



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

FRANCIELI DA SILVA FLORES

**Análise do princípio osteoindutor do vidro bioativo
incorporado na superfície de miniplacas pela técnica
de anodização: Estudo em ratas ovariectomizadas**

**Araçatuba - SP
2024**

FRANCIELI DA SILVA FLORES

**Análise do princípio osteoindutor do vidro bioativo
incorporado na superfície de miniplacas pela técnica
de anodização: Estudo em ratas ovariectomizadas**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de
Odontologia de Araçatuba, para obtenção
do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Associado Leonardo P.
Faverani

Araçatuba - SP
2024

Dedico este trabalho aos amores da minha vida, meus pais, Vandileuza da Silva Flores e Edevilson Geraldo Flores, e a minha irmã Graziela da Silva Flores, por serem meus pilares, e por se dedicarem tanto para que um sonho se realizasse. Sem eles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem e ao vice-diretor Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra.

A Coordenadoria de Permanência Estudantil (Cope) – Unesp, pelo apoio financeiro da minha pesquisa de iniciação científica através da bolsa COPE CONECTA. E pelo seu brilhante trabalho de assessoria aos jovens estudantes que se encontram com vulnerabilidade socioeconômica.

Aos colaboradores de pesquisa na realização da oxidação para o PEO-BG, em nome do Professor Valentim Adelino Ricardo Barão da FOP-UNICAMP.

A empresa Traumec (Traumec Health Technology- Distrito Industrial, Rio Claro – SP) por ter fornecido as miniplacas utilizadas em nossa pesquisa, e por ter confiado em nosso trabalho.

Aos animais, *in memoriam*, desta e de todas as outras pesquisas do grupo, que doaram as suas vidas a ciência.

Em nome do grupo de pesquisa, gostaria de agradecer ao Laboratório Multiusuário da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP (#01.12.0530.00-FINEP/ PROINFRA 01/2011) pela facilitação na avaliação de microtomografia computadorizada.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP por toda a sua dedicação e comprometimento a nossa faculdade. Um agradecimento especial a todo o pessoal da limpeza, esterilização, triagem/CDMAC e manutenção por toda a sua disposição, carinho e paciência, sem vocês nenhum atendimento seria possível.

A todos os membros do Faverani's Team, por toda a sua dedicação, trabalho e companhia. Todos os momentos com vocês foram incríveis, e essenciais nesta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos e oportunidades que Ele me concedeu, por todas as pessoas maravilhosas que Ele colocou em meu caminho, por me ensinar a ser mais paciente e resiliente, por me guiar, e me amparar em todos os momentos, por me mostrar diariamente que apesar das minhas aflições, “O SENHOR é o meu pastor, e nada me faltará.” (Salmo 23), que toda honra e glória seja sempre Dele. À Maria, mãe de misericórdia, por toda sua intercessão, por sempre me abrigar de baixo do seu manto, e sempre me conduzir em direção ao seu Filho!

Aos meus pais, **Vandileuza da Silva Flores** e **Edevilson Geraldo Flores**, por terem me dado a vida, por terem se dedicado tanto para que pudesse dar oportunidades melhores para mim e para minha irmã, por garantir que nós estivéssemos bem antes mesmo que eles, por todo amor e carinho. À minha irmã, **Graziela da Silva Flores**, por ser a típica irmã mais velha, coruja, que sempre defende os seus, que reclama, mas é a pessoa que mais me mima, e sempre demonstra o seu amor do seu jeitinho único. À minha família, que são os meus pilares, que sempre acreditou no meu potencial e apoiou os meus sonhos, que são a minha motivação de ser cada dia melhor. Cada passo que eu dou, é por eles, e para que eu possa dar o melhor para eles.

Ao meu professor e orientador, **Leonardo Perez Faverani**, por ter me aceitado como orientada, por além de ensinar ser uma fonte de inspiração, sua paixão pela cirurgia é contagiante; por enxergar um aluno além de sua nota, por ser sempre gentil e atencioso, por sempre me desafiar, me dar oportunidades e as vezes acreditar na minha capacidade mais do que eu mesma. O mundo precisa de mais pessoas e professores como o senhor.

A professora **Ana Paula Farnezi Bassi**, por ser esse grande exemplo de profissional, por todas as suas aulas e ensinamentos, por toda a sua demonstração de carinho. A senhora me transmite muita força e garra, e é muito importante termos como referência mulheres como a senhora. Que o futuro possa me permitir mais tempo com ao seu lado, e que eu consiga aprender ainda mais com você.

A doutoranda **Stéfany Barbosa**, obrigada por me escolher para fazer parte do seu projeto e por toda orientação, por toda paciência, carinho e incentivo, por ter tornado tudo mais leve e simples, sem você tudo seria diferente. Que muitas

peças tenham a oportunidade de conhecer a pessoa incrível que você é e o coração gigante que você tem.

Ao mestrando **Olavo Alcade Panigali**, por ter sido parte importante deste projeto, e por todo incentivo e orientação nos estudos, pelas conversas e bons momentos que tivemos até agora.

À professora **Daniela Micheline dos Santos** por ter aceitado ser suplente na minha banca de avaliação, e por ser um exemplo de professora, que sempre tenta desenvolver e incentivar os seus alunos ao máximo. Ao doutorando **Eduardo Dallazen** por também ter aceitado, e por toda disponibilidade e paciência em ensinar, sendo peça fundamental do grupo de pesquisa.

À professora **Aláide Gonçalves** por ter sido minha orientadora no treinamento técnico no Departamento de Ciências Básicas na disciplina de Histologia, por toda a sua paciência e carinho, por todos os conselhos de vida, e por todas as pipocas com leite ninho que sempre me lembraram a senhora.

Ao professor **Dinael Corrêa de Campos**, da psicologia da Unesp - Campus Bauru, por ter sido o professor responsável pela equipe da Unesp – Campus Araçatuba no incrível Projeto Rondon – Operação Guaiacurus, por sempre tentar extrair o melhor de nós, e por nos fazer refletir desde então o que cada dia tem a nos ensinar. Aproveito para agradecer ao professor **Alexandre de Oliveira Legendre**, aos rondonistas **Douglas, Samyra, Marcos, Mylena, Yasmin, Luã e Rafaela**, a equipe da **Unifenas** e ao subtenente **Amaral**, por toda dedicação e parceria neste projeto incrível que marcou nossas vidas, sempre levarei vocês comigo.

Aos meus amigos de vida, **Thayná Machado Bruno, Otavio Henrique Marchisete Coelho, Pedro Lucas Dias Lacerda, Caio Daniel de Oliveira Secate e Isabela Oliveira Wedekin**, por sempre estarem ao meu lado a mais de uma década e serem um porto seguro, por estarem comigo nos piores e melhores momentos, por me mostrarem o que é amizade verdadeira e serem uma segunda família. Que Deus abençoe a nossa jornada e a nossa amizade, amo muito vocês.

Ao **Caio** em especial, por ter sido um suporte importante em Araçatuba, por ter estado ao meu lado em todos os momentos, por todos os conselhos, por me

fazer voltar para realidade, por todo seu carinho e amor, por ser praticamente um irmão, e fazer da minha vida melhor.

À **Izabela Fornazari Delamura**, por ter dividido o quarto comigo por 3 anos, por ser essa amiga incrível, que sempre se doa e dá o melhor que pode em tudo, por todos os conselhos e orientações de estudo, por ser a minha inspiração de garra e determinação.

Aos meus amigos de faculdade, **Evelyn de Moura Silva, José Roberto Virgilio Matos, Bruna Stefani Costa e Silva, Mirella de Cassia Gasperoni, Marcos Eduardo Gomes Alves, Douglas Sadrac de Biagi Ferreira, Samyra Yukiko Tazaki Dote, Arthur Henrique Alécio Viotto, Paloma Casimiro Lopes de Queiroz, Matheus Henrique Faccioli Raghianti, Bruna Maziero de Jesus** por dividirem essa jornada comigo e tornar tudo mais leve.

À todas as minhas duplas da faculdade, **Maria Carolina Belintani Ferreira** por ter sido minha primeira dupla, e no período mais difícil e ter dividido todo esse processo comigo; ao **Caio Daniel de Oliveira Secate** por ter passado os melhores momentos na periodontia comigo; a **Júlia Peres Mendonça Werlang** por ter dividido o peso da PPR comigo e fazer ser mais leve; a **Mariana de Oliveira Bachega** por ter atendido comigo a princesa mais fofa da ortodontia; a **Paloma Casimiro Lopes de Queiroz** por ser a melhor carona e companhia às 6 da manhã para saúde coletiva; **Matheus Henrique Faccioli Raghianti** por dividir as aventuras da LACTBMF comigo; e pôr fim a **Emili de Lima Minowa** por ter sido esse encontro maravilhoso, por ser o meu oposto, por ser a melhor comediantes para os nossos pacientes e distrair as crianças como ninguém, por ser fofa apesar de dizer que não é, por tornar tudo melhor e encerrar comigo essa jornada maravilhosa!

À todas as meninas que já passaram e estão na casa 24, por toda convivência e momentos bons. E aos meninos da casa 23 por serem os melhores e mais engraçados vizinhos.

“Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as suas rosas,
O resto é a sombra
De árvores alheias.”

Fernando Pessoa

RESUMO

FLORES, FS. **Análise do princípio osteoindutor do vidro bioativo incorporado na superfície de miniplacas pela técnica de anodização: Estudo em ratas ovariectomizadas.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

Este estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos do revestimento de biovidro via oxidação por plasma eletrolítico (PEO-BG) no reparo ósseo de fraturas femorais em ratas ovariectomizadas. Para isso, miniplacas de titânio comercialmente puro (TiCP) foram revestidas por vidro bioativo (~ 45.0 Si, 24.5 Ca, 24.5 Na, 6.0 P; m/v %) via PEO (500 V, 1000 Hz, ciclo de trabalho de 10%, 420 s). Inicialmente, caracterizações de superfície foram conduzidas. Em seguida, 12 ratas Wistar foram submetidas à ovariectomia bilateral. Após 90 dias, foram submetidas ao procedimento de osteotomia bilateral de fêmur e osteossíntese, de forma randomizada, com miniplacas revestidas pela superfície PEO-BG e miniplacas comercialmente disponíveis (grupo CONV), sendo uma em cada fêmur. Todos os animais foram eutanasiados aos 42 dias de pós-operatório, os fêmures foram coletados e destinados às análises de Microtomografia Computadorizada (Micro-CT), análise histológica e histométrica. Os resultados quantitativos foram submetidos a análise estatística considerando $p < 0,05$. As caracterizações topográficas demonstraram para PEO-BG uma superfície com agregados irregulares, maior rugosidade média, maior área de superfície e maior molhabilidade. A análise das imagens 3D obtidas pela micro-ct demonstrou maior tendência ao completo reparo do “gap” para PEO-BG. A análise histométrica demonstrou neoformação óssea significativamente maior para PEO-BG ($p < 0,05$). A avaliação qualitativa histológica constatou uma maturação óssea superior para PEO-BG, bem como menor quantidade de infiltrado inflamatório comparado ao grupo CONV. É possível concluir que o revestimento PEO-BG apresentou efeito de osteoindução, otimizando o reparo ósseo de fraturas femorais em ratas ovariectomizadas.

Palavras-chave: Regeneração óssea; Materiais biocompatíveis; Consolidação da Fratura.

