



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



STÉFANY BARBOSA

**Análise da reparação de fraturas em fêmures de
ratas osteoporóticas em função de placas de
fixação submetidas ao método de texturização
por plasma eletrolítico e incorporação de íons
cálcio e fósforo**

Araçatuba - SP
2020

STÉFANY BARBOSA

Análise da reparação de fraturas em fêmures de ratas osteoporóticas em função de placas de fixação submetidas ao método de texturização por plasma eletrolítico e incorporação de íons cálcio e fósforo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Cirurgiã Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani

Araçatuba - SP
2020

Dedico este trabalho aqueles que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui, aos meus pais.

*À minha mãe, **Maria Estela Bertechini Barbosa**, meu exemplo de determinação, ternura e compreensão. Com você aprendi que nenhum desafio é grande quando se tem fé e coragem, e que toda jornada se torna mais leve quando realizamos as coisas com amor e dedicação. Seu coração puro e bondoso te fazem essa pessoa tão especial e tão querida por todos, ser sua filha é meu maior orgulho. Só tenho a agradecer por tudo que fez e faz por mim e por abster de tantas coisas para que eu tenha uma vida boa e feliz, espero um dia ser uma grande mulher assim como você.*

*A meu pai, **Fidelcino Barbosa**, que sempre me ensinou o real valor das coisas simples da vida. Desde muito nova você me ensinou a cuidar e proteger de quem nós amamos e dar valor a tudo o que temos. Com você aprendi a correr atrás dos meus sonhos e não abaixar a cabeça para aqueles que não acreditarem em mim. Sou muito grata por todas as coisas que já fez pela nossa família, por todo o esforço que faz para me dar as melhores oportunidades e por toda a preocupação que tem comigo.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me dar a dádiva da vida, por me conceder saúde e força durante esta jornada e por colocar pessoas tão incríveis no meu caminho.

Ao meu querido orientador, **Prof. Assist. Dr. Leonardo Perez Faverani**, por me conceder a honra de aprender todos os dias com o senhor e por ter sua amizade. Foi assistindo uma palestra do senhor que tive a certeza de que meu caminho deveria ser o da cirurgia, e tive uma felicidade enorme ao se tornar sua orientada. Sua paixão por ensinar e seu carinho com os alunos o fazem tão querido e respeitado por todos nós. Sou eternamente grata pela confiança que o senhor deposita em mim, a todas as oportunidades que já me deu, por todo crescimento que tive durante essa jornada ao seu lado e ao carinho com que sempre me tratou. Muito obrigada por tudo, “Prof Léo”, o senhor é muito especial em minha vida.

Às **professoras Roberta Okamoto e Ana Paula Farnezi Bassi**, as quais tenho grande admiração e respeito. Vocês são exemplos de dedicação, responsabilidade e competência. São grandes inspirações em minha vida e me fizeram entender que o sucesso anda junto com o carisma e a humildade. Só tenho a agradecer ao privilégio de ter sido sua aluna e por todo carinho que têm comigo.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa do diretor **Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara**, pelo privilégio de realizar minha graduação em uma faculdade de tão alta qualidade e com professores tão acolhedores. Agradeço a **todos os professores** que fizeram parte desta jornada e me conduziram a formação profissional, em especial aos professores **José Américo de Oliveira, Paulo Roberto Botacin, Edilson Ervolino, Juliano Milanezi de Almeida, Ricardo Coelho Okida, Adriana Cristina Zavanelli, Karina Helga Turcio de Carvalho, Alessandra Marcondes Aranega, Francisley Ávila Souza, Osvaldo Magro Filho e Daniela Ponzoni**, por todo carinho, atenção e conhecimento transmitidos durante o curso.

À **Pró-reitoria de Extensão Universitária e Cultura (PROEX – UNESP)**, por me conceder incentivo, no formato de bolsa durante dez meses (2017) do desenvolvimento do projeto “Círculo de Palestras à Comunidade da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba (CIRPACfoa)”.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, (Processo 2018/00522-0 e 2019/27237-7) pelo grande incentivo, no formato de bolsa de Iniciação Científica, durante três anos da minha graduação.

Aos **Alunos da pós-graduação orientados pelo professor Leonardo**, por toda a paciência, carinho e comprometimento com o ensino. Inicialmente nas pessoas de **Gustavo Antonio Correa Momesso e Tárík Ocon Braga Polo**, pessoas que me mostraram o quão árduo e recompensador é o caminho da pesquisa. Desde o início do meu estágio vocês sempre tiveram muito carinho em me ensinar cada coisa e cada detalhe importantes para que um trabalho seja bem realizado. Agradeço por toda amizade, ajuda, oportunidades oferecidas e pela honra de dividir esse trabalho com vocês, serei eternamente grata. Ao **Doutorando William Phillip Pereira da Silva**, muito obrigada por dividir suas experiências comigo e por fazer isso de uma forma muito humilde e amigável. Agradeço aos **mestrandos Tiburtino José de Lima Neto, Anderson Maikon de Souza Santos e Leonardo Alan Delanora**, pela amizade desenvolvida, pelas oportunidades que me dão e pela honra de aprender com vocês a cada dia. Agradeço a **mestranda Bárbara Ribeiro Rios**, por todo o carinho e parceria durante esse último ano e pela honra de dividir um projeto com você. A todos vocês, fica o meu respeito, admiração e meu desejo de que tenham um caminho de muito sucesso. Serei sempre grata.

Aos **Colegas de Iniciação Científica**, pela amizade durante todos esses anos e pelo aprendizado que me trouxeram. Agradeço em especial, ao **João Matheus**, por ter compartilhado tantas experiências boas e por todas as

coisas que aprendemos juntos. Saiba que sempre terei muita admiração, respeito e orgulho de você e das suas conquistas. Tenho certeza que seu caminho será trilhado com muito brilhantismo e sucesso.

À minha amiga **Jéssica Silva Santana**, pela nossa linda amizade. Ter você ao meu lado nessa jornada foi fundamental para que eu me mantivesse animada e confiante. Você é uma pessoa muito especial, da qual eu tenho muito orgulho de ter conhecido e convivido. Obrigada pelos momentos que vivemos juntas e pelo carinho que sempre teve comigo. Te desejo todo sucesso e felicidade do mundo. Muito obrigada por tudo "Jé".

Às minhas queridas amigas, **Michelle, Thássia e Thaís**, pela nossa longa amizade e pela honra de viver momentos incríveis com vocês. Sou eternamente grata por tudo que vivemos juntas, por todos os ensinamentos e por todo o carinho. É um prazer enorme dividir minhas conquistas e aplaudir de pertinho o sucesso de vocês. Tenho muito orgulho das mulheres maravilhosas que são e desejo tudo que há de melhor nesse mundo. Que o "clubinho" traga ainda mais momentos de felicidade e muita história boa pra gente contar. Amo vocês. Obrigada por tudo.

Às minhas duplas de clínica, **João Matheus, Vitória Custódio, Renata Parpinelli, Mirela Caroline e Vivian Bertoni** foi muito bom passar os dias com vocês e dividir tanto aprendizado. Agradeço pela amizade e pelo comprometimento que sempre tiveram.

Às minhas amigas, **Juliana Érnica, Michele Luciano, Mariana Justo, Mariana Fantini e Amanda Rosa**, com quem compartilhei tantos momentos bons durante esta jornada. Agradeço vocês pela amizade construída nesse tempo e desejo muito sucesso em suas carreiras.

A **todos os funcionários** da FOA por sempre estarem a disposição para nos ajudar e pela amizade durante esta jornada.

Aos **pacientes**, pela confiança depositada a nós alunos e pela honra de nos auxiliar nessa caminhada de aprendizado. Serei eternamente grata.

BARBOSA, S. **Análise da reparação de fraturas em fêmures de ratas osteoporóticas em função de placas de fixação submetidas ao método de texturização por plasma eletrolítico e incorporação de íons cálcio e fósforo.** 2020. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi analisar o potencial osteocondutor de miniplacas com texturização de superfície por meio da oxidação por plasma eletrolítico, no reparo ósseo de fraturas femorais simuladas em ratas osteoporóticas. Para tanto, 24 ratas Wistar, fêmeas, com 6 meses de idade, foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) e mais 24 passaram por cirurgia fictícia de ovariectomia (SHAM), totalizando uma amostra de 48 animais. Após um período de 3 meses de preservação para indução de osteoporose, seguiu-se com osteotomia para confecção de fratura em ambos os fêmures e fixação com miniplacas e parafusos do sistema 1,5mm, sendo metade da amostra fixada com miniplacas texturizadas pela oxidação por plasma eletrolítico (PEO) (grupo experimental) e a outra metade com miniplacas superfície usinada (CONV) (grupo controle). Nos períodos de 14 e 42 dias pós-operatório realizou-se aplicação dos fluorocromos calceína e alizarina, respectivamente. A eutanásia de todos os animais foi realizada aos 60 dias pós-operatória, com coleta dos fêmures, coleta de sangue para dosagem de estrógeno e biópsia de órgãos de metabolização. Os fêmures foram encaminhadas para o processamento laboratorial para escaneamento em microtomografia computadorizada para avaliação volumétrica (BV/TV) e de qualidade óssea (Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), escaneamento por microscopia confocal a laser, análise histométrica e análise biomecânica. Além disso, no período baseline, realizou-se Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) para observação dos efeitos superficiais do tratamento. A caracterização da superfície evidenciou a distribuição homogênea de poros semelhantes a vulcões por toda a

miniplaca. A partir da microtomografia computadorizada observou-se que o grupo OVX/PEO obteve maior valor para os parâmetros Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp quando comparado ao grupo OVX/CONV. A análise histométrica constatou formação óssea mais significativa para o grupo OVX/PEO, do que o obtido pelo grupo OVX/CONV ($p < 0,05$ - Teste de Tukey). Em relação a área de fluorocromo, houve uma maior precipitação de calceína do que de alizarina para os grupos OVX (PEO e CONV). OVX/PEO demonstrou ainda, maiores valores de resiliência óssea em relação aos outros grupos ($P < 0,05$). Conclui-se que a texturização por PEO leva a uma otimização do reparo ósseo em fraturas femorais de ratas osteoporóticas.

Palavras-chave: Osteoporose. Regeneração óssea. Titânio.

BARBOSA, S. Analysis of fracture repair in osteoporotic rat femurs due to fixation plates subjected to the plasma electrolytic oxidation coating method and incorporation of calcium and phosphorus ions. 2020. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The objective of the present work was to analyze the osteoconductive potential of miniplates with surface coating by means of plasma electrolytic oxidation, in the bone repair of simulated femoral fractures in osteoporotic rats. Therefore, 24 female Wistar rats, 6 months old, were submitted to bilateral ovariectomy (OVX) and another 24 underwent fictitious ovariectomy surgery (SHAM), totaling a sample of 48 animals. After a period of 3 months of prostration to induce osteoporosis, an osteotomy for femoral fractures design was performed in both femurs and fixation with 1.5mm mini-plates and screws, half of the sample fixed with mini-plates textured by plasma oxidation electrolytic (PEO) (experimental group) and the other half with machined surface mini plates (CONV) (control group). In the periods of 14 and 42 days postoperatively, the fluorochromes calcein and alizarin were applied, respectively. The euthanasia of all animals was performed at 60 days postoperatively, with collection of femurs, collection of blood for estrogen measurement and biopsy of metabolizing organs. The femurs were sent to laboratory processing for scanning using computerized microtomography for volumetric (BV / TV) and bone quality assessment (Tb.Th, Tb.Sp and Tb.N), scanning by laser confocal microscopy, histometric analysis and biomechanics analysis. In addition, in the baseline period, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Dispersive Energy Spectroscopy (EDS) were performed to observe the surface effects of the treatment. The characterization of the surface showed the homogeneous distribution of pores like volcano throughout the miniplate. From the computed microtomography, it was observed that the OVX / PEO group obtained a higher value for the parameters Tb.Th, Tb.N and Tb.Sp when

compared to the OVX / CONV group. The Histometric analysis found greater bone formation for OVX / PEO group when compared to OVX / CONV group ($P < 0.05$ - Tukey test). Regarding the fluorochrome area, there was a greater precipitation of calcein than of alizarin for the OVX groups (PEO and CONV). The OVX / PEO also demonstrated higher bone turnover values in relation to the other groups ($P < 0.05$). It is concluded that PEO coating leads to an optimization of bone repair in femoral fractures of osteoporotic rats.

