajan S, Sukumar DK, Chung T-W, et al. Sol-gel based synthesis and biological properties of zinc integrated nano bioglass ceramics for bone tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(1):5. doi: 10.1007/s10856-020-06478-3.

Park J-H, Bae J-Y, Shim J, Jeon I. Evaluation of suitable porosity for sintered porous β -tricalcium phosphate as a bone substitute. *Mater Charact*. 2012;71:103–11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2012.06.012>.

Percie Du Sertid N, Ahluwaliaid A, Alamid S, Aveyid MT, Baker M, Browneid WJ, et al. Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0 2020. *PLoS Biol*. 2020 Jul 14;18(7):e3000411. doi: 10.1371/journal.pbio.3000411

Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2007;28(28):4023–32. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.05.003.

Prabakaran S, Rajan M, Lv C, Meng G. Lanthanides-substituted hydroxyapatite/aloe vera composite coated titanium plate for bone tissue regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:8261–79. doi: 10.2147/IJN.S267632.

Rastegar Ramsheh M, Behnamghader A, Khanlarkhani A. Sol-gel synthesis, in vitro behavior, and human bone marrow-derived mesenchymal stem cell differentiation and proliferation of bioactive glass 58S. *Iran Biomed J*. 2021;25(3):180–92. doi: 10.29252/ibj.25.3.180.

Ravichandran R, Gandhi S, Sundaramurthi D, Sethuraman S, Krishnan UM. Hierarchical mesoporous silica nanofibers as multifunctional scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2013;24(17):1988–2005. doi: 10.1080/09205063.2013.816930. PMID: 23862629.

Reid JW, Pietak A, Sayer M, Dunfield D, Smith TJN. Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system. *Biomaterials*. 2005;26(16):2887–97. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.005. PMID: 15603784.

Rodriguez DE, Thula-Mata T, Toro EJ, Yeh Y-W, Holt C, Holliday LS, et al. Multifunctional role of osteopontin in directing intrafibrillar mineralization of collagen and activation of osteoclasts. *Acta Biomater*. 2014;10(1):494–507. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.010>.

Romagnoli C, D'Asta F, Brandi ML. Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2013 Sep;10(3):155–61. PMID: 24554923; PMCID: PMC3917575.

Romanò CL, Logoluso N, Meani E, Romanò D, De Vecchi E, Vassena C, et al. A comparative study of the use of bioactive glass S53P4 and antibiotic-loaded calcium-based bone substitutes in the treatment of chronic osteomyelitis: a retrospective comparative study. *Bone Joint J*. 2014;96-B(6):845–50. doi: 10.1302/0301-620X.96B6.33014. PMID: 24891588.

Rosset EM, Bradshaw AD. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biol*. 2016;52–54:78–87. doi: 10.1016/j.matbio.2016.02.001.

Rouwkema J, Koopman B, Blitterswijk C, Dhert W, Malda J. Supply of nutrients to cells in engineered tissues. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2010;26:163–78. doi: 10.5661/bger-26-163.

Roy TD, Simon JL, Ricci JL, Rekow ED, Thompson VP, Parsons JR. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res A*. 2003;66(2):283–91. doi: 10.1002/jbm.a.10582. PMID: 12888998.

Rutkovskiy A, Stenslkken KO, Vaage IJ. Osteoblast differentiation at a glance. *Med Sci Monit Basic Res*. 2016 Sep 26;22:95–106. doi: 10.12659/msmbr.901142. PMID: 27667570; PMCID: PMC5040224.

Sabree I, Gough JE, Derby B. Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: Influence of internal dimensions. *Ceram Int*. 2015;41(7):8425–32. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.03.044>.

Safronova TV, Selezneva II, Tikhonova SA, Kiselev AS, Davydova GA, Shatalova TB, et al. Biocompatibility of biphasic α,β -tricalcium phosphate ceramics in vitro. *Bioact Mater*. 2020 Apr 1;5(2):423–7. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.03.007.

Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2475067. doi: 10.1155/2016/2475067.

Sarin J, Vuorenmaa M, Vallittu PK, Grénman R, Boström P, Riihilä P, et al. The viability and growth of hacat cells after exposure to bioactive glass s53p4-containing cell culture media. *Otol Neurotol*. 2021 Jun 1;42(5):e559-e67. doi: 10.1097/MAO.0000000000003057.

Seidenstuecker M, Kerr L, Bernstein A, Mayr HO, Suedkamp NP, Gadow R, et al. 3D Powder printed bioglass and β -tricalcium phosphate bone scaffolds. *Mater (Basel, Switzerland)*. 2017;11(1):13. doi: 10.3390/ma11010013.

Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem*. 2014;29(3):269–78. doi: 10.1007/s12291-013-0408-y.

Shirvani F, Behzad A, Abdollahi N, Mohkam M, Sharifian M, Esfandiar N, et al. Frequency and co-colonization of vancomycin-resistant Enterococci and Candida in ICU-hospitalized children. *New Microbes New Infect*. 2021;41:100881. doi: 10.1016/j.nmni.2021.100881.