ABSTRACT

FLORES, FS. **Analysis of the osteoinductive principle of bioactive glass incorporated on the surface of miniplates using the anodization technique: A study in ovariectomized rats.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

This study aimed to evaluate the effects of bioactive glass coating via electrolytic plasma oxidation (PEO-BG) on the bone repair of femoral fractures in ovariectomized rats. For this, commercially pure titanium miniplates (TiCP) were coated with bioactive glass (~ 45.0 Si, 24.5 Ca, 24.5 Na, 6.0 P; w/v %) via PEO (500 V, 1000 Hz, duty cycle of 10%, 420 s). Initially, surface characterizations were conducted. Next, 12 Wistar rats underwent bilateral ovariectomy. After 90 days, they underwent bilateral femoral osteotomy and osteosynthesis procedures, randomly assigned to receive either PEO-BG-coated miniplates or commercially available miniplates (CONV group), one on each femur. All animals were euthanized 42 days postoperatively, and the femurs were collected for Micro-CT analysis, histological, and histometric analysis. The quantitative results were subjected to statistical analysis considering $p < 0.05$. Topographical characterizations showed that PEO-BG exhibited a surface with irregular aggregates, higher average roughness, larger surface area, and greater wettability. Analysis of the 3D images obtained by micro-CT showed a greater tendency towards complete gap repair for PEO-BG. Histometric analysis demonstrated significantly greater bone neoformation for PEO-BG. Qualitative histological evaluation revealed superior bone maturation for PEO-BG, as well as a lower quantity of inflammatory infiltrate compared to CONV. Indeed, it can be concluded that the PEO-BG coating exhibited osteoinductive effects, optimizing the bone repair of femoral fractures in ovariectomized rats.

Keywords: Bone regeneration; Biocompatible materials; Fracture Healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise da rugosidade de um disco representante de uma das superfícies utilizadas neste estudo	9
Figura 2 – Demonstração do uso do Goniômetro	9
Figura 3 – Imagens demonstrativas da cirurgia de ovariectomia.	11
Figura 4 – Etapas para confecção de fraturas femorais, osteossíntese com instalação de miniplacas.	13
Figura 5 – Imagens representativas dos resultados de MEV e EDS.	16
Figura 6 – Imagens representativas de CLSM.	18
Figura 7: Gráficos representativos dos dados de molhabilidade e rugosidade.	19
Figura 8: Imagens representativas da análise qualitativa tridimensional através da microtomografia computadorizada.	19
Figura 9: Imagens representativas da área de osso neoformado na região de “gap” formado pela confecção de fratura em fêmur.	21
Figura 10: Representação gráfica dos resultados da análise histométrica relativa à área de osso neoformado.	22
Figura 11: Imagens representativas da análise qualitativa histológica em magnitude de 40x.	23

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Comitê de Ética

33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μ	Micro
μm ³	Micrometros
3D	Tridimensional
45S5	Fosfosilicato de ácido e sódio
Ag	Prata
AON	Área de osso neoformados
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P	Glicerolfosfato de sódio
C ₄ H ₆ O ₄ Ca	Acetato de cálcio
Ca	Cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CLSM	Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D
CONV	Convencional
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	Food and Drugs Administration
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GAP	Lacuna, vazio
HE	Hematoxilina e Eosina
Hz	Hertz
Kv	Coeficiente de permeabilidade vertical
Ltda	Limitada
M	Mega
Micro-CT	Microscópio confocal de varredura a laser 3D
mm	Milímetro
Na	Sódio
Na ₂ O	Óxido de Sódio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
Na ₂ SiO ₃ -	Metassilicato de Sódio Puro
₅ H ₂ O	
NJ	New jerss

OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fosforo
P ₂ O ₅	Fosfato
PEO	Oxidação por plasma
PEO-BG	Biovidro via oxidação por plasma
pH	Escala de acidez ou alcalinidade
Si	Silício
SiO ₂	Dióxido de Silício
Ti	Titânio
Ticp	Titânio comercialmente puro
UNESP	Universidade estadual paulista
UNICAMP	Universidade de Campinas
V	Volts
VOI	Volume Ósseo de Interesse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	5
3 MATERIAIS E METODOS	6
3.1 Revestimento da superfície à base de vidro bioativo por oxidação por plasma eletrolítico	6
3.2 Caracterizações de Superfície	7
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	8
3.2.2 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM)	8
3.2.3 Perfilometria (rugosidade de superfície)	8
3.2.4 Molhabilidade	9
3.3 Ovariectomia	10
3.4 Confeção de fraturas femorais	11
3.5 Suspensão pela cauda	13
3.6 Métodos de Análise	14
3.6.1. Microtomografia computadorizada (MICRO-CT)	14
3.6.2. Análise histológica e histométrica	14
3.7 Análise estatística	15
4 RESULTADOS	16
4.1 Caracterização topográfica	16
4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	16
4.1.2 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM)	17
4.1.3 Molhabilidade	18
4.1.4 Rugosidade de superfície	19
4.2 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)	19
4.3 Análise histológica e histométrica	20
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
APÊNDICES	33

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um órgão vivo, não estático, que é constantemente remodelado, do desenvolvimento do esqueleto ao decorrer da vida adulta.(1,2) Essa remodelação é fundamental para conservação da qualidade óssea, e para que o osso mantenha a sua função de suporte e regulador da homeostase mineral.(1,3) Calcula-se que cerca 10% do esqueleto seja renovado a cada ano através desta remodelação, que é um processo coordenado e dominante.(1) Este processo acontece em unidades multicelulares ósseas discretas, inicia-se com os osteoclastos reabsorvendo o osso antigo, depois os osteoblastos continuam o processo, formando um novo osso nas lacunas onde ocorreram essa reabsorção.(2) No estado funcional do organismo, tanto a quantidade de osso reabsorvida quanto a quantidade formada são proporcionais.(1)

No entanto, pode ocorrer um desequilíbrio nessa capacidade do tecido ósseo de ser remodelado, reparado, acarretando um tecido ósseo deficiente, devido a condições patológicas como diabetes, anemia, osteoporose, artrite reumatoide, ou ao uso de medicamentos, como os antirreabsortivos, os glicocorticoides, ou em pacientes tabagistas.(1,4) Esse desequilíbrio também pode ser encontrado em condições fisiológicas naturais como em pessoas idosas, em mulheres após menopausa.(1)

Destas condições patológicas, a osteoporose gera uma evidente remodelação desequilibrada, se tratando de uma doença crônica degenerativa, onde possui como particularidades a redução da densidade mineral óssea(1,5), sendo $\leq -2,5$ do desvio padrão do adulto jovem (score T) segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), redução dos minerais ósseos e a destruição da microestrutura do tecido ósseo, ocasionando assim em uma redução da resistência mecânica do osso, aumentando a fragilização óssea. Nestas condições há um aumento do risco de fraturas patológicas. A osteoporose é observada principalmente em idosos e mulheres na pós-menopausa.(1,6)

A osteoporose pós-menopausa está relacionada ao déficit de estrogênio, essa deficiência gera um aumento da remodelação óssea, ocasionando um desequilíbrio relacionado ao aumento da atividade dos osteoclastos, ao passo que a formação de novo tecido ósseo diminui(1,7). Assim, essas mulheres apresentam uma diminuição

da densidade mineral óssea e um maior risco a fraturas faciais (1) e de ossos longos. Uma série de estudos realizada pela FDA (Food and Drugs Administration) revelou que ratas ovariectomizadas replicavam a perda óssea esponjosa no período de pós-menopausa, quando analisadas com tempo inferior à de 12 meses. Sendo assim o estudo conseguiu exemplificar que na tíbia proximal, fêmur distal e vértebras lombares de ratas, foi possível imitar as condições de uma mulher na pós-menopausa, pois houve um aumento da remodelação óssea que acabou gerando uma perda óssea após essa ovariectomia.(8)

As fraturas faciais são frequentemente uma das razões pelos quais os pacientes procuram por uma emergência hospitalar. Essas lesões traumáticas acabam resultando em diversos padrões de fraturas, que podem ocorrer isoladamente ou ao mesmo tempo que outras fraturas. (9,10) São decorrentes principalmente de quedas, acidentes de trânsito, agressões físicas, exposição a forças mecânicas, entre outras.(7,9,10) A essas lesões estão atreladas consequências como comprometimento da função facial, danos estéticos, distúrbios psicossociais, que impõem um peso ao indivíduo, a família e a sociedade(7). A terapia para estes pacientes se torna um desafio para a equipe da cirurgia bucomaxilofacial, quando se tratando de fraturas faciais, assim como para médicos ortopedistas no que diz respeito as fraturas de ossos longos. (9,11,12)

Na presença dessas fraturas, o cirurgião pode realizar a redução anatômica, reaproximando cuidadosamente e estabilizando de maneira mais rígida as extremidades dessas fraturas com a colocação de placas. Com essa distância minimizada, acontece uma formação óssea por todo o defeito da fratura na presença de pouco tecido conjuntivo fibroso, que precisa conter um elevado grau de vascularização para essa ossificação de fato ocorrer. O osso necessita de alguma tensão estimuladora para que os osteoblastos continuem a formação óssea. O osso forma-se perpendicularmente à linha de tensão para ajudar a suportar as forças de tensão sobre ele(13). Essa redução/fixação possui como objetivos devolver a função a região, que pode ser, mastigar, falar, estabilizar e corrigir a oclusão, conseguir uma amplitude maior do movimento mandibular sem que gere dor, restaurar e garantir uma estabilidade que seja favorável a união óssea. (14)

Entretanto em ossos de ratos osteoporóticos, com densidade mineral reduzida, houve um aumento da remodelação e uma inadequada formação óssea,

ocasionando em uma maturação atrasada dos cotos ósseos e uma redução da velocidade de consolidação da fratura.(5) Revisões clínicas comprovaram este fato, onde demonstraram que a falha da fixação da fratura se apresentou de forma expressiva em pacientes osteoporóticos.(5,6)

Em decorrência disso, diversos estudos foram realizados com o objetivo de tentar contornar essas limitações, através da avaliação da interação biológica entre a superfície das placas estabilizadoras e o osso fraturado. Uma alternativa que tem sido bastante empregada na implantodontia para melhorias no reparo ósseo e mais recentemente em placas de fixação, são os revestimentos ou texturizações de superfície.(15,16) Um dos tratamentos de superfície que se apresentou bastante promissor na consolidação de fraturas, é oxidação eletrolítica plasmática (PEO). PEO representa um processo eletroquímico de oxidação, onde há conversão do substrato metálico em seu óxido, para a criação do revestimento. Permite a integração de elementos químicos a superfície como, o cálcio (Ca), o fósforo (P), o silício (Si) e a prata (Ag).(17) O PEO possui uma boa bioatividade, apresenta propriedades antibacterianas e pode gerar uma resistência aumentada à corrosão.(17,18) Em estudo recente com ratos demonstrou-se que miniplacas tratadas com PEO, induziram uma melhora na consolidação óssea nas fraturas simuladas em fêmures, aumentando assim a resiliência entre osso/microplaca.(17)

Com o intuito de melhorar a bioatividade, desenvolveu-se o revestimento de vidro bioativo (BG) através da técnica de oxidação por plasma eletrolítico (PEO), isto é, um revestimento fabricado através de PEO sobre a superfície de discos de Ti, utilizando precursores do biovidro 45S5® em solução eletrolítica (SiO₂, CaO, Na₂O, P₂O₅). O PEO-BG apresentou características altamente positivas, como alta aderência ao substrato, alta resistência a corrosão e ao desgaste tribológico, biocompatibilidade com células humanas, mecanismos biológicos in vitro semelhantes ao 45S5-bioglass®. Além disso, acredita-se que PEO-BG provoca uma lixiviação de íons que eleva o pH do meio, induzindo uma maior precipitação de hidroxiapatita e uma maior absorção superficial de proteínas do plasma sanguíneo, levantando a hipótese de se tratar de uma superfície com capacidade osteoindutiva.(19)

Diante das limitações apresentadas para o tratamento de fraturas em pacientes com condições de densidade mineral reduzida, como o ocorrido na

osteoporose e dado o ineditismo do uso de PEO-BG em experimento pré-clínico, este estudo tem grande relevância para avaliação do potencial osteoindutivo de PEO-BG em fraturas femorais de ratas ovariectomizadas.