Keywords: Osteoporosis. Bone regeneration. Titanium.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desenho experimental indicando os períodos de indução à osteoporose; simulação das fraturas e osteossíntese, administração de fluorocromos e eutanásia aos 60 dias pós-operatório	21
FIGURA 2 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. Incisão nos flancos das ratas (A); Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos (B); Localização do ovário e chifre uterino (C); Laqueadura do chifre uterino (D); Sutura dos planos interno e superficial (F -E)	22
FIGURA 3 - Etapas do procedimento cirúrgico para simulação de fraturas femorais. Incisão na porção lateral do fêmur (A); Visualização dos músculos lateral e bíceps do fêmur (B); Exposição do fêmur (C); Fixação da miniplaca (D); osteotomia para simulação com disco circular; (E) Aspecto final da fratura.	25
FIGURA 4 - Fluxograma demonstrando o delineamento experimental, a distribuição do número de animais em cada etapa e os métodos de análise.....	25
7	
FIGURA 5 - Procedimentos para análise por microtomografia computadorizada. Dispositivo de microtomografia SkyScan (A); Femures posicionadas e estabilizadas no aparelho de microtomografia (B); Imagem obtida pela digitalização (C); Reconstruções tridimensionais e bidimensionais, com orientação das imagens e determinação da região de interesse (ROI) (área vermelha - “gap” reparacional) (D)	29
FIGURA 6 - Lâminas obtidas pelo protocolo de processamento Exakt (A- B) e Área escolhida para análise em microscopia confocal (região entre os dois parafusos mais proximais) (C)	31
FIGURA 7 - Imagem representativa sobre área de interesse (ROI) analisada denotando os três terços da região, no qual, o 1º terço representa a região de “gap” reparacional em contato com a miniplaca; o 2º terço representa a região intermediária e o último terço, a região mais próxima do osso cortical basal do fêmur	33
FIGURA 8 - Procedimentos para teste biomecânico do complexo osso/ miniplacas. Inclusão das extremidades do fêmur em resina acrílica (A); Fêmur estabilizado na máquina universal DL 3000 para realização do teste (B); Modelo de célula usado para aplicação de carga (C)	35
FIGURA 9 - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura, nas magnitudes de 30x (A e B), 300x (C) e 2000x (D), das miniplacas com texturização por oxidação por plasma eletrolítico	37
FIGURA 10 - Imagem representativa do mapeamento dos constituintes da miniplaca com a superfície texturizada por meio da oxidação por plasma eletrolítico (PEO), pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva e mapa de cores referente à distribuição destes constituintes	38

FIGURA 11 - Representação gráfica da concentração de estrogênio plasmático, constatando hipostrogenismo no grupo OVX em comparação SHAM ($p = 0,0003$)	38
FIGURA 12 - Resultados gráficos dos parâmetros microtomográficos. Porcentagem de volume ósseo (BV.TV) (A); Espessura trabecular (Tb. Th) (B); Número de trabéculas (Tb. N)(C); Espaço entre as trabéculas (Tb. Sp) (D)	39
FIGURA 13 - Fotomicrografias das lâminas analisadas pela microscopia confocal a laser, em um aumento de x10. A coloração verde representa o fluorocromo calceína (osso velho) e a coloração vermelha representa a precipitação de alizarina (osso novo)	40
FIGURA 14 - Representação gráfica da área dos fluorocromos calceína e alizarina, para todos os grupos experimentais, evidenciando que para a maioria dos grupos (exceto SHAM PEO), a deposição de calceína (osso velho), foi maior do que a de alizarina (osso novo)	41
FIGURA 15 - Fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com azul de Stevenel e vermelho de alizarina em um aumento de x25, destacando-se maior presença de reparo ósseo nos grupos SHAM PEO e OVX PEO. ..	42
FIGURA 16 - Representação gráfica do cálculo histométrico, evidenciando superioridade de resultados para os grupos SHAM PEO e OVX PEO ($p < 0,05$)	43
FIGURA 17 - Representação gráfica dos valores de resiliência óssea obtidos no ensaio biomecânico por flexão de 3 pontos. O * e # representam a diferença estatística que houve na comparação dos grupos.....	44
FIGURA 18 - Representação gráfica dos valores de rigidez óssea obtidos no ensaio biomecânico por flexão de 3 pontos	44
FIGURA 19 - Imagens representativas da análise dos órgãos – cérebro, coração, rim, fígado, pulmão e músculo estriado esquelético.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Texturização de superfície através da oxidação por plasma eletrolítico	18
3.1.1 Caracterização estrutural baseline.....	19
3.2 Animais: Desenho experimental	20
3.2.1 Ovariectomia bilateral	21
3.2.2 Imunoensaio para dosagem de estrógeno	23
3.2.3 Osteotomia para confecção de fraturas femurais.....	24
3.3 Métodos de análises	26
3.3.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)	28
3.3.2 Escaneamento por microscopia confocal a laser (análise do "turnover" ósseo em reparação).....	29
3.3.3 Análise histométrica	33
3.3.4 Análise biomecânica	34
3.3.5 Biópsia de órgãos de metabolização	35
3.4 Análise estatística	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Caracterização estrutural baseline	37
4.2 Imunoensaio para dosagem de estrógeno	38
4.3 Microtomografia Computadorizada (Micro- Ct).....	39
4.4 Escaneamento por microscopia confocal a laser (análise do "turnover" ósseo em reparação)	40
4.5 Histometria.....	41
4.6 Análise biomecânica	43
4.7 Biópsia de órgãos de metabolização	44
5 DISCUSSÃO.....	46
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Considerado como uma problemática de saúde mundial, o tratamento de pacientes politraumatizados consiste em um desafio aos cirurgiões bucomaxilofaciais e ortopedistas. A dificuldade de resolução está atrelada a sensibilidade óssea em relação às condições mecânicas no momento do trauma, como, magnitude, direção e tipo de força que é aplicada no tecido ósseo. Estes fatores estão diretamente relacionados à distribuição das tensões e conseqüentemente ditarão quais serão as respostas biológicas na área afetada.^{1,2} A cicatrização óssea é um processo complexo, uma vez que demanda da interação de células, citocinas, matriz osteocondutora e bom suprimento sanguíneo.² Além disso, para que se tenha uma cicatrização adequada, é importante considerar fatores como, gravidade do trauma, qualidade da redução e da técnica de fixação utilizada e a condição geral de saúde do paciente.³

É importante se atentar às alterações sistêmicas que têm potencial de retardar ou até mesmo impedir uma cicatrização adequada das fraturas. A Diabetes mellitus, artrite reumatoide, anemia, desnutrição, osteopenia, hipovitaminoses, e o uso de medicamentos antirreabsortivos para tratamento de osteoporose ou de tumores malignos, são condições que podem resultar em retardo do reparo ósseo.^{1,2,3} A dinâmica óssea é composta por um *turnover*, onde os osteoclastos são encarregados da remoção de tecido ósseo velho e osteócitos antigos, e reposição, proporcionalmente, de tecido ósseo novo, por parte dos osteoblastos. Nas alterações sistêmicas em que se perde o equilíbrio entre esses processos de reabsorção e remodelação, há maior perda do que aposição de mineral, com subsequente redução da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido.^{4,5}

A osteopenia e a osteoporose são as alterações mais comumente associadas ao aumento do risco de fratura e também a dificuldade de reparo

do tecido ósseo, especialmente no sexo feminino, no período pós-menopausa.^{6,7} Estudos apontam que o retardo na cicatrização ocorre por associação entre baixa sensibilidade dos osteoblastos aos estímulos mecânicos, redução das células-tronco mesenquimais e redução da angiogênese.⁵ A simulação de fraturas em fêmures de modelos animais submetidos à cirurgia de ovariectomia, têm demonstrado que em situações de reduzida densidade mineral há um retardo no reparo das fraturas, o que pode estar associado a um atraso na expressão do receptor de estrogênio.^{8,9}

Em condições de reduzida densidade mineral óssea, tem-se uma dificuldade de fixação de fraturas, sem que ocorra perda de estabilidade das placas e parafusos, sendo de interesse a busca por meios que facilitem o reparo ósseo para pacientes com alterações no metabolismo.¹⁰ Nesse contexto, texturizações da superfície de implantes têm sido desenvolvidas, com a finalidade de promover melhores propriedades físico-químicas e biológicas e consequentemente a osseointegração.^{11,12,13}

Existem inúmeras técnicas de texturização, sendo elas classificadas como aditivas ou como subtrativas.^{14,15} Os métodos aditivos são aqueles em que o tratamento levará a adição ou integração de algum agente à superfície, como por exemplo, revestimento por plasma de titânio (TPS), revestimento de hidroxiapatita por pulverização a plasma (HA), revestimento de fosfato de cálcio biomimético (CaP), revestimento de alumina e também, a incorporação de íons.^{13,16} Já os métodos subtrativos são aqueles em que se tem uma remoção de material da superfície, afim da criação de rugosidades. O exemplo mais comum é o jateamento, que pode ser realizado utilizando partículas de alumina, óxido de titânio, fosfato de cálcio ou areia, por meio de um jato de ar comprimido em alta velocidade. Além disso, tem-se o ataque ácido, o qual pode ser realizado

com diferentes tipos de ácidos (HCl, H_2SO_4 , HNO_3 e IC), a oxidação anódica e a ablação a laser.^{11,17,18,19}

Uma nova alternativa para o tratamento de superfícies é a oxidação por plasma eletrolítico (PEO) com incorporação de íons cálcio e fosfato.²⁰ A texturização por PEO consiste em uma anodização modificada, onde ocorrem micro-descargas na superfície do Titânio, devido à influência de uma alta tensão, proporcionada pelos parâmetros de voltagem, tempo, densidade da corrente elétrica e composição da solução eletrolítica, culminando na formação de um revestimento de óxido.^{21,22} Estes parâmetros irão determinar as alterações que serão estabelecidas na superfície do material, como morfologia, espessura, propriedades físico-químicas e composição.^{23,24,26,27}

Estudos *in vitro* demonstraram que a texturização por PEO levou à formação de poros distribuídos homogeneamente pela superfície do titânio, gerando uma superfície com maior área de contato, o que favorece a interação celular.^{28,29} Além disso, apresentou resultados superiores a outras superfícies com relação à biocompatibilidade, expressão de fosfatase alcalina, adesão e diferenciação celular, citotoxicidade, molhabilidade e propriedade antibacteriana.^{25,26,30} A presença de íons cálcio e fosfato na solução eletrolítica utilizada para a texturização e sua subsequente incorporação a superfície, proporciona uma superfície favorável à adsorção de proteínas e adesão celular, justamente por aproximá-la da característica química do tecido ósseo.^{25,26}

Com o crescente aumento da expectativa de vida, torna-se cada vez mais frequente o número de pacientes com condições de reduzida densidade mineral óssea e que estão expostos ao risco de sofrer fraturas faciais e de ossos longos, sendo de suma importância a busca por meios que favoreçam o reparo ósseo e reduzam os inconvenientes associados a recuperação destes pacientes. O tratamento por PEO, já demonstrou bons

resultados quando avaliado, *in vitro*, na superfície de implantes de titânio, sendo necessário estudos *in vivo* que envolvam as superfícies de placas de fixação, que atualmente são comercializadas apenas usinadas.^{20,31,32}

A osteoporose induzida experimentalmente gera ossos com reduzida densidade mineral, sendo caracterizado como um bom modelo para a avaliação da influência da texturização por PEO na superfície de placas de fixação, bem como para avaliar o comportamento biológico de reparo ósseo.

2 OBJETIVOS

Este trabalho se propôs a analisar o potencial osteocondutor de miniplacas com texturização de superfície por um método de oxidação por plasma eletrolítico no reparo ósseo de ratas, induzidas à osteoporose, submetidas às fraturas femurais. Buscou-se melhorar o padrão reparacional nas situações críticas do metabolismo ósseo e, possivelmente desenvolver uma patente para os sistemas de fixação, aumentando a previsibilidade de sucesso do tratamento destes pacientes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a presente pesquisa, que buscou avaliar o potencial osteocondutor do sistema de fixação de fraturas de fêmur em ratas na condição de osteoporose, inicialmente apresenta-se todo o processamento microestrutural nas miniplacas de titânio (Ti). Para tanto, as miniplacas que foram utilizadas para a fixação das fraturas de fêmur, foram do sistema 1,5 mm, sendo ambas com 4 furos, sem intermediários na sua extensão. Estas foram fornecidas por uma empresa do setor (Engimplan, Rio Claro, SP, Brasil).

3.1 Texturização de superfície através da oxidação por plasma eletrolítico

Após o fornecimento das miniplacas por parte da empresa do setor de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, metade dessas foram separadas aleatoriamente para a modificação da superfície topográfica por meio da técnica de oxidação por plasma eletrolítico.

As miniplacas de Titânio foram tratadas em um reator, acionado por um sistema elétrico composto pelos seguintes componentes: fonte de alimentação alternada com tensão de saída variável, um transformador, um circuito de retificação, um disjuntor, um amperímetro e um voltímetro. Utilizou-se um osciloscópio para verificar a forma de onda após a retificação. O sistema de processamento é composto pelo porta-eletrodos e a cuba eletrolítica.

Através do sistema elétrico, os eletrodos foram alimentados com tensão DC de até 1000 V e corrente máxima de 1,5 A. Um variador de tensão AC, acoplado na fonte permite o ajuste no valor desejado de tensão. No decorrer do tratamento, a temperatura da solução eletrolítica foi medida com um termômetro portátil. Gerou-se por meio de aplicação de tensão de

290 V com frequência de 250 Hz, ciclo de trabalho fixado em 60% e com tempo de tratamento de 10 minutos.^{26,27} Para este estudo, utilizou-se uma solução eletrolítica à base de acetato de cálcio $[\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ (Sigma-Aldrich) e glicerofosfato dissódico ($\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$) com relação de Ca/P de 0,1M/0,03M.^{26,27}

Os parâmetros de oxidação foram a densidade de corrente de 50 mA/cm² e tensão 250- 400 V. O tempo de oxidação foi de 5 minutos e a temperatura durante a oxidação mantida a 15 +/- 2 °C.

Preparou-se a solução eletrolítica dissolvendo $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (3,6 x 10⁴M) em 1L de água destilada, com relação molar sendo 1.67, a fim de promover a incorporação de diferentes íons na superfície especificada, com deposição de cálcio e fósforo durante 10 minutos.

3.1.1 Caracterização estrutural baseline

No período baseline, seis miniplacas sem a texturização de superfície modificada (CONV) e seis com texturização de superfície com a oxidação por plasma eletrolítico (PEO), foram analisadas pela microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterização da superfície das miniplacas. Empregou-se espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para avaliar a composição química dos tratamentos de superfície. Análises químicas elementares em volumes pequenos (ordem de 1 μm^3) foram realizadas por meio da técnica de EDS utilizando um espectrômetro. A observação do espectro inteiro de raios X de modo simultâneo, permitiu a análise qualitativa rápida (mapeamento) dos principais elemento constituintes das superfícies das miniplacas de Ti, possibilitando comparação da composição química das diferentes superfícies analisadas. O software Image J (National Institute of Health,

EUA) foi usado para determinar o diâmetro médio dos poros e/ou compostos depositados.

