

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UFTM  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

GUSTAVO HENRIQUE MARQUES RIBEIRO

**RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA DE BIOVIDROS NANOESTRUTURADOS NO  
REPARO DE DEFEITO ÓSSEO NA CALVARIA DE RATAS**

**Uberaba-MG**

**2023**

GUSTAVO HENRIQUE MARQUES RIBEIRO

**RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA DE BIOVIDROS NANOESTRUTURADOS NO  
REPARO DE DEFEITO ÓSSEO NA CALVARIA DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração I - Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo César Rosa

**Uberaba-MG**

**2023**

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

R369r Ribeiro, Gustavo Henrique Marques  
Resposta imunoinflamatória de biovidros nanoestruturados no  
reparo de defeito ósseo na calvaria de ratas / Gustavo Henrique  
Marques Ribeiro. -- 2023.  
43 f. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023  
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo César Rosa

1. Imunidade. 2. Inflamação. 3. Nanotecnologia. 4. Regeneração  
Óssea. I. Rosa, Rodrigo César. II. Universidade Federal do Triângulo  
Mineiro. III. Título.

CDU 612.017

Gustavo Henrique Marques Ribeiro

Resposta imunoinflamatória de biovidros nanoestruturados com diferentes concentrações de íons prata no reparo de defeito ósseo na calvária de ratas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração I - Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo César Rosa

Uberaba, 25 de outubro de 2023.

**Banca Examinadora**

DR. RODRIGO CÉSAR ROSA  
Orientador - UFTM

DRa. JULIANA REIS MACHADO E SILVA  
ICBN / UFTM

DR. ANTÔNIO CARLOS SHIMANO  
FMRP / USP



Documento assinado eletronicamente por **RODRIGO CESAR ROSA, Professor do Magistério Superior**, em 25/10/2023, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **JULIANA REIS MACHADO E SILVA, Professor do Magistério Superior**, em 26/10/2023, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Shimano, Usuário Externo**, em 27/10/2023, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1093391** e o código CRC **8E599C26**.

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo a Deus, pela vida.

Ademais, seria impossível alcançar essa conquista sem um agradecimento especial a pessoas, sem as quais, nada teria conseguido. Entre elas estão:

Meu orientador, professor Rodrigo César Rosa, pela oportunidade de me aceitar como orientando, por todo conhecimento, não somente por ter me ensinado, mas ao tanto que se dedicou a mim, compreendendo as dificuldades que surgiram neste percurso.

Meus colegas integrantes do Laboratório de Reabilitação Morfofuncional – LAREM. Pela contínua ajuda e compreensão das inúmeras limitações e dificuldades enfrentadas.

Aos professores Marcos Vinicius da Silva, Rafael Obata Trevisan e a sua equipe integrante do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Elisabete, pelo contínuo suporte em atender as solicitações.

Especialmente:

A minha família, Maria Divina Marques da Silva Ribeiro e Gilberto Candido Ribeiro, meus exemplos de caráter, educação e vida. Desculpe-me por toda ausência.

Aos meus amigos em nome de Ana, Bruno, Rhuan, Érica, Hélio, Larissa e Paulo, presentes em diversos momentos; a Thais Lopes Lustosa Sousa, a pessoa mais iluminada e magnífica com quem avancei. Obrigado pelo apoio em cada passo, obrigado por representar o indescritível, obrigado simplesmente por tanto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Nas últimas décadas, houve acentuado aumento da demanda de novos biomateriais, com potencial terapêutico para substituir o tecido ósseo e propiciar a adequada reparação de lesões ósseas, em especial de grande magnitude. Desse modo, um biomaterial ideal deve não apenas servir como substitutos ósseo, mas atuar efetivamente no processo de reparação e regeneração óssea. Assim, deve ocorrer sua completa absorção e atuação no processo de neoformação óssea. Neste contexto, apesar da vasta variedade de materiais orgânicos e sintéticos disponíveis no mercado, não há um material que atenda a todos os requisitos desejados. Portanto, a incorporação de nanocristais na estrutura molecular de biovidro, é inovadora, tendo em vista que eventualmente amplia a potencialidade de inúmeras propriedades física, químicas e biológicas. Logo, há necessidade de uma melhor compreensão da interação desses nanobiocomposto com o sistema biológico. No estudo, foi avaliada a resposta imunoinflamatória, local e sistêmica, de biovidros nanoestruturados com íons prata, por meio da implantação desses biocompostos no tratamento de defeito ósseo nas calvárias de ratas. Foram utilizadas diferentes concentrações (percentual de massa - % wt): Ag - 0,00 (biovidro puro); Ag - 0,25 % wt; Ag - 0,50 % wt; Ag - 0,75 % wt; Ag - 1,00 % wt; Ag - 1,25 % wt; Ag - 1,5 % wt. Os resultados apontam significativa atuação dos biovidros nanoestruturados na modulação da resposta imunoinflamatória, durante o processo de cicatrização óssea, tanto local, como sistêmico. O biovidro, por si só, mostrou-se eficaz na imunomodulação, cuja eficácia foi potencializada ou regulada por nanocristais de prata, abrindo perspectivas para diversas aplicações além da regeneração óssea e imunomodulação. Portanto, esses biovidros nanoestruturados podem ser úteis em outras áreas, como no controle de microrganismos e no fortalecimento da resposta imune contra patógenos específicos. No entanto, estudos adicionais são necessários para validar essas demais capacidades destes biomateriais.

**Palavras-Chave:** Resposta Imune; Inflamação; Biovidro; Nanotecnologia; Reparação Óssea.

## **ABSTRACT**

In recent decades, there has been a sharp increase in demand for new biomaterials, with therapeutic potential to replace bone tissue and provide adequate repair of bone injuries, especially of large magnitude. Thereby, an ideal biomaterial should not only serve as bone substitutes, but act effectively in the process of bone repair and regeneration. Thus, its complete absorption and action in the process of bone neoformation must occur. In this context, despite the wide variety of organic and synthetic materials available on the market, there is no one material that meets all the desired requirements. Therefore, the incorporation of nanocrystals into the molecular structure of bioglass is innovative, considering that it eventually expands the potential of numerous physical, chemical and biological properties. Therefore, there is a need for a better understanding of the interaction of these nanobiocompounds with the biological system. In the study, the local and systemic immune-inflammatory response of nanostructured bioglasses with silver ions was evaluated through the implantation of these biocompounds in the treatment of bone defects in the calvaria of rats. Different concentrations were used (mass percentage - % wt): Ag - 0.00 (pure bioglass); Ag - 0.25% wt; Ag - 0.50% wt; Ag - 0.75% wt; Ag - 1.00% wt; Ag - 1.25% wt; Ag - 1.5% wt. The results indicate a significant role for nanostructured bioglasses in modulating the immune-inflammatory response during the bone healing process, both locally and systemic. Bioglass, by itself, proved to be effective in immunomodulation, whose effectiveness was enhanced or regulated by silver nanocrystals, opening perspectives for several applications beyond bone regeneration and immunomodulation. Therefore, these nanostructured bioglasses can be useful in other areas, such as controlling microorganisms and strengthening the immune response against specific pathogens. However, additional studies are needed to validate these other capabilities of these biomaterials.

**Key words:** Immune Response; Inflammation; Bioglasses; Nanotechnology; Bone Repair.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados Índice Kappa .....	42
Tabela 2: Intensidade do número cristais remanescentes .....	42
Tabela 3: Intensidade do número cristais remanescentes, somatória: leve e ausente (0 + 1) e moderado a intenso (2 + 3) .....	42
Tabela 4: Intensidade de infiltrado inflamatório no centro da lesão (entre cristais) ...	42
Tabela 5: Intensidade de infiltrado inflamatório no centro da lesão (entre cristais), somatória: leve e ausente (0 + 1) e moderado a intenso (2 + 3) .....	43
Tabela 6: Intensidade de infiltrado inflamatório na periferia da lesão.....	43
Tabela 7: Intensidade de infiltrado inflamatório na periferia lesão, somatória: leve e ausente (0 + 1) e moderado a intenso (2 + 3) .....	43



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1: Histological sections of the calvaria and graph of the number of remaining crystals.

- A- Neoformed tissue in the region of the bone defect, showing abundant silver crystals (black) surrounded by fibrous connective tissue (Hematoxylin-eosin, 400X).  
.....39
- B- Bone occupying the bone defect area with underlying fibrous connective tissue permeating the crystals (Hematoxylin-eosin, 400X) .....39
- C- Graph of percentage of crystals: moderate and intense percentage (2+3). Ag represents the groups of nanostructured bioglasses with silver in different concentrations.....39

Figure 2: Histological sections and graphs of the percentage of inflammatory infiltrate.

- A- Underlying the bone, in the region of the bone defect, there is a slight permeation of mature lymphocytes (arrow) and dispersed crystals (Hematoxylin-eosin, 400X)  
.....40
- B- Scattered mature lymphocytes (arrow) and crystals underlying the bone at the periphery of the bone defect (Hematoxylin-eosin, 400X) .....40
- C- Graph showing the percentage of mild or absent inflammatory infiltrate between the crystals (0+1) .....40
- D- Graph showing the percentage of mild or absent inflammatory infiltrate in the periphery of the bone defect (0+1) .....40

Figure 3: Concentration of anti-inflammatory cytokines, IL-4 (A) and IL-10 (B) in serum (plasma) of Wistar rats.. .....41

Figure 4: Concentration of the so-called pro-inflammatory cytokines, IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B) and IFN- $\gamma$  (C) in the serum (plasma) of Wistar rats .....41

## LISTA DE ABREVIATURAS

IL - 4 = Interleucina 4

IL - 6 = Interleucina 6

IL-13 = Interleucina 13

IL - 10 = Interleucina 10

TGF- $\beta$  = Fator de crescimento transformador beta

M-CSF = Fator estimulante de colônias de macrófagos

SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = Composição química do biovidros ativo