2 OBJETIVO

O objetivo geral do estudo foi avaliar a capacidade osteoindutora de miniplacas revestidas com vidro bioativo por meio de oxidação por plasma eletrolítico, visando aperfeiçoar o reparo ósseo em ossos de baixa densidade. Esse tipo de pesquisa é importante para entender como os materiais bioativos podem influenciar no processo de cicatrização óssea, especialmente em condições desafiadoras. Sendo assim, os objetivos específicos desta pesquisa foram:

- 1) Sintetizar revestimentos de PEO-BG em miniplacas de Tícp por meio do PEO;
- 2) Caracterizar as superfícies experimentais em termos de morfologia, topografia, composição química e propriedades físico-químicas;
- 3) Investigar *in vivo* o potencial de reparação óssea na presença de miniplacas revestidas com PEO-BG.

A hipótese nula desta pesquisa é que o tipo de superfície, neste caso, o revestimento de vidro bioativo através da oxidação por plasma eletrolítico, não teria influência nos parâmetros de reparação óssea a serem analisados em ratas ovariectomizadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada seguindo os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto desta pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pertencente à Universidade Estadual Paulista — Júlio de Mesquita Filho – UNESP (processo número 0622/2023), somente após a aprovação e obtenção do parecer a pesquisa foi iniciada.

O número de amostras por grupo foi determinado utilizando a ferramenta “Sample Size for Anova” do programa SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA). Foram considerados resultados de desfecho primário em artigos anteriores com metodologia semelhante. No cálculo amostral, utilizou-se uma diferença de 0,11, desvio padrão de 0,02 e poder estatístico de 95%, resultando em n=3 animais (n= 6 fêmeas) por grupo e por análise.(18)

Para o estudo em modelo animal, foram fornecidas pelo Biotério Central da UNESP, 12 ratas (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), fêmeas, adultas (n=6 por grupo), com 6 meses de idade e peso corporal variando de 250 a 300 gramas, provenientes de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA).

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz controlado (12 horas de claro e 12 horas de escuro). Foram alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e tiveram acesso a água ad libitum, à exceção das 12 horas que antecederam os procedimentos cirúrgicos.

3.1 Revestimento da superfície à base de vidro bioativo por oxidação por plasma eletrolítico

Para realizar o revestimento de PEO-BG, as amostras (miniplacas) foram submetidas a uma série de etapas de preparação. Inicialmente, foram limpas por ultrassom com água deionizada por 10 minutos, em seguida, desengorduradas com propanol a 70% por mais 10 minutos e finalmente secas com ar quente a 250°C . O

tratamento por PEO foi conduzido utilizando uma fonte de alimentação de corrente contínua fornecida pela Plasma Technology Ltda. Esse processo ocorreu no Laboratório de Plasma Tecnológico da UNESP de Sorocaba, sob a supervisão do Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz, em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Valentim Barão da UNICAMP, estabelecendo uma parceria sólida e produtiva entre as instituições.

O tratamento foi conduzido com a amostra (ânodo) imersa em uma solução eletrolítica dentro de um reservatório feito de aço inoxidável (cátodo), o qual possuía um sistema de refrigeração para manter a temperatura da solução em torno de 20°C. O suporte da amostra foi projetado de forma a permitir a exposição completa da miniplaca ao eletrólito durante o processo. Essa configuração proporcionou condições adequadas para a realização eficaz do tratamento por plasma eletrolítico.

A solução eletrolítica foi preparada utilizando várias substâncias químicas, incluindo metassilicato de sódio 0,014 M ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), acetato de cálcio 0,20 M ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Ca}$), nitrato de sódio 0,50 M (NaNO_3), e glicerolfosfato de sódio 0,0010 M ($\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$), que são fontes precedentes dos principais elementos bioativos do 45S5-bioglass. Além disso, foi utilizado 0,025 M de $\text{Na}_2\text{-EDTA } 2\text{H}_2\text{O}$ como agente quelante em todas as soluções eletrolíticas.

Os parâmetros de trabalho da PEO foram definidos como uma tensão anódica pulsada de 500 V, frequência de 1000 Hz e ciclo de trabalho de 10%, com duração total de 420 segundos. Após o tratamento por PEO-BG, as amostras foram enxaguadas em água destilada, secas ao ar e esterilizadas por autoclave 24 horas antes do procedimento cirúrgico, viabilizando a adequada preparação para a aplicação na fase cirúrgica.

3.2 Caracterizações de Superfície

Durante o período inicial do estudo, todas as superfícies foram submetidas a avaliações para verificar a reprodutibilidade dos resultados. Para isso, foram utilizados discos de titânio com características semelhantes às das superfícies testadas, conforme descrito em estudos anteriores *in vitro*. As análises qualitativas foram conduzidas com uma amostra de $n=2$ para cada grupo (CONV e PEO-BG)

enquanto as análises quantitativas foram realizadas com uma amostra de $n=4$. Em todas as análises, foram feitas leituras em pelo menos três áreas distintas.

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para avaliar a morfologia da superfície das amostras, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise pela espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi realizada em pequenos volumes, na ordem de $1 \mu\text{m}^3$ (5). Mapas de cores foram utilizados para investigar a distribuição dos elementos químicos na superfície dos implantes e confirmar a proporção estequiométrica (% atômica) esperada (45% Si, 24.5% Ca, 24.5% Na, 6% P; 5:2:2:1 razão biológica).

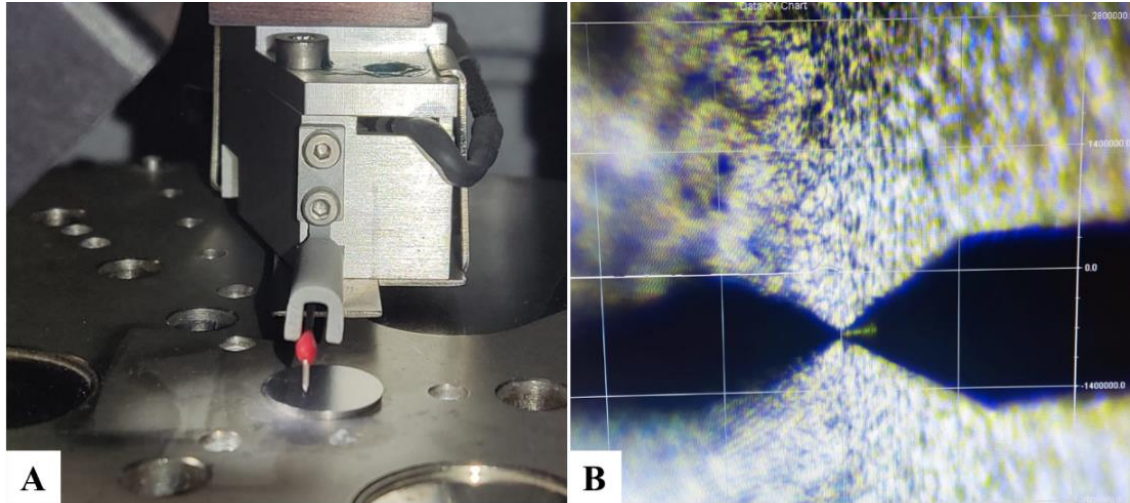
3.2.2 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM)

O microscópio confocal de varredura a laser 3D (CLSM) da série Keyence VK-X200 foi empregado para capturar imagens bidimensionais e tridimensionais, permitindo a caracterização qualitativa da topografia da superfície dos espécimes. Ampliações de 50x e 150x foram utilizadas para esse fim. O processamento das imagens e a medição da área de superfície foram conduzidos através do software VK-Analyzer, versão 3.3.0.0, fornecido pela Keyence. Esse software oferece ferramentas para análise e medição de características superficiais com precisão e eficiência.

3.2.3 Perfilometria (rugosidade de superfície)

Por meio de um perfilômetro (Dektak 150-d; Veeco) (Figura 1), analisou-se a rugosidade de superfície das amostras. / Para obter os valores de R_a (média aritmética da rugosidade de superfície) utilizou-se o cut-off de 0,25 mm aplicado a uma velocidade de 0,05 mm/s por um período de 12 segundos.

Figura 1 – Análise da rugosidade de um disco representante de uma das superfícies utilizadas neste estudo.



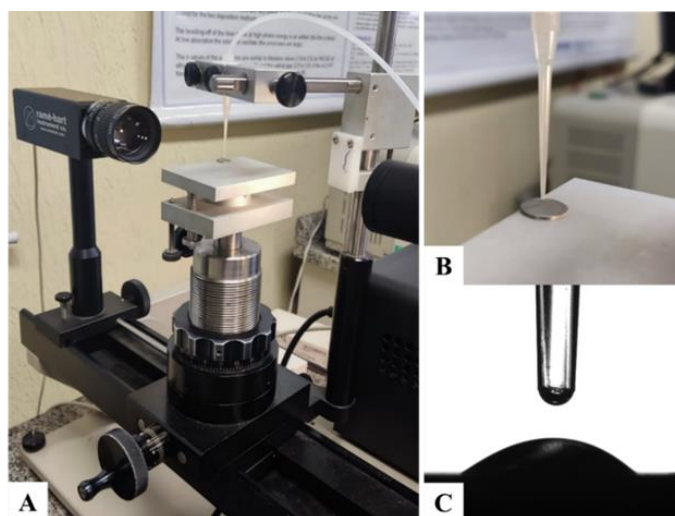
Fonte: Elaborada pela Autora, 2024

Legenda: Demonstração macroscópica (A) e microscópica (B) da ação do perfilômetro

3.2.4 Molhabilidade

O ângulo de contato da superfície foi determinado utilizando um goniômetro (modelo Ramé-Hart 10000, fabricado pela Ramé-Hart Instrument Co) por meio do método da gota séssil (conforme mostrado na Figura 2). Os grupos foram analisados quanto ao ângulo de contato com a água, que é uma medida do componente polar da superfície.

Figura 2 – Demonstração do uso do Goniômetro.



Fonte: Elaborada pela Autora, 2024

Legenda: (A) Goniômetro utilizado para cálculo do ângulo de contato. (B) Demonstração da ponteira responsável pela aplicação da gota na superfície do disco testado. (C) Imagem capturada pelo programa após a mensuração dos ângulos formados.