3.2 Animais: Desenho experimental

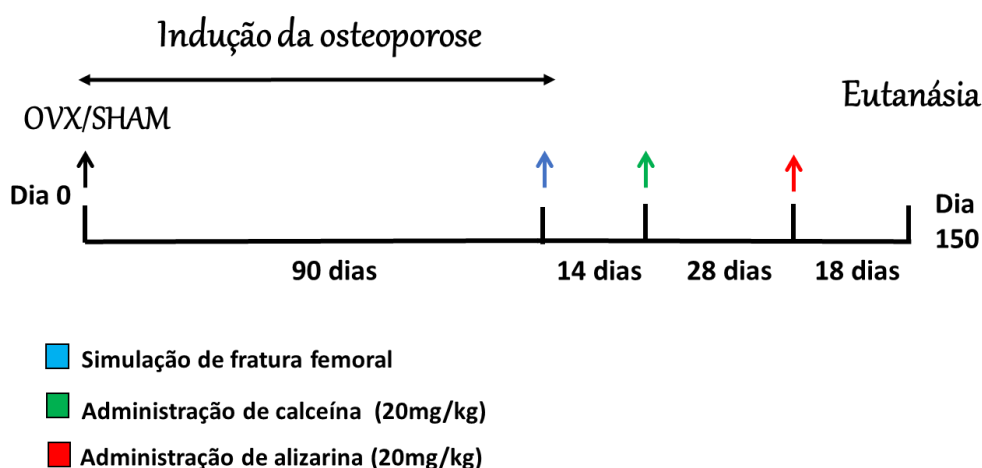
Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Para tanto, o projeto desta pesquisa foi enviado para parecer do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e, somente após a aprovação e obtenção do parecer consubstanciado, iniciou-se a pesquisa (Processo FOA- 00226-2017- Anexo A).

Para a análise da reparação de fraturas em fêmures, 48 ratas (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), fêmeas, adultas (**n=6 animais por grupo**), com 6 meses de idade, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição. O número de animais por grupo foi determinado a partir do cálculo do Poder do Teste no website http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua_2_medias.html, que para o poder do teste na ordem de 0,8 (80%), para o estudo em ratas necessitou-se 6 animais por grupo.

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. 24 ratas foram aleatoriamente alocadas para serem submetidas ao procedimento de ovariectomia bilateral (OVX) e a outra metade (n=24) ao procedimento cirúrgico fictício de ovariectomia, somente com exposição dos ovários, sem sua remoção (SHAM) (Figura 1).

FIGURA 1 - Desenho experimental indicando os períodos de indução à osteoporose; simulação das fraturas e osteossíntese, administração de fluorocromos e eutanásia aos 60 dias pós-operatório



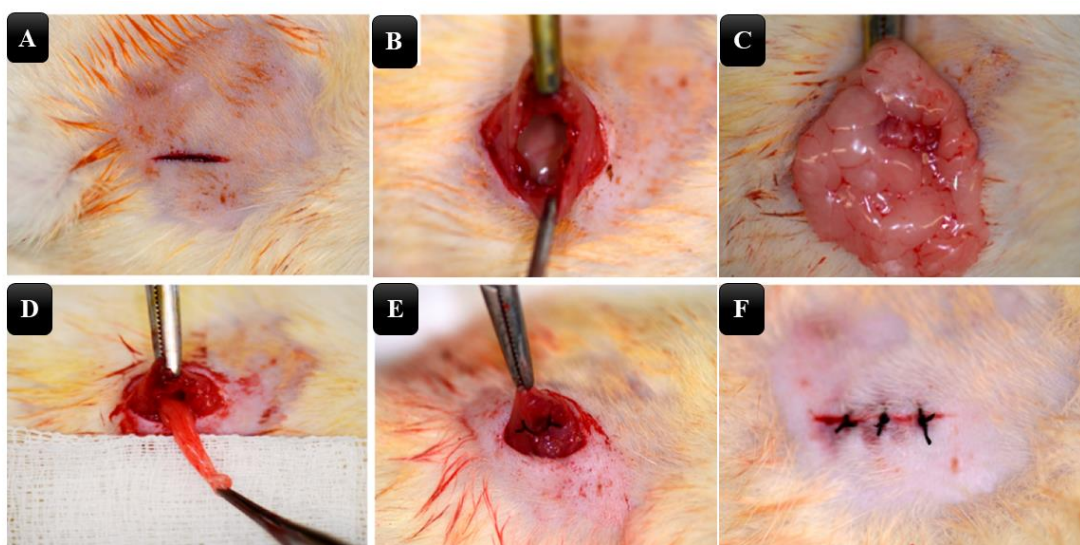
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.1 Ovariectomia bilateral

Nos primeiros oito dias, após a ambientalização, que corresponde a 2 ciclos estrais regulares (ciclo estrogênio), as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal, de acordo com técnica descrita em estudos prévios.^{33,34,35} A obtenção de células epiteliais através do esfregaço, foram dispostas em lâminas histológicas e analisadas em microscópio óptico. Com isso, durante os oito dias, a regularidade do ciclo estral será avaliada. Os animais que não tiverem a regularidade entre as fases estrais (proestro, estro, metaestro e diestro) foram desconsiderados do estudo.

Após esta fase, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral^{34,36,37} sob anestesia com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e cloridrato de quetamina (Ketamina, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.). Em seguida, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em decúbito lateral, realizou-se uma incisão de 1,5 cm nos flancos, divulsão do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio, afim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, os ovários e os chifres uterinos foram localizados e laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryltm - Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, EUA). Feito isso, seguiu-se a remoção dos ovários. Finalizado, realizou-se sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryltm - Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, EUA). As ratas do grupo saudável (SHAM) passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos chifres uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção (Figura 2).

FIGURA 2 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. Incisão nos flancos das ratas (A); Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos (B); Localização do ovário e chifre uterino (C); Laqueadura do chifre uterino (D); Sutura dos planos interno e superficial (F -E)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Estes animais continuaram no biotério sendo alimentadas com ração e água ad libitum durante todo o tempo experimental. Para a experimentação com ratas, as gaiolas comportaram até 4 animais. A temperatura do ambiente se manteve estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro). Passados 90 dias da indução da osteoporose, as ratas foram submetidas ao procedimento de osteotomia para simulação de fratura de fêmur.

3.2.2 Imunoensaio para dosagem de estrógeno

A concentração de estrógeno foi mensurada para validar a condição de osteoporose, para as ratas que foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) em comparação as que foram submetidas somente a cirurgia fictícia de ovariectomia (SHAM), sendo determinado pelo método de ELISA - enzima imunoensaio. Nos Kits comerciais para dosagem dessas citocinas, os 96 poços foram recobertos e incubados com o anticorpo anti-estradiol durante 15-18h a 4°C . Após esse tempo de incubação, a placa foi lavada com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e incubada com solução bloqueadora (PBS contendo 1% de BSA), em temperatura ambiente. A placa, então, foi lavada e logo em seguida, incubada com os padrões e as amostras de plasma em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada e incubada com anticorpo biotinilado à 25°C . A placa foi lavada, o conjugado Streptavidina-HRP foi adicionado e submetido à agitação (300 rpm) à 25°C . A placa foi lavada e incubada com a solução de substrato (Tetrametilbenzidina). O tampão "stop" foi adicionado para interromper a reação de coloração. A leitura foi realizada pelo espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda conforme as orientações do fabricante.

3.2.3 Osteotomia para confecção de fraturas femurais

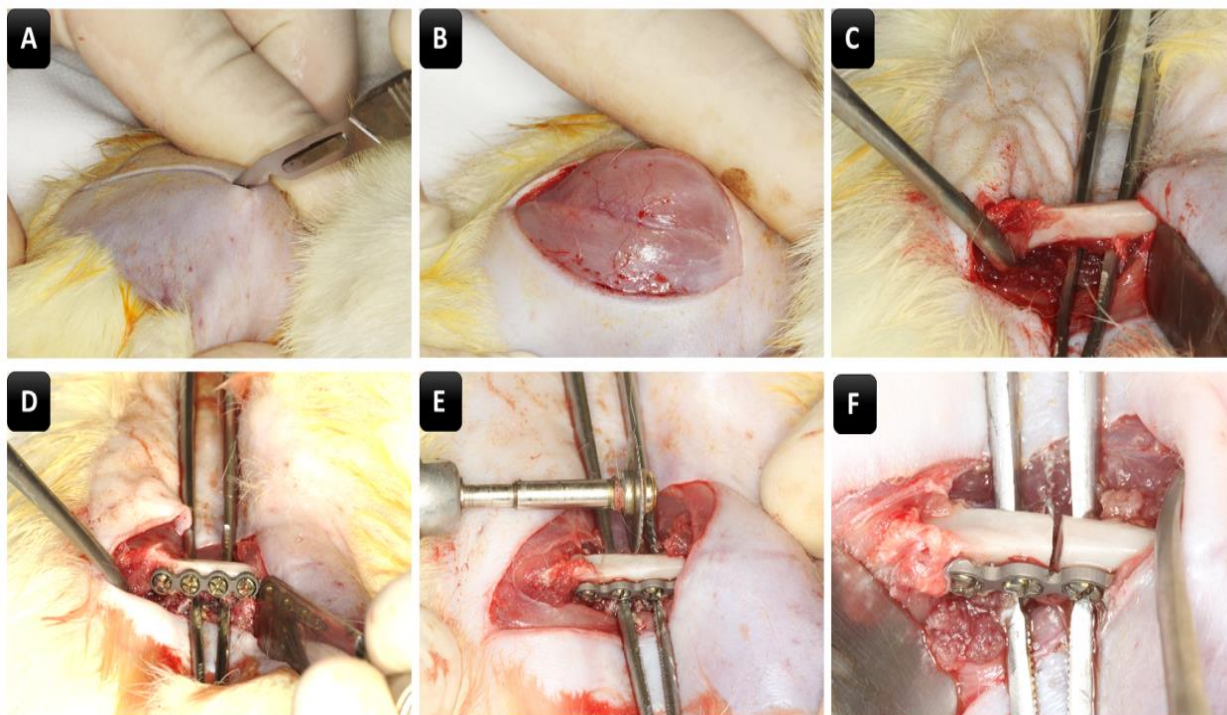
Após o jejum durante 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico, sem restrição hídrica, as ratas foram sedadas pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação dos animais, realizou-se a tricotomia na porção lateral do fêmur direito e esquerdo e, anti-sepsia 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 feita uma incisão de 4 cm de comprimento na porção lateral do fêmur e assim, se expôs bilateralmente o osso do fêmur do polo lateral do côndilo do fêmur, entre o músculo lateral e o músculo bíceps do fêmur. Uma placa do sistema 1.5 mm com 4 furos, sem intermediário, foi fixada bilateralmente, sendo uma placa convencionalmente disponível pelo mercado, em que ambas as superfícies da placa são usinadas (CONV) e, outra placa com as superfícies texturizadas por oxidação por plasma eletrolítico (PEO). Para a confecção da fratura, um disco circular foi utilizado e assim, a osteotomia foi realizada na metáfise epifisária, distando 5 mm da cartilagem articular epifisária e gerando um defeito crítico de cerca de 1,5 mm.^{11,38,39} A eleição do lado de fixação para a placa CONV ou PEO foi determinada por randomização por sorteio. Um envelope tinha dois papéis, um com a palavra "CONV" e o outro "PEO". Assim, no momento da fixação, um pesquisador que estava fora do procedimento cirúrgico, fez o sorteio, primeiramente o lado direito foi fixado e em seguida, o lado esquerdo.

A porção proximal da placa possuía 2 furos para serem fixados, em que utilizou-se dois parafusos do mesmo sistema, com o comprimento de 6mm, após a perfuração bicortical com parafusos do sistema (1,5 mm). Na porção distal da placa, mais dois parafusos (comprimento de 4 a 6 mm) foram parafusados para estabilização da fratura (Figura 3). 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. Suturou-se os tecidos 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 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

Portanto, os grupos experimentais em função da indução da osteoporose e tipo da texturização de superfície foram determinados em OVX/CONV (ratas osteoporóticas com placas convencionais usinadas), OVX/PEO (ratas osteoporóticas com placas texturizadas por PEO), SHAM/CONV (ratas SHAM com placas usinadas) e SHAM/PEO ratas SHAM com placas texturizadas por PEO).

FIGURA 3 – Etapas do procedimento cirúrgico para simulação de fraturas femorais. Incisão na porção lateral do fêmur (A); Visualização dos músculos lateral e bíceps do fêmur (B); Exposição do fêmur (C); Fixação a miniplaca (D); osteotomia para simulação com disco circular; (E) Aspecto final da fratura.



