



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba

LETYCIA CARPANEJI PALUDETTO

**Efeito do "Scaffold" de PDO comparado com malha de
titânio associados a rhBMP-2 em grandes reconstruções
pós- ressecções**

Araçatuba - SP

2024

LETYCIA CARPANEJI PALUDETTO

Efeito do “Scaffold” de PDO comparado com malha de titânio associados a rhBMP-2 em grandes reconstruções pós- ressecções

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 Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Associado. Leonardo Perez Faverani

Araçatuba - SP

2024

*DEDICO AOS MEUS PAIS MARIO APARECIDO PALUDETTO,
LUZIA APARECIDA CARPANEJI, E A MINNHA IRMÃ LUANA CARPANEJI
PALUDETTO, POR ME DAR FORÇAS SEMPRE, ÂNIMO E CORAGEM PARA
SEGUIR EM FRENTE. OBRIGADA POR TODO CARINHO, AMOR E
DEDICAÇÃO, SEM O SUPORTE DE VOCÊS NADA SERIA POSSÍVEL.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Glauco Issamu Miyaharae** do vice-diretor **Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, pelo ensino de excelência, pelos professores extraordinários, pelos funcionários prestativos e queridos, e por ter sido minha casa durante 6 anos da minha vida. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa instituição.

A **Deus**, por sempre me amparar e guiar meus passos, me ajudando a enfrentar todas as dificuldades, “Toda honra e gloria a ti meu Pai”.

À **Nossa senhora Aparecida**, por nunca ter me deixado sozinha principalmente nos momentos de tribulação. Agradeço-te minha mãe do céu.

Ao meu **Anjo da Guarda**, por estar comigo todos os dias, me dando conselhos, discernimento, e por cuidar de mim sempre.

Ao meu orientador, **Professor Leonardo Perez Faverani**, que me proporcionou a oportunidade de entrar em seu grupo de pesquisa, sempre me incentivando e transmitindo todo seu conhecimento. Me faltam palavras para expressar o tamanho da minha admiração por você professor, sua alegria e amor com a profissão, sua humanidade com as pessoas, sua bondade e paciência conosco, é o que traz ânimo e gera em mim a vontade para continuar. Foi o senhor quem plantou o amor pela cirurgia em meu coração como também pela pesquisa. Sou imensamente grata por ter sido sua orientada por todos esses anos, te agradeço com todo o coração

À **Doutoranda Barbara Rios**, que me ajudou a entrar no grupo de pesquisa, me auxiliando e me proporcionando aprendizado, sempre aberta para ensinar e tirar minhas dúvidas durante todo esse percurso, sendo minha amiga e orientadora da minha primeira iniciação científica. Quero que você sabia que sempre te admirei como profissional e como mulher, sua garra e determinação me inspira, e aumenta meu desejo de ficar nessa área da cirurgia que tanto amo. Foi com você que entrei e auxiliei a primeira vez em uma cirurgia, e me lembro da sensação e da alegria que senti, e como tive a certeza do que estava escolhendo. Agradeço-te de todo o coração.

Ao professor **Aldiéris Alves Pesqueira**, gostaria de agradecer por todo ensinamento e dedicação que o senhor teve comigo durante todo o ano de prótese fixa, que foi um dos maiores desafios para mim, gostaria de agradecer pelo seu incentivo e apoio, por mais difícil que era a realização do preparo o senhor me dizia que iria dar certo. Seu carinho e amor conosco foi o que me incentivou a nunca desistir da prótese. Lhe agradeço com todo o meu coração cada conselho e ensinamento. Admiro muito o senhor, professor.

Aos meus pais, **Luzia Aparecida Carpaneji**, e **Mario aparecido Paludetto**, por nunca terem medido esforços para me proporcionar a educação, e realizar o meu sonho, por abrirem mão de tantas coisas para eu conseguir chegar até aqui, por sempre estar comigo em todos os momentos, em cada conquista e, em cada dificuldade, nunca permitindo que eu desistisse dos meus ideais. O amor de vocês foi o que me sustentou e me deu forças para continuar firme durante todo o percurso, sendo o meu porto seguro, onde eu sempre pude me espelhar para chegar até aqui, dedico a vocês todas as minhas conquistas e se eu cheguei até o final dessa graduação foi por vocês. Tudo o que conquistei devo a vocês, que são meus maiores exemplos de vida, tenho um orgulho imenso de você Mãe e de você Pai, sou muito grata a Deus por ter me presenteado você. Minha Família é meu pedaço do céu aqui na terra. Meu eterno amor e gratidão.

À minha irmã, **Luana Carpaneji Paludetto**, a qual me proporciona uma alegria imensa desde o primeiro dia que a vi, me passando sempre segurança e me mostrando o lado bom da vida, sendo presente em todos os momentos, me apoiando em todas as decisões. Nosso amor e cumplicidade é o que torna a minha jornada mais leve, você é um pedacinho de mim, minha alegria em forma de pessoa, você deixa tudo mais doce e tranquilo, obrigada por me ajudar durante todo esse caminho acadêmico. Amo você, minha irmã.

À minha querida avó, **Lurdes Pinheiro Carpaneji**, que não está mais presente fisicamente em minha vida, mas está sempre em meu coração, e pôde viver comigo os primeiros anos de faculdade, sempre perseverando e rezando para mim, para que conseguisse vencer as dificuldades. Muito obrigada vó, meu eterno amor a ti.

À toda minha **família, meus tios e tias** que torceram por esta conquista, e me apoiaram nessa longa jornada, muito obrigada.

Ao meu namorado, **Henrique Russini Del Angelo** por sempre ter me encorajado a buscar o melhor de mim mesma, e a superar meus próprios limites, por ser meu companheiro em todas as minhas escolhas, por passar junto de mim os meus momentos de tribulação. O seu amor, comprometimento e companheirismo foram um grande apoio para minha dedicação aos meus projetos. Você deixa tudo leve, calmo e sereno, seu abraço me acalma, sua alegria me contagia. Obrigada por ser minha companhia e por me passar segurança em todos os momentos difíceis. Amo você, meu amor.

À minha amiga, **Beatriz Machado Alexandrelli** que esteve comigo desde o primeiro dia que cheguei em Araçatuba, e em todos os momentos, bons e ruins, que me ajudou a enfrentar os desafios e obstáculos todo esse período, e sempre me deu forças para seguir em frente, seu amor e sua amizade foi, e é, muito importante para mim. Lhe agradeço do fundo do meu coração por todo companheirismo. Agradeço também toda a sua família por todo carinho e amor comigo. Amo vocês.

Aos meus amigos **Arthur, Matheus, Gabriel, Isabela, Stefany, Rafaela**, que compartilharam comigo a jornada acadêmica e me ajudaram a enriquecer meu conhecimento, e enfrentar os momentos de dificuldades, compartilhando a vida como ela é, dividindo as alegrias e tristezas. Vocês deixaram o caminho ser mais leve. Amo vocês!

Aos meus **amigos do grupo de pesquisa** por dividirem seus conhecimentos e estarem comigo nessa caminhada científica.

Aos **Pós-graduandos** do grupo de pesquisa que sempre estavam abertos para me ajudar e incentivar nessa jornada.

À **Stefany Barbosa**, que é minha orientadora, amiga, e esteve comigo, me ajudou de todas as formas possíveis, dentro e fora da cirurgia, foi a primeira a me ensinar a suturar e me incentivar dentro da cirurgia, agradeço por ter compartilhado todo seu conhecimento comigo.

A todas as **amizades** que Deus me presenteou. Foram 5/6 anos de muito aprendizado e momentos intensos. Muito obrigada por dividirem comigo todos esses momentos que ficará para sempre em meu coração.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

"Não considere nenhuma prática como imutável. Mude e esteja pronto a mudar novamente. Não aceite verdade eterna. Experimente."

- B. F. Skinner

Paludetto, LC. Efeito do “Scaffold” de PDO comparado com malha de titânio associados a rhBMP-2 em grandes reconstruções pós- ressecções. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2024.

RESUMO

O objetivo é analisar o potencial bioativo de um “scaffold” de Polidioxanona (PDO) associado a rhBMP-2, em reconstruções de ressecção em fêmures de ratos. 24 ratos, machos, adultos, com 6 meses, tiveram ambos fêmures fixados com placas e parafusos de titânio e confecção de um “gap” de 2mm. Para a reconstrução, rhBMP-2 (Infuse) carregada em esponja de colágeno (3,25 µg) foi usada e recoberta por malha de titânio - Grupo Titânio (n=12) e membrana de polidioxanona - Grupo PDO (n=12). Eutanásia (n=6) ocorreu aos 14 e 60 dias após a cirurgia. Os fêmures foram removidos, radiografados para densitometria (programa ODR-ATA). As peças foram processadas para avaliação histológica, área óssea neoformada, perfil inflamatório e imuno-histoquímica (Runx2, OPG, RANKL, OCN e BMP2). Os dados quantitativos foram submetidos ao teste ANOVA-2 fatores e quando $p < 0,05$, o pós-teste Tukey foi aplicado. A densitometria mostrou maior densidade para o PDO aos 14 dias ($p < 0,05$). Na análise histológica houve reparo favorável para PDO, com maior área de formação óssea, menor infiltrado inflamatório, menos vasos sanguíneos ($p < 0,05$). Na imuno-histoquímica, a BMP-2 não apresentou marcações em Titânio, enquanto foi marcado no grupo PDO, com diferença estatística aos 60 dias ($p < 0,05$). OPG e RANKL foram mais marcadas para titânio, principalmente aos 60 dias ($p < 0,05$). Já Runx2 e OCN tiveram resultados superiores para PDO aos 14 dias, mas, aos 60 dias titânio teve maior expressão. Os resultados demonstram melhor potencial bioativo com reparo mais favorável na associação de PDO com a rhBMP-2, quando comparado a malha de titânio em fêmures de ratos após ressecção parcial.

Palavras-chave: polidioxanona; proteína morfogenética óssea 2; osteogênese.

Paludetto, LC. Effect of PDO Scaffold Compared to Titanium Mesh Associated with rhBMP-2 in Large Reconstructions Post-Resections. São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, 2024.

ABSTRACT

The objective is to analyze the bioactive potential of a Polydioxanone (PDO) scaffold associated with rhBMP-2, in resection reconstructions in rat femurs. Then, 24 adult male rats, 6 months old, had both femurs fixed with titanium plates and screws (1.5mm system) and a 2mm “gap” created. For reconstruction, rhBMP-2 (Infuse) carried in a collagen sponge (3.25 µg) was used and covered by titanium mesh - Titanium group (n=12) and polydioxanone mesh - PDO group (n=12). Euthanasia (n=6) occurred at 14 and 60 days after surgery and their femurs were removed and x-rayed for densitometry (ODR-ATA program). The pieces were processed for histological evaluation, newly formed bone area, inflammatory profile and immunohistochemistry (Runx2, OPG, RANKL, OCN and BMP2). Quantitative data were subjected to the ANOVA-2-factor test and $p < 0.05$, the Tukey post-test. Densitometry showed greater density for PDO at 14 days ($p < 0.05$). In the histological analysis, there was a favorable repair for PDO, with a greater area of bone formation, less inflammatory infiltrate, and fewer blood vessels. For immunohistochemistry, BMP-2 showed no staining in Titanium and relevant values in PDO, with a statistical difference at 60 days ($p < 0.05$). OPG and RANKL were more marked for titanium, especially at 60 days ($p < 0.05$). Runx2 and OCN had better results for PDO at 14 days, but at 60 days titanium had greater expression. The results demonstrate favorable repair in the association of PDO with rhBMP-2, when compared to titanium mesh.

Keywords: polydioxanone; bone morphogenetic protein 2; osteogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho explicativo do número da amostra mediante a cirurgia bilateral.....	20
Figura 2 – Imagem representativa da fixação femoral com placa 1.5, parafusos bicorticais e confecção de gap de 2mm	22
Figura 3 – Etapas do procedimento cirúrgico de ressecção e reconstrução	24
Figura 4 – Imagem ilustrativa do modelo de suspensão dos animais pela cauda, realizado através de fita de knesio tape fixada com esparadrapo, presa a alça móvel ao teto da caixa	25
Figura 5 – Radiografia antes (A) e após anexar a imagem radiográfica da cunha de alumínio (B).....	28
Figura 6 – Imagem representativa da mensuração de tecido ósseo neoformado.....	30
Figura 7 – Imagem representativa da metodologia de contagem de células inflamatórias, com ênfase em linfócitos, e dos vasos sanguíneos	31
Figura 8 – Imagem representativa da metodologia utilizada para análise imuno-histoquímica	33
Figura 9 – Imagem ilustrativa de coleção purulenta evidenciando infecção em fêmur do grupo Titânio.....	35
Figura 10 - Representação gráfica dos resultados de densitometria radiográfica, em mmAl, evidenciando uma maior densidade óssea para o grupo PDO, com diferença significativamente estatística aos 14 dias de pós-operatório ($p < 0,001$)	36
Figura 11 - Imagens obtidas por meio do “Simulador tridimensional do objeto de estudo”, ferramenta do programa computacional ODR- ATA	36
Figura 12 - Representação gráfica dos resultados de área de tecido ósseo neoformado.....	36
Figura 13 - Imagens representativas da área de tecido ósseo neoformado, demonstrando maior área para os grupos PDO.....	39
Figura 14 – Imagem em aumento de 40x demonstrando maior maturação e organização tecidual para o grupo PDO, em ambos os períodos.....	40
Figura 15 – Representação gráfica do perfil inflamatório presente nos grupos experimentais	41
Figura 16 – Imagens representativa da contagem de células inflamatórias	42

