



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; 2021.

## 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; 2021.

## **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 imunomarcção 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 imunomarcção 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 imunomarcção 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 imunomarcção 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 advém 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 consequentemente 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.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo do estudo é analisar o potencial bioativo de membranas de Polidioxanona (PDO) através de grandes reconstruções enquanto material estabilizador para rhBMP-2 atuando também como guia para neoformação óssea após ressecção em fêmures de ratos.

A hipótese nula desta pesquisa é que independente do material a ser testado (Malha de Ti ou Membrana de PDO), a terapia não influenciaria nos parâmetros reparacionais a serem analisados.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Fornecimento dos Materiais**

##### **3.1.1 Fornecimento e utilização da rhBMP-2**

O fornecimento da rhBMP2- Infuse<sup>R</sup> (Medtronic) 1,5mg/ml esteve sob responsabilidade da empresa Biosíntesis em nome da Dra. Fabiana Medeiros.

Sua utilização seguiu à risca o protocolo fornecido pelo fabricante e colaborador (Biosíntesis e IPEN) que sugere sua aplicação através de esponjas de colágeno contendo 3,25 µg de rhBMP-2 por defeito, dado obtido através da fórmula física de volume do cilindro:  $\pi \times R^2 \times \text{Altura}$ .

##### **3.1.2 Fornecimento e síntese das membranas de Polidioxanona**

As membranas de PDO (15mm x 10mm x 1mm) foram fornecidos pela empresa Plenum Bioengenharia (Jundiaí, São Paulo, Brasil). A síntese da membrana de PDO se baseou no protocolo de confecção realizado por Boland et al., em 2005(31). A obtenção da membrana ocorreu através de um processo denominado “eletrospinning” que consiste na formação de uma estrutura similar a uma teia formada por cadeias de polímeros emaranhados, para isso é necessário que a solução polimérica seja armazenada em um reservatório e separada de um alvo que foi submetido a carga elétrica oposta formando um campo elétrico que, tendo a tensão superficial superada cria um jato de encontro ao alvo produzindo a membrana.

Para isso a PDO é obtida como fios de sutura de monofilamento violeta PDS II de Ethicon, Inc. (Somerville, NJ). Antes do processamento, as agulhas são removidas e os fios levados em frascos herméticos contendo cloreto de metileno, por três dias, para que o corante seja removido de sua superfície. Após a remoção completa do corante, os fios são secos ao ar, para completa evaporação do solvente e em seguida são cortados em pequenas partes de 1-4 cm. Em seguida, é preparada uma solução com os fios cortados e o 1,1,1,1,3,3,3,3 hexafluoro-2-propanol (HFP, Sigma Aldrich ChemicalCo.) em concentrações de 50- 125 mg/ml de PDO em HFP. Para o procedimento de eletrospinning, a solução é carregada em uma seringa Becton Dickinson (3.0)10,0ml) e colocada em uma bomba de seringa KD Scientific para

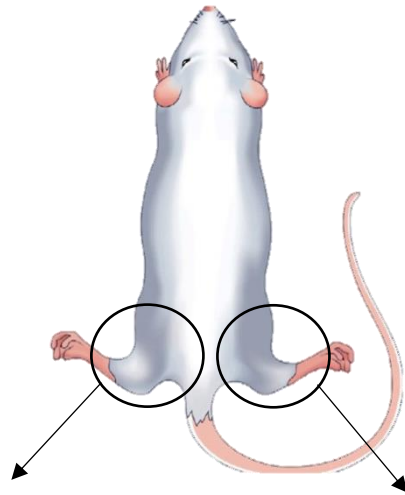
dosificação medida entre 4 e 12ml/h, sendo a taxa de dispersão inversamente variável, de acordo com a concentração do polímero. Uma fonte de alta tensão, ajustada para 22kV é conectada a uma agulha de calibre 18 na seringa e um alvo é colocado a 20 cm da ponta da agulha, sendo utilizada baixa rotação (100RPM) para produzir fibras dispostas aleatoriamente e uma rotação maior (400 RPM) para produzir fibras alinhadas.

### **3.2 Desenho experimental: animais**

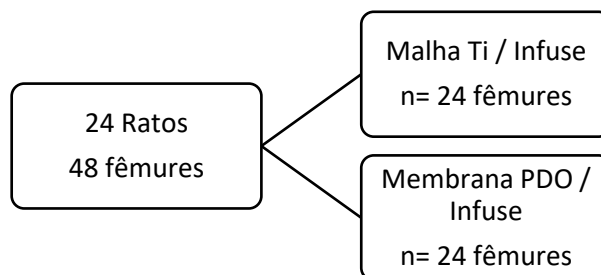
Para que este estudo se enquadrasse nos Princípios Éticos para Experimentação Animal, do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), o projeto foi enviado e obteve o parecer consubstanciado favorável do Comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP através do protocolo de número 00539-2019.

Para melhor entendimento do desenho experimental no tocante do número da amostra, vale ressaltar que cada animal contribuiu para a realização de 2 reconstruções distintas uma vez que foram operados bilateralmente totalizando  $n=2$  por animal e que a distribuição dos grupos mediante aos fêmures se deu através de randomização. (Figura 1) Em se tratando das orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), o princípio dos 3Rs (“replacement”: substituições, “Reduction”: redução e “refinement”: refinamento) deve ser seguido nas pesquisas animais.

**FIGURA 1 - Desenho explicativo do número da amostra mediante a cirurgia bilateral**



1 Rato n=2 fêmures



Fonte: Autor, 2021

Portanto, para este estudo foram utilizados 24 ratos (N=48 fêmures) (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), machos, adultos (n=12 ratos, 24 fêmures por grupo experimental), com 6 meses de idade, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, que foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição. O número de animais por grupo foi determinado pelo cálculo de poder do teste utilizando o software Sigma Plot 12.0 (San Jose, CA, EUA) considerando o estudo de Senoo et al. (32) cujo resultado primário refere-se a área de osso neoformado portanto, para um poder desejado de 85% e alfa de 5%, usando a diferença mínima detectável nas médias = 8,50 e desvio padrão

esperado = 4,50 dessa maneira obteve-se um número amostral de 6 animais por grupo experimental e a cirurgia de ambos grupos e tempos foram realizadas pelo mesmo operador.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, num ambiente com temperatura estável ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos.

### **3.3 Simulação da ressecção e reconstrução óssea**

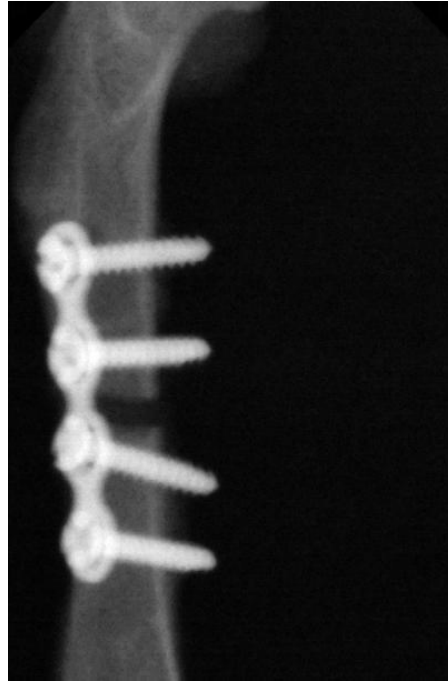
Os 24 animais (N=48 fêmeas) passaram por um período de adaptação ao biotério, submetidos a jejum de 12 horas previamente ao procedimento cirúrgico, e foram sedados pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaína 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) para anestesia local e hemostasia do campo operatório.

Após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia na porção lateral do fêmur direito e esquerdo e, antissepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de 4 cm de comprimento na porção lateral do fêmur e assim, bilateralmente o osso do fêmur foi exposto do polo lateral do côndilo do fêmur, entre o músculo lateral e o músculo bíceps do fêmur.

Posteriormente, uma placa de fixação do sistema 1.5mm com 4 furos sem intermediário, foi fixada em cada fêmur do animal. Após a estabilização da placa, foi realizada a simulação de uma ressecção, com o auxílio de uma serra circular com cerca de 1mm de espessura, realizando-se a osteotomia na metáfise epifisária,

distando 5mm da cartilagem articular epifisária, realizando um GAP (33-35) de 2mm, constituindo assim um defeito ósseo crítico (Figura 2), suportado por estudos previamente publicados.(36-38)

**FIGURA 2 – Imagem representativa da fixação femoral com placa 1.5, parafusos bicorticais e confecção de gap de 2mm**



Fonte: Autor, 2021

Foram utilizados quatro parafusos com o comprimento de 4mm (sistema 1,5) parafusados para estabilização dos cotos da ressecção.

Foi realizada a reconstrução dos fêmures, para estabilização e manutenção dos enxertos, de modo que, o mesmo animal teve seus dois fêmures reconstruídos com a malha de titânio (grupo Titânio) ou “scaffold” de PDO (grupo PDO) a depender do grupo que pertenciam.

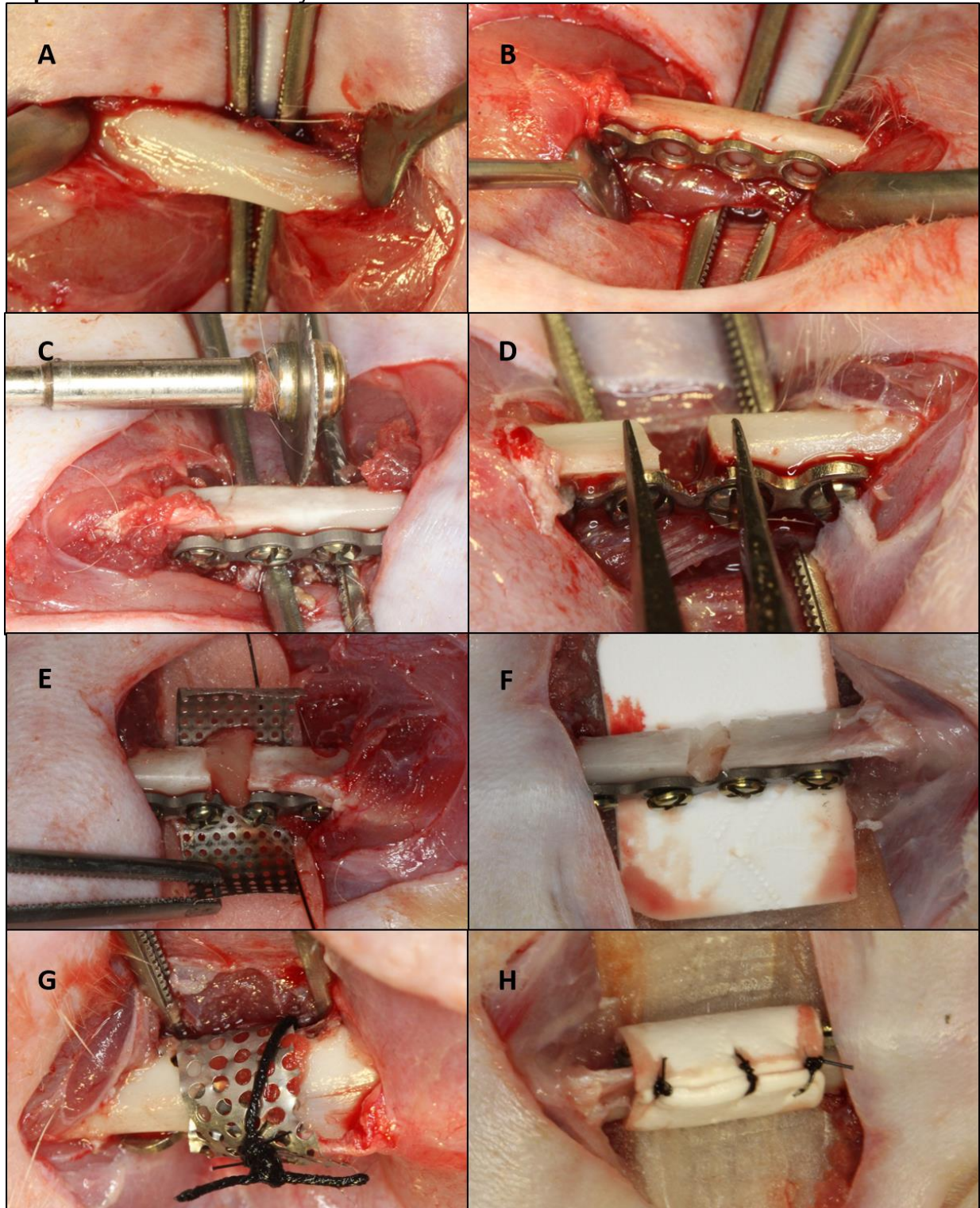
Para a reconstrução do **Grupo Titânio/Infuse**, foi realizado o preenchimento do “gap” com rhBMP2 (Infuse) carregada em esponja de colágeno (3,25 µg), em seguida, a malha de titânio 15mm x 10mm x 0,04mm (Criteria Engenharia de Implantes (Rio Claro, SP, Brasil) foi estabilizada com o auxílio de nylon (Nylon 3.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) para acomodação e estabilização da malha. Para o **Grupo PDO/Infuse**, a reconstrução também se iniciou com o

preenchimento do “gap” com a rhBMP2 (Infuse) carregada em esponja de colágeno e foi estabilizada com o uso de uma membrana de PDO, que foi fornecida pela empresa Plenum Bioengenharia (Jundiaí, São Paulo, Brasil) que foi disposto de modo a atuar como um arcabouço, sendo utilizado um fio monofilamentar (Nylon 3.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) nas duas extremidades da membrana para auxiliar na sua estabilidade. Durante todo o procedimento, tanto para a osteotomia e para a perfuração com as brocas cirúrgicas, as regiões foram irrigadas copiosamente com solução salina fisiológica (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), para evitar-se o aquecimento do tecido ósseo e assim, influenciar negativamente no reparo ósseo (Fig. 3 e 4). Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 4.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

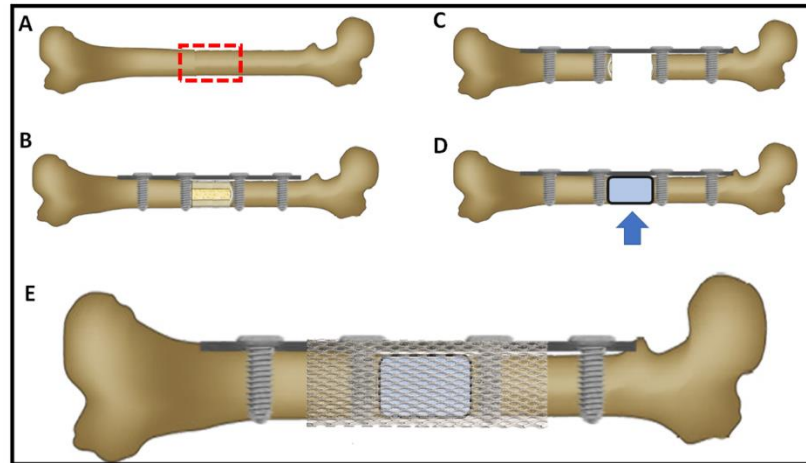
Além disso, 8 animais de cada grupo (8 animais do grupo PDO e 8 do grupo Malha de Ti) no dia da cirurgia da ressecção, foram submetidos a instalação do mesmo material do grupo ao qual pertencia, em seu dorso, a nível subcutâneo, através de uma incisão de 2cm na região caudal direita, onde o fragmento do material de recobrimento foi estabilizado através de uma sutura monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). Este mesmo material foi utilizado para a sutura da pele para o ensaio de biocompatibilidade.

Durante os três primeiros dias pós-operatório os animais foram medicados com cloridrato de tramadol (5 mg / kg / dia, IM) para alívio da dor.(38)

**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.



**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**



Fonte: Autor, 2021

### 3.4 Suspensão pela cauda

Com a finalidade de imobilizar as patas traseiras dos animais e evitar a ocorrência de fadiga das mini placas ou má consolidação das fraturas, após as cirurgias, os animais, ainda sedados, foram suspensos pela cauda, por meio de uma modificação da técnica proposta por Meira.(39) A suspensão foi realizada com o auxílio de uma fita elástica adesiva (Kinesio Tape). Desse modo, após colada ao rabo do animal, a própria fita foi utilizada para confecção de uma espécie de alça, que possibilitou sua apreensão à uma presilha metálica, que se encontrava conectada a uma barra de ferro, onde é possível regular a altura da suspensão. Para reforçar a bandagem, utilizou-se de três pedaços, de pequena largura, de esparadrapo, que foram colados nas periferias e no centro da fita elástica adesiva presa ao rabo do animal. Neste sistema de suspensão, os animais tiveram liberdade para movimentação dos membros torácicos, pois foram mantidos visualmente inclinados em aproximadamente 30 graus em relação ao assoalho da caixa. (Figura 5)

Apesar de alguns estudos demonstrarem uma relação direta entre a suspensão e a ocorrência de osteopenia e atrofia da musculatura, devido à falta de estímulos mecânicos na região das patas traseiras, (espera-se que isso não influencie

negativamente os resultados desse trabalho, visto que todos os animais foram submetidos a mesma situação. Além disso, tem-se como objetivo simular uma situação crítica e que se aproxime da realidade clínica, como o que se tem nas fraturas de ossos longos, onde o paciente necessita de uma imobilização até que se tenha segurança para que o membro volte a entrar em função.