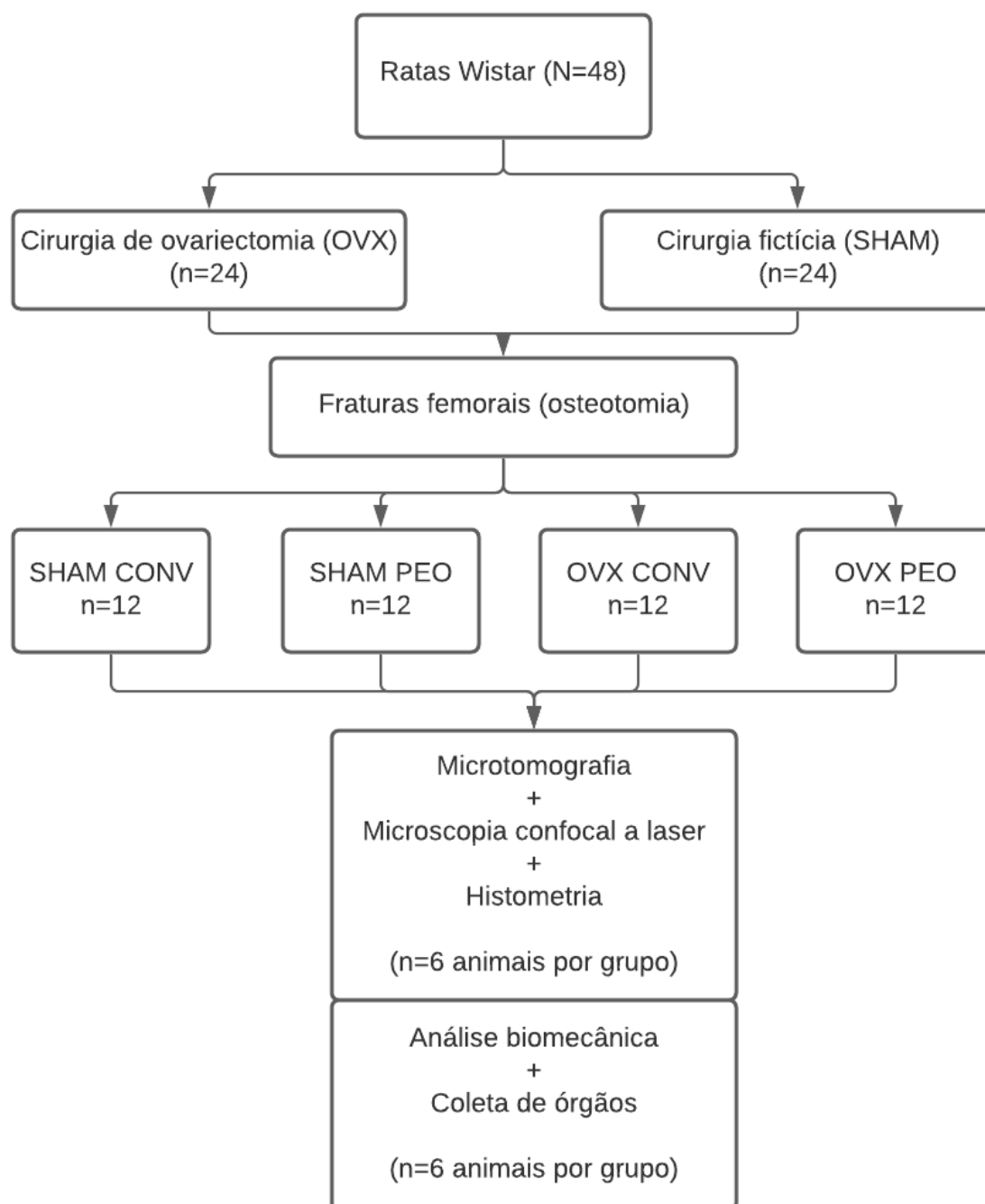
Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 60 dias após a cirurgia de fixação das fraturas femurais, por sobredosagem anestésica (Tiopental Sódico, 100 mg/kg) pela via intraperitoneal.

3.3 Métodos de análises

As amostras coletadas foram encaminhadas para o processamento laboratorial, para posterior análise através de microtomografia computadorizada (MicroCT), escaneamento por microscopia confocal a laser, histometria, análise biomecânica e biópsia de órgãos de metabolização. Além disso, realizou-se uma análise adicional de Imunoensaio para dosagem de estrogênio.

Figura 4 - Fluxograma demonstrando o delineamento experimental, a distribuição do número de animais em cada etapa e os métodos de análise.



Fonte: Elaborado pelo autor.

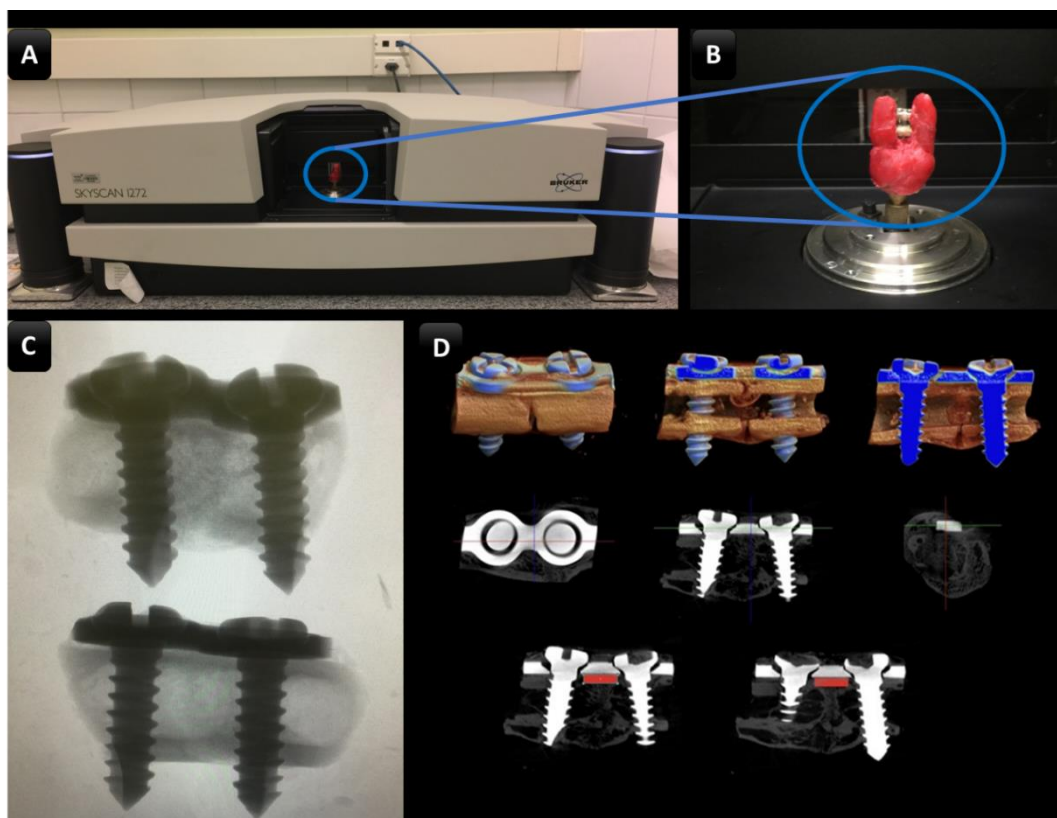
3.3.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional, nos animais pertencentes ao processamento para tecidos calcificados, após a eutanásia, 60 dias de pós-operatório, as peças foram removidas, reduzidas e armazenadas em álcool 70% e, primeiramente submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) (Figura 5) utilizando cortes de 5 μ m de espessura (50Kv e 500 μ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. 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).

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área de interesse (ROI) delimitada pela interface placa e o "gap" reparacional, criado pela osteotomia entre os dois cotos do fêmur fraturado. O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, que possibilitou a obtenção do volume de osso formado na ROI referente ao tecido ósseo neoformado.

Portanto, seguindo os parâmetros volumétricos sugeridos pela Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado, foram obtidos os parâmetros referentes à quantidade do tecido ósseo (BV= volume ósseo e BV/TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas e Tb.N= número das trabéculas).

FIGURA 5 - Procedimentos para análise por microtomografia computadorizada. Dispositivo de microtomografia SkyScan (A); Femures posicionadas e estabilizadas no aparelho de microtomografia (B); Imagem obtida pela digitalização (C); Reconstruções tridimensionais e bidimensionais, com orientação das imagens e determinação da região de interesse (ROI) (área vermelha – “gap” reparacional) (D)



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2 Escaneamento por microscopia confocal a laser (análise do "turnover" ósseo em reparação)

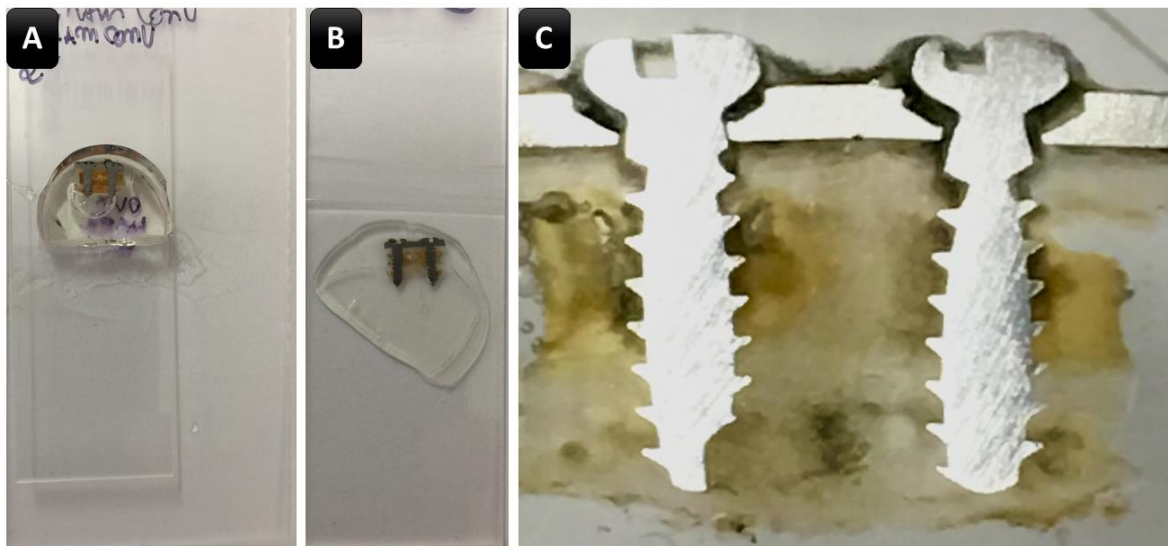
Após a realização do escaneamento das peças, estas retornaram para o processamento laboratorial para inclusão em resina. Portanto, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 80, 90, 95 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 3 dias. As peças em desidratação foram colocadas em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas. Ao término da desidratação, as peças

foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que se utilizou apenas a resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, que será fotopolimerizada e que passou pelo protocolo para processamento do Exakt (Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha). O corte e o desgaste das peças foram realizados utilizando um sistema de corte e em politriz automática (Exakt Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 80 µm de espessura.

Posteriormente, as peças foram montadas em lâminas histológicas de tecidos calcificados (figura 6) e levadas para a análise em microscópio confocal a laser Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As imagens foram obtidas a partir de diferentes secções dos fêmures na região de interesse, semelhante como o realizado na análise por microtomografia (interface placa e o "gap" reparacional, criado pela osteotomia entre os dois cotos do fêmur ou mandíbula fraturados). Depois da seleção da espessura, todos os cortes foram obtidos e operados por meio do z-stack, que permitiu obter o melhor ajuste de imagens que representaram a secção de cada animal dos grupos experimentais. As imagens começaram desde o começo da fluorescência, o que representa na nossa metodologia, o início da calcificação (precipitação de cálcio na matriz orgânica). Estas imagens têm a dimensão de 1x1 mm² e correspondem a secções óticas de 512 por 512 pixels. Secções de 2 µm foram escaneadas por 2,5 min. Assim, 28 cortes foram obtidos para cada 56µm de varredura. Os filtros de barreira utilizados foram o BP 530/30 nm e 590 LP, combinados com a ativação do "double dichroic" 488/568 nm, e o fotomultiplicador foi ajustado em 534 para calceína e 357 para alizarina. Os códigos 534 e 357 nm representam os filtros que permitem visualizar os fluorocromos. Eles foram localizados no microscópio e quando a luz da lâmpada de mercúrio

passou por essas barreiras e alcançou os cortes dos espécimes, foi possível visualizar as cores dos fluorocromos. Um dos filtros possibilita a visualização da calceína (filtro azul) e o outro filtro, a alizarina (filtro verde). As imagens obtidas por microscopia confocal foram reconstituídas através da pilha de software que está instalado para manipular o microscópio confocal (Leica CTR 4000 CS SPE, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha).^{39,40,41}

FIGURA 6 - Lâminas obtidas pelo protocolo de processamento Exakt (A-B) e Área escolhida para análise em microscopia confocal (região entre os dois parafusos mais proximais) (C)



Fonte: Elaborado pelo autor.

O osso do fêmur (região de interesse: "gap" reparacional) deve apresentar duas sobreposições de fluorocromos (calceína e alizarina), cada sobreposição representa uma sobreposição de cálcio que precipitou em cada um dos períodos, assim mostrando a conversão de osso velho para osso novo. Essas imagens foram salvas no formato TIFF e transportadas para o software ImageJ (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada). Usando a ferramenta "color threshold", cada imagem foi

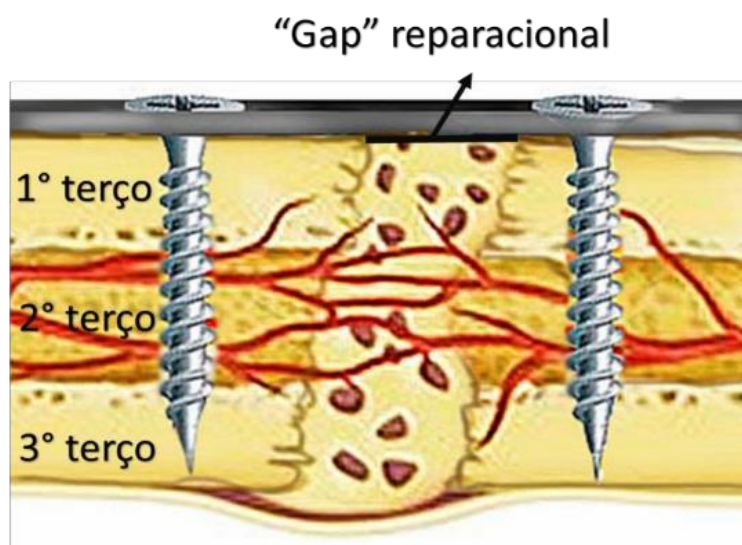
padronizada de acordo com a tonalidade, saturação, e brilho a fim de revelar primariamente os fluorocromos. Primeiro, a calceína foi destacada, e a ferramenta "measure" foi usada para prover a área em μm^2 . O mesmo procedimento foi realizado para a alizarina, obtendo dados da dinâmica do osso alveolar. O turnover ósseo, nessa abordagem metodológica, foi representado pela diferença entre osso velho (verde) e osso novo (vermelho). A partir das imagens sobrepostas (vermelho/verde), por meio da ferramenta "straight" também do software Image J, foi mensurada a distância em μm entre o início da precipitação da calceína até o outro extremo da precipitação do vermelho de alizarina. Esse valor foi dividido por 28 (intervalo entre as aplicações dos fluorocromos: 14-42 dias) e, assim, foi obtido o valor da taxa de precipitação mineral por dia de análise.