NO = Óxido nítrico

NOS2 = Óxido nítrico sintase 2

iNOS = Óxido nítrico sintase induzida

SOCS3 = Supressor da sinalização de citocinas 3

M1 = Macrófago do tipo 1

M2 = Macrófago do tipo 2

BMP2 = Proteína morfogenética óssea 2

BMP6 = Proteína morfogenética óssea 6

VEGF = Fator de crescimento endotelial vascular

OSM = Oncostatina M

RANKL = Receptor ativador do fator nuclear kappa-b

Ag = Prata

% Wt = Percentual de massa

TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa

IFN- $\gamma$  = Interferon gama

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	11
1.1 Biomateriais e regeneração óssea	11
1.2 Biomateriais nanoestruturados	12
1.3 Osteoimunologia e sua Relação com Biomateriais	12
1.4 Papel das Células Imunes na Fisiologia Óssea	13
1.5 Citocinas e Fatores da Regulação Óssea	13
1.6 Biovidros – Reparação e Regeneração Óssea	15
1.7 Ineditismo – Processo de Sínteses Biovidros	15
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	16
<b>3. HIPÓTESE</b>	17
<b>4. OBJETIVOS</b>	18
4.4 Objetivo Geral	18
4.5 Objetivo Específico	18
<b>REFERÊNCIAS</b>	19
<b>APÊNDICE A (artigo científico)</b>	24
<b>APÊNDICE B - DADOS SUPLEMENTARES</b>	42
<b>APÊNDICE D - LISTA PARTICIPAÇÃO DE COAUTORES</b>	44
<b>ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b>	45

## 1. INTRODUÇÃO

Em lesões com grande perda da integridade tecidual, é habitualmente notada capacidade limitada de regeneração, principalmente quando ocorre destruição da matriz extracelular (KOPEC, 2022; MARIN, et al., 2020). Diante de uma incidência cada vez maior de traumas, defeitos congênitos e doenças degenerativas, a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa, tem buscado desenvolver novas terapias biológicas, para muitas doenças, atualmente consideradas incuráveis. Assim, esse tipo de pesquisa, na grande maioria dos casos, visa colaborar no processo de regeneração, estimulando o próprio potencial de cura natural do paciente ou, alternativamente, criando tecidos biológicos e/ou matérias sintéticas para substituir partes ou segmentos do corpo (XUE, et al., 2022).

### 1.1 Biomateriais e regeneração óssea

Nessa perspectiva, inúmeros substitutos ósseos veem sendo desenvolvimentos, mas até o momento não há um biomaterial ideal, que cumpra adequadamente todos os requisitos. Neste contexto, nas últimas décadas houve um considerável aumento da demanda de biomateriais e do número de estudo, em vista à determinar o potencial clínico desses novos biocompostos. Em especial, aqueles com potencial de uso no reparo e/ou regeneração óssea (LIMMER & WIRTZ, 2017; MINARDI et al., 2016; XIE et al., 2020, XUE et al., 2022).

Deste modo, um biomaterial ideal, deve propiciar não apenas o preenchimento do defeito ósseo, mas deve atuar efetivamente no processo de regeneração ósseo, em que ocorra sua gradual reabsorção, com presença de neoformação e completa reparação da lesão (AMBROSIO et al., 2021; SUWARDI et al., 2022).

Porém, estes biomateriais devem atender a um requisito mínimo, denominado biocompatibilidade. Esta consiste na capacidade do biomaterial de realizar a tarefa terapêutica desejada, sem causar efeitos locais ou sistêmicos indesejados. Assim, deve propiciar uma resposta celular ou tecidual mais benéfica possível para a clínica e otimização da atividade terapêutica (MARIN, et al., 2020).

Neste contexto, espera-se que após a administração, ocorra uma interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o biomaterial implantado, resultando em uma resposta celular inespecífica ao biomaterial (LIMMER & WIRTZ, 2017). Apesar do grande número de materiais orgânicos e sintéticos capazes de substituir o tecido

ósseo ou estimular a osteogênese reparadora, ainda não existe um material que atenda a todos os requisitos desejados (MARIN, et al., 2020; SZCZESNY et al., 2022).

### *1.2 Biomateriais nanoestruturados*

Os biomateriais nanoestruturados têm a capacidade de substituir com precisão a composição e a arquitetura do osso, permitindo a recapitulação de características cruciais de seu meio bioquímico (MINARDI et al., 2016). Isso se traduz em uma capacidade aprimorada de envolver as células imunes e progenitoras do hospedeiro, conferindo resultados aprimorados (CHENG et al., 2013). Portanto, os biomateriais nanoestruturados, apresentam efeitos promissores no processo de reparação ósseo, embora ainda existam poucos estudos (KIM et al., 2020; MINARDI et al., 2016; XIE et al., 2020; XUE et al., 2022).

### *1.3 Osteoimunologia e sua Relação com Biomateriais*

A osteoimunologia, consiste em uma nova teoria baseada em descobertas recentes na biologia óssea, que postula às respostas imunes um papel importante na formação e homeostase óssea. Muitas proteínas funcionais, moléculas de sinalização e citocinas foram confirmadas como participantes síncronos em eventos imunes reativos e na osteogênese. Assim, as vias de sinalização imune estão intimamente relacionadas com a formação óssea (ARRON & CHOI, 2000; KIM et al., 2020).

Logo, a imunomodulação induzida por biomateriais pode repercutir no processo de crescimento e maturação de osteoblastos, durante a fase de reparo e remodelação. Assim, nasceu a teoria da osteoimunologia, como uma área que surgiu há cerca de 40 anos, que estuda a interface entre o sistema esquelético e o sistema imune (LORENZO et al., 2008; TAKAYANAGI, 2005).

A osteoimunologia também estuda os componentes e mecanismos compartilhados, incluindo ligantes, receptores, moléculas de sinalização e fatores de transcrição (TAKAYANAGI, 2007). Portanto, a grande contribuição da osteoimunologia relaciona-se aos avanços e descobertas dos mecanismos de modulação de resposta imunoinflamatória, em especial aquelas inerentes à interação desses biomateriais com os sistemas biológicos.

A principal contribuição do estudo da osteoimunologia na engenharia de materiais, refere-se à descrição de certas propriedades biológicas do tecido ósseo, em que os biomateriais são capazes de modular no ambiente imunológico local,

promovendo a osteointegração do implante e a osteogênese reparacional (CHEN et al., 2016).

#### *1.4 Papel das Células Imunes na Fisiologia Óssea*

As células imunes desempenham um papel importante tanto na fisiologia óssea, com em caso de doenças, produzindo substâncias químicas reguladoras, que influenciam na osteogênese. As células imunológicas mais importantes são os macrófagos (LORENZO et al., 2008), pois desempenham papel crucial nas reações imunoinflamatórias de longo prazo, induzidas mediante a implantação desses biomateriais.

Após a implantação, ocorre uma interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o biomaterial implantado, desencadeando uma resposta celular específica do biomaterial (AL-MAAWI et al., 2017; XUE et al., 2018). As proteínas desempenham um papel fundamental na mediação da interação entre biomateriais e células ou tecidos. Consequentemente, a absorção de proteínas na superfície do material, representa a fase inicial dessa interação, um determinante crítico para processos subsequentes, incluindo proliferação celular, diferenciação e formação da matriz extracelular (OTHMAN et al., 2018).

Por conseguinte, os macrófagos respondem a detritos de células mortas, bem como a infecções externas, sendo importantes células fagocitárias (LORENZO et al., 2008; TAKAYANAGI, 2005). Sabe-se que macrófagos possuem alta plasticidade intrínseca e atividade de polarização flexível nos subtipos M1 e M2. Esses dois subtipos de macrófagos, são classicamente distinguidos com base em várias propriedades funcionais, marcadores de superfície e indutores (XUE et al., 2018).

#### *1.5 Citocinas e Fatores da Regulação Óssea*

A remodelação óssea é um processo fisiológico natural regulada por ciclos contínuos de reabsorção e formação óssea, que depende de uma intrincada interação entre osteoblastos e osteoclastos (BAHT et al., 2018; XUE et al., 2018). Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo. Estes exercem um papel fundamental tanto na remodelação óssea normal, como na resposta a lesões ou doenças ósseas (XUE et al., 2018).

Neste contexto, a IL-6 surge como um mediador inflamatório que exerce a sua influência na ativação dos osteoclastos, tendo atuação na reabsorção óssea. Em

cenários inflamatórios, níveis elevados de IL-6 podem aumentar a atividade dos osteoclastos, potencialmente levando à perda óssea excessiva (HOTCHKISS et al., 2016; MARIANI et al., 2019; YAN et al., 2020).

O TNF- $\alpha$  é um mediador inflamatório, que desempenha um papel fundamental na condução da ativação dos osteoclastos. Promove a diferenciação de células precursoras em osteoclastos ativos e aumenta a atividade de reabsorção óssea (MARIANI et al., 2019; YAN et al., 2020). Por outro lado, o IFN- $\gamma$  é uma citocina pró-inflamatória, que tem o potencial de impactar diretamente na atividade dos osteoclastos, regulando a expressão de moléculas, que influenciam efetivamente na sua função. Há relatos da sua interação com outros mediadores e células do sistema imunológico, que interferem no *turnover* ósseo, em cenários inflamatórios, ou seja, no equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (LAQUERRIERE et al., 2003; MARIANI et al., 2019; YAN et al., 2020; XUE et al., 2018).

Os osteoblastos são células responsáveis pela formação da matriz óssea, são encarregados de sintetizar citocinas e fatores de crescimento, que regulam a atividade e a função dos osteoclastos. Entre eles, o ativador do receptor do ligante Kappa B do fator nuclear (RANKL) e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), desempenham papéis fundamentais na indução da osteoclastogênese. Além disso, em seu papel de modular a resposta imune, os osteoblastos interagem com as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Essas citocinas estimulam a diferenciação e a atividade dos osteoblastos, promovendo assim a geração de tecido ósseo recém formado, ajudando no equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (GAO et al., 2018; YAN et al., 2020).

De forma geral, a pesquisa e o desenvolvimento de materiais osteogênicos tradicionais têm se concentrado principalmente no preenchimento direto do defeito ósseo, atentando apenas aos princípios físicos, mecânicos e químicos. Assim, ocorre apenas a restauração do defeito, obtendo bom suporte mecânico, similares às do tecido ósseo natural. No entanto, esta abordagem ignora o fato de que o reparo do defeito ósseo é um processo fisiológico dinâmico, que envolve um intenso processo imunoinflamatório, com a participação de uma ampla variedade de células e citocinas pró e anti-inflamatórias (PAJARINEN et al., 2019).