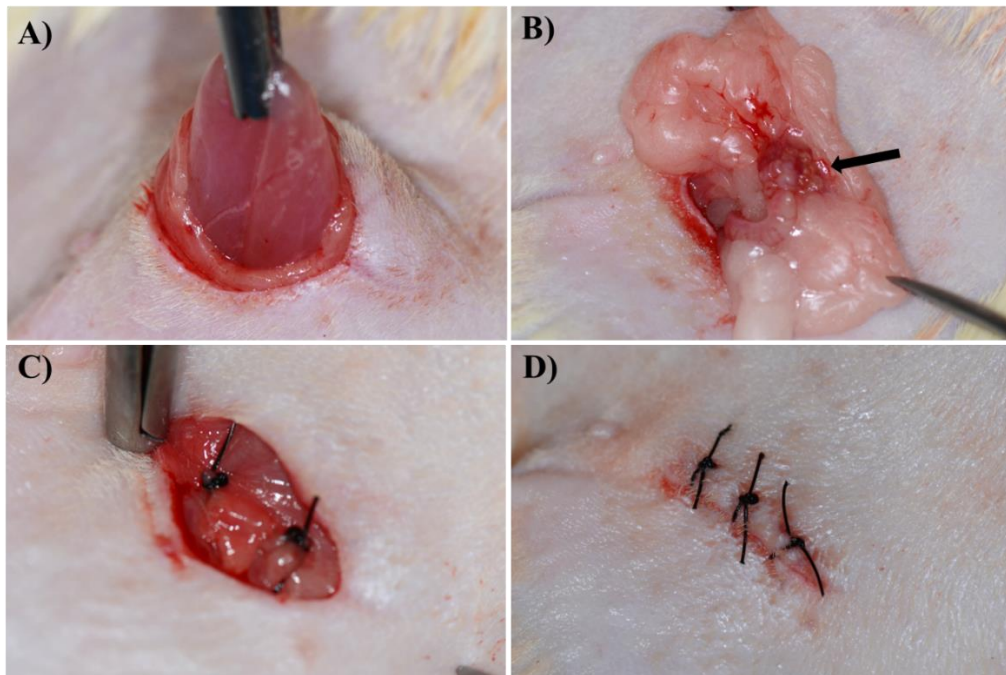
3.3 Ovariectomia bilateral

As ratas foram submetidas a um esfregaço vaginal, nos oitos primeiros dias correspondentes a dois ciclos estrais regulares (ciclo estrogênio) e após uma ambientação, conforme as técnicas descritas em estudos anteriores.(5) As células epiteliais obtidas pelo esfregaço foram dispostas em lâminas histológicas e analisadas em microscópio óptico, para verificar a regularidade do ciclo estral durante os oitos dias. As ratas que não apresentaram uma regularidade entre as fases estrais (proestro, estro, metaestro e diestro) foram excluídas do estudo.

Em seguida, as ratas selecionadas para o estudo foram submetidas à ovariectomia bilateral sob anestesia com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e cloridrato de quetamina (Ketamina, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.). Logo após foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, na qual foram incisionadas nos flancos cerca de 1,5 cm, os planos do tecido subcutâneo, seguido pelos planos do peritônio foram divulsionados com objetivo de acessar à cavidade abdominal das ratas. Em sequência, os ovários e os chifres foram localizados, então laqueados com um fio de Poligactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, EUA). Após isso, os ovários foram removidos, e os planos suturados com fio de Poligactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, EUA) (Figura 3).

Os animais permaneceram no biotério, onde foram alimentadas com o mesmo tipo de ração e com água ad libitum por todo o experimento. As ratas permaneceram em gaiolas com capacidade para quatro animais, e mantidas em temperatura ambiente estável entre ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), e o ciclo da luz foi controlado (12 horas claro e 12 horas escuro). Transcorridos 90 dias(20) da indução da osteoporose, os animais foram submetidos a cirurgia de osteotomia para a realização das fraturas em fêmur.

Figura 3 – Imagens demonstrativas da cirurgia de ovariectomia.



Fonte: Elaborada pela Autora, 2024

Legenda: (A) Exposição da musculatura abdominal a ser divulsionada para localização do ovário. (B) Ovário (seta preta) exposto previamente a laqueadura e remoção. (C) Sutura da camada muscular. (D) Sutura do plano externo.

3.4 Confecção de fraturas femorais

Anteriormente ao procedimento cirúrgico, as ratas foram mantidas em jejum por 12 horas, porém sem restrição hídrica. A sedação foi realizada com a 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 foi realizada uma anestesia local com mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) para hemostasia do campo operatório. Em seguida foi realizada a tricotomia em porção lateral de fêmur direito e esquerdo, e a anti-sepsia da região incisionada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), associado à PVPI tópico.

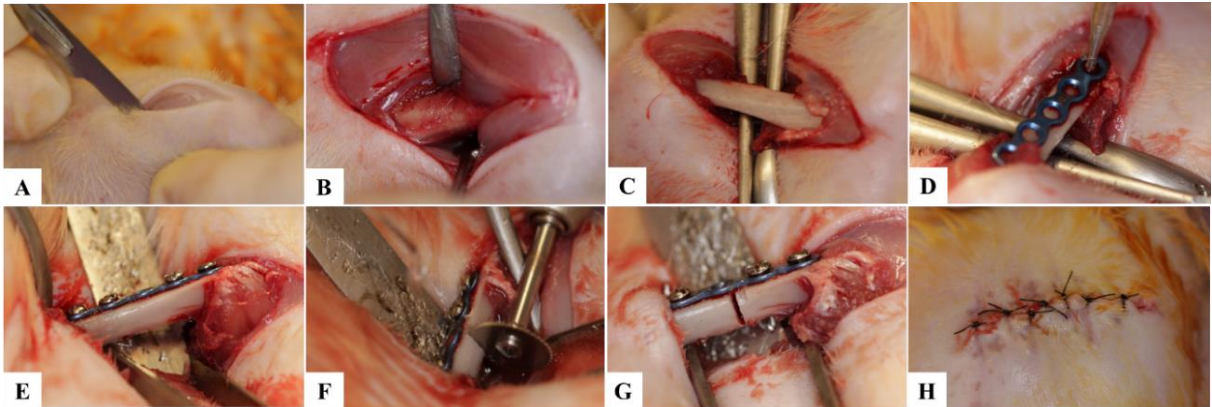
A porção lateral do fêmur foi incisionada com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) em cerca de 4 cm de comprimento, após isso o polo lateral do osso do Foi realizada uma simulação de fratura com um disco circular,

fazendo assim uma osteotomia da metáfise epifisiária, que ficou disposta à 5 mm da cartilagem articular epifisiária. Uma placa do sistema 1.5 mm com 4 furos e sem intermediário, foi fixada bilateralmente, utilizou-se uma placa convencional disponível no mercado, sendo as superfícies dessa placa usinadas (CONV), a outra placa possuía as suas superfícies texturizadas com a incorporação de biovidro via oxidação por plasma eletrolítico (PEO-BG).

O lado de fixação de cada placa foi selecionado a partir de uma randomização por sorteio. Este sorteio foi realizado no momento da fixação por um pesquisador que não participou da cirurgia, havia um envelope com as palavras "CONV" e "PEO-BG", de onde ele realizou o sorteio dos papéis. fêmur ficou exposto bilateralmente, entre o músculo bíceps e o lateral do fêmur. A placa possui dois furos em sua porção proximal, por onde usamos dois parafusos do mesmo sistema com cerca de 6 mm para fixá-las, isso foi previamente estabelecido pelo profundímetro obtido após a perfuração bicortical com os parafusos do sistema utilizado (1,5 mm). Para a estabilização da fratura foram colocados mais dois parafusos (comprimento de 5 a 6 mm, de acordo com o profundímetro) na porção distal da placa.

Durante todo o trans-operatório as regiões foram irrigadas abundantemente com solução fisiológica (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), para que assim evitássemos o aquecimento do tecido ósseo e que assim houvesse uma influência negativa no processo de reparo ósseo. A síntese foi realizada em duas partes, primeiro suturou-se o plano mais profundo com pontos contínuos com o fio (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil), em seguida com um fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) suturou-se o plano mais externo com pontos interrompidos (Figura 4). No pós-operatório os animais foram mantidos no biotério, onde ficaram sob os cuidados do grupo de pesquisa.

Figura 4 – Etapas para confecção de fraturas femorais, osteossíntese com instalação de miniplacas.



Fonte: Elaborada pela Autora, 2024

Legenda: (A) Realização de incisão na porção lateral do fêmur. (B) Localização da divisão anatômica entre os músculos lateral e bíceps do fêmur, servindo como referência para divulsão tecidual. (C) Fêmur exposto após divulsão. (D) Perfuração para instalação de parafusos. (E) Placa fixada com 4 parafusos bicorticais. (F) Simulação da fratura com disco circular. (G) Aspecto final da fratura. (H) Sutura – realizada por planos

3.5 Suspensão pela cauda

Com o objetivo de evitar uma fadiga das miniplacas ou uma má consolidação dessas fraturas, as patas traseiras das ratas foram imobilizadas, sendo assim após a cirurgia, com os animais ainda sob sedação, realizou-se a suspensão pela cauda desses animais, técnica esta que foi proposta por Silva et al.(21) Essa suspensão foi realizada com uma fita elástica adesiva (Kinesio Tape).

Ao longo de todo o período, entre a cirurgia e eutanásia, houve um acompanhamento diário dos animais, onde verificou-se a integridade da suspensão, a disponibilidade de ração e de água, a saúde e as feridas cirúrgicas dos animais. Outro cuidado, foi realizar antissepsia das feridas cirúrgicas todos os dias e a cada sete dias antissepsia da genitália do animal com o objetivo de evitar uma possível infecção de urinária, que poderia vir a ocorrer pela dificuldade que estes animais possuíam em fazer sua auto-higiene, em decorrência de sua limitação de movimentação pela suspensão.

3.6 Métodos de Análise

Decorridos 42 dias, foi realizada a eutanásia de todos os animais por meio de perfusão transcardíaca com solução salina fisiológica com acréscimo de 4% de heparina, após isso a perfusão seguiu com solução fixadora, contendo 4% de formaldeído (Sigma Chemical®, Saint Louis, MO, EUA) em tampão fosfato salino (PBS - Sigma Chemical®), 0,1M, 4°C, pH 7,4. Os fêmures foram coletados e encaminhados para Microtomografia computadorizada (Micro-CT) e para descalcificação para confecção de lâminas de tecido descalcificado para análise histológica e histométrica.

3.6.1. Microtomografia computadorizada (MICRO-CT)

Para esta análise tridimensional, as amostras foram reduzidas e conservadas em álcool 70%, e posteriormente passaram por análise por varredura de feixe de raios-X no sistema de microtomografia digital computadorizada. O escaneamento foi realizado através do microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), onde utilizou-se cortes com espessura de 5 µm (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. A projeção dos raios – X nas amostras gerou imagens que foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse através do pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

As imagens foram reconstruídas no software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), para que houvesse uma padronização do posicionamento para todas as amostras e determinação do Volume Ósseo de Interesse (VOI). Posteriormente, as imagens foram submetidas ao programa CtVox para obtenção das imagens tridimensionais dos fêmures de ambos os grupos para análise visual qualitativa.

