

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**Caracterização, avaliação da bioatividade *in vitro* e da
neoformação óssea *in vivo* de materiais cristalinos dopados com
íons estrôncio**

Joyce Andreza Moreira Pessoa

2019

JOYCE ANDREZA MOREIRA PESSÔA

**Caracterização, avaliação da bioatividade *in vitro* e da
neoformação óssea *in vivo* de materiais cristalinos dopados com
íons estrôncio**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, da
Universidade Federal da Paraíba, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia – Área de
Concentração em Biomateriais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

João Pessoa

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P475c Pessoa, Joyce Andreza Moreira.

Caracterização, avaliação da bioatividade in vitro e da neoformação óssea in vivo de materiais cristalinos dopados com íons estrôncio / Joyce Andreza Moreira Pessoa. – João Pessoa, 2019.
68 f. : il.

Orientação: Paulo Rogerio Ferreti Bonan.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

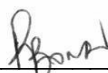
1. Materiais Biocompatíveis. 2. Cerâmicas. 3. Estrôncio. 4. Regeneração Óssea. I. Bonan, Paulo Rogerio Ferreti. II. Título.

UFPB/BC

JOYCE ANDREZA MOREIRA PESSÔA

**Caracterização, avaliação da bioatividade *in vitro* e da
neoformação óssea *in vivo* de materiais cristalinos dopados
com íons estrôncio**

Banca Examinadora



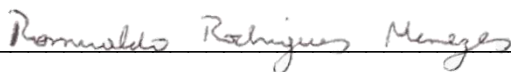
Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Examinador - UFPB



Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano

Examinador - UFPB



Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes

Examinador - UFCG

NOTA PRELIMINAR

A presente Dissertação foi redigida conforme o Manual para Normatização da Defesa do Trabalho Final proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, adotando o formato alternativo. Um artigo científico compõe este trabalho de Dissertação, o qual foi redigido de acordo com as exigências normativas do periódico Materials Science and Engineering C.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que sempre está comigo, guiando meus passos e abençoando os que eu mais amo. Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais João e Maria, por me propiciarem uma família com amor incondicional, educação, respeito e fé. Obrigada por acreditarem nos meus objetivos e fazerem-se presentes no meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por dar-me força e determinação, iluminar meus caminhos e guiar meus sonhos.

Aos meus pais, João e Maria, que sempre me guiaram na direção da bondade, da fé, da retidão, da luta pelos ideais, da perseverança e do sucesso.

Aos meus amados irmãos, Jumara, Junior, Jussara e Jônatas, pelo incentivo e amor incondicional. Obrigada por entenderem minhas ausências durante a caminhada acadêmica.

A Thiago Matias, pelo suporte, companheirismo, compreensão e amor, que tornaram meus dias mais leves.

Ao meu orientador, professor Paulo Bonan, pelos ensinamentos transmitidos, pelas suas críticas construtivas e reflexões. A sua contribuição foi fundamental para o meu crescimento como pesquisadora.

Aos meus professores Lúcio Castellano, Sabrina Aquino, Romualdo Menezes, Adriano Alves, André Batista e Frederico Sousa por serem solícitos para o prosseguimento e conclusão do trabalho.

À coordenadora do biotério, professora Bárbara Leite, e aos servidores do biotério da Unipê, pelo acolhimento dado a mim.

A Eudes, Panmella, Patrícia, Basílio, Dennis e Ésio por me ajudarem nessa pesquisa.

A todos os funcionários da UFPB e ETS, que sempre me receberam com muito carinho durante os experimentos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“Lembremo-nos de que o homem interior renova-se sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter.”

Chico Xavier

RESUMO

A busca por enxertos ósseos ideais impulsiona a produção de novos biomateriais osteocondutores e osteoindutores. Materiais cristalinos dopados com íon estrôncio (Sr^{2+}) podem ser uma alternativa para a regeneração óssea de defeitos de tamanho crítico. Objetivou-se caracterizar, avaliar a bio-reatividade *in vitro* e o potencial de neoformação óssea *in vivo* de materiais cristalinos dopados com Sr^{2+} . O pó cristalino (CP), similar ao vidro bioativo (VB) S53P4 e modificado com Sr^{2+} , foi produzido via rota sol-gel e tratado termicamente à 800 °C. Para incluir o Sr^{2+} no CP, houve a substituição em mol de 12,5 % ou 25 % de Óxido de Cálcio (CaO) por Óxido de Estrôncio (SrO). Três materiais cristalinos foram utilizados: CP sem Sr^{2+} (CPSr0), CP com 12,5 % de Sr^{2+} (CPSr12,5) e CP com 25 % de Sr^{2+} (CPSr25). A composição química dos CP (CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25) foi analisada por energia dispersiva de raios X (EDX). O perfil de liberação de Sr^{2+} em água destilada (1, 6 e 12 horas) foi obtido por espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS). A bio-reatividade foi avaliada *in vitro* por imersão em fluido corporal simulado (SBF) (24, 72 e 168 horas) e analisada por difração de raios X (DRX). No teste *in vivo* foram realizados 2 defeitos críticos de 7 mm de diâmetro na calvária de ratos Wistar macho, totalizando 30 defeitos, que foram randomicamente distribuídos nos grupos: (1) Controle negativo – coágulo sanguíneo; (2) Teste 1 – CPSr0; (3) Teste 2 – CPSr25. As avaliações foram feitas no período de 14 e 28 dias pós-cirúrgico com o número amostral por grupo, em cada período, de quatro para a microtomografia computadorizada (micro-CT) e cinco para a análise histológica. A dopagem com Sr^{2+} foi confirmada pela presença de SrO nas porcentagens de 2,209 % e 6,929 % peso para CPSr12,5 e CPSr25. Os valores de liberação de Sr^{2+} do CPSr25 foram maiores, com comportamento crescente até o tempo de 6 horas e pequeno declive em 12 horas. Constatou-se picos característicos de hidroxiapatita (HA) (26 °, 32 °, 40 °, 45 °, 50 ° e 56 °) nas amostras após análise de bio-atividade. No período de 168 horas, maiores picos de HA (26 ° e 32°) foram observados no CP sem Sr^{2+} . A avaliação do micro-CT e da histomorfometria das amostras obtidas do teste *in vivo* mostraram que o CPSr25 foi estatisticamente maior que o CPSr0 para o volume ósseo ($p = 0,016$), densidade óssea volumétrica ($p = 0,016$) e área de neoformação óssea ($p = 0,025$) aos 28 dias, indicando que a dopagem com Sr^{2+} tem maior potencial de regeneração

óssea. Na análise histológica do grupo CPSr25 foram constatados maiores valores para o grau de vascularização aos 28 dias quando comparado ao CPSr0 ($p = 0,003$). Em conclusão, os CP obtiveram sucesso no processo de dopagem e liberação iônica de Sr^{2+} , observados por meio de EDX e FAAS. Os picos principais de HA demonstraram menores valores para os CP com Sr^{2+} no período de 168 horas. A substituição de CaO por SrO apresentou melhores resultados no reparo de defeitos críticos sob o ponto de vista microtomográfico e histológico. Esses dados confirmam que a dopagem dos biomateriais com íons Sr^{2+} é uma boa estratégia para uso como substitutos ósseos na cicatrização de defeitos críticos.

Palavras-chave: Materiais Biocompatíveis; Cerâmicas; Estrôncio; Regeneração Óssea.

ABSTRACT

The search for ideal bone grafts drives the production of new osteoconductive and osteocutaneous biomaterials. Crystalline materials doped with strontium ion (Sr^{2+}) may be an alternative for bone regeneration of critical size defects. The objective of this study was to characterize, evaluate the *in vitro* bio-reactivity and *in vivo* bone neoformation potential of Sr^{2+} doped crystalline materials. The crystalline powder (CP), similar to the bioactive glass (BG) S53P4 and modified with Sr^{2+} , was produced via sol-gel route and heat treated at 800 °C. To include Sr^{2+} in the CP, there was a molar substitution of 12.5 % or 25 % of calcium oxide (CaO) by strontium oxide (SrO). Three crystalline materials were used: CP without Sr^{2+} (CPSr0), CP with 12.5 % Sr^{2+} (CPSr12.5) and CP with 25 % Sr^{2+} (CPSr25). The chemical composition of the CP (CPSr0, CPSr12.5 and CPSr25) was analyzed by energy dispersive x-ray (EDX). The release profile of Sr^{2+} in distilled water (1, 6 and 12 hours) was obtained by flame atomic absorption spectroscopy (FAAS). The bio-reactivity was evaluated *in vitro* by immersion in simulated body fluid (SBF) (24, 72 and 168 hours) and analyzed by X-ray diffraction (XRD). In the *in vivo* test, 2 critical defects of 7 mm in diameter were performed on the calvarium of male Wistar rats, totaling 30 defects, which were randomly distributed in the groups: (1) Negative control - blood clot; (2) Test 1 - CPSr0; (3) Test 2 - CPSr25. The evaluations were performed in the 14 and 28 postoperative days with the sample number per group in each period of four for the computerized microtomography (micro-CT) and five for the histological analysis. Doping with Sr^{2+} was confirmed by the presence of SrO in the percentages of 2.209 % and 6.929 % for CPSr12.5 and CPSr25. The release values of Sr^{2+} of CPSr25 were higher, with increasing behavior until the time of 6 hours and small slope in 12 hours. Characteristic peaks of hydroxyapatite (HA) (26 °, 32 °, 40 °, 45 °, 50 ° and 56 °) were determined in the samples after bioactivity analysis. In the 168 hour period, higher HA peaks (26 ° and 32 °) were observed in the CP without Sr^{2+} . The micro-CT and histomorphometry of the samples obtained from the *in vivo* test showed that CPSr25 was statistically different and higher than CPSr0 for bone volume ($p = 0.016$), percentual bone volume ($p = 0.016$) and new bone formation ($p = 0.025$) at 28 days indicating that Sr^{2+} doping has a greater potential for bone regeneration. In the histological analysis of the CPSr25 group, it was observed higher values for the degree of vascularization at 28 days when

compared to CPSr0 ($p = 0.003$). In conclusion, CP were successful in the doping process and ionic release of Sr^{2+} observed through EDX e FAAS. The main HA peaks showed lower values for CP with Sr^{2+} in the time of 168 hours. The substitution of CaO by SrO presented better results in the repair of critical defects from the microtomographic and histological point of view. These data confirm that doping of biomaterials with Sr^{2+} ions is a good strategy for use as bone substitutes in the healing of critical defects.

Keywords: Biocompatible Materials; Ceramics; Strontium; Bone Regeneration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALPL	Fosfatase Alcalina de Fígado (<i>Alkaline Phosphatase Liver</i>)
ANG-1	Angiopoetina-1
BGLAP	Proteína Óssea Gamma Carboxiglutamato (<i>Bone Gamma-carboxyglutamic Acid Protein</i>)
BV	Volume Ósseo (<i>Bone Volume</i>)
CaO	Óxido de Cálcio
Ca²⁺	Íon Cálcio
COL1A1	Colágeno Tipo 1 Alfa 1
CP	Pó Cristalino(s) (<i>Crystal Powder</i>)
CPSr0	Pó Cristalino sem Estrôncio
CPSr12,5	Pó Cristalino com 12,5 % de Estrôncio
CPSr25	Pó Cristalino com 25 % de Estrôncio
CT	Tecido Conjuntivo (<i>Connective Tissue</i>)
DRX	Difração de Raios X
EDX	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X
FAAS	Espectroscopia de Absorção Atômica em Chama (<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (<i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i>)
HA	Hidroxiapatita
HCA	Hidroxiapatita Carbonatada
H&E	Hematoxilina e Eosina

MAP	Proteína Ativada por Mitógeno (<i>Mitogen Activated Protein</i>)
MAPK ERK1/2	MAP Quinase Regulada por Sinalização Extracelular 1 e 2 (<i>Extracellular signal-regulated kinase – MAP kinase</i>)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Micro-CT	Microtomografia Computadorizada
MSCs	Células Mesenquimais Estromais (<i>Mesenchymal Stem Cell</i>)
NBA	Área de Osso Novo (<i>New Bone Area</i>)
NBF	Osso Recém Formado (<i>New Bone Formation</i>)
OPG	Osteoprotegerina
PBV	Densidade Volumétrica Óssea (<i>Percentual Bone Volume–BV/TV</i>)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF-BB	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas – BB (<i>Platelet-derived growth fator – BB</i>)
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B (<i>Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand</i>)
RUNX2	Fator de Transcrição 2 (<i>Runt-related Transcription Factor 2</i>)
SBF	Fluido Corporal Simulado (<i>Simulated Body Fluid</i>)
SrO	Óxido de Estrôncio
Sr²⁺	Íon Estrôncio
TA	Área Total (<i>Total Area</i>)
TB.N	Número de Trabéculas Ósseas (<i>Trabecular Number</i>)
TB.SP	Espaço entre as Trabéculas (<i>Trabecular Spacing</i>)
TB.TH	Espessura Trabecular (<i>Trabecular Thickness</i>)
TG/DTG	Termogravimetria/Termogravimetria Derivada

TM	Tricrômio de Masson
TV	Volume Tecidual Total (<i>Total Tissue Volume</i>)
VB	Vidro Bioativo(s)
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Fator</i>)
Wnt / NFATc	Via de Sinalização Wnt / Fator Nuclear de Células T ativadas (<i>Wnt / Nuclear Factor of Activated T-Cells</i>)
β-TCP	Beta Fosfato Tricálcio (<i>Tricalcium Phosphate Beta</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curvas termogravimétricas e termodiferenciais (TG/DTG) dos pós cristalinos.....	p. 13
Figura 2. Padrões de XDR dos pós cristalinos.....	p. 14
Figura 3. Espectros de FTIR dos pós cristalinos.....	p. 14
Figura 4. Micrografias (MEV) dos pós cristalinos.....	p. 15
Figura 5. Micrografias dos pós cristalinos após imersão em SBF.....	p. 17
Figura 6. Espectros de FTIR dos pós cristalinos CPSr25) após imersão em SBF.....	p. 17
Figura 7. Sequência do procedimento cirúrgico <i>in vivo</i>	p. 20
Figura 8. Composição química dos pós cristalinos.....	p. 24
Figura 9. Liberação de íon Sr^{2+} dos pós cristalinos.....	p. 25
Figura 10. Picos de DRX dos pós cristalinos após imersão em SBF.....	p. 26-27
Figura 11. Imagens 3D representativas da análise do Micro-CT.....	p. 28
Figura 12. Análise do micro-CT.....	p. 29-30
Figura 13. Análise histológica.....	p. 31
Figura 14. Análise histomorfométrica da NBF (<i>Area of neoformation bone</i> - área de neoformação óssea).	p. 32
Figura 15. Análise histológica através de escores de <i>degree of inflammation</i> (grau de inflamação) e <i>degree of vascularization</i> (grau de vascularização)..	p. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massas dos reagentes relacionados aos componentes dos pós cristalinos estudados (gramas).....	p. 12
Tabela 2. Composição dos pós cristalinos estudados (mol %).....	p. 12
Tabela 3. Determinação do tamanho médio das partículas dos pós cristalinos por ZetaSizer.....	p. 15
Tabela 4. Pontuações atribuídas aos eventos histológicos.....	p. 22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CAPÍTULO 1.....	8
1. Introdução.....	9
2. Material e Métodos.....	11
2.1. Preparação dos Pós Cristalinos.....	11
2.2. Caracterização Prévia dos Pós Cristalinos.....	12
2.3. Caracterização dos Pós Cristalinos.....	16
2.3.1. Análise por Energia Dispersiva de Raios X (EDX).....	16
2.4. Espectroscopia de Absorção Atômica em Chama (FAAS)...	16
2.5. Testes Prévios de Bio-reatividade <i>in vitro</i>	16
2.6. Teste de Bio-reatividade <i>in vitro</i>	18
2.6.1. Difração de Raios X (DRX).....	18
2.7. Experimento <i>In vivo</i>	18
2.7.1. Procedimento Cirúrgico.....	18
2.7.2. Microtomografia Computadorizada (Micro-CT).....	21
2.7.3. Análise Histológica.....	21
2.8. Análise Estatística.....	23
3. Resultados e Discussão.....	23
3.1. Análise por Energia Dispersiva de Raios X (EDX).....	23
3.2. Espectroscopia de Absorção Atômica em Chama (FAAS)...	24
3.3. Teste de Bio-reatividade <i>in vivo</i> com análise de DRX.....	25
3.4. Experimento <i>In vivo</i>	28
3.4.1. Microtomografia Computadorizada (Micro-CT).....	28
3.4.2. Análise Histológica.....	31
4. Conclusão.....	35
5. Referências.....	36
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	42
4. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS*	43

1. INTRODUÇÃO

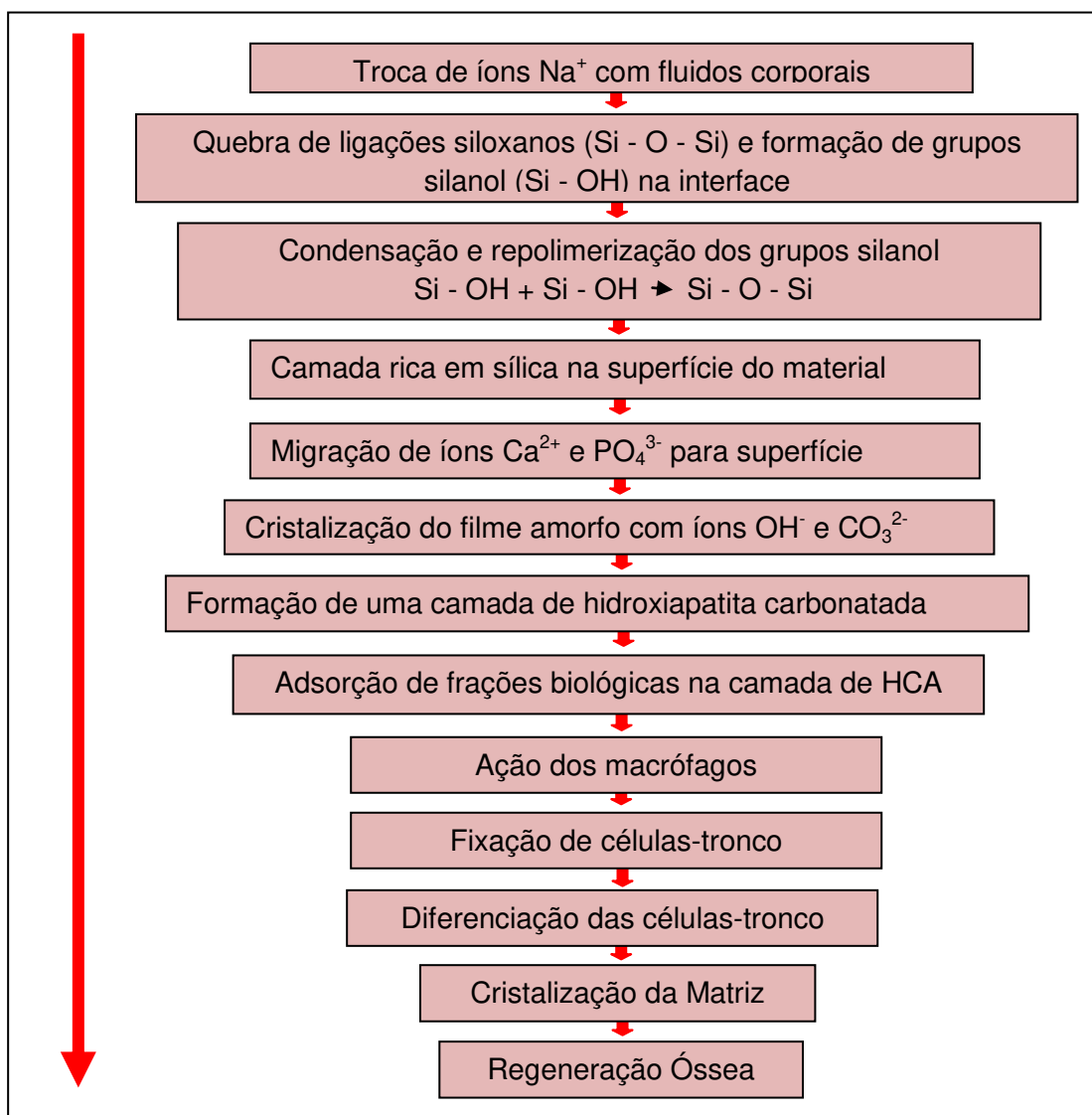
A reconstrução bem sucedida de defeitos ósseos críticos ocorridos por lesões traumáticas, inflamações, infecções microbianas, deformidades congênitas e ressecções tumorais, que não se regeneram espontaneamente, é um problema que motiva a criação de novos biomateriais na odontologia (1,2). O acometimento dos tecidos periodontais e a perda de órgãos dentais interferem diretamente no equilíbrio das forças oclusais do sistema estomatognático, pois induzem a reabsorção do processo alveolar e, conseqüentemente, causam problemas relacionados à digestão, à fonética e à estética dos pacientes (3). Defeitos ósseos críticos quando tratados com enxertia têm o seu processo de reparo potencializado, propiciando a estabilidade oclusal e a possibilidade de reabilitação funcional via implante dentário (1).