### *1.6 Biovidros – Reparação e Regeneração Óssea*

A implantação de substitutos ósseos sempre altera o microambiente osso, em que alguns substitutos ósseos podem promover alterações da resposta imunoinflamatória (ZHAO et al., 2020). Estudos demonstraram que a cicatrização óssea pode ser controlada, mediante a alteração da composição química (íons metálicos, proteínas e drogas de moléculas pequenas) e as propriedades físicas (tamanho das partículas, porosidade, tamanho dos poros e topologia) dos biomateriais (WANG, 2019).

Nesta perspectiva, os biovidros tem sido cada vez mais estudados, no que tange o processo de reparação e regeneração óssea (CURTIS et al., 2010; MA et al., 2017). Os biovidros não apenas exibem biocompatibilidade e bioabsorção, mas também estabelecem fortes conexões com os tecidos, devido à sua reatividade química nos fluidos corporais. Este biomaterial possui a capacidade única de desenvolver uma camada de hidroxiapatita, ao entrar em contato com fluidos biológicos (CATTEAUX et al., 2013).

Assim, os vidros bioativos encontram ampla aplicação na engenharia de tecidos para regeneração óssea. A sua semelhança estrutural com o tecido natural e a sua capacidade de estimular a regeneração óssea torna esse tipo de biomaterial altamente valioso (BALAMURUGAN et al., 2006).

### *1.7 Ineditismo – Processo de Sínteses Biovidros*

Neste sentido, o biovidro surge como um promissor candidato à atuar como protagonista no processo de cicatrização de defeitos ósseos e fraturas complexas. Sendo amplamente pesquisado em aplicações médicas e odontológicas, graças à sua excepcional biocompatibilidade e osteocondutividade (AL-MAAWI et al., 2017; MOGHANIAN et al., 2018; XUE et al., 2018).

Nesta perspectiva, a incorporação de nanocristais na estrutura molecular de biovidros é inovador, o que possibilita a intensificação de diversas propriedades físicas, químicas e biológicas, as quais precisam ser melhor caracterizadas nas diversas aplicações clínicas. Deste modo, no estudo foi avaliada a resposta imunoinflamatória local e sistêmica, com uso de modelo experimental de lesão óssea nas calvárias de ratas, tratada com biovidros puro e nanoestruturados, com diferentes concentrações de íons prata.



## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar da variedade de materiais orgânicos e sintéticos capazes de substituir o tecido ósseo ou estimular a osteogênese reparacional, ainda não foi desenvolvido um material que atenda a todos os requisitos desejados. O biovidro representa uma inovação promissora na área dos biomateriais, trazendo consigo uma fusão fascinante entre a ciência dos materiais e as aplicações biológicas.

Nessa perspectiva, a incorporação de nanocristais na estrutura molecular do biovidro é inovadora, o que visa intensificar diversas propriedades, que precisam ser melhor caracterizadas, em vista a determinar o potencial clínico desses novos biocompostos. Em particular, a resposta imunoinflamatória, resultado de ativação osteoimunomoduladora, inerentes à implantação destes novos biovidros puro e nanoestruturados.

### **3. HIPÓTESE**

Nossa proposta é que o biovidro nanoestruturado, devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas intensificadas pela presença de nanocristais de prata em diferentes concentrações, demonstrará uma resposta imunoinflamatória controlada e uma capacidade superior de promover a regeneração óssea quando comparado ao biovidro puro.

## 4. OBJETIVOS

### 4.4 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imunoinflamatória local e sistêmica, frente a implantação de biovidros puro e nanoestruturados com íons de prata no sistema vítreo SNCP ( $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ ), no tratamento de lesões ósseo nas calvárias de ratas.

### 4.5 Objetivo Específico

- Avaliar de forma semiquantitativa o número de cristais remanescente nos cortes histológicos de calvárias de ratas dos grupos tratados com biovidro puro e nanoestruturado, com diferentes concentrações de íons prata (percentual de massa - % wt): Ag - 0,00 (Biovidro Puro); Ag - 0,25 % wt; Ag - 0,50 % wt; Ag - 0,75 % wt; Ag - 1,00 % wt; Ag - 1,25 % wt; Ag - 1,5 % wt.
- Avaliação de forma semiquantitativa a presença de infiltrado inflamatório, no centro (entre cristais) e na periferia da lesão, para determinar o efeito dos biovidros nanoestruturados na modulação da resposta inflamatória local.
- Analisar a capacidade de modulação da resposta sistêmica imunoinflamatório desses biovidros nanoestruturados, com base na concentração de citocinas pró-inflamatórias no soro/plasma, relacionadas ao processo de remodelamento ósseo (osteoclastos), com polarização dos macrófagos para um perfil M1: IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ .
- Determinar citocinas anti-inflamatórias relacionadas ao processo de formação óssea (osteoblastos), com polarização dos macrófagos para um perfil M2: IL-4, IL-10

## REFERÊNCIAS

- AL-MAAWI, S.; ORLOWSKA, A.; SADER, R.; JAMES KIRKPATRICK, C.; GHANAATI, S. In vivo cellular reactions to different biomaterials-Physiological and pathological aspects and their consequences. **Semin Immunol.**, v. 29, n. 01, p. 49-61. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.06.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532317300118?via%3Dihub>. Acesso em: 07 jan.2023.
- AMBROSIO, L.; RAUCCI, M. G.; VADALA, G.; AMBROSIO, L.; PAPALIA, R.; DENARO, V. Innovative Biomaterials for the Treatment of Bone Cancer. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 01. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22158214>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/8214>. Acesso em: 15 fev. 2023.
- ARRON, J. R., CHOI, Y. Bone versus immune system. **Nature.**, v. 408, n. 6, p. 535. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35046196>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35046196>. Acesso em: 15 fev. 2023.
- A. BALAMURUGAN, SOCKALINGUM, G. D., MICHEL, J.-B., FAURE, J., V. BANCHET, WORTHAM, L., BOUTHORS, S., LAURENT-MAQUIN, D., & GÉRARD BALOSSIÉ. Synthesis and characterisation of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications. **Mater Lett.**, v. 60, n. 01 p. 3752–3757. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.03.102>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167577X06004009#preview-section-cited-by>. Acesso em: 16 fev. 2023.
- BAHT GS, VI L, ALMAN BA. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. **Curr Osteoporos.**, v. 16, n. 02, p. 138- 145. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0423-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11914-018-0423-2>. Acesso em: 20 fev. 2023.
- CATTEAUX R, GRATTEPANACHE-LEBECQ I, DÉLANGLOIS F, CHAI F, HORNEZ JC, HAMPSHIRE S. Synthesis, characterization and bioactivity of bioglasses in the Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> system prepared via sol gel processing. **Chem Eng Res Des.**, v. 91, n. 12 p. 2420–6. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.05.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0263876213002116>. Acesso em: 22 fev. 2023.
- CHEN, Z.; KLEIN, T.; MURRAY, R.Z.; CRAWFORD, R.; CHANG, J.; WU, C.; XIAO, Y. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. **Materials Today.**, v. 19, n. 01, p. 304-321. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.11.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702115003788>. Acesso em: 22 fev. 2023.
- CHENG, L. C., JIANG, X., WANG, J., CHEN, C. E LIU, R.-S. Nano–bio effects: interaction of nanomaterials with cells. **Nanoscale.**, v. 05, n. 01, p. 3547- 3547. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3NR34276J>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/nr/c3nr34276j>. Acesso em: 15 jan. 2023.

CURTIS, A. R.; WEST, N. X.; SU, B. Synthesis of nanobioglass and formation of apatite rods to occlude exposed dentine tubules and eliminate hypersensitivity. **Acta Biomater.**, v. 6, n. 01, p. 3740–3746. 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.045>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20206307/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

DAVIS MJ, TSANG TM, QIU Y, DAYRIT JK, FREIJ JB, HUFFNAGLE GB, OLSZEWSKI MA. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **mBio.**, v. 18, n. 04, p. 264-13. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00264-13>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23781069/>. Acesso em: 22 fev. 2023.

GAO, L.; LI, M.; YIN, L.; ZHAO, C.; CHEN, J.; ZHOU, J.; DUAN, K.; FENG, B. Dual-inflammatory cytokines on TiO(2) nanotube-coated surfaces used for regulating macrophage polarization in bone implants. **J Biomed Mater Res.**, v. 106, n. 01, p. 1878-1886. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36391>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29524297/>. Acesso em: 13 mar. 2023.

HOTCHKISS, K.M.; REDDY, G.B.; HYZY, S.L.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D.; OLIVARES-NAVARRETE, R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. **Acta Biomater.**, v. 31, n. 01, p. 425-434. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.003>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26675126/>. Acesso em: 22 mar. 2023.

KIM, S.H.; SEO, Y.B.; YEON, Y.K.; LEE, Y.J.; PARK, H.S.; SULTAN, M.T.; LEE, J.M.; LEE, J.S.; LEE, O.J.; HONG, H. 4D-bioprinted silk hydrogels for tissue engineering. **Biomaterials.**, v. 260, n. 01, p. 281. 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120281>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961220305275>. Acesso em: 22 mai. 2023.

KOPEC, M.; BETON, K.; JARCZEWSKA, K.; ABRAMCZYK, H. Hyperglycemia and cancer in human lung carcinoma by means of Raman spectroscopy and imaging. **Sci Rep.**, v. 12, n. 01, p. 18561. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21483-y>.

Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-21483-y>. Acesso em: 21 mai. 2023.

KZHYSHKOWSKA, J.; GUDIMA, A.; RIABOV, V.; DOLLINGER, C.; LAVALLE, P.; VRANA, N.E. Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine. **Journal of leukocyte biology.**, v. 98, n. 01, p. 953-962. 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1189/jlb.5vmr0415-166r>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26168797/>. Acesso em: 25 mai. 2023.

LAQUERRIERE, P.; GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A.; JALLOT, E.; BALOSSIER, G.; FRAYSSINET, P.; GUENOUNOU, M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. **Biomaterials.**, v. 24, n. 01, p. 2739-2747. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00089-9). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961203000899>. Acesso em: 24 mai. 2023.

