



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

BARBARA RIBEIRO RIOS

**Análise do potencial do reparo ósseo através da
reconstrução de ressecções segmentares por meio da
associação de scaffolds de Polidioxanona ou Malha de
Titânio e rhBMP-2: Estudo *in vivo***

Araçatuba - SP
2022



BARBARA RIBEIRO RIOS

**Análise do potencial do reparo ósseo através da
reconstrução de ressecções segmentares por meio da
associação de scaffolds de Polidioxanona ou Malha de
Titânio e rhBMP-2: Estudo *in vivo***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani

Coorientador: Prof. Associado. Edilson Ervolino

Araçatuba - SP
2022

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R586a Rios, Barbara Ribeiro.
Análise do potencial do reparo ósseo através da reconstrução de ressecções segmentares por meio da associação de scaffolds de polidioxanona ou malha De titânio e rhBMP-2 : estudo in vivo / Barbara Ribeiro Rios. – Araçatuba, 2022
84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Polidioxanona 2. Proteína morfogenética óssea-2
3. Reconstrução mandibular I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

À minha família, com gratidão e respeito, pelo inesgotável incentivo, apoio incondicional e amor destinado a mim, não só durante a elaboração desse trabalho, como por toda vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba *Prof. Glauco Issamu Miyahara* e vice-diretor *Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem* pela estrutura, suporte técnico, intelectual e sobretudo pelo carinho e respeito pela formação dos alunos que por aqui passam. Me orgulho por ter concluído minha graduação e em breve, pós-graduação, em uma instituição tão humana e qualificada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador *Prof. Associado Wirley Gonçalves Assunção*.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do mestrado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela prontidão em nos atender e carinho.

Aos funcionários do Departamento de diagnóstico e Cirurgia (*Paulo Gratão, Renato e Marco*). Muito obrigado pelo carinho e respeito.

À empresa Plenum Bioengenharia na pessoa do *Prof. Dr. Jamil Awad Shibli* pelo fornecimento dos materiais teste e vasta assistência durante toda a execução do trabalho.

Ao instituto IPEN na pessoa do Prof. Dr. Paolo Bartolini pelo fornecimento do material osteoindutor e pela parceria que também contempla outras pesquisas do nosso grupo.

À instituição de fomento FAPESP Processo nº 2019/27237-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido através de bolsa de iniciação científica da aluna Stefany Barbosa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão da Bolsa de Mestrado durante o curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro durante o curso e com isso, permitir que fosse possível a realização do mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani nos agradecimentos do meu TCC disse o quanto te admiro e no dia da minha formatura te disse que é uma honra representar a minha sala te homenageando, hoje, após 2 anos trabalhando com você a gratidão só aumenta, pela paciência inabalável, pela oportunidade de aprender diariamente com sua vasta experiência clínica, acadêmica e científica que tanto engrandeceram minha trajetória até aqui, e por nos mostrar diariamente através de seu exemplo que quando se ama o que faz, o sucesso é uma certeza! Te admiro imensamente e tenho muito respeito pelo seu trabalho e sua história. Me sinto honrada por ser orientada por alguém tão grandioso e que tanto me inspira.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Edilson Ervolino pela disposição e atenção dedicada a mim durante o desenvolvimento da metodologia, realização das eutanásias e análises. Me sinto honrada por contar com seu conhecimento para a execução desse trabalho.

A professora Letícia Theodoro por prontamente aceitar participar da arguição deste estudo e por todo o auxílio prestado ao nosso grupo de pesquisa no desenvolvimento de outros projetos. Sua contribuição é de suma importância para aprimorar nossos trabalhos.

Ao Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada, professor querido, que antes mesmo de me conhecer se prontificou muito gentilmente a nos auxiliar com as alterações metodológicas do trabalho, sem poupar simpatia e disposição foi peça essencial para o sucesso do referido estudo, cedendo-nos as caixas para a suspensão dos animais, orientando os cuidados necessários para manutenção dos mesmos e nos oferecendo inúmeras alternativas para as análises imagiológicas, contornando adversidades como a pandemia e quebra de equipamentos, Toda a viabilização do desenho experimental desse trabalho se deve a ele. Sou profundamente grata.

Aos professores *Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Profa. Dra. Alessandra Aranega, Osvaldo Magro Filho, Francisley Ávila de Souza, Idelmo Rangel Garcia Júnior, Daniela Ponzoni*, por tantos ensinamentos clínicos durante os ambulatórios, clínicas da graduação, clínica PET e atendimentos no CAOÉ. Sou imensamente grata pela oportunidade de aprender com vocês.

Ao meu professor de especialização *Prof. Dr. Edgard Franco de Moraes* por acreditar no meu potencial, por todo incentivo e ensinamentos clínicos que engrandecem ainda mais minha vivência cirúrgica. Você é minha inspiração! Cirurgião impecável; atencioso com seus pacientes, ético e exímio docente. Você consegue o equilíbrio entre amizade e profissionalismo, cobrança e respeito, atenção e liberdade! Sou imensamente grata pela oportunidade de aprender com alguém grandioso como você e espero um dia ser um terço do profissional que é, através de tudo que me ensina.

Aos colegas de pós-graduação: *João Matheus Fonseca e Santos, Mirela Caroline, Anderson Maikon de Souza Santos, Tiburtino José de Lima Neto, Eduardo Dallazen, Mateus Pavelski, Leonardo Alan Delanora, Winicius Arildo Ferreira Araújo*, muito obrigada pelo companheirismo e pela troca de experiência, é muito enriquecedor dividir a minha formação com pessoas tão especiais.

Aos alunos de iniciação científica *Maria Eloise Simon, Gabriela Baccaro, Larissa Campos, Letycia Carpaneji, Milenni Buzo, Monique Gonçalves, Nathalia Pereira, Victor Sachi, Rafaela Stuque, Iago Guerra, Gustavo Ribeiro* vocês nos enchem de orgulho diariamente pela seriedade e comprometimento com os trabalhos e pacientes. Não sei agradecer o quanto me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho. Nada, absolutamente nada, disso teria saído do papel sem o trabalho de vocês, a responsabilidade com que cuidam dos nossos animais, dos materiais para as nossas cirurgias, a assistência e carinho que oferecem aos nossos pacientes no pós-operatório, no capricho e empenho que executam qualquer tarefa que confiamos a vocês. Eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus pela vida, saúde, por ter me amparado nos momentos de angústia, me concedido coragem para enfrentar minhas limitações e sobretudo pelas inúmeras bênçãos a mim concedidas: pelas oportunidades e gratos encontros com pessoas ímpares que trilharam comigo o caminho até aqui, permitindo a conclusão desse trabalho.