Os fluorocromos são componentes químicos que tem a propriedade de se ligar ao cálcio no momento da precipitação na matriz orgânica. Assim sendo, as marcações pelos fluorocromos representam a quantidade da precipitação de cálcio, assim permitindo mensuração da neoformação óssea. Outro aspecto a ser considerado é o período em que os fluorocromos foram injetados, como o primeiro foi a calceína (verde), o osso marcado em fluorocromos verdes representa o osso velho. O segundo fluorocromo injetado foi a alizarina, portando, o osso marcado em fluorocromos vermelhos representa o osso novo. Considerando esses pontos é possível dizer que as diferentes cores representam as diferentes idades dos ossos formados. A dinâmica do tecido ósseo é representada pelo turnover ósseo, que é observado através da renovação óssea representada pelos fluorocromos vermelhos. Quanto maior a prevalência de fluorescência vermelha, maior é a formação de osso novo, enquanto a fluorescência verde representa o osso velho.

3.3.3 Análise histométrica

As mesmas lâminas utilizadas para análise por microscopia confocal a laser, foram lavadas em água deionizada e coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. A área de interesse, representada pela interface placa e o "gap" reparacional, criado pela osteotomia entre os dois cotos do fêmur fraturados, foi mensurada histometricamente por meio da análise da área de osso neoformado (AON). Assim, após a fotomicrografia as lâminas foram salvas em arquivo TIFF, essas foram transportadas para o programa computacional Image J (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canadá), que por meio da ferramenta "free hands" foi utilizada para mensurar a área de osso neoformado μm^2 . A região de interesse foi padronizada em três terços, sendo o primeiro terço representado pela região do "gap" reparacional em contato com a miniplaca para fixação das fraturas; o terço médio, pela região intermediária e, o último terço, o mais próximo do osso cortical basal do fêmur (Figura 7).

FIGURA 7 – Imagem representativa sobre área de interesse (ROI) analisada denotando os três terços da região, no qual, o 1º terço representa a região de "gap" reparacional em contato com a miniplaca; o 2º terço representa a região intermediária e o último terço, a região mais próxima do osso cortical basal do fêmur



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.4 Análise biomecânica

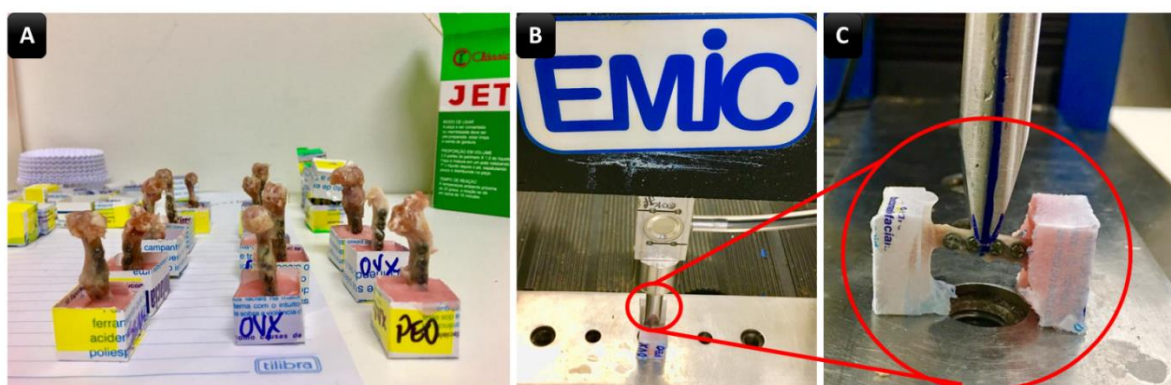
Para a análise das propriedades mecânicas do osso comprometido pela indução da osteoporose (Ovx) ou o osso saudável (Sham), bem como a influência do sistema de fixação, nas fraturas femurais (CONV ou PEO), os animais de todos os grupos, 60 dias após os procedimentos para fixações das fraturas, foram sedados com cloridrato de quetamina e xilazina e em seguida, submetidos à decaptação, através de "guilhotina" para a coleta de sangue, para a dosagem sérica de estrógeno, por meio do método ELISA, com o intuito de validação da técnica de indução de osteoporose pela ovariectomia.

Portanto, os fêmures que foram fraturados e fixados foram removidos, além das tíbias, para o ensaio mecânico. Os ossos foram retirados e dissecados, identificados por grupo experimental e tipo de osso, em seguida foram envolvidos por gases embebidas em solução fisiológica e congelados em freezer à temperatura de -20°C , até o momento do ensaio.

Os ensaios mecânicos de flexão em três pontos foram realizados no Laboratório de ensaios mecânicos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Aracatuba (FOA/Unesp), na máquina universal de ensaio DL 3000 (EMIC, São José dos Pinhais/PR, Brasil) (Figura 8). Nos ensaios de flexão, três pontos nos fêmures foram apoiados sobre dois suportes distanciados 55 mm entre eles. Uma célula de carga KRATOS® modelo KM, com capacidade de até 200 kgf foi utilizada e ligada a uma ponte de extensometria SODMEX®, modelo CAE201. As deflexões foram registradas por um relógio comparador Mitutoyo® com precisão de centésimos de milímetros. Uma pré-carga de 0,5 kgf foi utilizada para acomodação do sistema: máquina, acessórios e osso, com um tempo de acomodação de 1 minuto. A velocidade de aplicação da carga utilizada foi de 0,50 mm/min.

Em face dos resultados coletados, o sistema forneceu os gráficos de carga versus deflexão para cada osso submetido ao ensaio mecânico, e a partir das curvas, as propriedades mecânicas para cada situação foram obtidas: limites de proporcionalidade (LP), limites máximos (LM), rigidez (R) e resiliência (E). O LP é identificado como sendo o último ponto onde se encontra o segmento reto da curva carga x deflexão; LM são os maiores valores da carga e deflexão observados em cada ensaio (ponto máximo); R - é obtida na fase elástica do material, determinada pela inclinação da curva carga x deflexão; E - energia absorvida na fase elástica, obtida através do cálculo da área formada pela região elástica.

FIGURA 8 - Procedimentos para teste biomecânico do complexo osso/mini-placas. Inclusão das extremidades do fêmur em resina acrílica (A); Fêmur estabilizado na máquina universal DL 3000 para realização do teste (B); Modelo de célula usado para aplicação de carga (C)



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.5 Biópsia de órgãos de metabolização

Seguida da coleta dos ossos para a análise biomecânica, também foram removidos os principais órgãos de metabolização para a análise histopatológica. Assim, os pulmões, o fígado, rim e cérebro foram coletados e imediatamente fixados em formalina 10% tamponada (Merck, Darmstadt,

Germany) durante 48 horas. As peças foram microtomizadas em cortes de 5 micrometros de espessura e coradas em hematoxilina e eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada em microscopia óptica (Zeiss, Axioshop, Germany) e possíveis alterações nos órgãos, tais como presença de infiltrado celular ou metais, tecidos hiperplásicos, transformações metaplásicas ou displásicas, foram analisadas entre os grupos experimentais.

3.4 Análise estatística

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos separadamente pelas análises das fraturas femorais, foi abordada a diferença entre os grupos experimentais quanto à alteração sistêmica (2 níveis: Ovx e Sham) e o sistema de fixação (CONV e PEO). Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk, os quais confirmaram a homogeneidade dos dados ($p > 0,05$). Posteriormente, o teste ANOVA 2 fatores foi aplicado e para os resultados que mostraram os valores de $p < 0,05$, o pós-teste Tukey ou Holm-Sidak. O programa estatístico foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA).

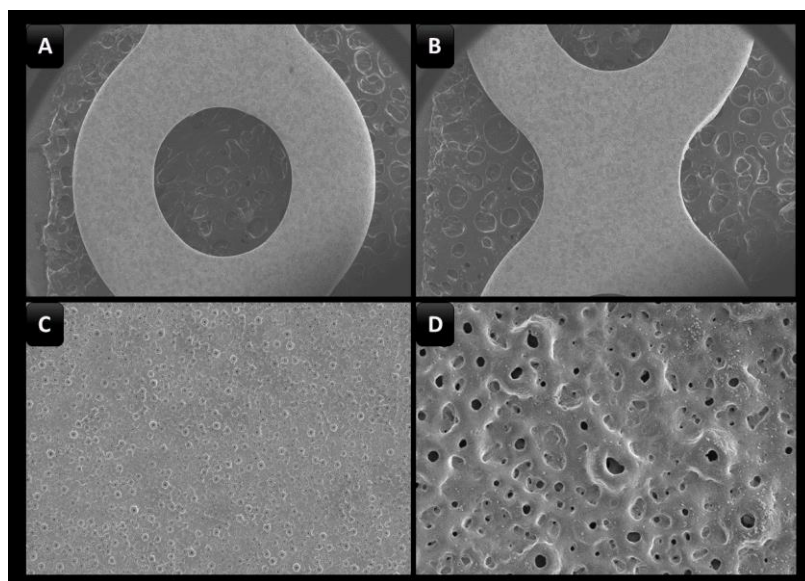
4 RESULTADOS

4.1 Caracterização estrutural baseline

As fotomicrografias representativas obtidas após o escaneamento, das placas tratadas com PEO, em microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostraram uma topografia de superfície homogênea com a presença de poros com geometria semelhante a “vulcão”, independente da magnitude do aumento avaliado (300 ou 2000x) (Figura 9).

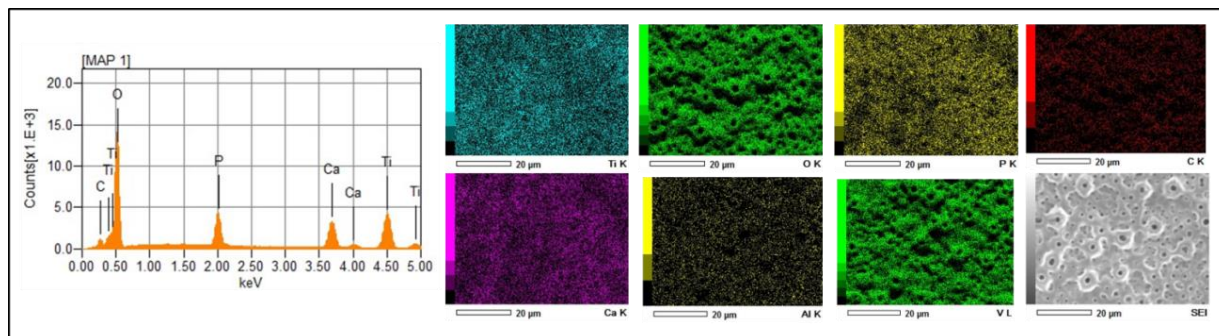
A partir da espectroscopia de energia dispersiva (EDS) a análise química elementar da topografia superficial das miniplacas mostrou picos de titânio em todas as amostras, bem como picos íons de cálcio e fosforo, com média aproximadamente 1,65 a 1,77% de cálcio e aproximadamente 5% de íons fósforo. O mapa de cores obtido a partir do EDS, demonstrou uma distribuição homogênea tanto dos constituintes da miniplaca de Ti como dos íons incorporados pelo método de texturização (cálcio e fósforo) em toda área escaneada (Figura 10).

FIGURA 9 – Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura, nas magnitudes de 30x (A e B), 300x (C) e 2000x (D), das miniplacas com texturização por oxidação por plasma eletrolítico



Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 10 - Imagem representativa do mapeamento dos constituintes da miniplaca com a superfície texturizada por meio da oxidação por plasma eletrolítico (PEO), pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva e mapa de cores referente à distribuição destes constituintes

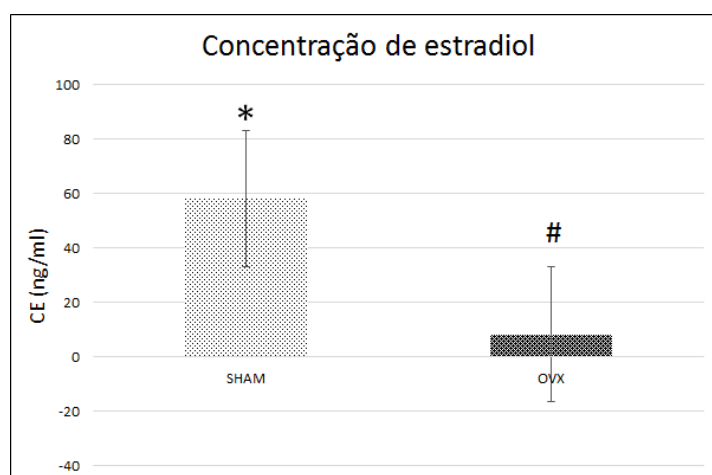


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Imunoensaio para dosagem de estrogênio

Os resultados referentes à concentração de estrogênio plasmático avaliados através do método Elisa evidenciaram a condição de hipoestrogenismo nos animais submetidos à ovariectomia bilateral. É possível observar diminuição significativa na concentração de estradiol do grupo OVX em relação ao grupo SHAM ($p = 0,0003$), comprovando então que 90 dias após a ovariectomia, os animais apresentaram intenso hipoestrogenismo, com condição similar à osteoporose (Figura 11).