LIMMER, A.; WIRTZ, D.C. Osteoimmunology: Influence of the Immune System on Bone Regeneration and Consumption. **Orthop Unfall.**, v. 155, n. p. 273-280. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0043-100100>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28683495/>. Acesso em: 24 jan. 2023.

LORENZO J, HOROWITZ M, CHOI Y. Osteoimmunology: Interactions of the Bone and Immune System. **Endocrine Reviews.**, v. 29, n. 04, p. 403-440. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1210/er.2007-0038>. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article/29/4/403/2354973>. Acesso em: 22 mai. 2023.

MA, Q.; WANG, T.; MENG, Q.; XU, X.; WU, H.; XU, D.; CHEN, Y. Comparison of in vitro dentinal tubule occluding efficacy of two different methods using a nanoscaled bioactive glass-containing desensitising agent. **J Dent.**, v. 60, n. 01, p. 63-69. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ident.2017.03.001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28267581/>. Acesso em: 03 fev. 2023.

MARIANI, E.; LISIGNOLI, G.; BORZI, R.M.; PULSATELLI, L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 03, p. 636. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20030636>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30717232/>. Acesso em: 03 fev. 2023.

MARIN, E., BOSCHETTO, F., & PEZZOTTI, G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. **J Biomed Mater Res.**, v. 108, n. 08, p.1617-1633. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36930>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32196949/>. Acesso em: 15 fev. 2023.

MINARDI, S., TARABALLI, F., PANDOLFI, L. E TASCIOOTTI, E. Patterning Biomaterials for the Spatiotemporal Delivery of Bioactive Molecules. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.**, v. 4, p. 45. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00045>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2016.00045/full>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MOGHANIAN A, FIROOZI S, TAHRIRI M, SEDGHI A. A comparative study on the in vitro formation of hydroxyapatite, cytotoxicity and antibacterial activity of 58S bioactive glass substituted by Li and Sr. **Mater Sci Eng.**, v. 91, n. 60, p. 349-360. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.058>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30033264/>. Acesso em: 17 nov. 2022.

OTHMAN, Z.; CILLERO PASTOR, B.; VAN RIJT, S.; HABIBOVIC, P. Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. **Biomaterials.**, v. 167, n. 01, p. 191-204. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.020>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29571054/>. Acesso em: 13 jan. 2023.

PAJARINEN, J.; LIN, T.; GIBON, E.; KOHNO, Y.; MARUYAMA, M.; NATHAN, K.; LU, L.; YAO, Z.; GOODMAN, S.B. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. **Biomaterials.**, v. 196, n. 01, p. 80-89. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.025>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29329642/>. Acesso em: 10 jan. 2023.

SUWARDI, A.; WANG, F.; XUE, K.; HAN, M.Y.; TEO, P.; WANG, P.; WANG, S.; LIU, Y.; YE, E.; LI, Z. Machine Learning-Driven Biomaterials Evolution. **Adv Mater.**, v. 34, n. 1, p. 2102703. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.202102703>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34617632/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

SZCZESNY, G.; KOPEC, M.; POLITIS, D.J.; KOWALEWSKI, Z.L.; LAZARSKI, A.; SZOLC, T. A Review on Biomaterials for Orthopaedic Surgery and Traumatology: From Past to Present. **Materials (Basel)**, v. 15, n. 10, p. 3622. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma15103622>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35629649/>. Acesso em: 14 jan. 2023.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodontal Res.**, v. 40, n. 01, p. 287-293. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00814.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15966905/>. Acesso em: 03 mai. 2023.

TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nat Rev Immunol.**, v.07, n. 01, p. 292-304. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri2062>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2062>. Acesso em: 03 fev. 2023.

WANG, Z.; ZHANG, W.; XIE, C.; WEN, F.; MA, C.; LIN, N.; THIAN, E.S.; WANG, X. Geometric anisotropy on biomaterials surface for vascular scaffold design: engineering and biological advances. **Journal of Physics: Materials**, v. 02, n. 03, p. 032033. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1088/2515-7639/ab1c68>. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2515-7639/ab1c68/meta>. Acesso em: 05 jan. 2023.

XIE, Y.; HU, C.; FENG, Y.; LI, D.; AI, T.; HUANG, Y.; CHEN, X.; HUANG, L.; TAN, J. Osteoimmunomodulatory effects of biomaterial modification strategies on macrophage polarization and bone regeneration. **Regen Biomater.**, v. 7, n. 03, p. 233-245. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/rb/rbaa006>. Disponível em: <https://academic.oup.com/rb/article/7/3/233/5835252>. Acesso em: 14 jan. 2023.

XUE, Q.; YAN, Y.; ZHANG, R.; XIONG, H. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 3805. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19123805>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30501075/>. Acesso em: 17 fev. 2023.

XUE, Y.; CHE, J.; JI, X.; LI, Y.; XIE, J.; CHEN, X. Recent advances in biomaterial-boosted adoptive cell therapy. **Chem Soc Rev.**, v. 51, n. 01, p. 1766-1794. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1CS00786F>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/cs/d1cs00786f>. Acesso em: 17 fev. 2023.

YAN, X.; SHEN, K.; TANG, Q.; FANG, X.; ZHANG, C.; ZHU, Z.; HOU, Y.; LAI, M. IL-4 functionalized titanium dioxide nanotubes modulate the inflammatory response of macrophages. **J Biomater Sci Polym Ed.**, v. 31, n. 17, p. 2238-2251. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1799534>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32693732/>. Acesso em: 10 mar. 2023.

ZHAO, Z.; ZHAO, Q.; GU, B.; YIN, C.; SHEN, K.; TANG, H.; XIA, H.; ZHANG, X.; ZHAO, Y.; YANG, X. Minimally invasive implantation and decreased inflammation reduce osteoinduction of biomaterial. **Theranostics**, v. 10, n. 08, p. 3533-3545. 2020. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.39507>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32206106/>. Acesso em: 26 fev. 2023.



## APÊNDICE A (artigo científico)

### IMMUNE AND INFLAMMATORY RESPONSES TO NANOSTRUCTURED BIOGLASSES IN RAT CALVARIA BONE DEFECT REPAIR

#### ABSTRACT

This study assessed the immune and inflammatory system responses concerning using silver nanostructured bioglasses in mending bone defects within the rat calvaria. Notably, bioglasses profoundly impacted immune and inflammatory reactions within the bone defect site. The distinctive nanostructure of the material facilitated targeted interactions with immune system cells, leading to substantial modulations in the local bone repair milieu. The outcomes revealed that nanostructured bioglasses effectively stimulated an appropriate immune response, fostering the proliferation and differentiation of cells crucial to bone regeneration. Furthermore, a notable mitigation of excessive inflammatory responses was observed, contributing to a more efficient resolution of the bone defect. Based on these promising results, nanostructured bioglasses emerge as potential candidates for future deployment in bone repair therapies, offering an advanced and efficacious approach to enhancing the healing process of bone defects within clinical contexts. However, further investigation is imperative to comprehensively explore the therapeutic potential of these biomaterials and their applicability across diverse clinical scenarios pertinent to bone regeneration.

**Keywords:** Immune Response; Inflammation; Bioglasses; Nanotechnology; Bone Repair

## INTRODUCTION

Bioglasses represent a promising innovation in the area of biomaterials, bringing with them the fascinating fusion between materials science and biological applications. These materials, also known as bioactive glasses or bioactive glasses, have the unique ability to beneficially interact with the surrounding biological environment, making them ideal for a variety of medical and therapeutic applications.

Since their discovery, bioglasses have attracted increasing interest and attention from scientists and health professionals, thanks to their exceptional properties. The ability to stably bind to bone tissue, stimulating cell growth and bone repair, making them valuable materials in orthopedic treatments, bone reconstruction and dental implants. Furthermore, the biocompatibility of bioglasses, that is, their ability to harmoniously interact with biological systems, is a fundamental aspect that makes them stand out as viable alternatives to other traditional materials, such as metal or plastic. This significantly reduces the risk of rejection or adverse reactions, making them safer and more efficient for medical applications [1,2].

The adequate regeneration of tissues in the human body is limited, especially when there is a great loss of integrity and destruction of the extracellular matrix. Thus, the development of bone substitutes has been a promising option, boosting research in the area of biomaterials for bone regeneration. [1,2]. The ideal materials for bone repair should not only act as substitutes, but also allow for complete resorption with new bone formation. [3,6].

The implantation of materials in biological tissues requires biocompatibility, that is, the ability of the biomaterial to perform a desired function without causing unwanted effects, generated in a satisfactory cellular or tissue response. [2]. The interaction between the host's immune system and the biomaterial triggers a nonspecific cellular response. [7]. Despite the variety of organic and synthetic materials capable of replacing bone tissue or stimulating repairing osteogenesis, a material that meets all the desired requirements has yet to be developed. [2,8].

Bioglasses mimic the composition and architecture of bone at the nanoscale, which improves interaction with host immune and progenitor cells, leading to better outcomes. [9]. These biomaterials have promising effects on bone repair, although there are few experimental studies available. [10]. Furthermore, osteoimmunology suggests that immune responses play an important role in bone formation and

homeostasis. Several proteins and cytokines participate in immunological events and osteogenesis, showing a close relationship between immune signaling pathways and bone formation. [11].

Advanced immunomodulatory biomaterials have the potential to promote osseointegration and bone formation, preventing harmful imbalances related to bone remodeling, which can lead to problems such as osteoarthritis, osteolysis and osteoporosis. [12, 13]. In this perspective, the incorporation of nanocrystals in the molecular structure of bioglass is innovative and allows the intensification of several properties, which need to be better clarified. In particular, the immunoinflammatory response, the result of osteoimmunomodular mechanisms inherent to the implantation of these new nanostructured bioglasses.

Thus, the present study evaluated the immunoinflammatory response at the local and systemic level, inherent to the implantation of these nanostructured bioglasses with silver ions in a bone defect in the calvaria of rats.

## MATERIAL AND METHODS

### Synthesis and Characterization of Nanostructured Bioglasses

The synthesis of nanostructured bioglasses in the SNCP vitreous system was carried out by the melting method, between 1000 and 2000 °C, after mixing the reagents: silicon dioxide (30-60%), sodium carbonate (10-40%), sodium carbonate sodium and calcium (10-40%), phosphorus oxide (1-10%). Then, to obtain the nanostructured bioglasses, the pure bioglass was doped with silver oxide nanoparticles (0.25-1.5%). The method and application of these silver nanostructured bioglasses is in the process of applying for a patent (Process INPI: BR 10 2023 000062 2).