3.6.2. Análise histológica e histométrica

As amostras destinadas a análise histológica e histométrica foram lavadas, após 24 horas embebidas em formol, e posteriormente foram encaminhados ao processamento laboratorial para os tecidos descalcificados. O processamento teve

início com a descalcificação em EDTA (10%), com trocas semanais da solução, até que se observou ausência de resistência à passagem de uma agulha gengival extra curta, demonstrando que a peça estava descalcificada. Posteriormente, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, foi feita a diafanização com xilol e posterior inclusão em parafina, seguida da obtenção de lâminas com cortes de 5 µm de espessura.(22–26)

Antes da inclusão propriamente dita, as placas e parafusos foram cuidadosamente removidos dos fêmures. Após a microtomia, as lâminas foram submetidas à coloração com hematoxilina e eosina (HE) para análise. Esta análise focou nas diferenças entre os grupos experimentais, com ênfase nos parâmetros de quantidade e qualidade óssea, avaliando a maturidade e quantidade do tecido ósseo, bem como a presença de infiltrado inflamatório.

Avaliação quantitativa do tecido ósseo: As lâminas coradas em HE foram fotomicrografadas na região do defeito ósseo, inicialmente em uma objetiva de 2.0x, que garantiu uma visão ampla do defeito e permitiu a mensuração da *área total de tecido ósseo neoformado*, a partir do software Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA), por meio da ferramenta “Free hands”.

Avaliação qualitativa do tecido ósseo: Para observação da maturação e das características do tecido ósseo e tecidos adjacentes dos diferentes grupos, foram realizadas fotomicrografias em uma objetiva de 40x. Todas as imagens foram analisadas por um examinador cego e calibrado, e todos os parâmetros foram calculados de acordo com a Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado.(27)

3.7 Análise estatística

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos em função dos grupos experimentais (CONV e PEO-BG) os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, os testes estatísticos foram realizados através do programa SigmaPlot 12.0 (Exakt Graph and Data Analysis, San Jose, California, USA). Para todos os parâmetros foi utilizado o Teste T de Student.

4 Resultados

4.1 Caracterização topográfica

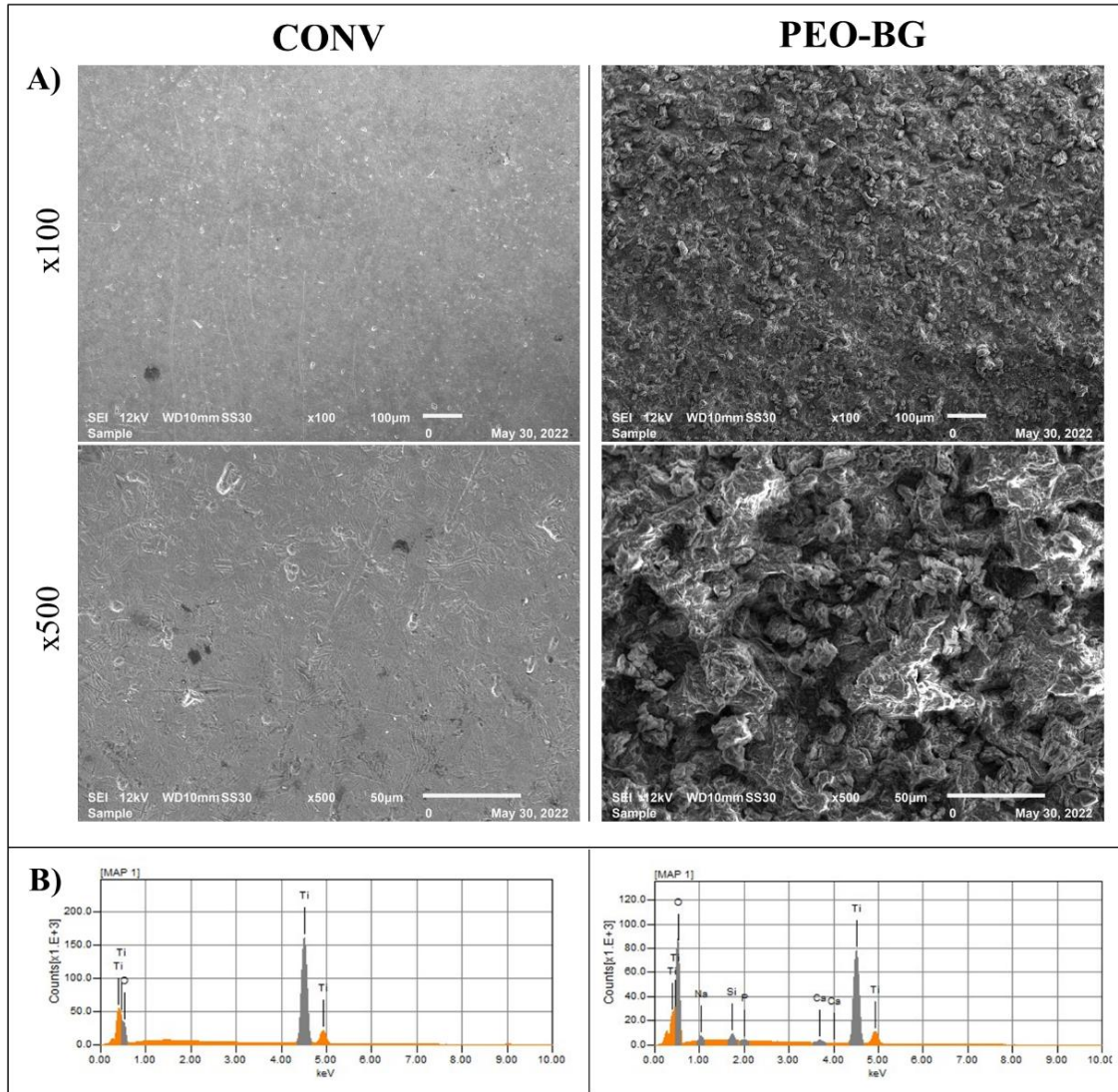
As superfícies utilizadas neste estudo: CONV (superfície de titânio comercialmente puro) e PEO-BG (superfície com revestimento de vidro bioativo por oxidação por plasma eletrolítico) foram submetidas a uma caracterização topográfica com a finalidade de demonstrar a fiel reprodutibilidade da texturização proposta, bem como apresentar e discutir as características que podem diretamente se correlacionar com o comportamento reparacional na investigação animal.

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As imagens obtidas através de MEV, em magnitude de 100x e 500x, demonstraram para CONV uma superfície lisa, sem irregularidades significativas. Enquanto isso, a superfície apresentada por PEO-BG apresentou inúmeras irregularidades com distribuição homogênea e semelhante a agregados (Figura 5-A).

A análise de EDS demonstrou a efetiva incorporação dos elementos do vidro bioativo na superfície PEO-BG, em especial o Si (Figura 5-B).

Figura 5: Imagens representativas dos resultados de MEV e EDS.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

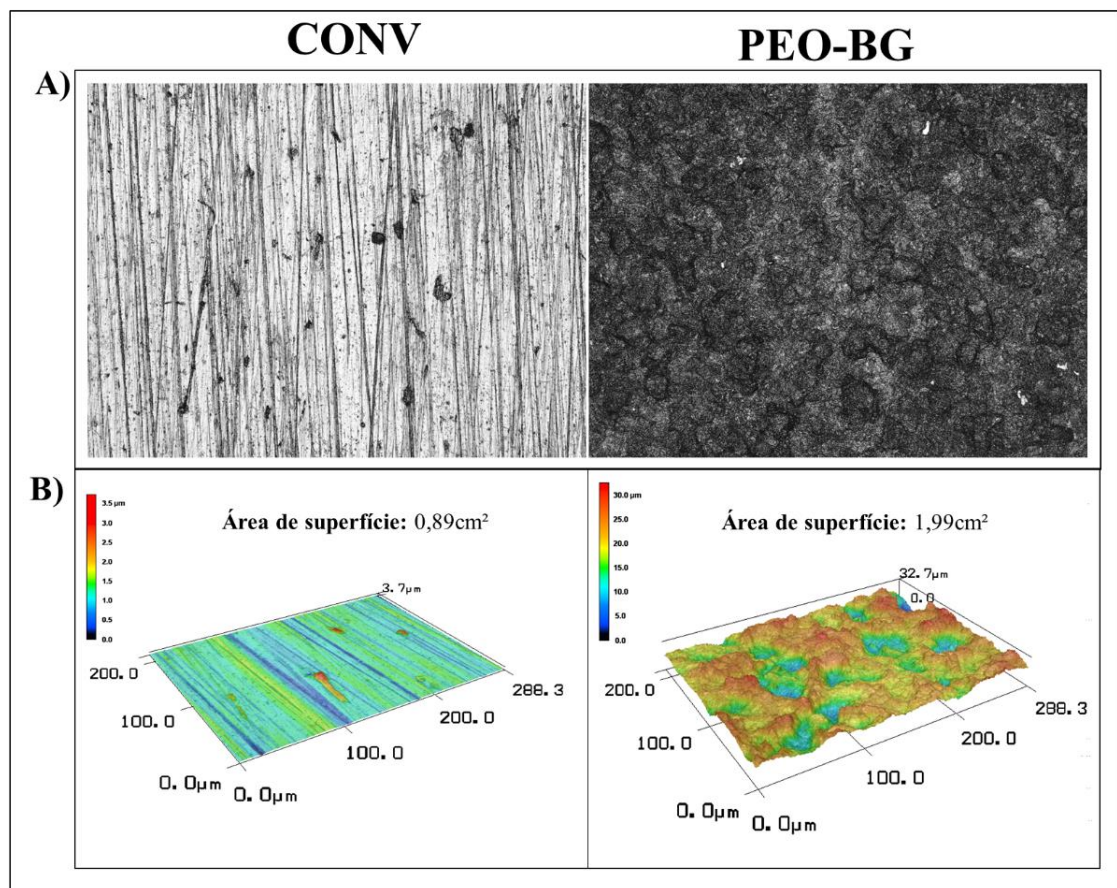
Legenda: (A) Imagens de MEV em magnitude de x100 e x500, evidenciando a criação de agregados de contorno irregular e distribuição homogênea para PEO-BG. (B) Gráficos representativos de EDS, evidenciando presença de Si para PEO-BG.

4.1.2 Microscopia Confocal de Varredura a Laser 3D (CLSM)

A CLSM permitiu uma visualização das amostras em imagens bidimensionais e tridimensionais. No aspecto bidimensional, em magnitude de 20x, foi observado para CONV um padrão de ranhuras lineares longitudinais distribuídas de forma homogênea. A superfície produzida por PEO-BG gerou uma superfície com rugosidades semelhantes a agregados de contorno irregular (Figura 6– A).

Já no aspecto tridimensional, em magnitude de 50x, foi observado para PEO-BG elevações com diferentes alturas, enquanto CONV apresentou superfície com tendência exponencial ao aplainamento. A análise quantitativa de Área de superfície obtida através de CLSM comprova que PEO-BG apresenta a maior área de superfície entre as amostras testadas ($<0,001$) (Figura 6- B).

Figura 6: Imagens representativas de CLSM.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Legenda: (A) Imagens bidimensionais em magnitude de 20x, evidenciando padrão de superfície rugosa para PEO.BG. (B) Imagens tridimensionais em magnitude de 50x e valores de área de superfície, sendo PEO-BG com área significativamente maior ($<0,001$).