Aos meus pais e irmão: *Tânia Cristina Duchatsch Ribeiro da Silva, Marcos Rios da Silva e Gustavo Ribeiro Rios* tudo por vocês! São minha fortaleza, minhas origens, minha motivação e todo o meu amor. Sou infinitamente grata pelo privilégio de ter uma família tão sensacional... Pai e mãe, a 25 anos vocês abrem mão de tanto por nós, para investir nos estudos, para nos educar da melhor maneira possível nos transmitindo bons princípios, com todo amor, atenção e respeito... só cheguei até aqui por vocês e farei minha parte para ir mais além, para honrar todo o esforço dedicado a mim! Cresci com exemplos lindos de força, honestidade, paciência e determinação, e espero me tornar metade do que vocês são. Irmão, você é a minha motivação para, diariamente, tentar me tornar alguém melhor, assumi essa responsabilidade quando me tornei irmã mais velha, e me surpreendi muito com esse papel; é você quem me ensina, me inspira e me incentiva. Não me canso de dizer que é lindo te ver crescer, te ver fazendo escolhas, trilhando seus próprios caminhos e não tenho dúvidas do quanto será feliz através deles. Guardo no coração o refrão da música que marcou minha formatura “ Son in life you're gonna go far, if you do it right, you'll love where you are. Just know that wherever you go, you can always come home”. Sou extremamente feliz por amar o que faço, e ainda mais feliz por ir atrás de um sonho, tendo um lar e vocês me esperando chegar. Meu amor por vocês é além dessa vida e só sou, porque vocês são!

Aos demais membros da minha família: *Geraldo Ribeiro, Mario Gonçalves e Guilherme Donizetti – in memoriam, Marta Duchatsch, Patrícia Duchatsch, Mauro Souza, Francine Duchatsch, Caroline Duchatsch, Victor Ito, Luzia Rios, Simone Rios, Vinicius Zotto, Bruna Rios, Beatriz Rios, Márcia Rios, Frederico Santarosa, Thiago Rios, Diego Rios, Paula Coelho, Isabella Rios, Otávio Rios.* Vocês representam a minha história, minhas raízes. Mesmo de longe exercem papel essencial na minha

vida, me oferecendo amor e incentivo. Apesar dos 200km que nos separa a 7 anos, meu amor por vocês é imenso e me dói demais não estar por perto para ver os primos construindo suas famílias, as avós envelhecendo, as tias se tornando avós e tantas outras etapas da vida. A pandemia nos tirou muito, restringiu nosso contato, nos tirou o toque, o abraço, mas nada disso se compara a dor que nos causou tirando o nosso Guilherme, minha garganta embarga toda vez que penso na injustiça que é ver alguém tão jovem partir, parte de mim não vê mais alegria em comemorar aniversário, por não ter mais você pra brigar comigo pelo miolo do bolo, a páscoa perdeu o brilho, desde que você se foi, os natais e anos novos jamais serão os mesmos, sem a sua alegria e toda vez que me vejo comemorando alguma conquista, me lembro do tanto de vida que você ainda tinha pela frente e as lágrimas me consomem. Seguimos daqui, juntando os pedaços e buscando aceitação na sua partida, confiando nos planos de Deus, e tendo a certeza de que foi amparado pelos nossos anjinhos que já moravam no céu: vô Geraldo, vô Mário e muitos outros espíritos de luz.

Ao meu namorado Gustavo Antonio Correa Momesso te gosto e te admiro desde quando éramos só bons amigos, sempre foi meu colo, minha melhor companhia, parceiro para absolutamente toda hora: do trabalho exaustivo, aos dias de cerveja e risada até a barriga doer. Obrigada por me incentivar, incansavelmente, a me dedicar a pós-graduação, a valorizar nossa formação, a correr atrás dos meus sonhos... obrigada por acreditar no meu trabalho e potencial, pelas oportunidades, por tornar essa fase mais leve e prazerosa e por me ensinar tanto, sobre odontologia e ainda mais sobre companheirismo, te amo.

À minha amiga e aluna de iniciação científica Stefany Barbosa, de longe a pessoa mais dedicada que eu conheço, só tenho a te agradecer por toda a ajuda nesse projeto, não sei o que seria de mim, sem você... se desdobrou em mil, trabalhou com tanto capricho que o resultado não poderia ser diferente, foi aprovada no mestrado e agora também comemoramos sua bolsa Fapesp e vai chegar muito mais longe. Também sou muito grata pela amizade que estamos construindo, sua presença no departamento tornou a rotina muito mais leve e agradável, obrigada por me ouvir, me ajudar e me aconselhar. Que possamos estreitar ainda mais esse laço e compartilhar muitas outras comemorações nos próximos anos. Você é especial.

Ao meu amigo e colega de pós-graduação *William Phillip Pereira da Silva*, como costumamos brincar: o responsável por arruinar a minha vida ou salva-la, depende do ponto de vista hahaha, brincadeiras à parte, minha mãe sempre me disse que fica surpresa de ver como Deus é tão cuidadoso em selecionar as pessoas que cruzam meu caminho e inclusive o momento exato em que isso acontece e você foi uma delas. Nos conhecemos da maneira mais inusitada possível, e um dia, poucos meses antes da minha formatura, me vi num café, contando meus planos para alguém que eu pouco convivia, e em trinta minutos de conversa, meus planos eram outros! Obrigada por isso, essa conversa me trouxe até aqui, e que experiência louca você me meteu... confesso que quando me via escrevendo 50 prontuários, dirigindo com 30 ratos no banco do carro ou acordando pela Terceira vez na madrugada para atender um chamado no hospital, eu questioneei se deveria mesmo ter tomado aquele café que mudou o rumo da minha vida, mas não posso negar que aquela escolha me trouxe muita vivência, muitas oportunidades e extremo aprendizado. Além disso, ganhei um amigão, para toda hora, para me ouvir chorar, para decifrar meus mistérios de um jeito bem sagaz, para me contar boas fofocas e para fazer a melhor gin tônica que já tomei. Obrigada por tanto!

Aos meus amigos *Lourenço Vieira Tereza Canevari e Hiskell Francine Fernandes e Oliveira* meus fieis amigos desde a graduação e que permaneceram parte da minha rotina no mestrado. Estiveram ao meu lado por 5 longos anos, vivendo o pior e o melhor da faculdade e agora o pior e o melhor da pós-graduação. Vejo vocês como irmãos e fico com o coração cheio de orgulho de vê-los buscando mais conhecimento sobre si próprio, melhorando a cada dia sua relação consigo e com as outras pessoas, buscando desenvolvimento profissional e mantendo sempre suas essências. São pessoas que tenho profunda admiração e respeito e que torço genuinamente pelo sucesso e felicidade! Amo vocês.

Ao meu cachorro Snoppy você escolheu o dia da minha defesa para ir morar com o papai do céu e apesar da dor horrível que senti te vendo partir, só posso ser grata pela oportunidade de dar um último cheiro e por ser agraciada durante 13 anos com esse amor tão puro! Você vive em mim, meu menininho, jamais me esquecerei do seu amor.

"Resiliência, inventividade e sobrevivência refletem qualidades que emanam primeiro daqueles que lutam contra as doenças e só então espelham aqueles que as tratam."