### Animals and Experimental Design

The study was carried out in accordance with international guidelines, as recommended in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health, obtaining approval from the Ethics Committee (CEUA/UNIUBE - nº 017/2019).

To evaluate the effect of nanostructured bioglasses with silver ions on a bone lesion, 80 Wistar albino rats (*Rattus Norvegicus*), 140-160g, housed in standard cages, in a bioterium with room temperature set at  $22 \pm 2$  ° C, air humidity at  $55 \pm 5\%$ , light-dark cycles of 12 h, and free access to water and chow (Nuvilab CR-1, Colombo, PR, Brazil).

A Bone defect in the rat calvaria was created in the frontal bone, on the right side of the median sagittal suture, using a 4mm trephine drill adapted to the contra-angle of a micromotor, with 20,000 rpm. Complete perforation of the bone plate was performed, maintaining the integrity of the cranial meninges and creating a spherical defect measuring 4 mm in diameter and 1.5 mm in depth.

The animals were randomly divided into eight groups (n=10 per group): Control (C): the bone defect was maintained with natural filling by the blood clot; Bioglass (Ag) - the bone gap was filled with bioglass nanostructured with silver ions, in seven different mass percentage concentrations (% in weight): Ag - 0.00 (Pure Bioglass); Nanostructured Bioglasses: Ag - 0.25, Ag - 0.5, Ag - 0.75, Ag - 1.0, Ag - 1.25, Ag - 1.5.

The animals were euthanized at the end of 4-week postoperative period, induced by 50 mg/kg of xylazine hydrochloride intraperitoneally.

### Histopathological Evaluations

After euthanasia, samples of the rats' calvaria were collected and subjected to histological processing. Histological analysis was performed semiquantitatively using standard light microscopy (Olympus BX41®). The number of remaining crystals and the intensity of the inflammatory infiltrate within the bone defect were determined by 3 independent evaluators: around the crystals and on the periphery of the bone defect. The following criteria were adapted from GEORGIANNOS et al., 2003 [14]: 0 - absence of inflammatory infiltrate or crystals; 1 - discrete presence of inflammatory infiltrate or rare crystals; 2 – moderate presence of inflammatory infiltrate or number of crystals; 3 - intense presence of inflammatory infiltrate or intense amount of crystals. Due to the low frequencies in the crossings between the variables of interest, the sum of two of them was considered: levels 0 and 1 were added (0: absent, 1: mild) and levels 2 and 3 (2: moderate and 3 : intense). Thus, these were considered as mild or absent (0 + 1) and moderate and intense (2 + 3), respectively.

### Immunological Evaluations

The systemic immunomodulatory effects were evaluated by the quantification of plasmatic cytokines, in which blood collections were performed through open cardiac puncture. The tubes were heparinized, kept at -80°C until the moment of dosage. Cytokine levels were determined by ELISA (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Cytokine levels were expressed in pg/ml.

### Statistical analysis

Data were tabulated in excel and exported to GraphPad Prism 8.1. The D'Agostino-Pearson test was used to assess normality. In cases of non-Gaussian distribution, the non-parametric Mann-Whitney test was applied. Multiple comparisons of median values for more than two groups were performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test. When the distribution was considered

normal and the variance homogeneous, parametric tests, ANOVA with Tukey's post-test of multiple comparisons were used. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

A mean concordance between the three evaluators, Kappa index, of  $97.46 \pm 4.07\%$  (mean  $\pm$  standard deviation) was detected in the semiquantitative analyzes of the number of remaining crystals and inflammatory infiltrate. Moderate and intense levels (2+3) of remaining crystals were observed in  $84.7 \pm 12.1\%$  of the samples (Figure 1 A-D). Specifically, in each group containing silver nanostructured bioglasses, the following mean percentages were detected: Pure Bioglass - Ag - 0.00 (71%), Ag - 0.25 (78%), Ag - 0.50 (72%), Ag - 0.75 (88%) %, Ag - 1.00 (84%), Ag - 1.25 (100%) and Ag - 1.50 (100%).

It is important to emphasize that in control group, the filling of the bone defect occurred naturally only by the blood clot. Therefore, the presence of remaining crystals was observed in groups nanostructured with silver ions ( $p < 0.001$ ) with concentrations greater than 0.75, that is, in Groups: Ag - 0.75, Ag - 1.00, Ag - 1.25, Ag - 1.50. The group with the lowest percentage was the Ag - 0.50 ( $p < 0.001$ ), followed respectively by the groups: Ag - 0.00 and Ag - 0.25 (Figure 1E).

The presence of inflammatory infiltrate was evaluated between the crystals (BC) and in the periphery of the bone defect (DB). It is important to emphasize that in the control group, repair by secondary intention was observed in the periphery with the presence of a bone defect in the center of the lesion. Thus, during the surgical procedure, the natural filling of the bone defect was performed, only by the blood clot. Thus, in the control group, mild or absent inflammatory infiltrate (0+1) was observed in the periphery of the lesion in 80% of the samples.

In the treated groups, a mild or absent (0+1) level of inflammatory infiltrate was also observed between the crystals in  $80.9 \pm 16.0\%$  of the samples and at the periphery of the bone defect in  $82.1 \pm 24.1\%$  of the cases. samples. With the exception of Ag - 0.00 (Pure Bioglass), in which a moderate and intense presence was observed on the periphery of the lesion (2+3) in 72% of the samples, with a light and absent level between the crystals in 57% of the samples.

Specifically, the following percentages were observed for the other groups: Ag - 0.25 (BC= 78%; BD= 88%), Ag - 0.50 (BC= 86%; BD= 72%), Ag - 0, 75 (BC= 67%; BD= 89%), Ag - 1.00 (BE= 100%; BD= 100%), Ag - 1.25 (BE= 100%; BD= 100%) and Ag - 1.50 (BE=78%; BD=100%).

The groups with the highest percentage of inflammatory infiltrate among the crystals were Ag - 1.0 and Ag - 1.25. And the groups with the lowest percentage were Ag - 0.00 (Pure Bioglass) and Ag - 0.75 ( $p < 0.001$ ) (Figure 2C). In the periphery of the bone defect, a higher percentage was observed in the groups: Ag - 1.0, Ag - 1.25 and Ag - 1.50. And lower percentage ( $p < 0.001$ ): Ag - 0.00 (Pure Bioglass) and Ag - 0.50 (Figure 2D).

The cytokines that participate in the osteogenesis process were quantified. It was observed that the production of IL-4 was significantly positively modulated by pure bioglass (Ag-0.00) and also by bioglass Ag-1.5, when compared to the other concentrations of Ag and to the control. When comparing the Ag-1.5 bioglass with the pure bioglass, we verified a significant increase in the production of IL-4 in the Ag-1.5 bioglass (Figure 3A). Regarding IL-10, there was a significantly higher production in the Ag-1.5 bioglass when compared to all other groups (including control and other Ag concentrations) (Figure 3B).

Regarding IL-6, there was a significant increase in the pure bioglass group (Ag-0.00) in relation to all other groups (Figure 4A). The production of TNF- $\alpha$  showed a different production pattern than the other cytokines. In the bioglass conjugated with Ag-1.0 and Ag-0.25, there was a significant increase in the production of TNF- $\alpha$  in relation to the control group and the groups of bioglass conjugated with Ag in the following concentrations: pure bioglass, Ag-1.25 and Ag-1.5. The Ag-0.75 bioglass induced significantly higher production in relation to all conditions, except for the Ag-0.5 bioglass, which showed a significant increase in relation to all other groups, as observed in figure 4B. Modulation of IFN- $\gamma$  production was only demonstrated in the Ag-0.25 bioglass and Ag-0.75 bioglass groups, the latter with significantly higher production than the Ag-0.25 bioglass (Figure 4C).



## DISCUSSION

In general, biomaterials have been shown to be able to modulate the immune response, either positively or as a way of suppressing the immune response. The ability of most biomaterials to trigger an inflammatory response occurs because the body perceives the biomaterial as a foreign body and reacts in an attempt to eliminate or isolate it. Inflammation is a natural immune system response to injury and invading pathogens. Consequently, this inflammation can lead to increased production of cytokines, which are proteins produced by immune system cells in response to an infection or inflammation. Cytokines are important mediators of the immune response, as they regulate the migration and activation of immune system cells [15].

In the present study, the pure and nanostructured bioglasses with silver per se were able to modulate the production of IL-4, having its effect potentiated by the presence of silver. In the modulation of the immune response, after the implantation of biomaterials, the polarization of the macrophages for an M2 profile is necessary, avoiding an exacerbated production of inflammatory cytokines, regulating and guaranteeing that the rejection process of this graft is smaller [16]. Gao et al. (2018) demonstrated that nanotubes coated with TiO<sub>2</sub> can modulate this response in bone grafts, showing that initially there is production of pro-inflammatory molecules, but then IL-4 levels increase, remaining high in the following days. to the graft [17]. The use of IL-4 to modulate the environment has been increasingly used, the approach of conjugating IL-4 to biomaterials, in one study, IL-4 was conjugated with titanium dioxide nanotubes (TNTs) using polydopamine, this strategy caused the inflammatory markers (TNF and IL-18) to have a lower expression in the IL-4 conjugated TNTs, and concomitantly the anti-inflammatory markers (IL-4 and IL-10) had a significant increase, polarizing an M2 profile with inhibition of M1 profile polarization, which is shown to be effective and necessary to inhibit the inflammatory response and effectively promote tissue repair and regeneration [18].

Our study demonstrated that silver nanostructured bioglasses have the ability to modulate the cytokine IL-10, with positive and negative modulation occurring. It is known that biomaterials can modulate IL-10 production in different ways, depending on the type of material and clinical application. Some biomaterials can induce the production of IL-10 by cells of the immune system, such as macrophages and lymphocytes. For example, bioactive materials such as hydroxyapatite and bioactive

glass can activate the Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway in macrophages, leading to the production of IL-10. Other biomaterials can control the release of immunomodulatory drugs, such as transforming growth factor beta (TGF-beta) and interferon-gamma (IFN-gamma), which can regulate the production of IL-10 by cells of the immune system. In the cicatricial process, the participation of the cytokine IL-10 is essential, where macrophages polarize to the "M2" phenotype, secreting anti-inflammatory cytokines such as IL-10, thus learning the capacity of reduction and phagocytosis of these cells and enhancing remodeling activity tissue, also inducing the migration and front of fibroblasts leading to effective tissue healing [19]. IL-10 also demonstrates the ability to inhibit the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  after phagocytosis of polymethylmethacrylate particles by monocytes/macrophages [20].

