

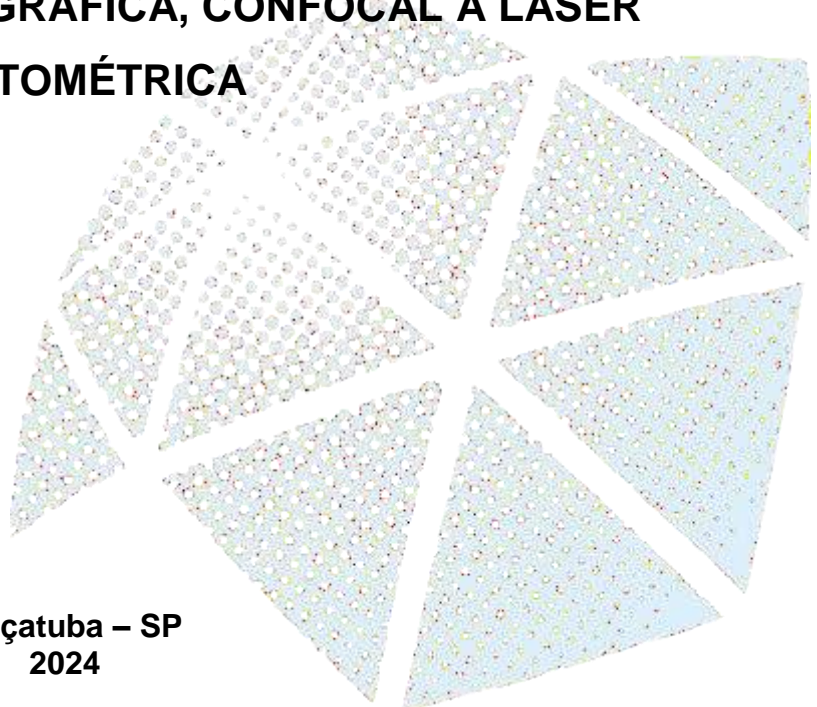


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**HARRISSON LUCHO MAMANI VALERIANO**

**AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE DISPOSITIVO DE  
FIXAÇÃO INTERNA DE POLI (L-LACTÍDEO-CO-D,L-  
LACTÍDEO) PLDLLA INSTALADOS EM TÍBIA DE RATOS.  
ANÁLISES MICROTOMOGRÁFICA, CONFOCAL A LASER  
E HISTOMÉTRICA**

**Araçatuba – SP  
2024**



**HARRISSON LUCHO MAMANI VALERIANO**

**AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE DISPOSITIVO DE  
FIXAÇÃO INTERNA DE POLI (L-LACTÍDEO-CO-D,L-  
LACTÍDEO) PLDLLA INSTALADOS EM TÍBIA DE RATOS.  
ANÁLISES MICROTOMOGRÁFICA, CONFOCAL A LASER  
E HISTOMÉTRICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Profº. Dr. Francisley Ávila Souza

**Araçatuba – SP  
2024**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M263a Mamani Valeriano, Harrisson Lucho.  
Avaliação da incorporação de dispositivo de fixação interna de poli (L-lactídeo-co-D,L-lactídeo) PLDLLA instalados em tíbia de ratos : análises microtomográfica, confocal a laser e histométrica / Harrisson Lucho Mamani Valeriano. - Araçatuba, 2024  
57 f. : il. ; graf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Francisley Ávila Souza

1. Regeneração óssea 2. Dispositivo de fixação 3. Osseointegração 4. Microtomografia por raio-x I. T.

Black D7  
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*Dedicatória*

### **Dedico este trabalho...**

A **Deus**, por me permitir seguir cumprindo meus sonhos e me manter com saúde e vida.

A minha amada mãe **Inés**, fonte inesgotável de amor, inspiração e apoio. Obrigado por cada palavra de encorajamento, por tua paciência e sacrifício. Obrigado por ser a minha guia e minha maior admiradora! Esta conquista é tanto sua como minha.

Ao meu querido pai **Lúcio** in memoriam, pelo amor, sabedoria e apoio incondicional, que foi minha maior inspiração e modelo nesta trajetória acadêmica. Obrigado pelo impacto eterno que você teve em minha vida.

Aos meus queridos irmãos **Jeffersson e Ericksson**, companheiros de vida e cúmplices em cada passo desta jornada. Seu amor incondicional, apoio constante e a alegria que compartilhamos têm sido meu refúgio durante esta trajetória acadêmica. Agradeço por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidava. Esta conquista é de todos nós. Levo-os no meu coração em cada página deste trabalho!

*Agradecimentos  
especiais*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. FRANCISLEY ÁVILA SOUZA**, pelo carinho, sabedoria, dedicação e paciência que teve comigo. Obrigado pela acolhida e transmissão de conhecimento precisos durante tudo meu desenvolvimento no curso de mestrado. Receba meu profundo respeito e admiração pelo profissionalismo e dedicação com que realiza suas atribuições.

Ao **Prof. Dr. IDELMO RANGEL JÚNIOR**, por servir de modelo em minha vida acadêmica e profissional. Um profissional completo além de ser um grande cirurgião, uma ótima pessoa. Receba minha sincera gratidão e meu profundo respeito pela oportunidade de compartilhar nestes dois anos, e por guiar minha formação e desenvolvimento no âmbito científico e profissional. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. PAULO SERGIO PERRI DE CARVALHO**, referência em odontologia, exemplo de caráter, humildade e dedicação. Obrigado pela oportunidade e confiança de realizar este grande trabalho de pesquisa, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos. Receba os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade oferecida, pela paciência e dedicação no decorrer destes dois anos.

Ao **Prof. Dr. ANDRÉ LUIS DA SILVA FABRIS**, pelo profissionalismo, amizade, ensinamentos e informações transmitidas. Recebe os meus sinceros agradecimentos pelo carinho, incentivo e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao **Prof. Dr. LEONARDO PEREZ FAVERANI**, por mostrar-me que experiência e juventude podem caminhar juntas. A minha sincera gratidão pelos valiosos ensinamentos, pelo carinho e pelo exemplo de dedicação e competência. O senhor é um exemplo concreto de que pós-graduação é educação.

Aos demais **professores do departamento de Cirurgia**, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dra. Ana Paula Bassi, Prof. Dra. Daniela Ponzoni, Prof. Dra. Alessandra Aranega. Obrigado por tanto conhecimento fornecido com quem eu tive a oportunidade de operar com todos eles, de coração muito obrigado pela ajuda.

Aos meus colegas de mestrado, **VINICIUS GANZAROLI, CAROLINE MARCHIOLLI, LAURA PALUDETTO, LUANA OLIVEIRA, MONIQUE GONÇALVES** com quem compartilhei tantos momentos felizes nesta etapa de pós-graduação, e a **MARIA EDUARDA** quem ajudou ativamente no meu projeto de pesquisa e quem foi sempre uma boa amiga para mim.

Ao meu grupo de pesquisa **HENRIQUE e ANA FLÁVIA** por sempre estar presentes e ter me ajudado em cada etapa do meu projeto de pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

Ao meu amigo e colega **NELSON PADILHA SILVA**, pela parceria, pela ajuda constante, pelo compromisso e luta diária de realizar esta pesquisa juntos. Receba meus sinceros agradecimentos.

À minha amiga de pós-graduação **LAIS KAWAMATA DE JESUS**, pelo companheirismo e ajuda de sempre de forma disposta. Receba minha admiração pela sua determinação e capacidade de manter um bom ambiente de trabalho. De coração muito obrigado.

À minha amiga de pós-graduação **MAISA PEREIRA DA SILVA**, pela disponibilidade em ajudar sempre e por contribuir na realização deste trabalho. Receba meu muito obrigado pela amizade e pela ajuda nas análises estatísticas.

À minha amiga da pós-graduação **LETICIA GABRIELLA DE SOUZA RODRIGUES**, por sua cumplicidade e simpatia. Obrigado pela confiança, partilha de conhecimentos e ensinamentos transmitidos durante o período de convivência. Receba minha admiração por sua competência, dedicação e honestidade.

Ao irmão que me deu Brasil, **PAULO MATHEUS HONDA TAVARES**, obrigado pelo carinho e parceria que criamos juntos ao longo desses 2 anos de pós-graduação, por ser um bom amigo e cuidar de mim. Receba minha admiração por seu profissionalismo, competência e honestidade.

Ao grande amigo e colega **MATEUS DIEGO PAVELSKI**, pela ajuda constante da parte clínica de cirurgia oral menor e implantodontia. Obrigado pelo seu profissionalismo, parceria, carinho e confiança de operarmos juntos nestes últimos dois anos.

Aos alunos de iniciação científica, Luis Fernando Alves, Kézia Barbosa, Lilian Matos, Júlia Bão, Maria Fernanda Bessi, Beatriz Medeiros, Beatriz Costa, Anna Luisa Perri, Ana Laura Galvão e Brittnie Johnson, pela ajuda e compromisso com as pesquisas. Obrigado.

Aos **FUNCIONÁRIOS DO LABORATÓRIO DE CIRURGIA E AMIGOS:**

Marco, Renato, Fausto e Paulo, obrigado pelo feliz convívio e ajuda fornecida durante esses 2 anos de pós-graduação. Meus agradecimentos por sempre me ajudarem nos trabalhos laboratoriais. Recebam minha profunda admiração por sempre auxiliarem nos trabalhos logísticos, permitindo o atendimento clínico à população.

*Agradecimientos*

## AGRADECIMENTOS

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** - Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP e seus representantes, senhor diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e do senhor, vice-diretor Prof. Ass. Luciano Tavares Angelo Cintra, do senhor Prof. Tit. Wirley Gonçalves Assunção, como coordenador do programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade de ser aluno desta tão renomada instituição, onde cada um que faz parte tem consciência e faz jus ao legado que carrega.

Ao Programa Nacional de Becas y Créditos Educativos – **PRONABEC – PERÚ** pela concessão da bolsa “Beca Generación de Bicentenario”, a qual foi fundamental para realização de trabalhos de pós-graduação e para progresso da ciência.

A **Faculdade de Odontologia de Araraquara** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr/UNESP) em nome da Técnica Sônia Zanetti e ao laboratório de Físico/Química.

Ao **Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** – UNESP, e ao grande amigo Sr. João Batista, responsável pelo suporte, apoio e amizade no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao **Laboratório de Multiusuário** - Sala de Microtomografia Computadorizada na pessoa do Professor Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Aos funcionários da **Santa Casa de Araçatuba, Unimed Araçatuba e Unimed Birigui**, pela oportunidade, respeito e educação que sempre mantiveram com a nossa equipe. Aos pacientes, agradeço sinceramente pela confiança depositada e pela oportunidade de aprender e evoluir ao lado de cada um de vocês.

Aos **animais**, in memoriam, que de forma silenciosa, contribuíram para o avanço da ciência. Em busca do conhecimento, reconhecemos a grande importância de sua participação. Seus sacrifícios não passam despercebidos.

*"O sucesso não é a chave para a felicidade. A felicidade é a chave para o sucesso. Se você ama o que faz, você será bem-sucedido." -*

*Albert Schweitzer*

MAMANI VALERIANO, H. L. **Avaliação da incorporação de dispositivo de fixação interna de poli (L-lactídeo-co-D,L-lactídeo) PLDLLA instalados em tíbia de ratos. Análises microtomográfica, confocal a laser e histométrica.** 2024. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

## RESUMO

A proposição do trabalho foi avaliar o processo de incorporação óssea de dispositivo de fixação interna manufaturados de poli (L-lactídeo-co-D,L-lactídeo) PLDLLA instalados em tíbia de ratos. 32 ratos Wistar machos foram distribuídos em 4 períodos, sendo 8 animais por período. Cada animal recebeu 1 dispositivo de fixação interna em forma de parafuso (2x6mm) aleatoriamente nas suas tíbias direita ou esquerda. Nos animais do período de 28 e 42 dias foram aplicados Fluorocromos de calceína e vermelho de alizarina. Após períodos de 7, 14, 28 e 42 dias os animais foram eutanasiados, e os espécimes foram submetidos a análise microtomográfica e Histomorfométrica. Nos espécimes dos períodos de 28 e 42 dias realizou-se a microscopia confocal a laser. Os valores obtidos foram submetidos a análise estatística. Na porcentagem de volume ósseo ( $P=0,006$ ), Volume ósseo ( $P=0,006$ ), números e separação trabecular ( $P<0,001$ ), contato dispositivo de fixação/osso (BIC) em região Cortical ( $P<0,001$ ) e medular ( $P=0,003$ ) em 28 e 42 dias foram maiores que 7 e 14 dias. A Área óssea Neoformada (NBA) cortical em 42 dias apresentou-se maior formação quando comparado a 7 e 14 dias ( $P=0,022$ ). A NBA medular e confocal a laser não foram observadas nenhuma diferença estatística. Conclui-se que o dispositivo de fixação interna de PLDLLA foi biocompatível e permitiu neoformação óssea ao redor das espiras.