Figura 17 - Número de vasos sanguíneos, demonstrando melhores resultados para o grupo PDO, especialmente no período de 14 dias sem diferença estatística	43
Figura 18 - Fotomicrografias representativas do número de vasos sanguíneos	43
Figura 19 – Imagens representativas das marcações pela imuno-histoquímica, demonstrando o padrão de marcação para os grupos experimentais, em 14 e 60 dias	44
Figura 20 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para BMP-2, em células e matriz extracelular	45
Figura 21 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para RUNX2, em células e matriz extracelular	46
Figura 22 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para OCN em células e matriz extracelular	47
Figura 23 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para RANK-L, em células ósseas	48
Figura 24 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para OPG em células ósseas.	48
Figura 25 – Figura representativa do músculo de absorção e metabolização dos grupos PDO e Malha	49
Figura 26 – Representação gráfica da média do número de células inflamatórias no tecido subcutâneo no tempo de 3, 5, 7 e 10 dias	50
Figura 27 – Representação gráfica da média do número de vasos sanguíneos no tecido subcutâneo no tempo de 3, 5, 7 e 10 dias	51
Figura 28 – Figura representativa dos espécimes de tecido subcutâneo demonstrando a biocompatibilidade dos materiais testados aos 3, 5, 7 e 10 dias	52

LISTA DE SIGLAS

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Desenho experimental	20
3.2 Procedimento cirúrgico: ressecção e reconstrução óssea	21
3.3 Imobilização do membro operado: Suspensão pela cauda	24
3.4 Eutanásia	26
3.5 Coleta do tecido muscular	26
4 ANÁLISES	26
4.1 Análise clínica	26
4.2 Análise com tecidos calcificados	27
4.2.1 Radiografia	27
4.2.2 Análise da densitometria radiográfica por meio do programa computacional ODR-ATA	27
4.3 Análises com tecidos descalcificados	28
4.3.1 Análise histológica	28
4.3.2 Análise imuno-histoquímica	31
4.3.3 Análise subcutânea	33
4.3.4 Contagem de células inflamatórias	34
4.4 Análise estatística	34
5 RESULTADOS	34
5.1 Avaliação clínica	34
5.2 Análise com tecidos calcificados	35
5.2.1 Análise da densitometria radiográfica por meio do programa computacional ODR-ATA	35
5.3 Análise com tecidos descalcificados	37
5.3.1 Análise histológica de tecido ósseo neoformado	37
5.3.2 Contagem de células inflamatórias	40
5.3.3 Análise imuno-histoquímica	44
5.4 Análise do tecido muscular	49
5.5 Análise subcutânea	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos podem acontecer por inúmeros motivos, podendo ser devido a anomalias congênitas, necrose por irradiação ou associação a medicamentos, doenças malignas orais, tumores, infecções, e causas traumáticas. Com isso, a reconstrução de grandes defeitos ósseos apresenta-se como uma grande dificuldade no meio médico e odontológico, devido ao enorme desconforto que gera ao paciente, além do desafio da execução. É essencial lembrar que as grandes reconstruções ósseas buscam em restabelecer a estética facial, proporcionar a regeneração óssea apropriada, para que esse osso seja de boa qualidade e possa receber implantes, devolvendo assim funcionalidade, estética e conforto, além de manter o tecido circundante e vascularizado^{1,2}.

O enxerto autógeno é considerado o padrão ouro para regenerações ósseas, no qual oferece células osteoprogenitoras que com estímulo osteoindutivo correto, possuem o potencial de mediar a reparação óssea alveolar. Além disso, o enxerto autógeno, é colhido do próprio paciente podendo ser em regiões intrabuciais (linha oblíqua extra, região de tuber da maxila, tórus) e extrabuciais (crista ilíaca, sínfise, calvaria, tíbia), entre outras regiões³. É essencial afirmar que a necessidade de intervir em um segundo sítio cirúrgico apresenta algumas desvantagens em realizar essa técnica, como: a limitação de disponibilidade da área doadora, o paciente ficará com dois sítios cirúrgicos, o processo é considerado mais doloroso, pode ocasionar quadros de hemorragias, risco de infecção, inadequada regeneração óssea, fratura óssea secundária, parestesia, defeito no contorno e no resultando além de outros problemas clínicos⁴. Ademais, um dos grandes problemas das reconstruções de maior magnitude que os enxertos autógenos na forma “livre”, sem pedículo vascular são limitantes nos defeitos lineares extensos. E, mesmo tendo bons resultados, na forma microvascularizada, mesmo com a grande morbidade, existe a necessidade de uma equipe de cirurgiões especializados, e são fatores para os autoenxertos^{5,6,7}.

Com o exposto acima, a engenharia tecidual busca formas e estratégias alternativas para o enxerto autógeno, no qual favoreçam a formação óssea, como por exemplo, a combinação de biomateriais (arcabouços biodegradáveis) com moléculas biológicas (fatores de crescimento)⁸.

Entende-se que uma estabilização de fratura óssea para ela ser bem realizada é importante que ocorra um equilíbrio entre a parte mecânica e biológica⁹. Tendo em vista que, o tecido ósseo sofre remodelação contínua para conferir a manutenção global do volume ósseo, forma e integridade estrutural. E para que isso ocorra, suas atividades metabólicas são ajustadas por inúmeros fatores locais e sistêmicos que comandam a atividade celular e dependem do fornecimento de oxigênio, nutrientes, hormônios, citocinas e células percussoras, as quais advêm da vascularização¹. Durante a reparação óssea normal, células osteoprogenitoras oriundas das células estaminais mesenquimais, se diferenciam em osteoblastos produzindo osteócitos -matriz óssea- e a mineralização dessa matriz ao longo do tempo resulta na formação de osso denominado lamelar¹⁰. Os defeitos ósseos de grande dimensão possuem poucas células osteoprogenitoras e com isso há a redução do estímulo à regeneração óssea, sendo, portanto, necessário a suplementação do material de preenchimento com células osteoprogenitoras. Dessa forma, são utilizados fatores de crescimento para promover a angiogênese e a osteogênese, além de suas propriedades específicas^{9,10}.

Nessa conjuntura, há um valioso fator de crescimento do grupo de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) que por meio da técnica de clonagem do DNA, tornou possível sintetizar BMPs recombinantes. E nesse cenário, a única aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) é a chamada proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 (rhBMP-2). Esta, disponível no mercado como o nome comercial de Infuse®, da empresa Medtronic (Minneapolis, MN, EUA)^{11,12,13,14}. Essas também estão presentes na fisiologia natural e desempenham atividades como angiogênese, apoptose celular, inflamação e osteogênese. É o fator osteogênico com melhor capacidade de formação de osso trabecular e remodelação óssea lamelar, visto que, realiza todas as propriedades desejadas de um fator de crescimento, trabalhando particularmente na linhagem de células responsáveis pela remodelação óssea. Soma-se a este fator, sua indicação para reparo de fratura fechada de tíbia, fusão vertebral, aumento do rebordo alveolar e elevação do seio maxilar¹⁵. Portanto, seu uso no tratamento de defeitos ósseos tem sido abundantemente explorado, levando em consideração que oferecem propriedades osteoindutoras parecidas às do enxerto autógeno, mas dispensando a necessidade de um segundo sítio cirúrgico para a coleta do enxerto, diminuindo, dessa forma, a morbidade presente nessa

modalidade cirúrgica, reduzindo em estadia hospital e com isso obtendo uma redução no custo do tratamento^{4,5}.

Todavia, a rhBMP-2 tem meia-vida curta e liberação rápida quando aplicada diretamente na área do defeito ósseo, isso acontece porque ela atua estimulando o circuito de retroalimentação atuando dentro de 24 a 48 horas e, posteriormente, será eliminado do organismo, de uma maneira que sua resposta induza a produção de mais fatores de crescimento endógenos¹⁵ e acarrete a formação e cicatrização do tecido ósseo.

Com isso, é realizado o carregamento da rhBMP-2 em uma esponja de colágeno absorvível que mostram uma forma estrutural semelhante a um favo de mel. Essa estrutura é responsável por proporcionar uma melhor absorção do fator de crescimento e penetração das células osteoprogenitoras em sua superfície¹⁶ e deve ser quebrada em partes menores para que seja combinada com o material do enxerto e, dessa maneira, tenha melhor desempenho^{5,17}. Além de ser considerada como o transportador ouro para moléculas de BMP, já que prolonga sua meia-vida^{10,11,12,13,14,15,16,17,18}, apresenta taxas previsíveis de reabsorção e liberação de proteína, é versátil, também, biocompatível e tem baixa imunogenicidade.

Sua grande desvantagem é não ter propriedades ideais para manutenção mecânica e do espaço, podendo, desse modo, se deformar com facilidade quando submetida a pressão, pois não apresenta rigidez adequada, fator que pode ser prejudicial em cirurgias craniomaxilofaciais já que não apresenta capacidade de manter o volume, estabilizar o coágulo sanguíneo e bloquear a infiltração de tecidos moles¹⁹, visto que a pressão das bordas da ferida tendem a entrar em colapso na zona de regeneração²⁰.

Já a malha de titânio, mostrou-se ideal para suprir tal dificuldade, trabalhando como um guia para a formação do tecido ósseo. Afinal, sua rigidez garante que não ocorra colapso do espaço e evita invasão e compressão pelos tecidos moles na região do enxerto. Além de ser inerte e apresentar propriedades aloplásticas, possui alta biocompatibilidade e uma superfície lisa que impede a adesão de bactérias²¹.

Estudos clínicos presentes na literatura apresentam, em sua maioria, bons resultados utilizando a associação de malha de titânio com esponja de colágeno

impregnada com rhBMP-2 em casos de reparação óssea, tanto em modelos experimentais animais, quanto em humanos^{19,22}. Apesar disso, sua principal desvantagem é seu histórico de alta taxa de deiscência precoce e exposição do enxerto na cavidade oral²³, o que pode levar a uma infecção e, conseqüentemente, o insucesso do enxerto ósseo. Soma-se a este quadro a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para a remoção da malha de titânio⁵.

Nos dias atuais, alternativas de reconstruções com biomateriais reabsorvíveis tem sido alvo de estudos e pesquisas com a intenção de diminuir as complicações e a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, como realizada na utilização das malhas de titânio⁵. O benefício de optar-se por um dispositivo biodegradável é que ele não precisa de uma segunda cirurgia para sua remoção, o que diminui o número de visitas hospitalares do paciente assim como o tempo de internação e os custos cirúrgicos. Além disso, esses dispositivos tendem a evitar uma resposta imune a longo prazo²⁴. Constantemente, a engenharia tecidual busca o desenvolvimento de biomateriais para esta finalidade que seja de fácil manipulação, lenta degradação e com resistência suficiente para garantir a reconstituição tridimensional destes defeitos e permitir a reabilitação com implantes osseointegráveis.

Nessa circunstância, uma opção que é ressaltada nas reconstruções ósseas é a membrana de polidioxanona (PDO). A PDO é um polímero incolor, cristalino e biodegradável, biocompatível não antigênico e não pirogênico, o qual tem propriedade de induzir a mínima reação no tecido durante sua absorção²⁴. Foi apresentado no mercado, no início de sua circulação, como material para sutura, e após sendo disponibilizado com conformação de tela/membrana em diferentes espessuras, com ou sem perfuração. As membranas de PDO podem ser utilizados em tecido ósseo e cartilagem e a sua degradação ocorre por meio de hidrólise, que se inicia após 10 semanas da instalação e é finalizada após 25 semanas, sem produzir metabólitos que danifiquem os tecidos circulantes e sem causar reação inflamatória de corpo estranho ^{25,26}.

As membranas são amplamente utilizadas em procedimentos que envolvem a cartilagem nasal, sendo como um arcabouço e estabilizador em septorrinoplastias extracorpóreas, septoplastia endonasal reparo de perfuração septal e enxertos de extensão septal²⁶. Além de sua boa ação em cartilagens, tal polímero caracteriza um

bom meio auxiliar na regeneração do tecido ósseo, por conta da sua flexibilidade, baixa toxicidade de seus produtos de degradação e um período de biodegradação que condiz com o tempo de cicatrização óssea²⁷.

Somente algumas pesquisas avaliaram a capacidade de contribuição que este biomaterial tem no reparo de defeitos ósseos^{27,28}, mas sabe-se que ele garante a melhora na síntese de colágeno, estimula a via neurovascular e fortalece a elasticidade muscular, induz a formação do tecido conjuntivo fibroso pela atividade dos miofibroblastos, aumenta o número de vasos e capilares próximos e também estimulam um aumento nos níveis de colágeno tipo 1 e 3 como também o TGF-B1 TGF-B2 e TGF-B3 e atua como um arcabouço²⁹.

Essa técnica de “eletrospining” torna a superfície física dos polímeros com maior peso molecular, aspecto que facilita sua combinação com outras substâncias. E sua apresentação comercial oferece área maior, de forma, a facilitar a adesão e proliferação celular. Além disso, sua estrutura porosa tridimensional é semelhante a matriz extracelular, o que melhora a sua biocompatibilidade e reduz a rejeição dos tecidos e, por fim, é um material hidrofílico o que o torna benéfico para a adsorção de outras substâncias, especialmente se tiverem vida útil curta de forma a prolongá-la como é o caso da rhBMP-2³⁰. Esta associação, também demonstrou provocar maior atividade da proteína fosfatase alcalina, que está presente nos estágios iniciais do desenvolvimento dos osteoblastos, conseqüentemente, tem-se maiores taxas de diferenciação e ligação celular, atividade que indica que seu uso promove cicatrização e regeneração óssea²⁹.