- Siddhartha Mukherjee

Rios BR. Análise do potencial do reparo ósseo através da reconstrução de ressecções segmentares por meio da associação de scaffolds de Polidioxanona ou Malha de Titânio e rhBMP-2: Estudo *in vivo* [dissertação]. Aracatuba: Universidade Estadual Paulista; 2022.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar o potencial bioativo de um “scaffold” de Polidioxanona (PDO) com associação da rhBMP-2, nas reconstruções após simulação de ressecção óssea em fêmures de ratos. Para tanto, 24 ratos, machos, adultos, com 6 meses de idade, foram submetidos a ressecção e reconstrução dos fêmures bilateralmente. Inicialmente foi realizada a estabilização com fixação de placas e parafusos de titânio do sistema 1.5mm e em seguida a confecção de um “gap” de 2mm. A reconstrução foi realizada com rhBMP-2 (Infuse) carregada em esponja de colágeno (3,25 µg), tendo uma malha de titânio, para o grupo Titânio (n=24 fêmures) (grupo controle), atuando como um arcabouço. E para o grupo PDO (n=24 fêmures) (grupo teste), a reconstrução foi realizada também com a rhBMP-2 carregada em uma esponja de colágeno (3,25 µg), envolvido por um “scaffold” de PDO. Desses animais, 16 (2 por tempo) receberam em seu dorso, no plano subcutâneo, um fragmento do mesmo material testado em seu fêmur, para análise de biocompatibilidade, que foram removidos sob anestesia local, junto de fragmento do tecido subcutâneo adjacente, aos 3, 5, 7 e 10 dias para análise. Os animais foram submetidos à eutanásia (n=6 por grupo) nos períodos de 14 e 60 dias após a cirurgia de reconstrução tiveram seus órgãos de metabolização (cérebro, rim, fígado e músculo) removidos para análise anatomopatológica e seus fêmures também foram removidos, reduzidos, radiografados para análise da densitometria radiográfica posteriormente os fêmures passaram por descalcificação e em seguida todas as peças foram submetidas ao processamento para obtenção de lâminas com cortes de 5 µm de espessura, para avaliação histológica, com avaliação da área óssea neoformada e perfil inflamatório e para análise imunohistoquímica através das proteínas Runx2, OPG, RANKL, OCN e BMP2. Todos os dados quantitativos foram submetidos ao teste ANOVA-2 fatores e quando $p < 0,05$, o pós-teste Tukey foi realizado. Os resultados da densitometria radiográfica demonstraram maior densidade para o grupo PDO, especialmente no período de 14 dias ($p < 0,05$). Na análise histológica observou-se reparo mais favorável para o grupo PDO,

especialmente aos 60 dias quando comparado ao Titânio, com diferença estatística significativa ($p = 0.002$) bem como menor infiltrado inflamatório e maior número de vasos sanguíneos aos 14 dias. Com relação as imunomarcações, BMP-2 não apresentou marcações para Titânio e dados expressivos para PDO, com diferença significativamente estatística aos 60 dias ($p < 0.05$). OPG e RANKL mostraram maior marcação para titânio, principalmente aos 60 dias ($p < 0.05$). Já Runx2 e OCN apresentaram resultados superiores para PDO aos 14 dias, entretanto, aos 60 dias titânio demonstrou maior expressão. A análise de biocompatibilidade mostrou maior processo inflamatório para o grupo titânio. Os órgãos de metabolização apresentaram aspectos de higidez dentro da normalidade para ambos grupos. Os resultados deste trabalho demonstram um padrão reparacional mais favorável à associação do “Scaffold” de PDO com a rhBMP-2, quando comparado a reconstrução com malha de titânio.

Palavras-chave: Polidioxanona. Proteína morfogenética óssea-2. Reconstrução óssea.

Rios BR. Bone potential analysis through segmental resection reconstruction using Polydioxanone or Titanium Mesh scaffolds and rhBMP-2: In vivo study [dissertação]. Aracatuba: Universidade Estadual Paulista; 2022.

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the bioactive potential of a Polydioxanone (PDO) scaffold with rhBMP-2 association, in reconstructions after simulating bone resection in rat femurs. Therefore, 24 male, adult rats, aged 6 months, underwent resection and reconstruction of the femurs bilaterally. Initially, stabilization was performed with fixation of titanium plates and screws of the 1.5mm system and then a 2mm gap was created. The reconstruction was performed with rhBMP-2 (Infuse) loaded in a collagen sponge (3.25 µg), with a titanium mesh, for the Titanium group (n=24 femurs) (control group), acting as a scaffold. And for the PDO group (n=24 femurs) (test group), the reconstruction was also performed with rhBMP-2 carried in a collagen sponge (3.25 µg), surrounded by a PDO scaffold. Of these animals, 16 (2 per time) received on their back, in the subcutaneous plane, a fragment of the same material tested in their femur, for biocompatibility analysis, which was removed under local anesthesia, together with a fragment of the adjacent subcutaneous tissue, at 3, 5, 7 and 10 days for analysis. The animals were euthanized (n=6 per group) in the periods of 14 and 60 days after the reconstruction surgery, had their metabolizing organs (brain, kidney, liver, and muscle) removed for anatomopathological analysis and their femurs were also removed, reduced, radiographed for analysis of radiographic densitometry later the femurs underwent decalcification and then all the pieces were submitted to processing to obtain 5 µm thick slices for histological evaluation, with the evaluation of the newly formed bone area and inflammatory profile and for immunohistochemical analysis through Runx2, OPG, RANKL, OCN, and BMP2 proteins. All quantitative data were submitted to the 2-way ANOVA test and when $p < 0.05$, the Tukey post-test was performed. The results of radiographic densitometry showed higher density for the PDO group, especially in the 14-day period ($p < 0.05$). In the histological analysis, a more favorable repair was observed for the PDO group, especially at 60 days when compared to Titanium, with a statistically significant difference ($p = 0.002$), as well as a lower inflammatory, infiltrate and a

greater number of blood vessels at 14 days. Regarding immunostaining, BMP-2 did not show staining for Titanium and expressive data for PDO, with a statistically significant difference at 60 days ($p < 0.05$). OPG and RANKL showed higher staining for titanium, mainly at 60 days ($p < 0.05$). On the other hand, Runx2 and OCN showed superior results for PDO at 14 days, however, at 60 days titanium showed greater expression. The biocompatibility analysis showed a greater inflammatory process for the titanium group. The metabolizing organs presented aspects of health within the normal range for both groups. The results of this work demonstrate a more favorable repair pattern for the association of the PDO scaffold with rhBMP-2, when compared to reconstruction with titanium mesh.