Os enxertos ósseos mais usados para recuperação da forma e função de tecidos afetados são o autógeno, o homólogo, o heterólogo e o aloplástico (4). Esses enxertos contribuem para a formação de suporte ósseo através dos mecanismos osteogênico, osteocondutor e/ou osteoindutivo. Enxertos aloplásticos vêm obtendo destaque devido às limitações e aos riscos associados aos demais substitutos, como o fornecimento ósseo limitado, a morbidade do banco do doador, a hospitalização prolongada e os potenciais riscos de infecção e rejeição do sistema imunológico (5). Os materiais sintéticos mais utilizados na odontologia incluem a hidroxiapatita (HA), o beta-fosfato-tricálcio (β -TCP), os metais, os polímeros e os vidros bioativos (VB) (6).

Os VB foram criados por Larry L. Hench no final da década de 60. Trata-se de uma composição especial de um vidro, biocompatível, osteocondutor e osteoindutor (7), baseada nas porcentagens do sistema óxido de sódio-óxido de cálcio-pentóxido de difósforo-óxido de silício ($\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$) (8). Quando esse material entra em contato com o organismo, desenvolve em sua superfície uma camada de HA bioativa responsável pela forte ligação ao tecido ósseo (9). A característica da bioatividade está diretamente relacionada à composição química do vidro, tendo como concentração máxima permitida a porcentagem de 55 a 60 % de SiO_2 , altas concentrações de CaO e Na_2O e baixas de P_2O_5 (10,11). A queima controlada desses materiais à 800 °C também contribui com a

biocompatibilidade, pois possibilita a formação da fase cristalina bioativa combeita ($1\text{Na}_2\text{O}-2\text{CaO}-3\text{SiO}_2$) (12,13).

A formação da camada de HA foi descrita por Hench (2013) (14) e envolve um mecanismo químico constituído por cinco fases distintas conforme esquematizado no quadro 1. Durante a primeira reação química, ocorre uma rápida troca de íons sódio (Na^+) da superfície do vidro com íons hidrogênio (H^+) e hidrônio (H_3O^+) da solução. No segundo estágio, a quebra das ligações siloxano (Si-O-Si) e a formação de grupos silanol (Si-OH) na interface resulta na perda de sílica solúvel (SiO_2) para a solução, na forma de ácido ortossilícico [$\text{Si}(\text{OH})_4$]. Na terceira etapa, ocorre a condensação e a repolimerização dos grupos silanol formando uma camada rica em sílica na superfície do material deficiente de cátions alcalinos e alcalino-terrosos. Durante o quarto passo, íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}) migram para a superfície do vidro formando um filme amorfo rico em óxido de cálcio (CaO) e pentóxido de difósforo (P_2O_5) que cresce pela incorporação de Ca^{+2} solúvel e fosfatos a partir da solução fisiológica. Durante a última etapa, o filme amorfo é cristalizado com íons hidroxila (OH^-) e carbonato (CO_3^{2-}) presentes na solução, originando finalmente a camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA). O rápido crescimento de aglomerados de HCA na superfície do vidro adsorve moléculas biológicas (fibras colágenas) que facilitam a ação dos macrófagos. Em 24 a 48 horas, as células-tronco fixam-se na superfície bioativa e iniciam a produção de fatores de crescimento, havendo a geração de uma matriz extracelular que será posteriormente cristalizada (6 a 12 dias), camada essa propícia à proliferação e ao crescimento ósseo (14).



Quadro 1. Esquema do mecanismo de ação do Vidro Bioativo
Fonte: Hench, 2013 (14)

Os VB podem ser produzidos por diferentes processos. O método padrão consiste no derretimento de óxidos a temperaturas entre 1100-1300 °C e posterior fusão dessa mistura (15). Entretanto, esse método apresenta desvantagens como resultar em materiais quimicamente heterogêneos, graus de contaminação variável (16) e defeitos na integração do material (17). A rota sol-gel oferece um método alternativo ao procedimento tradicional para preparo de materiais vitrocerâmicos (16).

A síntese sol-gel envolve a produção de uma solução (sol) composta por precursores líquidos a temperaturas relativamente baixas (16). A mistura de sol

passa por hidrólise e condensação para formar o gel. O gel é seco e estabilizado em temperaturas entre 600 e 800 °C. Os materiais bioativos sintetizados por esse método apresentam maior pureza, homogeneidade, controle de composição (18), possibilidade de alteração de textura da sua microestrutura (15) e a presença de porosidades que permitem um aumento de área de superfície de contato (18-20). Além disso, a temperatura de estabilização dos géis (680 °C) coincide com a faixa de temperatura (600-700 °C) de cristalização do material. Dessa maneira, materiais parcialmente cristalinos são produzidos, compostos por fases cristalinas bioativas - silicatos de sódio ($\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ e $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$) (15,16,21).

Em 1969, Hench desenvolveu o VB S53P4 (BonAlive^R Biomaterials Ltd, Finlândia) constituído por 53 % de SiO_2 , 23 % de Na_2O , 20 % de CaO e 4 % de P_2O_5 . Atualmente, esse é um dos VB mais estudados por apresentar potencial de osteocondução (22-24), de diferenciação osteogênica de células-tronco humanas (25) e de angiogênese (24). Diferentemente dos demais VB, o S53P4 apresenta efeito antibacteriano (22,26-28), contribuindo para a proteção de superfícies de biomateriais da colonização de micro-organismos (28). O encolhimento e o dano da membrana celular dos micro-organismos após exposição ao VB S53P4 são observados na análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), entretanto o mecanismo de ação não foi completamente estabelecido, necessitando de novas investigações (27). É sugerido que a ação antimicrobiana desse material deva-se ao efeito alcalinizador do meio (29) e à elevada pressão osmótica que contribuem para um ambiente inapropriado ao crescimento microbiano (26). Essas propriedades fazem do VB S53P4 um material ideal na regeneração óssea, pois une a ação promotora óssea à atividade antibacteriana, sendo um potente material de preenchimento de cavidades infectadas e restabelecimento da função (30).

Vários estudos *in vitro* demonstram o efeito antimicrobiano do VB S53P4 sobre bactérias: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* (31), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (22,32). Bons resultados foram observados em um estudo *in vitro* sobre 17 espécies bacterianas anaeróbicas clinicamente importantes,

demonstrando ter, o VB S53P4, um forte efeito inibidor de crescimento sobre todos os agentes patogênicos testados (33). A redução bacteriana em biofilmes de *Staphylococcus aureus* foi estudada em diferentes tamanhos de partículas do VB (0,5-0,8 mm e < 45 µm), constatando-se que a maior ação antibacteriana está relacionada com o aumento da área superficial de contato (26).

O efeito antimicrobiano de CP (partículas < 2 µm) semelhante ao VB S53P4 com substituições de 0 % (CPSr0), 12,5 % (CPSr12,5) e 25 % (CPSr25) de CaO por SrO, em concentrações ≤ 100 mg/mL, foi avaliado sobre bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*, e leveduras do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Os CP dopados com Sr²⁺ demonstraram pequeno retardo do efeito antimicrobiano, alcançando inibição completa sobre os fungos e as bactérias em 72 horas. Valores de pH maiores que 10, mensurados após 6 horas de contato dos CP com o meio, exibiram correlação positiva com o efeito inibitório sobre os micro-organismos avaliados (34).

O VB S53P4 vem sendo usado para tratar uma variedade de condições médicas (35) a exemplo de defeitos ósseos vertebrais por espondilodiscite grave (24), osteomielite crônica (36-38), infecções articulares ósseas e protéticas (14), lesões osteocondrais do joelho (39), colesteatoma-obliteração da cavidade mastóide (40-43), defeitos de tumor ósseo benigno (23), fratura zigomática-órbito-maxilar (44) e revestimento de implantes reconstrotores (28). Na odontologia tem sido testado como medicação intracanal de dentes (45), osteointegração de implantes (46,47), regeneração óssea de cavidades císticas, defeitos ósseos na maxila e mandíbula (48) e na regeneração óssea periodontal (49).

Apesar da excelente capacidade de ligação com ossos e tecidos moles, os VB têm aplicação restrita como material de suporte por sua eminente fragilidade (50). Diante disso, a bioengenharia tecidual trabalha para proporcionar melhores características estruturais e funcionais, incorporando metais, cerâmicas, polímeros e íons. Diferentes íons podem ser adicionados aos VB, a exemplo do zinco, magnésio, zircônia, titânio, boro, cobre, prata e estrôncio, com a finalidade de potencializar a funcionalidade e sua bioatividade (51).

O Sr^{2+} induz benefícios à mineralização e à resistência óssea. O entendimento das vias de ação farmacológica do Sr^{2+} nos processos de reparação óssea obtiveram notáveis avanços nos últimos anos. Sabe-se que o Sr^{2+} reduz a diferenciação e a atividade celular dos osteoclastos e, conseqüentemente, promove sua apoptose e a diminuição da reabsorção óssea. Outro efeito do Sr^{2+} é estimular o processo de diferenciação de células mesenquimais estromais (MSCs) em osteoblastos (52,53). Os alvos moleculares desse íon ainda são objetos de estudo, mas suspeita-se que eles atuem em alvos semelhantes aos do íon cálcio (Ca^{2+}), mediante semelhança estrutural entre eles. A estimulação de receptores sensíveis ao Ca^{2+} em osteoclastos e osteoblastos ativam a fosfolipase $\text{C}\beta$, o inositol 1,4,5-trifosfato e a liberação de Ca^{2+} intracelular. O íon Ca^{2+} induz a ativação da MAP quinase (proteína ativada por mitógeno) regulada pela sinalização extracelular 1 e 2 (MAPK ERK1/2) e pela via de sinalização Wnt/Fator Nuclear de Células T ativadas (Wnt/NFATc). Ao fim, as moléculas reguladoras ligantes do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) controlam o mecanismo da reabsorção óssea (54).

Cientes do potencial terapêutico do Sr^{2+} , Gorustovich e cols (2010) (55) avaliaram, pela primeira vez, a osteocondutividade de partículas do VB 45S5 dopados com 6 %SrO em mol (45S5.6Sr) implantadas na medula óssea da tíbia de ratos. As evidências desse estudo indicaram que não houve diferença significativa entre as partículas 45S5 e 45S5.6Sr. Consoante às evidências, outro estudo verificou a estabilidade de implantes de cerâmica de vidro ($4,5\text{SiO}_2-3\text{Al}_2\text{O}_3-1,5\text{P}_2\text{O}_5-3\text{SrO}-2\text{SrF}_2$) com completa substituição de íons Ca^{2+} por Sr^{2+} , em um modelo de fêmur de coelho, analisado após 12 semanas por micro-CT. A biocompatibilidade e a capacidade de regeneração óssea foram semelhantes ao VB sem substituição, entretanto, percebeu-se que elevadas quantidades de Sr^{2+} não influenciaram negativamente nas propriedades de bioatividade e na reconstrução óssea (56).

Goel e cols (2011) (57) investigaram a influência do SrO na capacidade de formação de apatita em SBF quando substituições de até 10 %mol eram realizadas no VB $[(36,07-x)\text{CaO}-x\text{SrO}-19,24\text{MgO}-5,61\text{P}-38,49\text{SiO}-0.59\text{CaF}]$. Foi

visto que a capacidade de formação de apatita diminuiu significativamente conforme aumento de Sr^{2+} e consequente diminuição de Ca^{+2} . Isso pode ser explicado pela incapacidade de formação da fase precursora do fosfato de octacálcio em baixas concentrações de Ca^{2+} (58).

Diferentemente, Jebahi e cols (2013) (59), utilizando um modelo de cicatrização de defeito criado na lateral de côndilo femoral de rato, provaram que a substituição de 0,1 % em peso de Sr^{2+} no VB 46S6 (considerada a concentração de Sr^{2+} próxima à existente no corpo) aumentou a formação óssea e a quimiotaxia de osteoblastos para a região. Interessados em aprofundar essas evidências, Zhang e cols (2013) (52) verificaram o efeito estimulador de arcabouços mesoporosos de VB [$\text{Sr}/\text{Ca}/\text{P}/\text{Si} = x/15/5/(80-x)$], sem e com Sr^{2+} (0; 2,5 e 5 %mol) sobre a proliferação e diferenciação osteogênica de MSCs da medula óssea *in vitro*, e sobre defeitos de femur de tamanho crítico em ratas ovariectomizadas. Os resultados mostraram que os íons Sr^{2+} aumentaram significativamente a multiplicação de MSCs e estimularam a expressão de marcadores de diferenciação de osteoblastos [fosfatase alcalina de fígado (ALPL), proteína óssea gamma carboxyglutamato (BGLAP), colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1) e fator de transcrição 2 (RUNX2)]. *In vivo*, viu-se maior regeneração óssea de defeitos osteoporóticos preenchidos com VB dopado com Sr^{+2} , sugerindo que a incorporação de íons Sr^{2+} seja um método terapêutico promissor na regeneração de fraturas ocasionadas pela osteoporose.

Santocildes-Romero e cols (2015) (53) também investigaram o efeito da substituição parcial (50 %) ou total (100 %) de CaO por SrO (em molar) do VB 45S5 sobre MSCs da medula óssea de rato *in vitro*. Essa substituição resultou em aumento da solubilidade do biomaterial, podendo ter causado uma inibição da atividade metabólica celular em composições com 100 % de Sr^{2+} . Entretanto, análises de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real detectaram a regulação da expressão de alguns genes (ALPL e BGLAP) da diferenciação osteoblástica na presença de composições substituídas por Sr^{2+} . Esse resultado apoia o conceito de que VB podem exibir seletividade em células *in vitro*, favorecendo a diferenciação em uma linhagem osteogênica.

Apesar do VB S53P4 ter sido descoberto há algum tempo, foi pouco explorado pela área da biotecnologia tecidual óssea, necessitando de novos estudos que venham melhorar as propriedades bioativas desse material. Baseado nas propriedades de osteocondução, osteoindução e atividade antimicrobiana do VB S53P4, e no potencial terapêutico do íon Sr^{2+} , esse trabalho teve como propósito caracterizar, avaliar a bioatividade *in vitro* e a neoformação óssea *in vivo* de materiais cristalinos dopados com Sr^{2+} . H1: A adição de Sr^{2+} em CP semelhantes ao VB S53P4 pode interferir nas características físico-químicas, na bioatividade e no potencial regenerativo ósseo.

1. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Materials Science and Engineering C”.

Caracterização, avaliação da bioatividade *in vitro* e da neoformação óssea *in vivo* de materiais cristalinos dopados com íons estrôncio

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar, avaliar a bio-reatividade *in vitro* e os ganhos potenciais ósseos *in vivo* provenientes da substituição parcial do óxido de cálcio (CaO) por 12,5 mol% (CPSr12,5) ou 25 mol% (CPSr25) de óxido de estrôncio (SrO) em pós cristalinos (CP) de composição semelhante ao S53P4. A composição química dos CP (CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25) foi analisada por espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDX). A bio-reatividade foi avaliada por imersão em fluido corporal simulado (SBF) (24, 72 e 168 horas) e analisada por difração de raios X (DRX). O perfil de liberação de estrôncio (Sr^{2+}) em água destilada (1, 6 e 12 horas) foi obtido por espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS). Defeitos ósseos críticos bilaterais de 7mm foram criados na calvária de ratos Wistar. Os defeitos preenchidos com CPSr0 e CPSr25 faziam parte dos grupos teste e os não implantados foram utilizados como controle negativo. Os animais foram sacrificados após 14 e 28 dias. A dopagem com Sr^{2+} foi confirmada pela presença de SrO nas porcentagens de 2,209 % e 6,929 % peso para CPSr12,5 e CPSr25. Os valores de liberação de Sr^{2+} do CPSr25 foram maiores. Os principais picos de HA (26 ° e 32°) no tempo de 168 horas foram maiores para o CP sem Sr^{2+} . Nas análises microtomográfica

(n = 4) e histomorfométrica (n = 5) o CPSr25 mostrou valores maiores que o CPSr0 para o volume ósseo (p = 0,016), densidade volumétrica óssea (p = 0,016) e área de neoformação óssea (p = 0,025) aos 28 dias. A análise histológica (n = 5) revelou maior grau de vascularização aos 28 dias para CPSr25 quando comparado ao CPSr0 (p = 0,003). Esses dados confirmam que a dopagem dos CP S53P4 com íons Sr^{2+} possui potencial para uso como substitutos ósseos na cicatrização de defeitos críticos.

Palavras-chave: Materiais Biocompatíveis, Cerâmicas, Estrôncio, Regeneração Óssea.