FIGURA 11 - Representação gráfica da concentração de estrogênio plasmático, constatando hipoestrogenismo no grupo OVX em comparação SHAM ($p = 0,0003$)

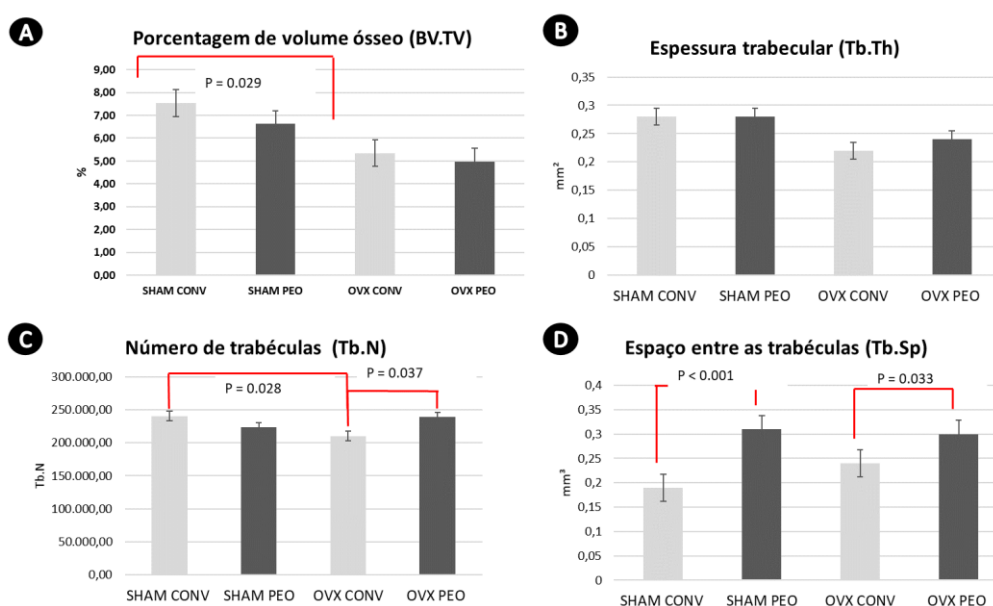


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Microtomografia Computadorizada (Micro- Ct)

A análise microtomográfica evidenciou que os animais saudáveis, independentemente da texturização de superfície (SHAM CONV e SHAM PEO), apresentaram valores bastante favoráveis à microarquitetura óssea durante o reparo da fratura femoral, com maiores valores para porcentagem de volume ósseo (BV.TV) e espessura trabecular (Tb.Th), além de menores valores de número de trabéculas (Tb.N) e espaço entre as trabéculas (Tb.Sp), comparado aos grupos osteoporóticos (OVX CONV e OVX PEO), exceto o grupo SHAM PEO que apresentou valores similares aos do grupo OVX PEO para o parâmetro Tb.Sp. Já com relação à comparação direta das placas texturizadas por PEO entre os animais osteoporóticos (OVX CONV x OVX PEO), foi possível observar valores bastante similares para todos os parâmetros, não apresentando diferenças significativas entre os grupos (Figura 12).

FIGURA 12 – Resultados dos parâmetros microtomográficos. Porcentagem de volume ósseo (BV.TV) (A); Espessura trabecular (Tb. Th) (B); Número de trabéculas (Tb. N)(C); Espaço entre as trabéculas (Tb. Sp) (D)

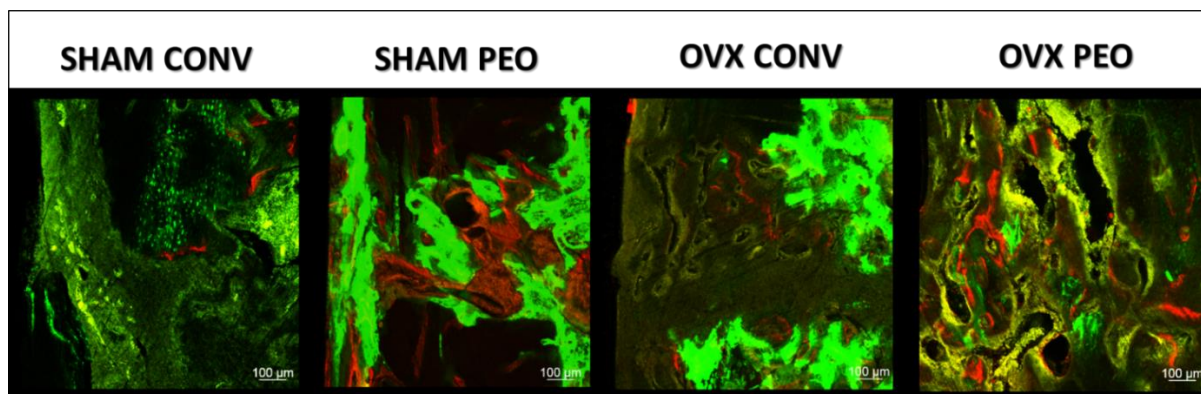


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Escaneamento por microscopia confocal a laser (análise do "turnover" ósseo em reparação)

Aos 14 e 42 dias posteriores à realização da simulação de fraturas femorais, realizou-se aplicação dos fluorocromos calceína e alizarina, respectivamente, e foram obtidas lâminas para leitura em microscópio confocal a laser. A partir das fotomicrografias é possível observar a representação da dinâmica de renovação do tecido ósseo. A coloração verde representa a presença de calceína, a qual está presente em todos os grupos experimentais, e corresponde a deposição de cálcio no tecido ósseo antigo. Já a coloração vermelha, corresponde à precipitação de alizarina, que por sua vez representa o tecido ósseo formado mais recentemente, visto que foi o último fluorocromo a ser aplicado. A alizarina também está presente em todas as imagens, o que demonstra que há um efetivo dinamismo ósseo em todos os grupos, com realização de reabsorção e neoformação óssea (Figura 13).

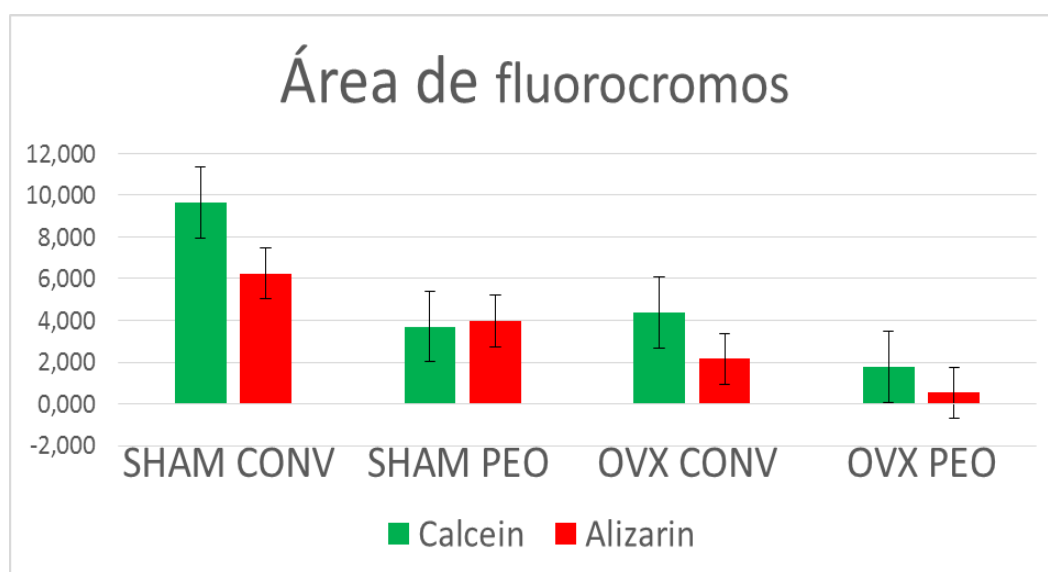
FIGURA 13 – Fotomicrografias das lâminas analisadas pela microscopia confocal a laser, em um aumento de x10. A coloração verde representa o fluorocromo calceína (osso velho) e a coloração vermelha representa a precipitação de alizarina (osso novo)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação aos dados quantitativos, observa-se que o dinamismo ósseo foi mais intenso para o grupo SHAM CONV, com a deposição de calceína ligeiramente maior do que a de alizarina. Já os grupos SHAM PEO e OVX CONV apresentaram valores próximos de área de fluorocromos, sendo que neste ultimo, houve uma maior presença de tecido ósseo velho do que neoformação óssea, o que se repete para OVX PEO, que já apresenta uma área de fluorocromo reduzida, quando comparada aos outros grupos, tanto para calceína, quanto para alizarina. Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 14).

FIGURA 14 – Representação gráfica da área dos fluorocromos calceína e alizarina, para todos os grupos experimentais, evidenciando que para a maioria dos grupos (exceto SHAM PEO), a deposição de calceína (osso velho), foi maior do que a de alizarina (osso novo)



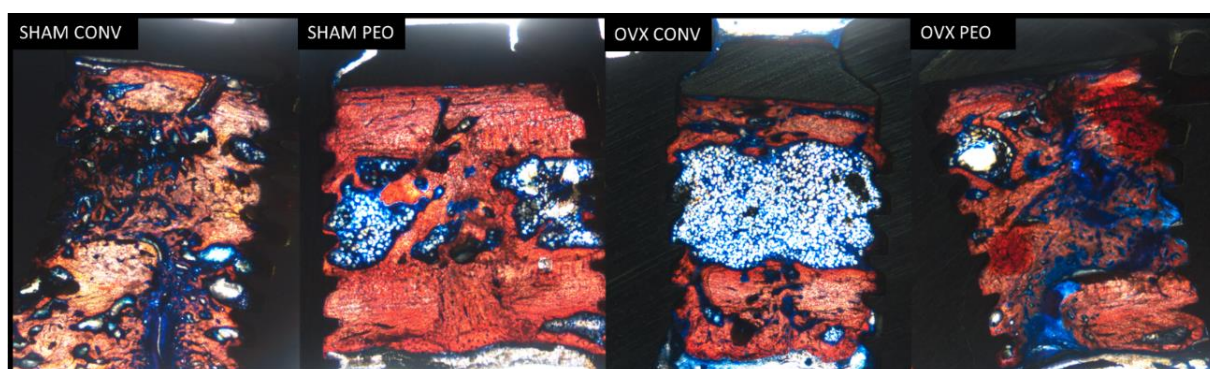
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Histometria

Foram obtidas fotomicrografias através da objetiva (x25) das lâminas histológicas coradas com azul de Stevenel e vermelho de alizarina, após 60 dias de reparo ósseo, de todos os grupos experimentais. Dessa forma, através de uma análise qualitativa das fotomicrografias obtidas, foi possível

evidenciar que a superfície de tratamento através do PEO proporcionou um aspecto reparacional interessante nos animais saudáveis (SHAM PEO), com grande presença de tecido ósseo na maior porção do gap da fratura femoral e poucos pontos com presença de tecido adiposo, quando comparado com as placas de superfície convencional (SHAM CONV), que evidenciaram bom aspecto de neoformação óssea, no entanto com mais áreas de tecido adiposo presente. Já com relação aos animais caracterizados pela baixa qualidade óssea (OVX), foi possível observar que a placa de superfície convencional (OVX CONV) proporcionou reparo ósseo deficiente, com forte presença de tecido adiposo e pequenas áreas de neoformação óssea. Já a texturização por PEO (OVX PEO) demonstrou melhorar de maneira acentuada a neoformação óssea no gap reparacional, com relação ao grupo OVX CONV, demonstrando característica muito similar ao grupo SHAM CONV (Figura 15).

FIGURA 15 – Fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com azul de Stevenel e vermelho de alizarina em um aumento de x25, destacando-se maior presença de reparo ósseo nos grupos SHAM PEO e OVX PEO.

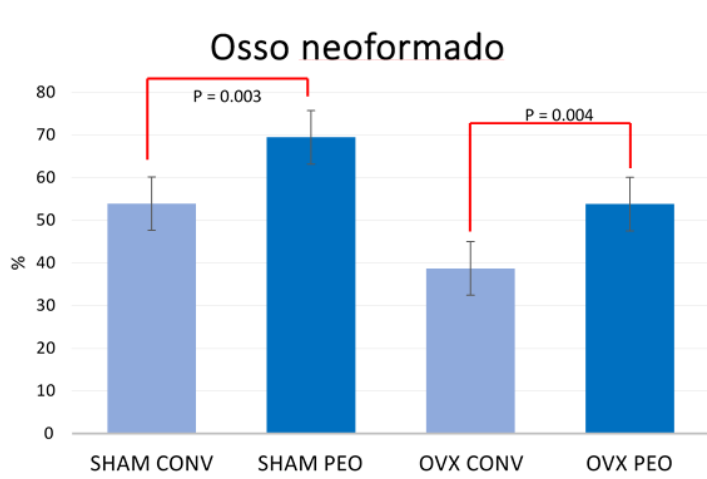


Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação aos dados quantitativos obtidos através do cálculo histométrico, observou-se que, de fato, a texturização por PEO foi benéfica durante o reparo ósseo de fraturas femorais, principalmente em se tratando

dos animais saudáveis (SHAM PEO) que obtiveram a maior quantidade de osso neoformado, contrapondo-se ao grupo OVX CONV, que apresentou a pior quantidade de formação óssea. Os grupos SHAM PEO e OVX PEO demonstraram maiores valores de tecido ósseo neoformado do que SHAM CONV e OVX CONV, com diferenças estatisticamente significativas, entre os tipos de superfície tanto em animais saudáveis, quanto em animais osteoporóticos ($P < 0,05$) (Figura 16).

FIGURA 16 - Representação gráfica do cálculo histométrico, evidenciando superioridade de resultados para os grupos SHAM PEO e OVX PEO ($P < 0,05$)

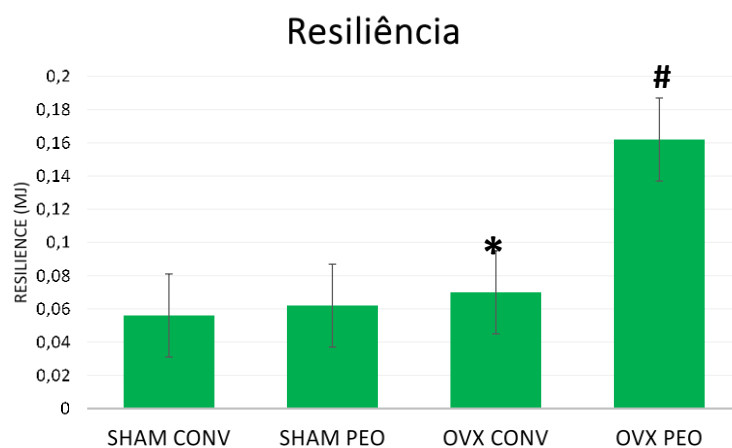


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Análise biomecânica

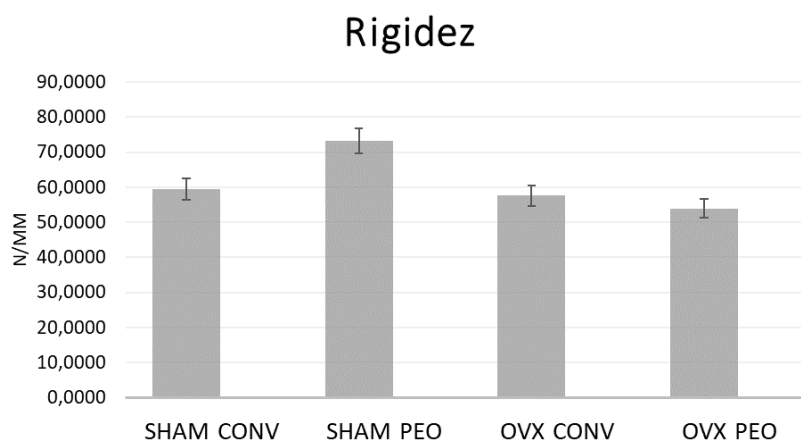
Os ensaios mecânicos de flexão de 3 pontos demonstraram valores de resiliência bastante semelhantes entre os grupos SHAM CONV, SHAM PEO E OVX CONV, sendo de maior destaque o valor de resiliência do grupo OVX PEO, que se apresentou bastante superior aos outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 17). Com relação a rigidez óssea, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). (Figura 18).