Keywords: Polydioxanone. Bone morphogenetic protein-2. Bone reconstruction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desenho explicativo do número da amostra mediante a cirurgia bilateral	29
FIGURA 2 – Imagem representativa da fixação femoral com placa 1.5, parafusos bicorticais e confecção de gap de 2mm.....	31
FIGURA 3 – Etapas do procedimento cirúrgico de ressecção e reconstrução. (A) Exposição da porção lateral do fêmur. (B) Fêmur sendo fixado por mini placa e parafusos do sistema 1,5mm (C) realização da osteotomia com serra circular para marcação das extremidades do “gap”. (D) Paquímetro com marcação de 2mm para o “gap” (E) Defeito preenchido pela esponja com rhBMP-2 (3,25 µg) e malha de titânio posicionada para envolver a região de ressecção. (F) Defeito preenchido pela esponja com rhBMP-2 (3,25 µg) e scaffold de PDO posicionada para envolver a região de ressecção. (G) Aspecto final da estabilização da malha de Ti ao redor do defeito. (H) Aspecto final da estabilização do scaffold de PDO ao redor do defeito.....	33
FIGURA 4 – Imagem ilustrativa após a realização do “GAP”. A) Fêmur com a demarcação em vermelho da área de interesse. B) Fixação da placa e parafusos antes da remoção do fragmento ósseo. C) Confecção do “GAP” de 2 mm. D) Área de aplicação da esponja de colágeno carregada com Infuse (Grupos Titânio ou PDO). E) Estabilização e manutenção dos enxertos, com a malha de titânio ou PDO como arcabouço.....	34
FIGURA 5 – Imagem ilustrativa do modelo de suspensão dos animais pela cauda, realizado através de fita de knesio tape fixada com esparadrapo, presa a alça móvel ao teto da caixa.....	35
FIGURA 6 – Imagem representativa de fêmur coletado após eutanásia. Exemplar correspondente ao grupo PDO com 14 dias de pós-operatório, demonstrando integridade do “Scaffold” de PDO e ausência de alterações teciduais visíveis a olho nu.....	36
FIGURA 7 – Radiografia antes (A) e após anexar a imagem radiográfica da cunha de alumínio (B)	38
FIGURA 8 – Comandos do programa computacional ODR – ATA. (A) Local de seleção da imagem radiográfica em formato PNG; (B) Seleção da cunha com parâmetros pré-determinados; (C) Ferramenta “Drawing” para esquadramento e	

imagem representativa dos respectivos pinceis para seleção da região de cunha e para seleção da região de interesse no tecido ósseo	38
FIGURA 9 – Visão geral do programa ODR – ATA, representando a área de interesse selecionada (quadrado em amarelo) e o simulador tridimensional gerado a partir desta seleção.....	39
FIGURA 10 - Imagem representativa da mensuração de tecido ósseo neoformado, em uma fotomicrografia com objetiva de 2.5x, por meio do software Image J. Observa-se uma área óssea selecionada (amarelo) por meio da ferramenta “Free hands”(vermelho).....	41
FIGURA 11 - Imagem representativa da metodologia de contagem de células inflamatórias, com ênfase em linfócitos, e dos vasos sanguíneos. Foram utilizadas fotomicrografias realizadas em objetiva de 100X, em três diferentes áreas do defeito ósseo e no software Image J, utilizou-se as ferramentas “Grid” e “Cell Counter Notice”.....	42
FIGURA 12 – Imagem representativa da metodologia utilizada para análise imunohistoquímica. Foram realizadas capturas em objetiva de 100x, em três diferentes áreas do defeito e no software Image J utilizou-se as ferramentas “Grid” no tipo “Crosses” e a ferramenta “Cell Counter Notice”.....	44
FIGURA 13 - Imagem ilustrativa de coleção purulenta evidenciando infecção em fêmur do grupo Titânio.....	47
FIGURA 14 - Representação gráfica dos resultados de densitometria radiográfica, em mmAl, evidenciando uma maior densidade óssea para o grupo PDO, com diferença significativamente estatística aos 14 dias de pós-operatório *(P<0,001).....	48
FIGURA 15 - Imagens obtidas por meio do” Simulador tridimensional do objeto de estudo”, ferramenta do programa computacional ODR- ATA, demonstrando tendência do grupo PDO para formação de uma ponte de tecido ósseo já aos 14 dias e finalização desta formação aos 60 dias pós-operatório, facilitando a visualização do resultado gráfico.....	49
FIGURA 16 - Representação gráfica dos resultados de área de tecido ósseo neoformado. Evidenciou-se reparo ósseo superior para o grupo PDO, especialmente	

no período de 60 dias, onde houve diferença significativamente estatística *(P=0,016)	50
FIGURA 17 - Imagens representativas da área de tecido ósseo neoformado, demonstrando maior área para os grupos PDO. As setas em vermelho representam o Scaffold de PDO e sua absorção gradativa nos diferentes tempos.....	51
FIGURA 18 – Imagem em aumento de 40x demonstrando maior maturação e organização tecidual para o grupo PDO, em ambos os períodos.....	52
FIGURA 19 - Representação gráfica do perfil inflamatório presente nos grupos experimentais. O perfil traçado por meio da contagem de células inflamatórias, principalmente de linfócitos, demonstrou que houve maior infiltrado inflamatório para o grupo Titânio nos períodos de 14 e 60 dias sem diferença estatística	53
FIGURA 20 – Imagens representativa da contagem de células inflamatórias. Durante a contagem, a prioridade de marcação foram os linfócitos (setas pretas). Imagens realizadas em objetiva de 100x.....	54
FIGURA 21 - Número de vasos sanguíneos, demonstrando melhores resultados para o grupo PDO, especialmente no período de 14 dias sem diferença estatística.....	55
FIGURA 22 - Fotomicrografias representativas do número de vasos sanguíneos, por meio de uma objetiva de 100x. Observa-se que aos 14 dias, a imagem representativa do grupo PDO apresenta o dobro de vasos do que o grupo Titânio.....	56
FIGURA 23 – Imagens representativas das marcações pela imunistoquímica, demonstrando o padrão de marcação para os grupos experimentais, em 14 e 60 dias as imunomarcações são representadas pela coloração amarronzadas nas células e tecidos.....	57
FIGURA 24 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para bmp-2, em células e matriz extracelular, demonstrando que não houve marcação para o grupo titânio, enquanto que para PDO ocorreu, inclusive com diferença estatística aos 60 dias *(p=0,014).....	58