**Palavras-chave:** 1. Regeneração óssea 2. Dispositivos de Fixação Interna 3. Osseointegração 4. Microtomografia por raio-x

MAMANI VALERIANO, H. L. **Evaluation of the incorporation of internal fixation devices made of poly (L-lactide-co-D,L-lactide) PLDLLA installed in rat tibiae. Microtomographic, laser confocal, and histometric analyses.** 2024. 52 f. Dissertation (Master's Degree) - School of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

## **ABSTRACT**

The aim of the study was to evaluate the bone incorporation process of internal fixation devices manufactured from poly(L-lactide-co-D,L-lactide) (PLDLLA) installed in the tibiae of rats. Thirty-two male Wistar rats were distributed into 4 periods, with 8 animals per period. Each animal randomly received 1 internal fixation device in the form of screws (2x6mm) in either their right or left tibia. Calcein and alizarin red fluorochromes were applied to the animals in the 28- and 42-day periods. After 7, 14, 28, and 42 days, the animals were euthanized, and specimens were subjected to microtomographic and histomorphometric analysis. Confocal laser microscopy was performed on specimens from the 28- and 42-day periods. The obtained values were subjected to statistical analysis. In terms of bone volume percentage ( $P=0.006$ ), bone volume ( $P=0.006$ ), trabecular number and separation ( $P=<0.001$ ), bone-implant contact (BIC) in cortical ( $P<0.001$ ) and medullary ( $P=0.003$ ) regions at 28 and 42 days were higher than at 7 and 14 days. Cortical new bone area (NBA) at 42 days showed greater formation compared to 7 and 14 days ( $P=0.022$ ). No statistical differences were observed in medullary NBA and confocal laser microscopy. It is concluded that the PLDLLA internal fixation device was biocompatible and allowed for bone neoformation around the spirals.

**Keywords:** Bone Regeneration. Internal Fixation Devices. Osseointegration. MicroCT.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cirurgia Experimental. A: Anestesia Geral. B: Dergemação com Iodopovidona. C: Anestesia local infiltrativa para hemostasia local. D: Incisão dermoperiosteal de espessura. E: Descolamento e exposição da área cirúrgica. F e G: Fresagem. H: Instalação do dispositivo de fixação interna de 2 x 6mm. I: Dispositivo de fixação Instalado. J: Defeitos e seus respectivos tratamentos executados.

J: Sutura.....2  
0

Figura 2 - Dia 0 representa o procedimento cirúrgico, a linha azul pontilhada representa os períodos de eutanásia, a linha verde representa a aplicação de calceína nos períodos de 28 e 42 dias, a linha laranja representa a aplicação de alizarina nos períodos de 28 e 42 dias.....22

Figura 3 - Seleção do volume de interesse (VOI) pelo software DataViewer.....24

Figura 4 - No software CTan, após seleção do número de cortes padronizados (230), a região de interesse foi delimitada com a ferramenta Round.....25

Figura 5 - No software CTan, o thresholds foi padronizado com intervalo de 55-250, para posterior análise tridimensional e quantificação do osso neoformado.....26

Figura 6 - A: Posicionamento no recipiente para inclusão em resina TechnoVit ®. B: Identificação dos recipientes. C: Inclusão de Resina após polimerização com as peças incluídas. D: Fotopolimerização. E: Resina após polimerização com as peças incluídas. F e G: Individualização das amostras.....27

Figura 7 - H: Lâminas montadas para corte na região central do defeito utilizando a serra do Exakt. I: Prensa adesiva à vácuo (sanduicheira) em funcionamento para preparação da lâmina de estudo. J: Serra do sistema Exakt em funcionamento. K: Checagem da espessura das amostras após desgaste.....28

Figura 8 - Medidas traçadas no canal medular a serem analisadas usando a ferramenta de Straight Line or freehands no software ImageJ .....	29
Figura 9 - Delimitação da área Cortical e Medular a ser analisada usando a ferramenta de Segmented Line or freehand no software ImageJ.....	30
Figura 10 - Médias de porcentagem do volume ósseo em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada (P= 0,006) .....	3
3	
Figura 11 – Gráficas das médias do volume ósseo em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada (P = 0,006) .....	3
4	
Figura 12 - Gráficas das médias de número de trabéculas em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada (P= <0,001) .....	3
5	
Figura 13 - Gráficas das médias de espessura trabecular em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada (P = 0,008) .....	3
6	
Figura 14 - Gráficas das médias de separação trabecular em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada (P =<0,001) .....	3
7	
Figura 15 - Imagens dos 4 períodos 7,14, 28 e 42 dias obtidos no Software CTVox .....	3
8	
Figura 16 - Gráfico demonstrando as médias de Taxa de Aposição Mineral MAR nos períodos de 28 e 42 dias, obtidos através da análise Confocal a Laser (P=0,925) .....	3
9	

Figura 17 - Gráfico demonstrando as médias de Contato dispositivo de fixação /Osso Área Cortical em todos os períodos, obtidos através da análise histométrica (P<0,001).....	4
0	
Figura 18 - Gráfico demonstrando as médias de Contato dispositivo de fixação /Osso Área Medular em todos os períodos, obtidos através da análise histométrica (P=0,003).....	4
1	
Figura 19 - Gráfico demonstrando as médias de Área Neoformada (NBA) Região Cortical em todos os períodos, obtidos através da análise histométrica (P=0,022).....	4
2	
Figura 20 - Gráfico demonstrando as médias de Área Neoformada (NBA) Região Medular em todos os períodos, obtidos através da análise histométrica (P=0,781).....	4
3	
FIGURA 21 - Imagens dos 4 períodos obtidos no programa Leica Application Suite LAS core. Mostrando a incorporação do dispositivo de fixação aos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias, em aumentativa de 2.5x e coloração de Stevenel's blue e Fucsina acida.....	4
4	

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
ANOVA	Análise de variância
BV	Volume Ósseo
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
C	Carbono
Ca	Cálcio
Cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Ctan	Ctanalyser
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
MAR	Taxa de aposição mineral
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg/Kg	Miligrama por quilo
Mg/kg/dia	Miligrama kilo dia
Mg/L	Miligrama por Litro
Micro-ct	Microtomografia computadorizada
MI	Mililitros
MI/Kg	Mililitro por quilo
Mm	Milímetro
Mol.L-1	Mol Litro
N	Nitrogênio
N.cm	Newton por centímetro
Na	Sódio
NAOH	Hidróxido de Sódio
NBA	Área de osso neoformado
O	Oxigênio
°C	Graus Celsius
p	Nível de significância
P	Fósforo
ph	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido Polilático
PLLA	Poli-L-Lactídeo
PDLA	Poli-D-Lactídeo
PLDLLA	Poli (L-lactide-co-D,L-lactide)
PGA	Ácido Poli-Glicólico
PDS	Polidioxanona
PVP-I	Polivinilpirrolidona - Iodo
ROI	Área ao redor do implante
Rpm	Rotações por minuto
Tb.N	Número de trabéculas

Tb.Sp	Separação das trabéculas
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
TC	Tomografia computadorizada
Ti	Titânio
µm	Micrometro
µA	Microampere

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais e Grupos Experimentais	19
3.1.1 Preparação dos dispositivos de fixação interna em Poli (D, L-ácido láctico)	19
3.1.2 Procedimento Cirúrgico	19
3.1.3 Anestesia	20
3.1.4 Acesso Cirúrgico	21
3.1.5 Osteotomia	21
3.1.6 Instalação dos dispositivo de fixação interna	21
3.1.7 Sutura	21
3.1.8 Prescrição Pós-Operatória	22
3.2 Aplicação dos Fluorocromos	22
3.3 Eutanásia e Coleta do Material	23
3.4. Análise Microtomográfica (Micro-Ct)	23
3.5 Preparação do Material para análises em tecidos mineralizados	26
3.6 Microscopia Confocal a Laser	28
3.7 Análise Histométrica	30
3.8 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	33
4.1 Microtomografia (Micro-Ct)	33
4.1.1. Porcentagem de Volume Ósseo (BV/TV)	33
4.1.2 Volume Ósseo (BV)	34
4.1.3 Número de Trabéculas (Tb.N)	35
4.1.4 Espessura Trabecular (Tb.Th)	36
4.1.5 Separação Trabecular (Tb.Sp)	37
4.1.6 Análise Descritiva Qualitativa	38
4.2 Microscopia Confocal a Laser	39
4.2.1 Taxa de Aposição Mineral (MAR)	39
4.3 Histometria	40
4.3.1 Contato Dispositivo de Fixação /Osso (BIC) Area Cortical	40
4.3.2 Contato Dispositivo de Fixação /Osso (BIC) Area Medular	41

4.3.3 Área Neoformada (NBA) Região Cortical	41
4.3.4 Área Neoformada (NBA) Região Medular	43
4.3.5 Análise Descritiva Qualitativa	44
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	59

*Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO\*

O uso de sistemas de fixação com placas e/ou parafusos de titânio (Ti) para o tratamento de fraturas faciais, cirurgias reconstrutivas e regeneração óssea guiada tem sido largamente empregado, [1] por ser o material de primeira escolha e mais popular no âmbito da especialidade Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial [2]. Este fato ocorre, uma vez que o titânio apresenta boas propriedades físicas, módulo de elasticidade próxima ao do osso humano, baixo índice de complicações e excelente biocompatibilidade [1,3-5].

No entanto, tem havido uma controvérsia ao uso do titânio, devido à necessidade de sua remoção que pode ocorrer de 5 a 40% dos casos, devido estresse mecânico que secundariamente desencadeia em infecções, fratura, sensibilidade do material [3-6], além de risco de restrição de crescimento de ossos de pacientes pediátricos ou até mesmo exposição das placas na cavidade bucal [7-9]. Ressalta-se também que material de osteossíntese em titânio pode interferir na tomografia computadorizada, na ressonância magnética (RM) e aumentar na taxa de complicações em pacientes que recebem radioterapia [2]. Este fato tem levado a necessidade de desenvolvimento de materiais de fixação reabsorvíveis [4,6]. Dentre os materiais reabsorvíveis, encontram-se três componentes principais: o ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-láctico (PLA), e poli-dioxanona (PDS) [10-13]. Esses materiais reabsorvíveis têm a resistência suficiente de fixação e geralmente apresentam degradação bifásica, hidrólise e metabolismo [14,15]. Primeiramente, ocorre a redução do peso molecular, depois a redução da resistência mecânica, seguida da redução da massa [16]. Este processo de degradação permite que o material seja totalmente reabsorvido pelo organismo e substituído por osso neorformado dentro do período de 1 a 5 anos, de modo progressivo até desaparecer [6,15,17].

O polímero ácido poli-láctico é um poliéster alifático que possui 2 isômeros ópticos, o D(-) (dextrógiro) PDLA e o L(+) (levógiro) PLLA [18,19,20]. O PLLA é um material altamente cristalino que se tornou prevalente em meados de 1990 e permanece em uso até os dias atuais [15]. Este material é o mais estável e mais lentamente reabsorvido de todos [21]. O PDLA é outra forma estereoisomérica de

---

\* Formatado de acordo com as Normas para publicação no Periódico Materials - MDPI Journals - <https://www.mdpi.com/journal/materials/instructions>

PLA com uma taxa de degradação mais rápida que o PLLA, além de ser altamente biocompatível [22]. A mistura de L- e D lactídeos resulta em PLDLLA [20] que se apresenta como um polímero amorfo e tem sido o biomaterial preferido para confecção de material de osteossíntese, devido a sua resistência mecânica, propriedades biomecânicas, térmicas, reológicas, biológicas que garantem boa tolerância tecidual [2,19], além de ser radiotransparente [20].

Na Odontologia o uso deste polímero tem sido proposto para regeneração óssea guiada (ROG) na forma de membranas, pinos e parafusos [22] e como material de osteossíntese para fraturas faciais [23,20,24,25], cirurgias reconstrutivas [26] e cirurgia ortognática [27]. Neste sentido, justifica-se a realização desta pesquisa no intuito de avaliar a incorporação óssea de dispositivo de fixação interna de PLDLLA que estão em desenvolvimento por uma empresa nacional, uma vez que estes apresentam propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade termoplástica e propriedades físico-mecânicas apropriadas, além de evitar a necessidade de remoção em cirurgias subsequentes, reduzindo assim o desconforto e os riscos associados a procedimentos adicionais [11,28,29]. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de incorporação de dispositivo de fixação interna manufaturados em polímero Poli (L-lactídeo-co-D,L-lactídeo) PLDLLA instalados em tíbia de ratos, empregando-se análises microtomográfica, confocal a laser e histométrica.

*Objetivo*

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a incorporação de dispositivo de fixação interna manufaturados em Poli (L-lactídeo-co-D,L-lactídeo) PLDLLA instalados em tibia de ratos, empregando-se análises microtomográfica, confocal a laser e histométrica.

*Materiais e Métodos*

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Animais e Grupos Experimentais**

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (CEUA 0335-2022) (Anexo A). O projeto foi delineado de acordo com as diretrizes da ARRIVE guidelines [30].