Durante todo o período entre a cirurgia e a eutanásia, os animais foram acompanhados todos os dias, onde foi verificada a integridade da suspensão, a disponibilidade de ração e água, a saúde geral e as feridas cirúrgicas. Além disso, todos os dias realizou-se antissepsia das feridas cirúrgicas e uma vez por semana a antissepsia da genitália do animal para evitar ocorrência de infecção urinária, que poderia ocorrer devido à dificuldade que o animal tem de fazer sua auto higiene pela limitação de movimentação.

**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.**

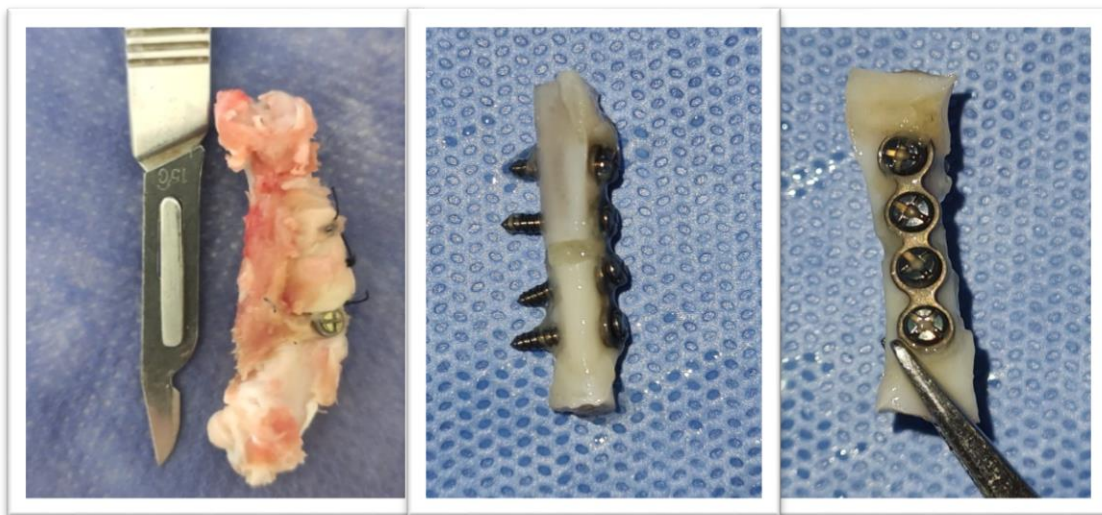


Fonte: Autor, 2021

### 3.5 Eutanásia

Após 14 e 60 dias da cirurgia de simulação de ressecção e reconstrução femoral, todos os animais foram submetidos a sedação com 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e submetidos a perfusão cardíaca de formaldeído para fixação interna e posteriormente peças foram encaminhadas para as respectivas análises. (Figura 6)

**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**



Fonte: Autor, 2021

### 3.6 Análises

As análises desse trabalho foram executadas pelo mesmo colaborador e com o intuito de reduzir o viés, procedeu-se de maneira cega, tal qual não fosse possível identificar a qual grupo pertencia a referida peça.

#### 3.6.1 Análise clínica

Durante eutanásia e coleta dos fêmures foi observada integridade dos tecidos moles, presença ou não de infecção nos fêmures reconstruídos, formação de calo ósseo e integridade do material de recobrimento.

## **3.6.2 Análise com tecidos calcificados**

### **3.6.2.1 Radiografia**

Os animais foram eutanasiados aos 14 e 60 dias e os fêmures foram submetidos a radiografias que foram realizadas por um mesmo operador, em um mesmo dispositivo de captura por via de um sensor de imagem FIT tamanho 1 (Micro imagem) por meio de um aparelho de raio-X Timex 70 E (Gnatus). Para evitar quaisquer distorções entre as imagens, padronizou-se uma distância de 8cm do canhão por onde se tem a saída dos feixes de raios x, até a peça, bem como um tempo de exposição de 0,10s para todas as tomadas radiográficas. Posteriormente, as imagens foram expostas ao programa ODR – ATA, afim de realizar uma análise da densidade óssea presente nas amostras radiografadas.

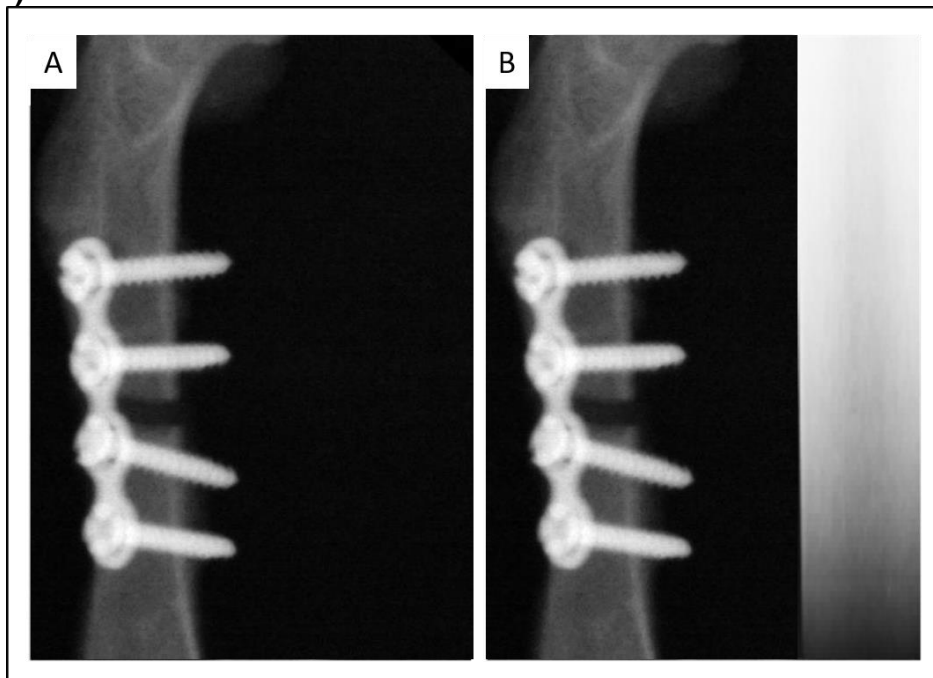
### **3.6.2.2 Análise da densitometria radiográfica por meio do programa computacional ODR-ATA**

O programa computacional ODR – ATA é um software livre, que tem como objetivo realizar o cálculo da densidade óssea, tendo como base a densitometria radiográfica.(40) Para isso, utiliza um modelo de cunha de alumínio, material que possui absorção de raios – x semelhante ao tecido ósseo, como método de comparação com a amostra.

Todas as radiografias dos fêmures tiveram a imagem da cunha anexada à radiografia por meio do aplicativo “Paint” e em seguida foram salvas em formato PNG (Figura 7). Com o programa ODR-ATA em execução, realizou-se a seleção da cunha com os dados pré-determinados, denominada de “Cunha Teste”. Em seguida, a imagem da radiografia digitalizada com a cunha anexada foi selecionada e aberta no programa e como método de calibração, por meio da ferramenta “Drawing”, com o auxílio do mouse, fez-se esquadramento da imagem da cunha de referência, de modo que o software realizou uma leitura pixel a pixel de todos os tons de cinza, sendo presentes variações de 0 a 255 tons de cinza ao longo da cunha, gerando então um gráfico que representa a curva de densidade radiográfica versus altura da cunha.

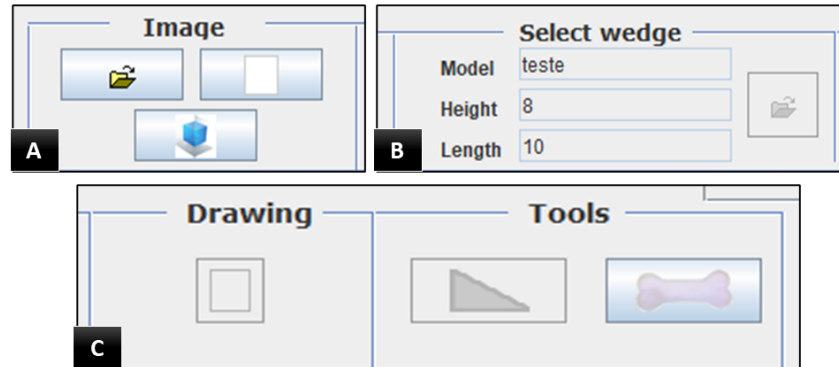
Finalizada a calibração, a ferramenta “Drawing” foi novamente selecionada, mas dessa vez com o pincel referente ao tecido ósseo, e a região de interesse foi esquadrihada, gerando um valor médio de densidade óssea em mmAl e um simulador tridimensional da região selecionada (Figura 8 e 9). Como o intuito de reduzir erros no momento da seleção da região de interesse, padronizou-se a seleção da região referente aos dois parafusos proximais ao defeito ósseo.

**FIGURA 7 – Radiografia antes (A) e após anexar a imagem radiográfica da cunha de alumínio (B)**



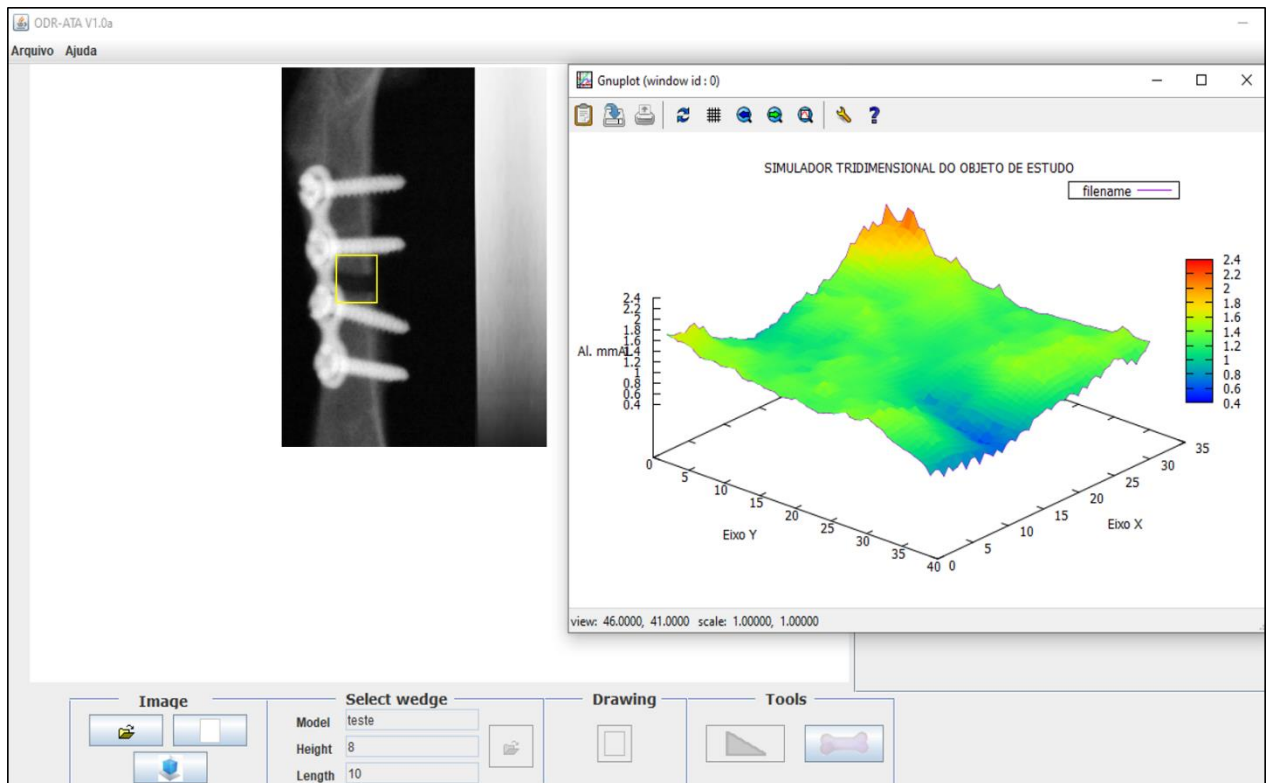
Fonte: Autor, 2021

**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 pincéis para seleção da região de cunha e para seleção da região de interesse no tecido ósseo**



Fonte: Autor, 2021

**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**



Fonte: Autor, 2021

### 3.6.3 Análises com tecidos descalcificados

#### 3.6.3.1 Análise histológica

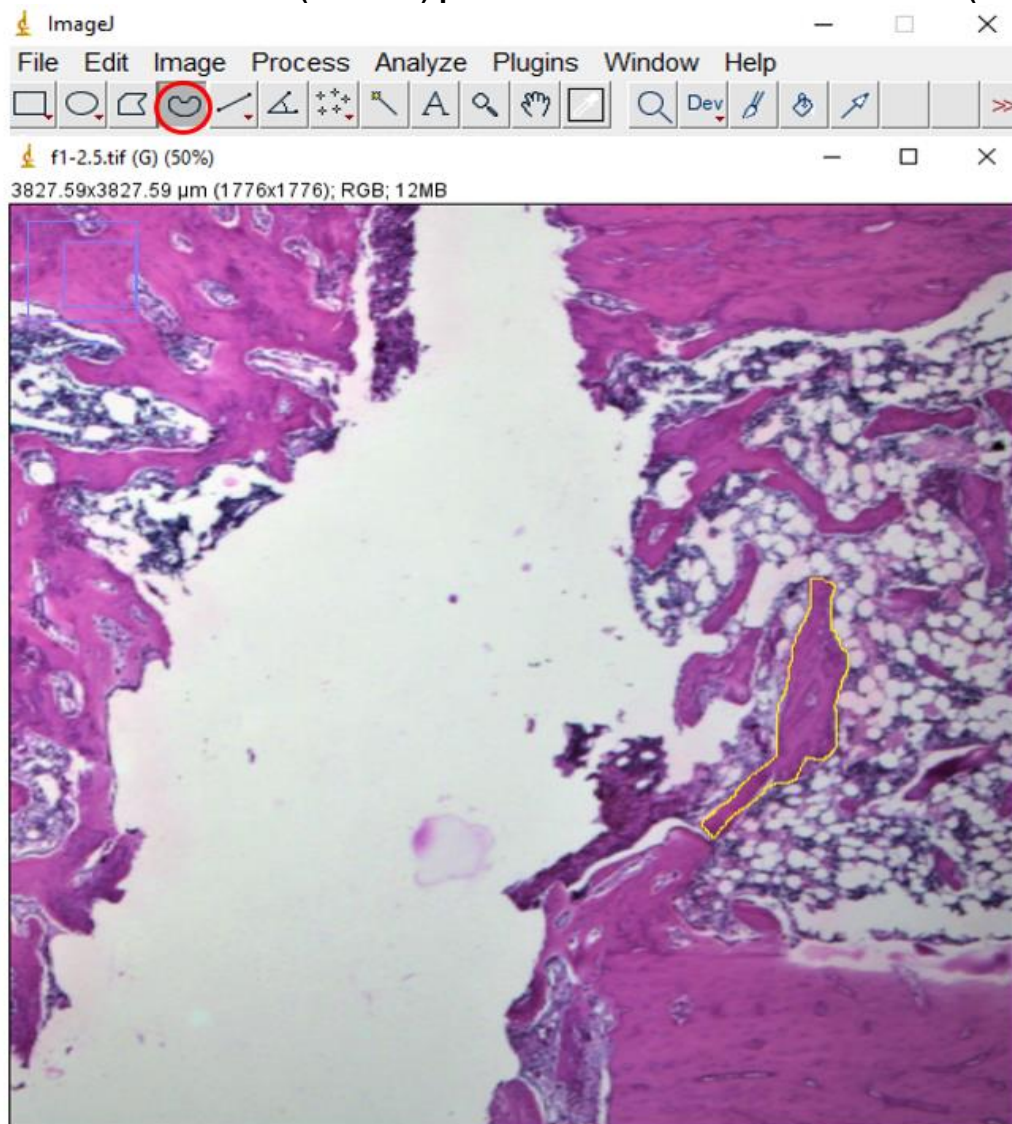
Nos períodos de 14 e 60 dias pós-operatórios, seis fêmures de cada grupo (**Grupo Titânio** e **Grupo PDO**) foram encaminhados ao processamento laboratorial para os tecidos descalcificados. O processamento se iniciou com a descalcificação em ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) (10%), de modo que as peças foram imersas em solução para descalcificação, a qual foi trocada semanalmente até se observar a diminuição da resistência à passagem de uma agulha para seringa carpule, demonstrando que a peça estava descalcificada. Posteriormente, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, foi feita a diafanização com xilol e posterior inclusão em parafina, seguida da obtenção de lâminas com cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura.