FIGURA 25 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para RUNX2, em células e matriz extracelular, para os grupos titânio e PDO, nos períodos de 14 e 60 dias sem diferença estatística.....	59
FIGURA 26 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para OCN, em células e matriz extracelular, para os grupos titânio e PDO, nos períodos de 14 e 60 dias sem diferença estatística.....	60
FIGURA 27 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para RANK-L, em células ósseas, para os grupos titânio e PDO, nos períodos de 14 e 60 dias sem diferença estatística.....	61
FIGURA 28 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para OPG, em células ósseas, para os grupos experimentais, demonstrando marcação mais acentuada para o grupo titânio no período de 60 dias *($p < 0,001$)	62
FIGURA 29 - Figuras representativas dos órgãos de absorção e metabolização dos grupos PDO e Malha – Objetiva de 40x.....	63
FIGURA 30 - Representação gráfica da média do número de células inflamatórias no tecido subcutâneo no tempo de 3, 5, 7 e 10 dias.....	65
FIGURA 31 - Representação gráfica da média do número de vasos sanguíneos no tecido subcutâneo no tempo de 3, 5, 7 e 10 dias.....	66
FIGURA 32 – Figura representativa dos espécimes de tecido subcutâneo demonstrando a biocompatibilidade dos materiais testados aos 3, 5, 7 e 10 dias em um aumento de 100x onde é possível observar infiltrado inflamatório (setas amarelas) e número de vasos sanguíneos (setas vermelhas).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP Proteínas morfogenéticas ósseas
rhBMP-2 Proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 (Infuse)
COBEA Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA Food and Drug Administration
HE Hematoxilina e eosina
OC Osteocalcina
OPG Osteoprotegerina
PDO Polidioxanona
PVPI Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante
RANKL Receptor ativador do fator nuclear kapa B ligante
RhBMP-2 Proteína morfogenética óssea recombinante humana 2
Ti Titânio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Fornecimento dos Materiais	27
3.1.1 Fornecimento e utilização da rhBMP-2.....	27
3.1.2 Fornecimento e síntese das membranas de Polidioxanona	27
3.2 Desenho experimental: animais	28
3.3 Simulação da ressecção e reconstrução óssea	30
3.4 Suspensão pela cauda.....	34
3.5 Eutanásia	36
3.6 Análises.....	36
3.6.1 Análise clínica	36
3.6.2 Análise com tecidos calcificados	37
3.6.2.1 Radiografia.....	37
3.6.2.2 Análise da densitometria radiográfica por meio do programa computacional ODR-ATA	37
3.6.3 Análises com tecidos descalcificados	40
3.6.3.1 Análise histológica.....	40
3.6.3.2 Análise Imunoistoquímica.....	43
3.6.4 Biópsia de órgãos de absorção e metabolização	45
3.6.4. Análise subcutânea	46
3.6.4.1. Análise de biocompatibilidade.....	46
3.7 Análise estatística	47
4. RESULTADOS.....	48
4.1 Avaliação clínica.....	48
4.2 Análise com tecidos calcificados	48
4.2.1 Análise da densitometria radiográfica por meio do programa computacional ODR-ATA.....	48
4.3 Análise com tecidos descalcificados	50
4.3.1 Análise histológica.....	50
4.3.1.1 Área de tecido ósseo neoformado	50
4.3.1.2 Perfil inflamatório.....	53

4.3.2 Análise Imunoistoquímica	57
4.4 Biópsia de órgãos de absorção e metabolização	63
4.4 Análise subcutânea	64
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

As reconstruções de grandes defeitos ósseos apresentam-se como um desafio médico e odontológico devido a morbidade e desconforto que gera ao paciente, bem com sua dificuldade de execução. Esses defeitos podem ser advindos de anomalias congênitas como as fendas palatinas, necrose devido irradiação ou associada ao uso de medicações, malignidades orais, tumores, infecções ou até mesmo lesões traumáticas ou por arma de fogo. Portanto os procedimentos cirúrgicos de reconstrução se incumbem de reestabelecer a estética facial, proporcionar a regeneração óssea no local apropriado e que essa atinja suficiente qualidade para que seja possível suportar implantes garantindo que a restauração final tenha funcionalidade além de manter o tecido circundante e sua vascularização.(1, 2)

O enxerto autógeno é eleito como padrão ouro para regenerações ósseas pois oferece potencial de fornecer células osteoprogenitoras que com o estímulo osteoindutivo adequado, elas podem mediar a reparação óssea alveolar e podem ser colhidas do próprio paciente de regiões como crista ilíaca, sínfise, calvária entre outras.(3) Porém a necessidade de intervir em um segundo sítio cirúrgico oferece algumas desvantagens a essa técnica como por exemplo a limitação de disponibilidade de área doadora, além disso é uma intervenção invasiva, causam morbidades ao local doador incluindo dor, hemorragia, risco de infecção, inadequada regeneração óssea, fratura óssea secundária, parestesia, dificuldades clínicas e defeitos de contorno ósseo.(4) Além disso, um dos maiores desafios são as reconstruções de maior magnitude que os enxertos mesmos autógenos na forma “livre” sem pedículo vascular são limitantes nos defeitos lineares extensos. Adicionalmente, mesmo tendo bons resultados na forma microvascularizada, além da grande morbidade, a necessidade de uma grande equipe de cirurgiões especializados são fatores dificultadores para os autoenxertos.(5-7)

Diante disso, a engenharia tecidual tem se dedicado para apresentar estratégias alternativas ao enxerto autógeno, mas que também favoreçam a formação óssea, como por exemplo a combinação de biomateriais (arcabouços biodegradáveis) com moléculas biológicas (fatores de crescimento).(8)

Sabe-se que para que haja uma consolidação de uma fratura óssea bem-sucedida é necessário que se estabeleça um equilíbrio das condições mecânicas e

biológicas(9) pois o tecido ósseo sofre remodelação contínua para garantir a manutenção global do volume ósseo, forma e sua integridade estrutural e para isso suas atividades metabólicas são reguladas por múltiplos fatores locais e sistêmicos que controlam a atividade celular e dependem do fornecimento de oxigênio, nutrientes, hormônios, citocinas e células precursoras que advêm da vascularização.(1) Durante a reparação óssea normal, células osteoprogenitoras oriundas das células estaminais mesenquimais, se diferenciam em osteoblastos produzindo osteócitos (matriz óssea) e a mineralização dessa matriz ao longo do tempo resulta na formação de osso lamelar.(10) Em defeitos ósseos de tamanho crítico há poucas células osteoprogenitoras, dessa forma há uma redução do estímulo à regeneração óssea fazendo-se necessário suplementar o material de preenchimento com células osteoprogenitoras. Nesse caso utiliza-se muito os fatores de crescimento pois além de apresentarem propriedades específicas, espera-se que promovam a angiogênese e osteogênese, através do estímulo das atividades celulares, como adesão, proliferação, diferenciação e expressão gênica. (9,10)

Dentro desse contexto contamos com um importante fator de crescimento do grupo das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) que a partir da técnica de clonagem do DNA, tornou-se possível sintetizar BMPs recombinantes, sendo que a única aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) é a chamada Proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 (rhBMP-2) disponível no mercado como Infuse®, da empresa Medtronic (Minneapolis, MN, EUA).(11-14) Essas também estão presentes na fisiologia natural e desempenham atividades como angiogênese, apoptose celular, inflamação e osteogênese. É eleito o fator osteogênico com melhor capacidade de formação de osso trabecular e remodelação óssea lamelar pois cumpre todas as propriedades esperadas de um fator de crescimento atuando especificamente na linhagem de células responsáveis pela remodelação óssea e é indicado para reconstruções de fratura fechada de tíbia, fusão vertebral, aumento do rebordo alveolar e elevação do seio maxilar.(15) Por isso seu uso no tratamento de defeitos ósseos tem sido amplamente explorado já oferecem propriedades osteoindutoras semelhantes às do enxerto autógeno, porém dispensando a necessidade de um segundo sítio cirúrgico para a coleta do enxerto, reduzindo da morbidade presente nessa modalidade cirúrgica, redução em estadia hospitalar e conseqüentemente uma redução no custo do tratamento.(4, 5)

Porém a rhBMP-2 tem meia-vida curta e liberação rápida quando aplicada diretamente na área do defeito ósseo, isso porque atua estimulando o circuito de retroalimentação atuando dentro de 24 a 48 horas e posteriormente será eliminado do organismo e de forma com que este responda induzindo a produção de mais fatores de crescimento endógeno(15) e acarrete a formação e cicatrização do tecido ósseo.