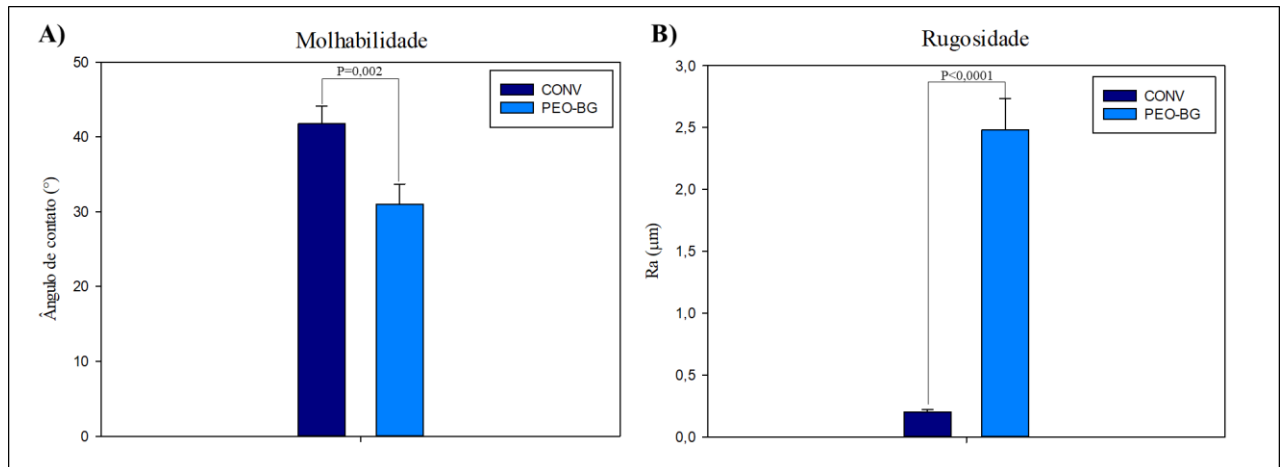
4.1.3 Molhabilidade

Com relação ao ângulo de contato com água, foi observado menor ângulo para o grupo PEO-BG ($31,02^\circ$) em comparação a CONV ($41,80^\circ$), com diferença significativamente estatística ($P=0,002$)(Figura 7-A).

4.1.4 Rugosidade de superfície

PEO-BG apresentou valores de rugosidade média (Ra)=2,48 μ m significativamente maior do que CONV (0,20 μ m)($<0,001$) (Figura 7 -B).

Figura 7: Gráficos representativos dos dados de molhabilidade e rugosidade.



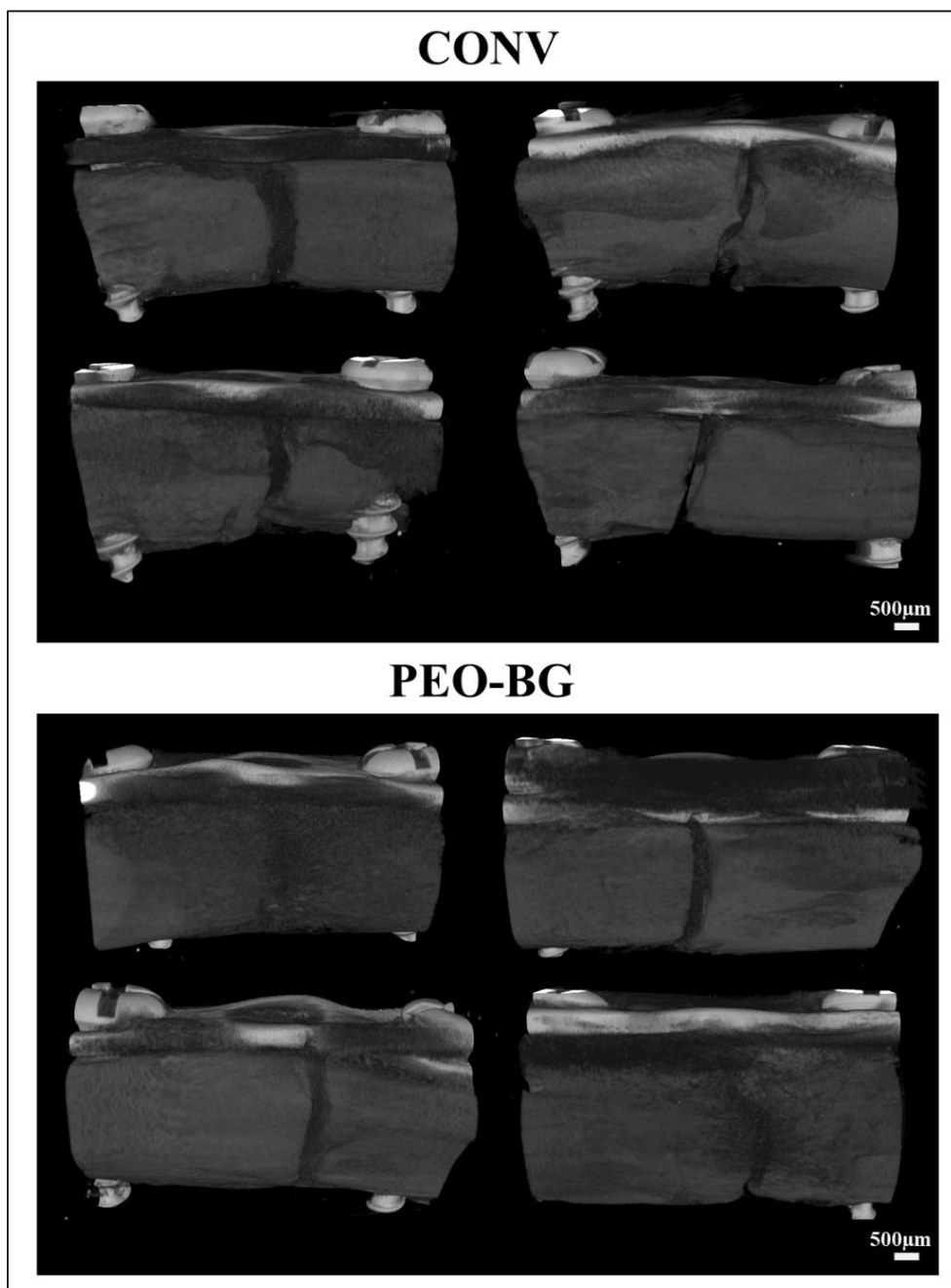
Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Legenda: (A) Valores de ângulo de contato com a água para CONV e PEO-BG, demonstrando maior molhabilidade para PEO-BG (P=0,002). (B) Valores de rugosidade média, com superioridade para PEO-BG (P<0,001).

4.2 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

A análise qualitativa das imagens tridimensionais obtidas através da microtomografia demonstraram mais áreas de hiperdensidade para o grupo PEO-BG em comparação ao grupo CONV. Isto é, enquanto para o grupo PEO-BG houve maior tendência ao fechamento do “gap” reparacional, traduzido como maior formação óssea, CONV apresentou regiões de maior hipodensidade, relativas à ausência de tecido ósseo em alguns pontos do “gap” (Figura 8).

Figura 8: Imagens representativas da análise qualitativa tridimensional através da microtomografia computadorizada.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

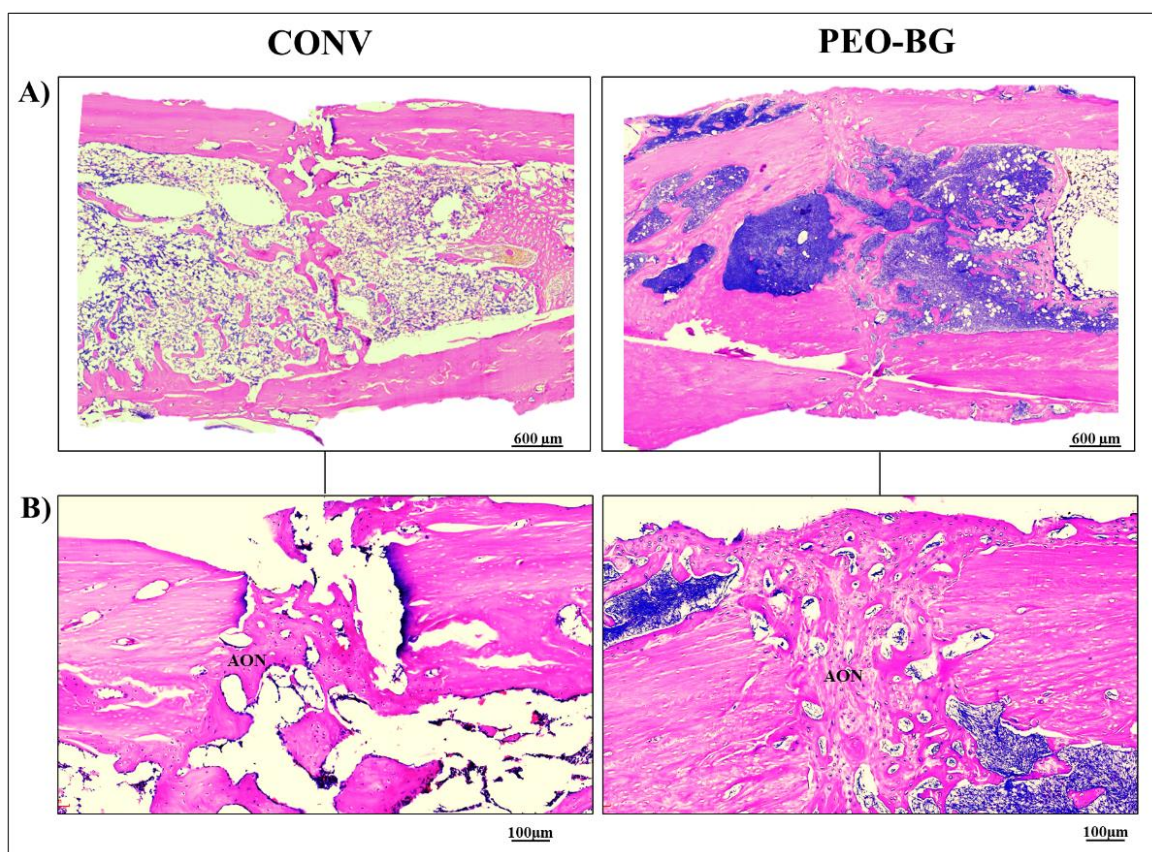
Legenda: Observa-se mais áreas de hipodensidade para CONV e mais áreas de hiperdensidade para PEO-BG no “gap” reparacional.

4.3 Análise histológica e histométrica

Através das lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina foi possível observar o padrão reparacional para ambos os grupos experimentais. PEO-BG demonstrou uma maior neoformação óssea, caminhando para o total fechamento da região de “gap”, enquanto CONV, apesar de também permitir a

formação de tecido ósseo, mostrou reparo inferior ao PEO-BG (Figura 9: A e B). A análise histométrica demonstrou uma área de neoformação óssea significativamente maior para PEO-BG ($P=0,001$) (Figura 10).