Regarding the modulation of the so-called inflammatory cytokines that orchestrate this initial immune response after implantation or injection of biomaterials, a rapid immune response, similar to what occurs in the presence of microbiological threats or other acute threats characterized by high levels of interleukin IL-1 $\beta$ , IL -6 and TNF $\alpha$ . We verified in relation to these cytokines that the bioglass was able to effectively modulate the production of IL-6, one of the cytokines that participate in this response. IL-6 is modulated in different ways by biomaterials. Hotchkiss et al. (2016) demonstrated that the production of pro-inflammatory cytokines in the first hours after the implantation of biomaterials is extremely necessary. Among these cytokines is IL-6, which, like other pro-inflammatory cytokines, has greater production in the first hours in response to the implant. However, these levels need to be reduced and a polarization of M2 macrophages occurs. It has already been demonstrated that a titanium disk with greater roughness had the ability to reduce IL-6 production and increase concomitantly with the increase of anti-inflammatory cytokines [21].

The outlined strategy is always to try to reduce inflammatory cytokines, including IL-6. Another study demonstrated the association of Icarin to titanium particles, demonstrating that treatment with Icarin can reduce osteolysis and also decrease the inflammatory response, including the reduction of IL-6, in a model of murine calvaria [22] that was the same model used by our group.

We observed that there is an approach in which, using different types of nano-CeO<sub>2</sub> (ceria) introduced into the Ti surface coating, expression of the gene related to IL-6 production similar to the control group in HGF fibroblasts is obtained, in addition to in RAW macrophages, it had the ability to reduce IL-6 levels, acting on the restriction

of translocation of the NF- $\kappa$ B/p65 subunit, inhibiting the activation of the inflammatory cascade and consequently the production of pro-inflammatory cytokines [23].

Another cytokine related to this post-implantation production of biomaterials is TNF- $\alpha$ . In the present study, pure and nanostructured bioglasses with silver were able to modulate TNF production, in most of their conjugated silver concentrations, and this modulation was frequently positive in relation to the control group. In the implantation of biomaterials, the cells that act at the beginning are the macrophages, which react by trying to phagocytize the biomaterial considered a foreign body, such as secreting cytokines that direct an inflammatory and healing response to the biomaterial. Among the cytokines is TNF, which is secreted in an increased form at the beginning of the response [24].

One way of trying to control inflammation is to conjugate nanostructured bioglasses with silver to some other substance or to modify its structure. In a study using smooth titanium and hydrophilic titanium crude, it was demonstrated that smooth titanium induces a greater production of pro-inflammatory cytokines, including TNF, whereas hydrophilic titanium crude can induce macrophages to an M2 phenotype and a consequent lower production of TNF [15]. In another study, a hybrid of gold nanoparticles associated with nanocolloids performed by pulsed laser ablation was used. In this study, the authors demonstrated that this biomaterial significantly reduced the expression of the TNF gene, according to the concentration of the biomaterial [25]. This finding corroborates our results, and can be evidenced in the groups with nanostructured bioglass with a higher concentration of silver ions (Ag-1.25 and Ag-1.5 / Figure 4B).

Regarding IFN production, as observed, only two conditions were able to modulate IFN- $\gamma$  production (Ag- 0.25 and Ag- 0.75 / Figure 4C). Little is known about the role of IFN- $\gamma$  in reactions involving the implantation of biomaterials. However, IFN- $\gamma$  is known to have the known ability to activate macrophages and drive towards an M1 phenotype, which is known as a pro-inflammatory state, reflecting the ability to upregulate the ability of antigen presentation, phagocytosis and production of pro-inflammatory cytokines and effector molecules [26]. In the present study, the low production of IFN- $\gamma$  in the plasma of rats corroborates what Chang et al. (2009) who stimulated cultures of pure lymphocytes and monocytes, observed that over 10 days there was no production of IFN- $\gamma$ , regardless of the type of biomaterial treated. However, in indirect cultures there was a slight increase in production, but when

adherent monocytes were placed in culture together with lymphocytes, IFN- $\gamma$  production increased significantly according to the different types of biomaterials [27].

## CONCLUSION

Despite the extensive knowledge available on the influence of different biomaterials on immunomodulation, it is essential to consider other important factors such as the purpose of the biomaterial, its arrangement and physical state. In this study, we demonstrate the use of nanostructured silver bioglasses in improving specific aspects of immunomodulation. In addition, we used an established in-vivo model for systemic evaluation. Bioglass alone proved to be effective in immunomodulation, whose effectiveness was potentiated or regulated by silver nanocrystals, allowing perspectives for several applications beyond bone regeneration and immunomodulation. In short, our research shows that bioglass has the ability to immunomodulate and regulate inflammation both locally and systemically. Therefore, these nanostructured bioglasses can be useful in other areas, such as controlling microorganisms and strengthening the immune response against specific pathogens. However, additional studies are needed to validate these other capabilities of biomaterials.

## REFERENCES

1. Kopec, M.; Beton, K.; Jarczewska, K.; Abramczyk, H. Hyperglycemia and cancer in human lung carcinoma by means of Raman spectroscopy and imaging. *Sci Rep* **2022**, *12*, 18561, doi:10.1038/s41598-022-21483-y.
2. Marin, E.; Boschetto, F.; Pezzotti, G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J Biomed Mater Res A* **2020**, *108*, 1617-1633, doi:10.1002/jbm.a.36930.
3. Xue, Y.; Che, J.; Ji, X.; Li, Y.; Xie, J.; Chen, X. Recent advances in biomaterial-boosted adoptive cell therapy. *Chem Soc Rev* **2022**, *51*, 1766-1794, doi:10.1039/d1cs00786f.
4. Xie, Y.; Hu, C.; Feng, Y.; Li, D.; Ai, T.; Huang, Y.; Chen, X.; Huang, L.; Tan, J. Osteoimmunomodulatory effects of biomaterial modification strategies on macrophage polarization and bone regeneration. *Regen Biomater* **2020**, *7*, 233-245, doi:10.1093/rb/rbaa006.
5. Ambrosio, L.; Raucci, M.G.; Vadala, G.; Ambrosio, L.; Papalia, R.; Denaro, V. Innovative Biomaterials for the Treatment of Bone Cancer. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22158214.
6. Suwardi, A.; Wang, F.; Xue, K.; Han, M.Y.; Teo, P.; Wang, P.; Wang, S.; Liu, Y.; Ye, E.; Li, Z.; et al. Machine Learning-Driven Biomaterials Evolution. *Adv Mater* **2022**, *34*, e2102703, doi:10.1002/adma.202102703.
7. Limmer, A.; Wirtz, D.C. Osteoimmunology: Influence of the Immune System on Bone Regeneration and Consumption. *Z Orthop Unfall* **2017**, *155*, 273-280, doi:10.1055/s-0043-100100.
8. Szczesny, G.; Kopec, M.; Politis, D.J.; Kowalewski, Z.L.; Lazarski, A.; Szolc, T. A Review on Biomaterials for Orthopaedic Surgery and Traumatology: From Past to Present. *Materials (Basel)* **2022**, *15*, doi:10.3390/ma15103622.
9. Minardi, S., Taraballi, F., Pandolfi, L. e Tasciotti, E. Padronização de biomateriais para a entrega espaço-temporal de moléculas bioativas. *Frente. Bioeng. Biotecnologia*. **2016**, *4*:45. doi: 10.3389/fbioe.2016.00045
10. Kim, S.H.; Seo, Y.B.; Yeon, Y.K.; Lee, Y.J.; Park, H.S.; Sultan, M.T.; Lee, J.M.; Lee, J.S.; Lee, O.J.; Hong, H.; et al. 4D-bioprinted silk hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **2020**, *260*, 120281, doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120281.
11. Arron JR, Choi Y. "Bone versus immune system". *Nature*. **2000**, *408* (6812): 535–6. doi:10.1038/35046196. PMID 11117729. S2CID 32822431.
12. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 292-304, doi:10.1038/nri2062.
- 13.
14. Georgiannos, S.N.; Renaut, A.; Goode, A.W.; Sheaff, M. The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. *Surgery* **2003**, *134*, 827-34, doi: 10.1016/s0039-6060(03)00292-7.
15. Anderson, J.M.; Rodriguez, A.; Chang, D.T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* **2008**, *20*, 86-100, doi:10.1016/j.smim.2007.11.004.