FIGURA 17 – Representação gráfica dos valores de resiliência óssea obtidos no ensaio biomecânico por flexão de 3 pontos. O * e # representam a diferença estatística que houve na comparação dos grupos



Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 18 - Representação gráfica dos valores de rigidez óssea obtidos no ensaio biomecânico por flexão de 3 pontos

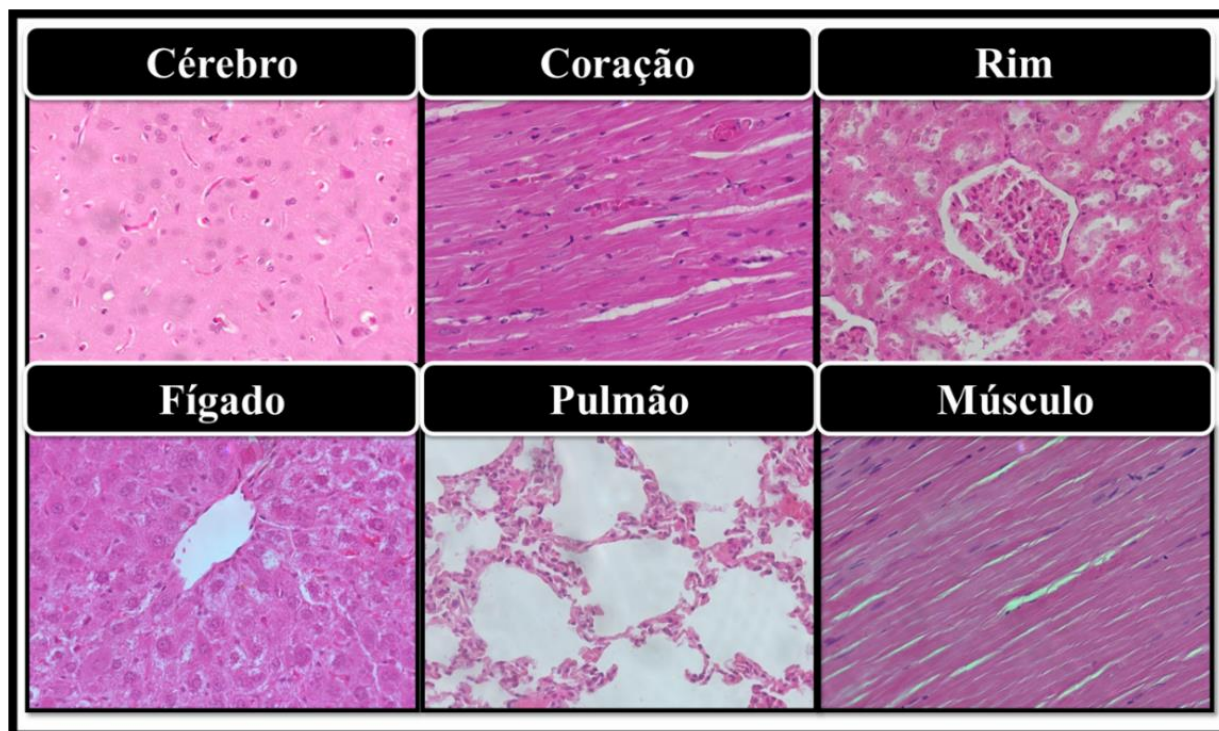


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Biópsia de órgãos de metabolização

Não foram observadas alterações estruturais passíveis de serem visualizadas, em cortes corados em hematoxilina e eosina, em microscopia óptica nos órgãos analisados (Figura 19).

FIGURA 19 - Imagens representativas da análise dos órgãos – cérebro, coração, rim, fígado, pulmão e músculo estriado esquelético



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo pré-clínico inédito foi avaliar a influência da texturização através da oxidação por plasma eletrolítico (PEO) em miniplacas de titânio durante o reparo de fraturas femorais, em animais caracterizados pela baixa densidade mineral óssea (DMO). Foi observado que a texturização por PEO proporcionou melhora importante durante o reparo ósseo das fraturas, principalmente no que diz respeito a maior área de neoformação óssea no “gap” reparacional.

A oxidação por plasma eletrolítico apresenta-se como um método recente descrito na literatura utilizado para a texturização de superfícies de titânio. As superfícies tratadas por PEO se tornam mais duras, resistentes à corrosão e ao desgaste, devido à formação de uma camada de óxido sobre o titânio. Além disso, demonstrou gerar uma superfície altamente hemocompatível e biocompatível. Devido a essas características, o PEO está sendo investigado no âmbito biomédico, principalmente pela implantodontia e tem mostrado resultados bastante favoráveis, nos que diz respeito ao aumento da atividade osteoblástica, no entanto, sem evidências atuais de estudos em osso crítico.⁴²

Este estudo demonstrou que a oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO) é um meio alternativo eficiente para a criação de modificações superficiais e físico-químicas em placas de fixação óssea. A partir da análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), durante o período de caracterização estrutural baseline, constatou-se que após a texturização por PEO, a superfície apresentava uma distribuição homogênea de poros em formato de vulcão. Com a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) notou-se a impregnação satisfatória de íons cálcio e fosfato, validando o modelo experimental utilizado no estudo.

Hartjen *et al.*³¹ observaram as mesmas características topográficas em seu estudo e observaram que estas propriedades melhoraram a

capacidade de adesão, com consequente maior viabilidade celular. Além disso, a presença de íons cálcio e fosfato parece gerar um efeito osteocondutor, aumentando a atratividade para células da linhagem osteoblástica. A propriedade osteocondutora pode ainda estar associado com a capacidade deste tipo de superfície em interagir melhor com a proteína BMP-2, um dos fatores de crescimento liberado pelos osteoblastos.^{27,30,43,44}

Para a caracterização do modelo experimental de baixa densidade mineral óssea, foi realizada a cirurgia de remoção dos ovários bilaterais (ovariectomia) para que, após 90 dias, estivesse instalada a condição de osteoporose nos animais. Os resultados obtidos através da imunoensaio para dosagem de estrógeno evidenciaram diminuição significativa do estradiol plasmático nos animais ovariectomizados, comparado aos animais SHAM. É bem estabelecido na literatura que o hipoestrogenismo severo leva a perda da densidade mineral óssea e, consequentemente, à condição de osteoporose.⁴⁵

Além disso, este modelo foi adotado, uma vez que é sabido que, além da perda de densidade mineral óssea e, consequente, aumento da fragilidade óssea, a osteoporose também interfere de maneira significativa no remodelamento ósseo, levando a possíveis atrasos durante o reparo tecidual.⁴⁶ Estudos pré-clínicos demonstraram que animais ovariectomizados submetidos à simulação de fratura femoral e fixação interna com placas de titânio convencionais apresentaram aspecto de atraso no reparo tecidual, quando comparados aos animais saudáveis.⁴⁷ Além disso, estudo realizado por Campenfeldt *et al.*⁴⁸ evidenciou que pacientes com baixa densidade mineral óssea apresentaram mais falhas na fixação de fraturas femorais comparado a pacientes com densidade mineral óssea adequada.⁴⁸

Neste estudo foi possível observar, através da análise histológica e histométrica, que a texturização por PEO nas placas de titânio proporcionou efeito positivo no padrão reparacional dos animais com baixa densidade mineral óssea, uma vez que é possível observar maior presença de tecido ósseo e poucas regiões com tecido adiposo no gap reparacional, comparado aos animais OVX que receberam placas de titânio convencionais, os quais apresentaram neoformação óssea atrasada com bastante presença de tecido adiposo. Além disso, é possível observar, também, que o grupo OVX PEO apresentou maior área de neoformação óssea comparado ao grupo OVX CONV. Estes resultados quantitativos estão de acordo com o que foi observado por Polo *et al.* na avaliação da influência da texturização por PEO na superfície de implantes osseointegráveis, em que os implantes com superfície modificada por PEO obtiveram valores significativamente maiores para área de formação óssea.⁴⁹

O padrão reparacional dos animais osteoporóticos que receberam placas texturizadas por PEO (OVX PEO) é bem similar ao dos animais saudáveis, que receberam placas convencionais (SHAM CONV), ou seja, o uso da texturização por PEO levou a reparação óssea de fraturas femorais em situação de densidade mineral óssea reduzida à padrões próximos do que se encontra nos animais com densidade óssea normal e com a placa sem texturização (CONV) como é comercializado atualmente.

Os resultados obtidos pela microscopia confocal a laser, demonstram que a presença da texturização por PEO reduziu os níveis de marcação pelos fluorocromos calceína e alizarina, tanto no grupo SHAM, quanto no grupo OVX. Especula-se que esta redução esteja associada a uma otimização da neoformação óssea, devido ao tratamento de superfície. Estes mesmos grupos, foram os que obtiveram maiores valores de área de formação óssea na análise histométrica, o que condiz com a hipótese de uma formação de tecido ósseo mais avançada. O grupo OVX CONV apresentou uma marcação

de fluorocromo próximo do que se encontra para OVX PEO, entretanto, na análise histométrica, foi o grupo com menor valor de área de osso neoformado, o que pode indicar que o reparo para este grupo começou mais tardiamente do que para OVX PEO.

Não se tem na literatura estudos que analisem o reparo ósseo em fixação de fraturas por meio da análise por microscopia confocal a laser, entretanto, esta metodologia já tem sido utilizada para avaliar diferentes tratamentos que favoreçam a osseointegração em implantes.⁵⁰ Nesse contexto, Momesso *et al.* também observaram uma menor precipitação dos fluorocromos calceína e alizarina em superfícies tratadas por PEO, mesmo que a análise histométrica tenha conferido valores de neoformação óssea bem próximos entre os grupos analisados, o que reforça ainda mais a hipótese de que a texturização pode ter provocado uma antecipação do início do reparo ósseo. Contudo, todas as análises deste estudo foram realizadas apenas no tempo de 60 dias, sendo interessante períodos mais curtos para confirmar essas hipóteses.⁵¹

Já com relação aos parâmetros microtomográficos avaliados, foi possível observar que os animais saudáveis (SHAM) apresentaram padrões de microarquitetura óssea positivos, independentemente da texturização de superfície utilizada. Já com relação aos grupos osteoporóticos, foi possível observar que a texturização de superfície por PEO não foi capaz de melhorar de maneira significativa o padrão reparacional quando comparado às placas de titânio convencionais. Os valores de todos os parâmetros foram muito próximos entre os grupos OVX, não corroborando com os resultados histométricos. No entanto, é importante ressaltar que os animais induzidos à condição de osteoporose não foram tratados sistemicamente para a doença, com algum tipo de medicamento e, portanto, não é possível reverter totalmente a situação de deterioração da microarquitetura óssea e esse não é o objetivo da texturização de superfície.

Jingzu Hao *et al.*²⁰ observaram que a criação de uma superfície porosa, através da texturização por anodização, faz com que a rigidez do implante se torne próxima a rigidez da cortical óssea, o que reduz a incompatibilidade mecânica existente entre o Ti e o tecido ósseo, favorecendo a interação com as células de revestimento, que iram modular a formação e reabsorção óssea.^{19,20} Além dessa característica adquirida pela superfície, o próprio tecido ósseo terá sua rigidez aumentada, como o que foi demonstrado pelo grupo SHAM PEO, comparando – o ao grupo SHAM CONV. Os valores para rigidez do grupo OVX foram bastante próximos, e abaixo do que se encontra no grupo de animais saudáveis. Estes resultados corroboram com a análise microtomográfica, onde observou-se no grupo OVX uma alteração da microarquitetura óssea, o que é característica da condição de osteoporose ao qual os animais foram submetidos, após a redução dos níveis de estrogênio gerada pela ovariectomia.⁵² Por outro lado, observamos que não houve uma influência negativa com relação à resiliência do tecido ósseo, visto que OVX PEO se destacou diante dos outros grupos. Isto indica que o tecido ósseo de um animal osteoporótico, com sua fratura fixada por uma placa tratada por PEO, tem a capacidade de receber mais energia de flexão e retornar a sua posição inicial, sem que sofra uma fratura, podendo se especular que apesar de ter uma menor rigidez óssea do que o grupo de animais saudáveis, este tipo de tecido ósseo é mais resistente à fratura.

Sendo assim, apesar de a texturização por PEO não ter melhorado os parâmetros estruturais em ossos de baixa densidade, por não ter efeito sistêmico, como demonstrado pela microtomografia computadorizada, a propriedade bioativa do PEO^{27,30,43} parece ter proporcionado o recrutamento e a sinalização de células pré-osteoblásticas e osteoblásticas, fundamentais no processo de reparo ósseo, o qual a placa convencional não é capaz de realizar. Esse comportamento fez com o processo de reparo da fratura femoral fosse acelerado quando comparado à placa convencional.