De acordo com exposto acima, entende-se que modelos experimentais de grandes defeitos ósseos do tipo longo, mostram-se como um método interessante para avaliar o comportamento e as respostas biológicas da regeneração óssea, através de membranas de PDO as quais atuarão como material estabilizador para o conjunto rhBMP-2 + esponja de colágeno. Esta associação oferecerá inclusive permeabilidade seletiva favorecendo as condições de migração e proliferação de células essenciais para a osteogênese e atuando também como um guia para neoformação óssea recobrando a rhBMP-2. Ademais, esse estudo apresenta um caráter inédito, no qual mostra a importância em realizar um estudo pré-clínico dos biomateriais, na investigação de um meio viável para a regeneração dos grandes

defeitos ósseos, com finalidade de reduzir a morbidade a qual o paciente está susceptível.

2 OBJETIVOS

Esta pesquisa tem como objetivo analisar o potencial bioativo de membranas de Polidioxanona (PDO) por meio de grandes reconstruções enquanto material estabilizador para rhBMP-2, atuando também, como guia para neoformação óssea após ressecção em fêmures de ratos.

A hipótese nula desta pesquisa é que independente do material a ser testado (Malha de Ti ou Membrana de PDO), o potencial bioativo em relação aos parâmetros reparacionais não seriam influenciado por eles.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A utilização da rhBMP-2- Infuse^R (Medtronic) 1,5mg/ml seguiu rigorosamente o protocolo fornecido pelo fabricante que recomenda sua aplicação através de esponjas de colágeno contendo 3,25 µg de rhBMP-2 por defeito, dado obtido através da fórmula física de volume do cilindro: $\pi \times R^2 \times \text{Altura}$.

As membranas de PDO (15mm x 10mm x 1mm) (Plenum guide - Plenum Bioengenharia Jundiaí, São Paulo, Brasil) foram sintetizadas a partir do protocolo de confecção realizado por Boland et al., em 2005(31). A obtenção da membrana ocorreu através de um processo denominado “eletrospinning” que tem finalidade de confeccionar uma estrutura similar a uma teia formada por cadeias de polímeros emaranhados.

Dessa forma, é importante que a solução polimérica seja armazenada em um reservatório e separada de um alvo que foi submetido a carga elétrica oposta formando um campo elétrico que, tendo a tensão superficial superada cria um jato de encontro ao alvo produzindo a membrana. O preparo do PDO se dá a partir dos fios de sutura de monofilamento violeta PDS II de Ethicon, Inc. (Somerville, NJ). Antes do processamento, as agulhas são removidas e os fios levados em frascos herméticos contendo cloreto de metileno, por três dias, para que o corante seja removido de sua superfície. Após a remoção completa do corante, os fios são secos ao ar, para completa evaporação do solvente e em seguida são cortados em pequenas partes de 1-4 cm. Em seguida, é preparada uma solução com os fios cortados e o 1,1,1,1,3,3,3,3 hexafluoro-2-propanol (HFP, Sigma Aldrich ChemicalCo.) em concentrações de 50-125 mg/ml de PDO em HFP. Para o procedimento de eletrospinning. A solução é carregada em uma seringa Becton Dickinson (3.0)10,0ml) e colocada em uma bomba de seringa KD Scientific para dosificação medida entre 4 e 12ml/h, sendo a taxa de dispersão inversamente variável, de acordo com a concentração do polímero. Uma fonte de alta tensão, ajustada para 22kV é conectado a uma agulha de calibre 18 na seringa e um alvo é colocado a 20 cm da ponta da agulha, sendo utilizada baixa rotação (100RPM) para produzir fibras dispostas aleatoriamente e uma rotação maior (400 RPM) para produzir fibras alinhadas.

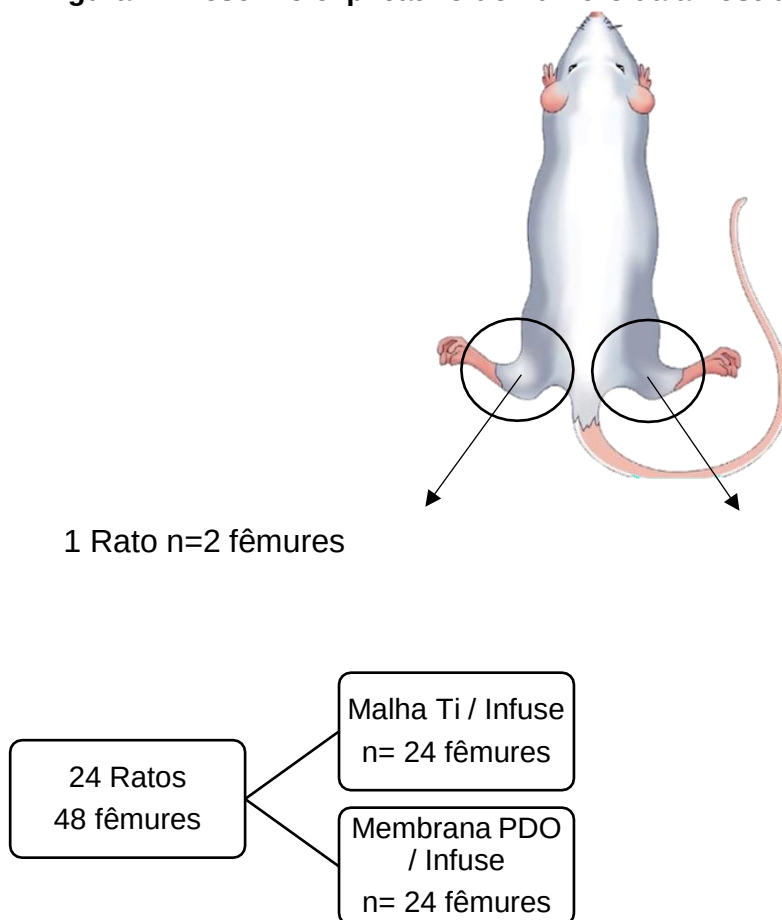
Para que este estudo se enquadrasse nos Princípios Éticos para Experimentação Animal, do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA),

o projeto foi enviado e obteve o parecer consubstanciado favorável do Comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP através do protocolo de número 00539-2019.

3.1 Desenho experimental

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

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



Fonte: Autora, 2024

Sendo assim, para essa pesquisa foram utilizados 24 ratos (N=48 fêmeas) (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), machos, adultos (n=12 ratos, 24 fêmeas por grupo experimental), com 6 meses de idade, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, que foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição. O número de animais por grupo foi determinado pelo cálculo de poder do teste utilizando o software Sigma Plot 12.0 (San Jose, CA, EUA) considerando o estudo de Senoo et al ³² cujo resultado primário refere-se a área de osso neoformado portanto, para um poder desejado de 85% e alfa de 5%, usando a diferença mínima detectável nas médias = 8,50 e desvio padrão esperado = 4,50 dessa maneira obteve-se um número amostral de 6 animais por grupo experimental e a cirurgia de ambos grupos e tempos foram realizadas pelo mesmo operador.

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

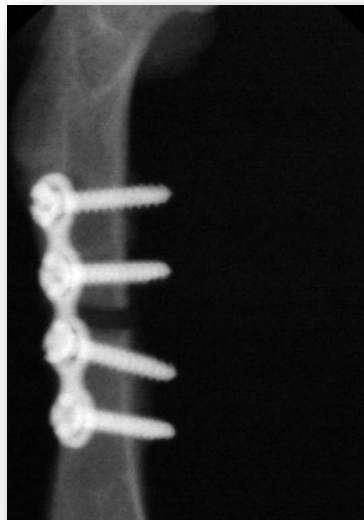
3.2 Procedimento cirúrgico: ressecção e reconstrução óssea

Os 24 animais (N=48 fêmeas) passaram por tempo para se adaptar no biotério, submetidos a jejum de 12 horas antes do procedimento cirúrgico, e foram sedados pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaína 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) para anestesia local e hemostasia do campo operatório. Após sedação dos animais, foi realizada a tricotomia na porção lateral do fêmur direito e esquerdo e, antissepsia da região a ser incisa com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de 4 cm de

comprimento na porção lateral do fêmur e assim, bilateralmente o osso do fêmur foi exposto do polo lateral do côndilo do fêmur, entre o músculo lateral e o músculo bíceps do fêmur.

Posteriormente, uma placa de fixação do sistema 1.5mm com 4 furos sem intermediário, foi fixada em cada fêmur do animal. Após a estabilização da placa, foi realizada a simulação de uma ressecção, com o auxílio de uma serra circular com cerca de 1mm de espessura, realizando-se a osteotomia na metáfise epifisária, distando 5mm da cartilagem articular epifisária, realizando um GAP^{33,34,35} de 2mm, constituindo assim um defeito ósseo crítico (Figura 2), suportado por estudos previamente publicados^{36,37,38}.

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



Fonte: Autora, 2024

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

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

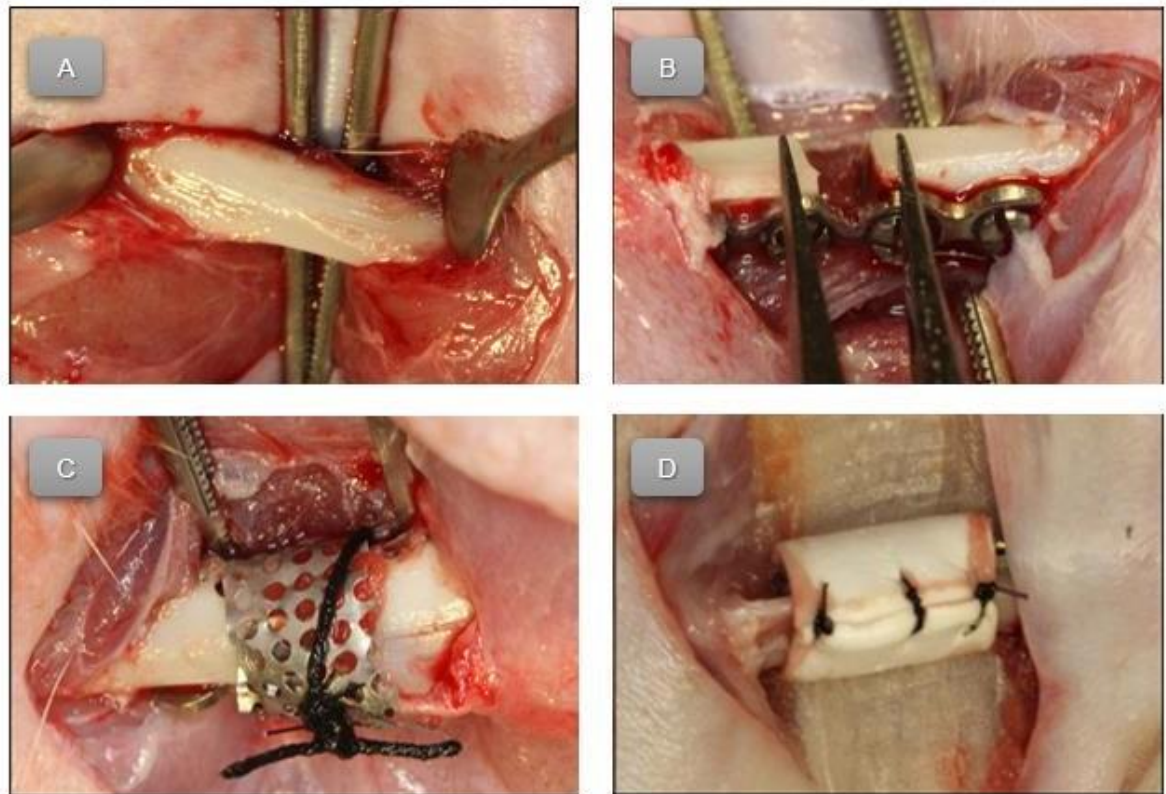
Para a reconstrução do Grupo Titânio/Infuse, foi realizado o preenchimento do “gap” com rhBMP-2 (Infuse) carregada em esponja de colágeno (3,25 µg), em

seguida, a malha de titânio 15mm x 10mm x 0,04mm (Criteria Engenharia de Implantes (Rio Claro, SP, Brasil) foi estabilizada com o auxílio de nylon (Nylon 3.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) para acomodação e estabilização da malha. Para o Grupo PDO/Infuse, a reconstrução iniciou-se com o preenchimento do “gap” com a rhBMP-2 (Infuse) carregada em esponja de colágeno e foi estabilizada com o uso de uma membrana de PDO, que foi fornecida pela empresa Plenum Bioengenharia (Jundiaí, São Paulo, Brasil) que foi disposto de modo a atuar como um arcabouço, sendo utilizado um fio monofilamentar (Nylon 3.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) nas duas extremidades da membrana para auxiliar na sua estabilidade. Durante todo o procedimento, tanto para a osteotomia e para a perfuração com as brocas cirúrgicas, as regiões foram irrigadas copiosamente com solução salina fisiológica (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), para evitar-se o aquecimento do tecido ósseo e assim, influenciar negativamente no reparo ósseo (Fig. 3 e 4). Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 4.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

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

Durante os três primeiros dias pós-operatório os animais foram medicados com cloridrato de tramadol (5 mg / kg / dia, IM) para alívio da dor³⁸.

Figura 3 – Etapas do procedimento cirúrgico de ressecção e reconstrução



Fonte: Autora, 2024

(A) Exposição da porção lateral do fêmur. (B) Paquímetro com marcação de 2mm para o “gap” (C) Aspecto final da estabilização da malha de Ti ao redor do defeito. (D) Aspecto final da estabilização do scaffold de PDO ao redor do defeito.

3.3 Imobilização do membro operado: Suspensão pela cauda

Tem como propósito imobilizar as patas traseiras dos animais e prevenir a ocorrência de fadiga das minis placas ou má consolidação das fraturas. Após as cirurgias, os animais, ainda sedados, foram suspensos pela cauda, por meio de uma modificação da técnica proposta por Meira³⁹. A suspensão foi realizada com ajuda de uma fita elástica adesiva (Kinesio Tape). Dessa forma, após aderir ao rabo do animal, a própria fita foi utilizada para confecção de uma espécie de alça, que proporciona a

apreensão à uma presilha metálica, no qual se encontrava conectada a uma barra de ferro, onde é possível regular a altura da suspensão. Para potencializar a bandagem, utilizou-se de três pedaços, de pequena largura, de esparadrapo, que foram colados nas periferias e no centro da fita elástica adesiva presa ao rabo do animal. Desse modo os animais tiveram liberdade para movimentação dos membros torácicos, pois foram mantidos em aproximadamente 30 graus, inclinado em relação ao assoalho da caixa (Figura 4).