Antes que se realizar-se a inclusão propriamente dita as placas, os parafusos e a malha de titânio foram removidos dos respectivos fêmures. Após a microtomia, as lâminas pares foram destinadas para coloração em hematoxilina e eosina (HE), sendo analisada a cronologia do reparo ósseo na interface do “gap” da simulação da ressecção e reconstrução, observando-se a diferença entre os grupos experimentais com ênfase nos parâmetros de qualidade, com avaliação da maturidade do tecido ósseo e quantidade de tecido ósseo, assim como presença de células do processo inflamatório e quantidade de vasos sanguíneos.

Para isso, as lâminas coradas em HE foram fotomicrografadas na região do defeito ósseo crítico onde a área de interesse foi determinada de forma visual sendo limitada lateralmente pelos cotos ósseos compreendendo apenas a região de GAP, inicialmente em uma objetiva de 5x, que conferiu uma visão ampla do defeito e permitiu a mensuração da área de tecido ósseo neoformado, a partir do software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), por meio da ferramenta “Free hands” (Figura 10). Ressalta-se que quando da presença de áreas ósseas descontínuas, realizou-se quantas mensurações fossem necessárias e em seguida, somou-se todos os valores, obtendo a área total de cada amostra, com um resultado em pixel/ $\mu\text{m}$ . Para observação da maturação e das características do tecido ósseo dos diferentes grupos, realizou-se fotomicrografias em um objetiva de 40x.

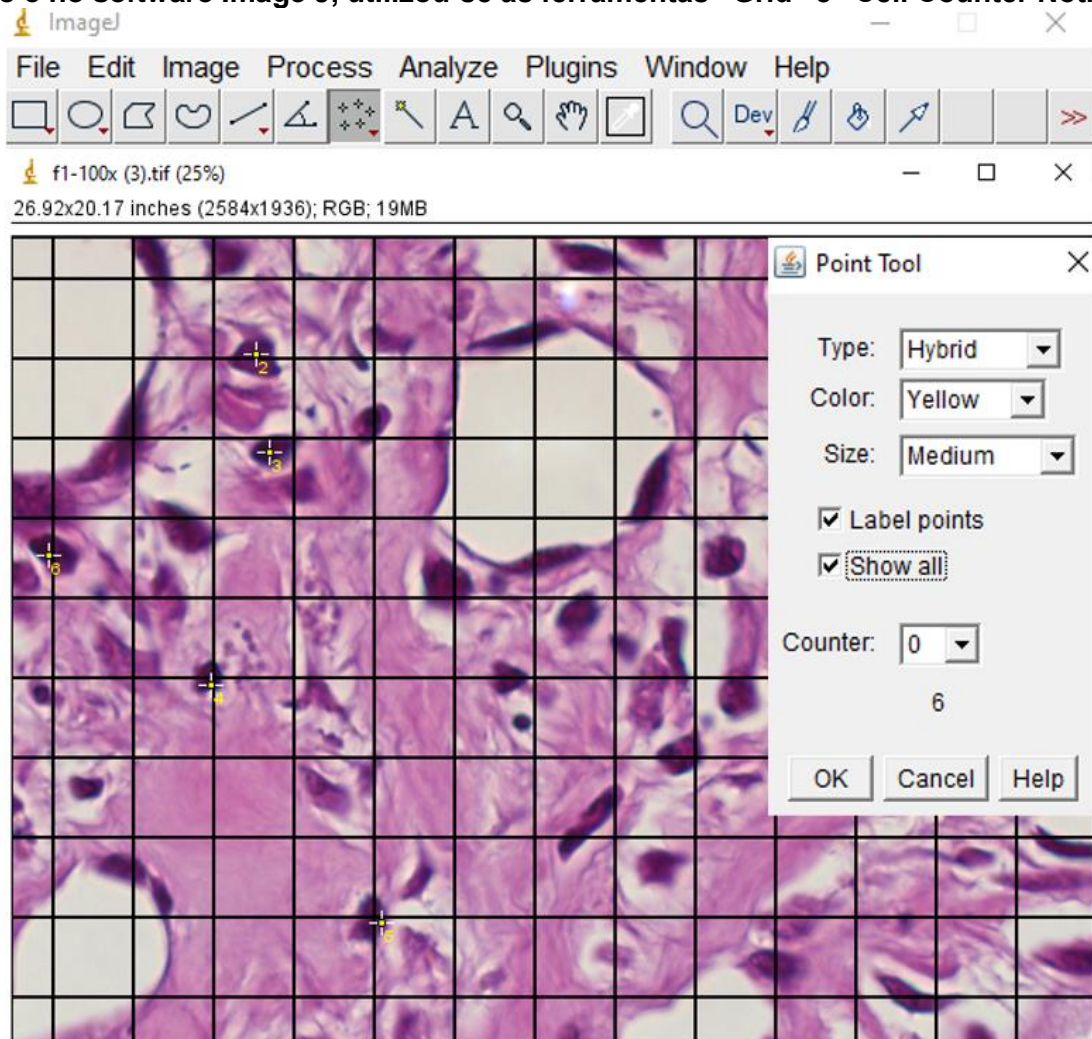
Já para a avaliação do perfil inflamatório, com ênfase em contagem de linfócitos e contagem de número de vasos sanguíneos, realizou-se, para cada amostra, três fotomicrografias realizadas na porção central do defeito, em objetivas de 100x, em diferentes regiões, sendo uma delas central e outras duas próximas próximas a cada coto ósseo . Em seguida, tais imagens foram também submetidas à análise por meio do software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), utilizando a ferramenta “Grid”, com 130 pontos de intersecção, como meio de facilitar a visualização das células e dos vasos sanguíneos. Além disso, foi utilizada a ferramenta “Cell Counter Notice”, para a contagem propriamente dita das estruturas mencionadas (Figura 11).

**FIGURA 10** - Imagem representativa da mensuração de tecido ósseo neoformado, em uma fotomicrografia com objetiva de 5x, por meio do software Image J. Observa-se uma área óssea selecionada (amarelo) por meio da ferramenta “Free hands” (vermelho)



Fonte: Autor, 2021

**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"**



Fonte: Autor, 2021

### 3.6.3.2 Análise Imunoistoquímica

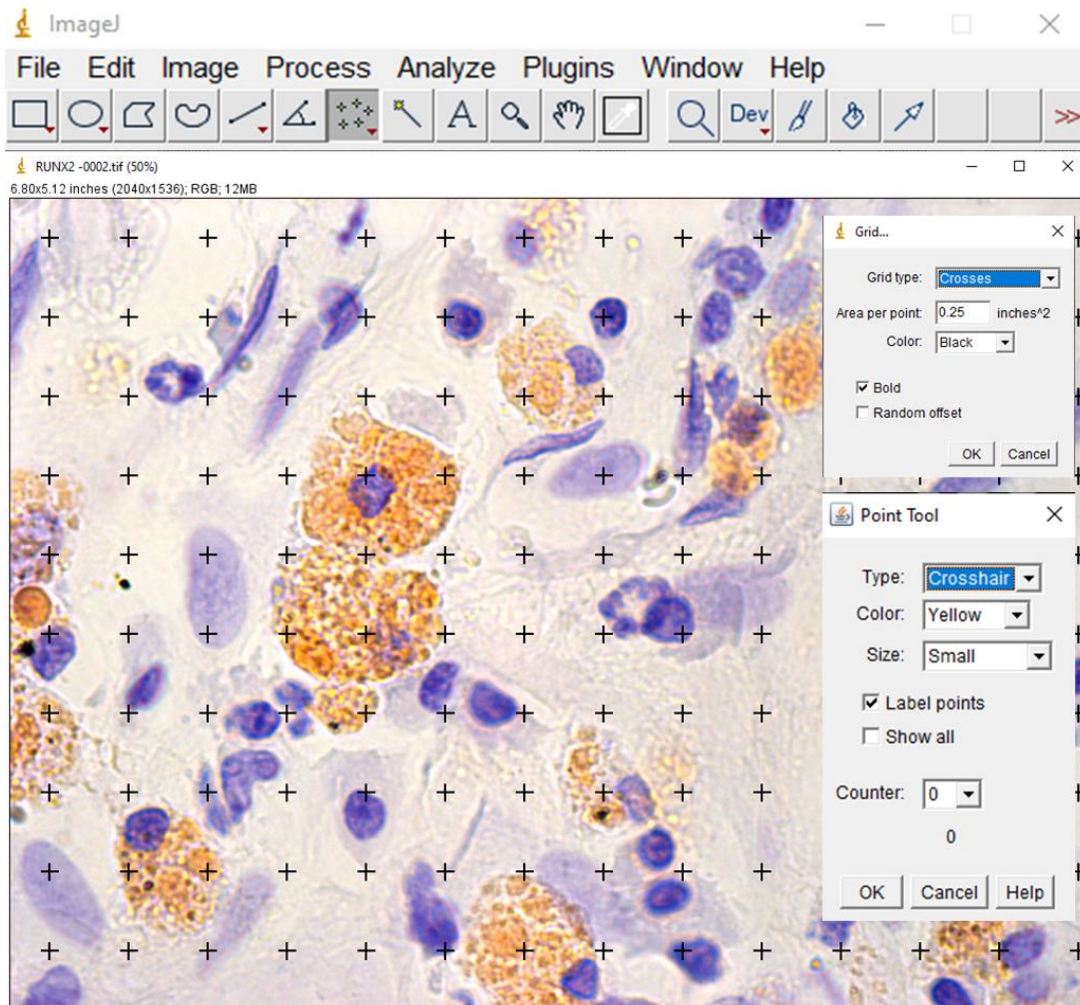
Das lâminas confeccionadas que foram descalcificadas e incluídas em parafina, as de número ímpar foram destinadas as reações de imunoistoquímica, onde a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram: anti BMP-2, uma vez que expressa o potencial osteoindutor, osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear kapa B ligante (RANKL) para avaliar o comportamento de reabsorção,

osteocalcina (OC) para evidenciar o a tendência de mineralização e anti RUNX2 com o intuito de avaliar a diferenciação de células osteogênicas.

O anticorpo secundário utilizado foi o biotilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente (análise qualitativa ordinal) pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo alveolar.

Para avaliação das reações imunoistoquímicas realizou-se uma análise quantitativa, por meio da contagem das células marcadas.(41, 42) As imagens foram fotomicrografadas em objetiva de 100x, em duas áreas distintas na região do defeito ósseo, e para a contagem de células marcadas utilizou-se o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), com auxílio da ferramenta “Grid” do tipo “Crosses”, com um total de 130 “crosses” por imagem. Para todos os grupos, assim como a análise histológica, foram realizadas as análises de imunoistoquímica nos períodos de 14 e 60 dias pós-operatórios (Figura 12).

**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”**



Fonte: Autor, 2021

### 3.6.4 Biópsia de órgãos de absorção e metabolização

Com o intuito de avaliar os efeitos sistêmicos dos materiais propostos realizou-se a coleta dos órgãos responsáveis pela absorção e metabolização: o músculo ao redor da reconstrução óssea, fígado, rim e cérebro. A coleta se deu imediatamente após a remoção dos fêmures e foram fixados em formalina 10% tamponada. Posterior a isso, essas peças seguiram para o processamento de inclusão, microtomia e foram coradas com HE e analisadas em microscopia óptica com o intuito de identificar quaisquer alterações histopatológicas causadas pelos materiais testados como: deposição de íons metálicos, infiltrado celular, tecidos hiperplásicos, transformações metaplásicas ou displásicas, foram analisadas entre os grupos experimentais.(43)

### **3.6.4. Análise subcutânea**

Dos 24, 16 animais receberam em seu dorso o mesmo material testado referente ao grupo que pertenciam (8 animais para cada grupo) sendo posteriormente submetidos a remoção do tecido subcutâneo para análise em quatro tempos distintos, 3, 5, 7 e 10 dias, totalizando 2 amostras por tempo e por grupo. Para isso foram submetidos a sedação seguindo o mesmo protocolo adotado para a cirurgia da ressecção, os animais foram submetidos a uma incisão elíptica ao redor da região de interesse, onde se encontra o material, para sua remoção junto de uma amostra do tecido subcutâneo adjacente. Posterior a isso realizou-se sutura por planos com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). O tecido coletado foi cuidadosamente manipulado para remoção da sutura estabilizadora do material, o mesmo foi removido e o tecido adjacente seguiu os mesmos protocolos de processamento laboratorial para confecção de lâminas histológicas como mencionado anteriormente para obter cortes de 5µm compondo 2 lâminas por espécime destinadas a coloração de HE com o intuito de avaliar biocompatibilidade.

#### **3.6.4.1. Análise de biocompatibilidade**

Para avaliar a biocompatibilidade, 2 lâminas por espécime foram fotomicrografadas no aumento de 100x (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Suíça) e em seguida analisadas no software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) para contagem de células inflamatórias e vasos sanguíneos.

Além disso, realizou-se uma análise semiquantitativa baseada nos estudos de Cintra et al. onde são determinados escores de acordo com o número de células inflamatórias, sendo: Escore 0 – ausência de células inflamatórias; 1 – menos de 25 células inflamatórias; 2 – 25 a 125 células inflamatórias; ou 3 – mais de 125 células inflamatórias.(44)

### 3.7 Análise estatística

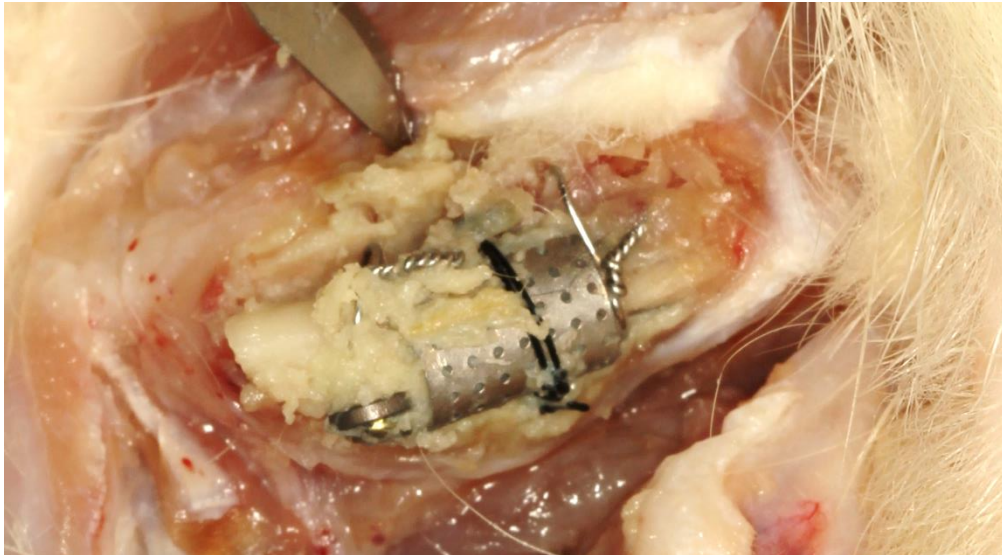
Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos obtidos através das análises radiográfica, histometria, análise histológica e imunoistoquímica, em função dos grupos experimentais (**Grupo Titânio e Grupo PDO**) versus tempo (14/60 dias), estes foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, os quais mostraram homogeneidade dos dados ( $p > 0,05$ ). Assim, o teste ANOVA-2 fatores foi aplicado e quando  $p < 0,05$ , o pós-teste Holm-sidak foi realizado. Todos os testes foram realizados no programa estatístico SigmaPlot 12.0 (Exakt Graph and Data Analysis, San Jose, California, USA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação clínica

O grupo Titânio apresentou deiscência de sutura e infecção associada a 5 fêmures, sendo 2 aos 14 dias e 3 aos 60 dias(Figura 13), enquanto que os animais do grupo PDO apresentaram integridade de tecido mole e satisfatória condição de reparo femoral. Além disso visualmente foi possível observar a formação de um tecido reparacional maior no grupo PDO do que no grupo Titânio, especialmente aos 60 dias.