Shuai C, Cao Y, Gao C, Feng P, Xiao T, Peng S. Hydroxyapatite whisker reinforced 63s glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Res Int*. 2015;2015:379294. doi: 10.1155/2015/379294.

Shuai C, Yang B, Peng S, Min A. Improved mechanical properties of Beta-tricalcium phosphate by addition of akermanite and 45S5 bioglass. *Mater Res Innov*. 2014;18(sup2):S2-69-S2-73. doi: 10.1179/1432891714Z.0000000000382.

Sousa E de, Dellú Jr M, Pandolfelli VC, Ortega FS. Produção de cerâmicas celulares por emulsão seguida de gelificação TT - Production of cellular ceramics by gel casting ceramic emulsions. *Cerâmica*. 2011;57(341):38–44. doi: 10.1590/S0366-69132011000100005.

Spirandeli BR, Campos TMB, Ribas RG, Thim GP, Trichês E de S. Evaluation of colloidal and polymeric routes in sol-gel synthesis of a bioactive glass-ceramic derived from 45S5 bioglass. *Ceram Int*. 2020;46(12):20264–71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.05.108>.

Staehlke S, Rebl H, Nebe B. Phenotypic stability of the human MG-63 osteoblastic cell line at different passages. *Cell Biol Int*. 2019;43(1):22–32. doi: 10.1002/cbin.11073. PMID: 30444078.

Steinhausen E, Lefering R, Glombitza M, Brinkmann N, Vogel C, Mester B, et al. Bioactive glass S53P4 vs. autologous bone graft for filling defects in patients with chronic osteomyelitis and infected non-unions - a single center experience. *J Bone Jt Infect*. 2021;6(4):73–83. doi: 10.5194/jbji-6-73-2021.

Sun T, Man Z, Peng C, Wang G, Sun S. A specific affinity cyclic peptide enhances the adhesion, expansion and proliferation of rat bone mesenchymal stem cells on

β -tricalcium phosphate scaffolds. *Mol Med Rep.* 2019;20(2):1157–66. doi: 10.3892/mmr.2019.10335. PMID: 31173215.

Tam K, Torres VJ. Staphylococcus aureus secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiol Spectr.* 2019;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018. PMID: 30873936.

Tao Z-S, Zhou W-S, Xu H-G, Yang M. Aspirin modified strontium-doped β -tricalcium phosphate can accelerate the healing of femoral metaphyseal defects in ovariectomized rats. *Biomed Pharmacother.* 2020;132:110911. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110911>.

Thijssen EGJ, van Gestel NAP, Bevers R, Hofmann S, Geurts J, van Loo IHM, et al. Assessment of growth reduction of five clinical pathogens by injectable S53P4 bioactive glass material formulations. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:634. doi: 10.3389/fbioe.2020.00634.

Titsinides S, Karatzas T, Perrea D, Eleftheriadis E, Podaropoulos L, Kalyvas D, et al. Osseous healing in surgically prepared bone defects using different grafting materials: an experimental study in pigs. *Dent J.* 2020;8(1):7. doi: 10.3390/dj8010007

Uruén C, Chopo-Escuin G, Tommassen J, Mainar-Jaime RC, Arenas J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiot (Basel, Switzerland).* 2020;10(1):3. doi: 10.3390/antibiotics10010003.

Vallittu PK, Närhi TO, Hupa L. Fiber glass–bioactive glass composite for bone replacing and bone anchoring implants. *Dent Mater.* 2015;31(4):371–81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.01.003>.

Vasconcellos LMR de, Oliveira MV de, Graça ML de A, Vasconcellos LGO de, Carvalho YR, Cairo CAA. Porous titanium scaffolds produced by powder metallurgy for biomedical applications. *Mater Res.* 2008;11(3):275–80. doi: 10.1590/S1516-14392008000300008.

Wang G, Li Y, Sun T, Wang C, Qiao L, Wang Y, et al. BMSC affinity peptide-functionalized β -tricalcium phosphate scaffolds promoting repair of osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Surg Res.* 2019;14(1):204. doi: 10.1186/s13018-019-1243-5. PMID: 31272458.

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.

Wang X, Zhao D, Ren H, Yan Y, Li S. Biological evaluation of the modified nano-amorphous phosphate calcium doped with citrate/poly-amino acid composite as a potential candidate for bone repair and reconstruction. *J Mater Sci Mater Med.* 2021;32(1):16. doi: 10.1007/s10856-020-06482-7.

Waselau M, Patrikoski M, Mannerström B, Raki M, Bergstroem K, Rechenberg B, et al. In vivo effects of bioactive glass S53P4 or beta tricalcium phosphate on osteogenic differentiation of after incubation with BMP-2. *J Stem Cell Res Ther.* 2012;2:1–11.