1. Introdução

A restauração bem sucedida de defeitos ósseos de tamanho crítico ocorridos por lesões traumáticas, inflamações, infecções microbianas, deformidades congênitas e ressecções tumorais é um problema que motiva a criação de novos biomateriais na odontologia [1,2]. Os enxertos ósseos mais usados para reabilitação da forma e da função de tecidos acometidos são o autógeno, o homogêneo, o heterógeno e o aloplástico [3]. Enxertos aloplásticos vêm obtendo destaque devido às limitações e aos riscos associados aos demais substitutos, como o fornecimento ósseo limitado, a morbidade do banco do doador, a hospitalização prolongada, os potenciais riscos de infecção e a rejeição do sistema imunológico [4]. Os materiais sintéticos mais utilizados como enxertos na odontologia incluem a hidroxiapatita (HA), o beta-fosfato-tricálcio (β -TCP), os metais, os polímeros e os vidros bioativos (VB) [5].

O VB S53P4 (53 % de dióxido de silício, 23 % de óxido de sódio, 20 % de óxido de cálcio e 4 % de pentóxido de fósforo) [6] é um dos substitutos ósseos mais estudados por apresentar potencial de osteocondução [7-9], de diferenciação osteogênica de células-tronco [10] e de angiogênese [9]. Diferentemente dos demais VB, apresenta efeito antimicrobiano [7,11-13], contribuindo para a proteção de superfícies de biomateriais da colonização de micro-organismos [13]. Sua composição química, com baixo teor de sílica, é responsável pela formação da camada de HA bioativa que se liga fortemente ao tecido ósseo [14,15]. Tal vantagem justifica sua seleção para aplicação na área médica [7-9,13,16-23] e odontológica [24-28].

A fusão de óxidos é o método padrão para produção desse biomaterial [29]. Entretanto, esse método apresenta desvantagens como resultar em materiais quimicamente heterogêneos, com possíveis contaminações [30] e defeitos na integração do material [29]. A rota sol-gel oferece um método alternativo ao procedimento tradicional para preparo de materiais vitrocerâmicos [30] e tem como vantagens a obtenção de maior pureza, a homogeneidade, o controle de composição [31], a facilidade de alteração microestrutural [32] e a presença de porosidade que permite um aumento de área de superfície de contato [31,33,34]. Além disso, a temperatura de estabilização dos géis (680 °C) coincide com a faixa de temperatura (600-700 °C) de cristalização dos VB. Os materiais resultantes são parcialmente cristalinos e compostos pela fase cristalina altamente bioativa – silicato de sódio ($\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ e $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$) [30,32,35].

A bioengenharia tecidual trabalha para proporcionar melhores características estruturais e funcionais, incorporando metais, cerâmicas, polímeros e íons. Diferentes íons podem ser adicionados aos VB, a exemplo do zinco, magnésio, zircônia, titânio, boro, cobre, prata e estrôncio, com a finalidade de potencializar sua funcionalidade e bioatividade [36]. Os íons Sr^{2+} são conhecidos pelo potencial terapêutico sobre o fortalecimento ósseo. Agem através de dois mecanismos, a diferenciação osteoblástica e a apoptose dos osteoclastos por vias semelhantes às do íon cálcio (Ca^{2+}) [37]. Estudos com adição do Sr^{2+} no VB demonstram aumento da formação óssea, da quimiotaxia de osteoblastos [38], da multiplicação de células mesenquimais estromais [39] e da estimulação da expressão de marcadores de diferenciação de osteoblastos [fosfatase alcalina de fígado (ALPL), proteína óssea gamma carboxyglutamato (BGLAP), colagênio tipo1 alfa 1 (COL1A1), fator de transcrição 2 (RUNX2)] [14,39]. Em contraste, estudos *in vitro* demonstraram que a substituição de Ca^{2+} por Sr^{2+} retardou a formação de uma fase semelhante à HA em SBF [15,40,41], o que foi associado a incapacidade de formação da fase precursora do fosfato de octacálcio em baixas concentrações de Ca^{2+} [41].

Estudos *in vitro* com dopagem de Sr^{2+} em formulações S53P4 já foram realizados [15,42], entretanto não há avaliações da ação desse íon adicionado ao S53P4 em modelo animal de defeito crítico. Baseado nas propriedades de osteocondução, de osteoindução e da atividade antimicrobiana do VB S53P4, e

no potencial terapêutico do íon Sr^{2+} , esse trabalho tem como objetivo caracterizar, avaliar a bioatividade *in vitro* e a neoformação óssea *in vivo* de materiais cristalinos de composição semelhante ao S53P4 dopados com íons Sr^{2+} .

2. Material e Métodos

2.1. Preparação dos pós cristalinos

Para a produção dos CP, utilizados no desenvolvimento desta pesquisa, foram usados o tetraetil ortosilicato (TEOS, 99 %), o trietil fosfato (TEP), o nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, o nitrato de sódio $[\text{Na}(\text{NO}_3)]$ e o cloreto de estrôncio (SrCl_2) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), precursores do silício (Si), do fósforo (P), do cálcio (Ca), do sódio (Na) e do estrôncio (Sr), respectivamente. Inicialmente, o TEOS foi adicionado ao ácido acético à 0,1 mol/L [43]. A quantidade de água foi definida de acordo com a relação de número de mol de água com o TEOS ($n = \text{água}/\text{TEOS}$), baseada em um valor de 35. Após 3h de agitação vigorosa através de um agitador magnético, foram adicionados o TEP, o nitrato de cálcio e o nitrato de sódio, com intervalo de 1h entre as adições, sob agitação constante. Nas composições de CP com Sr^{2+} , a quantidade de reagente foi calculada considerando uma substituição em massa dos componentes finais de óxidos de CaO por SrO em porcentagens de 12,5 % e 25 %. Os valores das massas utilizadas referentes a esses componentes são mostrados na Tabela 1.

As soluções foram deixadas na estufa à 110 °C por 48h para que ocorresse a geleificação e a secagem. Posteriormente, os materiais passaram por queimas de 600, 700 e 800 °C, com taxa de aquecimento de 30 °C/min durante 5h. A queima à 800 °C foi escolhida por propiciar a formação da fase cristalina bioativa chamada de combeita [44,45] e por não apresentar nitrato de sódio residual [29]. As composições obtidas CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25 são mostradas na tabela 1. Finalmente, os materiais foram macerados e peneirados usando uma peneira de 200 mesh (abertura 45 μm) para obtenção de partículas que propiciassem uma maior área de superfície de contato.

Tabela 1. Massas dos reagentes relacionados aos componentes dos pós cristalinos estudados (gramas).

Reagentes	TEOS	Na(NO ₃)	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	TEP	SrCl ₂
CPSr0	5.742	1.971	2.636	0.320	0.00
CPSr12.5	5.742	1.971	2.306	0.320	0.201
CPSr25	5.742	1.971	1.970	0.320	0.402

Tabela 2. Composição dos pós cristalinos estudados (mol %).

Componentes	SiO ₂	Na ₂ O	CaO	P ₂ O ₅	SrO
CPSr0	53.0	23.0	20.0	4.0	0.0
CPSr12.5	53.0	23.0	17.5	4.0	2.5
CPSr25	53.0	23.0	15.0	4.0	5.0

2.2. Caracterização prévia dos pós cristalinos

Os pós cristalinos CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25 foram caracterizados anteriormente por análises termogravimétricas (TG/DTG) sob atmosfera de nitrogênio e aquecimento da temperatura ambiente a 1000 °C a uma taxa de aquecimento de 15 °C/min (DTG-60H, Shimadzu, Japão) (Fig. 1) [46]. O comportamento de cristalização foi analisado por difração de raios X (DRX) (XRD-6000, Shimadzu, Japão) operado com radiação alfa de cobre (Cu K α , λ = 0.15418 Å) e filtro de níquel (Fig. 2) [46]. Os espectros de infravermelho foram obtidos usando um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de fourier (FTIR) (IRPrestige-21, Shimadzu, Japão) usando pastilhas de KBr com 64 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹ de 400-4,000 cm⁻¹ (Fig. 3) [46]. O tamanho médio das partículas e o desvio padrão foram estimados a partir de leitura em triplicada usando um ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido) (Tab. 3) [46]. A morfologia dos CP foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) modelo Quanta 450 (FEI Company, Estados Unidos) (Fig. 4) [46].

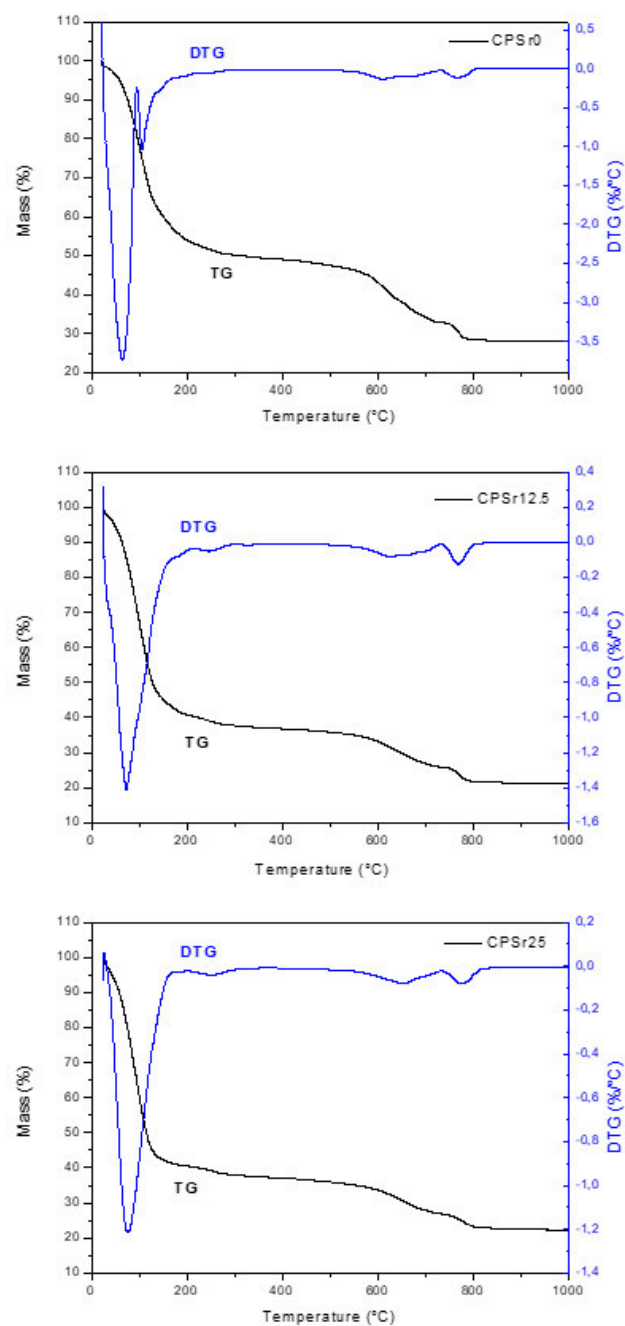


Figura 1. Curvas termogravimétricas e termodiferenciais (TG/DTG) dos pós cristalinos (CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25) expressas como a mudança do percentual de massa de amostra em função da temperatura.

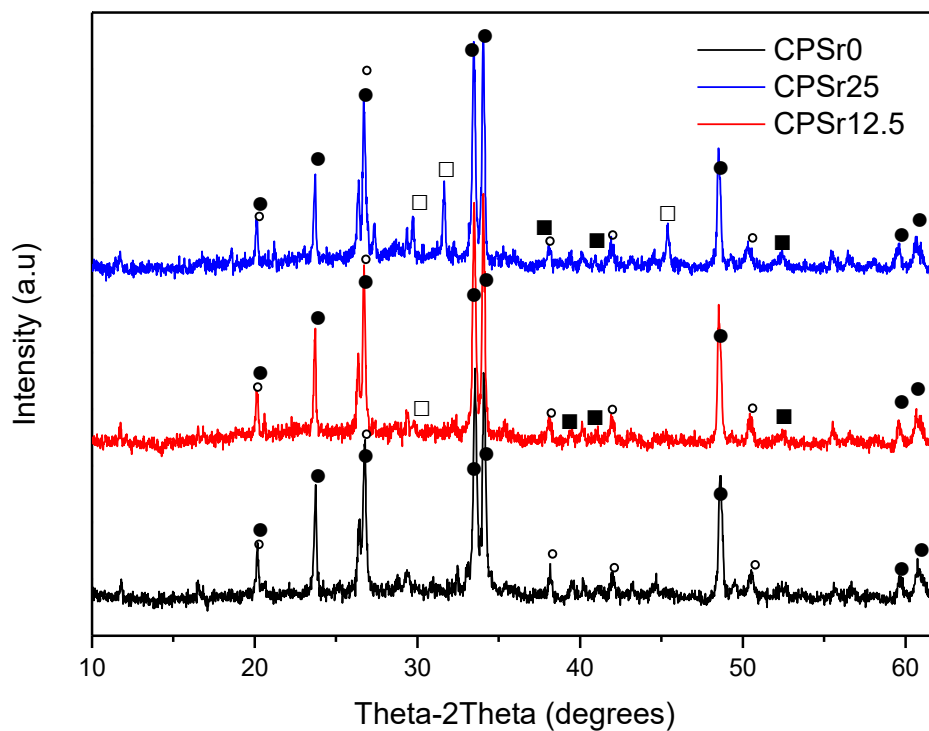


Figura 2. Padrões de XDR dos pós cristalinos (CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25).
($\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ (●), $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ (○), SrSiO_3 (□), $\text{Na}_2\text{SrSi}_2\text{O}_6$ (■)).

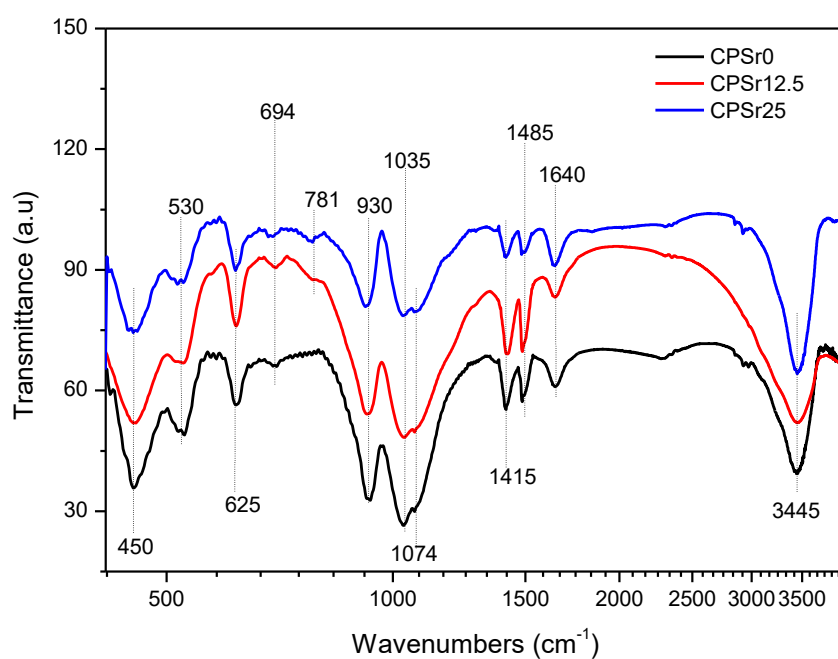


Figura 3. Espectros de FTIR dos pós cristalinos CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25. Bandas características: 850 a 1220 cm^{-1} (vidros de silicato), 930 cm^{-1} (ligação do Si-O⁻ ao Na⁺ ou Ca²⁺, ou a ligação P-O-P), 1070 (grupo fosfato), 530 e 625 cm^{-1} (combeita), entre 1400 e 1515 cm^{-1} (carbonato), 781 cm^{-1} (Sr-O).

Tabela 3. Determinação do tamanho médio das partículas dos pós cristalinos (CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25) por ZetaSizer.

Materials	Size	Standard deviation
CPSr0	1.61 μm	$\pm 0.24 \mu\text{m}$
CPSr12.5	1.88 μm	$\pm 0.48 \mu\text{m}$
CPSr25	1.48 μm	$\pm 0.41 \mu\text{m}$

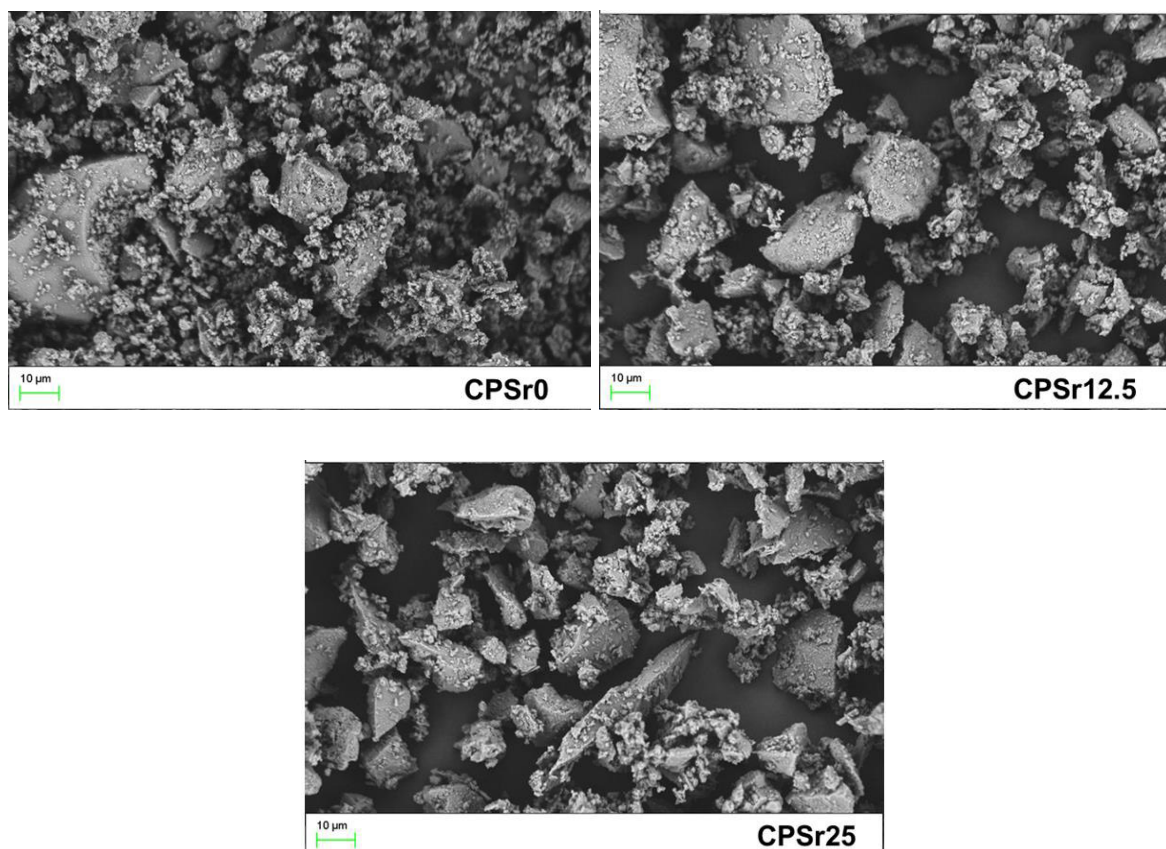


Figura 4. Micrografias (MEV) dos pós cristalinos (CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25) evidenciando material irregular com tamanho variável e partículas menores formando aglomerados ou se unindo às superfícies de partículas maiores.