**FIGURA 13 – Imagem ilustrativa de coleção purulenta evidenciando infecção em fêmur do grupo Titânio**



Fonte: Autor, 2021

### 4.2 Análise com tecidos calcificados

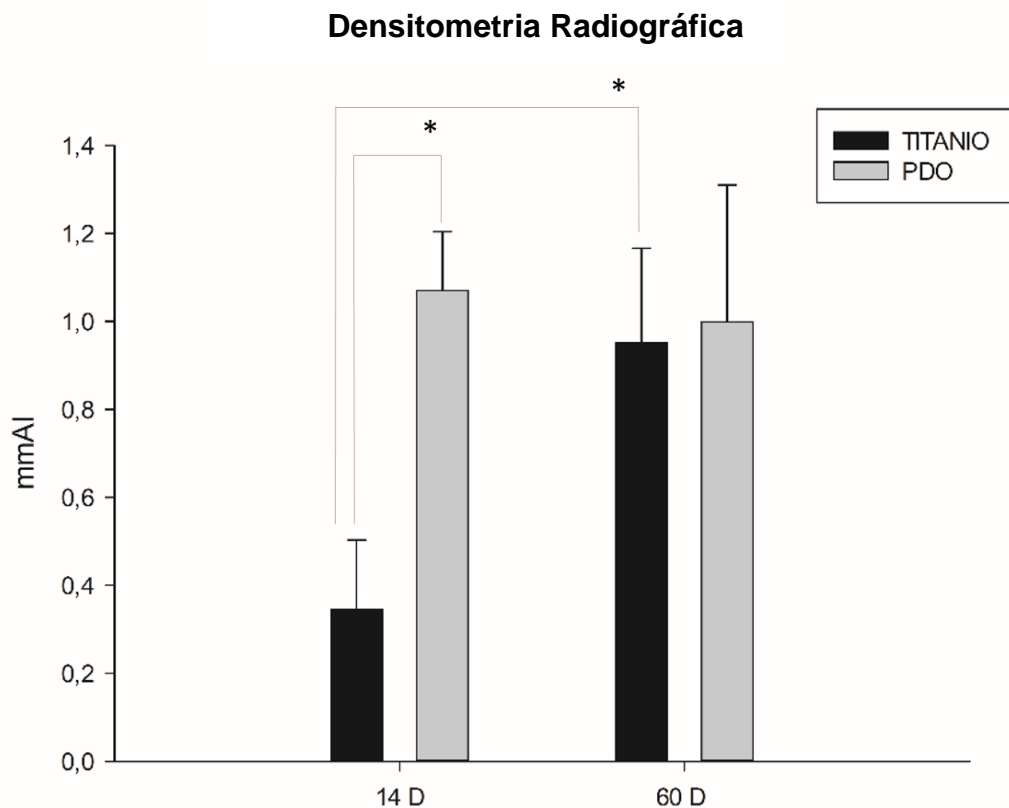
#### 4.2.1 Análise da densitometria radiográfica por meio do programa computacional ODR-ATA

A análise da densitometria nas radiografias, por meio do programa ODR-ATA, demonstrou que para o grupo PDO (PDO 14D:  $1,070 \pm 0,133813$ ) (PDO 60D:  $1,000 \pm 0,31042$ ) houve uma superioridade com relação a densidade óssea, quando comparado ao grupo titânio (Ti 14D:  $0,346 \pm 0,157256$ ) (Ti 60D:  $0,952 \pm 0,215668$ ),

observando-se diferença estatística significativa no período de 14 dias ( $p < 0,001$ ) (Figura 14).

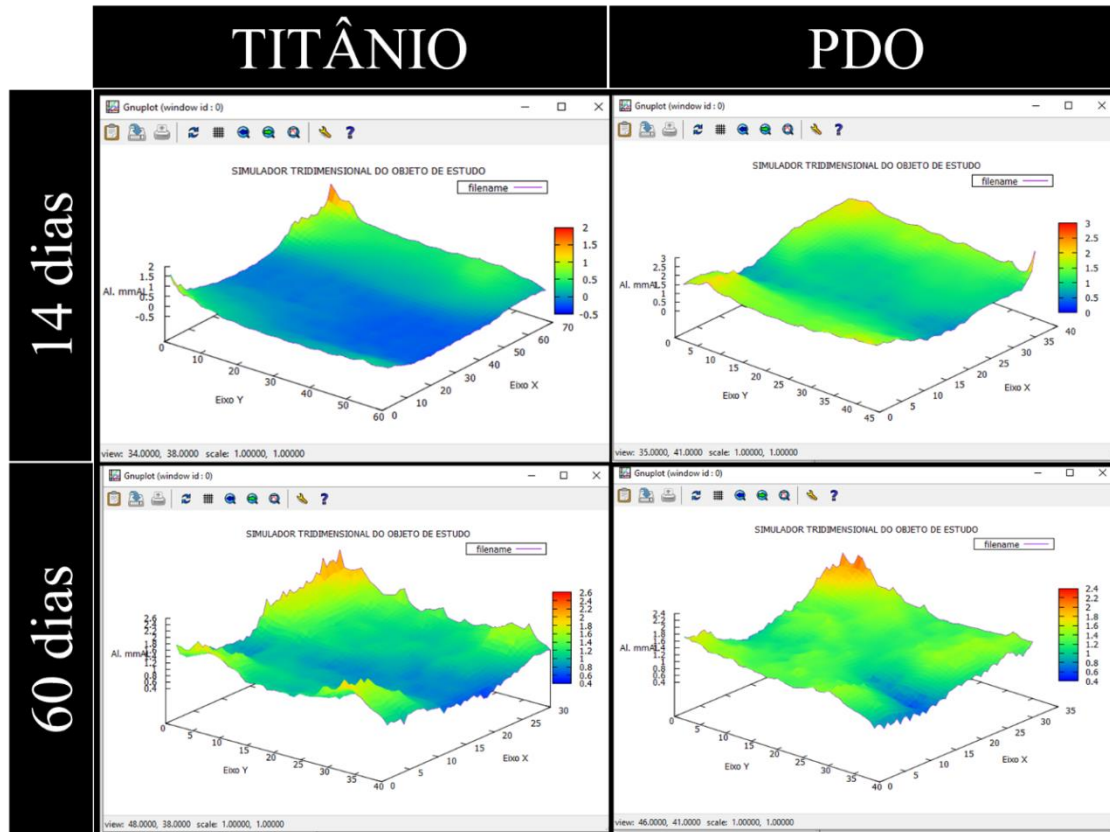
A reconstrução da área de defeito ósseo crítico por meio do “Simulador tridimensional do objeto de estudo” possibilitou observar que para o grupo PDO, já nos primeiros 14 dias pós-operatórios há a formação de uma ponte de tecido ósseo entre os cotos, a qual é finalizada aos 60 dias após a cirurgia de ressecção e reconstrução no fêmur. Já o grupo titânio, além de apresentar menor formação óssea aos 14 dias, demonstrou ter um padrão mais atrasado também aos 60 dias, sem ter a formação completa de uma ponte de tecido ósseo ao final do período observado (Figura 15).

**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\* ( $p < 0,001$ )**



Fonte: Autor, 2021

**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



Fonte: Autor, 2021

### 4.3 Análise com tecidos descalcificados

#### 4.3.1 Análise histológica

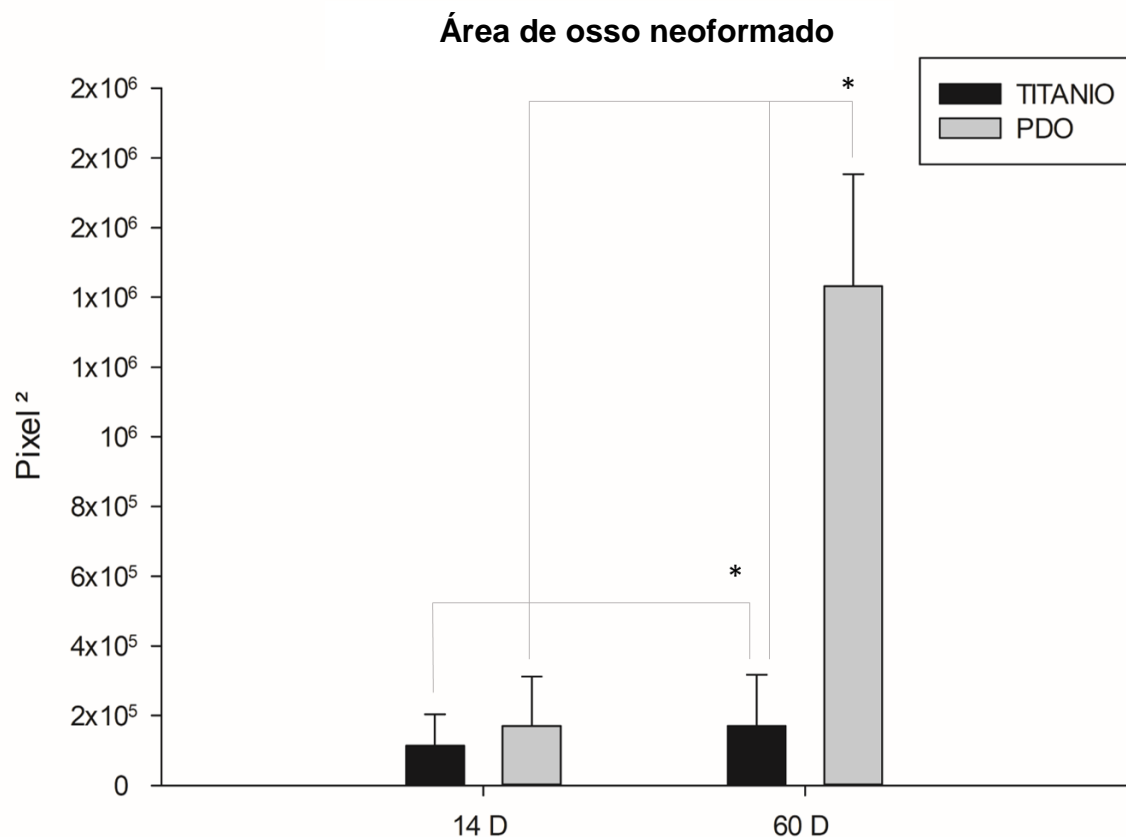
##### 4.3.1.1 Área de tecido ósseo neoformado

A avaliação quantitativa do tecido ósseo demonstrou que nas amostras de 14 dias, tanto para o grupo Titânio ( $113744,8 \pm 89837,54$ ) quanto para o grupo PDO ( $170872 \pm 140801,2$ ), já existem regiões de neoformação óssea entremeadas nas fibras da esponja de colágeno, que serviu como carreadora da proteína rhBMP-2. Em ambos grupos houve formação óssea mais pronunciada ao tempo de 60 dias, quando comparado a 14, inclusive apresentando maior maturação do tecido ósseo, com maior número de osteócitos e maior volume de matriz mineralizada (Figura 18), observou-se também diferença estatística em ambos grupos: grupo titânio ( $P = 0,038$ ) e grupo

PDO ( $P < 0,001$ ). Além disso, nota-se maior formação e maturação óssea para o grupo PDO ( $1431613 \pm 322218$ ), especialmente com relação a amostra de 60 dias, quando comparado ao grupo Titânio para o mesmo tempo ( $170668,5 \pm 146354,8$ ) ( $P = 0,002$ ). (Figuras 16, 17 e 18).

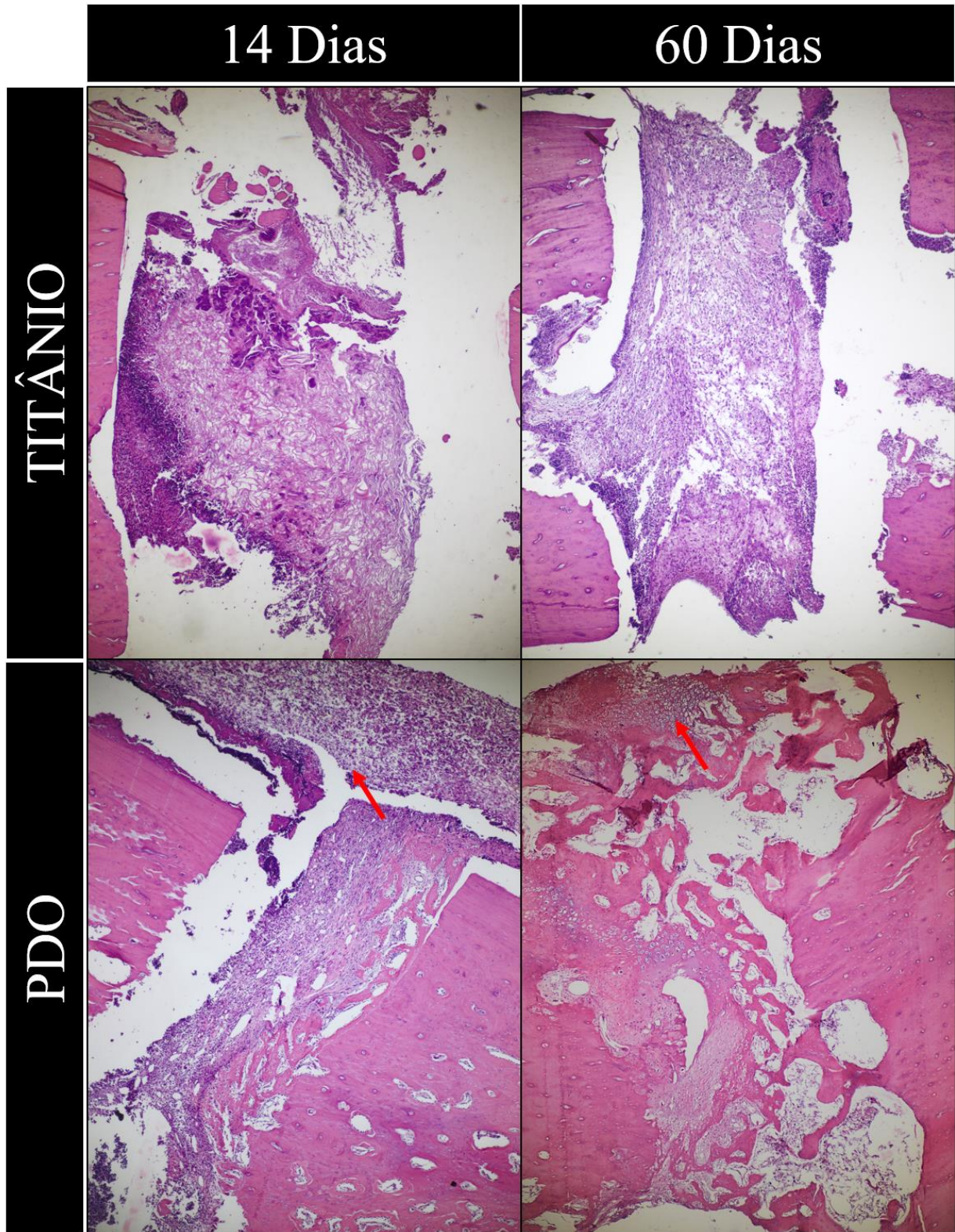
Outro aspecto que se pode observar nas imagens representativas é uma porção do “Scaffold” de PDO próxima a região de defeito ósseo, com boa parte de sua integridade aos 14 dias e em processo de absorção nas amostras de 60 dias (Figura 17).

**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  $*(p < 0,001)$**



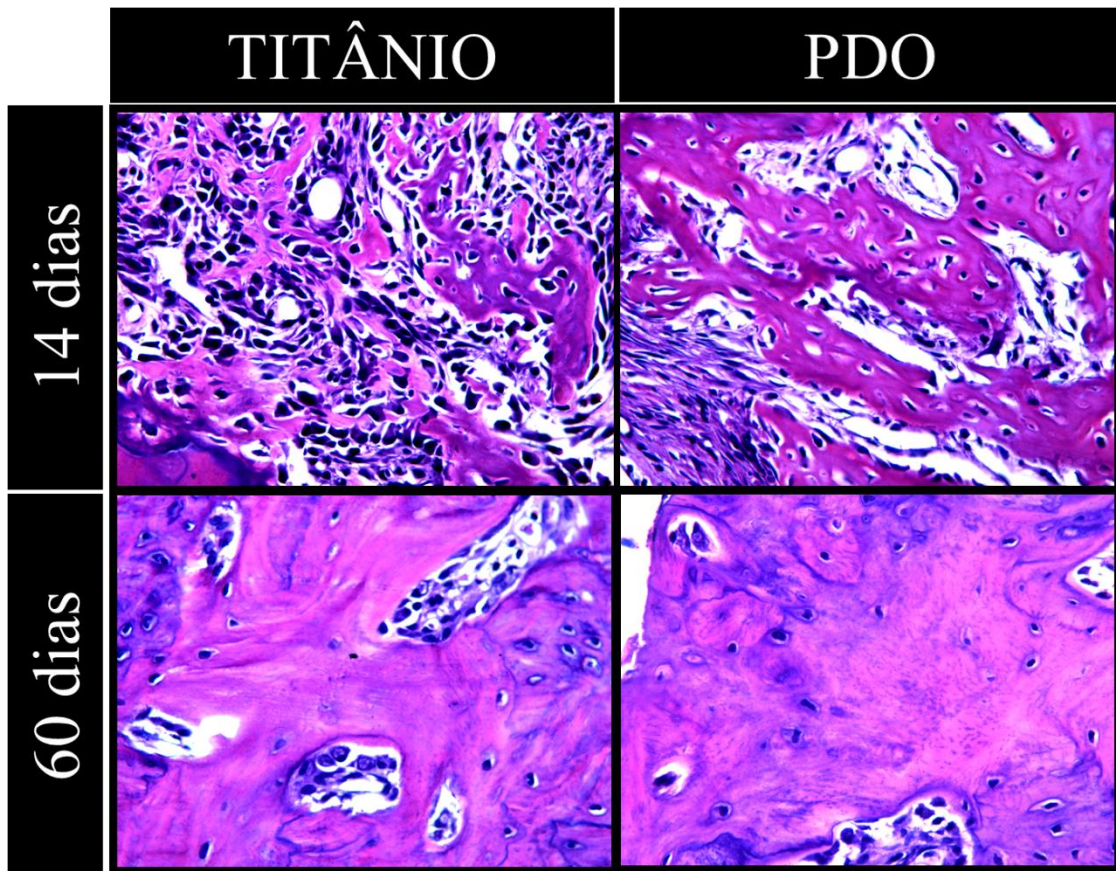
Fonte: Autor, 2021

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



Fonte: Autor, 2021

**FIGURA 18** – Imagem em aumento de 40x demonstrando maior maturação e organização tecidual para o grupo PDO, em ambos os períodos