Para a realização deste trabalho foram utilizados 32 (trinta e dois) ratos machos, adultos, variação *Wistar* fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com aproximadamente três meses de idade, peso corporal em torno de 350 a 450g, mantidos em biotério próprio da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com controle da temperatura e luz do ambiente, alimentados com ração sólida e água *ad libitum*, durante todo o experimento. Para determinação do poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), e com um poder de teste de 80%, sendo definido alpha como 0,05 oito ratos por grupo serão necessários para a finalidade de comparar os diferentes grupos.

Os animais foram enquadrados em 4 (quatro) períodos de eutanásia: 7, 14, 28, 42 dias, compondo 8 (oito) animais por período, e 8 dispositivos de fixação interna em cada período que foram realizadas as análises em tecidos mineralizados (micro tomográfica, microscopia confocal a laser e histométrica).

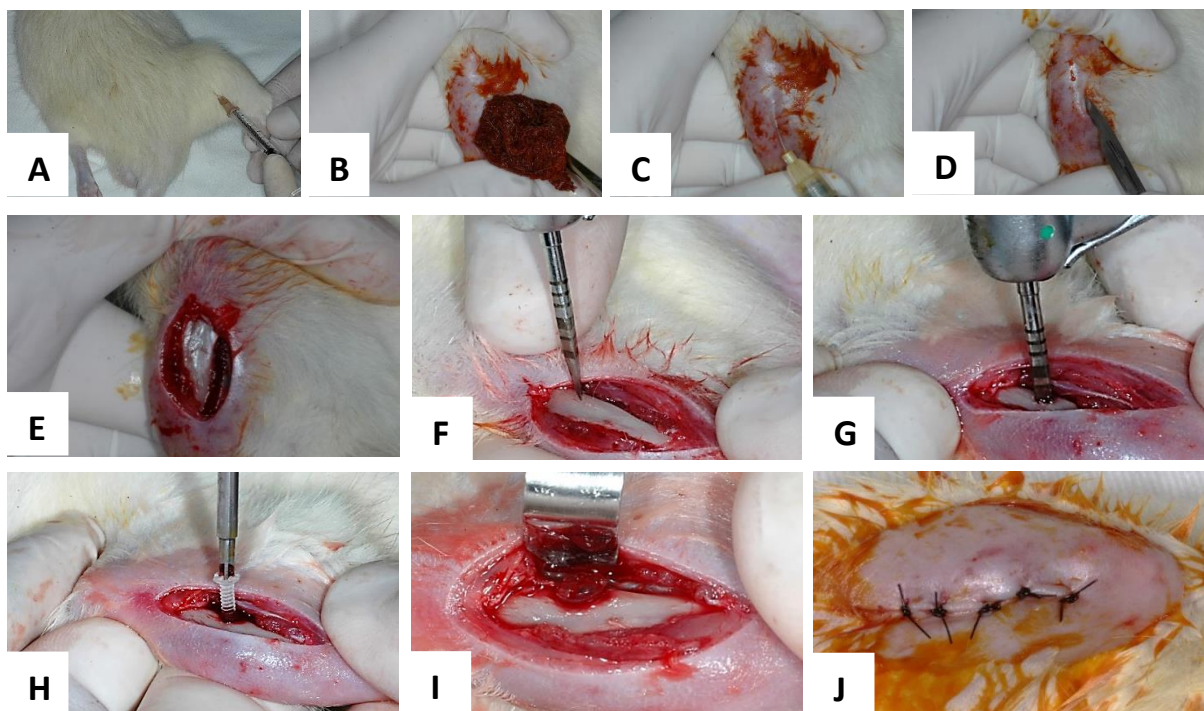
#### **3.1.1 Preparação dos dispositivos de fixação interna de Poli (D, L-ácido láctico)**

Os dispositivos de fixação interna foram fornecidos pela empresa Baumer AS (Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) e este material está no rol de biomateriais experimentais em desenvolvimento pela empresa.

#### **3.1.2 Procedimento Cirúrgico**

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Figura 1). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme descrito em trabalhos prévios publicados [31-35].

**Figura 1 - Cirurgia Experimental. A: Anestesia Geral. B: Dergemação com Iodopovidona. C: Anestesia local infiltrativa para hemostasia local. D: Incisão dermoperiosteal de espessura. E: Descolamento e exposição da área cirúrgica. F e G: Fresagem. H: Instalação do dispositivo de fixação Instalado de 2 x 6mm. I: Dispositivo de fixação instalado. J: Sutura e aspecto final.**



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

### 3.1.3 Anestesia

Os animais foram mantidos em jejum doze horas antes do procedimento cirúrgico. Para todos os procedimentos cirúrgicos foi realizada anestesia geral sob sedação com aplicação intramuscular de 50mg/kg de cloridrato de Ketamina (Vetaset® - Fort Dodge Animal Health Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 5mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser - Laboratórios Calier do Brasil Ltda., Osasco SP, Brasil). No intuito de complementação anestésica e hemostasia do campo operatório

foi empregada a anestesia local de Cloridrato de Mepivacaína (0,3mL/kg, scandicaine 2% com epinefrina 1:100.000, Septodont, França).

#### **3.1.4 Acesso Cirúrgico**

A região anterior das tíbias direita ou esquerda (de acordo com a randomização) foram tricotomizadas e posteriormente realizada a antissepsia pré-operatória com Polivinil Pirrolidona Iodo degermante (PVP-I 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico. O acesso cirúrgico foi realizado por meio de uma incisão dermo-periosteal empregando-se uma lâmina de bisturi n. 15 (Feather, Feather Safety, Japan) montada em cabo de bisturi n. 3 (Hu-Friedy, German) na margem anterior da tíbia, iniciada a 5 milímetros abaixo da articulação tíbio-femural, medindo aproximadamente um centímetro de comprimento. Após incisão o retalho foi deslocado, com conseqüente exposição da tíbia, local de eleição para a osteotomia.

#### **3.1.5 Osteotomia**

Após a exposição da tíbia foi realizada osteotomia de 1,6 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento em cada tíbia por meio de fresa helicoidal (Emfils, Novo Colosso, Itu, Brasil) montada em contra ângulo redutor 20:1 (Kavo do Brasil, Joinville, Brasil), acoplado em motor elétrico (Kavo do Brasil, Joinville, Brasil), a uma velocidade de 1200 rpm, sob irrigação constante de solução fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil).

#### **3.1.6 Instalação dos dispositivos de fixação interna**

Os dispositivos de fixação interna foram instalados por meio de chave digital em cruz (Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil). Foram instalado um dispositivo de fixação interna de polímero de poli (L-lactídeo-co-D,L-lactídeo) PLDLLA em cada animal. O dispositivo de fixação foi inserido até que o módulo de rebordo assente na camada cortical externa da região proximal da face lateral da tíbia.

### 3.1.7 Sutura

O tecido mole foi reposicionado e suturado por planos. A sutura muscular foi realizada com fio absorvível de Poligalactina 910 (Vicryl 5.0, Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil). No plano cutâneo a sutura foi realizada com fio de Nylon 5.0 (Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil). Após a sutura foi novamente realizada a antissepsia da área com Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico (PVP-I 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto).

### 3.1.8 Prescrição Pós-Operatória

No pós-cirúrgico os animais receberam injeções intramusculares de Penta biótico (0,1 ml/kg; Fort Dodge Saúde Animal Ltda) com Dipirona Sódica (1 mg/kg; Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo Brasil).

## 3.2 Aplicação dos Fluorocromos

Nesta metodologia de cortes mineralizados foram empregados apenas nos 8 animais do período de 28 e 42 dias. A aplicação dos fluorocromos foram de acordo com a metodologia empregada em estudos prévios publicados [31,36,37]. Para análise de epifluorescência do período de 28 dias, foram aplicados pela via intramuscular 20 mg/kg de calceína 14 dias após a instalação do dispositivo de fixação e passados 24 dias foram administrados 20 mg/kg de vermelho de alizarina para cada animal. Para os animais do período de 42 dias, foram administrados pela via intramuscular 20 mg/kg de calceína 24 dias após a instalação do dispositivo de fixação e passados mais 10 dias foram administrados 20 mg/kg de vermelho de alizarina para cada animal (Figura 2 ).

**Figura 2 - Dia 0 representa o procedimento cirúrgico, a linha azul pontilhada representa os períodos de eutanásia, a linha verde representa a aplicação de calceína nos períodos de 28 e 42 dias, a linha laranja representa a aplicação de alizarina nos períodos de 28 e 42 dias.**



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

### **3.3 Eutanásia e Coleta do Material**

Nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias os animais foram mantidos em jejum por doze horas antes do procedimento de eutanásia. Para tal foi realizada sedação por injeção intramuscular de 50mg/kg de cloridrato de Ketamina (Vetaset® - Fort Dodge Animal Health Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 5mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser - Laboratórios Calier do Brasil Ltda., Osasco SP, Brasil). Após sedação os animais foram submetidos à eutanásia com dose excessiva anestésica com Tiopental Sódico, 150mg/kg (Cristália Ltda., Itapira, SP, Brasil). Após eutanásia, a tibia contendo o dispositivo de fixação foi removida e o tecido mole excedente eliminado. A pós-fixação foi realizada em solução de para formaldeído 4% a 4°C, durante um período de 6 horas. As peças obtidas foram reduzidas em 10mm de cada lado ao redor do dispositivo de fixação para serem avaliadas pela análise microtomográfica. Após foram levados a inclusão em resina composta para posterior processamento para corte em micrótomos específicos.

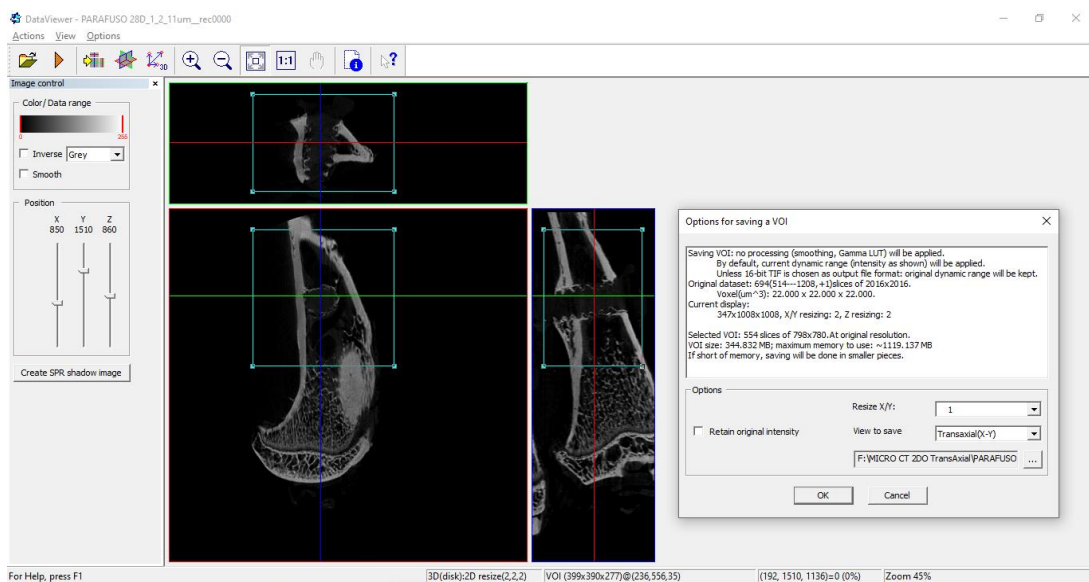
### **3.4 Análise Microtomográfica (Micro-Ct)**

Após a eutanásia dos animais, as tíbias foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 24 horas, seguidos de banho em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram armazenadas em álcool 70%, para a realização da análise microtomográfica. A análise microtomográfica foi realizada de acordo com metodologia descrita por trabalho prévio publicado por Bouxsein et al. [38]. Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) as peças foram escaneadas utilizando cortes de 6µm de espessura (90Kv e 111µA) com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.5mm, tamanho do pixel de 2016x1344 µm e com tempo de aquisição de 1h e 15min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas, determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 1, correção dos anéis

de artefato de 8, correção de Beam Hardening de 24% e a faixa de conversão de imagem poderá variar de 0,0 – 0,14.

Para análise linear 2D utilizou-se o software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), utilizado para a determinação do volume de interesse (VOI), padronizado para todas as imagens, todas as imagens foram reconstruídas para serem observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital) e posteriormente salvos em uma vista Transaxial (Figura 3).