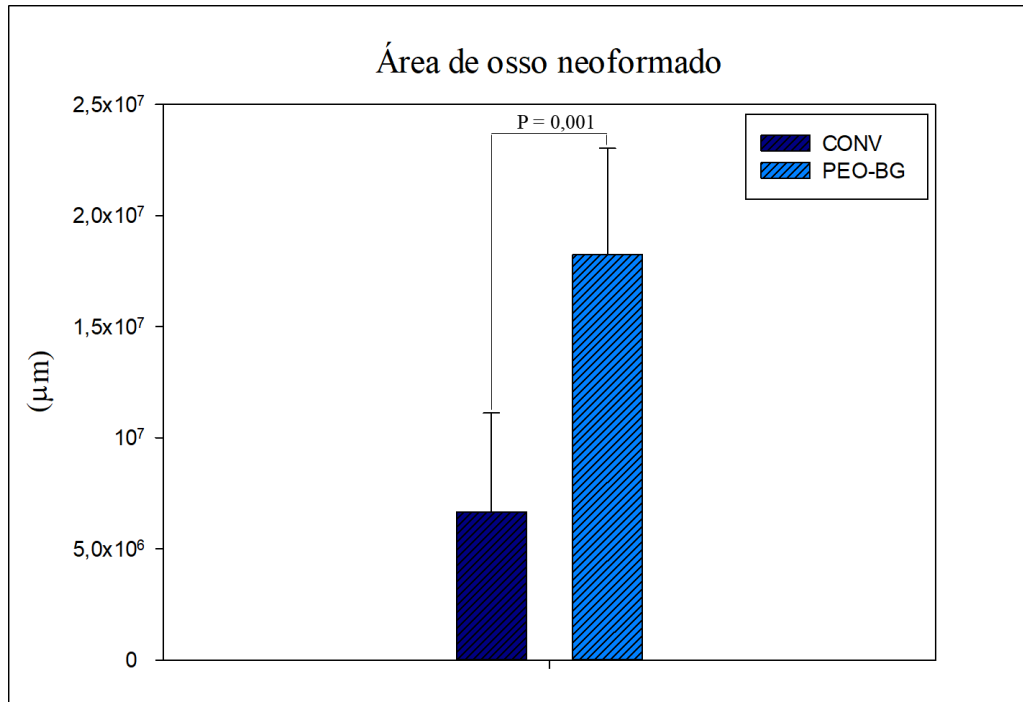
Figura 9: Imagens representativas da área de osso neoformado na região de “gap” formado pela confecção de fratura em fêmur.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Legenda: (A) Imagens em magnitude de 2x demonstrando maior tentativa de cicatrização completa do “gap” para PEO-BG. (B) Região de maior contato com as respectivas placas, em magnitude de 10x, onde se observa maior maturação e formação óssea para PEO-BG.

Figura 10: Representação gráfica dos resultados da análise histométrica relativa à área de osso neoformado.



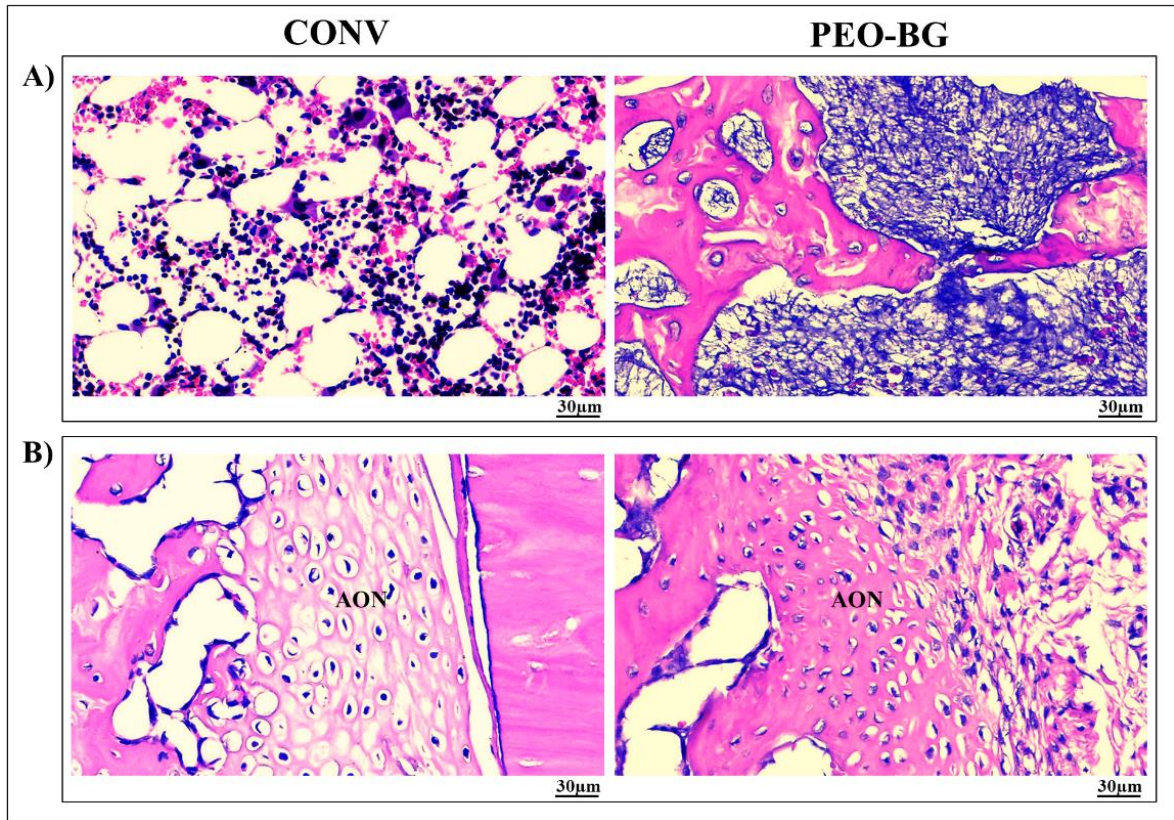
Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Legenda: Observa-se neoformação óssea significativamente maior para PEO-BG (P=0,001).

Com relação aos aspectos qualitativos do reparo ósseo, foi observado para CONV um tecido ósseo com maior espaçamento entre as trabéculas, sendo este espaço permeado por tecido conjuntivo com presença de infiltrado inflamatório mais intenso (Figura 11-A). Além disso, algumas amostras foram marcadas pela presença de tecido ainda em processo de ossificação endocondral (Figura 11-B).

Por outro lado, PEO-BG apresentou mais proximidade entre suas trabéculas, menor quantidade de tecido mole entremeado e sem presença de grandes infiltrados inflamatórios, sendo marcado apenas pela presença de tecido gorduroso relacionado a medula óssea, nas áreas adjacentes ao “gap” (Figura 11-A). Ainda, para as amostras de PEO-BG, mesmo aquelas em que havia regiões de neoformação óssea em andamento, apresentou um reparo mais avançado, marcado por maior organização celular e maior maturação da matriz osteogênica, como observado na figura 11 - B.

Figura 11: Imagens representativas da análise qualitativa histológica em magnitude de 40x.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Legenda: (A) Regiões adjacentes ao osso neoformado, demonstrando presença de maior infiltrado inflamatório para CONV. (B) Representação do padrão de maturação óssea para ambos os grupos, com maior maturação para PEO-BG.

5 DISCUSSÃO

Este estudo *in vitro* e *in vivo*, que teve como principal objetivo avaliar os efeitos de um novo revestimento de vidro bioativo através da oxidação por plasma eletrolítico (PEO-BG), foi importante para demonstrar a capacidade osteoindutora da superfície em questão.

A oxidação por plasma eletrolítico (PEO) é uma técnica já bastante explorada na literatura, tendo diversas vantagens, dentre elas a possibilidade de incorporação de elementos químicos nas superfícies de titânio. Em 2015, Marques et al.(17,28) demonstraram que o revestimento produzido com PEO promove melhoras propriedades biológicas, mecânicas e ainda melhora em relação a corrosão dos materiais de titânio. A técnica de PEO foi investigada previamente como um método para incorporação de precursores da hidroxiapatita, ou seja, cálcio e fosfato, na superfície de implantes osseointegráveis e de miniplacas de fixação em modelos animais ovariectomizados.

Na ocasião, os autores observaram uma importante otimização do reparo ósseo, que levou animais com densidade mineral óssea reduzida a uma condição de cicatrização óssea semelhante a um animal em condições saudáveis(5,18). A otimização do reparo foi atrelada principalmente ao fato de se ter, através de PEO, uma superfície com maior área de contato, maior molhabilidade e maior compatibilidade biológica referente a presença da hidroxiapatita, o que gerou uma área favorável para interação de células osteogênicas e conseguinte melhora na formação óssea. Apesar dos bons resultados, não foram atribuídas propriedades de osteoindução a superfície gerada por PEO com precursores da hidroxiapatita.

A osteoindução é conceituada como a capacidade de se gerar atratividade e estímulo a diferenciação de células da linhagem osteogênica e representa uma propriedade de poucos materiais atualmente disponíveis, como os enxertos ósseos autógenos e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Nesse contexto, o vidro bioativo tem sido investigado para engenharia óssea como um potencial material osteoindutor. Acredita-se que a sílica, principal componente do vidro bioativo, apresenta uma singular capacidade de atratividade celular as células osteogênicas, bem como estímulo a diferenciação de células mensequimais indiferenciadas para osteoblastos. Sua exposição aos fluidos corporais leva a formação de uma

superfície permissível a nucleação e crescimento de cristais de hidroxiapatita, o que é altamente favorável para interação de osteoblastos.(29) Diante dessas características, o biovidro vem sendo amplamente investigado para aplicação como revestimento de cerâmicas, produção de scaffolds, aplicação em superfícies diversas, associações com outros materiais, dentre outras aplicações na engenharia tecidual.(30–32) Acredita-se ainda que sejam eficientes para melhorar a revascularização, adesão de osteoblastos, atividade enzimática e diferenciação de células tronco mesenquimais.(33)

Diante disto, Costa et al. (2020) desenvolveu um revestimento que associa a técnica de PEO com os elementos químicos precursores do biovidro. O revestimento se mostrou bastante promissor nos estudos realizados *in vitro*, onde foram observadas melhores propriedades mecânicas e tribológicas do Ti, maior resistência a corrosão, modulação positiva de biofilmes polimicrobianos, maior adsorção de proteínas plasmáticas, além de produzir uma topografia altamente hidrofílica e com ausência de efeitos citotóxicos em células humanas. Tais resultados levantaram a hipótese de que o PEO-BG seria uma superfície potencialmente osteoindutora. Nesse sentido, este representa compreensões acerca do comportamento fisiológico animal para a superfície PEO-BG.

Pensando na aplicabilidade de PEO-BG, a caracterização topográfica realizada inicialmente foi essencial para demonstrar a capacidade de reprodução do revestimento e a para comparação direta com a superfície de titânio comercialmente puro (CONV) utilizada no estudo, que representa a superfície comercialmente disponível e de amplo uso na indústria de placas de fixação. A análise dos elementos químicos disponíveis na superfície através do EDS demonstrou que houve a efetiva incorporação de Si a miniplaca, bem como dos demais componentes do vidro bioativo. A análise de MEV mostrou que PEO-BG difere grandemente da superfície comercial, visto que, enquanto PEO-BG apresentou inúmeros agregados de contorno não regular e distribuição homogênea, com padrão de rugosidade topográfico, CONV se apresentou como uma superfície lisa com apenas algumas ranhuras discretas distribuídas de forma não homogênea.

Os dados de microscopia confocal a laser corroboram com as imagens obtidas por MEV, uma vez que constatou a efetiva maior área de contato para PEO-BG, inclusive com diferença significativamente estatística. Além disso, PEO-BG

apresentou menores valores de ângulo de contato com a água, o que implica diretamente em sua maior capacidade de molhabilidade, bem como maiores valores de rugosidade média. A somatória de todos esses fatores na topografia das miniplacas, em especial a região que ficou em contato direto com o “gap” reparacional, gera um ambiente favorável para interação do sangue, proteínas, citocinas e células da linhagem osteogênica, favorecendo, por sua vez, o reparo ósseo.