Fonte: Autor, 2021

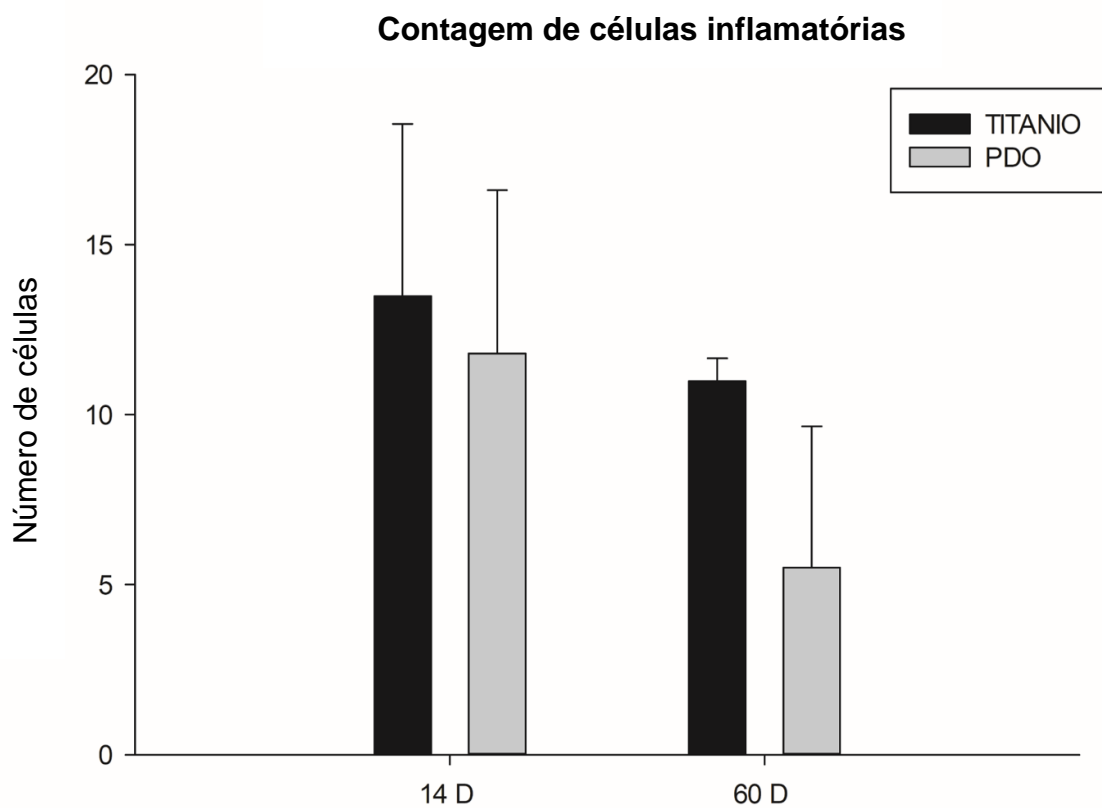
#### 4.3.1.2 Perfil inflamatório

A contagem de células inflamatórias, com ênfase nos linfócitos, e do número de vasos sanguíneos em todos os grupos experimentais, possibilitou a avaliação do perfil inflamatório. Com isso, observou-se que o grupo Titânio (Ti 14D:  $13,49 \pm 5,057911$ ) (Ti 60D:  $10,99333 \pm 0,665006$ ) apresentou maior número de linfócitos em ambos os períodos quando comparado ao grupo PDO (PDO 14D:  $11,798 \pm 4,804177$ ) (PDO 60D:  $5,495 \pm 4,165$ ), especialmente aos 60 dias. Além disso, observou-se que para ambos os grupos, aos 60 dias houve redução do processo inflamatório sem diferença estatística para nenhuma das comparações (Figura 19).

Nas imagens representativas é possível observar que para o grupo Titânio, as regiões de tecido conjuntivo se apresentam com infiltrado inflamatório mais intenso, bem celularizado e com fibras colágenas, características presentes em um tecido em reparo. Já nas imagens do grupo PDO, se observa que mesmo na região de tecido

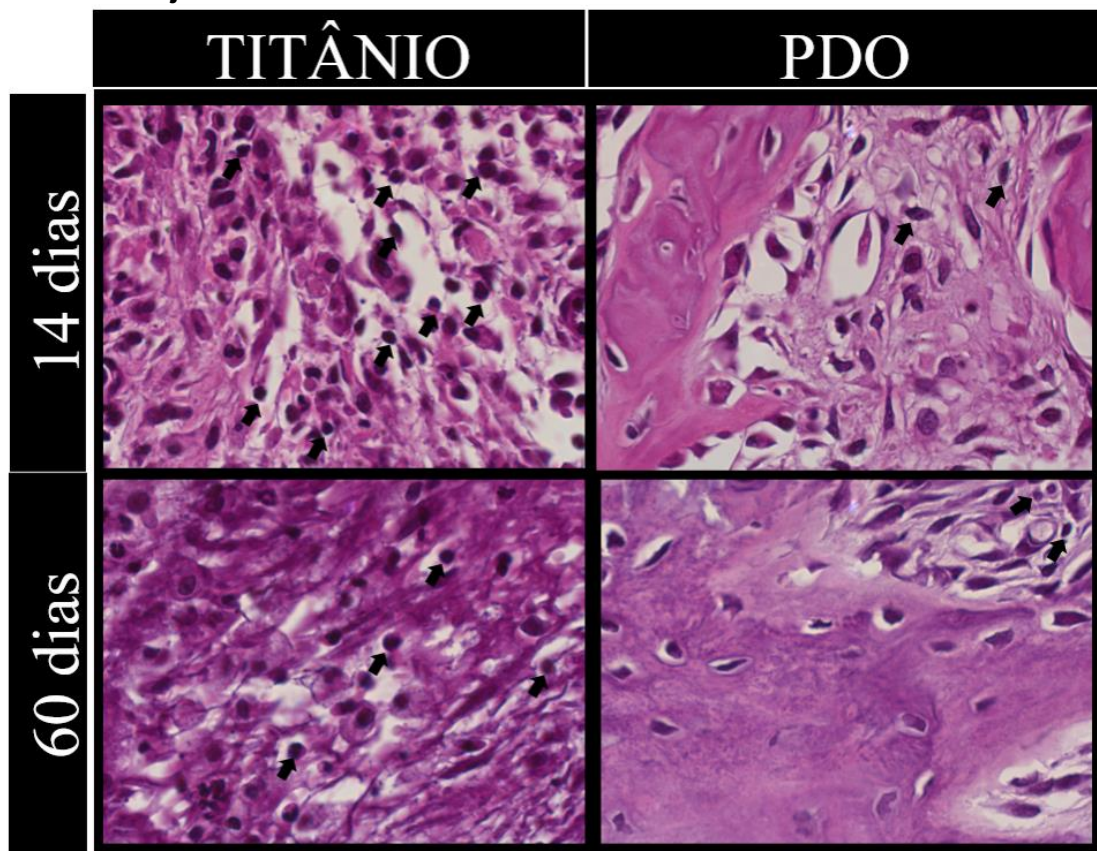
conjuntivo, há regiões com tecido ósseo em desenvolvimento ou até mesmo completamente desenvolvido, sem características de reparo tecidual em andamento, sendo encontrada baixa quantidade de células inflamatórias e fibras de colágeno, bem como característica de um tecido mais organizado (Figura 20).

**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.**



Fonte: Autor, 2021

**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

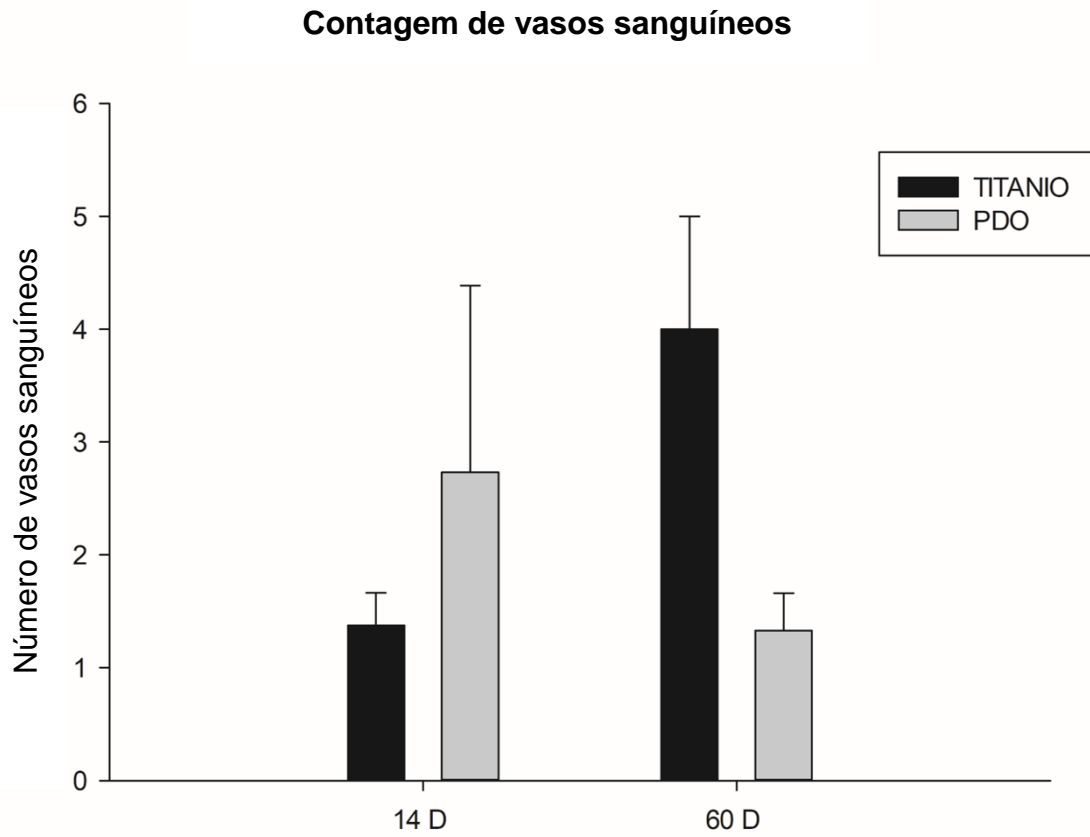


Fonte: Autor, 2021

Por sua vez, a contagem de número de vasos sanguíneos, também associada ao perfil inflamatório do tecido, demonstrou valores maiores para o grupo PDO aos 14 dias (PDO 14D  $2,73 \pm 1,657981$ ) quando comparado ao grupo Titânio (Ti 14d  $1,375 \pm 0,287228$ ), e aos 60 dias é observado o oposto, com números mais expressivos de vasos sanguíneos para Titânio (Ti 60D  $4 \pm 1$ ) (PDO 60D  $1,33 \pm 0,33$ ) sem diferença estatística para ambas comparações. (Figura 21).

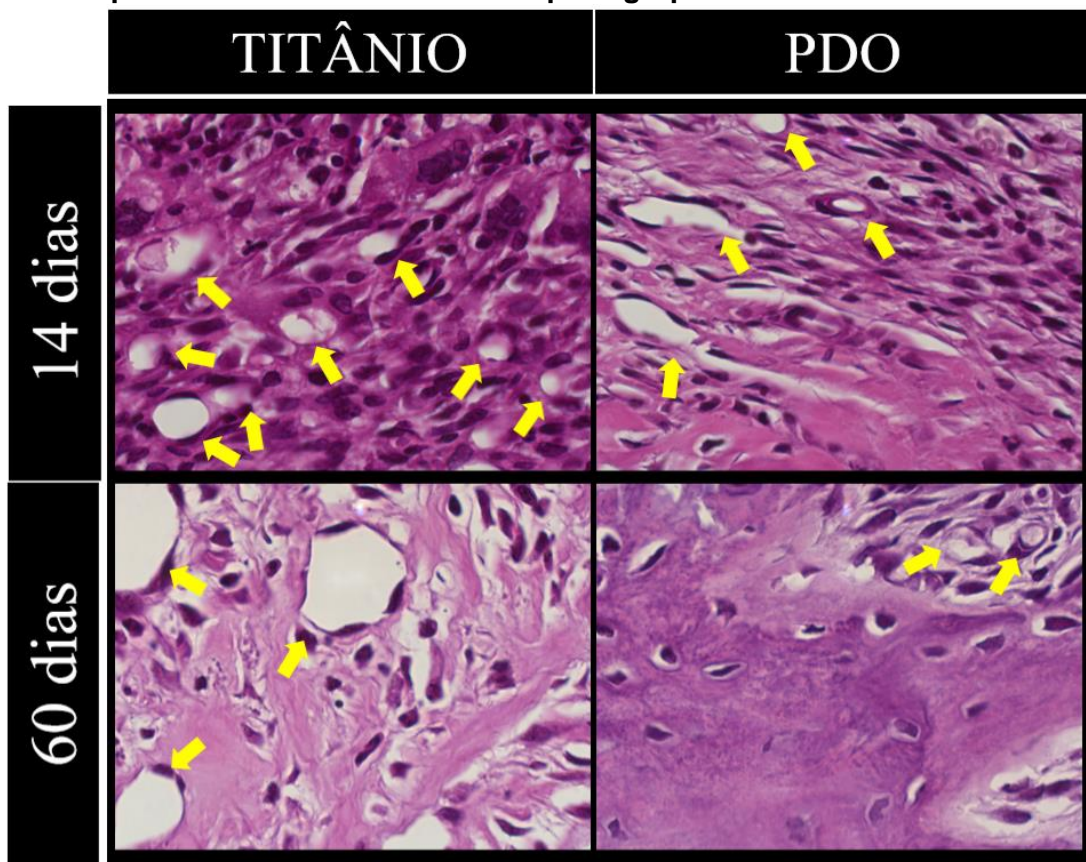
Nas fotomicrografias tem-se um reforço desses resultados, com presença de maior número de vasos para o grupo PDO aos 14 dias e Titânio aos 60 dias (Figura 22).