2.3. Caracterização dos pós cristalinos

2.3.1. Análise por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

A composição química dos pós cristalinos, CPSr0, CPSr12,5, CPSr25, foi determinada por EDX (*Energy Dispersive X ray Analysis*) em um espectrômetro de fluorescência de raios X por energia dispersiva (Shimadzu, modelo EDX-720, Japão) mapeando-se a distribuição dos óxidos SiO₂, Na₂O, CaO, P₂O₅ e SrO.

2.4. Espectroscopia de Absorção Atômica em Chama (FAAS)

Neste ensaio, 0,225 g de cada CP dopado com Sr²⁺ (CPSr12,5 e CPSr25) foi imerso em um béquer com 150 mL de água deionizada, sob agitação contínua (taxa média de 75 rpm), a uma temperatura de 22 °C. Com auxílio de uma seringa, 50 mL da solução homogênea foram removidos (60, 360 e 1440 min). Após cada retirada, as soluções foram filtradas com filtro millipore de 0,22 µm [47]. As amostras foram acidificadas e a determinação de Sr²⁺ realizada por FAAS (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*) (Analytik Jena, Nov AA3003, Jena, Alemanha). O experimento foi realizado em triplicata e os valores médios de cada ponto da curva foram obtidos.

2.5. Testes prévios de bio-reatividade in vitro

Os materiais foram avaliados em SBF (pH 7,4) [48] nos tempos de 24, 72 e 168 h, utilizando MEV (Fig. 5) e por FTIR (Fig. 6) para verificar a formação de HA [46].

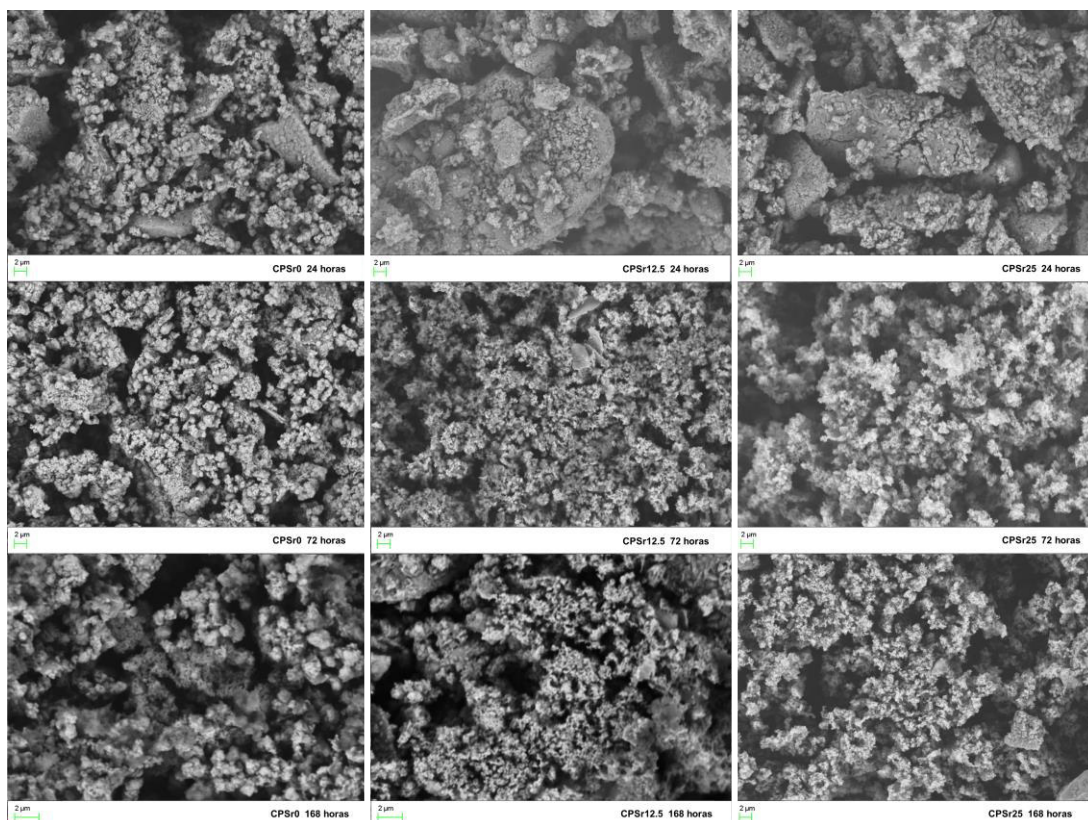


Figura 5. Micrografias dos pós cristalinos (CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25) após 24, 72 e 168 horas de imersão em SBF com formação de uma camada compatível com a HA para todos os CP.

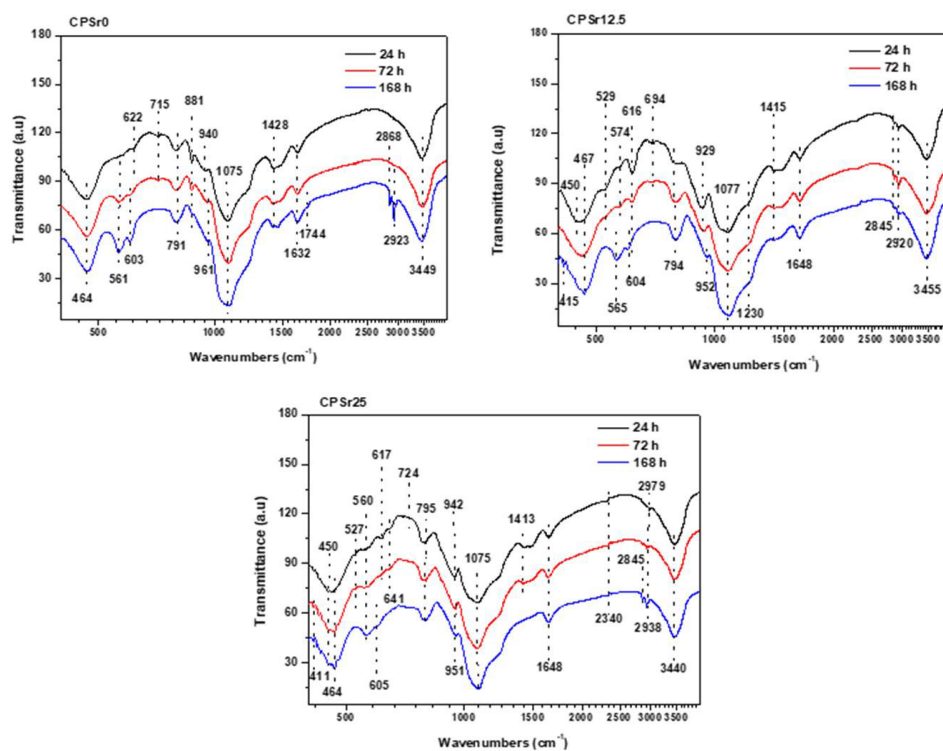


Figura 6. Espectros de FTIR dos pós cristalinos (CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25) após imersão em SBF por 24, 72 e 168 horas com bandas características de HA para todos os grupos (565 e 605 cm^{-1}).

2.6. *Teste de bio-reatividade in vitro*

2.6.1. *Difração de Raios-X (DRX)*

A bio-reatividade dos materiais foi avaliada por imersão em SBF (pH 7,4) pelo método de Kokubo e cols (2006) [48]. Os CP foram prensados a 9,81 N por 20 minutos para obtenção de arcabouços. As amostras foram limpas em acetona com auxílio do ultrassom por 10 segundos [32]. Após, os corpos-de-prova foram imersos em SBF usando uma proporção de 2 mg/mL, sob agitação constante à 37 °C em mesa agitadora [32] por 24, 72 e 168 h [15]. Ao término de cada período, as amostras foram lavadas com acetona para remover o SBF e para finalizar qualquer reação superficial, e submetidas à secagem [32]. Nos tempos 24, 72 e 168 h, as amostras foram analisadas por DRX (XRD-6000, Shimadzu, Japão) para verificar a existência de picos característicos da HA nos materiais cristalinos.

2.7. *Experimento In vivo*

2.7.1. *Procedimento Cirúrgico*

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de João Pessoa sob o nº de protocolo 002/2019. Ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso entre 300g e 400g, foram submetidos à anestesia intraperitoneal de 80 mg/kg de Cloridrato de Cetamina 10 % (Cetamin®, Syntec, Brasil) e 10 mg/kg de Cloridrato de Xilazina 2 % (Xilazin®, Syntec, Brasil) [49]. Após, foi realizada a tricotomia na região da calvária e a antissepsia da pele com digluconato de clorexidina à 2 %. Foi feita uma incisão cutânea bicoronal, semilunar, com extensão de aproximadamente 2 cm, estendendo-se da pele para as camadas fascial e periosteal que sobrepõem à sutura sagital da calvária. O tecido subcutâneo, o músculo temporal e o periósteo foram divulsionados de maneira a permitir a visualização da região óssea a ser cirurgiada. Dois defeitos circulares críticos, com 7 mm de diâmetro cada, foram realizados na região da calvária, sobre a sutura sagital mediana, com uma broca trefina de 6mm (Harte, Precision

Grip, Brasil) acoplada a um motor cirúrgico portátil (Motor endodôntico X - smart plus maillefer, Dentsply, Suíça), sob baixa rotação e irrigação abundante com solução salina estéril a 0,9 % (50). Para evitar danos nos tecidos subjacentes, o osso foi parcialmente perfurado com a trefina e gentilmente elevado com foice ponta morse (Foice Raspador Extrator Ponta Morse 0/00, Millennium, Brasil) para separá-lo da dura-máter [49].

Os animais foram divididos aleatoriamente, por sorteio, em três grupos e avaliados em 2 períodos distintos (14 e 28 dias), totalizando seis grupos com número amostral de 5 defeitos cada. Os grupos receberam material de preenchimento diferente: coágulo sanguíneo, CPSr0 e CPSr25 (50). Os CP foram previamente esterilizados por óxido de etileno. Nos grupos experimentais tratados com biomateriais, colocou-se 20mg de CP, de forma a ocupar toda a loja óssea criada. Por cima do material de preenchimento, foi posicionada uma tela de polipropileno (Tela de Polipropileno Plana Propy-Mesh, Atramat, México) para promover uma área cirúrgica livre de invasão epitelial [51] e para proteção da dura-máter. A sutura da pele foi feita com fio de seda 3-0 (Technew®, Brasil).

Durante o pós-operatório, os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno unitárias, forradas com maravalha (Maravalha de Pinus Biotério – QUIMIA, Brasil), ciclo dia/noite de 12/12 horas, com facilitação do acesso à água e a ração (QUIMIA, Brasil), administração de dose única de 0,2 mL do pentabiótico (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Brasil) e 50 mg/Kg de dipirona de 8 em 8 horas por 5 dias, ambas medicações por via subcutânea [52]. Os animais ficaram sob observação durante as 4 horas posteriores ao momento cirúrgico. A limpeza da ferida cirúrgica foi realizada com digluconato de clorexidina à 2 % até a remoção da sutura e total cicatrização.

Após 14 e 28 dias pós-operatórios, os animais sofreram eutanásia em câmara por inalação de dióxido de carbono (CO₂). Os crânios foram dissecados e fragmentos representativos da calvária com a região do defeito foram coletados e fixados em formol à 10 % por um tempo mínimo de 48 horas [50]. Todas as etapas cirúrgicas encontram-se na figura 7. Os procedimentos seguiram as diretrizes da prática de eutanásia do conselho nacional de controle de

experimentação animal e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento.

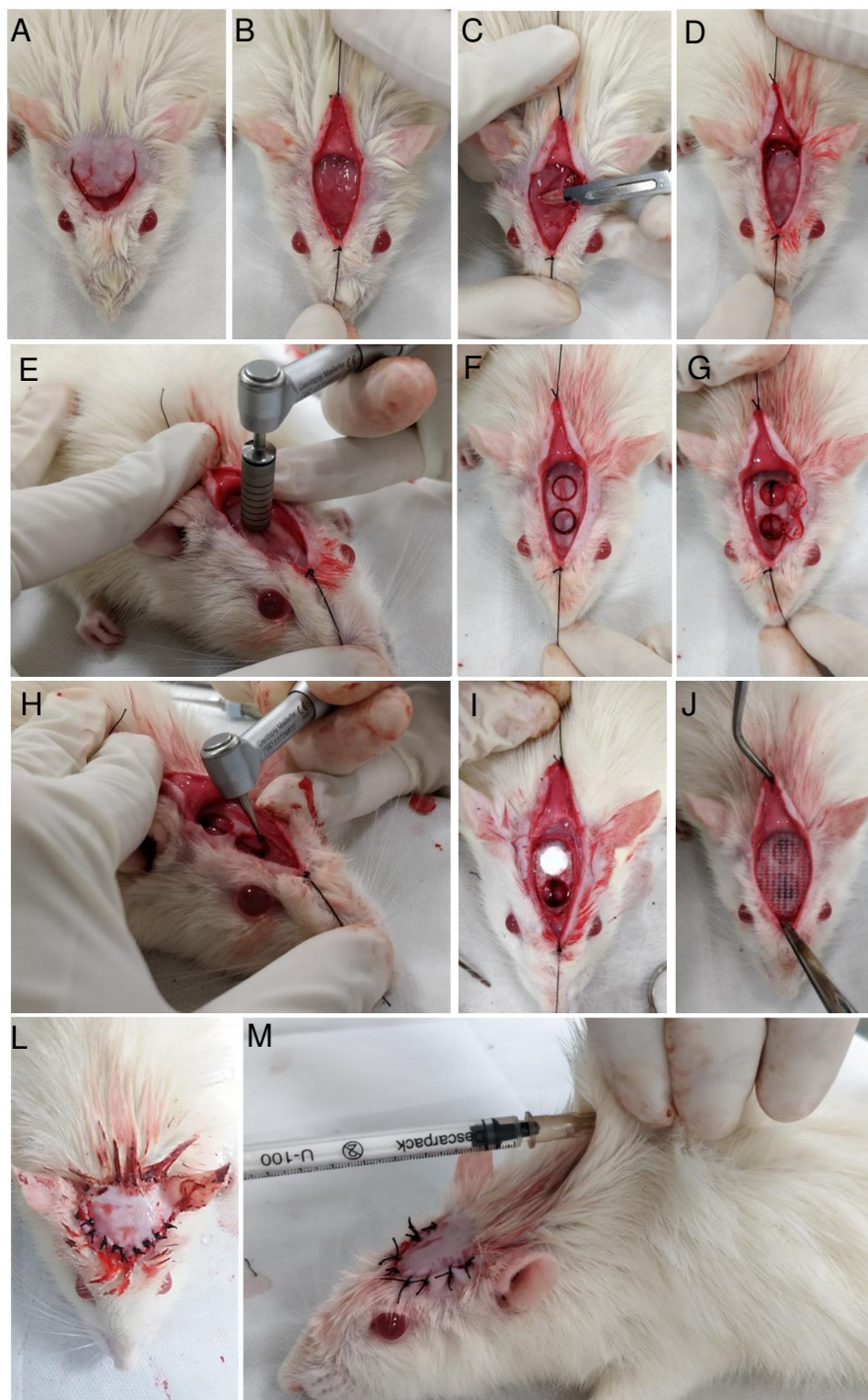


Figura. 7. Sequência do procedimento cirúrgico *in vivo*. (A) Incisão semilunar; (B) Fixação das bordas; (C) Divulsão do periósteo; (D) Calvária exposta; (E) Defeito crítico de 7mm; (F) Dois defeitos criados; (G) Deslocamento do bloco ósseo; (H) Regularização de espículas nas bordas do defeito; (I) Implantação dos

biomateriais; (J) Tela de polipropileno posicionada; (L) Síntese das bordas da ferida; (M) Aplicação subcutânea de analgésico e antibiótico.

2.7.2. Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

Para avaliar a mineralização dos defeitos, quatro amostras de cada grupo, nos períodos de 14 e 28 dias, foram analisadas em um aparelho de micro-CT (Bruker micro CT, SkyScan 1172, Bélgica) pertencente ao laboratório de Microscopia e Imagem Biológica da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Utilizou-se o seguinte protocolo: 13,5 µm de pixel, 80 kV, 124 µA, 180 graus de rotação com quatro projeções a cada 0,6 graus, uso de filtro de alumínio de 0,5 mm e utilização de anel de redução de artefatos. O tempo de varredura para cada amostra foi de aproximadamente 53 minutos. As amostras foram posicionadas e fixadas à sela do aparelho para que não ocorresse movimentação durante a tomada tomográfica. Finalizado o processo, os dados em duas dimensões foram processados no *software NRecon* e reposicionados no *software Dataviewer* para alinhar os planos de corte. Através do *software CTAnalyser* foi delimitada a região de estudo (ROI) com 7mm de diâmetro e *threshold* fixo de 0 a 57. Os espécimes foram analisados quanto ao volume ósseo (BV), à densidade volumétrica óssea [PBV = BV sobre o volume tecidual total (BV/TV)], à espessura trabecular (TB.TH), ao espaço entre as trabéculas ósseas (TB.SP) e ao número de trabéculas ósseas (TB.N) [53].

2.7.3. Análise Histológica

Após a análise microtomográfica, todos os espécimes dos grupos (n = 5) fixados em solução de formalina tamponada (10 %) foram colocados em solução descalcificadora de ácido nítrico (10 %) por 3 dias e, posteriormente, desidratados e diafanizados. As calvárias foram seccionadas coronalmente, separando os dois defeitos, um anterior e outro posterior. As amostras foram incluídas em parafina e secções coronais de 5 µm de espessura [50] foram feitas da área central com maior neoformação óssea [54]. As lâminas histológicas foram coradas por Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômio de Masson (TM) [54]. Foram obtidas imagens histológicas em aumentos de 5x, 10x, 40x, posteriormente avaliadas a

cego por dois examinadores, calibrados e experientes, com auxílio de microscópio óptico (Carl Zeiss, Germany) [55].

As secções coradas com TM foram avaliadas histomorfometricamente na objetiva de 5x com auxílio de *software* de análise de imagem (ImageJ, National Institutes of Health, Estados Unidos) e foi calculada a porcentagem da área de neoformação óssea. Primeiramente, as bordas dos defeitos foram delineadas, e então, a porcentagem de área ossea recém formada (*New Bone Formation - NBF*) identificada e quantificada [56] de acordo com a equação 1 (Eq. 1):

$$\text{Equação 1. } NBF = NBA/TA \times 100$$

Onde, *NBA* (*New Bone Area*) é a área de osso novo e o *TA* (*Total Area*) é a área total medida entre as bordas do defeito.