No decorrer do tempo entre a cirurgia e a eutanásia, os animais foram assistidos todos os dias, onde foi notada a integridade da suspensão, a disponibilidade de ração e água, a saúde geral e as feridas cirúrgicas. É importante lembrar que durante todos os dias foi feita a antissepsia das feridas cirúrgicas e uma vez por semana a antissepsia da genitália do animal, para não ocorrer infecção urinária, já que poderia resultar, devido à dificuldade que o animal tem de realizar sua auto-higiene pela limitação de movimentação.

Figura 4 – Imagem ilustrativa do modelo de suspensão dos animais pela cauda, realizado através de fita de knesio tape fixada com esparadrapo, presa a alça móvel ao teto da caixa.



Fonte: Autora, 2024

3.4 Eutanásia

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

3.5 Coleta do tecido muscular

Com o intuito de avaliar os efeitos sistêmicos dos materiais propostos, realizou-se a coleta do músculo ao redor da reconstrução óssea. A coleta se deu, imediatamente, após a remoção dos fêmures e foram fixados em formalina 10% tamponada. Posteriormente, essas peças seguiram para o processamento de inclusão, microtomia e foram coradas com HE e analisadas em microscopia óptica com o intuito de identificar quaisquer alterações histopatológicas causadas pelos materiais testados.

4 ANÁLISES

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

4.1 Análise clínica

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

4.2 Análise com tecidos calcificados

4.2.1 Radiografia

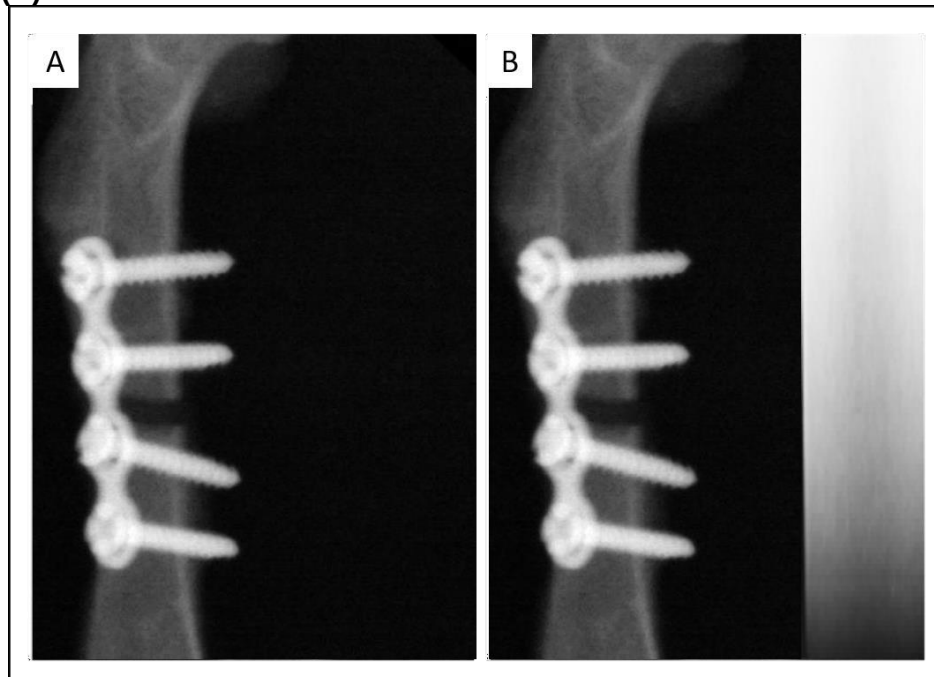
Os fêmures foram submetidos a radiografias, as quais foram efetuadas por um mesmo operador, em um mesmo dispositivo de captura por via de um sensor de imagem FIT tamanho 1 (Micro imagem) através de um aparelho de raio-X Timex 70 E (Gnatus). Foi estabelecido uma distância de 8cm do canhão por onde se tem a saída dos feixes de raios x, até a peça, bem como um tempo de exposição de 0,10s para todas as tomadas radiográficas. Logo em seguida, as imagens foram divulgadas ao programa ODR – ATA, para ser realizado a análise da densidade óssea presente nas amostras radiografadas.

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

O programa computacional ODR – ATA, tem como proposito fazer o cálculo da densidade óssea, sendo a densitometria radiográfica sua base⁴⁰. Para essa finalidade, foi utilizado um modelo de cunha de alumínio, pois esse material possui absorção de raios – x semelhante ao tecido ósseo, como método de comparação com a amostra.

As radiografias dos fêmures foram salvas em formato PNG (Figura 5). Com o programa ODR-ATA em execução, fez-se a escolha da cunha com os dados pré-determinados, denominada de “Cunha Teste”. Logo após, a radiografia digitalizada com a cunha anexada foi selecionada e aberta no programa e como método de calibração, por meio da ferramenta “Drawing”.

Figura 5 – Radiografia antes (A) e após anexar a imagem radiográfica da cunha de alumínio (B)



Fonte: Autora, 2024

4.3 Análises com tecidos descalcificados

4.3.1 Análise histológica

Com 14 e 60 dias de pós-operatórios, seis fêmures de cada grupo (Grupo Titânio e Grupo PDO) foram levados ao processamento laboratorial para os tecidos descalcificados. O processamento deu início com a descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (10%), dessa forma as peças foram imersas em solução para descalcificação, ressaltando que as trocas foram realizada semanalmente até ocorrer a redução da resistência à passagem de uma agulha para seringa carpule, apontando que a peça estava descalcificada. Após essa etapa, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois (70 a 100%). Posteriormente estas etapas, foi feita a diafanização com xilol, e em seguida inclusão em parafina, para a obtenção de lâminas com cortes de 5 μ m de espessura.

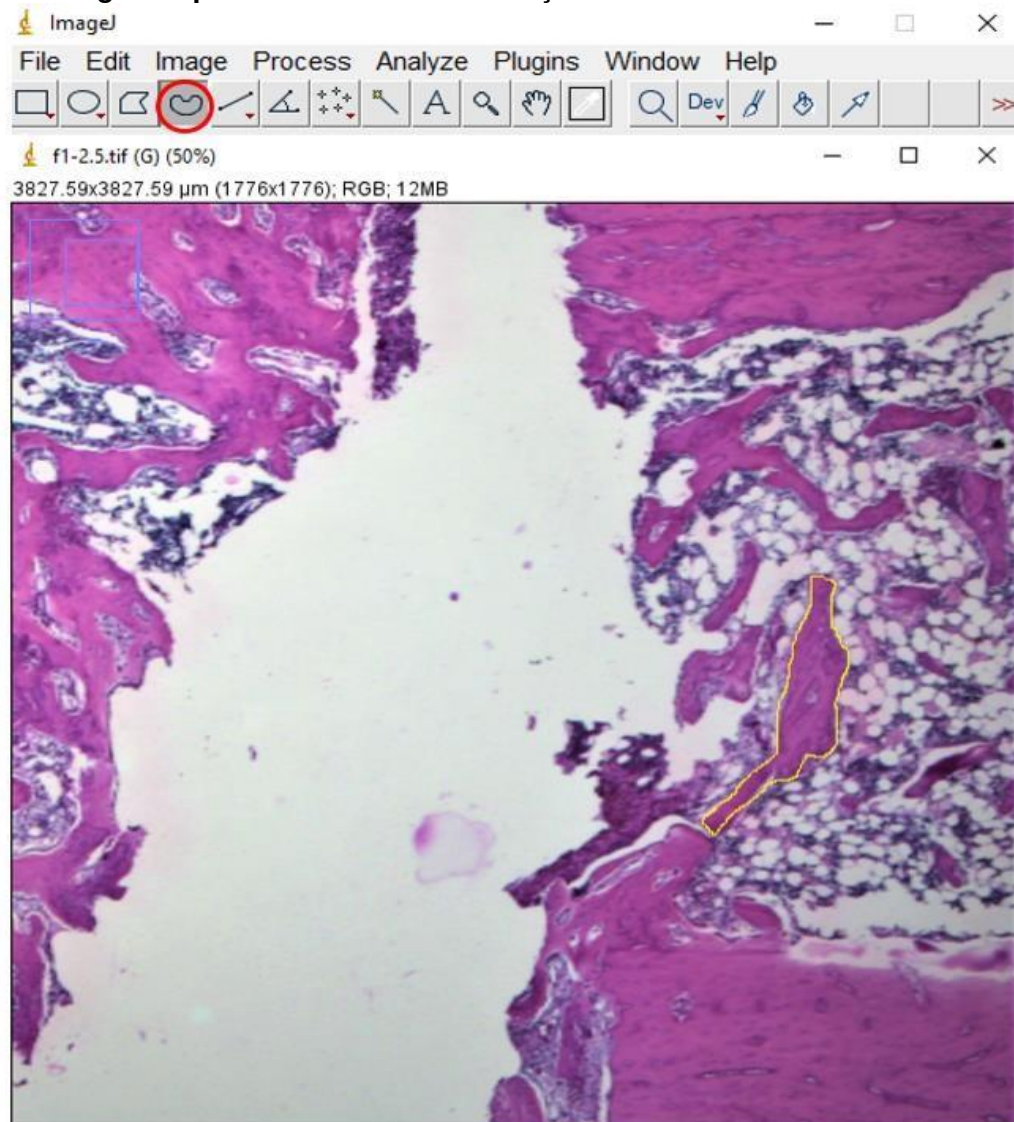
Antes de ser realizada a inclusão propriamente dita as placas, os parafusos e a malha de titânio foram removidos dos respectivos fêmures. Depois da microtomia, as lâminas pares foram destinadas para coloração em hematoxilina e eosina (HE), na

qual foi analisada a cronologia do reparo ósseo na interface do “gap” da simulação da ressecção e reconstrução. Foi analisado a desigualdade entre os grupos experimentais com destaque nos parâmetros de qualidade, com avaliação da maturidade do tecido ósseo e quantidade de tecido ósseo, e também a presença de células do processo inflamatório e quantidade de vasos sanguíneos.

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

Logo para a avaliação do perfil inflamatório, com destaque na contagem de linfócitos e contagem de número de vasos sanguíneos, foi feito, para cada amostra, três fotomicrografias realizadas na porção central do defeito, em objetivas de 100x, em diferentes regiões, sendo uma delas central e outras duas próximas a cada coto ósseo. Logo após, as imagens foram também submetidas à análise por meio do software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), utilizando a ferramenta “Grid”, com 130 pontos de intersecção, como meio de facilitar a visualização das células e dos vasos sanguíneos. E também, foi utilizada a ferramenta “Cell Counter Notice”, para a contagem propriamente dita das estruturas mencionadas (Figura 6).

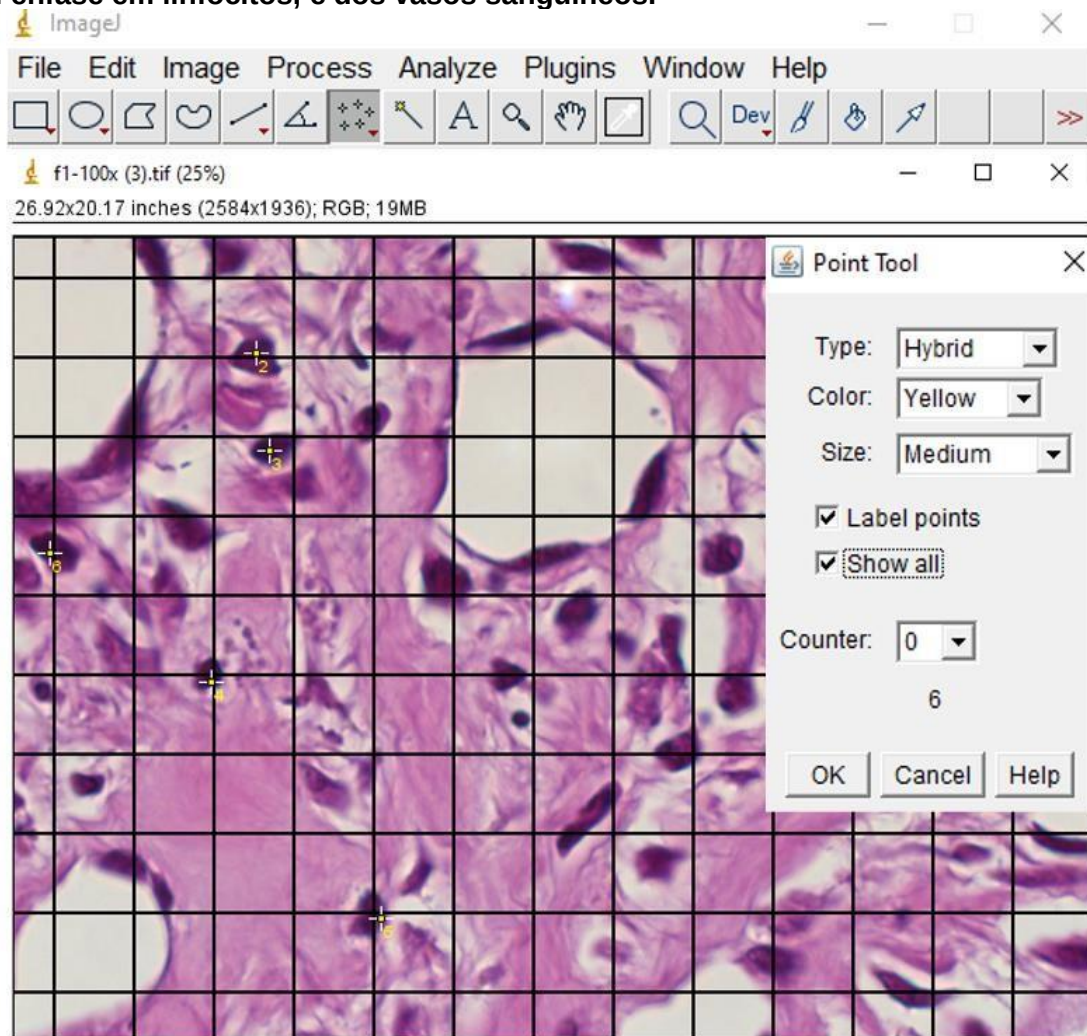
Figura 6 - Imagem representativa da mensuração de tecido ósseo neoformado.