**FIGURA 21 - Número de vasos sanguíneos, demonstrando melhores resultados para o grupo PDO, especialmente no período de 14 dias sem diferença estatística.**



Fonte: Autor, 2021

**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.

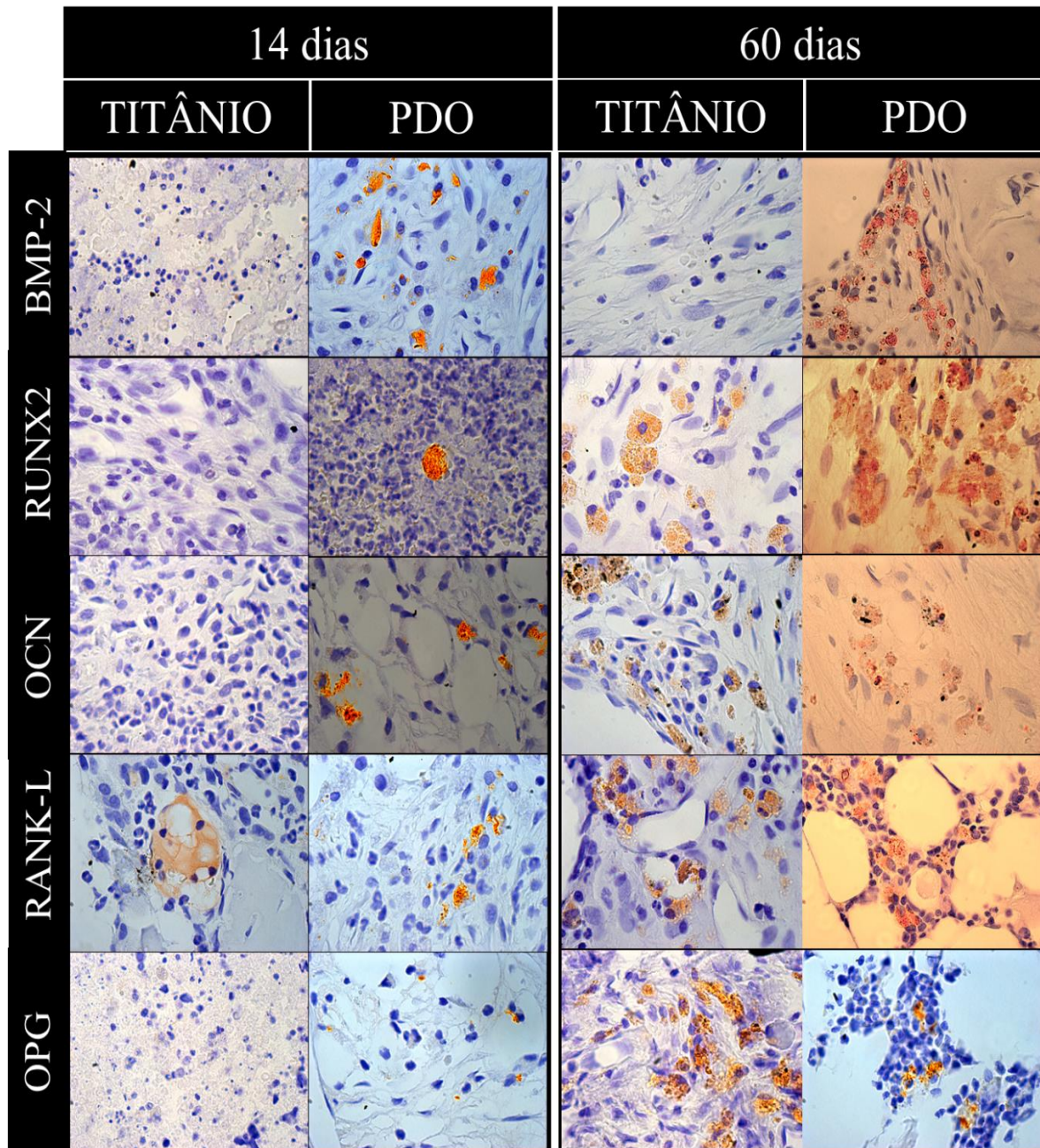


Fonte: Autor, 2021

#### 4.3.2 Análise Imunoistoquímica

Por meio da análise imunoistoquímica através da avaliação das proteínas bmp-2, RUNX2, osteocalcina (OCN), RANK-L e osteoprotegerina (OPG), na imagem representativa, é possível observar que, de um modo geral, houve resultados com maiores áreas de imunomarcção para os anticorpos relacionados à osteogênese para o grupo PDO, quando comparado ao grupo titânio (Figura 23).

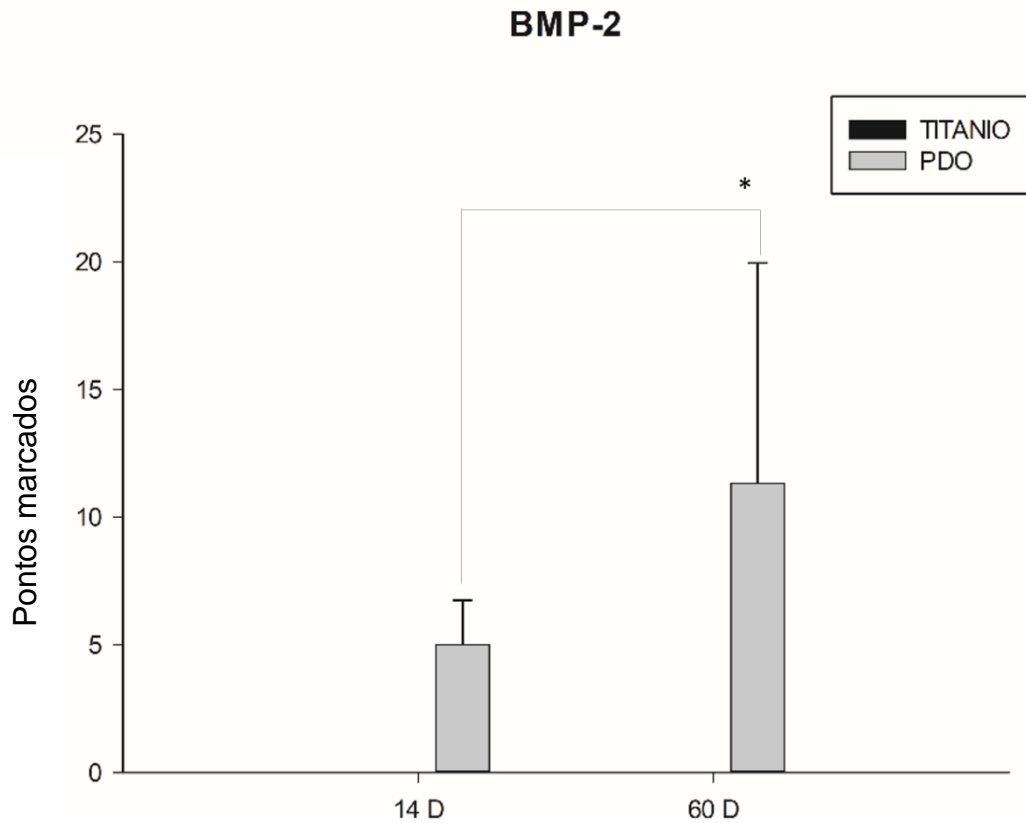
**FIGURA 23** – Imagens representativas das marcações pela imunistoquímica, demonstrando o padrão de marcação para os grupos experimentais, em 14 e 60 dias. As imunomarcações são representadas pela coloração amarronzadas nas células e tecidos.



Fonte: Autor, 2021

Com relação a proteína bmp-2, observou-se que não houve marcação para os grupos titânio, enquanto que para PDO (PDO 14D:  $5 \pm 1,732051$ ) (PDO 60D:  $11,33333 \pm 8,621678$ ) houve marcação, com diferença estatisticamente significativa aos 60 dias ( $p=0,014$ ) (Figura 24).

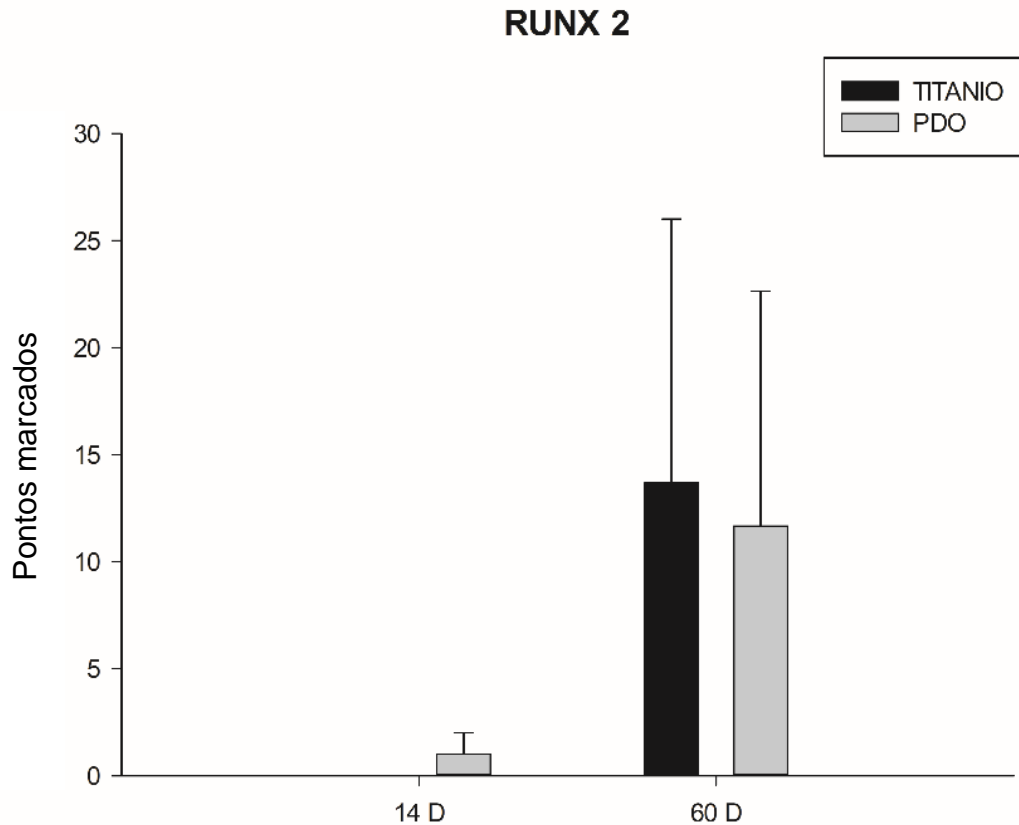
**FIGURA 24 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcção para bmp-2, em células e matriz extracelular, demonstrando que não houve marcação para o grupo titânio, enquanto que para PDO ocorreu, inclusive com diferença estatística aos 60 dias \*(p=0,014)**



Fonte: Autor, 2021

Para RUNX2 houve uma marcação maior para PDO (PDO 14D:  $1 \pm 1$ ), em relação ao titânio que não apresentou marcação no período de 14 dias, de modo que esse quadro se inverte no período de 60 dias, com maior marcação para o grupo titânio (Ti 60D:  $13,66667 \pm 12,34234$ ) em comparação ao PDO (PDO 60D:  $11,66667 \pm 10,96966$ ), sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) (Figura 25).

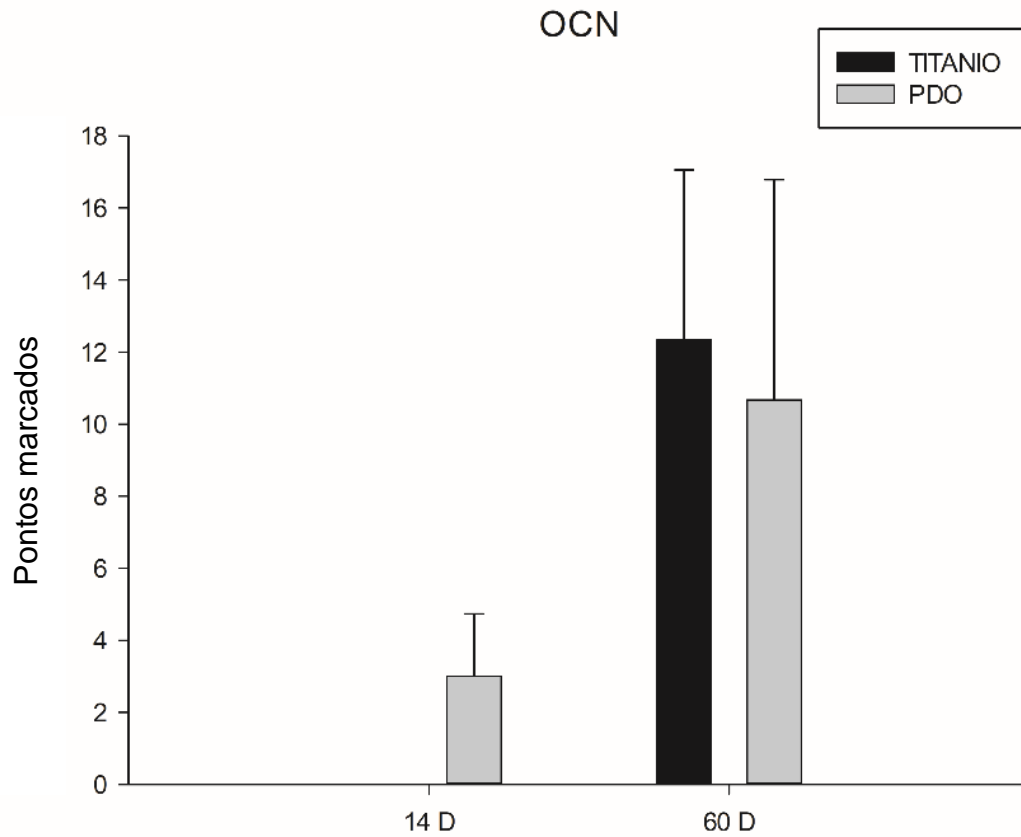
**FIGURA 25 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcção para runx2, em células e matriz extracelular, para os grupos titânio e PDO, nos períodos de 14 e 60 dias sem diferença estatística.**



Fonte: Autor, 2021

Com relação a OCN, aos 14 dias não houve marcação para o grupo titânio, enquanto que para a PDO houve (PDO 14D:  $3 \pm 1,732051$ ), porém, aos 60 dias ocorreu uma marcação maior para o grupo Titânio (Ti 60D:  $12,33333 \pm 4,725816$ ) do que para PDO (PDO 60D:  $10,66667 \pm 6,110101$ ), mas sem diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 26).

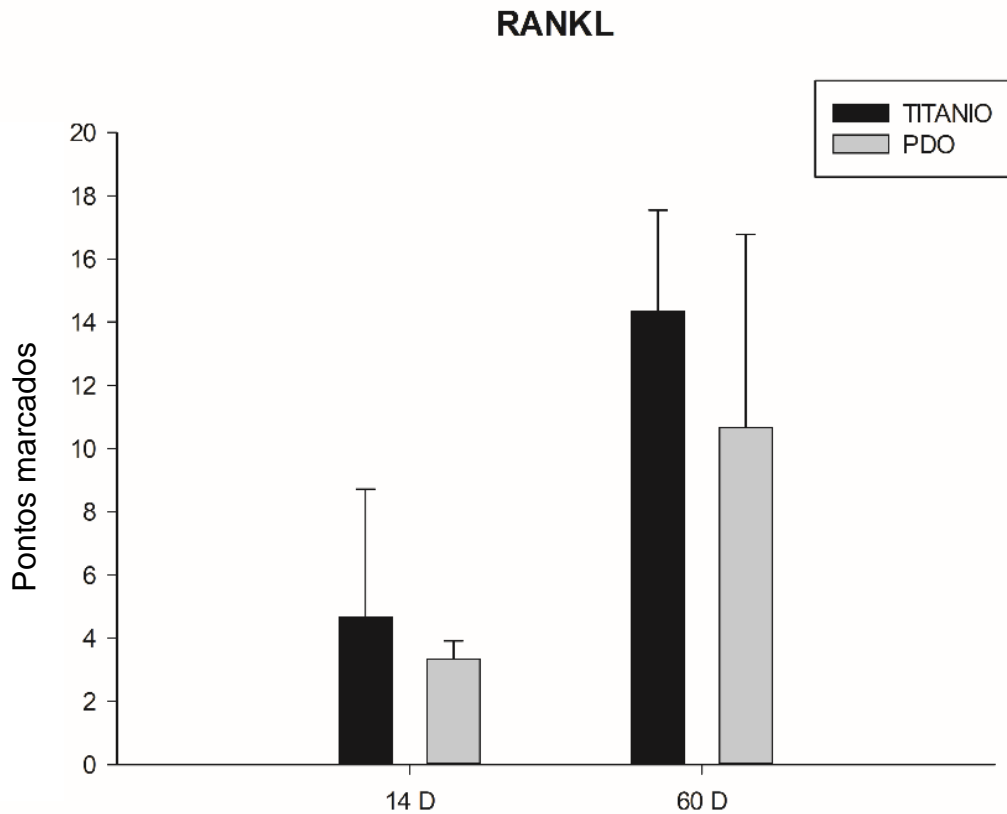
**FIGURA 26 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcção para OCN, em células e matriz extracelular, para os grupos titânio e PDO, nos períodos de 14 e 60 dias sem diferença estatística.**



Fonte: Autor, 2021

As marcações para RANK-L foram semelhantes entre os grupos titânio (Ti 14D:  $4,666667 \pm 4,041452$ ) (Ti 60D:  $14,333333 \pm 3,21455$ ) e PDO (PDO 14D:  $3,333333 \pm 0,57735$ ) (PDO 60D:  $10,66667 \pm 6,110101$ ), entretanto se observa uma tendência de maior marcação para o grupo titânio, sem diferença estatística. (Figura 27).