Para suprir essa deficiência é realizado o carreamento da rhBMP-2 em uma esponja de colágeno absorvível, que apresenta uma forma estrutural semelhante a um favo de mel, o que proporciona uma melhor absorção do fator de crescimento e penetração das células osteoprogenitoras em sua superfície(16) e deve ser quebrada em partes menores para que seja misturada com o material do enxerto e com isso tenha melhor distribuição da sua ação(5, 17) além de ser considerada como o transportador ouro para moléculas de BMP já que prolonga sua meia-vida(10, 18) apresenta taxas previsíveis de reabsorção e liberação de proteína, ser versátil, biocompatível e ter baixa imunogenicidade.

Sua principal desvantagem é não ter propriedades adequadas para manutenção mecânica e do espaço podendo se deformar com facilidade quando submetida a pressão, pois não apresenta rigidez o que pode ser prejudicial em cirurgias craniomaxilofaciais já que é incapaz de manter o volume, estabilizar o coágulo sanguíneo e bloquear a infiltração de tecidos moles(19) já que a pressão das bordas da ferida tendem a entrar em colapso na zona de regeneração.(20)

A malha de titânio mostrou-se ideal para suprir tal dificuldade, atuando como um guia para a formação do tecido ósseo, pois sua rigidez garante que não ocorra colapso do espaço e evita invasão e compressão pelos tecidos moles na região do enxerto, além de ser inerte e apresentar propriedades aloplásticas, possuir alta biocompatibilidade e uma superfície lisa que impede a adesão de bactérias.(21)

A associação de malha de titânio com esponja de colágeno impregnada com rhBMP-2 têm demonstrado bons resultados para reparação óssea tanto em modelos experimentais animais, quanto em humanos.(19, 22) Porém sua principal desvantagem é apresentar um histórico de alta taxa de deiscência precoce e exposição do enxerto na cavidade oral,(23) o que pode levar a uma infecção e conseqüentemente o insucesso do enxerto ósseo, além de apresentar a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para a remoção da malha de titânio.(5)

Atualmente, novas alternativas de reconstruções com biomateriais reabsorvíveis tem sido alvo de pesquisas com o intuito de reduzir complicações e a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, como realizada na utilização das malhas de titânio.(5) A vantagem de optar por um dispositivo biodegradável é que ele não necessita de uma segunda cirurgia para sua remoção, o que diminui o número de visitas hospitalares do paciente assim como o tempo de internação e os custos cirúrgicos, além disso esses dispositivos tendem a evitar uma resposta imune a longo prazo.(24) A engenharia tecidual busca constantemente o desenvolvimento de biomateriais para esta finalidade que seja de fácil manipulação, lenta degradação e com resistência suficiente para garantir a reconstituição tridimensional destes defeitos e permitir a reabilitação com implantes osseointegráveis.

Nesse contexto, uma opção que vem sendo destacada nas reconstruções ósseas é a membrana de polidioxanona (PDO). A PDO é um polímero incolor, cristalino e biodegradável, biocompatível não antigênico e não pirogênico e induz a mínima reação no tecido durante sua absorção(24) apresentado no mercado inicialmente como material para sutura, e após sendo disponibilizado com conformação de tela/membrana em diferentes espessuras, com ou sem perfuração. As membranas de PDO podem ser utilizados em tecido ósseo e cartilagem e a sua degradação ocorre por meio de hidrólise, que se inicia após 10 semanas da instalação e é finalizada após 25 semanas, sem produzir metabólitos que danifiquem os tecidos circulantes e sem causar reação inflamatória de corpo estranho.(25, 26)

Essas membranas são amplamente utilizados em procedimentos envolvendo a cartilagem nasal, servindo como arcabouço e estabilizador em septorrinoplastias extracorpóreas, septoplastia endonasal reparo de perfuração septal e enxertos de extensão septal.(26) Além da boa ação em cartilagens, tal polímero caracteriza um bom meio auxiliar na regeneração do tecido ósseo, devido a sua flexibilidade, baixa toxicidade de seus produtos de degradação e um período de biodegradação que condiz com o tempo de cicatrização óssea.(27)

Poucos estudos avaliaram a capacidade de contribuição que este biomaterial tem na reconstrução de defeitos ósseos,(27, 28) mas sabe-se que ele melhora a síntese de colágeno, estimula a via neurovascular e melhora a elasticidade muscular, induz a formação do tecido conjuntivo fibroso pela atividade dos miofibroblastos, aumenta o número de vasos e capilares próximos além disso induzem um aumento

nos níveis de colágeno tipo 1 e 3 além de TGF-B1 TGF-B2 e TGF-B3 e também atua como um arcabouço.(29)

A técnica de “eletrospinning” torna a superfície física dos polímeros com maior peso molecular o que também facilita sua combinação com outras substâncias, e sua apresentação comercial oferece área maior de forma a facilitar a adesão e proliferação celular, sua estrutura porosa tridimensional é semelhante a matriz extracelular o que melhora a biocompatibilidade e reduz a rejeição dos tecidos e por fim, é um material hidrofílico o que o torna benéfico para a adsorção de outras substâncias especialmente se tiverem vida útil curta de forma a prolonga-la como é o caso da rhBMP-2.(30) Esta associação também demonstrou provocar maior atividade da proteína Fosfatase Alcalina, que está presente nos estágios iniciais do desenvolvimento dos osteoblastos, conseqüentemente, tem-se maiores taxas de diferenciação e ligação celular, o que indica que seu uso promove cicatrização e regeneração óssea.(29)

Portanto, modelos experimentais de grandes defeitos ósseos do tipo longo, apresentam-se como um método interessante para avaliar o comportamento e as respostas biológicas da regeneração óssea, através de membranas de PDO que atuarão como material estabilizador para o conjunto rhBMP2 + esponja de colágeno oferecendo inclusive permeabilidade seletiva favorecendo as condições de migração e proliferação de células essenciais para a osteogênese e atuando também como um guia para neoformação óssea recobrando a rhBMP-2. Além desta pesquisa apresentar um caráter de ineditismo, ressalta-se a importância em realizar um estudo pré-clínico dos biomateriais, na investigação de um meio viável para a regeneração dos grandes defeitos ósseos, com finalidade de reduzir a morbidade a qual o paciente está susceptível.