Fonte: Autora, 2024

A figura em questão representa uma fotomicrografia em objetiva de 5x, por meio do software Image J. Nesta, é possível observar uma área óssea selecionada – delimitada em amarelo- por meio da ferramenta “Free hands” (círculo vermelho).

Figura 7 – Imagem representativa da metodologia de contagem de células inflamatórias, com ênfase em linfócitos, e dos vasos sanguíneos.



Fonte: Autora, 2024

Para essa demonstração, foram utilizadas fotomicrografias realizadas em objetiva de 100X, em três diferentes áreas do defeito ósseo e no software Image J, utilizou-se as ferramentas "Grid" e "Cell Counter Notice".

4.3.2 Análise imuno-histoquímica

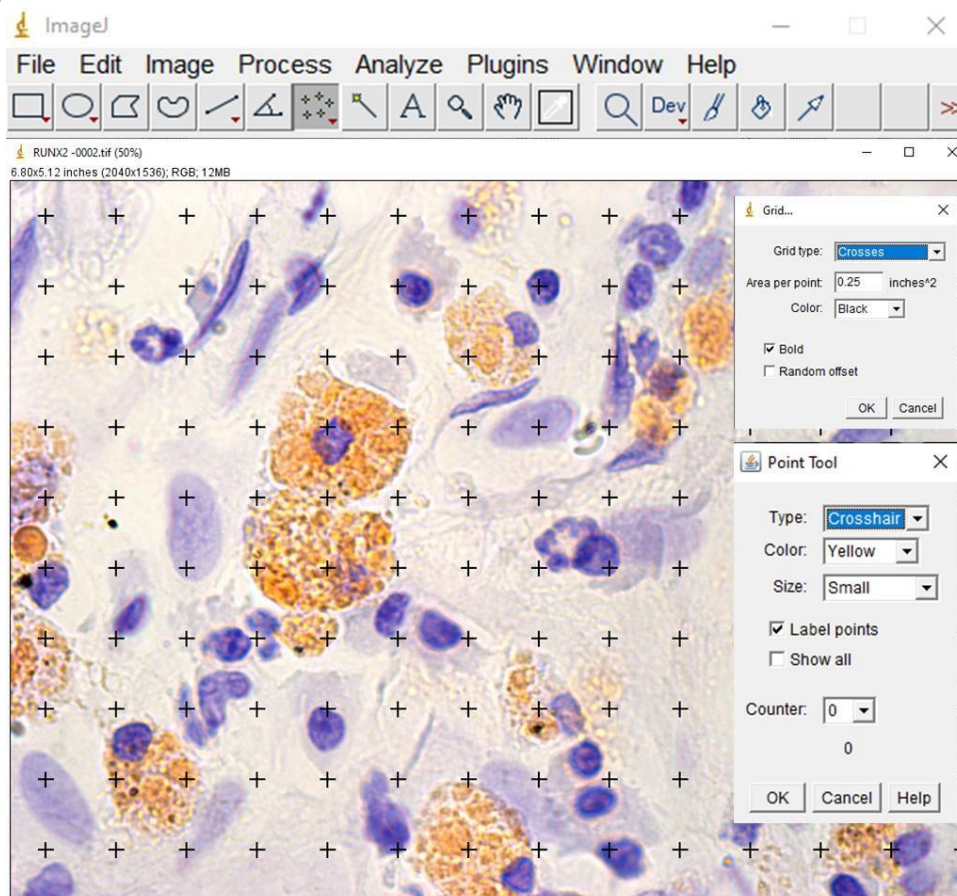
As lâminas que foram descalcificadas e incluídas em parafina, as de número ímpar foram designadas as reações de imuno-histoquímica, no qual a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. Logo, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato

(pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram: anti BMP-2, uma vez que expressa o potencial osteoindutor, osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear kapa B ligante (RANKL) para avaliar o comportamento de reabsorção, osteocalcina (OC) para evidenciar a tendência de mineralização e anti RUNX2 com o intuito de avaliar a diferenciação de células osteogênicas.

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

Para avaliação das reações imuno-histoquímicas realizou-se uma análise quantitativa, por meio da contagem das células marcadas^{41,42}. As imagens foram fotomicrografadas em objetiva de 100x, em duas áreas distintas na região do defeito ósseo, e para a contagem de células marcadas utilizou-se o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), com auxílio da ferramenta “Grid” do tipo “Crosses”, com um total de 130 “crosses” por imagem. Para todos os grupos, assim como a análise histológica, foram realizadas as análises de imuno-histoquímica nos períodos de 14 e 60 dias pós-operatórios (Figura 8).

Figura 8 – Imagem representativa da metodologia utilizada para análise imuno-histoquímica.



Fonte: Autora, 2024

Para essa representação gráfica foram realizadas capturas em objetiva de 100x, em três diferentes áreas do defeito e no software Image J utilizou-se as ferramentas “Grid” no tipo “Crosses” e a ferramenta “Cell Counter Notice”.

4.3.3 Análise subcutânea

Dos 24 animais, 16 deles receberam em seu dorso o mesmo material testado referente ao grupo que pertenciam (8 animais para cada grupo) sendo posteriormente submetidos a remoção do tecido subcutâneo para análise em quatro tempos distintos, 3, 5, 7 e 10 dias, totalizando 2 amostras por tempo e por grupo. Para isso, foram submetidos a sedação seguindo o mesmo protocolo adotado para a cirurgia da ressecção, os animais foram submetidos a uma incisão elíptica ao redor da região de interesse, onde se encontra o material, para sua remoção junto de uma amostra do tecido subcutâneo adjacente. Posterior a isso, realizou-se sutura por planos com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São

José dos Campos, Brasil). O tecido coletado foi cuidadosamente manipulado para remoção da sutura estabilizadora do material, o mesmo foi removido e o tecido adjacente seguiu os mesmos protocolos de processamento laboratorial para confecção de lâminas histológicas como mencionado anteriormente para obter cortes de 5µm compondo 2 lâminas por espécime destinadas a coloração de HE com o intuito de avaliar biocompatibilidade.

4.3.4 Contagem de células inflamatórias

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

4.4 Análise estatística

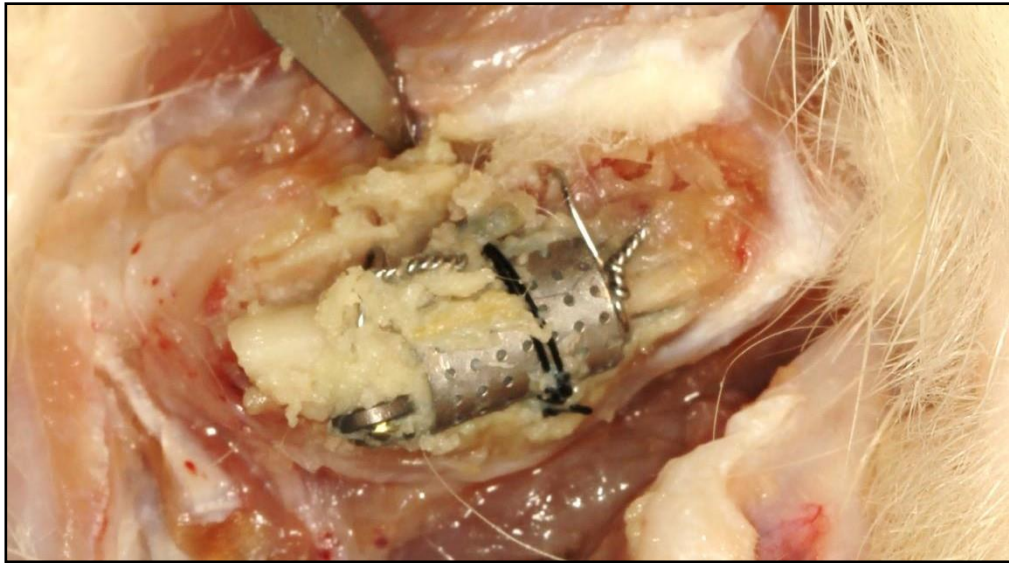
Todos os testes foram realizados no programa estatístico Sigma Plot 12.3 (Systat Software, Inc., San Jose California, USA). Inicialmente, os dados obtidos a partir da análise histométrica foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk, $P>0,05$). Após a confirmação da distribuição normal dos dados, os testes de ANOVA 2-fatores e pós teste Tukey foram utilizados para a comparação entre as médias com nível de significância de $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica

O grupo Titânio mostrou deiscência de sutura e infecção associada a 5 fêmeas, sendo 2 aos 14 dias e 3 aos 60 dias (Figura 9), já os animais do grupo PDO apresentaram integridade de tecido mole e satisfatória condição de reparo femoral. Ainda visualmente foi possível observar a formação de um tecido reparacional maior no grupo PDO do que no grupo Titânio, especialmente aos 60 dias.

Figura 9 – Imagem ilustrativa de coleção purulenta evidenciando infecção em fêmur do grupo Titânio



Fonte: Autora, 2024

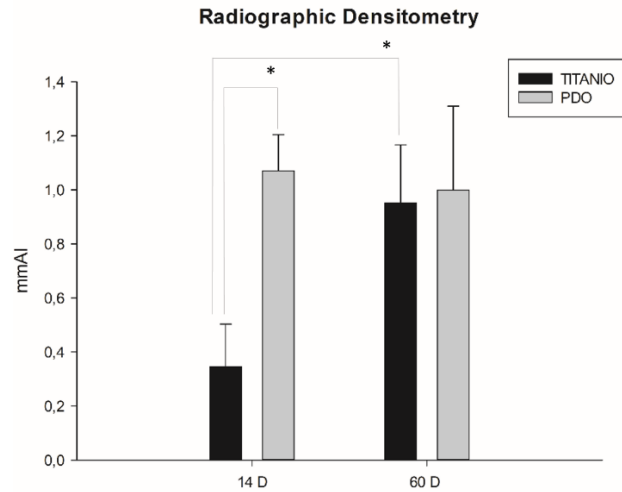
5.2 Análise com tecidos calcificados

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

A análise da densitometria nas radiografias, por meio do programa ODR-ATA, demonstrou que para o grupo PDO (PDO 14D: $1,070 \pm 0,133813$) (PDO 60D: $1,000 \pm 0,31042$) houve uma superioridade com relação a densidade óssea, quando comparado ao grupo titânio (Ti 14D: $0,346 \pm 0,157256$) (Ti 60D: $0,952 \pm 0,215668$), observando-se diferença estatística significativa no período de 14 dias ($p < 0,001$) (Figura 10).

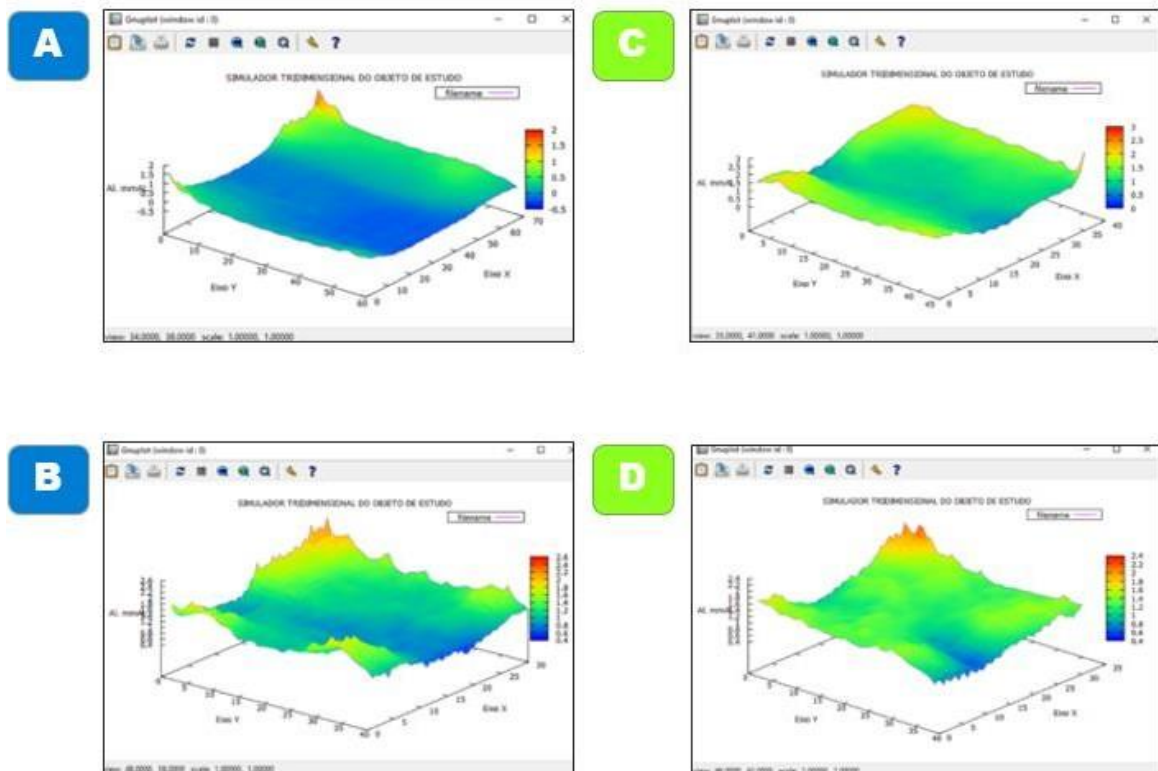
A reconstrução da área de defeito ósseo crítico por meio do “Simulador tridimensional do objeto de estudo” possibilitou observar que para o grupo PDO, já nos primeiros 14 dias pós-operatórios há a formação de uma ponte de tecido ósseo entre os cotos, a qual é finalizada aos 60 dias após a cirurgia de ressecção e reconstrução no fêmur. Já o grupo titânio, além de apresentar menor formação óssea aos 14 dias, demonstrou ter um padrão mais atrasado também aos 60 dias, sem ter a formação completa de uma ponte de tecido ósseo ao final do período observado (Figura 11).