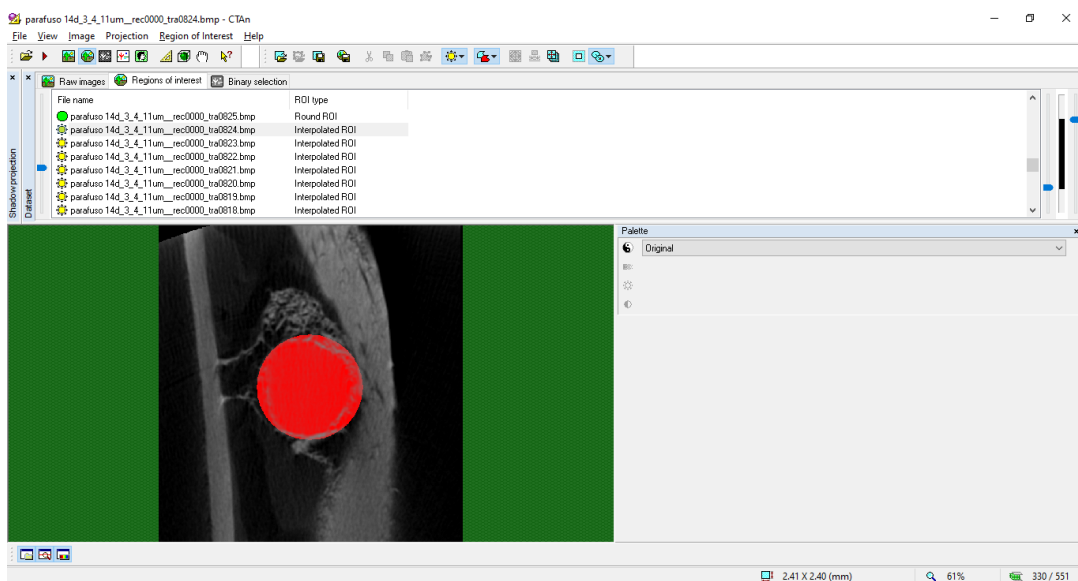
**Figura 3 - Seleção do volume de interesse (VOI) pelo software DataViewer.**



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

As mensurações volumétricas em 3D foram realizadas utilizando um software específico (CT Analyzer Versão 1.15.4.0, Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), seguindo da determinação da região de interesse (ROI – region of interest) na foi utilizada a ferramenta “Round” devido a morfologia circular do dispositivo de fixação , sendo essa também padronizada para todas as reconstruções (Figura 4).

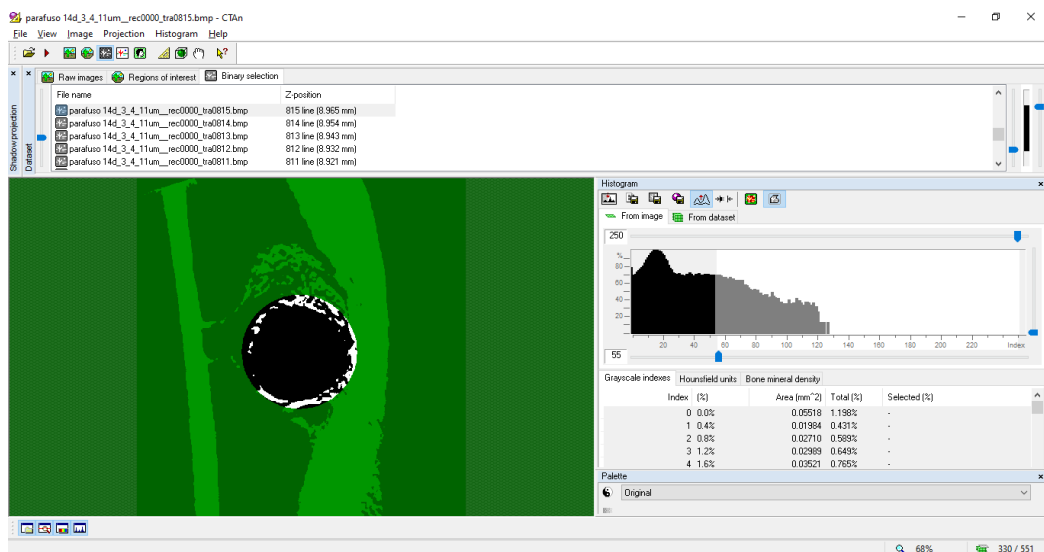
**Figura 4 - No software CTan, após seleção do número de cortes padronizados (230), a região de interesse foi delimitada com a ferramenta Round.**



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

A área de interesse demarcada correspondeu a área medular e cortical. Logo após, o thresholds foi padronizado com intervalo de 55-250 em um intervalo de 230 camadas (Figura 5). As imagens foram então convertidas para a escala de cinza para o cálculo dos parâmetros tridimensionais em milímetros (mm), realizado pelo próprio software. Nas imagens obtidas foram avaliados os parâmetros de : Volume Ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura de trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação de trabéculas (Tb.Sp).

**Figura 5 - No software CTan, o thresholds foi padronizado com intervalo de 55-250, para posterior análise tridimensional e quantificação do osso neoformado.**



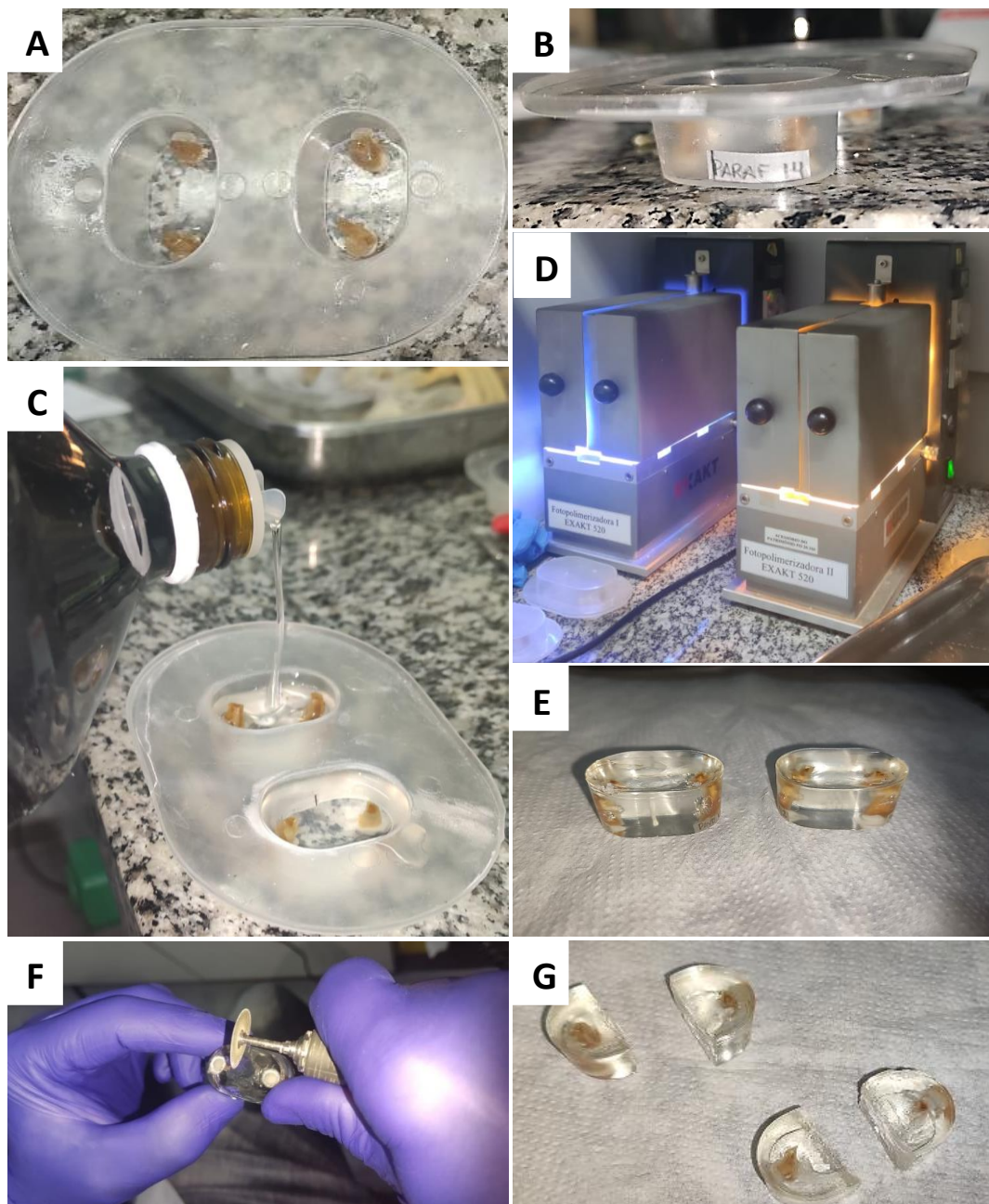
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

### 3.5 Preparação do Material para Análise Confocal a Laser e Histométrica em tecidos mineralizados.

Esta metodologia foi realizada de acordo com trabalhos prévios publicados [39-42]. Após análise microtomográfica, as 32 tíbias, contendo os dispositivos de fixação foram novamente colocadas em formalina neutra tamponada a 10% por um período de 72h. Em seguida passaram pela etapa de desidratação em

concentrações crescentes de álcoois etanol 60, 70, 80, 90 e 100% gradativamente, com troca de solução a cada 7 dias. Ao término da desidratação as peças foram incluídas em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC, Kultzer Heraeus GmbH & Co, Wehrheim, Alemanha) e submetidas ao protocolo para processamento para corte e desgaste de peças em cortes calcificados, os blocos contendo o dispositivo de fixação e tecido ósseo foram cortados em um ponto central, empregando-se um micrótomo com sistema de corte e desgaste (Exakt Apparatebau, Hamburgo, Alemanha). As peças obtidas foram no plano SAGITAL com secção de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de espessura (Figura 6 e 7).

**Figura 6 - A: Posicionamento no recipiente para inclusão em resina TechnoVit®. B: Identificação dos recipientes. C: Inclusão de Resina após polimerização com as peças incluídas. D: Fotopolimerização. E: Resina após polimerização com as peças incluídas. F e G: Individualização das amostras.**



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

Figura 7 – H: Lâminas montadas para corte na região central do defeito utilizando a serra do Exakt. I: Prensa adesiva à vácuo (sanduicheira) em funcionamento para preparação da lâmina de estudo. J: Serra do sistema Exakt em funcionamento. K: Checagem da espessura das amostras após desgaste e polimento no sistema Exakt.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

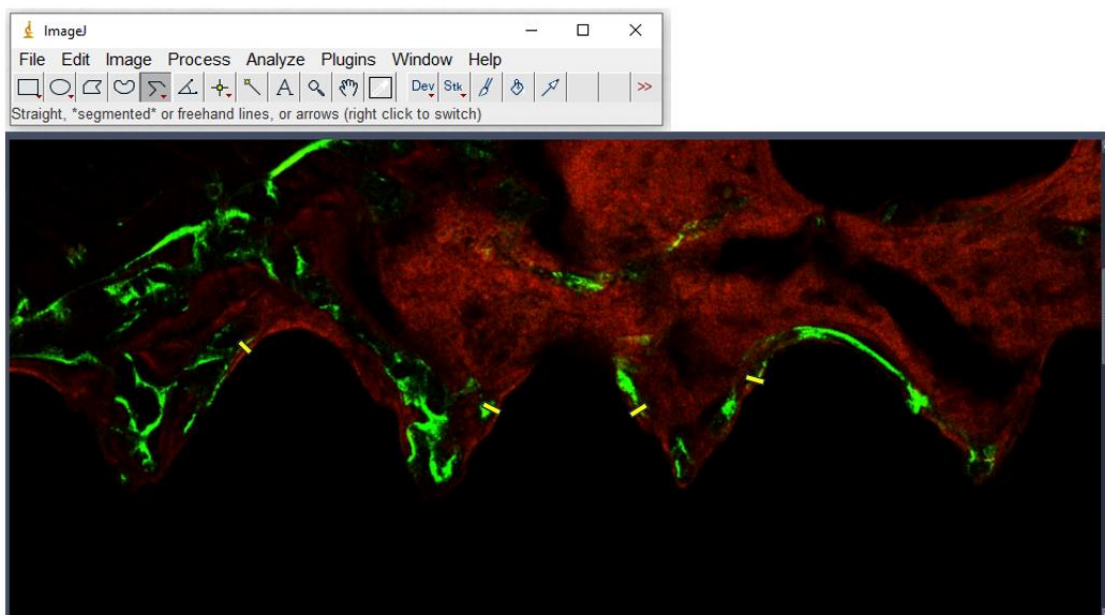
### 3.6 Microscopia Confocal a Laser

As lâminas obtidas das tíbias dos 8 animais pertencentes ao período de eutanásia de 28 e 42 dias foram capturados pelo microscópio a laser confocal Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X (original aumentar 100) no Laboratório de biologia molecular da

UNESP - Araraquara. Foram obtidas assim, imagens dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina separadamente (osso velho/osso novo) e por fim, estas imagens foram reconstruídas, fornecendo a sobreposição dos fluorocromos utilizados para avaliação do turnover ósseo pela taxa de aposição mineral (MAR).

As imagens foram transportadas para o programa computacional analisador de imagens Image J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá). Após calibração da régua, e através da ferramenta “Straight Line or freehands”, a área de precipitação dos fluorocromos (calceína/alizarina) foi mensurada. Na análise da aposição óssea mineral, a partir da ferramenta Straight Line foram traçadas 10 medidas dentro do canal medular, estendendo-se da margem externa da calceína em direção a margem externa da alizarina, sendo o valor obtido, dividido por 10, que representa o intervalo de dias entre as injeções dos dois fluorocromos analisados (Figura 8). O resultado representou o valor da taxa de aposição mineral (MAR) em micrômetros [43].