6 CONCLUSÃO

Diante das limitações deste estudo *in vivo*, a associação do “Scaffold” de Polidioxanona com a rhBMP-2 apresenta-se como uma excelente alternativa para a reconstruções de grandes defeitos ósseos na medicina e na odontologia devido a sua manutenção tridimensional do defeito e otimização das propriedades osteoindutoras.

REFERÊNCIAS

1. Carlisle P, Marrs J, Gaviria L, Silliman DT, Decker JF, Brown Baer P, et al. Quantifying vascular changes surrounding bone regeneration in a porcine mandibular defect using computed tomography. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2019;25(12):721-31.
2. Hussein KA, Zakhary IE, Hailat D, Elrefai R, Sharawy M, Elsalanty ME. Delayed versus immediate reconstruction of mandibular segmental defects using recombinant human bone morphogenetic protein 2/absorbable collagen sponge. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013;71(6):1107-18.
3. Grey ZJ, Howie RN, Durham EL, Hall SR, Helke KL, Steed MB, et al. Sub-clinical dose of bone morphogenetic protein-2 does not precipitate rampant, sustained inflammatory response in bone wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2019;27(4):335-44.
4. Trujillo RL, Kadioglu O, Currier GF, Smith KS, Yetkiner E. Volumetric Cleft Changes in Treatment With Bone Morphogenic Protein/ β -Tricalcium Phosphate Versus Grafts From the Iliac Crest or Symphysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2018;76(9):1991-7.
5. Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2008;66(4):616-24.
6. Essig H, Rana M, Kokemueller H, von See C, Ruecker M, Tavassol F, et al. Pre-operative planning for mandibular reconstruction-a full digital planning workflow resulting in a patient specific reconstruction. *Head & neck oncology*. 2011;3(1):1-7.
7. Bubalo M, Lazić Z, Milović R, Čuković A. Rehabilitation of Severely Resorbed Mandible Treated With Mini Dental Implants and Iliac Crest Bone Grafts: Case Report. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2011;28(3).
8. Herford AS, Lowe I, Jung P. Titanium mesh grafting combined with recombinant human bone morphogenetic protein 2 for alveolar reconstruction. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*. 2019;31(2):309-15.
9. Schwarz C, Ott CE, Wulsten D, Brauer E, Schreivogel S, Petersen A, et al. The Interaction of BMP2-Induced Defect Healing in Rat and Fixator Stiffness Modulates Matrix Alignment and Contraction. *JBMR plus*. 2018;2(3):174-86.
10. Nune KC, Misra RDK, Bai Y, Li S, Yang R. Interplay of topographical and biochemical cues in regulating osteoblast cellular activity in BMP-2 eluting three-dimensional cellular titanium alloy mesh structures. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2019;107(1):49-60.
11. James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, et al. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22(4):284-97.

12. Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(4):616-24.
13. Poon B, Kha T, Tran S, Dass CR. Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(2):139-47.
14. Herford AS, Lowe I, Jung P. Titanium Mesh Grafting Combined with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 for Alveolar Reconstruction. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2019;31(2):309-15.
15. Durham EL, Kishinchand R, Grey ZJ, Cray JJ. rhBMP2 alone does not induce macrophage polarization towards an increased inflammatory response. *Molecular immunology.* 2020;117:94-100.
16. Fujioka-Kobayashi M, Schaller B, Saulacic N, Pippenger BE, Zhang Y, Miron RJ. Absorbable collagen sponges loaded with recombinant bone morphogenetic protein 9 induces greater osteoblast differentiation when compared to bone morphogenetic protein 2. *Clinical and experimental dental research.* 2017;3(1):32-40.
17. Visser R, Arrabal PM, Becerra J, Rinas U, Cifuentes M. The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo. *Biomaterials.* 2009;30(11):2032-7.
18. Reuss JM, Pi-Anfruns J, Moy PK. Is Bone Morphogenetic Protein-2 as Effective as Alveolar Distraction Osteogenesis for Vertical Bone Regeneration? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2018;76(4):752-60.
19. Lee K-S, Jeon Y-S, Shin S-W, Lee J-Y. Effects of rhBMP-2 loaded titanium reinforced collagen membranes on horizontal bone augmentation in dogs. *BioMed research international.* 2017;2017.
20. Sanz-Esporrin J, Blanco J, Sanz-Casado JV, Muñoz F, Sanz M. The adjunctive effect of rhBMP-2 on the regeneration of peri-implant bone defects after experimental peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research.* 2019;30(12):1209-19.
21. Youn YH, Lee SJ, Choi GR, Lee HR, Lee D, Heo DN, et al. Simple and facile preparation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 immobilized titanium implant via initiated chemical vapor deposition technique to promote osteogenesis for bone tissue engineering application. *Materials Science and Engineering: C.* 2019;100:949-58.
22. Herford AS, Stoffella E, Tandon R. Reconstruction of mandibular defects using bone morphogenetic protein: can growth factors replace the need for autologous bone grafts? A systematic review of the literature. *Plastic surgery international.* 2011;2011.
23. Cohen A, Polak D, Nir-Paz R, Westreich N, Casap N. Indirect Bactericidal Properties of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 In Vitro. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2019;77(8):1611-6.

24. Martins JA, Lach AA, Morris HL, Carr AJ, Mouthuy P-A. Polydioxanone implants: A systematic review on safety and performance in patients. *Journal of biomaterials applications*. 2020;34(7):902-16.
25. Oh GJ, Choi J, Kim T-K, Jeong J-Y, Kim J-H, Kim S, et al. Feasibility of a polydioxanone plate as an adjuvant material in rhinoplasty in Asians. *Archives of plastic surgery*. 2019;46(2):152.
26. Goonoo N, Jeetah R, Bhaw-Luximon A, Jhurry D. Polydioxanone-based bio-materials for tissue engineering and drug/gene delivery applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;97:371-91.
27. Kim HJ, Lee SJ, Lee JH, Kim SH, Suh IS, Jeong HS. Clinical features of skin infection after rhinoplasty with only absorbable thread (Polydioxanone) in oriental traditional medicine: a case series study. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2020;44(1):139-47.
28. Mohd Slim MA, Jasem H, Melia L, McGarry G. Polydioxanone sheet as a rigid framework in skull-base repair: Our experience in thirteen patients. *Clinical Otolaryngology*. 2019;44(5):856-60.
29. Kim JE, Lee EJ, Kim HE, Koh YH, Jang JH. The impact of immobilization of BMP-2 on PDO membrane for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2012;100(6):1488-93.
30. Yue H, Zhou L, Zou R, Li Z, Liao T, Yan J, et al. Promotion of skin fibroblasts collagen synthesis by polydioxanone mats combined with concentrated growth factor extracts. *Journal of biomaterials applications*. 2019;34(4):487-97.
31. Boland ED, Coleman BD, Barnes CP, Simpson DG, Wnek GE, Bowlin GL. Electrospinning polydioxanone for biomedical applications. *Acta biomaterialia*. 2005;1(1):115-23.
32. Senoo M, Hasuike A, Yamamoto T, Ozawa Y, Watanabe N, Furuhashi M, et al. Comparison of Macro-and Micro-porosity of a Titanium Mesh for Guided Bone Regeneration: An In Vivo Experimental Study. *in vivo*. 2022;36(1):76-85.
33. Liu Y, Cao L, Ray S, Thormann U, Hillengass J, Delorme S, et al. Osteoporosis influences osteogenic but not angiogenic response during bone defect healing in a rat model. *Injury*. 2013;44(7):923-9.
34. Thormann U, El Khawassna T, Ray S, Dürselen L, Kampschulte M, Lips K, et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. *Injury*. 2014;45(3):487-93.
35. Alt V, Thormann U, Ray S, Zahner D, Dürselen L, Lips K, et al. A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *Acta biomaterialia*. 2013;9(6):7035-42.