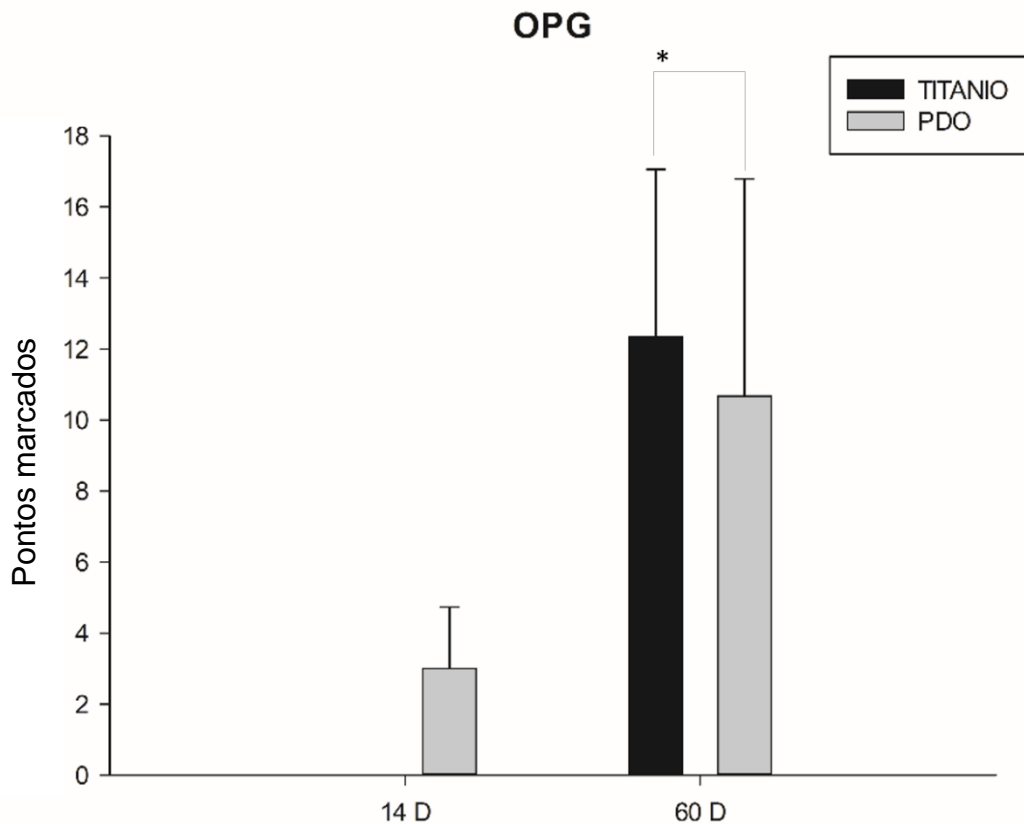
**FIGURA 27 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcção para RANK-L, em células ósseas, para os grupos titânio e PDO, nos períodos de 14 e 60 dias sem diferença estatística.**



Fonte: Autor, 2021

Para OPG, apesar de não ocorrer marcação para o grupo titânio aos 14 dias, no período de 60 dias (Ti 60D:  $16,66667 \pm 0,57735$ ) (PDO 14D:  $1 \pm 1$ ) houve marcação superior ao PDO (PDO 60D:  $6,66667 \pm 3,785939$ ), também com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Figura 28).

**FIGURA 28 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcção para OPG, em células ósseas, para os grupos experimentais, demonstrando marcação mais acentuada para o grupo titânio no período de 60 dias ( $p < 0,001$ )**



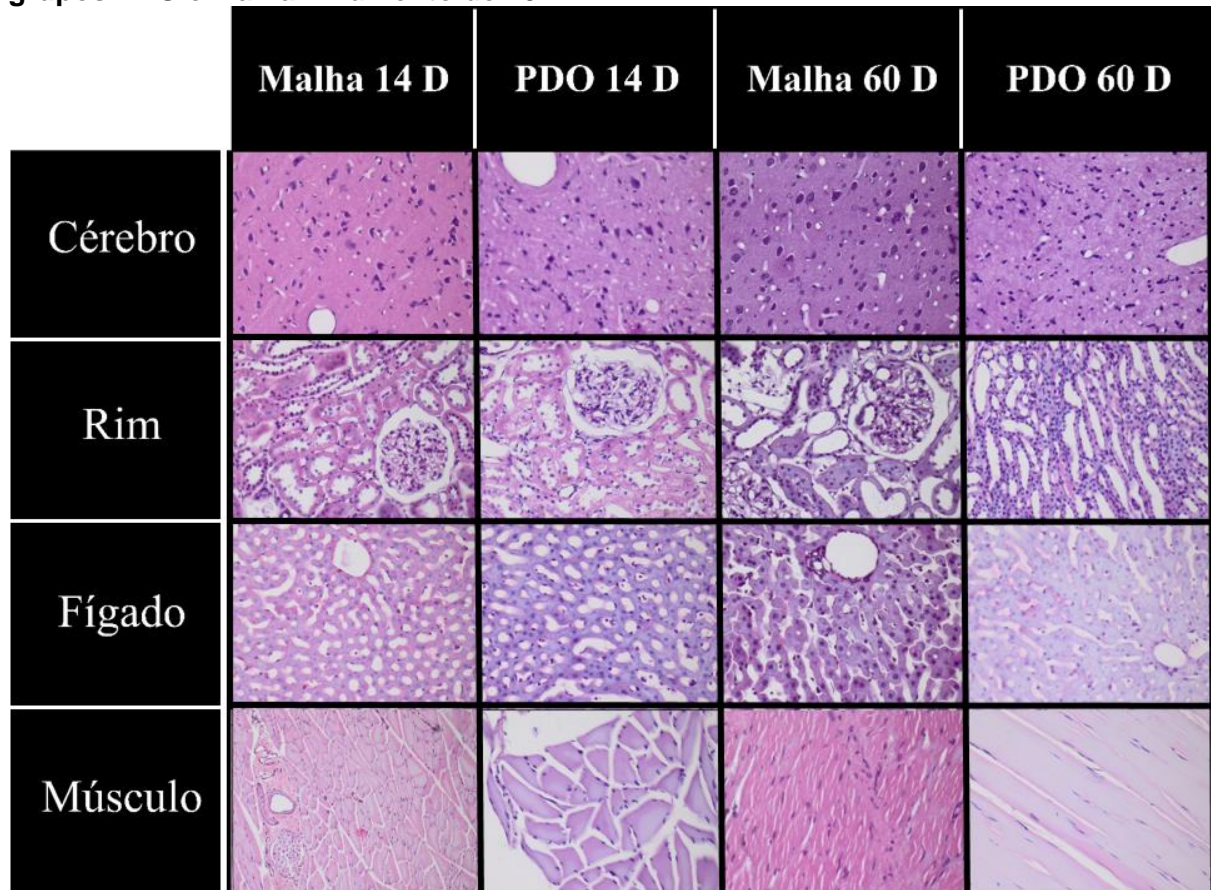
Fonte: Autor, 2021

#### 4.4 Biópsia de órgãos de absorção e metabolização

Através da análise qualitativa dos espécimes de órgãos de metabolização biopsiados, evidenciou-se aspecto de normalidade para o cérebro, com presença de células da glia, corpos neurais, fibras nervosas, prolongamentos celulares e substância branca sem quaisquer alterações dignas de nota. O fígado apresentou estrutura celular caracterizando normalidade dos tecidos, com presença de hepatócitos e lóbulos hepáticos. O pulmão apresentou seus elementos estruturais íntegros e dentro dos padrões alveolares, com células e vãos sanguíneos. O rim mostrou normalidade de número, distribuição e organização de corpúsculo e células renais. Por fim, o tecido muscular adjacente a reconstrução femoral também foi analisada com o intuito de avaliar se houve transferência de íons advindos da malha de Titânio, ou presença acentuada de tecido inflamatório em ambos grupos e

evidenciou-se aspecto de normalidade de disposição e número de fibras musculares. (Figura 29)

**FIGURA 29 – Figuras representativas dos órgãos de absorção e metabolização dos grupos PDO e Malha – Aumento de 40x.**



Fonte: Autor, 2021

#### 4.4 Análise subcutânea

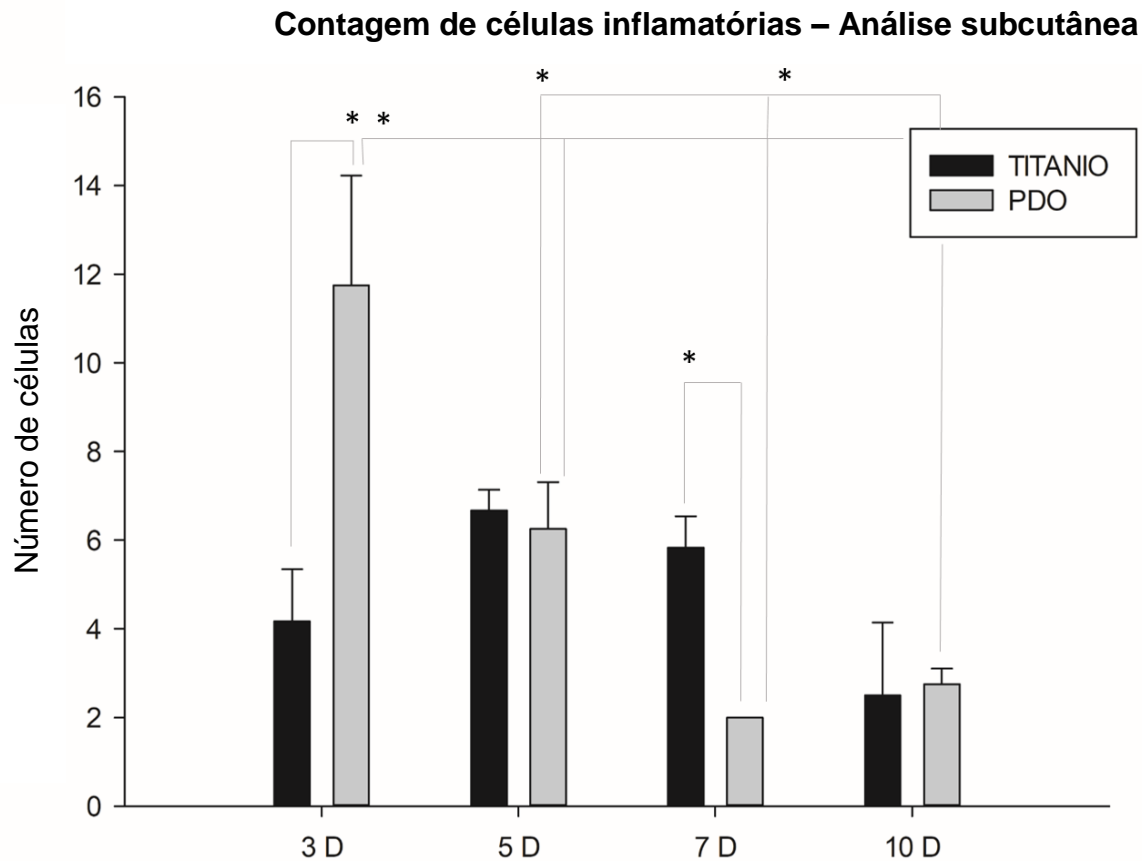
Para análise de biocompatibilidade, através da avaliação quantitativa do número de células inflamatórias observou-se aos 3 dias, maior infiltrado inflamatório para o grupo PDO (PDO 3D:  $11,75 \pm 2,474874$ ), quando comparado ao grupo Titânio (Ti 3D:  $4,165 \pm 1,180868$ ) apresentando diferença estatística ( $p < 0,001$ ), inclusive quando comparado ao grupo PDO para os demais tempos: 5 dias (PDO 5D:  $6,25 \pm 1,06066$ ) ( $p = 0,009$ ), 7 dias (PDO 7D:  $2 \pm 0$ ) ( $p < 0,001$ ) e 10 dias (PDO 10D:  $2,75 \pm 0,353553$ ) ( $p < 0,001$ ).

Aos 5 e 7 dias, o grupo Titânio (Ti 5D:  $6,665 \pm 0,473762$ ) (Ti 7D:  $5,83 \pm 0,707107$ ) apresentou maior infiltrado inflamatório quando comparado ao PDO para os respectivos tempos, obtendo diferença estatisticamente significativa apenas aos 7 dias ( $p = 0,015$ ). Além disso observou-se valores expressivos para o grupo PDO aos 5 dias quando comparados ao mesmo grupo, nos tempos de 7 ( $p = 0,026$ ) e 10 dias ( $p = 0,044$ ) com diferença estatística para ambos. Observa-se também uma redução significativa de células inflamatórias a medida que o tempo de análise aumenta, para ambos grupos.

Por fim, aos 10 dias observa-se uma inversão do perfil inflamatório, mostrando a presença mais expressiva de células inflamatórias no grupo PDO em relação ao grupo Titânio (Ti 10D:  $2,495 \pm 1,647559$ ). (Figura 30 e 32)

Além disso, através de análise semiquantitativa para avaliação de biocompatibilidade observou-se igualdade dos escores para todos os grupos e tempos, uma vez que todos eles apresentaram menos de 25 células inflamatórias por região amostral, configurando escore 1.

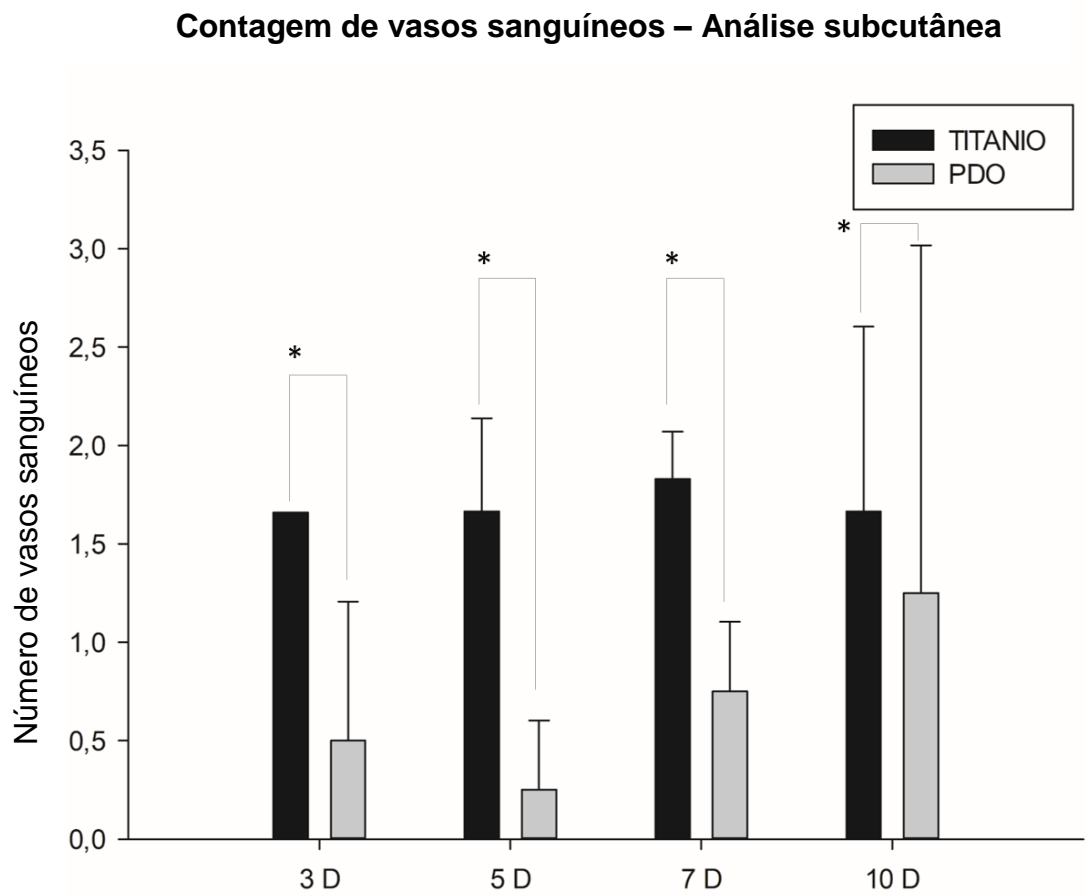
**FIGURA 30 – Representação gráfica da média do número de células inflamatórias no tecido subcutâneo no tempo de 3, 5, 7 e 10 dias**