**Figura 8 - Medidas traçadas no canal medular a serem analisadas usando a ferramenta de Straight Line or freehands no software ImageJ**

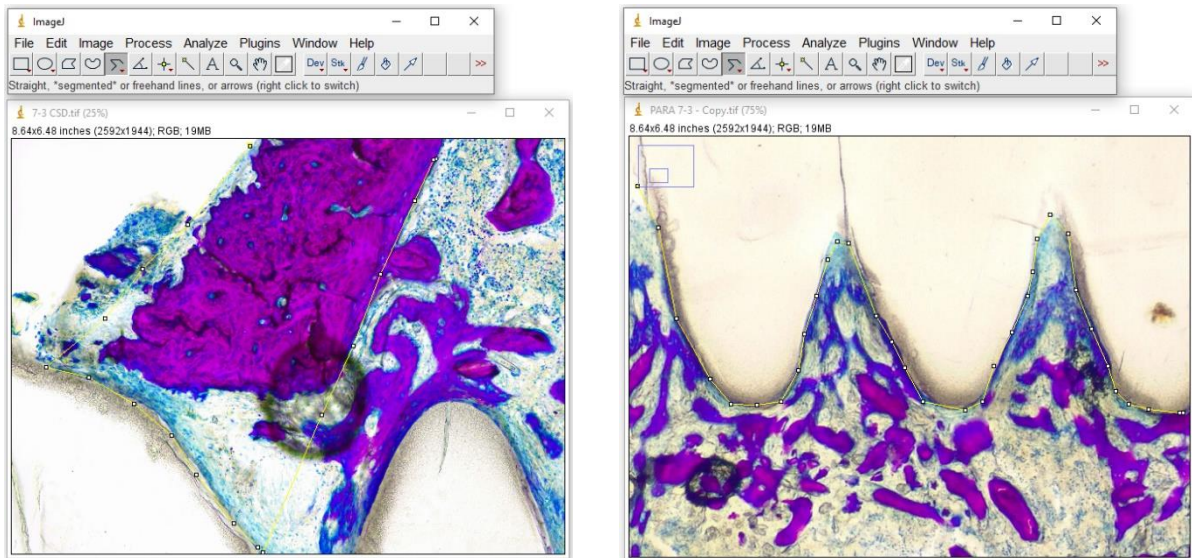


### 3.7 Análise Histométrica

Todas as lâminas obtidas dos 32 animais, contendo os dispositivos de fixação em tecido mineralizado nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias foram coradas pelo Stevenel's blue e Fucsina ácida. As imagens foram analisadas em microscópio óptico (Diastar, Leica Reichert & Jung products, Alemanha) e capturadas por meio de uma câmera fotográfica digital (Leica Microsystems DFC-300-FX, Alemanha), com resolução de 1.3 megapixels, acoplada ao microscópio de luz.

As análises histométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens Image J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá). Após calibração da régua, através da ferramenta "Segmented Line or freehand", foi usada para calcular a extensão linear de contato dispositivo de fixação/osso e área de tecido ósseo neoformado entre as espiras. As medidas foram padronizadas e os resultados da extensão linear e da área entre as espiras (em micrometros) foram convertidos para porcentagem, no intuito de obter contato / dispositivo de fixação/osso (BIC) e a área de tecido ósseo neoformado entre as espiras (NBA), separadamente, tanto nas regiões corticais, quanto medular (Figura 9).

**Figura 9 - Delimitação da região Cortical e Medular a ser analisada usando a ferramenta de Segmented Line or freehand no software ImageJ.**



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

### 3.8 Análise Estatística

Os valores obtidos nas análises microtomográfica e histométrica foram tabulados e levados ao teste de Shapiro Wilk para verificação da homogeneidade de distribuição. Após o teste foram submetidos à análise de Kruskal – Wallis One Way os parâmetros de porcentagem de volume ósseo (BV/TV), volume ósseo (BV) e área neoformada (NBA) da região medular. Para os parâmetros espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp), número de trabéculas (Tb.N), contato dispositivo de fixação/osso (BIC) região cortical, região Medular e área neoformada (NBA) região cortical foram submetidos a análise de One Way ANOVA. Após esta análise foram submetidas a análise de múltiplas comparações com teste de Tukey's.

Os valores obtidos na análise de Microscopia Confocal a Laser foram tabulados e levados ao teste de Shapiro Wilk para verificação da homogeneidade de distribuição. Após o teste foram submetidos a Teste  $T$ , para os parâmetros de Taxa de Aposição Mineral (MAR).



# Resultados

## 4 RESULTADOS

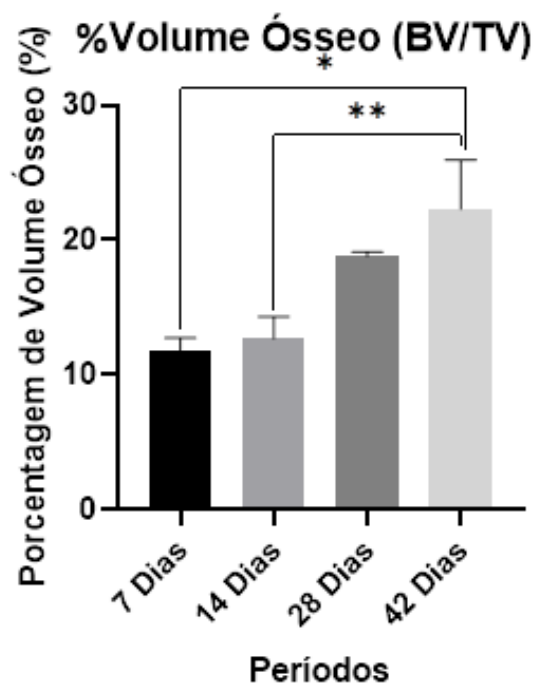
### 4.1 MICROTOMOGRFÍA (MICRO-CT)

A análise microtomográfica mostrou diferenças estatísticas entre os períodos nos parâmetros de BV ( $P = 0,006$ ), BV/TV ( $P = 0,006$ ), Tb.Th ( $P = 0,008$ ), Tb.N ( $P < 0,001$ ), Tb.Sp ( $P = < 0,001$ ).

#### 4.1.1 Porcentagem de volume ósseo (BV/TV)

A média de porcentagem de volume ósseo foi maior no período de 42 dias ( $22,30 \pm 3,62$ ), seguido do período de 28 dias ( $18,82 \pm 0,28$ ); nos quais foram encontrados diferença estatística de 42 dias comparados a 7 dias e 14 dias ( $P < 0,050$ ) (Figura 10).

**Figura 10 - Gráfico demonstrando as médias de porcentagem do volume ósseo em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ( $P = 0,006$ ).**

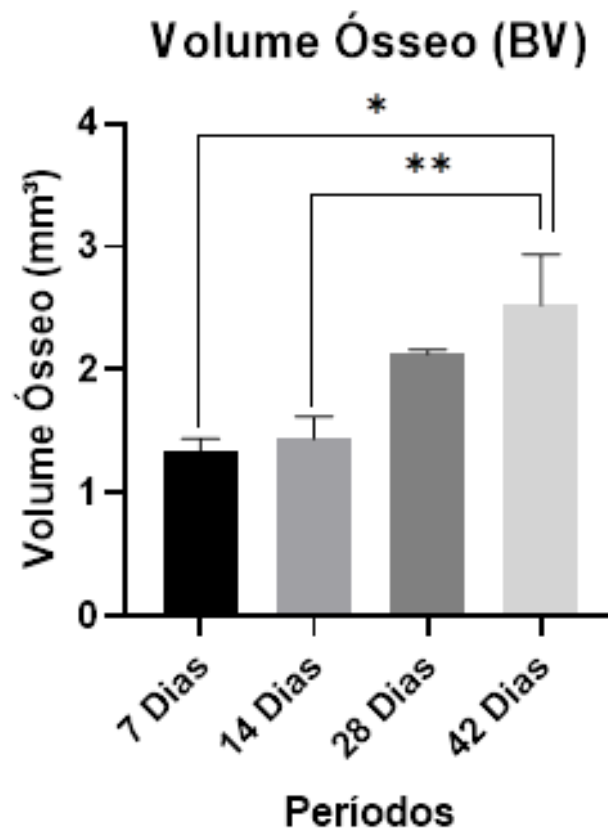


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

#### 4.1.2 Volume Ósseo (BV)

A média de volume ósseo foi maior no período de 42 dias ( $2,52 \pm 0,41$ ), seguido do período de 28 dias ( $2,13 \pm 0,03$ ); nos quais foram encontrados diferença estatística de 42 dias comparados a 7 dias e 14 dias ( $p < 0,050$ ) (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico demonstrando as médias do volume ósseo em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ( $P = 0,006$ )

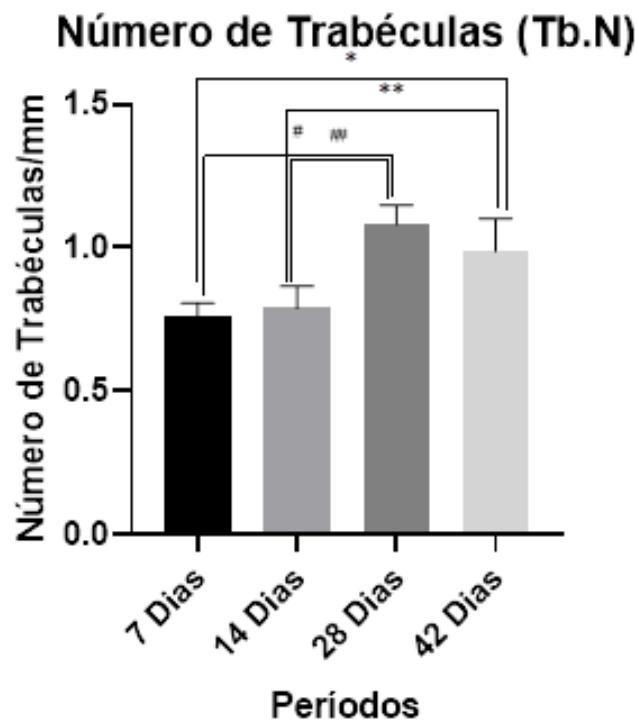


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

#### 4.1.3 Número de Trabéculas (Tb.N)

A média de número de trabéculas foi maior no período de 42 dias ( $0,988 \pm 0,114$ ), seguido do período de 28 dias ( $1,081 \pm 0,066$ ); nos quais foram encontrados diferença estatística de 28 dias comparados a 7 dias ( $p < 0,001$ ) e 14 dias ( $p = 0,001$ ) e 42 dias comparados a 7 dias ( $p = 0,008$ ) e 14 dias ( $p = 0,020$ ) (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico demonstrando as médias de número de trabéculas em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ( $P = < 0,001$ )

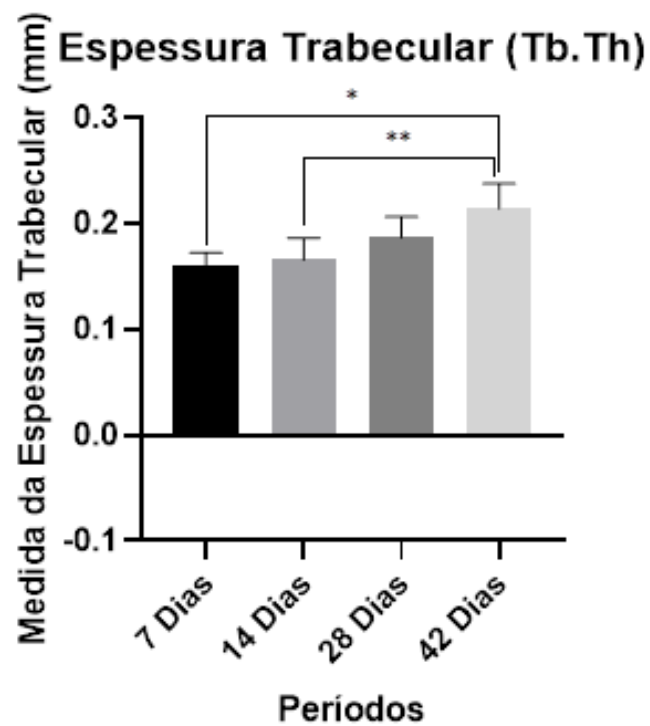


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

#### 4.1.4 Espessura Trabecular (Tb.Th)

A média de espessura trabecular foi maior no período de 42 dias ( $0,214 \pm 0,0234$ ), seguido do período de 28 dias ( $0,187 \pm 0,0197$ ); nos quais foram encontrados diferença estatística no período de 42 dias comparados a 7 dias ( $p=0,010$ ) e 14 dias ( $p=0,018$ ) (Figura 13)

Figura 13 - Gráfico demonstrando as médias de espessura trabecular em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada (P = 0,008)