Figura 10 - Representação gráfica dos resultados de densitometria radiográfica, em mmAl, evidenciando uma maior densidade óssea para o grupo PDO, com diferença significativamente estatística aos 14 dias de pós-operatório ($p<0,001$)



Fonte: Autora, 2024

Figura 11 - Imagens obtidas por meio do “Simulador tridimensional do objeto de estudo”, ferramenta do programa computacional ODR- ATA.



Fonte: Autora, 2024

Na seguinte representação, temos A: Grupo Titânio 14 dias; B: Grupo Titânio 60 dias; C: Grupo PDO 14 dias; D: Grupo PDO 60 dias.

Nela, podemos observar que há certa tendência do grupo PDO para formação de uma ponte de tecido ósseo já aos 14 dias e finalização desta formação aos 60 dias pós-operatório, facilitando a visualização do resultado gráfico.

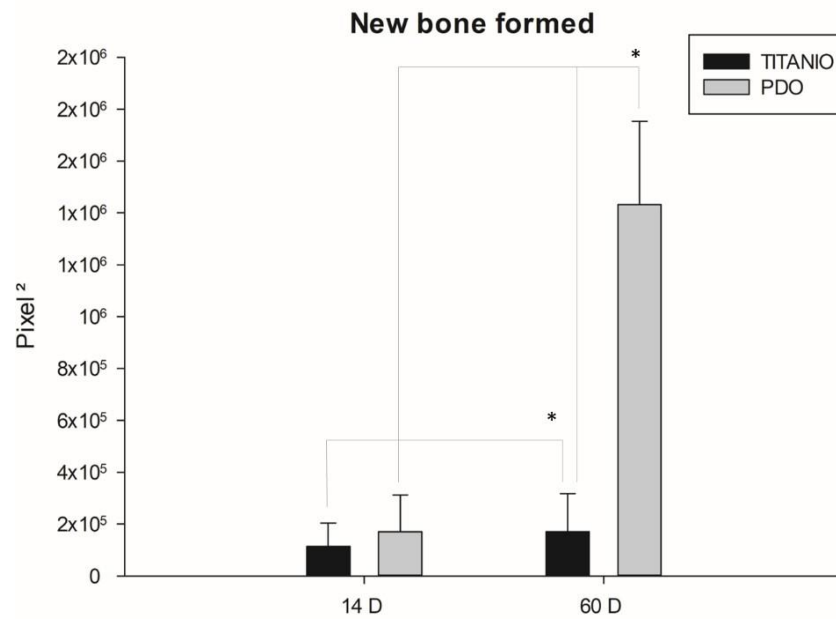
5.3 Análise com tecidos descalcificados

5.3.1 Análise histológica de tecido ósseo neoformado

A avaliação quantitativa do tecido ósseo apontou que nas amostras de 14 dias, tanto para o grupo Titânio ($113744,8 \pm 89837,54$) quanto para o grupo PDO ($170872 \pm 140801,2$), já havia regiões de neoformação óssea entremeadas nas fibras da esponja de colágeno, que se apresentou como carreadora da proteína RhBMP-2. Nos dois grupos teve formação óssea mais significativa ao tempo de 60 dias, em comparação a 14, ainda apresentando maior maturação do tecido ósseo, com grande número de osteócitos e maior volume de matriz mineralizada (Figura 14), notou-se também diferença estatística nos dois grupos: grupo titânio ($P = 0,038$) e grupo PDO ($P < 0,001$). Ademais, percebeu-se maior formação e maturação óssea para o grupo PDO (1431613 ± 322218), principalmente com relação a amostra de 60 dias, quando comparado ao grupo Titânio para o mesmo tempo ($170668,5 \pm 146354,8$) ($P = 0,002$). (Figuras 12, 13 e 14).

Vale destacar, que podemos notar nas imagens representativas uma porção do “Scaffold” de PDO próxima a região de defeito ósseo, com boa parte de sua integridade aos 14 dias e em processo de absorção nas amostras de 60 dias (Figura 13).

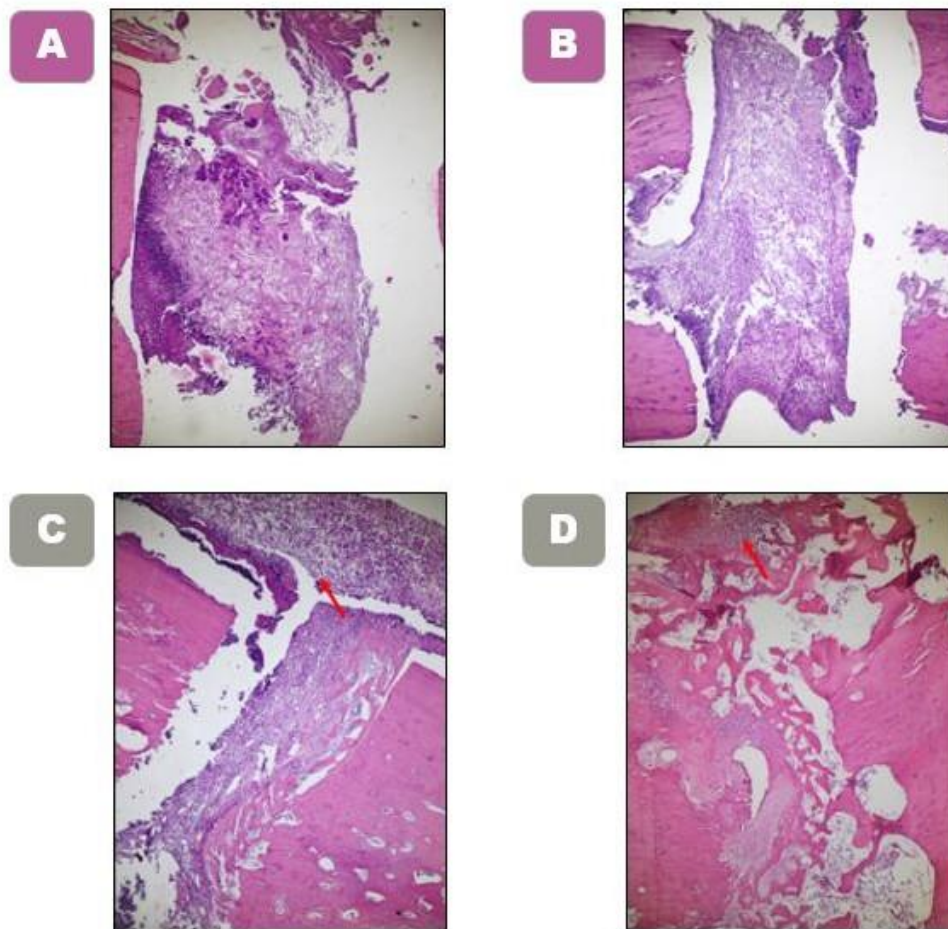
Figura 12 - Representação gráfica dos resultados de área de tecido ósseo neoformado.



Fonte: Autora, 2024

Para essa representação gráfica, evidenciou-se reparo ósseo superior para o grupo PDO, especialmente no período de 60 dias, período no qual houve diferença significativamente estatística ($p < 0,001$).

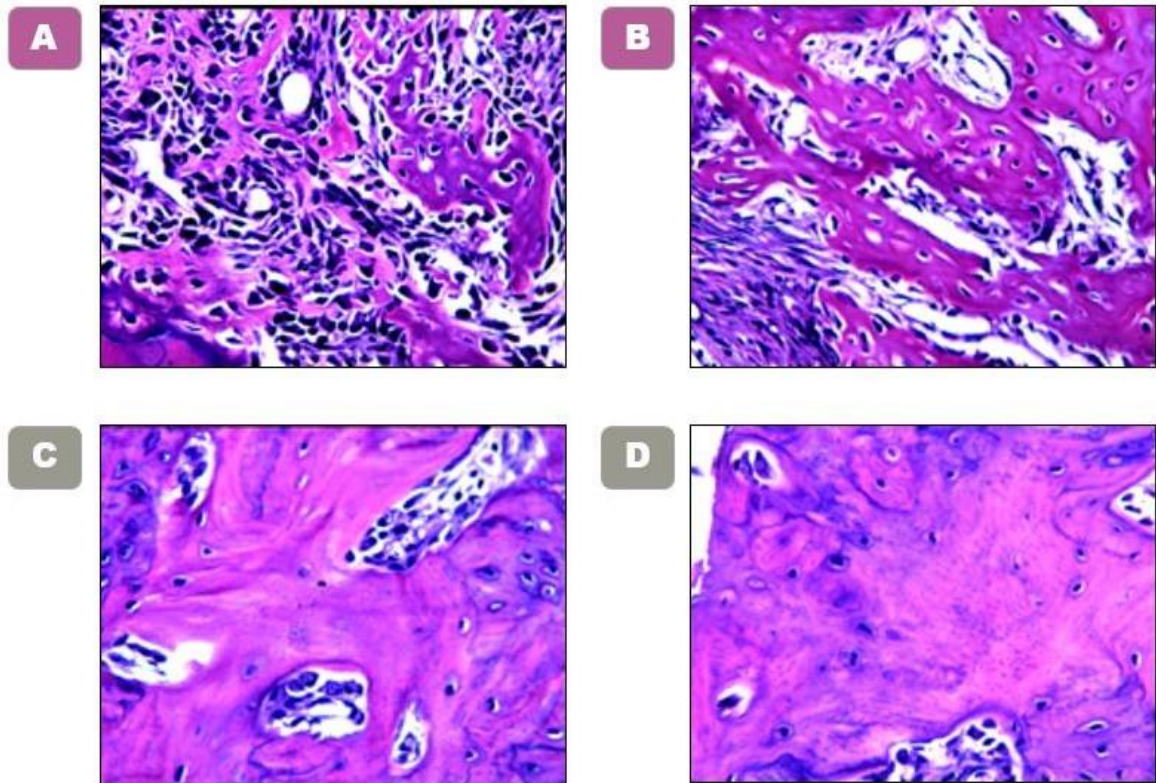
Figura 13 - Imagens representativas da área de tecido ósseo neoformado, demonstrando maior área para os grupos PDO.



Fonte: Autora, 2024

Na imagem, as setas em vermelho representam o Scaffold de PDO e sua absorção gradativa nos diferentes tempos.

Figura 14 – Imagem em aumento de 40x demonstrando maior maturação e organização tecidual para o grupo PDO, em ambos os períodos.



Fonte: Autora, 2024

Em que, A: Grupo Titânio dias; B: Grupo PDO 14 dias; C: Grupo Titânio 60 dias; D: Grupo PDO 60 dias.

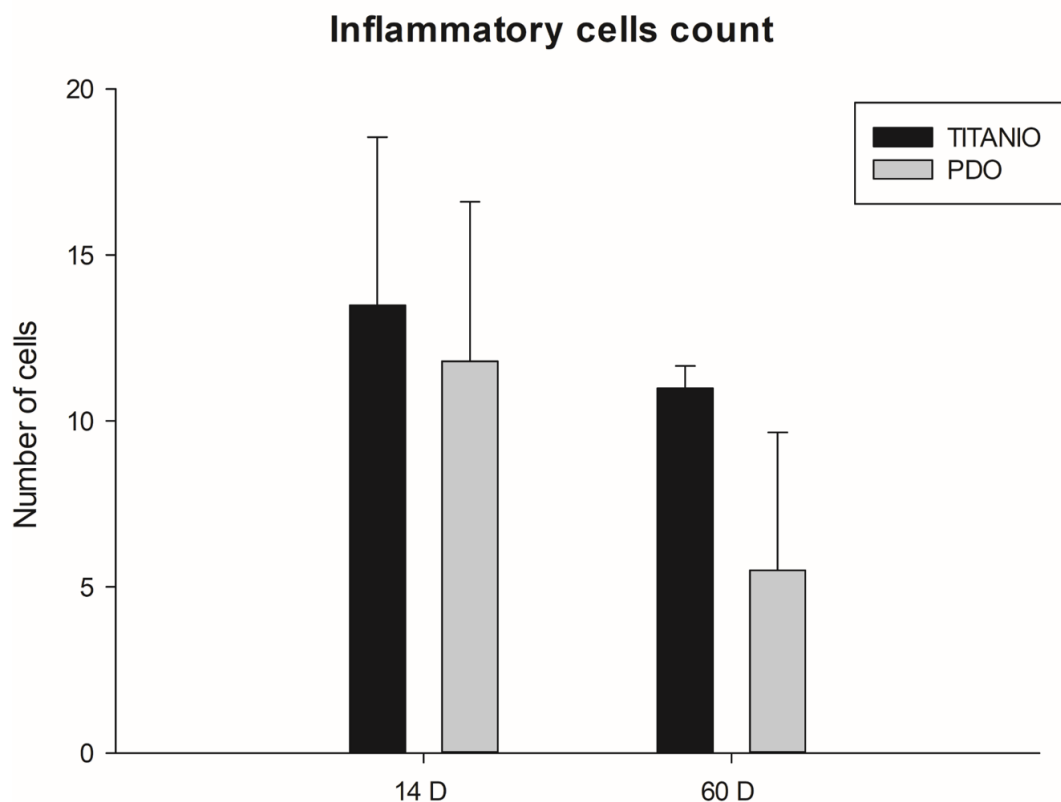
5.3.2 Contagem de células inflamatórias

A contagem de células inflamatórias, com destaque nos linfócitos, e na quantidade de vasos sanguíneos em todos os grupos experimentais, possibilitou a avaliação do perfil inflamatório. Por conseguinte, notou-se que o grupo Titânio (Ti 14D: $13,49 \pm 5,057911$) (Ti 60D: $10,99333 \pm 0,665006$) demonstrou maior número de linfócitos nos dois tempos quando comparado ao grupo PDO (PDO 14D: $11,798 \pm 4,804177$) (PDO 60D: $5,495 \pm 4,165$), principalmente aos 60 dias. Ademais, notou-se que para os dois os grupos, aos 60 dias houve diminuição do processo inflamatório sem diferença estatística para nenhuma das comparações (Figura 15).