Westhauser F, Essers C, Karadjian M, Reible B, Schmidmaier G, Hagmann S, et al. Supplementation with 45S5 bioactive glass reduces in vivo resorption of the β -tricalcium-phosphate-based bone substitute material vitoss. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 30;20(17):4253. doi: 10.3390/ijms20174253.

Westhauser F, Hohenbild F, Arango-Ospina M, Schmitz SI, Wilkesmann S, Hupa L, et al. Bioactive glass (BG) ICIE16 shows promising osteogenic properties compared to crystallized 45S5-BG. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 28;21(5):1639. doi: 10.3390/ijms21051639.

Westhauser F, Widholz B, Nawaz Q, Tsitlakidis S, Hagmann S, Moghaddam A, et al. Favorable angiogenic properties of the borosilicate bioactive glass 0106-B1 result in enhanced in vivo osteoid formation compared to 45S5 Bioglass. *Biomater Sci.* 2019;7(12):5161–76. doi: 10.1039/c9bm01220f. PMID: 31584047.

Wilson T, Parikka V, Holmbom J, Ylänen H, Penttinen R. Intact surface of bioactive glass S53P4 is resistant to osteoclastic activity. *J Biomed Mater Res Part A.* 2006;77A(1):67–74. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30600>.

Wrana JL, Maeno M, Hawrylyshyn B, Yao KL, Domenicucci C, Sodek J. Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol.* 1988;106(3):915–24. doi: 10.1083/jcb.106.3.915. PMID: 3162238.

Xidaki D, Agrafioti P, Diomatari D, Kaminari A, Tsalavoutas-Psarras E, Alexiou P, et al. Synthesis of hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate particles to act as local delivery carriers of curcumin: loading, release and in vitro studies. *Mater (Basel, Switzerland).* 2018;11(4):595. doi: 10.3390/ma11040595. PMID: 2964912.

Xie Z, Yan D, Zhou Q, Wu Z, Weng S, Boodhun V, et al. The fast degradation of β -TCP ceramics facilitates healing of bone defects by the combination of BMP-2 and Teriparatide. *Biomed Pharmacother.* 2019;112:108578. doi: 10.1016/j.biopha.2019.01.039. PMID: 30784943.

Yamada M, Shiota M, Yamashita Y, Kasugai S. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of α - and β -tricalcium phosphate in block grafts. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2007;82B(1):139–48. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30715>.

Yang N, Tan RP, Chan AHP, Lee BSL, Santos M, Hung J, et al. Immobilized macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) regulates the foreign body response to implanted materials. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(2):995–1007. doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01887.

Yoshikawa H, Tamai N, Murase T, Myoui A. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2009;6 Suppl 3(Suppl 3):S341–8. doi: 10.1098/rsif.2008.0425.focus.

Yuan H, De Bruijn JD, Li Y, Feng J, Yang Z, De Groot K, et al. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12(1):7–13. doi: 10.1023/a:1026792615665. PMID: 15348371.

Zhang F-Z, Kato T, Fuji M, Takahashi M. Gelcasting fabrication of porous ceramics using a continuous process. *J Eur Ceram Soc*. 2006;26(4):667–71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2005.07.021>.

Zhao C, Tan A, Pastorin G, Ho HK. Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2013;31(5):654–68. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.08.001. PMID: 22902273.

Zhao D, Zhu T, Li J, Cui L, Zhang Z, Zhuang X, et al. Poly(lactic-co-glycolic acid)-based composite bone-substitute materials. *Bioact Mater*. 2021;6(2):346–60. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.08.016. PMID: 32954053.

Zhao P, Wang J, Li Y, Wang X, Chen C, Liu G. Microfluidic technology for the production of well-ordered porous polymer scaffolds. *Polymers (Basel)*. 2020;12(9):1863. doi: 10.3390/polym12091863. PMID: 32825098

Zhu L, Luo D, Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *Int J Oral Sci*. 2020;12(1):1–15. doi: 10.1038/s41368-020-0073-y.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no uso de animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos



Instituto de Ciência e Tecnologia
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
UNESP



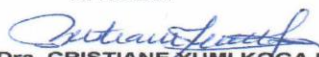
CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 02/2020, intitulado:- " **REGENERAÇÃO ÓSSEA INDUZIDA POR NOVO BIOMATERIAL CERÂMICO PRODUZIDO POR GEL-CASTING: ESTUDO IN VIVO**" sob a responsabilidade de LUANA MAROTTA REIS DE VACONCELLOS , tendo como colaboradoras:- SARAH DE OLIVEIRA MARCO AVELINO e SUELEN SIMÕES AMARAL, 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 27/04/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	27/04/2020 a 31/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Coelhos Albinos / Nova Zelândia
Nº de Animais	12
Peso/Idade	4 Kg / 5 MESES
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 27 de abril de 2020

Obs:- Inclusão do nome da Pesquisadora Suelen Simões Amaral, aprovado pela CEUA, em 19/10/2020.


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

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
Fax (12) 3947-9028 / carlos.guedes@unesp.br/ cristiane.koga-ito@unesp.br