36. de Souza Balbinot G, Leitune VCB, Ponzoni D, Collares FM. Bone healing with niobium-containing bioactive glass composition in rat femur model: A micro-CT study. *Dental Materials*. 2019;35(10):1490-7.
37. Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Giardino R. Characterization of bone defect repair in young and aged rat femur induced by xenogenic demineralized bone matrix. *Journal of periodontology*. 2002;73(9):1003-9.
38. Muramatsu K, Oba K, Mukai D, Hasegawa K, Masuda S, Yoshihara Y. Subacute systemic toxicity assessment of β -tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite implanted in rat femur. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007;18(3):513-22.
39. Meira PS. Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo ósseo em tíbias osteotomizadas de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) frente à ausência de carga e tratamento com ultrassom. 2009.
40. Oliveira MT. Programa computacional ODR-ATA para densitometria óssea baseado na densitometria radiográfica. 2014.
41. Benetti F, Briso A, de Araújo Lopes J, Carminatti M, Conti L, Gallinari M, et al. In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45-cells in the pulp of bleached teeth. *International endodontic journal*. 2019;52(12):1723-37.
42. Cintra LTA, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto RdC, et al. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. *Journal of Applied Oral Science*. 2016;24(1):95-104.
43. Legeros RZ, Craig RG. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1993;8(S2):S583-S96.
44. Cintra LTA, Ribeiro TAA, Gomes-Filho JE, Bernabé PFE, Watanabe S, Facundo ACdS, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. *Dental traumatology*. 2013;29(2):145-50.
45. Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z, Watson JT. Critical-size bone defects: is there a consensus for diagnosis and treatment? *Journal of orthopaedic trauma*. 2018;32:S7-S11.
46. Batstone M. Reconstruction of major defects of the jaws. *Australian dental journal*. 2018;63:S108-S13.
47. Zhang Q, Wu W, Qian C, Xiao W, Zhu H, Guo J, et al. Advanced biomaterials for repairing and reconstruction of mandibular defects. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;103:109858.

48. Zhang M, Matinlinna JP, Tsoi JK, Liu W, Cui X, Lu WW, et al. Recent developments in biomaterials for long-bone segmental defect reconstruction: A narrative overview. *Journal of Orthopaedic Translation*. 2020;22:26-33.
49. Cohen A, Polak D, Nir-Paz R, Westreich N, Casap N. Indirect Bactericidal Properties of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 In Vitro. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2019;77(8):1611-6.
50. Esmail N, Buser Z, Cohen JR, Brodke DS, Meisel H-J, Park J-B, et al. Postoperative complications associated with rhBMP2 use in posterior/posterolateral lumbar fusion. *Global spine journal*. 2018;8(2):142-8.
51. Cicciù M, Herford A, Stoffella E, Cervino G, Cicciù D. Protein-signaled guided bone regeneration using titanium mesh and Rh-BMP2 in oral surgery: a case report involving left mandibular reconstruction after tumor resection. *The open dentistry journal*. 2012;6:51.
52. Trento G, Carvalho P, Macedo D, Gabrielli M, Monnazzi M, Pereira-Filho V. Titanium mesh associated with rhBMP-2 in alveolar ridge reconstruction. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2019;48(4):546-53.
53. Kim TH, Oh SH, Chun SY, Lee JH. Bone morphogenetic proteins-immobilized polydioxanone porous particles as an artificial bone graft. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(5):1264-74.
54. Fisher M, Yee K, Alba B, Tanna N, Bastidas N, Bradley JP. Applications of bone morphogenetic protein-2: alternative therapies in craniofacial reconstruction. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2019;30(7):1952-9.
55. Zeng J-H, Qiu P, Xiong L, Liu S-W, Ding L-H, Xiong S-L, et al. Bone repair scaffold coated with bone morphogenetic protein-2 for bone regeneration in murine calvarial defect model: systematic review and quality evaluation. *The International journal of artificial organs*. 2019;42(7):325-37.
56. Avashia YJ, Sastry A, Fan KL, Mir HS, Thaller SR. Materials used for reconstruction after orbital floor fracture. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2012;23(7):S49-S55.
57. Gepreel MA-H, Niinomi M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2013;20:407-15.
58. Boenisch M, Mink A. Clinical and histological results of septoplasty with a resorbable implant. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2000;126(11):1373-7.
59. Boenisch M, Tamás H, Nolst Trenité GJ. Influence of polydioxanone foil on growing septal cartilage after surgery in an animal model: new aspects of cartilage healing and regeneration (preliminary results). *Archives of facial plastic surgery*. 2003;5(4):316-9.

60. Gollapudi S, So CS, Formica M, Agrawal S, Agrawal A. Safety and efficacy of polydioxanone nano-fibers as anti-inflammatory agents. *J Nanomedicine Biotherapeutic Discov.* 2014;4(2):1000127.
61. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy.* 2007;9(1):1-7.
62. Weitzmann MN. Bone and the immune system. *Bone Toxicology.* 2017:363-98.
63. Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT. Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Reviews and Reports.* 2012;8(3):891-7.
64. Liu T, Gao Y, Sakamoto K, Minamizato T, Furukawa K, Tsukazaki T, et al. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines. *Journal of cellular physiology.* 2007;211(3):728-35.
65. Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2017;1409(1):79.

ANEXOS

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Análise do potencial bioativo em malhas de titânio por meio da texturização de superfície por oxidação por plasma eletrolítico (PEO) e osteoindutivo de uma nova BMP-2 nas reconstruções após simulação de ressecções ósseas segmentares: Um estudo pré-clínico", Processo FOA nº 00539-2019, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Julho de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Março de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Abril de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Analysis of the bioactive potential of titanium meshes by surface texturisation by electrolytic plasma oxidation (PEO) and osteoinduction of a new BMP-2 in reconstructions after simulation of segmental bone resections: A preclinical study", Protocol FOA nº 00539-2019, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 30, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 01, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 01, 2022.


Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Vice-Coordenador da CEUA
Vice-CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br