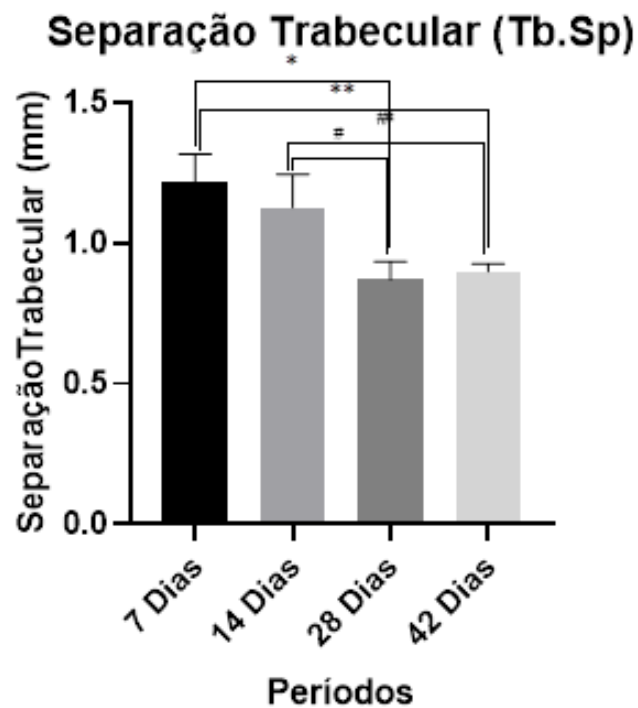


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

#### 4.1.5 Separação Trabecular (Tb.Sp)

A média de separação trabecular foi maior no período de 7 dias ( $1,218 \pm 0,0994\text{mm}$ ), seguido do período de 14 dias ( $1,126 \pm 0,118\text{mm}$ ); nos quais foram encontrados diferença estatística a no períodos de 7 dias comparados aos 28 dias ( $p < 0,001$ ) e 42 dias ( $p = 0,001$ ) e 14 dias comparados a 28 dias ( $p = 0,005$ ) e 42 dias ( $p = 0,012$ ) (Figura 14)

Figura 14 - Gráfico demonstrando as médias de separação trabecular em todos os períodos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ( $P = < 0,001$ )

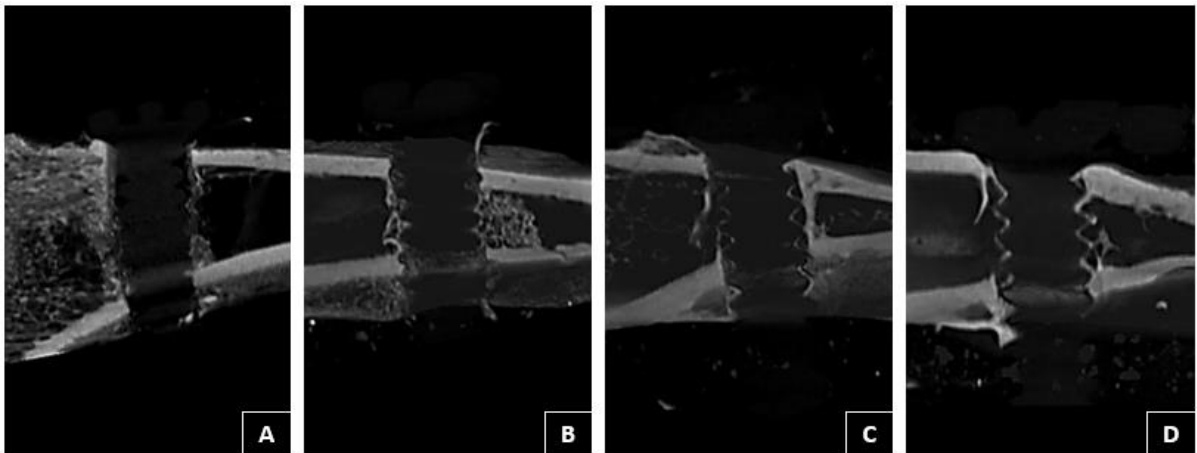


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

#### 4.1.6 Análise Descritiva Qualitativa

Os resultados obtidos por meio da análise micro tomográficas possibilitaram observar a progressiva incorporação dos dispositivos de fixação de PLDLLA ao tecido ósseo nos períodos 7, 14, 28 e 42 dias. (Figura 15) por meio da deposição mineral progressiva ao redor das espiras.

**Figura 15 - Imagens dos 4 períodos obtidos no Software CTVox. Mostrando a incorporação do dispositivo de fixação aos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias**



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

Aos 7 dias, observamos uma sombra do dispositivo de fixação incorporado na tíbia e o defeito de broca lança (Figura 14A). Aos 14 dias, podemos observar a formação óssea entorno as espiras do dispositivo de fixação (Figura 14B). Aos 28 dias, podemos observar presença de osso nas espiras do dispositivo de fixação (Figura 14C). Aos 42 dias, observamos maior quantidade de presença óssea em tudo o comprimento das espiras do dispositivo de fixação (Figura 14D).

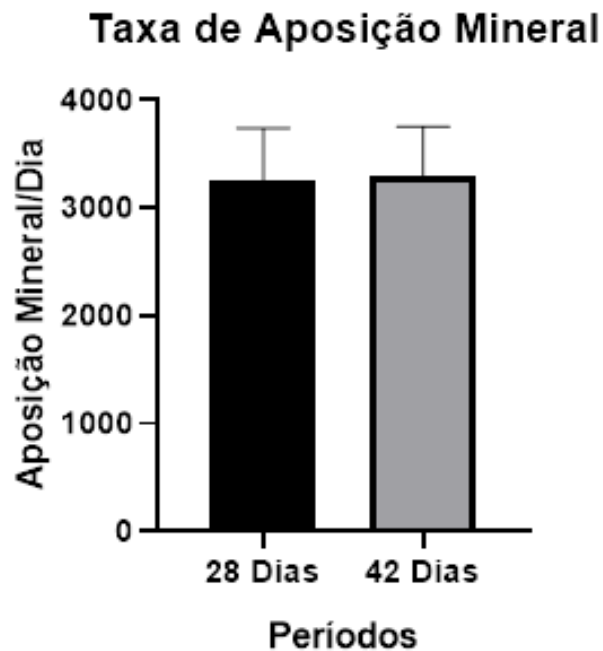
## 4.2 MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER

A análise de microscopia confocal a laser não mostrou diferenças estatísticas entre os períodos de 28 dias e 42 dias no parâmetro de Taxa de Aposição Mineral MAR ( $P=0,925$ ).

### 4.2.1 Taxa de Aposição Mineral (MAR)

Não foram encontradas diferenças estatísticas em MAR ( $P=0,925$ ), entretanto os valores médios de MAR aos 42 dias ( $3287,6 \pm 468,8$ ) foram numericamente superiores, quando comparado com os valores médios do período de 28 dias ( $3258,3 \pm 481,7$ ) (Figura 16).

Figura 16 - Gráfico demonstrando as médias de taxa de aposição mineral MAR nos períodos de 28 e 42 dias, obtidos através da análise Confocal a Laser ( $P=0,925$ ).



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

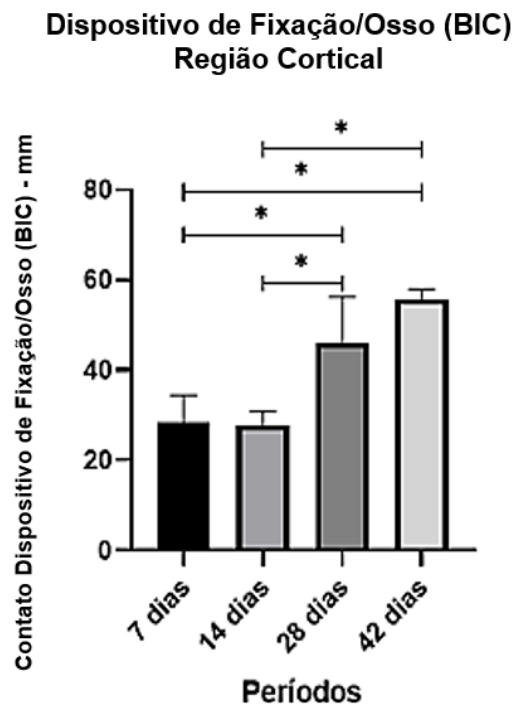
### 4.3 HISTOMETRÍA

A análise histométrica demonstrou diferenças estatísticas entre os períodos nos parâmetros de contato dispositivo de fixação/osso (BIC) região cortical ( $P < 0,001$ ), contato dispositivo de fixação/osso (BIC) região medular ( $P = 0,003$ ) e área neoformada (NBA) região cortical ( $P = 0,022$ ). No parâmetro de área neoformada (NBA) região medular não houve diferença estatística ( $P = 0,781$ ).

#### 4.3.1 Contato Dispositivo de Fixação/Osso (BIC) Região Cortical

A média em porcentagem de contato dispositivo de fixação /osso área cortical foi maior no período de 42 dias ( $55,78 \pm 2,214$ ), seguido do período de 28 dias ( $45,94 \pm 10,38$ ) em que foram encontradas diferenças estatísticas de 28 dias comparados a 7 dias ( $p = 0,0006$ ) e 14 dias ( $p = 0,0004$ ) e 42 dias comparados a 7 dias ( $< 0,0001$ ) e 14 dias ( $< 0,0001$ ). (Figura 17)

**Figura 17 - Gráfico demonstrando as médias de contato Dispositivo de Fixação/Osso região cortical em todos os períodos, obtidos através da análise histométrica ( $P < 0,001$ ).**

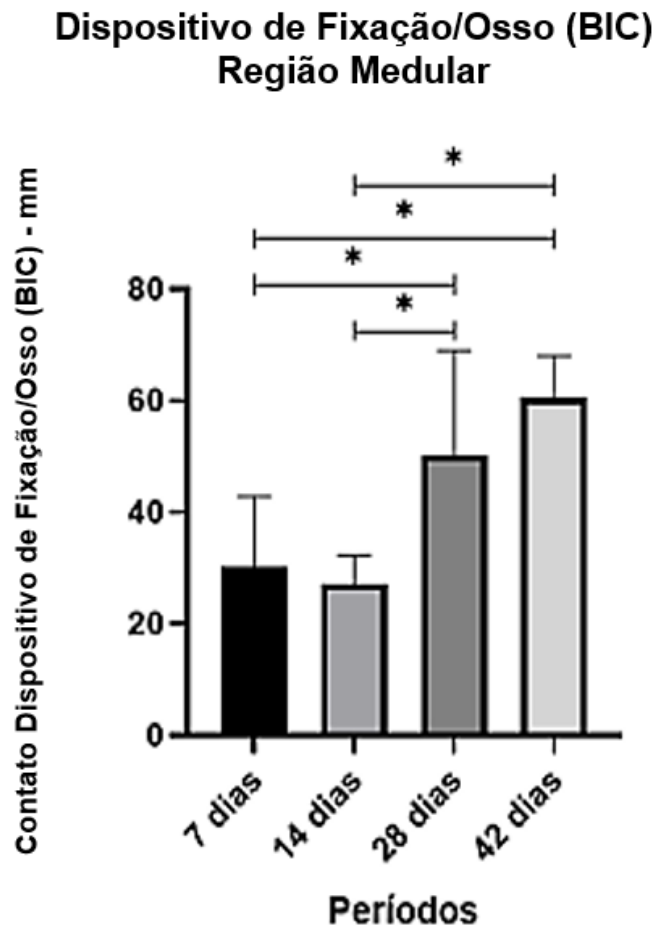


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

#### 4.3.2 Contato Dispositivo de Fixação /Osso (BIC) Região Medular

A média em porcentagem de contato dispositivo de fixação/osso região medular foi maior no período de 42 dias ( $60,56 \pm 7,458$ ), seguido do período de 28 dias ( $50,22 \pm 18,76$ ). Foram encontradas diferenças estatísticas de 28 dias comparados a 7 dias ( $p=0,0498$ ) e 14 dias ( $p=0,0197$ ) e 42 dias comparados a 7 dias ( $p=0,0013$ ) e 14 dias ( $p=0,0005$ ) (Figura 18)

Figura 18 - Gráfico demonstrando as médias de contato Dispositivo de Fixação/Osso região medular em todos os períodos, obtidos através da análise histométrica ( $P=0,003$ ).