Os aspectos verificados durante análise qualitativa, em cortes corados com H&E, foram tabulados em um sistema de escores baseados no grau de inflamação e no grau de vascularização. A análise morfológica, através da análise da lâmina toda, verificou processos como migração leucocitária, hemorragia, vasodilatação e morte celular (necrose e apoptose) [55], além da contagem de células inflamatórias e capilares sanguíneos [57] descritos abaixo (Tab. 4).

Tabela 4 - Pontuações atribuídas aos eventos histológicos

Escore	(a) Grau de inflamação
1	Ausência de células inflamatórias
2	Discreto (15 células inflamatórias no aumento de 10x)
3	Moderado (até 30 células inflamatórias no aumento de 10x)
4	Abundante (presença de mais que 30 células inflamatórias no aumento de 10x)
Escore	(b) Grau de vascularização
1	Ausência de capilares sanguíneos
2	Discreto (presença de menos que 3 capilares sanguíneos no aumento de 40x)
3	Moderado (presença de 3 a 5 capilares sanguíneos no aumento de 40x)
4	Abundante (presença de mais que 10 capilares sanguíneos no aumento de 40x)

Fonte: Metodologia adaptada de Mendes et al., 2009 [57]

2.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados com os valores da média $\pm$ desvio padrão/erro padrão. As diferenças entre os grupos foram verificadas por análise de variância (ANOVA) seguido de testes de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$) ou de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$), através do *software* de programa estatístico *GraphPad Prisma* (Graphpad Software, Estados Unidos).

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

A figura 8 indica a composição química em percentual por mol para cada material estudado. Os dados mostraram que os CP obtidos por meio do método sol-gel são compostos predominantemente pelos óxidos SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 . A dopagem com Sr^{2+} foi confirmada pela presença de SrO nas porcentagens de 2,209 %massa total do CPSr12,5 (10,28 %massa de substituição de CaO por SrO) e 6,929 %massa total do CPSr25 (27,5 %massa de substituição de CaO por SrO). Foi observada uma distribuição homogênea dos materiais, verificada pelo pequeno desvio-padrão das amostras, indicando que o método de produção sol-gel apresenta boa solubilidade. Em todas amostras produzidas nesse trabalho foi identificado o óxido de alumínio (Al_2O_3) que possivelmente foi incluído nas amostras por meio de contaminação dos reagentes, do cadinho de queima e do molde para fabricação das pastilhas para realização da análise por EDX.

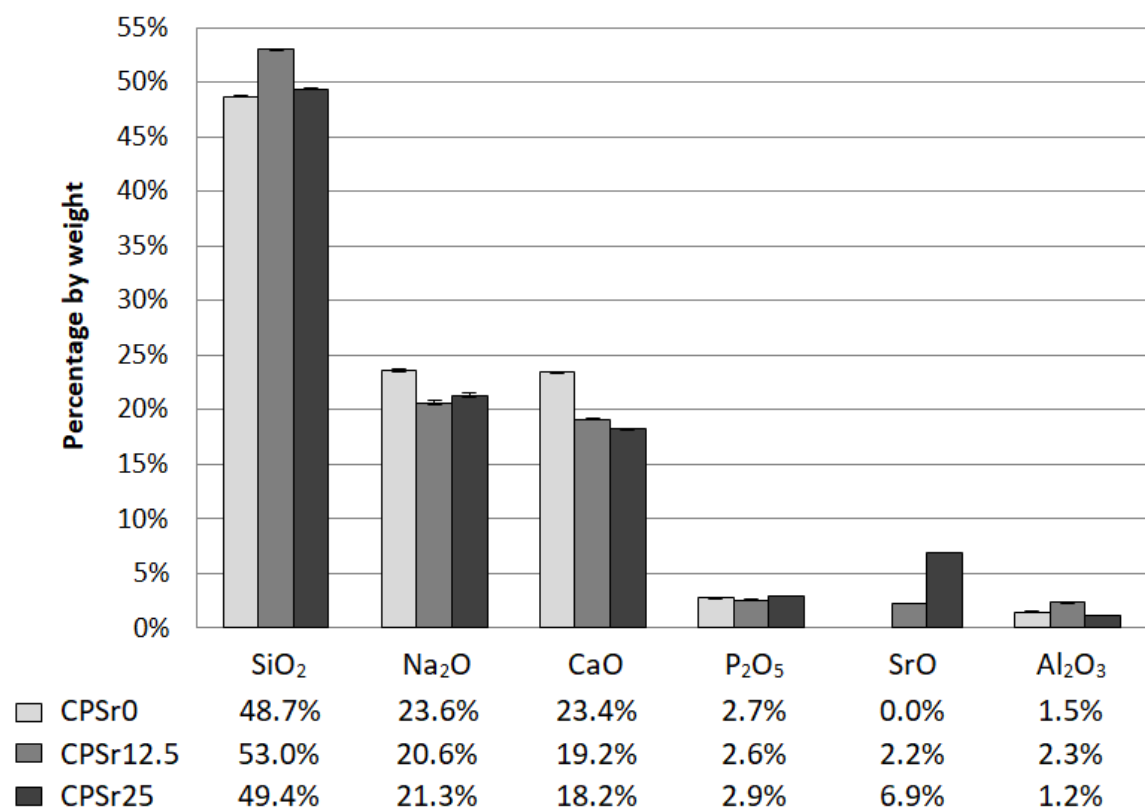


Figura 8. Composição química dos pós cristalinos (CPSr0, CPSr12,5, CPSr25) realizada por EDX.

3.2. Espectroscopia de Absorção Atômica em Chama (FAAS)

A figura 9 mostra a liberação de Sr^{2+} dos CP (CPSr12,5 e CPSr25) em água destilada através de FAAS. Observou-se uma taxa crescente de dissolução dos íons Sr^{2+} até o ponto máximo de liberação que se deu no tempo de 360 minutos para os dois materiais. Nos minutos seguintes, essa tendência foi se alterando com leve declive para o CPSr25 e acentuada queda para o CPSr12,5. Conforme esperado, o CPSr25 apresentou maiores concentrações de Sr^{2+} durante todos os períodos [15] e menor queda do valor obtido ao final dos 720 minutos em relação ao pico máximo de liberação. Provavelmente, a maior queda de concentração de Sr^{2+} do CPSr12,5 do período de 360 a 720 minutos ocorreu devido a depletação de íon Sr^{2+} do biomaterial. Esses dados consolidaram a escolha do CPSr25, em detrimento do CPSr12,5, para uso em testes *in vivo*, pois maiores concentrações de Sr^{2+} no plasma tendem a desencadear melhores respostas biológicas pela maior disponibilidade no meio, sem causar toxicidade aos organismos vivos [58].

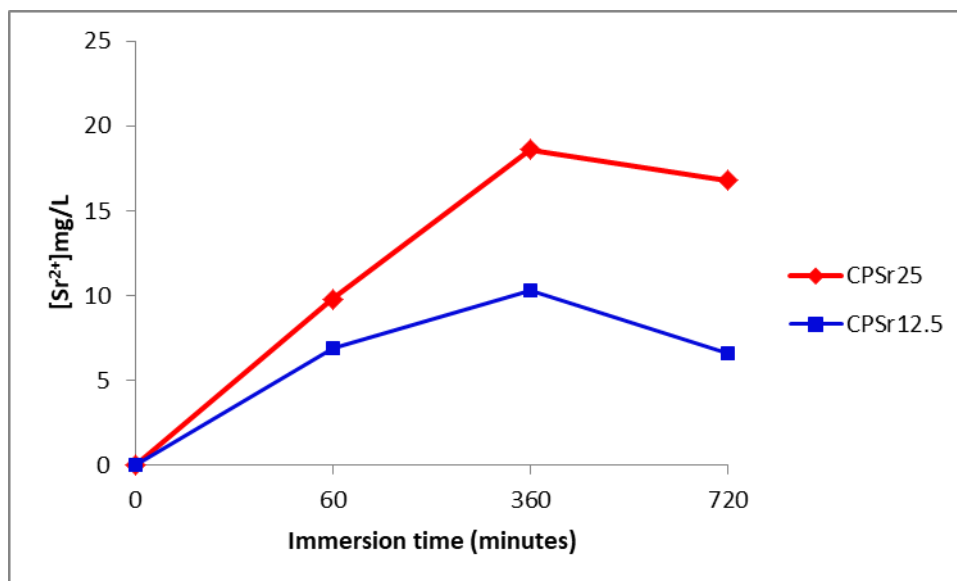


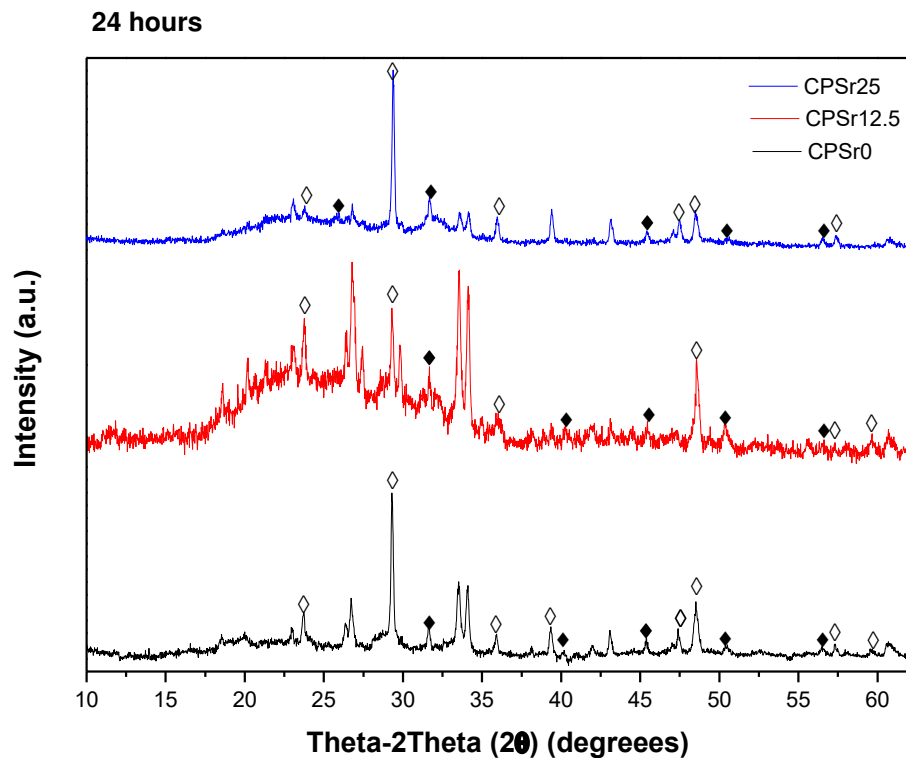
Figura 9. Liberação de íon Sr^{2+} dos pós cristalinos (CPSr12,5 e CPSr25) em água destilada no período de 60, 360 e 720 minutos. A liberação do íon Sr^{2+} é relatada em mg/L.

3.3. Teste de bio-reatividade *in vitro* com análise de DRX

Nesse estudo, usou-se a substituição de 12.5 % e 25 % massa de CaO por SrO baseada na semelhança de redes estruturais entre esses óxidos, ideal à substituição [42]. A escolha das porcentagens de substituição foi fundamentada nos bons resultados *in vitro* e *in vivo* obtidos em estudos anteriores por VB diferentes do S53P4 dopados com Sr^{2+} [14,38,39]. Altas substituições de CaO por SrO foram evitadas, pois insuficientes concentrações de Ca^{2+} podem dificultar a formação da apatita, via impedimento da constituição da fase precursora de fosfato de octacálcio, de modo a retardar a bio-reatividade do material [41].

Picos coincidentes com os picos do carbonato de cálcio (CaCO_3 ; ICDD 05-0586), dióxido de silício (SiO_2 ; ICDD 46-1045) e HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; ICDD 09-4320) foram visualizados nos padrões de DRX (Fig. 10). Os picos característicos de ligações atômicas que indicam a formação de HA (2θ iguais a 26° , 32° , 40° , 45° , 50° e 56°), com os respectivos planos (002, 211, 310, 203, 213 e 322), foram identificados nos grupos analisados no difratograma (Fig. 10) [15,32,59,60]. No período de 168 horas, picos mais expressivos de HA (2θ iguais a 26° e 32°) foram observados no grupo sem Sr^{2+} [32,59].

A menor intensidade dos picos de HA dos materiais com Sr^{2+} pode estar relacionada com a diminuição da espessura da camada de HA e/ou menor quantidade de conversão do CaP amorfo para a sua forma cristalina [15]. A substituição do CaO por SrO induz uma expansão na rede estrutural do vidro e consequente aumento da taxa de dissolução inicial do material em meio, o que explica a antecipada formação do filme de sílica gel sobre a superfície de CP com Sr^{2+} [15]. Essa rápida liberação eleva o pH e facilita a formação da camada de menor espessura de HA sobre a superfície do pó. Entretanto, entende-se que as menores camadas de HA decorrentes da dopagem com Sr^{2+} facilitam uma dissolução prolongada dos íons constituintes e melhoram a bioatividade [15].



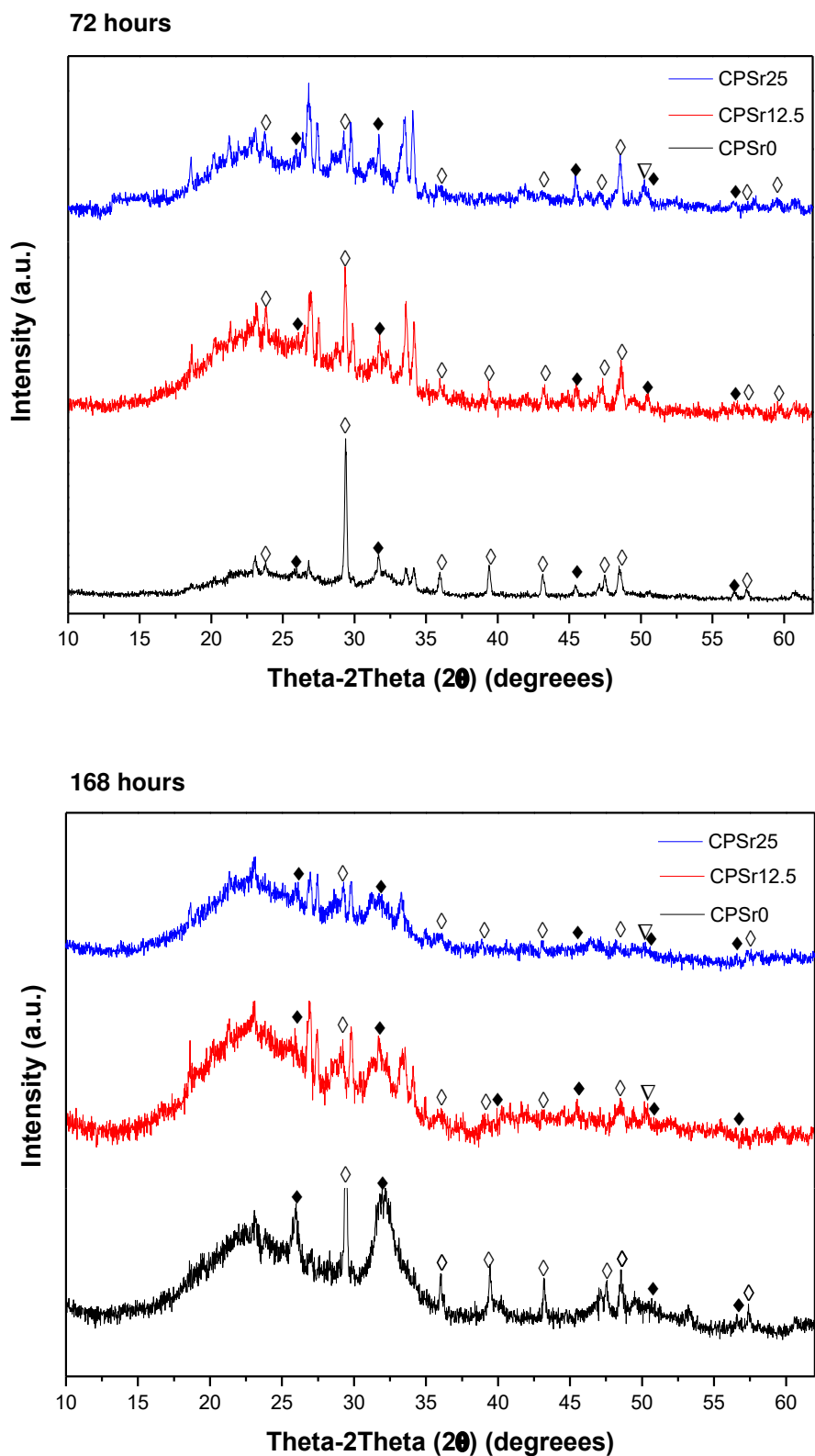


Figura 10. Picos de DRX dos pós cristalinos CPSr0, CPSr12,5 e CPSr25 após imersão em SBF por 24, 72 e 168 horas. Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (♦) Carbonato de Cálcio (CaCO_3) (◇), Dióxido de Silício (SiO_2) (▽).

3.4. Estudo *in vivo*

3.4.1. Microtomografia computadorizada (Micro-CT)

Pela primeira vez, o potencial regenerador ósseo da substituição de íons Sr^{2+} em materiais semelhantes ao VB S53P4 foi investigado por meio de um modelo de defeito crítico em calvária de rato. Os defeitos críticos criados nas calvárias dos animais foram tratados com 3 diferentes preenchedores (coágulo, CPSr0 ou CPSr25) e avaliados aos 14 e 28 dias após a etapa cirúrgica. Defeitos de tamanho crítico representam modelos experimentais validados, pois não apresentam regeneração óssea espontânea [61]. Entretanto, verificou-se que mesmo tratando-se de defeito considerado crítico ($\geq 5\text{mm}$ de diâmetro) [62], houve uma discreta cicatrização da loja óssea no grupo coágulo (*clot*) (Fig.11), implicando na necessidade de revisão desse conceito. Contudo, a tela de polipropileno pode ter influenciado, pois na medida em que protegeu a loja óssea de invasão do tecido conjuntivo, também contribuiu para a regeneração óssea guiada [51].

Parâmetros da macro e microarquitetura óssea foram avaliados por micro-CT. A figura 11 esquematiza as imagens 3D representativas obtidas dos grupos nos 2 períodos analisados. A regeneração óssea foi maior no grupo implantado com CPSr25, apesar de todos os grupos terem demonstrado capacidade de cicatrização óssea, com superior mineralização e maturação óssea durante a progressão dos períodos.