Clinicamente isso apresenta uma grande vantagem, uma vez que boa parte das falhas de fixação em pacientes com baixa DMO, deve-se a incapacidade de o tecido recuperar-se rapidamente.⁴⁸

Estudos buscaram avaliar a presença de alterações celulares ou presença de impregnação de metais, associado ao uso de ligas de titânio para tratamento médico-odontológico, sendo constatado uma ausência de alterações teciduais e celulares⁵³. Apesar da biocompatibilidade do titânio já ser bem reconhecida, é importante avaliar se a texturização por PEO não tem potencial de causar dano celular ou liberação de metais nos tecidos.^{54,55} A análise histológica com os órgãos de metabolização e também com o músculo estriado esquelético que se encontrava em íntimo contato com a placa, demonstrou que não houveram quaisquer alterações macroestruturais e nem mesmo a presença de metais.

Apesar das limitações deste estudo pré-clínico, os resultados obtidos são bastante encorajadores para a utilização da texturização por PEO nas placas para a osteossíntese de fraturas ósseas, sejam elas na região maxilofacial ou ortopédicas, em pacientes que apresentam qualquer tipo de alteração sistêmica que leve a redução da DMO. No entanto, mais estudos devem ser realizados com intuito de avaliar os parâmetros de viabilidade celular e resistência mecânica para corroborar e melhor explicar as nuances do estudo.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a texturização por PEO em placas de titânio utilizadas na osteossíntese de fraturas femorais foi capaz de melhorar e acelerar o reparo ósseo de animais com baixa DMO, equiparando-se ao de um organismo saudável utilizando placas convencionais, comercializadas atualmente, no entanto, sem reverter a condição de osteoporose.

REFERÊNCIAS

1. Liedert A, Kaspar D, Augat P, Ignatius A, Claes L. Mechanobiology of Bone Tissue and Bone Cells. In: Kamkin A, Kiseleva I, editors. Mechanosensitivity in Cells and Tissues. Moscow: Academia.; 2005.
2. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015;70:93-101.
3. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(3):133-43.
4. Kanazawa I, Sugimoto T. Diabetes Mellitus-induced Bone Fragility. *Intern Med*. 2018;57(19):2773-85.
5. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(10):1938-56.
6. Szulc P. Bone turnover: Biology and assessment tools. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2018;32(5):725-38.
7. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet*. 2002;359(9321):1929-36.
8. Karlamangla AS, Burnett-Bowie SM, Crandall CJ. Bone Health During the Menopause Transition and Beyond. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2018;45(4):695-708.
9. Lupsa BC, Insogna K. Bone Health and Osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015;44(3):517-30.
10. Cheung WH, Miclau T, Chow SK, Yang FF, Alt V. Fracture healing in osteoporotic bone. *Injury*. 2016;47 Suppl 2:S21-6.
11. Thormann U, El Khawassna T, Ray S, Duerselen 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.
12. De Bruyn H, Christiaens V, Doornewaard R, Jacobsson M, Cosyn J, Jacquet W, et al. Implant surface roughness and patient factors on long-term peri-implant bone loss. *Periodontol 2000*. 2017;73(1):218-27.

13. Hatamleh MM, Wu X, Alnazzawi A, Watson J, Watts D. Surface characteristics and biocompatibility of cranioplasty titanium implants following different surface treatments. *Dent Mater.* 2018;34(4):676-83.
14. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. *Biomed Res Int.* 2015;2015:791725.
15. Tavares MG, de Oliveira PT, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(4):452-8.
16. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20 Suppl 4:172-84.
17. Gupta A, Dhanraj M, Sivagami G. Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview. *Indian J Dent Res.* 2010;21(3):433-8.
18. Oliveira NT, Guastaldi FP, Perrotti V, Hochuli-Vieira E, Guastaldi AC, Piattelli A, et al. Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;15(3):427-37.
19. Lin A, Wang CJ, Kelly J, Gubbi P, Nishimura I. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(5):808-16.
20. Hao J, Li Y, Li B, Wang X, Li H, Liu S, et al. Biological and Mechanical Effects of Micro-Nanostructured Titanium Surface on an Osteoblastic Cell Line In vitro and Osteointegration In vivo. *Appl Biochem Biotechnol.* 2017;183(1):280-92.
21. Krząkała A, Kazek-Kęsik A, Simka W. Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys. *RSC Advances.* 2013;3(43):19725-43.
22. Walsh FC, Low CTJ, Wood RJK, Stevens KT, Archer J, Poeton AR, et al. Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys. *Transactions of the IMF.* 2009;87(3):122-35.

23. Akatsu T, Yamada Y, Hoshikawa Y, Onoki T, Shinoda Y, Wakai F. Multifunctional porous titanium oxide coating with apatite forming ability and photocatalytic activity on a titanium substrate formed by plasma electrolytic oxidation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(8):4871-5.
24. Echeverry-Rendon M, Duque V, Quintero D, Robledo SM, Harmsen MC, Echeverria F. Improved corrosion resistance of commercially pure magnesium after its modification by plasma electrolytic oxidation with organic additives. *J Biomater Appl*. 2018;33(5):725-40.
25. Sobolev A, Kossenko A, Borodianskiy K. Study of the Effect of Current Pulse Frequency on Ti-6Al-4V Alloy Coating Formation by Micro Arc Oxidation. *Materials (Basel)*. 2019;12(23).
26. Marques ID, Barão VA, da Cruz NC, Yuan JC, Mesquita MF, Ricomini-Filho AP, et al. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. *Corros Sci*. 2015;100:133-46.
27. Marques Ida S, da Cruz NC, Landers R, Yuan JC, Mesquita MF, Sukotjo C, et al. Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration. *Biointerphases*. 2015;10(4):041002.
28. Zhou W, Wang T, Gan Y, Yang J, Zhu H, Wang A, et al. Effect of micropore/microsphere topography and a silicon-incorporating modified titanium plate surface on the adhesion and osteogenic differentiation of BMSCs. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2020;48(1):230-41.
29. Zhou W, Peng X, Zhou X, Li M, Ren B, Cheng L. Influence of bio-aging on corrosion behavior of different implant materials. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(6):1225-34.
30. Popkov AV, Popkov DA, Kononovich NA, Gorbach EN, Tverdokhlebov SI, Bolbasov EN, et al. Biological activity of the implant for internal fixation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(12):2248-55.
31. Hartjen P, Hoffmann A, Henningsen A, Barbeck M, Kopp A, Kluwe L, et al. Plasma Electrolytic Oxidation of Titanium Implant Surfaces: Microgroove-Structures Improve Cellular Adhesion and Viability. *In Vivo*. 2018;32(2):241-7.
32. Zhou K, Xie F, Wu X, Wang S. Fabrication of High Temperature Oxidation Resistance Nanocomposite Coatings on PEO Treated TC21 Alloy. *Materials (Basel)*. 2019;13(1).

33. Laurindo CA, Torres RD, Mali SA, Gilbert JL, Soares P. Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;37:223-31.
34. Evans HM, Long JA. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1922;8(3):38-9.
35. Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, Okamoto T, Dornelles RC, Garcia IR, Jr., et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol*. 2010;55(1):52-9.
36. Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR, Jr., Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone*. 2010;46(4):1021-9.
37. 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.
38. 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.
39. 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 Biomater*. 2013;9(6):7035-42.
40. 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.
41. Papalexiou V, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SS, Taba M, Jr., Kajiwarra JK. Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(1):44-53.
42. Klein M, Kuhn Y, Woelke E, Linde T, Ptock C, Kopp A, et al. In vitro study on the hemocompatibility of plasma electrolytic oxidation coatings on titanium substrates. *Artif Organs*. 2020;44(4):419-27.

43. Echeverry-Rendón M, Galvis O, Aguirre R, Robledo S, Castaño JG, Echeverría F. Modification of titanium alloys surface properties by plasma electrolytic oxidation (PEO) and influence on biological response. *J Mater Sci Mater Med*. 2017;28(11):169.
44. He J, Feng W, Zhao BH, Zhang W, Lin Z. In Vivo Effect of Titanium Implants with Porous Zinc-Containing Coatings Prepared by Plasma Electrolytic Oxidation Method on Osseointegration in Rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;33(2):298–310.
45. 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. *J Biomed Mater Res A*. 2019;107(1):49-60.
46. Szeliga A, Maciejewska-Jeske M, Męczekalski B. Bone health and evaluation of bone mineral density in patients with premature ovarian insufficiency. *Prz Menopauzalny*. 2018;17(3):112-6.
47. Chen CH, Wang L, Serdar Tulu U, Arioka M, Moghim MM, Salmon B, et al. An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair. *Bone*. 2018;112:212-9.
48. Campenfeldt P, Al-Ani A, Hedström M, Ekström W. Low BMD and high alcohol consumption predict a major re-operation in patients younger than 70 years of age with a displaced femoral neck fracture-A two -year follow up study in 120 patients. *Injury*. 2018;49(11):2042-6.
49. Polo TOB, da Silva WP, Momesso GAC, Lima-Neto TJ, Barbosa S, Cordeiro JM, et al. Plasma Electrolytic Oxidation as a Feasible Surface Treatment for Biomedical Applications: an in vivo study. *Scientific Reports*. 2020;10(1):10000.
50. 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.
51. Momesso GAC, Santos AMS, Fonseca ESJM, da Cruz NC, Okamoto R, Barão VAR, et al. Comparison between Plasma Electrolytic Oxidation Coating and Sandblasted Acid-Etched Surface Treatment: Histometric, Tomographic, and Expression Levels of Osteoclastogenic Factors in Osteoporotic Rats. *Materials (Basel)*. 2020;13(7).

52. Sharir A, Barak MM, Shahar R. Whole bone mechanics and mechanical testing. *Vet J*. 2008;177(1):8-17.
53. Piozzi R, Ribeiro DA, Padovan LE, Nary Filho H, Matsumoto MA. Genotoxicity and cytotoxicity in multiple organs induced by titanium miniplates in Wistar rats. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88(2):342-7.
54. Moran CA, Mullick FG, Ishak KG, Johnson FB, Hummer WB. Identification of titanium in human tissues: probable role in pathologic processes. *Hum Pathol*. 1991;22(5):450-4.
55. Acero J, Calderon J, Salmeron JI, Verdaguer JJ, Concejo C, Somacarrera ML. The behaviour of titanium as a biomaterial: microscopy study of plates and surrounding tissues in facial osteosynthesis. *J Craniomaxillofac Surg*. 1999;27(2):117-23.

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 "Efeito da bioatividade de miniplacas de titânio texturizadas pela oxidação por plasma eletrolítico no reparo de fraturas ósseas no espectro médico-odontológico", Processo FOA nº 00226-2017, 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 19 de Abril de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 19 de Abril de 2019.

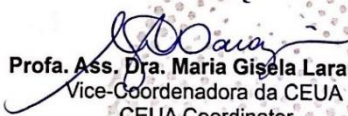
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 19 de Maio de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Bioactivity effect of titanium mini-plates textured by plasma electrolytic oxidation in the bone fractures repair in the medical and dental spectrum", Protocol FOA nº 00226-2017, 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 April 19, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 19, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 19, 2019.


Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Vice-Coordenadora 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

ANEXO B – Envio do artigo para publicação em periódico “Materials Science and Engineering C”

MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C

[HOME](#) • [LOGOUT](#) • [HELP](#) • [REGISTER](#) • [UPDATE MY INFORMATION](#) • [JOURNAL OVERVIEW](#)
[MAIN MENU](#) • [CONTACT US](#) • [SUBMIT A MANUSCRIPT](#) • [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#) • [PRIVACY](#)

Role: Author Username: leobucomaxilo@gmail.com

Submissions Being Processed for Author Leonardo Perez Faverani

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Action	Manuscript Number	Title
Action Links	MSEC_2020_2679	Miniplates coated by plasma electrolytic oxidation improve bone healing of simulated femoral fractures on low bone mineral density rats

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Manuscript Details

Manuscript number	MSEC_2020_2679
Title	Miniplates coated by plasma electrolytic oxidation improve bone healing of simulated femoral fractures on low bone mineral density rats
Article type	Research Paper

Abstract

The treatment of polytrauma patients represents a great challenge in the maxillofacial and orthopedic surgery fields. Therefore, this study tested the hypothesis that the use of a bioactive coating (by plasma electrolytic oxidation, PEO) on titanium microplates could improve the fracture healing of low bone mineral density (BMD) rats. Thirty female rats underwent bilateral ovariectomy surgery (OVX), and 35 rats underwent fake surgery (SHAM). Three months later, animals were subjected to femoral fracture simulation and were fixed with either non-coated (CONV) or coated (PEO) titanium miniplates. Eight weeks postoperatively, microplate/bone complexes were analyzed through computed microtomography, histometric, confocal microscopy, molecular, and biomechanical analysis. Bioactive elements (Ca and P) were incorporated on the PEO microplate and the surface was modified in a volcano-like structure. In the microCT analysis the OVX/PEO group had greater values for Tb.Th (bone trabecular thickness), Tb.Sp (separation of bone trabeculae) and Tb.N (number of trabeculae) parameters compared to the OVX/CONV group. According to histometric analysis, the OVX/PEO group showed significantly higher new bone formation than the OVX/CONV group ($P < 0.05$). For the fluorochrome area, the OVX groups (PEO and CONV) showed greater values for calcein precipitation (old bone) than alizarin red (new bone). Molecular results showed greater values for proteins related to the final phase of bone formation ($P < 0.05$) in the OVX/PEO group. The OVX/PEO group showed higher bone/miniplate system resilience compared to the others ($P < 0.05$). It was concluded that PEO coating optimizes bone healing on simulated femoral fractures in low bone mineral density rats. This sheds new light in the treatment of osteoporotic patients with bone fractures.

Keywords Preclinical studies, Bone histomorphometry, Biochemical markers of bone turnover, Osteoporosis.

Corresponding Author Leonardo Perez Faverani

Order of Authors Gustavo Momesso, Tárík Polo, William Phillip Pereira Silva, Stefany Barbosa, Gileade Freitas, Helena Bacha Lopes, Adalberto Luiz Rosa, Jairo Cordeiro, Luan Toro, Fernando Chiba, Doris Matsushita, Mario Louzada, Nilson Cruz, Valentim Adelino Ricardo Barao, Leonardo Perez Faverani