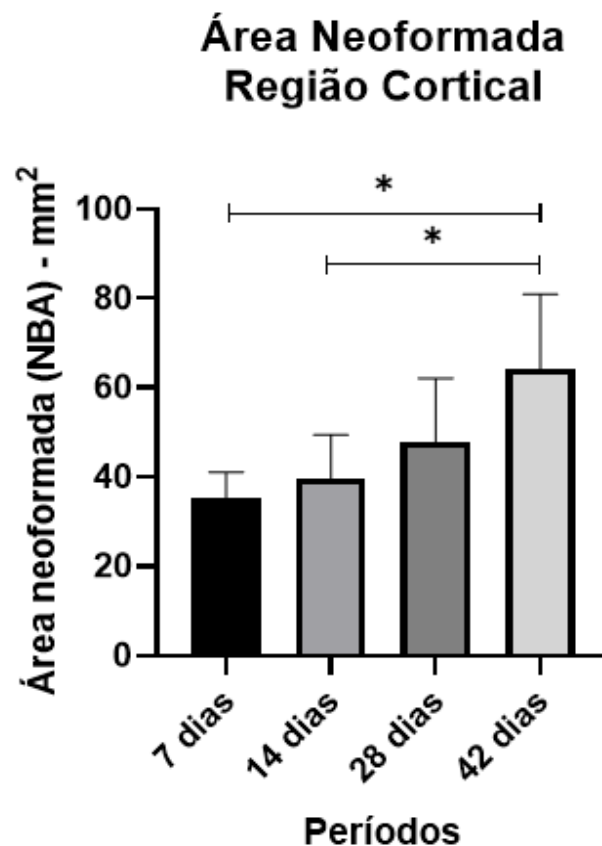


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

### 4.3.3 Área Neoformada (NBA) Região Cortical

A média de área neoformada em porcentagem (NBA) na região cortical foi maior no período de 42 dias ( $64,33 \pm 16,61$ ), seguido do período de 28 dias ( $47,83 \pm 14,31$ ). Também foram encontradas diferenças estatísticas de 42 dias comparados a 7 dias ( $p=0,0031$ ) e 14 dias ( $p=0,0118$ ). (Figura 19)

Figura 19 - Gráfico demonstrando as médias de área neoformada (NBA) região cortical em todos os períodos, obtidos através da análise histométrica ( $P=0,022$ ).

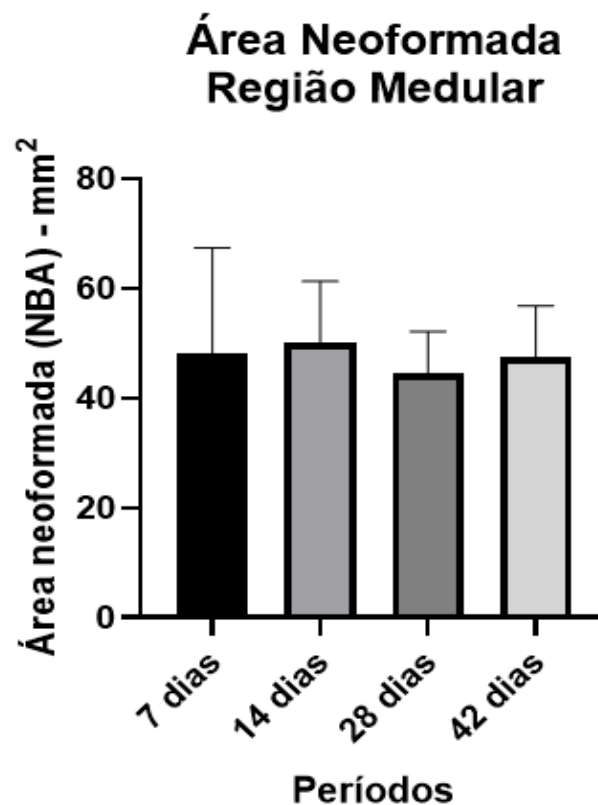


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

#### 4.3.4 Área Neoformada (NBA) Região Medular

A média de área neoformada (NBA) em porcentagem na região medular foi maior no período de 14 dias ( $50,15 \pm 11,17$ ), seguido do período de 7 dias ( $48,10 \pm 19,25$ ). No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas entre nenhum dos períodos. (Figura 20)

Figura 20 - Gráfico demonstrando as médias de área neoformada (NBA) região medular em todos os períodos, obtidos através da análise histométrica ( $P=0,781$ ).

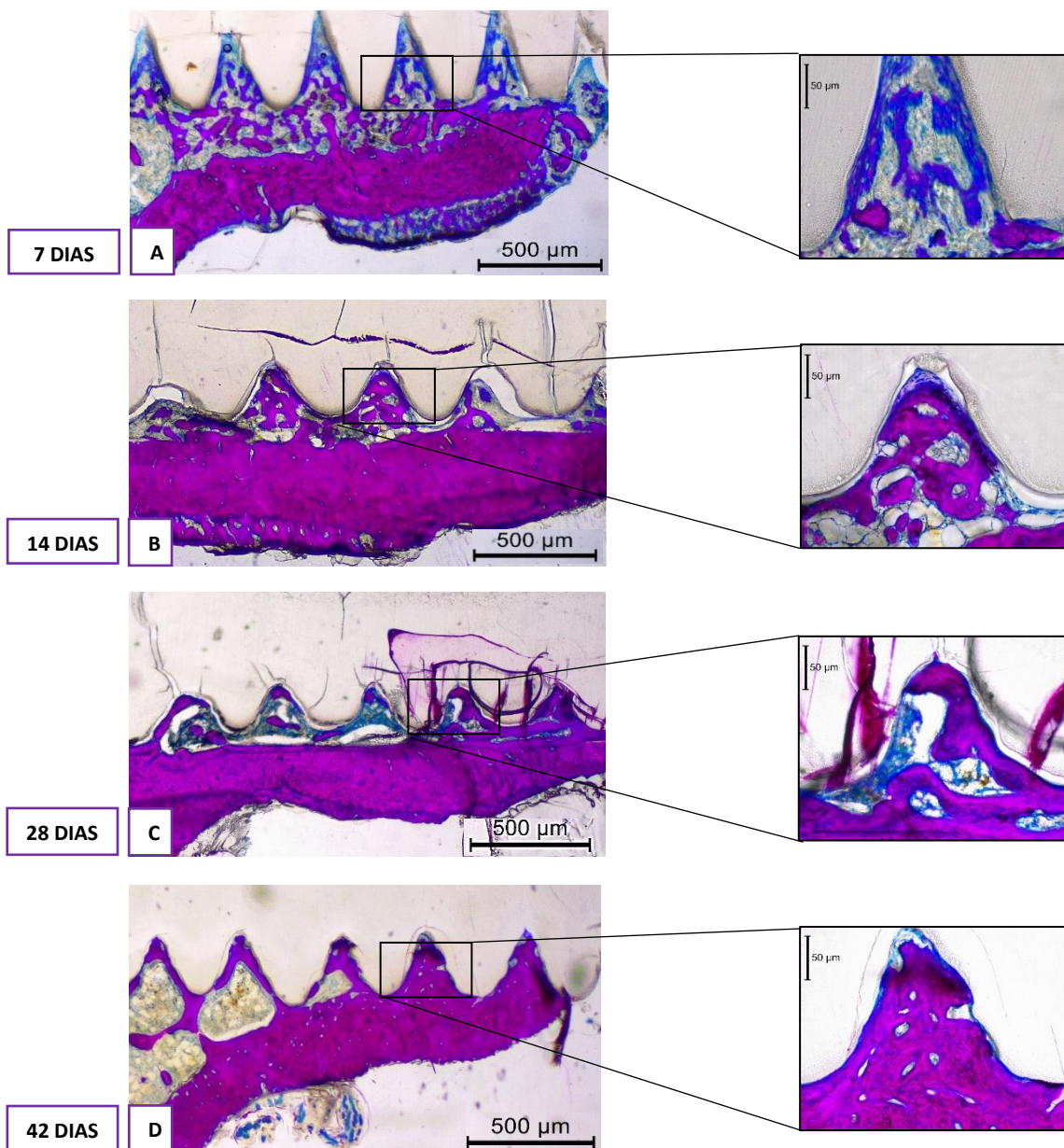


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023

#### 4.3.5 Análise Descritiva Qualitativa

Os resultados obtidos na análise histométrica possibilitaram observar a permanência do dispositivo de fixação de PLDLLA em processo de incorporação progressivo ao tecido ósseo nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias intactos, sem nenhuma área ou linha de degradação. (Figura 21)

**FIGURA 21. Imagens dos 4 períodos obtidos no programa Leica Application Suite LAS core. Mostrando a incorporação do dispositivo de fixação aos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias, em aumentativa de 2.5x e 20x em coloração de Stevenel's blue e Fucsina acida**



Na análise histométrica qualitativa dos tecidos mineralizados referente aos períodos de 7 e 14 dias representados com as letras A e B, foi possível observar a permanência dos dispositivos de fixação em sua total integridade, sem sinais de reabsorção, com grande quantidade de trabéculas com espaços medulares amplos aos 7 dias (Figura 21 A), e progressiva mineralização óssea aos 14 dias (Figura 21 B). Aos 28 dias pode-se observar uma maior presença de tecido ósseo mineralizado (Figura 21 C), enquanto aos 42 dias formação de tecido ósseo mineralizado completo entre as espiras (Figura 21 D).

*Discussão*

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente, os materiais bioabsorvíveis mais utilizados para manufaturar sistemas de fixação são compostos de uma combinação de polímeros de alto peso molecular, compostos por ácido poliláctico (PLA), e seus isômeros (PLDLLA), ácido poliglicólico (PGA) em variadas proporções [32]. A literatura tem demonstrado que estes biomateriais absorvíveis, embora apresentem uma menor resistência mecânica, quando comparado com o titânio, tem múltiplas vantagens como biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade termoplástica e propriedades físico-mecânicas muito apropriadas [11]. Nesta pesquisa foi possível observar que os dispositivos de fixação de PLDLLA apresentaram excelente biocompatibilidade, permitindo formação óssea progressiva ao redor das espiras nos períodos analisados. No entanto, mesmo no último período de análise (42 dias em ratos) não foi possível observar nenhuma linha ou área de degradação do PLDLLA, fato que contribui para a manutenção das propriedades mecânicas do dispositivo de fixação por períodos iguais ou maiores que 6 meses, levando-se em consideração o metabolismo do rato em comparação ao metabolismo humano.

Embora os sistemas de osteossíntese manufaturados em PLDLLA sejam muito questionados, devido as propriedades mecânicas inferiores, entre elas resistência a tração e carga, quando comparado ao titânio e suas ligas, um estudo prévio publicado que comparou a estabilidade do PLDLLA e titânio demonstrou a eficácia do sistema de placas e parafusos em PLDLLA, onde os autores concluíram que os sistemas de fixação interna manufaturados em PLDLLA, empregadas em cirurgia ortognática foram confiáveis, quando empregadas em cirurgias mandibulares com osteotomia sagital de ramo [27].

Outro estudo prévio demonstrou que o uso de materiais metálicos pode ser melhor do ponto de vista de custo e efetividade na cirurgia maxilofacial convencional, porém os materiais reabsorvíveis aumentam sua presença em cirurgias, visto a necessidade de ausência de materiais metálicos ou necessidade de abordagens únicas em determinados pacientes no pós-operatório [44], como cirurgias em pacientes pediátricos [45], cirurgias reconstrutivas [26] e regeneração óssea guiada [22]. Sendo assim, pode-se sugerir que este polímero (PLDLLA) apresenta resultados satisfatórios na fixação óssea em cirurgias bucomaxilofaciais, em suas diferentes áreas de atuação, como cirurgias reconstrutivas, como enxertos ósseos,

regeneração óssea guiada e cirurgia ortognática. Neste sentido, pode-se também extrapolar o emprego para diversas áreas médicas, como cirurgia pediátrica e ortopédica. Este fato por si, justifica a realização desta pesquisa, no intuito de validar novos sistemas de fixação em rol de desenvolvimento pelas empresas.

Estudo *in vitro* e revisão de literatura que relataram a degradação dos polímeros a base de PLA determinaram que eles são eliminados pelo organismo em 2 estágios, hidrólise e metabolismo [7,15]. Primeiramente ocorre a redução do peso molecular, seguido da redução da resistência mecânica e por consequente redução de massa. Durante a hidrólise, o peso molecular das cadeias poliméricas diminui consideravelmente, Com cadeias menores, estas poderão se mover mais livremente e serão mais facilmente deformadas. A hidrólise progride, ao ponto do dispositivo de fixação começar a perder integridade e fraturar. Por fim, os macrófagos fagocitam os detritos poliméricos, convertendo-os em água e dióxido de carbono, através do ciclo de Krebs [7,14,15]. A modulação destes eventos é de suma importância para o desenvolvimento e a aplicação clínica do material reabsorvível. Embora esta pesquisa não objetivou avaliar os eventos de degradação, ficou evidente neste modelo *in vivo* pré-clínico que o PLDLLA não foi degradado em 42 dias em ratos que corresponde, aproximadamente em humanos a 6 meses. Essas observações são consideradas positivas, uma vez que a estabilidade estrutural do dispositivo de fixação mantida por 6 meses pode favorecer o processo de reparo ósseo, seja em cirurgias reconstrutivas, regeneração óssea guiada, fraturas faciais, cirurgia ortognática e cirurgia da articulação temporomandibular (ATM).

A literatura científica tem determinado que o período final da degradação dos polímeros vai de 1 ano [46], podendo estender tempos superiores de 3 a 5 anos [47,48,49] Nesta pesquisa, o desenvolvimento do dispositivo de fixação em PLDLLA, pela empresa biomédica, objetivou diminuir o período de degradação, uma vez que o PLDLLA é a mistura de PLLA, mais cristalino e reabsorção mais lenta e o PDLA, menos cristalino e reabsorção mais rápida. Estudo prévio publicado[50] que empregou parafusos de PLDLLA em fraturas de carpo das mãos, verificou que o período final de degradação foi 12 a 14 meses, com degradação completa em avaliação radiográfica[51].