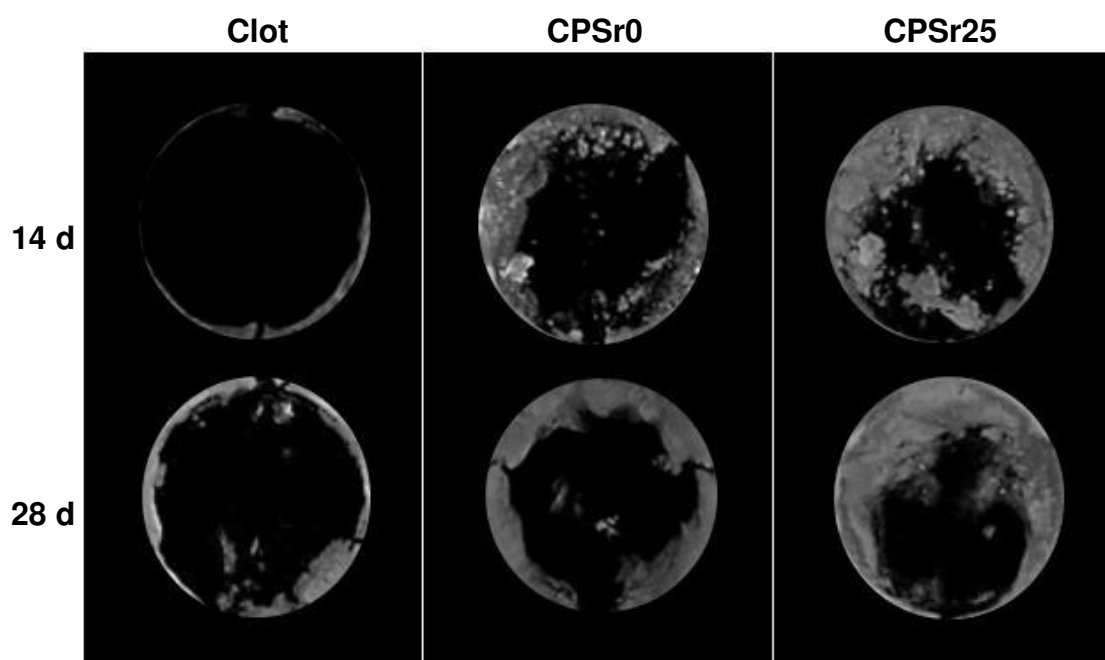
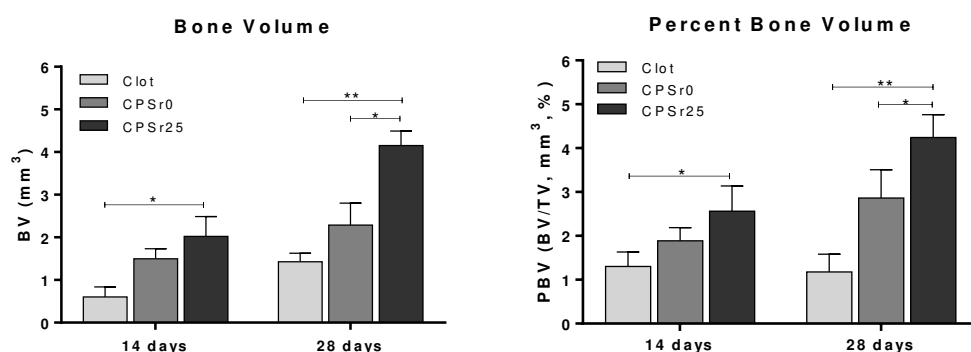


Fig. 11. Imagens 3D representativas da análise do Micro-CT dos defeitos das calvárias de rato, após 14 dias (14 d) e 28 dias (28 d), grupos *Clot* (Coágulo), CPSr0 e CPSr25.

A figura 12 traz as análises estatísticas dos parâmetros microtomográficos. A similaridade entre os dados da PBV e do BV comprova a padronização do método de criação de volume tecidual das amostras. O CPSr25 foi estatisticamente diferente do coágulo aos 14 e 28 dias para os parâmetros de BV ($p = 0,032$; $p = 0,001$) e de PBV ($p = 0,029$; $p = 0,001$), e aos 28 dias para o TB.N ($p = 0,015$). Em contrapartida o coágulo demonstrou maior TB.SP em relação ao CPSr0 e CPSr25 ($p = 0,029$; $p = 0,009$) aos 14 dias. O CPSr25, quando comparado ao CPSr0, mostrou valores maiores para o BV ($p = 0,016$) e a PBV ($p = 0,016$) aos 28 dias. De acordo com os dados, presume-se que os maiores valores do BV e da PBV do CPSr25 no período de 28 dias é resultante do aumento de TB.N.

Os resultados da análise microtomográfica indicam que a dopagem com Sr^{2+} tem maior potencial regenerador ósseo. Resultados semelhantes foram vistos no estudo *in vivo* de Zhang e cols (2013) [14], quando incorporou o Sr^{2+} (2,5 e 5 % mol) a um VB sem atividade antimicrobiana, com composição e tamanho de partícula diferente do usado nesse estudo, em que houve aumento da velocidade e qualidade de regeneração óssea e remodelação via recuperação da conectividade trabecular.



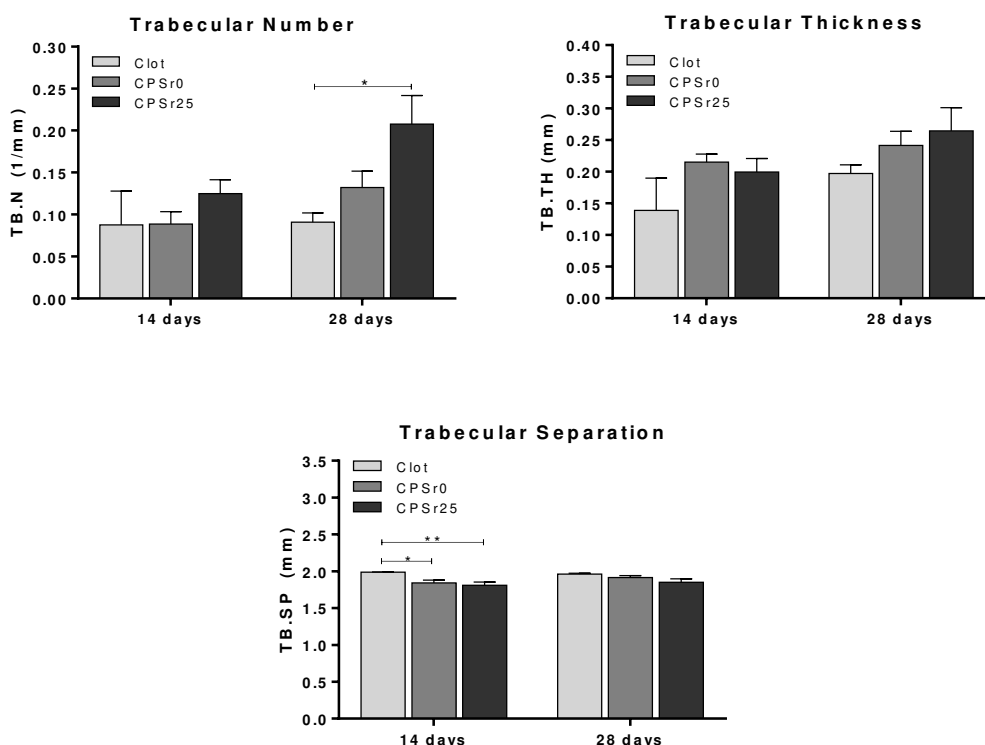


Fig. 12. Análise do micro-CT para regeneração óssea em diferentes parâmetros: (a) *Bone Volume* (Volume Ósseo), (b) *Percent Bone Volume* (Densidade Óssea Volumétrica), (c) *Trabecular Number* (Número de Trabéculas), (d) *Trabecular Thickness* (Espessura Trabecular) e (e) *Trabecular Separation* (Espaço entre Trabéculas). Valores da média e erro padrão, teste One-way ANOVA seguido pelo pós - teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para comparações entre os grupos coágulo, CPSr0 e CPSr25.

3.4.2. Análise Histológica

Secções histológicas dos grupos coágulo, CPSr0 e CPSr25 foram corados por TM e H&E (Fig. 13). Após 14 e 28 dias de tratamento dos defeitos ósseos, as amostras com coloração TM, vistas no aumento de 40x, mostraram tendência para a formação de único bloco ósseo nas bordas do defeito e a presença de tecido conjuntivo denso conectando os centros de calcificação, com neoformação óssea dirigida ao centro. O tecido ósseo neoformado durante os dois períodos mostrou muitos osteócitos e lacunas ósseas irregulares, caracterizando um padrão imaturo. Não foram verificados focos de necrose óssea nos espécimes, confirmando a ausência de toxicidade local de CP semelhantes ao VB S53P4 dopados com Sr^{2+} [24]. Consoante a esses resultados, outro estudo comprovou

que o VB S53P4, com substituição de 10 %mol de Sr^{2+} , também não apresenta citotoxicidade a fibroblastos gengivais, o que é oportuno ao uso desses materiais no tratamento de agravos da odontologia [42].

Os biomateriais foram completamente reabsorvidos aos 14 dias. A reabsorção é uma característica esperada para biomateriais nos quais ocorre a degradação e a reposição óssea concomitantemente [58]. A rápida degradação dos CP pode ter prejudicado a sua propriedade de osteocondução. A bioengenharia do tecido ósseo pode auxiliar futuramente no melhoramento das propriedades desse biomaterial promissor, através da produção de nanoestruturas funcionais e arcabouços para aplicações específicas [63].

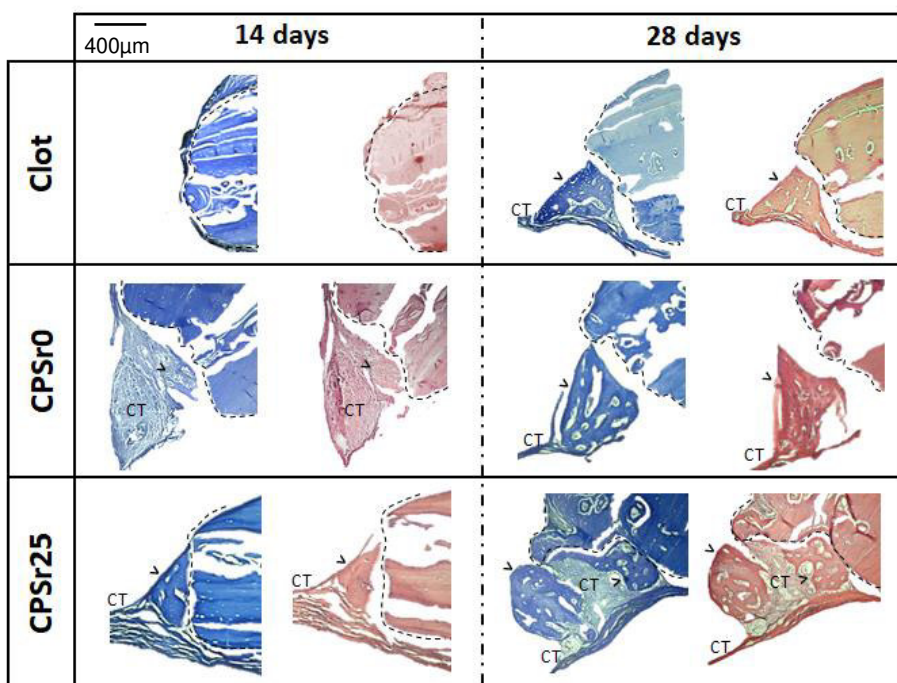


Fig. 13. Análise histológica de defeitos de calota craniana tratados com *clot* (coágulo), CPSr0 e CPSr25 nos períodos de 14 dias e 28 dias pós cirúrgico. As secções histológicas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, e Tricrômio de Masson. (Ampliação = 5x). Legenda: v (neoformação óssea), CT (*connective tissue* - tecido conjuntivo), --- (borda do defeito ósseo).

Na figura 14 temos a análise dos dados da área de neoformação óssea. Conforme esperado, houve a progressão de incrementos ósseos do período de 14 para 28 dias. Os resultados indicaram maior neoformação óssea nos grupos dos CP, principalmente para o CPSr25 nos tempos de 14 e 28 dias. Diferenças

significativas entre os grupos implantados com CP foram vistas no período de 28 dias ($p = 0,025$). Esses resultados confirmaram os dados obtidos na micro-CT, em que se constatou maior BV e PBV para os grupos do CP, com destaque para o dopado com Sr^{2+} , no período de 28 dias. Diferentemente dos estudos que não obtiveram melhorias na qualidade óssea após a dopagem [58,64], a biocompatibilidade e o potencial de reparação óssea verificados nesse estudo constataam que substituições de 25 mol% de Sr^{2+} são seguras para aplicações terapêuticas [14,38,42].

Os melhores resultados *in vivo* para o material dopado com Sr^{2+} , verificados na análise microtomográfica e histométrica, podem ser explicados pela maior taxa de dissolução inicial em meio e constante formação de uma camada de menor espessura de HA que possibilita uma bioatividade prolongada, conforme visto anteriormente em estudo *in vitro* [15]. Em adição, os VB dopados com Sr^{2+} são capazes de estimular a expressão de genes *ALPL*, *COL1A1*, *BGLAP* e *RUNX2* em períodos de 7 a 14 dias [14,39]. O *ALPL*, *COL1A1*, *BGLAP* e *RUNX2* são, respectivamente, marcadores da precoce diferenciação osteoblástica, da presença de pré-osteoblastos e deposição inicial de osteóide, do estágio tardio da diferenciação osteogênica, e da regulação da osteogênese [65,66]. Os marcadores influenciam diretamente na proliferação e diferenciação osteogênica, condicionando melhores habilidades de reparação óssea *in vivo* [14].

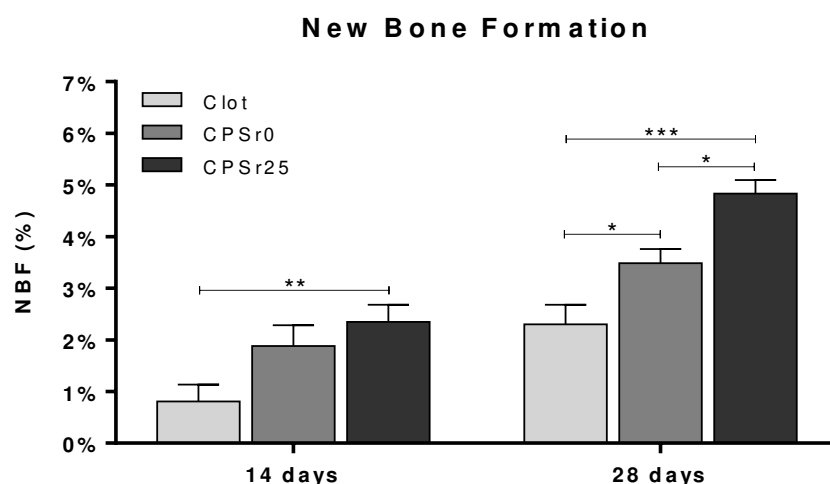


Fig. 14. Análise histomorfométrica da NBF (*Area of neoformation bone* - área de neoformação óssea). Valores da média e erro padrão, teste One-way ANOVA

seguido pelo pós - teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,005$ para comparações entre os grupos coágulo (*clot*), CPSr0 e CPSr25.

Na figura 15, observou-se um aumento de vascularização de 14 a 28 dias e ausência de inflamação durante os dois períodos para o grupo coágulo. O CPSr0 mostrou, aos 14 dias, discreto exsudato inflamatório periosteal predominantemente macrofágico imerso em tecido conjuntivo neoformado com abundante presença de vasos jovens e, aos 28 dias, abundante inflamação mononuclear com raros linfócitos e poucos vasos sanguíneos. Já para o grupo CPSr25, houve abundante exsudato mononuclear infiltrado em um tecido conjuntivo rico em capilares sanguíneos periosteal aos 14 e 28 dias.

A análise estatística (Fig. 15) constatou diferença estatisticamente significantes para o CPSr25, em relação ao grupo coágulo, para o grau de inflamação nos dois períodos ($p = 0,001$; $p = 0,003$) e para o grau de vascularização aos 14 dias ($p = 0,003$). O grupo CPSr25 foi significativamente maior do que o CPSr0 apenas para o grau de vascularização aos 28 dias ($p = 0,003$). O maior e constante grau de vascularização e inflamação verificados no grupo CPSr25 estão relacionados aos significantes ganhos ósseos.

Entende-se que o desencadeamento do processo inflamatório, quando em contato com biomateriais, é essencial para o processo de biodegradação dos enxertos, na sinalização de fatores de crescimento e na regeneração óssea [67]. Consoante a esse mecanismo de resposta biológica, o maior grau de angiogênese permite um eficiente aporte de oxigênio e nutrientes ao defeito ósseo, via liberação de mediadores angiogênicos [68,69]. É sugerido que materiais bioativos à base de sílica com presença de íons Sr^{2+} na matriz promovem angiogênese inicial através da regulação do fenótipo dos macrófagos que passam a expressar elevados níveis de fator de crescimento derivado de plaquetas – BB (PDGF-BB) [68], e da produção de fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e angiopoetina 1 (ANG-1) [69], dando eficiente vascularização à nova formação óssea.

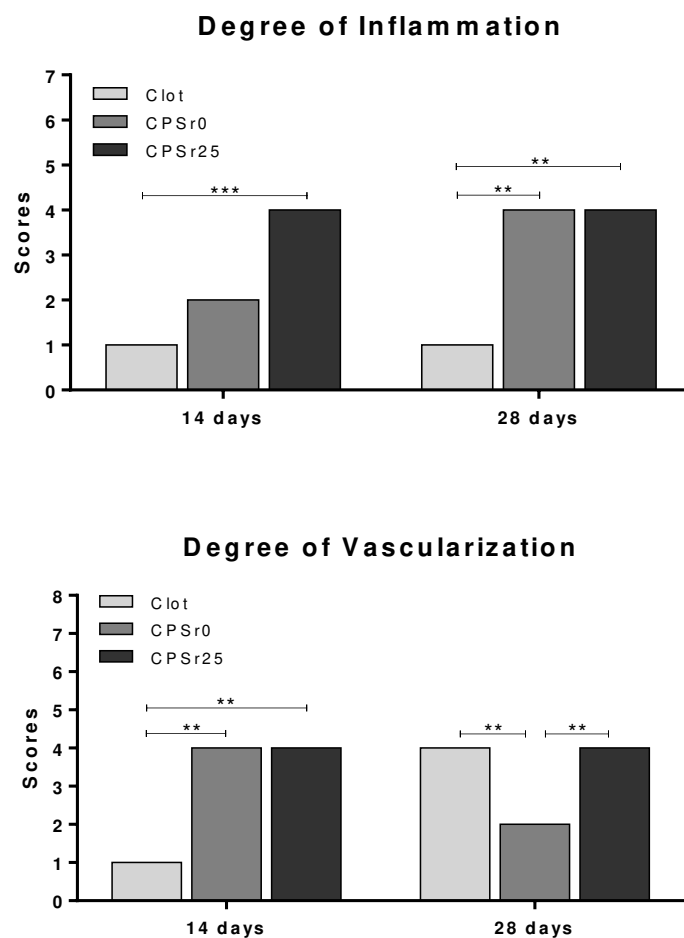


Fig.15. Análise histológica através de escores de *degree of inflammation* (grau de inflamação) e *degree of vascularization* (grau de vascularização). Valores da média e erro padrão, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,005$ para comparações entre os grupos coágulo (*clot*), CPSr0 ou CPSr25.