Fonte: Autor, 2021

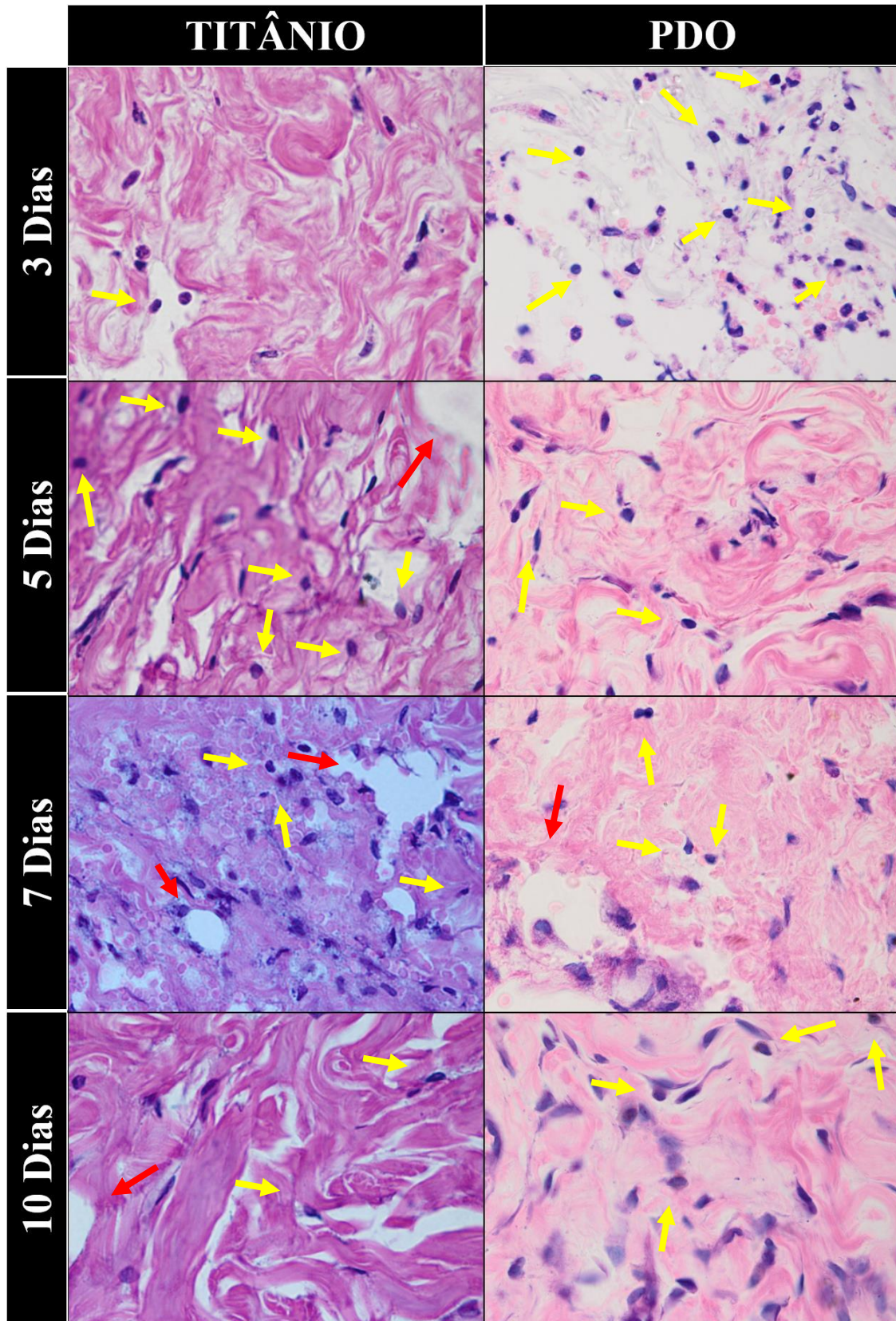
Para análise quantitativa da biocompatibilidade também foi observado o número de vasos sanguíneos. Dessa maneira, o grupo titânio obteve números mais expressivos quando comparado ao grupo PDO em todos os tempos, obtendo diferença estatisticamente significativa para todos eles. (Ti 3D:  $1,66 \pm 0$ ) (PDO 3D:  $0,5 \pm 0,707107$ ) ( $p= 0,033$ ); (Ti 5D:  $1,665 \pm 0,473762$ ) (PDO 5D:  $0,25 \pm 0,353553$ ) ( $p= 0,033$ ); (Ti 7D:  $1,83 \pm 0,240416$ ) (PDO 7D:  $0,75 \pm 0,353553$ ) ( $p= 0,033$ ); (Ti 10D:  $1,665 \pm 0,940452$ ) (PDO 10D:  $1,25 \pm 1,767767$ ) ( $p= 0,033$ ). (Figura 31 e 32)

**FIGURA 31** – Representação gráfica da média do número de vasos sanguíneos no tecido subcutâneo no tempo de 3, 5, 7 e 10 dias



Fonte: Autor, 2021

**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)



## 5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo pré-clínico foi avaliar o potencial bioativo de “scaffolds” de polidioxanona (PDO) associado a rhBMP-2, nas reconstruções ósseas após e ressecção de fêmures em ratos. Observou-se que o grupo PDO apresentou uma otimização no reparo do tecido ósseo, com formação e maturação tecidual adiantada em comparação ao grupo titânio, no qual também há a presença da proteína rhBMP-2 associada a uma malha de titânio convencional. Por este motivo, a hipótese nula apresentada pelo estudo foi rejeitada.

As reconstruções de grandes ressecções ósseas são consideradas problemáticas e de difícil resolução, tanto na ortopedia, cirurgia plástica, quanto na cirurgia bucomaxilofacial, visto que as grandes perdas ósseas geralmente estão associadas ao comprometimento de funções essenciais à qualidade de vida do indivíduo.(45) Nesse contexto, as perdas ósseas em região de maxila e mandíbula, que podem ocorrer por diferentes etiologias, causam ao paciente dificuldades principalmente relacionadas a fonação e a mastigação, levando a busca por tratamentos seguros e eficazes com um objetivo final de reabilitar a função e estética e garantir que hajam melhores condições funcionais e psicológicas para o paciente.(46)

Atualmente, a busca por materiais e terapêuticas que apresentem capacidade osteoindutiva é exponencial, com o intuito de reduzir as morbidades associadas a cirurgia, acelerar o período de recuperação do paciente, reduzir tempo de internação, reduzir os riscos de complicações e ter resultados mais satisfatórios.(47, 48) Diante disso, a proteína rhbmp-2, tem sido grande objeto de estudo, uma vez que apresenta características osteoindutivas, favorecendo a regeneração óssea através da ativação de mitoses, quimiotaxia, diferenciação de linhagens de células mesenquimais além de possuir propriedades imunoreguladoras.(49, 50)

Sua formulação é líquida e sua meia vida na corrente sanguínea é de apenas alguns minutos,(51) dessa maneira deve ser administrada junto de outro material que seja responsável pela sua adsorção. Para isso a esponja de colágeno é amplamente utilizada para esse fim, uma vez que possui formato similar a um favo de mel, favorecendo a incorporação de até 90% da proteína, garantindo sua liberação lenta, sendo concluída em até 10 dias, bem como a estabilização do coágulo e migração de

células progenitoras para seu interior.(16) Porém sua desvantagem é a ausência de rigidez estrutural suficiente para manutenção tridimensional dos materiais utilizados na reconstrução, levando ao colapamento de tecidos moles e conseqüentemente prejuízos no ganho de altura óssea.(20)

Dentro desse contexto, a malha de titânio vem sendo amplamente utilizadas como arcabouço, com a finalidade de estabilização dos materiais reconstrotores e para atuar como guia para a neoformação óssea. Há na literatura inúmeros relatos da associação de rhBMP-2, com aloenxertos e malha de titânio(49) porém, além de não possuir propriedades que favoreçam a liberação lenta da rhBMP-2, a principal complicação decorrente dessa associação é a deiscência de sutura, levando a casos de infecção e conseqüente insucesso, além da demanda de um segundo estágio cirúrgico para remoção do material, uma vez que é não-reabsorvível, e também são responsáveis pela liberação de resíduos metálicos e oferecem fraca adesão de sua superfície ao tecido adjacente.(21) Essas complicações foram evidenciadas neste estudo, através da análise clínica, onde foi possível observar recorrentes casos de deiscência de sutura no grupo titânio, seguido de quadros de infecção, com formação de abscessos. A análise do perfil inflamatório corrobora com esse dado, uma vez que se observou um expressivo número de células inflamatórias aos 14 e 60 dias, quando comparado ao grupo PDO.

Com o intuito de suprir essas deficiências sugere-se a PDO, seja capaz de aumentar a adsorção da proteína e aumentar sua meia vida, devido as sua característica hidrofílica e o maior peso molecular atingido através da técnica de eletrospinning, além de que, o controle dos poros obtidos por meio desta técnica torna possível controlar a distribuição dos filamentos do polímero, tornando sua superfície similar a matriz extracelular, com característica de semi-permeabilidade, atuando como barreira seletiva para a migração de células do tecido mole em direção ao defeito.(30) O eletrospinning torna possível controlar a espessura desejada, garantindo a estabilização da arquitetura macroscópica da reconstrução, evitando colapamento de tecidos moles, além de ser um material reabsorvível, concluindo sua hidrólise em aproximadamente seis meses, tempo esperado para a consolidação de defeitos ósseos.(27) Além disso, esta degradação não gera produtos tóxicos, sendo os metabólitos excretados pelo trato respiratório e intestinal.(26)

Apesar de já se ter o conhecimento de que o uso de malha de titânio em associação com rhbmp-2 gera bons resultados na reparação do tecido ósseo, atribuiu-se essa atividade osteoindutora totalmente a presença do fator de crescimento, visto que a malha de titânio atua apenas como um arcabouço biocompatível mas que não apresenta qualquer bioatividade.(8, 19, 52) Estudos *in vitro* já têm demonstrado que além de ter importantes funções físicas, como a manutenção do espaço em reparo, impedindo colapso e invasão de tecidos moles, a PDO também possui uma atividade osteocondutora, de modo a otimizar o reparo ósseo quando comparado a malha de titânio, como também confirmado no presente estudo.(26, 29, 53)

Clinicamente foi possível observar que a PDO cumpre a proposta de realizar a manutenção tridimensional do defeito e guiar a formação óssea, como foi visto nos espécimes de fêmur coletados após eutanásia, onde o grupo PDO apresentou calo ósseo bem delimitado. Além disso o potencial de acelerar o reparo ósseo, foi evidenciado nesse estudo, visto que já aos 14 dias de pós-operatório observou-se, histologicamente, a formação de tecido ósseo para ambos os grupos experimentais e com uma maturação avançada para o grupo PDO, observada por meio da característica de redução do número de células inflamatórias, aumento da deposição de matriz e melhor organização tecidual.(54, 55) Com relação a avaliação quantitativa do tecido ósseo, observou-se maior neoformação para o grupo PDO, em ambos os tempos experimentais e com diferença estatisticamente significativa no período de 60 dias.

Na avaliação da densidade do tecido ósseo, observou-se que no período de 14 dias, o grupo PDO apresentou uma densidade radiográfica significativamente maior do que o grupo titânio. Isso demonstra que nos períodos mais iniciais do reparo ósseo já se tem, para a associação do “scaffold” de PDO com a rhBMP-2, um tecido ósseo mais mineralizado, de modo que essa característica se mantém até os momentos mais avançados do reparo. Este fato tem uma grande importância clínica, visto que um tecido ósseo de maior resistência em períodos iniciais pode garantir a manutenção do volume tridimensional alcançado pela reconstrução e por conseguinte permitindo aceleração do processo reabilitador e retorno precoce das funções mastigatórias para um paciente que sofreu reconstrução de um grande defeito em mandíbula.

Com relação ao perfil inflamatório, com ênfase na contagem de linfócitos e verificação do número de vasos sanguíneos, observou-se que para o grupo titânio,

houve maior número de linfócitos em ambos tempos. Embora a inflamação seja parte do processo de reparo ósseo, quando há a presença de infiltrado inflamatório exacerbado, conseqüentemente haverá a formação de um tecido reparacional desorganizado levando a um atraso na cicatrização, como foi observado também na análise histológica para avaliação de maturação do tecido ósseo. Além disso há estudos que apontam que a rhBMP-2 atua de forma imunomodulatória, controlando a resposta inflamatória inicial. Dessa maneira podemos observar que o aumento da meia vida da rhBMP-2 proporcionado pelo PDO repercutindo de forma positiva no processo inflamatório e conseqüentemente na otimização do reparo.(3, 49)

Apesar do titânio ser um material biocompatível, a liberação de íons metálicos pode estar associada a um efeito de citotoxicidade, o que pode ser a causa desta diferença entre os grupos.(56, 57) Além disso, alguns estudos já demonstraram que a PDO apresenta um tecido reativo mínimo, sem grandes infiltrados inflamatórios e sem reação de corpo estranho, tanto para períodos de 14 quanto para 60 dias.(58, 59)

Gollapudi et al.(60) observaram que além de ter uma resposta inflamatória mínima, sem perturbar a função fagocítica de monócitos e neutrófilos, secreção de citocinas por monócitos e linfócitos e também as funções das células citotóxicas, especulou-se que a PDO tenha um efeito anti-inflamatório, devido um aumento na interleucina 10 no longo prazo, a qual corresponde a uma interleucina anti-inflamatória por inibir a síntese de citocinas inflamatórias.

Quanto ao número de vasos sanguíneos observou-se valores mais significativos para o grupo PDO aos 14 dias, e para Titânio aos 60 dias. A literatura mostra que a rhBMP-2 é responsável pela liberação de Angiopoietina e fator de crescimento fibroblástico nas primeiras 2 horas, caindo consideravelmente após 8 horas, além do aumento da expressão de VEGF após 24 horas, criando um ambiente favorável a angiogênese, aumentando o número de capilares no defeito ósseo, configurando um reparo adiantado em relação ao grupo titânio, que apenas expressou maior angiogênese aos 60 dias. Dado esse, complementar ao anterior, uma vez que ambos sugerem que a PDO atenda as expectativas de aumentar o tempo de liberação da rhBMP-2.(1)

Os resultados da análise imunoistoquímica corroboram com o perfil inflamatório, visto que as proteínas associadas a atividade osteoclástica, a OPG e

RANKL se apresentaram mais expressas no grupo Titânio. A atividade inflamatória gera uma resposta imunológica, com liberação de fatores pró-osteoclastogênicos, incluindo RANKL.(61, 62) Com isso, ocorre uma reabsorção óssea maior do que o que ocorre em um turnover ósseo normal, o que condiz com os resultados de menor área de formação óssea observado no grupo Titânio. Com a ocorrência de uma reabsorção intensa, tem-se um aumento na liberação de OPG, como o que ocorreu aos 60 dias de pós-operatório, onde a imunomarcação de OPG teve uma diferença estatística significativa em comparação ao grupo PDO.

Com relação aos resultados de imunomarcação da proteína BMP-2, o que se observa é que para o grupo Titânio, a BMP-2 aplicada na região de defeito carregada pela esponja de colágeno, apresentou uma liberação rápida, com efeito concentrado nos períodos iniciais do reparo ósseo. Acredita-se que as perfurações presentes na malha de titânio acabam facilitando este escoamento da proteína do local de interesse, o que difere bastante do “Scaffold” de PDO, que além de não possuir furos, apresenta uma estrutura tridimensional que propicia a adesão de proteínas como a BMP-2, que manteve-se no defeito por mais tempo e foi um fator importante para os resultados satisfatórios associados ao grupo PDO.(30)

A expressão de Runx2, que está relacionada com a regulação de proteínas importantes para a diferenciação de células da linhagem osteogênica,(63, 64) foi ligeiramente maior para PDO nos primeiros 14 dias, entretanto, aos 60 dias o grupo Titânio inverteu esse quadro, o que associado aos resultados de expressão de BMP-2 e a formação de tecido ósseo, leva a especulação de que há um atraso no reparo para este grupo, que diferente de PDO ainda tem formação óssea em andamento. A mesma coisa acontece com a Osteocalcina (OCN), proteína que aparece na fase final do reparo ósseo e que está associada à mineralização deste tecido. Como observado nas imagens representativas de PDO, aos 60 dias já se tem uma maturação e mineralização importante do tecido ósseo, levando-se a acreditar que aos 60 dias, o grupo titânio ainda está em fases intermediárias e finais do reparo, enquanto para PDO boa parte da mineralização do tecido ósseo neoformado já foi concluída.(65)

Além disso, a análise de observação do comportamento biológico dos materiais testados mostrou, através da observação anatomopatológica que nenhum dos materiais sozinhos, sem combinação com outro material osteoindutor, é capaz de induzir a formação de tecidos metaplásicos, de causar deposição de partículas em

órgãos de metabolização e tecidos adjacentes ou de produzir quaisquer resíduos com repercussão sistêmica.

Quanto a análise de biocompatibilidade, observou-se que ambos grupos, nos dois grupos testados, apresentaram baixo escore de inflamação em tecido subcutâneo, contando com maior número de células inflamatórias para o grupo PDO, especialmente no dia 3, reduzindo gradativamente para os demais tempos, devido ao início da hidrólise da cadeia polimérica, enquanto que o grupo titânio apresentou números semelhantes para cada um dos tempos analisados, uma vez que configura um material não reabsorvível. Já no reparo ósseo, observou-se comportamento inverso, de maneira que a PDO aumenta a disponibilidade deste, que possui propriedades anti-inflamatórias, reduzindo o processo inflamatório associado a esse material. O mesmo comportamento inverso é observado a respeito do número de vasos sanguíneos, devido a mesma propriedade da associação da PDO ao rhBMP-2.

As limitações do presente estudo consistem na eleição de uma única espessura do scaffold de polidioxanona, bem como uma única concentração da rhBMP-2, apesar disso, os resultados apresentados neste estudo demonstram que a associação do "Scaffold" de PDO com rhBMP-2 em defeitos críticos em fêmur de ratos, gerou um padrão reparacional bastante favorável quando comparado a reconstrução com malha de titânio e rhBMP-2, sendo observada maior formação e maturação de tecido ósseo, menor inflamação tecidual e uma expressão positiva de proteínas relacionadas a formação e ao turnover do tecido ósseo.

Como proposta para estudos futuros, a influência das diferentes espessuras do scaffold de polidioxanona deve ser testado quanto a sua capacidade de manutenção tridimensional do defeito e o comportamento dessas espessuras no tocante da disponibilidade de substâncias solúveis como rhBMP-2. Além disso, outros estudos acerca da qualidade do osso neoformado, da osseointegração e sobrevivência de implantes instalados na região regenerada, bem como resistência tensional do scaffold para possibilitar a execução de técnicas de enxertia óssea com aumento vertical.

## 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/ $\beta$ -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, Ćuković 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 biomaterials 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  $\beta$ -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