Na análise de microscopia confocal a LASER, não houve diferença estatística para a taxa de posição mineral (MAR) diária entre os períodos de 28 e 42 dias, dado

que corroborou com os resultados obtidos nas análises microtomográfica e histométrica. Nesta pesquisa a MAR não foi avaliada no período de 7 e 14 dias, pois os animais seriam manipulados poucos dias após a cirurgia de instalação dos dispositivos de fixação, para aplicação dos fluorocromos, o que aumentaria o risco de fratura da tíbia e assim, inviabilizaria as demais análises (microtomográfica e histométrica). No entanto, para esta pesquisa, os autores acreditam que a MAR de 7 e 14 dias acompanharia os resultados encontrados nas análises microtomográfica e histométrica.

A análise histológica qualitativa realizada nesta pesquisa evidenciou uma alta biocompatibilidade dos dispositivos de fixação de PLDLLA com tecido ósseo, com presença das câmaras de reparação, bem como uma progressiva neoformação óssea perceptível nas espiras ao redor dos dispositivos de fixação, com uma maior corticalização na interfase osso- dispositivo de fixação dos períodos de 28 e 42 dias, quando comparados com os períodos de 7 e 14 dias. Estes achados corroboram com os demais resultados encontrados na literatura científica [52-54]. Novamente, destaca-se que os resultados encontrados na análise histológica corroboram os resultados da análise microtomográfica.

Assim, novas pesquisas deverão ser realizadas para avaliar: (1) fase inicial de degradação dos dispositivos de fixação de PLDLLA; (2) Os resultados biomecânicos, e a caracterização topográfica.

*Conclusão*

## **6 CONCLUSÃO**

Conclui-se que o dispositivo de fixação de PLDLLA foi biocompatível e permitiu neoformação óssea ao redor das espiras.

*Referências*

## REFERÊNCIAS

1. Hollier LH Jr, Sharabi SE, Koshy JC, Stal S. Facial trauma: general principles of management. *J Craniofac Surg*. 2010;21(4):1051-53.
2. Brożyna B, Szymańska H, Ptaszyński K, Woszczyński M, Lechowska-Piskorowska J, Gajewska M, et al. Tissue response after implantation of pure titanium and bioresorbable screws in scapula with postoperative irradiation: an experimental study on rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120(4):443-52.
3. Martínez-Villalobos Castillo, S. Osteosíntesis maxilofacial con titanio. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac*. 2004;26(6):351-68.
4. Gareb B, van Bakelen NB, Buijs GJ, Jansma J, de Visscher JGAM, Hoppenreijns TJM, et al. Comparison of the long-term clinical performance of a biodegradable and a titanium fixation system in maxillofacial surgery: a multicenter randomized controlled trial. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177152.
5. Yoshioka I, Igawa K, Nagata J, Yoshida M, Ogawa Y, Ichiki T, et al. Comparison of material-related complications after bilateral sagittal split mandibular setback surgery: biodegradable versus titanium miniplates. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70(4):919-24.
6. Campbell CA, Lin KY. Complications of rigid internal fixation. *Craniofac Trauma Reconstr*. 2009;2(1):41-7.
7. Pietrzak WS, Sarver D, Verstynen M. Bioresorbable implants--practical considerations. *Bone*. 1996;19(1 Suppl):109S-19S.
8. Costa F, Robiony M, Zorzan E, Zerman N, Politi M. Stability of skeletal Class III malocclusion after combined maxillary and mandibular procedures: titanium versus resorbable plates and screws for maxillary fixation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006;64(4):642-51.
9. Singh V, Kshirsagar R, Halli R, Sane V, Chhabaria G, Ramanojam S, et al. Evaluation of bioresorbable plates in condylar fracture fixation: a case series. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(12):1503-5.
10. Burstein FD. Resorbable distraction of the mandible: technical evolution and

clinical experience. *J Craniofac Surg.* 2008;19(3):637-43.

11. Alsaheb R.A, Aladdin A, Othman NZ, Malek RA, Leng OM, Aziz R, et al Recent applications of polylactic acid in pharmaceutical and medical industries. *J Chem Pharm Res.* 2015;7(12):51-63.

12. Mazzonetto R, Paza AO, Spagnoli DB. A retrospective evaluation of rigid fixation in orthognathic surgery using a biodegradable self-reinforced (70L:30DL) polylactide. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(7):664-669.

13. Mukherjee DP, Pietrzak WS. Bioabsorbable fixation: scientific, technical, and clinical concepts. *J Craniofac Surg.* 2011;22(2):679-89.

14. Pietrzak WS. Heat adaptation of bioabsorbable craniofacial plates: a critical review of science and technology. *J Craniofac Surg.* 2009;20(6):2180-4.

15. Pietrzak WS. Principles of development and use of absorbable internal fixation. *Tissue Eng.* 2000;6(4):425-33.

16. Simon JA, Ricci JL, Di Cesare PE. Bioresorbable fracture fixation in orthopedics: a comprehensive review. Part I. Basic science and preclinical studies. *Am J Orthop.* 1997;26(10):665-71.

17. Eppley BL. Use of resorbable plates and screws in pediatric facial fractures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(3):385-91.

18. Farah S, Anderson DG, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;107:367-92.

19. Annunziata M, Nastri L, Cecoro G, Guida L. The use of Poly-D,L-lactic Acid (PDLLA) devices for bone augmentation techniques: a systematic review. *Molecules.* 2017;22(12):2214.

20. Doll C, Thieme N, Schönmuß S, Voss JO, Nahles S, Beck-Broichsitter B, et al. Enhanced radiographic visualization of resorbable foils for orbital floor reconstruction: a proof of principle. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018;46(9):1533-8.

21. Pihlajamäki H, Böstman O, Hirvensalo E, Törmälä P, Rokkanen P. Absorbable pins of self-reinforced poly-L-lactic acid for fixation of fractures and osteotomies. *J*

Bone Joint Surg Br. 1992;74(6):853-7.

22. Ngo HX, Bai Y, Sha J, Ishizuka S, Toda E, Osako R, et al. A narrative review of u-HA/PLLA, a bioactive resorbable reconstruction material: applications in oral and maxillofacial surgery. *Materials*. 2021;15(1):150.

23. Ketola-Kinnula T, Suuronen R, Kontio R, Laine P, Lindqvist C. Bioabsorbable plates and screws for fixation of mandibulotomies in ablative oral cancer surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(8):1753-1762.

24. Ashammakhi N, Peltoniemi H, Waris E, Suuronen R, Serlo W, Kellomäki M, et al. Developments in craniomaxillofacial surgery: use of self-reinforced bioabsorbable osteofixation devices. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108(1):167-80.

25. Hoffmann J, Troitzsch D, Gülicher D, Adam C, Reinert S. Significance of biodegradable implants in case of midfacial fractures. *Biomed Tech (Berl)*. 2002;47 Suppl 1 Pt 1:496-499.

26. Raghoobar GM, Liem RS, Bos RR, van der Wal JE, Vissink A. Resorbable screws for fixation of autologous bone grafts. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(3):288-293.

27. Tuovinen V, Suuronen R, Teittinen M, Nurmenniemi P. Comparison of the stability of bioabsorbable and titanium osteosynthesis materials for rigid internal fixation in orthognathic surgery. A prospective randomized controlled study in 101 patients with 192 osteotomies. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(11):1059-1065.

28. Bessho K, Fujimura K, Iizuka T. Experimental long-term study of titanium ions eluted from pure titanium miniplates. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(7):901-4.

29. Böstman OM. Absorbable implants for the fixation of fractures. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73(1):148-53.

30. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Physiol*. 2010;14:2519-21.

31. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr, Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(6):798-805.

32. Oliveira D, Hassumi JS, Gomes-Ferreira PH, Polo TO, Ferreira GR, Faverani LP, et al. Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(1):42-52.
33. Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC, Hassumi JS, Rossi AC, et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig.* 2018;22(1):255-65.
34. Palin LP, Polo TOB, Batista FRS, Gomes-Ferreira PHS, Garcia Junior IR, Rossi AC, et al. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170470.
35. Mulinari-Santos G, Souza Batista FR, Kirchweger F, Tangl S, Gruber R, Okamoto R. Losartan reverses impaired osseointegration in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(11):1126-34.
36. Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol.* 2011;56(10):984-90.
37. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt.* 2015;20(3):038003.
38. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-86.
39. Souza FÁ, Furtado TSM, Dayube URC, Melo WM, Nishioka RS, Poli PP, et al. Comparative in vivo study of alloy titanium implants with two different surfaces: biomechanical and SEM analysis. *Clin Oral Investig.* 2019;23(12):4383-97.
40. Sisti KE, Piattelli A, Guastaldi AC, Queiroz TP, De Rossi R. Nondecalfified histologic study of bone response to titanium implants topographically modified by laser with and without hydroxyapatite coating. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2013;35(5):689-96.
41. Souza FÁ, Queiroz TP, Sonoda CK, Okamoto R, Margonar R, Guastaldi AC, et al. Histometric analysis and topographic characterization of cp Ti implants with

surfaces modified by laser with and without silica deposition. *J Biomed Mater Res B* 2014;102(8):1677-88.

42. Queiroz TP, Molon RS, Souza FÁ, Margonar R, Thomazini AH, Guastaldi AC, et al. In vivo evaluation of cp Ti implants with modified surfaces by laser beam with and without hydroxyapatite chemical deposition and without and with thermal treatment: topographic characterization and histomorphometric analysis in rabbits. *Clin Oral Investig*. 2017;21(2):685-699.

43. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):2-17.

44. Olate S, Unibazo A, Uribe F, Alister JP, Martinez F. Bioresorbable bioactive ostoesynthesys (Hidroxiapatite/Poly L-lactide) in Le Fort Segmented Osteotomy. *Int J Odontostomat*. 2018;12(2):137-41.

45. Ferretti C. A prospective trial of poly-L-lactic/polyglycolic acid co-polymer plates and screws for internal fixation of mandibular fractures. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(3):242-248.

46. Eppley BL, Reilly M. Degradation characteristics of PLLA-PGA bone fixation devices. *J Craniofac Surg*. 1997;8(2):116-20.

47. Bos RR, Rozema FR, Boering G, et al. Degradation of and tissue reaction to biodegradable poly(L-lactide) for use as internal fixation of fractures: a study in rats. *Biomaterials*. 1991;12(1):32-36.

48. Bergsma JE, Rozema FR, Bos RR, Boering G, de Bruijn WC, Pennings AJ. In vivo degradation and biocompatibility study of in vitro pre-degraded as-polymerized polyactide particles. *Biomaterials*. 1995;16(4):267-274.

49. Marumo K, Sato Y, Suzuki H, Kurosaka D. MRI study of bioabsorbable poly-L-lactic acid devices used for fixation of fracture and osteotomies. *J Orthop Sci*. 2006;11(2):154-158

50. Peiji W, Qirong D, Jianzhong Q, Huayi W, Kailong Z, Nan Y. Intramedullary fixation in digital replantation using bioabsorbable poly-DL-lactic acid rods. *J Hand*

Surg Am. 2012;37(12):2547-2552.

51. PARFITT GJ. An investigation of the normal variations in alveolar bone trabeculation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1962;15:1453-1463.

52. Bai Y, Sha J, Kanno T, Miyamoto K, Hideshima K, Matsuzaki Y. Comparison of the bone regenerative capacity of three-dimensional uncalcined and unsintered Hydroxyapatite/Poly-d/l-Lactide and beta-tricalcium phosphate used as bone graft substitutes. *J Invest Surg.* 2021;34(3):243-56.

53. Scorsato PS, Rahal SC, Cestari TM, et al. Evaluation of the degradation of two bioabsorbable interference screws: an in-vivo study in sheep. *Acta Cir Bras.* 2022;37(4):e370405.

54. Chang WJ, Pan YH, Tzeng JJ, et al. Development and Testing of X-Ray Imaging-Enhanced Poly-L-Lactide Bone Screws. *PLoS One.* 2015;10(10):e0140354.

## ANEXOS

### ANEXO A - COMITE 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 "**Avaliação da incorporação de dispositivos de fixação interna (pinos e parafusos) de Poli (L-lactideo-co-D, L-lactideo) PLDLLA instalados em tibia de ratos. Análises microtomográfica, confocal a laser e histométrica**", Processo FOA nº 133-2024, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de Março de 2024.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 28 de Agosto de 2024.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 28 de Setembro de 2024.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Alliance of the incorporation of internal fixation devices (pins and screws) of Poly (L-lactide-co-D, L-lactide) PLDLLA installed in the tibia of rat. Micro tomographic, laser confocal and histometric analysis**", Protocol FOA nº 133-2024, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 25, 2024.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** August 28, 2024.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** September 28, 2024.

**Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri**  
Coordenador da CEUA  
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](mailto:ceua.foa@unesp.br)