4. Conclusão

Nesse estudo, avaliamos o efeito da adição de íons Sr^{2+} em CP semelhantes ao VB S53P4 nas características físico-química, em testes de bio-reatividade *in vitro* e na regeneração óssea de defeitos críticos em ratos. Os CP obtiveram sucesso no processo de dopagem observado por meio de EDX. Os valores de liberação de Sr^{2+} foram maiores para o CPSr25. Os picos principais de HA demonstraram menores valores para os CP com Sr^{2+} no período de 168 horas. A substituição de CaO por SrO apresentou melhores resultados no reparo

de defeitos críticos sob o ponto de vista microtomográfico e histológico. Esses dados confirmam que a dopagem dos biomateriais com íons Sr^{2+} é uma boa estratégia para uso como substitutos ósseos na cicatrização de defeitos críticos.

5. Referências

- [1] Kabir MA, Murata M, Akazawa T, Kusano K, Yamada K, Ito M. Evaluation of perforated demineralized dentin scaffold on bone regeneration in critical-size sheep iliac defects. *Clin Oral Implants Res.* 28(11) (2017) e227-235. <http://doi.org/10.1111/clr.13000>.
- [2] Förster Y, Bernhardt R, Hintze V, Möller S, Schnabelrauch M, Scharnweber D, et al. Collagen/glycosaminoglycan coatings enhance new bone formation in a critical size bone defect — A pilot study in rats. *Mater Sci C Mater Biol Appl.* 71(1) (2017) 84-92. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.071>.
- [3] Wadhawan A, Gowda TM, Mehta DS. Gore-tex(®) versus resolut adapt(®) GTR membranes with perioglas(®) in periodontal regeneration. *Contemp Clin Dent.* 3(4) (2012) 406-411. <http://doi.org/10.4103/0976-237X.107427>.
- [4] Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, et al. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblastlike cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater.* 20(1) (2010) 109-120. <http://doi.org/10.22203/eCM.v020a10>.
- [5] Pinto JGS, Ciprandi MTO, Aguiar RC, Lima PVP, Hernandez PAG, Júnior ANS. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. *RFO UPF.* 12(3) (2007) 79-84.
- [6] Isaac J, Nohra J, Lao J, Jallot E, Nedelec JM, Berdal A, et al. Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. *Eur Cell Mater.* 21 (2011) 130-143.
- [7] 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.* 71(1) (2016) 123-127. <http://doi.org/10.1093/jac/dkv327>.
- [8] Van Gestel NA, Geurts J, Hulsen DJ, 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) 1-12. <http://doi.org/10.1155/2015/684826>.
- [9] Kankare J, Lindfors NC. Reconstruction of vertebral bone defects using an expandable replacement device and bioactive glass S53P4 in the treatment of vertebral osteomyelitis: Three patients and three pathogens. *Scand J Surg.* 105(4) (2016) 248-253. <http://doi.org/10.1177/1457496915626834>.
- [10] Waselau M, Patrikoski M, Juntunen M, Kujala K, Kääriäinen M, Kuokkanen H, et al. Effects of bioactive glass S53P4 or beta-tricalcium phosphate and bone

- morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-7 on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *J Tissue Eng.* 3(1) (2012) 1-14. <http://doi.org/10.1177/2041731412467789>.
- [11] 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.* 32(1) (2014) 175-177. <http://doi.org/10.1002/jor.22463>.
 - [12] Drago L, De Vecchi E, Bortolin M, Toscano M, Mattina R, Romanò CL. Antimicrobial activity and resistance selection of different bioglass S53P4 formulations against multidrug resistant strains. *Future Microbiol.* 10(8) (2015) 1293-1299. <http://doi/10.2217/FMB.15.57>.
 - [13] Pérez-Tanoira R, Kinnari TJ, Hyyrynen T, Soininen A, Pietola L, Tiainen VM, et al. Effects of S53P4 bioactive glass on osteoblastic cell and biomaterial surface interaction. *J Mater Sci Mater Med.* 26(10) (2015) 1-11. <http://doi.org/10.1007/s10856-015-5568-2>.
 - [14] Zhang Y, Wei L, Chang J, Miron RJ, Shi B, Yi S. Strontium-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds stimulating *in vitro* proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells and *in vivo* regeneration of osteoporotic bone defects. *J Mater Chem B.* 1(41) (2013) 1-11. <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tb21047b>.
 - [15] Massera J, Hupa L. Influence of SrO substitution for CaO on the properties of bioactive glass S53P4. *J Mater Sci Mater Med.* 25(3) (2014) 657–668. <http://doi.org/10.1007/s10856-013-5120-1>.
 - [16] Stoor P, Mesimäki K, Lindqvist C, Kontio R. The use of anatomically drop-shaped bioactive glass S53P4 implants in the reconstruction of orbital floor fracture--A prospective long-term follow-up study. *J Craniomaxillofac Surg.* 43(6) (2015) 969-975. <http://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.03.029>.
 - [17] 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.* 96-B(6) (2014) 845–850. <http://doi.org/10.1302/0301-620X.96B6.33014>.
 - [18] Aurégana JC, Béguéa IT. Bioactive glass for long bone infection: a systematic review. *Injury.* 46(S8) (2015) S3-S7. [http://doi.org/10.1016/S00201383\(15\)30048-6](http://doi.org/10.1016/S00201383(15)30048-6).
 - [19] 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.* 971 (2017) 81-92. http://doi.org/10.1007/5584_2016_156.
 - [20] Bernardeschi D, Nguyen Y, Russo FY, Mosnier I, Ferrary E, Sterkers O. cutaneous and labyrinthine tolerance of bioactive glass S53P4 in mastoid and epitympanic obliteration surgery: prospective clinical study. *Biomed Res Int.*

- (2015) 242319. <http://doi.org/10.1155/2015/242319>.
- [21] Schimonski G, Schimanski E. Obliteration of mastoid cavities: 30 years of experience with recommendations for surgical strategy. *HNO*. 63(8) (2015) 538-545. <http://doi.org/10.1007/s00106-015-0028-3>.
 - [22] Bernardeschi D, Pyatigorskaya N, Russo FY, De Seta D, Corallo G, Ferrary E, et al. Anatomical, functional and quality-of-life results for mastoid and epitympanic obliteration with bioactive glass S53P4: a prospective clinical study. *Clin Otolaryngol*. 42(2) (2017) 387-396. <http://doi.org/10.1111/coa.12748>.
 - [23] De veij mestdag PD, Colnot DR, Borggreven PA, Orelia CC, Quak JJ. Mastoid obliteration with S53P4 bioactive glass in cholesteatoma surgery, *Acta Otolaryngol*. 137(7) (2017) 690-694. <http://doi.org/10.1080/00016489.2017.1279346>.
 - [24] Goel A, Sinha A, Khandeparker RV, Mehrotra R, Vashisth P, Garg A. Bioactive glass S53P4 versus chlorhexidine gluconate as intracanal medicament in primary teeth: An *in vivo* study using polymerase chain reaction analysis. *J Int Oral Health*. 7(8) (2015) 65-69.
 - [25] Ballo AM, Akca E, Ozen T, Moritz N, Lassila L, Vallittu P, et al. Effect of implant design and bioactive glass coating on biomechanical properties of fiberreinforced composite implants. *Eur J Oral Sci*. 122(4) (2014) 303-309. <http://doi.org/10.1111/eos.12133>.
 - [26] Sarin J, Hiltunen M, Hupa L, Pulkkinen J, Vallittu PK. Compression properties and dissolution of bioactive glass S53P4 and n-butyl-2 cyanoacrylate tissue adhesive-composite. *Biomed Mater Eng*. 27(4) (2016) 425-436. <http://doi.org/10.3233/BME-161596>.
 - [27] Stoor P, Apajalahti S, Kontio R. Regeneration of cystic bone cavities and bone defects with bioactive glass S53P4 in the upper and lower jaws. *J Craniofac Surg*. 28(5) (2017) 1197-1205. <http://doi.org/10.1097/SCS.00000000000003649>.
 - [28] Rosenqvist K, Airaksinen S, Vehkamäki M, Juppo AM. Evaluating optimal combination of clodronate and bioactive glass for dental application. *Int J Pharm*. 468(1-2) (2014) 112–120. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.04.017>.
 - [29] Deliormanl AM. Preparation and in vitro characterization of electrospun 45S5 bioactive glass nanofibers. *Ceram Int*. 41(1) (2015) 417-425. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.08.086>.
 - [30] Siqueira RL, Peitl O, Zanotto ED. Gel-derived SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ bioactive powders: Synthesis and *in vitro* bioactivity. *Mater Sci Eng C*. 31(5) (2011) 983–991. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.02.018>.
 - [31] Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses. *J Biomed Mater Res*. 58(6) (2001) 734-740. <https://doi.org/10.1002/jbm.10026>.

- [32] Siqueira RL, Costa LC, Schiavon MA, Castro DT, Andréa C, Reis AC, et al. Bioglass® and resulting crystalline materials synthesized via an acetic acid-assisted sol-gel route. *J Sol-Gel Sci Tech.* 83(1) (2017) 165-173. <http://dx.doi.org/10.1007/s10971-017-4402-3>.
- [33] Polini A, Bai H, Tomsia AP. Dental applications of nanostructured bioactive glass and its composites. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed and Nanobiotechnol.* 5(4) (2013) 399-410. <http://doi.org/10.1002/wnan.1224>.
- [34] Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater.* 2(4) (1991) 231-239. <http://doi.org/10.1002/jab.770020403>.
- [35] El-Kady AM, Ali AF, Rizk RA. Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles. *Ceram Int.* 38(1) (2012) 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.05.158>.
- [36] Wu C, Chang J. Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors. *J Control Release.* 193(10) (2014) 282-295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.026>.
- [37] Saidak Z, Marie PJ. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacol Ther.* 136(2) (2012) 216-226. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.009>.
- [38] Jebahi S, Oudadesse H, Elleuch J, Tounsi S, Keskes H, Pellen P, et al. The potential restorative effects of strontium-doped bioactive glass on bone microarchitecture after estrogen-deficiency induced osteoporosis: physicochemical and histomorphometric analyses. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 56(5) (2013) 533-540. <http://doi.org/10.1007/s13765-013-3167-9>.
- [39] Santocildes-Romero ME, Crawford A, Hatton P V., Goodchild RL, Reaney IM, Miller CA. The osteogenic response of mesenchymal stromal cells to strontium-substituted bioactive glasses. *J Tissue Eng Regen Med.* 9(5) (2015) 619-931. <http://doi.org/10.1002/term.2003>.
- [40] Goel A, Rajagopal RR, Ferreira JMF. Influence of strontium on structure, sintering and biodegradation behaviour of CaO-MgO-SrO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ glasses. *Acta Biomater.* 7(11) (2011) 4071-4080. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.047>.
- [41] Sriranganathan D, Kanwal N, Hing KA, Hill RG. Strontium substituted bioactive glasses for tissue engineered scaffolds: the importance of octacalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* 27(2):39 (2016) 1-10. <http://doi.org/10.1007/s10856-015-5653-6>.
- [42] Massera J, Kokkari A, Narhi T, Hupa L. The influence of SrO and CaO in silicate and phosphate bioactive glasses on human gingival fibroblasts. *J Mater Sci Mater Med.* 26(6):196 (2015) 1-9. <http://doi.org/10.1007/s10856-015-5528-x>.
- [43] Baino F, Fiorilli S, Vitale-Brovarone C. Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: Review of recent advances. *Acta*

- Biomater. 42 (2016) 18-32. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.033>.
- [44] Pirayesh H, Nychka JA. Sol-gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its *in vitro* dissolution and mineralization behavior. J Am Ceram Soc. 96(5) (2013) 1-8. <https://doi.org/10.1111/jace.12190>.
- [45] Durgalakshmia D, Ajay Rakesh R, Kesava M, Ganapathy S, Ajithkumar TG, Karthikeyan S, et al. Highly reactive crystalline phase embedded strontium-bioactive nanorods for multimodal bioactive applications. Biomater Sci. 6(7) (2018) 1764-1776. <http://doi.org/10.1039/c8bm00362a>.
- [46] Maciel PP, Bonan PRF. Produção e bioatividade de materiais cristalinos dopados com íons estrôncio [monografia]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba-UEPB. (2018).
- [47] Cerruti M, Greenspan D, Powers K. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of bioglass 45S5. Biomaterials. 26(14) (2005) 1665-1674. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.009>.
- [48] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? Biomaterials. 27(15) (2006) 2907-2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [49] Serrano J, Romo E, Bermúdez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L et al. Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by cementum protein 1 (CEMP1). PLoS one. 8(11) (2013) e78807. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0078807>.
- [50] Kargozar S, Hashemian SJ, Soleimani M, Millan PB, Askari M, Khalaj V, et al. Acceleration of bone regeneration in bioactive glass/gelatin composite scaffolds seeded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells over-expressing bone morphogenetic protein-7. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 75(1) (2017) 688-698. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.097>.
- [51] Acevedo CA, Olguín Y, Briceño M, Forero JC, Osses N, Díaz-Calderón P, et al. Design of a biodegradable UV-irradiated gelatin-chitosan/nanocomposed membrane with osteogenic ability for application in bone regeneration. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 99 (2019) 875-886. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.135>.
- [52] Xiao W, Sonny BB, Rahaman MN. Preparation of resorbable carbonate-substituted hollow hydroxyapatite microspheres and their evaluation in osseous defects *in vivo*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 60 (2016) 324-332. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.039>.
- [53] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. J Bone Miner Res. 2(6) (1987) 595-610. <http://doi.org/10.1002/jbmr.5650020617>.
- [54] Chu C, Deng J, Man Y, Qu Y. Evaluation of nanohydroxyapatite (nano-HA) coated epigallocatechin-3-gallate (EGCG) cross-linked collagen membranes. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 78(1) (2017) 258-264.

<http://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.069>.

- [55] Batista KS, Alves AF, Lima MDS, da Silva LA, Lins PP, de Sousa Gomes JA, et al. Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. *Br J Nutr.* 119(1) (2018) 30-41. <http://doi.org/10.1017/S0007114517003282>.
- [56] Chao SC, Wang MJ, Pai NS, Yen SK. Preparation and characterization of gelatin–hydroxyapatite composite microspheres for hard tissue repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 57(1) (2015) 113-122. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.047>.
- [57] Mendes PN, Rahal SC, Pereira-Junior OC, Fabris VE, Lenharo SL. *In vivo* and *in vitro* evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. *Acta Vet Scand.* 51(24) (2009) 12. <http://doi.org/10.1186/1751-0147-51-12>.
- [58] Basu B, Sabareeswaran A, Shenoy S. Biocompatibility property of 100% strontium-substituted $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-CaF}_2$ glass ceramics over 26 weeks implantation in rabbit model: histology and micro-Computed Tomography analysis. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 103(6) (2014) 1-12. <http://doi.org/10.1002/jbm.b.33270>.
- [59] Bellucci D, Sola A, Salvatori S, Anesi A, Chiarini L, Cannillo V. Role of magnesium oxide and strontium oxide as modifiers in silicate-based bioactive glasses: effects on thermal behaviour, mechanical properties and *in vitro* bioactivity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 72(1) (2017) 566-575. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.110>.
- [60] Singh BN, Pramanik K. Development of novel silk fibroin/polyvinyl alcohol/sol–gel bioactive glass composite matrix by modified layer by layer electrospinning method for bone tissue construct generation. *Biofabrication.* 9(1) (2017) 1-14. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa644f>.
- [61] Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect. as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 205 (1986) 299-308. <https://doi.org/10.1097/00003086-198604000-00036>.
- [62] Szpalski C, Barr J, Wetterau M, Saadeh PB, Warren SM. Cranial bone defects: current and future strategies. *Neurosurg Focus.* 29(6) (2010) E8. <http://doi.org/10.3171/2010.9>.
- [63] Sidorenko, AS. Physics, chemistry and biology of functional nanostructures III. *Beilstein J Nanotechnol.* 8 (2017) 590-591.
- [64] Gorustovich AA, Steimetz T, Cabrini RL, Porto López JM. Osteoconductivity of strontium-doped bioactive glass particles: A histomorphometric study in rats. *J of Biomed Mater Res A.* 92(1) (2010) 232-237. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.32355>.
- [65] Pratap J, Lian JB, Javed A, Barnes GL, Van Wijnen AJ, Stein JL. Regulatory roles of RUNX2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone.

- [66] Jeon O, Rhie JW, Kwon IK, Kim JH, Kim BS, Lee SH. *In vivo* bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. *Tissue Eng Part A*. 14(8) (2008) 1285-1294. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0253>.
- [67] Zhu Y, Jiang P, Luo B, Lan F, He J, Wu Y. Dynamic protein 1 corona influences immune-modulating 2 osteogenesis in magnetic nanoparticles (MNPs)-infiltrated 3 bone regeneration scaffolds *in vivo*. *Nanoscale*. (2019) 1-35. <http://doi.org/10.1039/C8NR08614A>.
- [68] Zhao F, Lei B, Li X, Mo Y, Wang R, Chen D et al. Promoting *in vivo* early angiogenesis with sub-micrometer strontium-contained bioactive microspheres through modulating macrophage phenotypes. *Biomaterials*. 178 (2018) 36-47. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.004>.
- [69] Mao L, Xia L, Chang J, Liu J, Jiang L, Wu C et al. The synergistic effects of Sr and Si bioactive ions on osteogenesis, osteoclastogenesis and angiogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Acta Biomater*. 61 (2017) 217-232. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.015>.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A pesquisa foi iniciada pela produção dos CP, com substituição de 0 %, 12,5 % e 25 % de CaO por SrO, através do método sol-gel. Em seguida, foi feito o EDX para analisar a composição química dos CP, verificada a curva de liberação de Sr^{2+} por FAAS e realizado o teste de bio-reatividade com análise de DRX. Numa segunda etapa, testes *in vivo* foram executados para avaliação do potencial de reparo ósseo de defeitos críticos criados em calvária de rato. Para isso, análises microtomográficas e histológicas foram usadas na obtenção dos dados. Os resultados demonstram que a substituição de Ca^{2+} por Sr^{2+} em 25% mol aumentou o potencial de regeneração óssea.

Esse estudo faz parte de um projeto maior, em que foram investigados os efeitos *in vitro* (33) e *in vivo* dos CP dopados com Sr^{2+} . Anteriormente a essa pesquisa, os materiais foram caracterizados por análises termogravimétricas (TGA/DTG), difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e zeta sizer (33). Realizaram-se, *in vitro*, testes de atividade antimicrobiana em fungos e bactérias aeróbias por macrodiluição e curva de morte, e teste de bio-reatividade

com análise de MEV e FTIR (33). Estudos para determinação da atividade antimicrobiana sobre bactérias anaeróbias são necessários, pois estão diretamente relacionadas às morbidades ósseas ocorridas em agravos da odontologia.