A partir da análise histométrica de área de osso neoformado, o principal desfecho deste estudo, foi possível constatar a capacidade de atratividade celular produzida por PEO-BG, uma vez que, para este grupo, a formação óssea foi significativamente maior, sendo observado nas imagens quase a total consolidação óssea da região de osteotomia mesmo com apenas 42 dias pós-operatórios. Esses resultados estão de acordo com os estudos prévios relativos a oxidação por plasma eletrolítico com adição de cálcio e fosfato no reparo ósseo periimplantar e na consolidação óssea de fraturas femorais em animais osteoporóticos, onde foi capaz de acelerar e otimizar o reparo ósseo.(5,18,34)

PEO-BG foi marcado por um tecido ósseo mais organizado, menos celularizado, com menor número e menor separação entre as trabéculas. Por outro lado, apesar de também ter permitido uma reparação óssea, CONV apresentou um padrão reparacional mais atrasado, com maior espaçamento entre as trabéculas ósseas, maior número de células, maiores regiões com formação óssea ainda em andamento e presença de maior quantidade de tecido conjuntivo entremeado ao osso neoformado. No que diz respeito a inflamação tecidual, não foram visualizados grandes infiltrados inflamatórios para PEO-BG. Em alguns casos, o tecido ósseo foi visto com um tecido gorduroso em regiões adjacentes, o que é esperado por se tratar de um osso longo que possui a medula óssea em plena atividade. CONV, no entanto apresentou áreas ao redor do osso neoformado com infiltrados inflamatórios mais intensos.

A análise tridimensional através da microtomografia corroborou expressivamente com a avaliação histométrica, visto que para o grupo PEO-BG foram observadas mais regiões de hiperdensidade do que para CONV. Houve uma maior tendência de tentativa de fechamento do “gap” através do preenchimento por tecido ósseo para PEO-BG.

Levando em conta a otimização do reparo ósseo produzida por PEO-BG em comparação com uma superfície de Ti comercialmente puro (CONV), pode-se prever que a aplicação deste simples diferencial as miniplacas de titânio podem garantir importantes avanços na área odontológica e médica, principalmente ao se pensar em condições limitantes ao reparo, como a osteoporose, diabetes, e demais condições sistêmicas que afetam diretamente o metabolismo ósseo. É importante pensar que, nessas condições limitantes, uma falha na fixação da fratura pode gerar a necessidade de reintervenções cirúrgicas, o que aumenta a morbidade associada ao tratamento, assim como os custos relacionados.(35–37)

Apesar dos bons resultados, este estudo é limitado por não responder as questões moleculares por trás da cronologia do reparo ósseo diante do uso do revestimento de PEO-BG. Além disso, investigações futuras poderiam contar com avaliações em tempos mais precoces do reparo pós-cirúrgico, para avaliação especialmente do potencial inflamatório associado ao tratamento.

Mesmo com limitações, este trabalho apresentou uma contribuição significativa no que tange a biologia da consolidação de fraturas ósseas, sendo eficaz para demonstrar que existe uma capacidade osteoindutiva por trás do revestimento PEO-BG. A facilidade de acesso, baixo custo a longo prazo e as melhorias biológicas estimulam mais investigações e futuras aplicações clínicas deste revestimento.

6 CONCLUSÃO

Através dessa investigação em modelo experimental pré-clínico de ratas ovariectomizadas, foi possível constatar que o revestimento de PEO-BG apresenta capacidade osteoindutiva, gerando maior aceleração do reparo ósseo, conduzindo para o fechamento do “gap” entre os cotos osteotomizados.

REFERÊNCIAS

1. Lerner UH. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *J Dent Res.* 2006 Jul 20;85(7):584–95.
2. Lerner UH. Inflammation-induced Bone Remodeling in Periodontal Disease and the Influence of Post-menopausal Osteoporosis. *J Dent Res.* 2006 Jul 20;85(7):596–607.
3. Buttgereit F, Palmowski A, Bond M, Adami G, Dejaco C. Osteoporosis and fracture risk are multifactorial in patients with inflammatory rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2024 Jun 3;
4. Briot K, Geusens P, Em Bultink I, Lems WF, Roux C. Inflammatory diseases and bone fragility. *Osteoporosis International.* 2017 Dec 15;28(12):3301–14.
5. Momesso GAC, Polo TOB, da Silva WPP, Barbosa S, Freitas GP, Lopes HB, et al. Miniplates coated by plasma electrolytic oxidation improve bone healing of simulated femoral fractures on low bone mineral density rats. *Materials Science and Engineering: C.* 2021 Jan;120:111775.
6. von Rüden C, Augat P. Failure of fracture fixation in osteoporotic bone. *Injury.* 2016 Jun;47:S3–10.
7. Yi Y, He X, Wu Y, Wang D. Global, regional, and national burden of incidence, prevalence, and years lived with disability for facial fractures from 1990 to 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2019. *BMC Oral Health.* 2024 Apr 10;24(1):435.
8. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 1995 Oct;17(4):S125–33.
9. Chukwulebe S, Hogrefe C. The Diagnosis and Management of Facial Bone Fractures. *Emerg Med Clin North Am.* 2019 Feb;37(1):137–51.
10. Allareddy V, Allareddy V, Nalliah RP. Epidemiology of Facial Fracture Injuries. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2011 Oct;69(10):2613–8.
11. Ayoub A, Al-Fotawei R. Biomaterials in the Reconstruction of the Oral and Maxillofacial Region. In 2015. p. 101–14.

12. Snauwaert K, Duyck J, van Steenberghe D, Quirynen M, Naert I. Time dependent failure rate and marginal bone loss of implant supported prostheses: a 15-year follow-up study. *Clin Oral Investig*. 2000 Mar 13;4(1):0013–20.
13. Hupp JR; IEE; TMR. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*. 7th ed. Rio de Janeiro: GEN | Grupo Editorial Nacional S.A.; 2021. 696.
14. Chouinard AF, Troulis MJ, Lahey ET. The Acute Management of Facial Fractures. *Curr Trauma Rep*. 2016 Jun 15;2(2):55–65.
15. Momesso GAC, Polo TOB, da Silva WPP, Barbosa S, Freitas GP, Lopes HB, et al. Miniplates coated by plasma electrolytic oxidation improve bone healing of simulated femoral fractures on low bone mineral density rats. *Materials Science and Engineering: C*. 2021 Jan;120:111775.
16. Momesso GAC, Polo TOB, da Silva WPP, Barbosa S, Freitas GP, Lopes HB, et al. Miniplates coated by plasma electrolytic oxidation improve bone healing of simulated femoral fractures on low bone mineral density rats. *Materials Science and Engineering: C*. 2021 Jan;120:111775.
17. Marques I da SV, Barão VAR, Cruz NC da, Yuan JCC, Mesquita MF, Ricomini-Filho AP, et al. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. *Corros Sci*. 2015 Nov;100:133–46.
18. Polo TOB, Momesso GAC, Silva WPP, Santos AM de S, Fonseca-Santos JM, da Cruz NC, et al. Is an anodizing coating associated to the photobiomodulation able to optimize bone healing in ovariectomized animal model? *J Photochem Photobiol B*. 2021 Apr;217:112167.
19. Costa RC, Souza JGS, Cordeiro JM, Bertolini M, de Avila ED, Landers R, et al. Synthesis of bioactive glass-based coating by plasma electrolytic oxidation: Untangling a new deposition pathway toward titanium implant surfaces. *J Colloid Interface Sci*. 2020 Nov;579:680–98.
20. Glösel B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010;25(3):516–24.

21. Silva AV da, Volpon JB. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. *Acta Ortop Bras.* 2004 Mar;12(1):22–31.
22. HASSUMI JS, MULINARI-SANTOS G, FABRIS AL da S, JACOB RGM, GONÇALVES A, ROSSI AC, et al. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *Journal of Applied Oral Science.* 2018 Jun 18;26(0).
23. Fabris AL da S, Mulinari-Santos G, Hassumi JS, Freire AR, Faverani LP, Gruber R, et al. Morphometric and histologic characterization of alveolar bone from hypertensive patients. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017 Dec 16;19(6):1106–13.
24. Bonardi JP, Pereira R dos S, Boos Lima FBDJ, Faverani LP, Griza GL, Okamoto R, et al. Prospective and Randomized Evaluation of ChronOS and Bio-Oss in Human Maxillary Sinuses: Histomorphometric and Immunohistochemical Assignment for Runx 2, Vascular Endothelial Growth Factor, and Osteocalcin. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2018 Feb;76(2):325–35.
25. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GAC, Luvizuto ER, de Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig.* 2017 Jun 27;21(5):1485–94.
26. Farnezi Bassi AP, Bizelli VF, Brasil LF de M, Pereira JC, Al-Sharani HM, Momesso GAC, et al. Is the Bacterial Cellulose Membrane Feasible for Osteopromotive Property? *Membranes (Basel).* 2020 Sep 12;10(9):230.
27. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2010 Jul 1;25(7):1468–86.
28. Marques I da SV, da Cruz NC, Landers R, Yuan JCC, 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 Dec 1;10(4).
29. Liu J, Mohd Rafiq NB, Wong LM, Wang S. Surface Treatment and Bioinspired Coating for 3D-Printed Implants. *Front Chem*. 2021 Nov 18;9.
 30. Gouveia PF, Mesquita-Guimarães J, Galárraga-Vinueza ME, Souza JCM, Silva FS, Fredel MC, et al. In-vitro mechanical and biological evaluation of novel zirconia reinforced bioglass scaffolds for bone repair. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2021 Feb;114:104164.
 31. Rohr N, Nebe JB, Schmidli F, Müller P, Weber M, Fischer H, et al. Influence of bioactive glass-coating of zirconia implant surfaces on human osteoblast behavior in vitro. *Dental Materials*. 2019 Jun;35(6):862–70.
 32. Pantulap U, Arango-Ospina M, Boccaccini AR. Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties. *J Mater Sci Mater Med*. 2022 Jan 23;33(1):3.
 33. Al-Harbi N, Mohammed H, Al-Hadeethi Y, Bakry AS, Umar A, Hussein MA, et al. Silica-Based Bioactive Glasses and Their Applications in Hard Tissue Regeneration: A Review. *Pharmaceuticals*. 2021 Jan 20;14(2):75.
 34. Polo TOB, Silva WPP, Momesso GAC, Lima-Neto TJ, Barbosa S, Cordeiro JM, et al. Author Correction: Plasma Electrolytic Oxidation as a Feasible Surface Treatment for Biomedical Applications: an in vivo study. *Sci Rep*. 2020 Oct 28;10(1):18821.
 35. Murray, Coleman. Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 30;20(19):4873.
 36. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*. 2015 Oct 9;13(5):327–35.
 37. Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Diabetes and Oral Implant Failure. *J Dent Res*. 2014 Sep 13;93(9):859–67.

APÊNDICES

APÊNDICE 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 **“Avaliação do efeito osteoindutor do revestimento de vidro bioativo através da oxidação por plasma eletrolítico em superfície de miniplacas: estudo em ratas ovariectomizadas”**, Processo FOA nº 622-2023, 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 22 de Agosto de 2023.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 23 de Março de 2025.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 23 de Abril de 2025.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **“Evaluation of the osteoinductive effect of the bioactive glass coating through electrolytic plasma oxidation on the surface of miniplates: study in ovariectomized rats”**, Protocol FOA nº 622-2023, 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 August 20, 2023.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 23, 2025.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 23, 2025.

Prof. Assoc. Marcos Franke Pinto
Vice-Coordenador da CEUA
CEUA Vice-Coordinator