16. Mosser, D.M.; Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **2008**, *8*, 958-969, doi:10.1038/nri2448.
17. Gao, L.; Li, M.; Yin, L.; Zhao, C.; Chen, J.; Zhou, J.; Duan, K.; Feng, B. Dual-inflammatory cytokines on TiO(2) nanotube-coated surfaces used for regulating macrophage polarization in bone implants. *J Biomed Mater Res A* **2018**, *106*, 1878-1886, doi:10.1002/jbm.a.36391.
18. Yan, X.; Shen, K.; Tang, Q.; Fang, X.; Zhang, C.; Zhu, Z.; Hou, Y.; Lai, M. IL-4 functionalized titanium dioxide nanotubes modulate the inflammatory response of macrophages. *J Biomater Sci Polym Ed* **2020**, *31*, 2238-2251, doi:10.1080/09205063.2020.1799534.
19. Mariani, E.; Lisignoli, G.; Borzi, R.M.; Pulsatelli, L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20030636.
20. Laquerriere, P.; Grandjean-Laquerriere, A.; Jallot, E.; Balossier, G.; Frayssinet, P.; Guenounou, M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2739-2747, doi:10.1016/s0142-9612(03)00089-9.
21. Hotchkiss, K.M.; Reddy, G.B.; Hyzy, S.L.; Schwartz, Z.; Boyan, B.D.; Olivares-Navarrete, R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta Biomater* **2016**, *31*, 425-434, doi:10.1016/j.actbio.2015.12.003.
22. Shao, H.; Shen, J.; Wang, M.; Cui, J.; Wang, Y.; Zhu, S.; Zhang, W.; Yang, H.; Xu, Y.; Geng, D. Icariin protects against titanium particle-induced osteolysis and inflammatory response in a mouse calvarial model. *Biomaterials* **2015**, *60*, 92-99, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.04.048.
23. Li, X.; Qi, M.; Sun, X.; Weir, M.D.; Tay, F.R.; Oates, T.W.; Dong, B.; Zhou, Y.; Wang, L.; Xu, H.H.K. Surface treatments on titanium implants via nanostructured ceria for antibacterial and anti-inflammatory capabilities. *Acta Biomater* **2019**, *94*, 627-643, doi:10.1016/j.actbio.2019.06.023.
24. Lee, H.S.; Stachelek, S.J.; Tomczyk, N.; Finley, M.J.; Composto, R.J.; Eckmann, D.M. Correlating macrophage morphology and cytokine production resulting from biomaterial contact. *J Biomed Mater Res A* **2013**, *101*, 203-212, doi:10.1002/jbm.a.34309.
25. Condorelli, M.; Speciale, A.; Cimino, F.; Muscara, C.; Fazio, E.; D'Urso, L.; Corsaro, C.; Neri, G.; Mezzasalma, A.M.; Compagnini, G.; et al. Nano-Hybrid Au@LCCs Systems Displaying Anti-Inflammatory Activity. *Materials (Basel)* **2022**, *15*, doi:10.3390/ma15103701.
26. Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **2004**, *25*, 677-686, doi:10.1016/j.it.2004.09.015.
27. Chang, D.T.; Colton, E.; Matsuda, T.; Anderson, J.M. Lymphocyte adhesion and interactions with biomaterial adherent macrophages and foreign body giant cells. *J Biomed Mater Res A* **2009**, *91*, 1210-1220, doi:10.1002/jbm.a.32218.

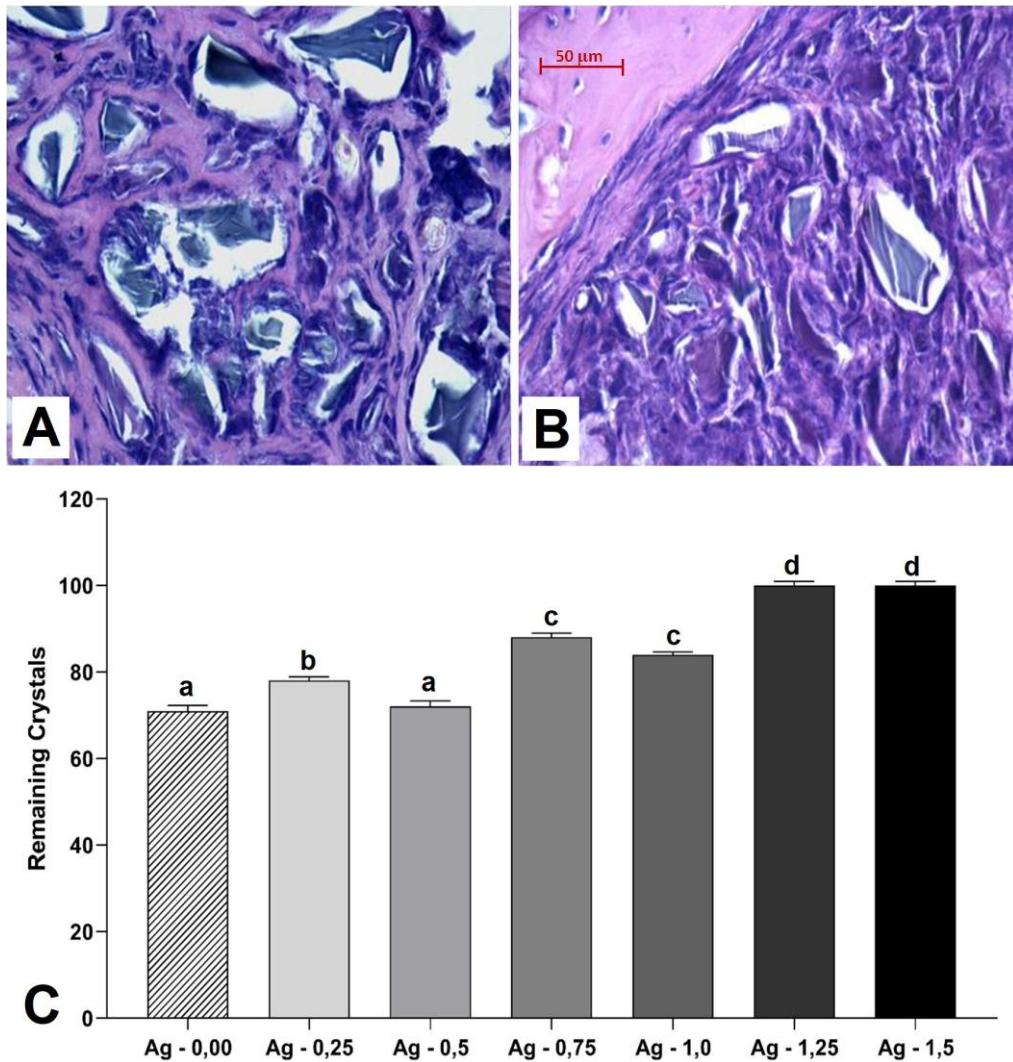


Figure 1: Histological sections of the calvaria and graph of the number of remaining crystals . A- Neoformed tissue in the region of the bone defect, showing abundant silver crystals (black) surrounded by fibrous connective tissue (Hematoxylin-eosin, 400X). B- Bone occupying the bone defect area with underlying fibrous connective tissue permeating the crystals (Hematoxylin-eosin, 400X). C- Graph of percentage of crystals: moderate and intense percentage (2+3). Ag represents the groups of nanostructured bioglasses with silver in different concentrations, while the vertical bar represents the number of remaining crystals. Different letters indicate presence of statistical difference, detected ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test ( $p < 0.001$ ).



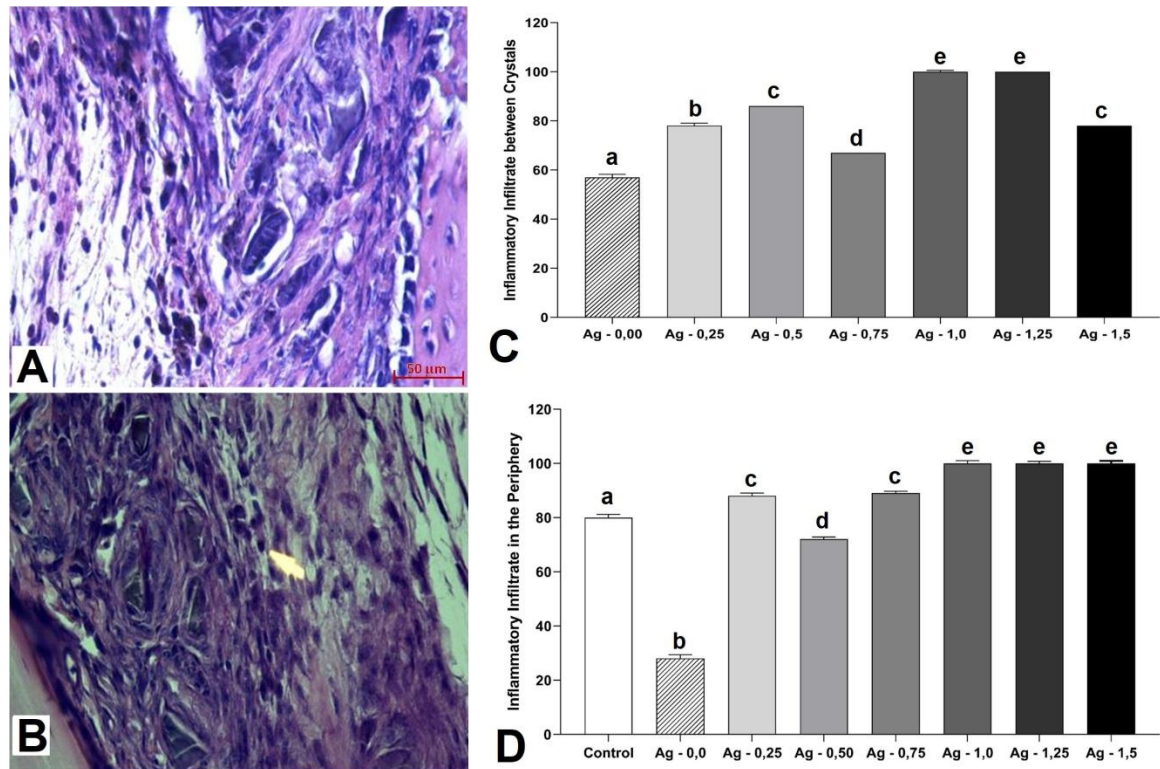


Figure 2: Histological sections and graphs of the percentage of inflammatory infiltrate. A- Underlying the bone, in the region of the bone defect, there is a slight permeation of mature lymphocytes (arrow) and dispersed crystals (Hematoxylin-eosin, 400X). B- Scattered mature lymphocytes (arrow) and crystals underlying the bone at the periphery of the bone defect (Hematoxylin-eosin, 400X). C- Graph showing the percentage of mild or absent inflammatory infiltrate between the crystals (0+1). D- Graph showing the percentage of mild or absent inflammatory infiltrate in the periphery of the bone defect (0+1). Different letters indicate presence of statistical difference. ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test ( $p < 0.001$ ).