Espera-se, futuramente, com o auxílio da tecnologia da engenharia de materiais, produzir arcabouços com nanofibras oriundas do produto testado aqui, com o intuito de aumentar a área de contato com a matriz extracelular e melhorar as propriedades mecânicas desse biomaterial promissor.

4. CONCLUSÃO

Nesse estudo, avaliamos o efeito de VB com adição Sr^{2+} em testes *in vitro* e na regeneração óssea de defeitos críticos em ratos. Os CP obtiveram sucesso no processo de dopagem observado por meio de EDX. Os valores de liberação de Sr^{2+} foram maiores para o CPSr25. Os picos principais de HA demonstraram menores valores para os CP com Sr^{2+} no período de 168 horas. A substituição de CaO por SrO apresentou melhores resultados no reparo de defeitos críticos sob o ponto de vista microtomográfico e histológico. Esses dados confirmam que a dopagem dos biomateriais com íons Sr^{2+} é uma boa estratégia para uso como substitutos ósseos na cicatrização de defeitos críticos.

REFERÊNCIAS*

1. Trejo-Iriarte CG, Serrano-Bello J, Gutierrez-Escalona R, Mercado-Marques C, Garcia-Honduvilla N, Bujan-Varela J et al. Evaluation of bone regeneration in a critical size cortical bone defect in rat mandible using microCT and histological analysis. Arch of Oral Biol. 2019; 101: 165-71. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.010>.
2. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Res. 1986; (205): 299-308. <https://doi.org/10.1097/00003086-198604000-00036>.
3. Schliephake H, Zghoul N, Jäger V, Van Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M et al. Bone formation in trabecular bone cell seeded scaffolds used for reconstruction of the rat mandible. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009; 38(2): 166-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2008.11.018>.

4. Wadhawan A, Gowda TM, Mehta DS. Gore-tex® versus resolut adapt® GTR membranes with perioglas® in periodontal regeneration. *Contemp Clin Dent*. 2012; 3(4): 406-11. <http://doi.org/10.4103/0976-237X.107427>.
5. Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, et al. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblastlike cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2010; 20: 109-20. <http://dx.doi.org/10.22203/eCM.v020a10>.
6. Pinto JGS, Ciprandi MTO, Aguiar RC, Lima PVP, Hernandez PAG, Júnior ANS. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. *RFO UPF*. 2007; 12(3): 79-84.
7. Isaac J, Nohra J, Lao J, Jallot E, Nedelec J-M, Berdal A, et al. Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. *Eur Cells Mater*. 2011; 21: 130-43. <http://dx.doi.org/10.22203/eCM.v021a11>.
8. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res*. 1971; 5(6): 117-41. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>.
9. Zhang J, Zhao S, Zhu Y, Huang Y, Zhu M, Tao C, et al. Three-dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2014; 10(5): 2269-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.01.001>.
10. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic, *Journal of the American Ceramic Society*. 1991; 74(7): 1487-510. <https://doi.org/10.1111/j.11512916.1991.tb07132.x>.
11. Hench LL. Bioceramics, *Stress The International Journal on the Biology of Stress*. 1998; 28: 1705-28.
12. Pirayesh H, Nychka JA. Sol-gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its in vitro dissolution and mineralization behavior. *J Am Ceram Soc*. 2013; 96(5): 1-8. <https://doi.org/10.1111/jace.12190>.
13. Durgalakshmia D, Ajay Rakesh RA, KesavNBF M, Ganapathy S, Ajithkumarc TG, Karthikeyand S, et al. Highly reactive crystalline phase embedded strontium-bioactive nanorods for multimodal bioactive applications. *Biomater Sci*. 2018; 6(7): 1764-76. <http://doi.org/10.1039/c8bm00362a>.
14. Hench LL. Bioactive glasses: gene activation, in: *Na Introduction to bioceramiics*, second ed., Imperial College Press, London. 2013; 68(4): 63-68. https://doi.org/10.1142/9781908977168_0004.
15. Siqueira RL, Costa LC, Schiavon MA, Castro DT De, Andréa C, Oscar R, et al. Bioglass ® and resulting crystalline materials synthesized via an acetic acid-assisted sol-gel route. *J Sol-Gel Sci Tech*. 2017; 83(1): 165-73. <http://dx.doi.org/10.1007/s10971-017-4402-3>.

16. Siqueira RL, Peitl O, Zanotto ED. Gel-derived $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ bioactive powders: Synthesis and *in vitro* bioactivity. *Mater Sci Eng C*. 2011; 31(5): 983-91. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.02.018>.
17. Deliormanli, AM. Preparation and *in vitro* characterization of electrospun 45S5 bioactive glass nanofibers. *Ceram Int*. 2016; 41(1): 417-25. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.08.086>.
18. Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses. *J Biomed Mater Res*. 2001; 58(6): 734-40. <https://doi.org/10.1002/jbm.10026>.
19. Polini HB, Bai H, Tomsia AP. Dental applications of nanostructured bioactive glass and its composites. *Wiley Interdiscip Ver Nanomedicine and Nanobiotechnol*. 2013; 5(4): 399-410. <http://doi.org/10.1002/wnan.1224>.
20. Li R, Clark AE, Hench LL. Na investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater*. 1991; 2(4): 231-39. <http://doi.org/10.1002/jab.770020403>.
21. El-Kady AM, Ali AF, Rizk RA. Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles. *Ceram Int*. 2012; 38: 177-88. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.05.158>.
22. Bortolin M, Vecchi E De, Romano CL, Toscano M, Mattina R, Drago L. Antibiofilm agents against mdr bacterial strains: Is bioactive glass bag-S53P4 also effective? *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71(1): 123-7. <http://doi.org/10.1093/jac/dkv327>.
23. Van Gestel NA, Geurts J, Hulsen DJ, 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: 1-12. <http://doi.org/10.1155/2015/684826>.
24. Kankare J, Lindfors NC. Reconstruction of vertebral bone defects using na expandable replacement device and bioactive glass S53P4 in the treatment of vertebral osteomyelitis: Three patients and three pathogens. *Scand J Surg*. 2016; 105(4): 248-53. <http://doi.org/10.1177/1457496915626834>.
25. Waselau M, Patrikoski M, Juntunen M, Kujala K, Kääriäinen M, Kuokkanen H, et al. Effects of bioactive glass S53P4 or beta-tricalcium phosphate and bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-7 on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *J Tissue Eng*. 2012; 3(1): 1-14. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2041731412467789>.
26. 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*. 2014; 32(1): 175-7. <http://doi.org/10.1002/jor.22463>.

27. Drago L, De Vecchi E, Bortolin M, Toscano M, Mattina R, Romanò CL. Antimicrobial activity and resistance selection of different bioglass S53P4 formulations against multidrug resistant strains. *Future Microbiol.* 2015; 10(8): 1293–9. <http://doi/10.2217/FMB.15.57>
28. Pérez-Tanoira R, Kinnari TJ, Hyrynen T, Soininen A, Pietola L, Tiainen VM, et al. Effects of S53P4 bioactive glass on osteoblastic cell and biomaterial surface interaction. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26(10): 1-11. <http://doi.org/10.1007/s10856-015-5568-2>.
29. Zhang D, Leppäranta O, Munukka E, Ylänen H, Viljanen MK, et al. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2009; 93(2): 475–83. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.32564>.
30. 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. <http://doi.org/10.3109/00016357.2012.757642>.
31. Stoor P, Söderling E, Salonen JI. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontol Scand.* 1998; 56(3): 161-5. <http://doi.org/10.1080/000163598422901>.
32. Gergely I, Zazgyva A, Man A, Zuh SG, Pop TS. The *in vitro* antibacterial effect of S53P4 bioactive glass and gentamicin impregnated polymethylmethacrylate beads. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2014; 61(2): 145-60. <http://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.2.5>.
33. Lepparanta O, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, Hupa L, Hupa M, et al. Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria *in vitro*. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19(2): 547-51. <http://doi.org/10.1007/s10856-007-3018-5>.
34. Maciel PP, Bonan PRF. Produção e bioatividade de materiais cristalinos dopados com íons estrôncio [monografia]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba – UFPB; 2018.
35. Farooq I, Imran Z, Farooq U, Leghari MA. Bioactive glass: A material for future. *World J Dent.* 2012; 3(2): 199-201. <http://doi.org/10.5005/jp-journals-10015-1156>.
36. 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 calciumbased bone substitutes in the treatment of chronic osteomyelitis, a retrospective comparative study. *Bone Joint J.* 2014; 96-B(6): 845-50. <http://doi.org/10.1302/0301-620X.96B6.33014>.
37. Aurégana JC, Béguéa IT. Bioactive glass for long bone infection: a systematic review. *Int.* 2015; 46(S8): S3-7.

[http://doi.org/10.1016/S00201383\(15\)30048-6](http://doi.org/10.1016/S00201383(15)30048-6).

38. 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. http://doi.org/10.1007/5584_2016_156.
39. Zazgyva AM, Gurzu S, Jung I, Nagy Ö, Mühlfay G, Pop TS. S53P4 bioactive glass and fibrin glue for the treatment of osteochondral lesions of the knee - a preliminary *in vivo* study in rabbits. *Rom J Morphol Embryol.* 2015; 56(3): 1085-90.
40. Bernardeschi D. Cutaneous and labyrinthine tolerance of bioactive glass S53P4 in mastoid and epitympanic obliteration surgery: prospective clinical study. *Biomed Res Int.* 2015; 242319. <http://doi.org/10.1155/2015/242319>.
41. Schimonski SG, Schimanski E. Obliteration of mastoid cavities. 30 years of experience with recommendations for surgical strategy. *HON.* 2015; 63(8): 538-45. <http://doi.org/10.1007/s00106-015-0028-3>.
42. Bernardeschi, D, Pyatigorskaya N, Russo FY, De Seta D, Corallo G, Ferrary E, et al. Anatomical, functional and quality-of-life results for mastoid and epitympanic obliteration with bioactive glass S53P4: a prospective clinical study. *Clin Otolaryngol.* 2016; 42(2) 387-96. <http://doi.org/10.1111/coa.12748>.
43. De Veij Mestdagh PD, Colnot DR, Borggreven PA, Orelia CC, Quak JJ. Mastoid obliteration with S53P4 bioactive glass in cholesteatoma surgery. *Acta Otolaryngol.* 2017; 137(7): 690-4. <http://doi.org/10.1080/00016489.2017.1279346>.
44. Stoor P, Mesimäki K, Lindqvist C, Kontio R. The use of anatomically drop-shaped bioactive glass S53P4 implants in the reconstruction of orbital floor fractures--A prospective long-term follow-up study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015; 43(6): 969-75. <http://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.03.029>.
45. Goel A, Sinha A, Khandeparker RV, Mehrotra R, Vashisth P, Garg A. Bioactive glass S53P4 versus chlorhexidine gluconate as intracanal medicament in primary teeth: An *in vivo* study using polymerase chain reaction analysis. *J Int Oral Health.* 2015; 7(8): 65-9.
46. Ballo AM, Akca E, Ozen T, Moritz N, Lassila L, Vallittu P, et al. Effect of implant design and bioactive glass coating on biomechanical properties of fiberreinforced composite implants. *Eur J Oral Sci.* 2014; 122(4): 303-9. <http://doi.org/10.1111/eos.12133>.
47. Sarin J, Hiltunen M, Hupa L, Pulkkinen J, Vallittu PK. Hiltunen M, Hupa L, Pulkkinen J, Vallittu PK. Compression properties and dissolution of bioactive glass S53P4 and n-butyl-2 cyanoacrylate tissue adhesive-composite. *Biomedical Materials Eng.* 2016; 27(4): 425-36.

<http://doi.org/10.3233/BME-161596>.

48. Stoor P, Apajalahti S, Kontio R. regeneration of cystic bone cavities and bone defects with bioactive glass S53P4 in the upper and lower jaws. J Craniofac Surg. 2017; 28(5): 1197-205. <http://doi.org/10.1097/SCS.0000000000003649>.
49. Rosenqvist K, Airaksinen S, Vehkamäki M, Juppo AM. Evaluating optimal combination of clodronate and bioactive glass for dental application. Int J Pharm. 2014; 468(1-2):112-20. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.04.017>.
50. Rizwan M, Hamdi M, Basirun WJ. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. J Biomed Mater Res A. 2017; 105(11): 3197-223. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.36156>.
51. Wu C, Chang J. Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors. J Control Release. 2014; 193(10): 282-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.026>.
52. Zhang Y, Wei L, Chang J, Miron RJ, Shi B, Yi S. Strontium-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds stimulating *in vitro* proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells and *in vivo* regeneration of osteoporotic bone defects. J Mater Chem B. 2013; 1(41): 1-11. <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tb21047b>.
53. Santocildes-Romero ME, Crawford A, Hatton P V, Goodchild RL, Reaney IM, Miller CA. The osteogenic response of mesenchymal stromal cells to strontium-substituted bioactive glasses. J Tissue Eng Regen Med. 2015;9(5): 619-31. <http://doi.org/10.1002/term.2003>.
54. Saidak Z, Marie PJ. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. Pharmacol Ther. 2012; 136(2): 216-26. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.009>.
55. Gorustovich AA, Steimetz T, Cabrini RL, Porto López JM. Osteoconductivity of strontium-doped bioactive glass particles: A histomorphometric study in rats. J Biomed Mater Res A. 2010; 92(1): 232-37. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.32355>.
56. Basu B, Sabareeswaran A, Shenoy SJ. Biocompatibility property of 100% strontium-substituted SiO₂-Al₂O₃-P₂O₅-CaO-CaF₂ glass ceramics over 26 weeks implantation in rabbit model: histology and micro-computed tomography analysis. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater. 2014; 103(6): 1-12. <http://doi.org/10.1002/jbm.b.33270>.
57. Goel A, Rajagopal RR, Ferreira JMF. Influence of strontium on structure, sintering and biodegradation behaviour of CaO-MgO-SrO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ glasses. Acta Biomater. 2011; 7(11): 4071-80. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.047>.
58. Sriranganathan D, Kanwal N, Hing KA, Hill RG. Strontium substituted

bioactive glasses for tissue engineered scaffolds: the importance of octacalcium phosphate. J Mater Sci Mater Med. 2016; 27(2): 1-10. <http://doi.org/10.1007/s10856-015-5653-6>.

59. Jebahi S, Oudadesse H, Elleuch J, Tounsi S, Keskes H, Pellen P, et al. The potential restorative effects of strontium-doped bioactive glass on bone microarchitecture after estrogen-deficiency induced osteoporosis: physicochemical and histomorphometric analyses. J Korean Soc Appl Biol Chem. 2013; 56(5): 533-40. <http://doi.org/10.1007/s13765-013-3167-9>.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

ANEXO I – Aprovação do CEUA do Centro Universitário de João Pessoa

CENTRO UNIVERSITÁRIO JOÃO PESSOA				
FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS				
Número do Protocolo (Uso do CEUA): 002/2019 - CEUA/UNIPÊ				
Data de recebimento (Uso do CEUA): 16/05/18				
FORMULÁRIO PARA SUBMISSÃO DE PROJETO DE PESQUISA COM ANIMAIS				
TÍTULO DO PROJETO: Avaliação do reparo ósseo de defeito crítico de calvaria preenchido com nanofibras de Vidro Bioativo S53P4				
1. Categoria do experimento Categoria A: Experimentos que não usam seres vivos ou que usam plantas, bactérias, protozoários ou espécies de animais invertebrados. Categoria B: Experimentos com vertebrados em que se produza pequeno ou nenhum desconforto. Categoria C: Experimentos que provocam estresse ou dor menor (dor de curta duração) em espécies vertebradas. Categoria D: Experimentos que provocam estresse ou dor significativos e inevitáveis em espécies vertebradas (responsabilidade explícita de explorar alternativas).				
2. Tipo de experimento (quando B, C, ou D) () Estudo imediato sem necessidade de observação posterior (após o procedimento inicial o animal é sacrificado) (X) Estudo mediato: com observação do animal por mais de 1(um) dia				
Nome: Joyce Andreza Moreira Pessoa				
Identidade: 322.4340	CPF: 084.434.094-44	Endereço (Rua, n.º): Rua Francisco Timóteo de Sousa		
Nacionalidade: Brasileira	Profissão: Odontóloga	CEP: 58052-130	Cidade: João Pessoa	UF: PB
Maior Titulação: Superior Completo	Cargo: Aluna de mestrado	Fone: (83) 99672-8496		
Instituição a que pertence: Universidade Federal da Paraíba		Email: joyceandrea_czf@hotmail.com		
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os princípios da ética em pesquisa com animais vigentes no país. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.				
Data: 06/05/2018		Assinatura:		
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA				
Nome: Centro Universitário de João Pessoa - Unipê		Endereço (Rua, n.º): Rodovia BR-230, km 22, s/n - Água Fria		
Escola/Curso: Biotério	CEP: 58053-000	Cidade: João Pessoa	UF: PB	
Participação Estrangeira: Sim () Não (X)		Fone: (83) 2105-9200	Fax: Não se aplica	
Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X) Nacional () Internacional () (Anexar lista de todos os Centros Participantes no Brasil e no Exterior)				
Termo de Compromisso (Deverá ser assinado pelo Coordenador de Curso): Declaro que conheço os princípios da ética em pesquisa com animais vigentes no país, conheço também o projeto de pesquisa anexo e tenho ciência de seu aspecto orçamentário.				
Nome: Bárbara Lima Simioni Leite		Cargo: Coordenadora do Biotério do Centro Universitário de João Pessoa - Unipê		
Data: 14/05/2018		Assinatura:		

ANEXO II – Comprovante de submissão de artigo

Ciência & Saúde Coletiva



Preview (CSC-2018-1806)

From: danuziacienciaesaudecoletiva@gmail.com

To: joyceandrea_cz@hotmail.com

CC: pbonan@yahoo.com, wellitonsouto@hotmail.com, ajlqueiroz@gmail.com, CAROL_MEDEIROS4@HOTMAIL.COM, clarissiane.serafim@gmail.com, joyceandrea_cz@hotmail.com, saradyas@hotmail.com, andreulisses@yahoo.com.br

Subject: Ciência & Saúde Coletiva - Manuscript ID CSC-2018-1806

Body: 27-Jun-2018

Dear Ms. Pessoa:

Your manuscript entitled "Association between depressive symptoms and oral health care in non-institutionalized elders in Northeastern Brazil" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Ciência & Saúde Coletiva.

Your manuscript ID is CSC-2018-1806.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/csc-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/csc-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Ciência & Saúde Coletiva.

Sincerely,
Ciência & Saúde Coletiva Editorial Office

Date Sent: 27-Jun-2018