Nas imagens representativas é possível notar áreas que para o grupo Titânio, as regiões de tecido conjuntivo se apresentam com infiltrado inflamatório

maior, muito celularizado e com fibras colágenas, características presentes em um tecido em reparo. Logo nas imagens do grupo PDO, é notável que mesmo na região de tecido conjuntivo, há áreas onde o osso está em desenvolvimento ou até mesmo completamente desenvolvido, sem características de reparo tecidual em andamento, sendo detectado baixa quantidade de células inflamatórias e fibras de colágeno, bem como característica de um tecido mais organizado (Figura 16).

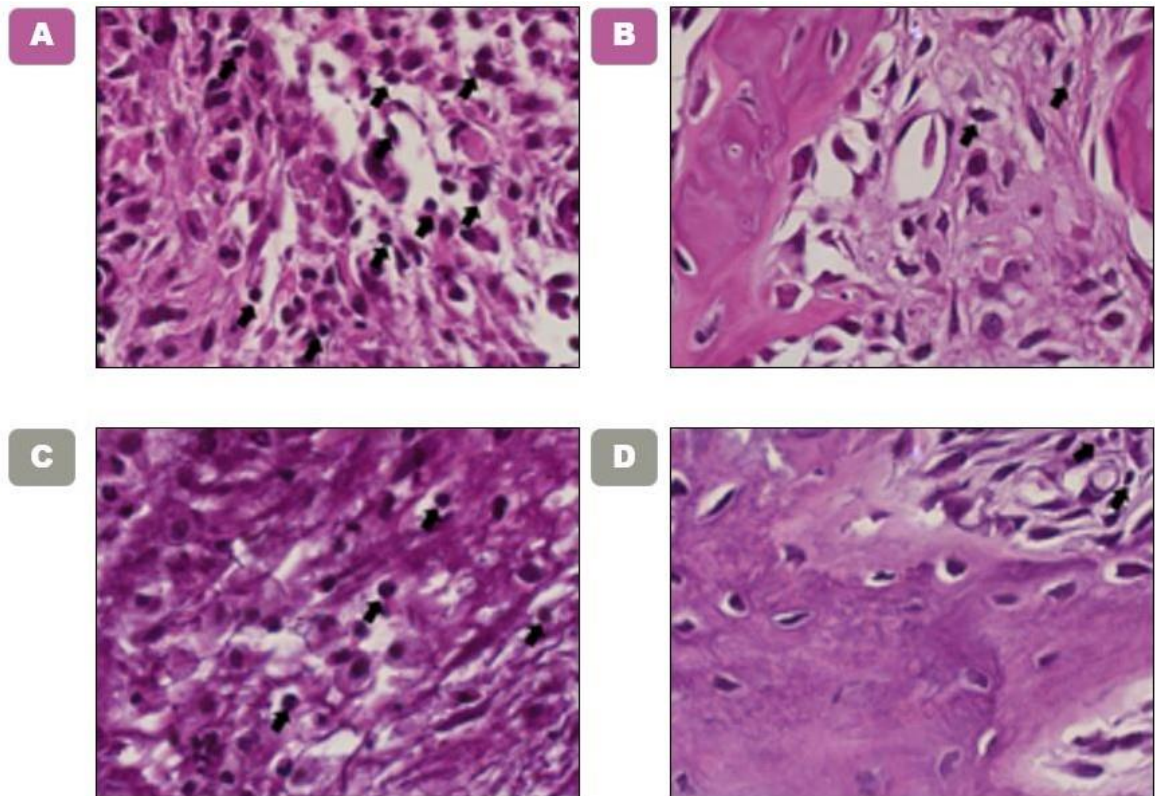
Figura 15 - Representação gráfica do perfil inflamatório presente nos grupos experimentais.



Fonte: Autora, 2024

O perfil traçado por meio da contagem de células inflamatórias, principalmente de linfócitos, demonstrou que houve maior infiltrado inflamatório para o grupo Titânio nos períodos de 14 e 60 dias sem diferença estatística.

Figura 16 – Imagens representativa da contagem de células inflamatórias.



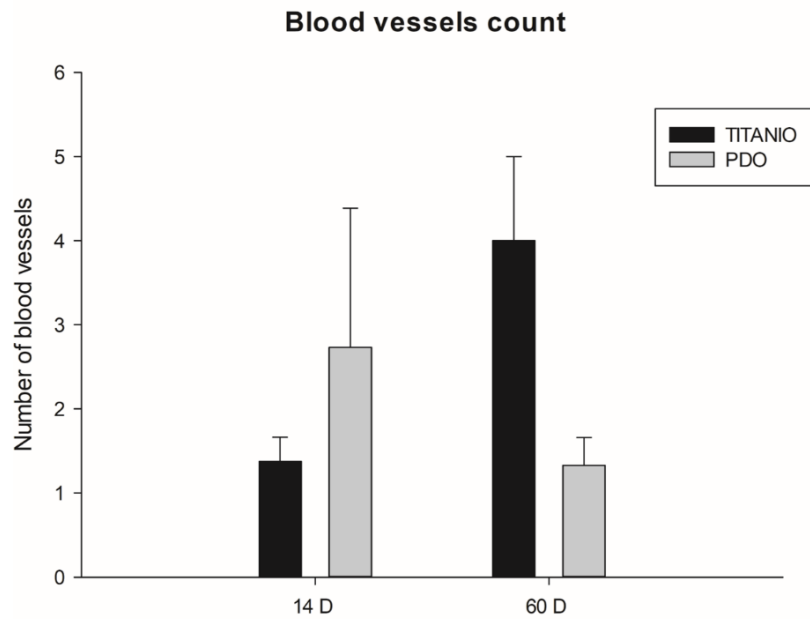
Fonte: Autora, 2024

Durante a contagem, a prioridade de marcação foram os linfócitos (setas pretas). Imagens realizadas em objetiva de 100x.

Já a contagem de número de vasos sanguíneos, também associada ao perfil inflamatório do tecido, confirmou valores maiores para o grupo PDO aos 14 dias (PDO 14D $2,73 \pm 1,657981$) quando comparado ao grupo Titânio (Ti 14d $1,375 \pm 0,287228$), e aos 60 dias é notado o oposto, com números mais significativos de vasos sanguíneos para Titânio (Ti 60D 4 ± 1) (PDO 60D $1,33 \pm 0,33$) sem diferença estatística para as duas comparações. (Figura 17).

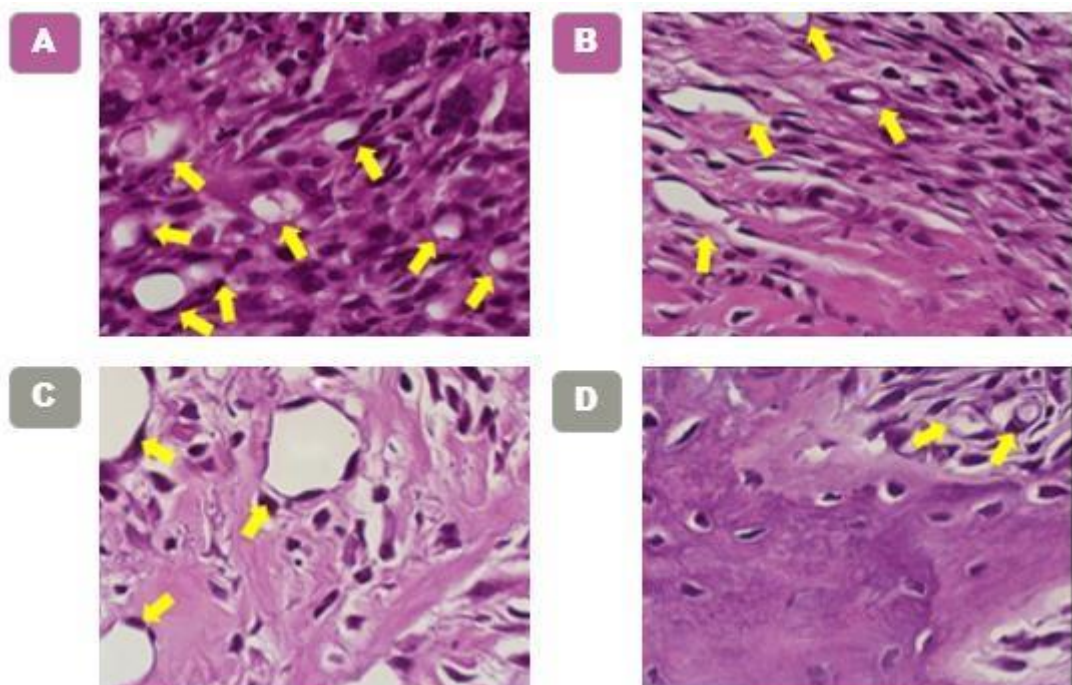
Nas fotomicrografias mostrou um reforço desses resultados, com existência de maior número de vasos para o grupo PDO aos 14 dias e Titânio aos 60 dias (Figura 18).

Figura 17 - Número de vasos sanguíneos, demonstrando melhores resultados para o grupo PDO, especialmente no período de 14 dias sem diferença estatística.



Fonte: Autora, 2024

Figura 18 - Fotomicrografias representativas do número de vasos sanguíneos.



Fonte: Autora, 2024

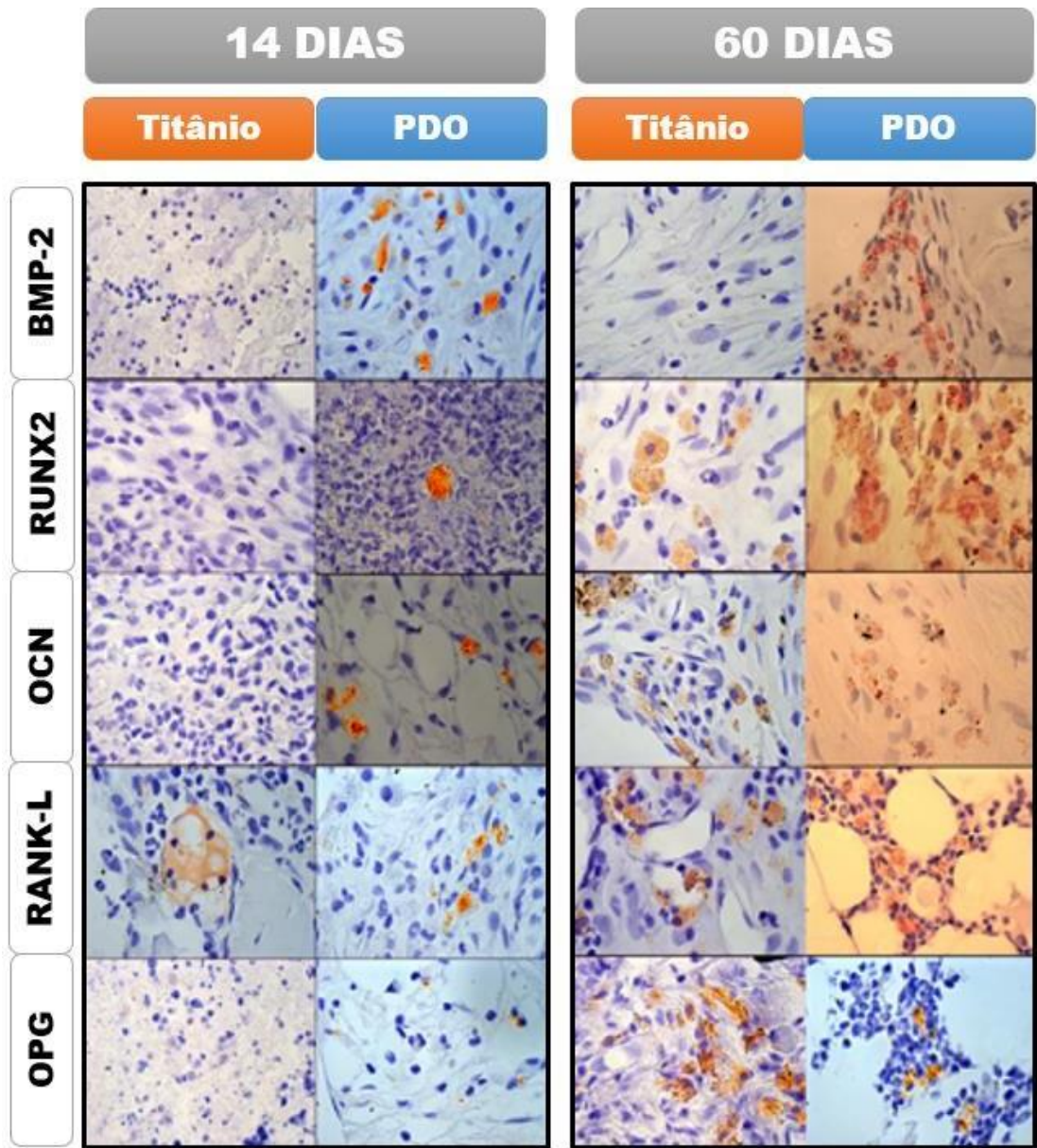
Para essa fotomicrografia utilizou-se objetiva de 100x. Temos que A: Grupo Titânio 14 dias; B: Grupo PDO 14 dias; C: Grupo Titânio 60 dias; D: Grupo PDO

60dias. Observa-se que aos 14 dias, a imagem representativa do Grupo PDO apresenta o dobro de vasos do que o Grupo Titânio.