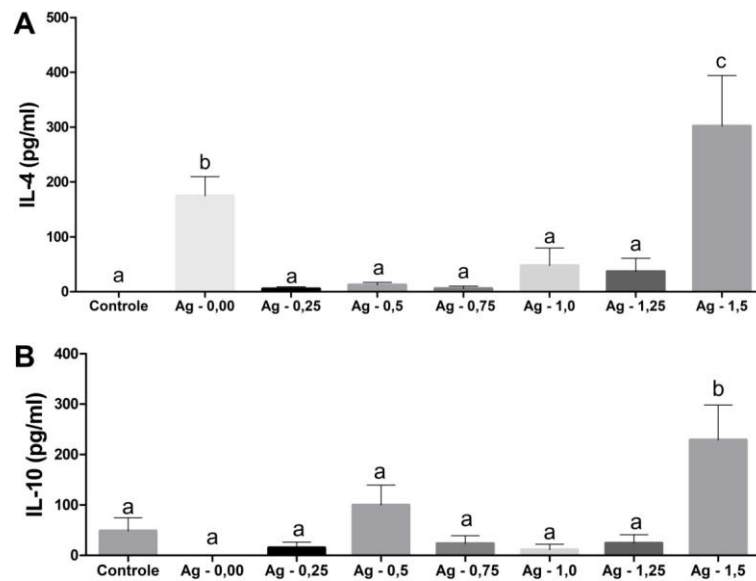


Figure 3: Concentration of anti-inflammatory cytokines, IL-4 (A) and IL-10 (B) in serum (plasma) of Wistar rats. Values represented as mean + standard error of mean. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test, where different letters represent a significant difference, with p value < 0.05.

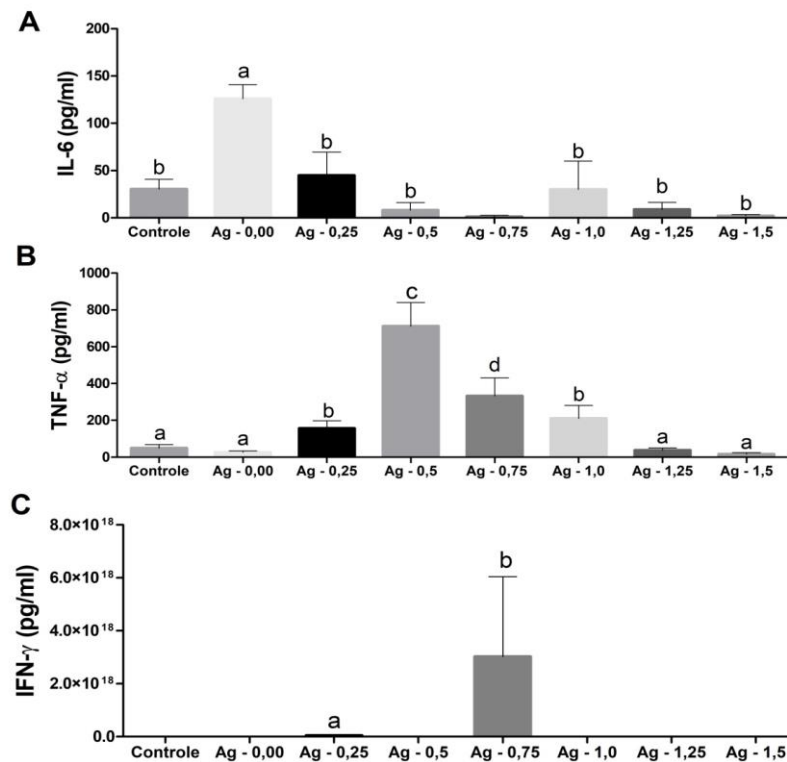


Figure 4: Concentration of the so-called pro-inflammatory cytokines, IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B) and IFN- $\gamma$  (C) in the serum (plasma) of Wistar rats. Values represented as mean + standard error of mean. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test, where different letters represent a significant difference, with p value < 0.05.

## APÊNDICE B - DADOS SUPLEMENTARES

Tabela 1: Dados Índice Kappa

Índice Kappa	Controle	Ag - 0,00	Ag - 0,25	Ag - 0,50	Ag - 0,75	Ag - 1,00	Ag - 1,25	Ag - 1,50
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Nº de Cristais Remanescentes	100,0	95,4	85,6	89,2	96,4	100	100	100
Infiltrado Inflamatório entre Cristais	100,0	100,0	92,8	100,0	96,4	100	96	100
Infiltrado Inflamatório na Periferia	100,0	90,8	96,4	100,0	100	100	100	100
<b>Média Geral</b>							<b>97,46 ± 4,07 %</b>	

Tabela 2: Intensidade do número cristais remanescentes

Nº de Cristais	Controle	Ag - 0,00	Ag - 0,25	Ag - 0,50	Ag - 0,75	Ag - 1,00	Ag - 1,25	Ag - 1,50
Remanescentes	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Intensidade - 0	100	0	0	14	0	14	0	0
Intensidade - 1	0	29	22	14	11	0	0	0
Intensidade - 2	0	29	56	30	44	70	37	44
Intensidade - 3	0	42	22	42	44	14	63	56

Tabela 3: Intensidade do número cristais remanescentes, somatória: leve e ausente (0 + 1) e moderado a intenso (2 + 3)

Nº de Cristais	Controle	Ag - 0,00	Ag - 0,25	Ag - 0,50	Ag - 0,75	Ag - 1,00	Ag - 1,25	Ag - 1,50
Remanescentes	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Intensidade (0 + 1)	100	29	22	28	11	14	0	0
Intensidade (2 + 3)	0	71	78	72	88	84	100	100

Tabela 4: Intensidade de infiltrado inflamatório no centro da lesão (entre cristais)

Infiltrado Inflamatório Entre Cristais	Controle	Ag - 0,00	Ag - 0,25	Ag - 0,50	Ag - 0,75	Ag - 1,00	Ag - 1,25	Ag - 1,50
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Intensidade - 0	100	14	33	0	0	14	0	0
Intensidade - 1	0	43	45	86	67	86	100	78
Intensidade - 2	0	43	11	14	33	0	0	22
Intensidade - 3	0	0	11	0	0	0	0	0

Tabela 5: Intensidade de infiltrado inflamatório no centro da lesão (entre cristais), somatória: leve e ausente (0 + 1) e moderado a intenso (2 + 3)

Infiltrado Inflamatório Entre Cristais	Controle	Ag - 0,00	Ag - 0,25	Ag - 0,50	Ag - 0,75	Ag - 1,00	Ag - 1,25	Ag - 1,50
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Intensidade (0 + 1)	100	57	78	86	67	100	100	78
Intensidade (2 + 3)	0	43	22	14	33	0	0	22

Tabela 6: Intensidade de infiltrado inflamatório na periferia da lesão

Infiltrado Inflamatório na Periferia	Controle	Ag - 0,00	Ag - 0,25	Ag - 0,50	Ag - 0,75	Ag - 1,00	Ag - 1,25	Ag - 1,50
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Intensidade - 0	40	0	45	58	22	43	25	66
Intensidade - 1	40	28	33	14	67	57	75	44
Intensidade - 2	20	58	0	28	11	0	0	0
Intensidade - 3	0	14	22	0	0	0	0	0

Tabela 7: Intensidade de infiltrado inflamatório na periferia lesão, somatória: leve e ausente (0 + 1) e moderado a intenso (2 + 3)

Infiltrado Inflamatório na Periferia	Controle	Ag - 0,00	Ag - 0,25	Ag - 0,50	Ag - 0,75	Ag - 1,00	Ag - 1,25	Ag - 1,50
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Intensidade (0 + 1)	80	28	88	72	89	100	100	100
Intensidade (2 + 3)	20	58	22	28	11	0	0	0

## APÊNDICE D - LISTA PARTICIPAÇÃO DE COAUTORES

Rafael Obata Trevisan<sup>2</sup>, ORCID: 0000-0002-4509-914

Paulo César Pio<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0002-0918-5414

Júlio César Tsukide<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0003-0972-1907

Malu Mateus Santo Obata<sup>2</sup>, ORCID: 0000-0002-6849-1702

Chamberttan Souza Desidério<sup>2</sup>, ORCID: 0000-0003-4399-0633

Odival Seabra<sup>3</sup>, ORCID: 0000-0002-0918-5414

Virmondes Rodrigues Junior<sup>4</sup>, ORCID: 0000-0001-8706-4223

Renata Margarida Etchebehere<sup>5</sup>, ORCID: 0000-0002-2241-5966

Carlo José Freire Oliveira<sup>6</sup>, ORCID: 0000-0003-2211-7333

Noelio Oliveira Dantas<sup>7</sup>, ORCID 0000-0001-6752-7382

Anielle Christine Almeida Silva<sup>7</sup>, ORCID: 0000-0002-5274-156X

Marcos Vinicius da Silva<sup>6</sup>; ID do ORCID: 0000-0002-2966-7621

Sanívia Aparecida de Lima Pereira<sup>8</sup>; ID do ORCID:0000-0002-0293-2587

Rodrigo César Rosa<sup>6</sup>, ORCID:0000-0003-3157-0826

<sup>2</sup> Doctoral Degree in Tropical Medicine and Infectology, Institute of Health Sciences, UFTM - Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

<sup>3</sup> Doctoral Degree in Physiological Sciences, Institute of Biological and Natural Sciences, UFTM - Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

<sup>4</sup> PhD, Full Professor, Institute of Biological and Natural Sciences, UFTM – Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil. PhD, Medical Pathologist, Institute of Health Sciences, UFTM - Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

<sup>5</sup>PhD, Associate Professor, Institute of Biological and Natural Sciences, UFTM Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

<sup>7</sup> PhD, Associate Professor, Laboratory of New Nanostructured and Functional Materials, Physics Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas Brazil

<sup>8</sup> PhD, Associate Professor, Laboratory of Cell and Molecular Biology, UNIUBE - University of Uberaba, Uberaba, MG, Brazil / Cefores, UFTM - Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

## ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

**Uniube**

Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-004/2021

Uberaba, 12 de julho de 2021.

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo n° 004/2021 relativos ao projeto intitulado **“Osteointegração e dinâmica da resposta imune de diferentes concentrações de íons prata e dióxido de titânio no sistema vítreo SNCP luminescente (2Eu) no reparo de lesão experimental de furca em molar e defeito ósseo na calvária de ratas”** que tem como responsável a **Profª. Sanívia Aparecida de Lima Pereira**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei n° 11.794/08.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol n° 004/2021 related to the project entitled **“Osteointegration and dynamics of the immune response of different concentrations of silver ions and titanium dioxide in the luminescent vitreous system SNCP (2eu) in the repair of experimental molar furcal lesion and bone defect in rat calvaria”** under the supervision of **Profª. Sanívia Aparecida de Lima Pereira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law n° 11.794/08.

Atenciosamente,

**Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**  
Coordenadora do CEEA-UNIUBE