5.3.3 Análise imuno-histoquímica

Através da análise imuno-histoquímica e da avaliação das proteínas bmp-2, RUNX2, osteocalcina (OCN), RANK-L e osteoprotegerina (OPG), na imagem representativa, é capaz de se notar que, de um modo geral, houve resultados com maiores regiões de imunomarcação para os anticorpos relacionados à osteogênese para o grupo PDO, quando comparado ao grupo titânio (Figura 19).

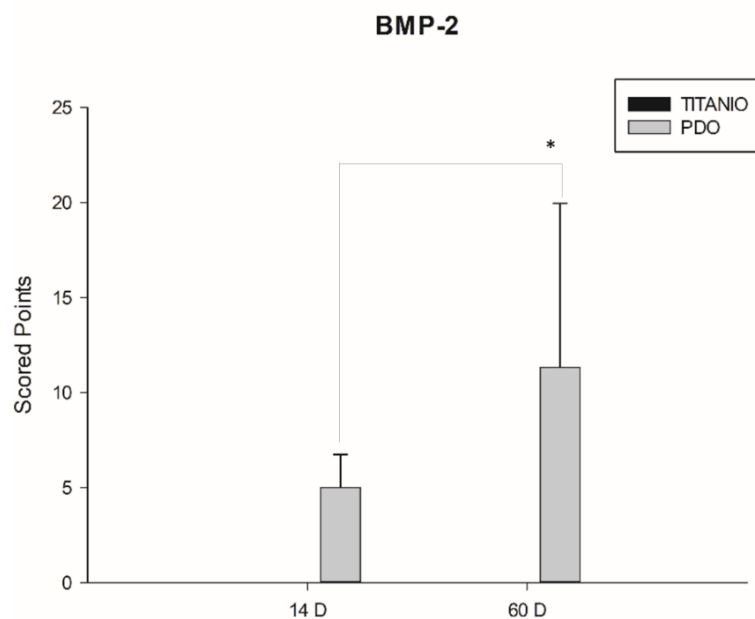
Figura 19 – Imagens representativas das marcações pela imuno-histoquímica, demonstrando o padrão de marcação para os grupos experimentais, em 14 e 60 dias.



As imunomarcações são representadas pela coloração amarronzadas nas células e tecidos.

No que diz respeito a proteína BMP-2, observou-se que não houve marcação para os grupos titânio, enquanto que para PDO (PDO 14D: $5 \pm 1,732051$) (PDO 60D: $11,33333 \pm 8,621678$) houve marcação, com diferença estatisticamente significativa aos 60 dias ($p=0,014$) (Figura 20).

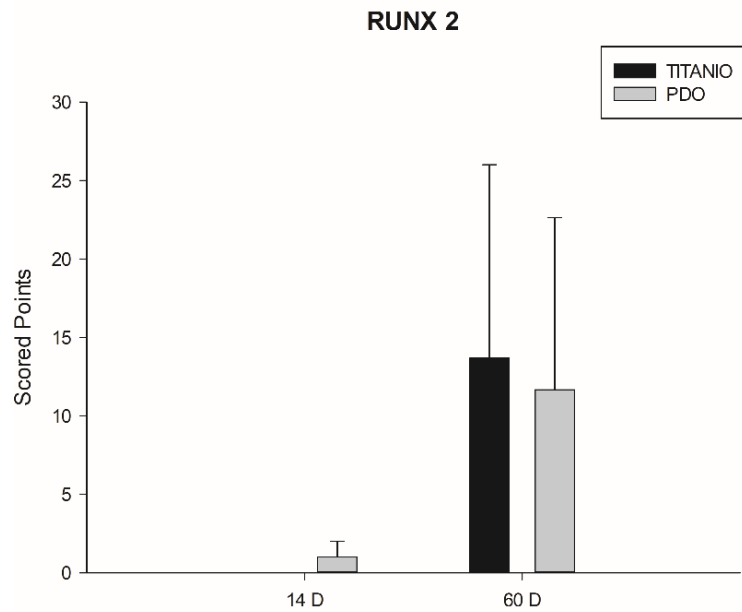
Figura 20 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para BMP-2, em células e matriz extracelular.



Fonte: Autora, 2024

Já para RUNX2 houve uma marcação maior para PDO (PDO 14D: 1 ± 1), em relação ao titânio no qual não apresentou marcação no período de 14 dias, dessa forma esse quadro se inverte no período de 60 dias, com maior marcação para o grupo titânio (Ti 60D: $13,66667 \pm 12,34234$) em comparação ao PDO (PDO 60D: $11,66667 \pm 10,96966$), sem diferença estatística ($p>0,05$) (Figura 21).

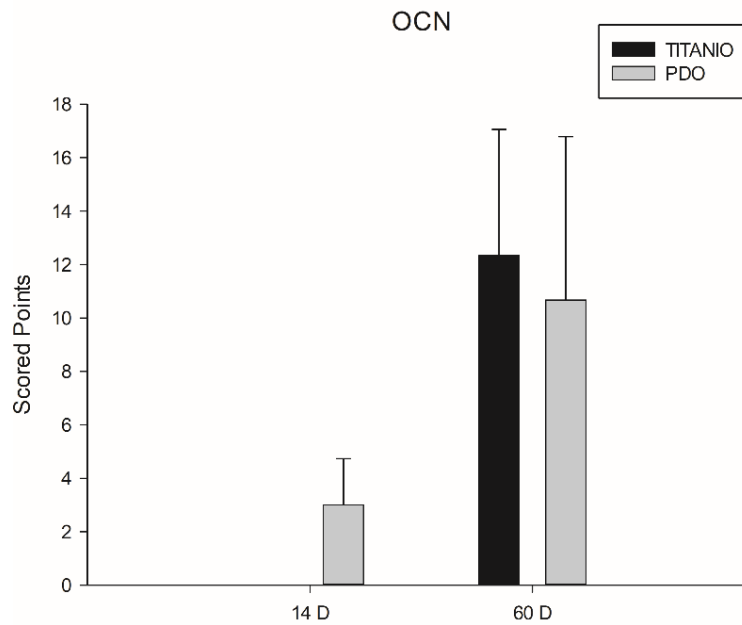
Figura 21 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcção para RUNX2, em células e matriz extracelular.



Fonte: Autora, 2024

Já a OCN, aos 14 dias não mostra marcação para o grupo titânio, enquanto que para a PDO houve (PDO 14D: $3 \pm 1,732051$), mas, aos 60 dias ocorreu uma marcação maior para o grupo Titânio (Ti 60D: $12,33333 \pm 4,725816$) do que para PDO (PDO 60D: $10,66667 \pm 6,110101$), mas sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (Figura 22).

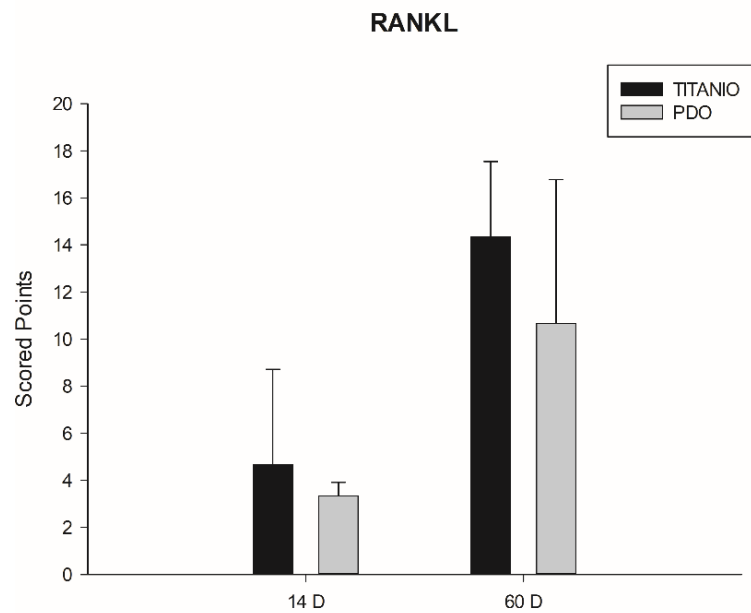
Figura 22 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para OCN em células e matriz extracelular.



Fonte: Autora, 2024

As marcações para RANK-L foram semelhantes entre os grupos titânio (Ti 14D: $4,666667 \pm 4,041452$) (Ti 60D: $14,333333 \pm 3,21455$) e PDO (PDO 14D: $3,333333 \pm 0,57735$) (PDO 60D: $10,66667 \pm 6,110101$), no entanto se observa uma tendência de maior marcação para o grupo titânio, sem diferença estatística. (Figura 23).

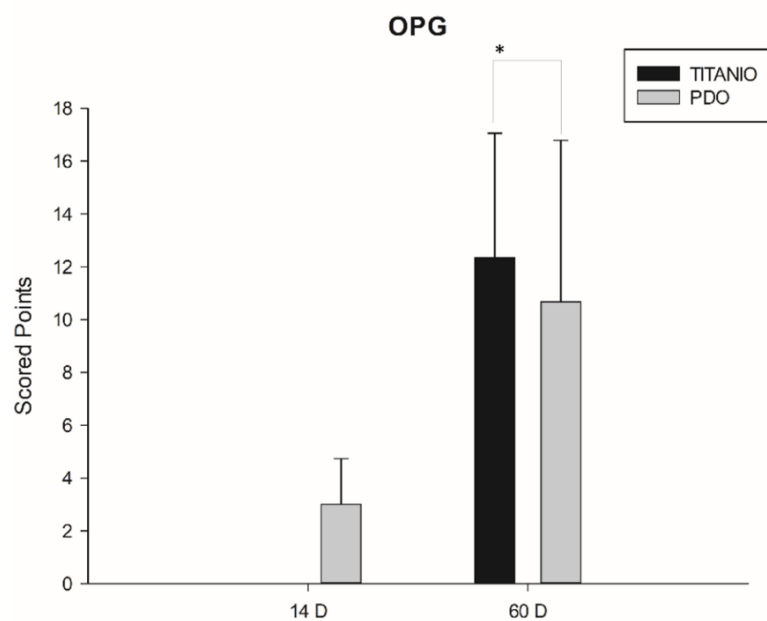
Figura 23 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para RANK-L, em células ósseas.



Fonte: Autora, 2024

Para OPG, não ocorreu nenhuma marcação para o grupo titânio aos 14 dias, no tempo de 60 dias (Ti 60D: $16,66667 \pm 0,57735$) (PDO 14D: 1 ± 1) houve marcação superior ao PDO (PDO 60D: $6,666667 \pm 3,785939$), também com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Figura 24).

Figura 24 - Representação gráfica dos valores medianos de imunomarcação para OPG em células ósseas.

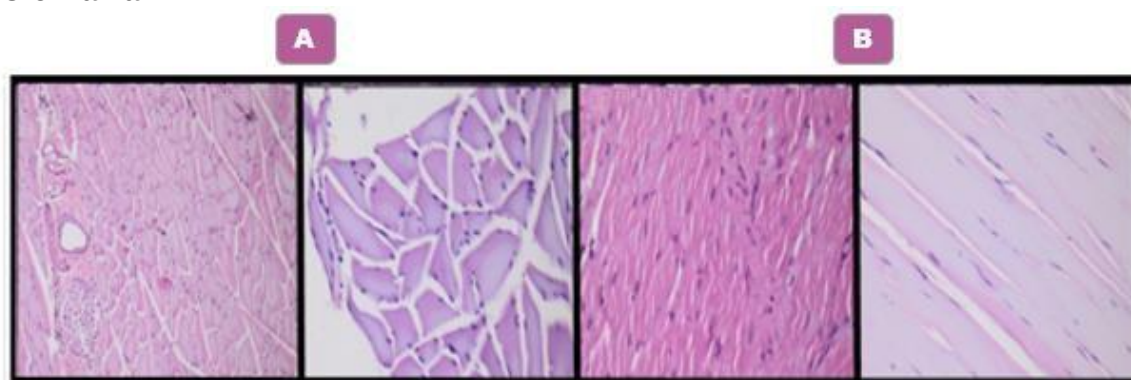


Fonte: Autora, 2024

5.4 Análise do tecido muscular

Através da análise qualitativa dos espécimes de órgãos de metabolização biopsiados, o tecido muscular adjacente a reconstrução femoral, foi analisada com o intuito de avaliar se houve transferência de íons advindos da malha de Titânio, ou presença acentuada de tecido inflamatório nos dois grupos e notou-se aspecto de normalidade de disposição e número de fibras musculares (Figura 25).

Figura 25 – Figura representativa do músculo de absorção e metabolização dos grupos PDO e Malha.



Fonte: Autora, 2024

Na figura, pode-se observar fotomicrografias, em aumento de 40x, referentes, respectivamente, dos músculos de absorção e metabolização correspondente aos grupos PDO (A) e Malha (B).

5.5 Análise subcutânea

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

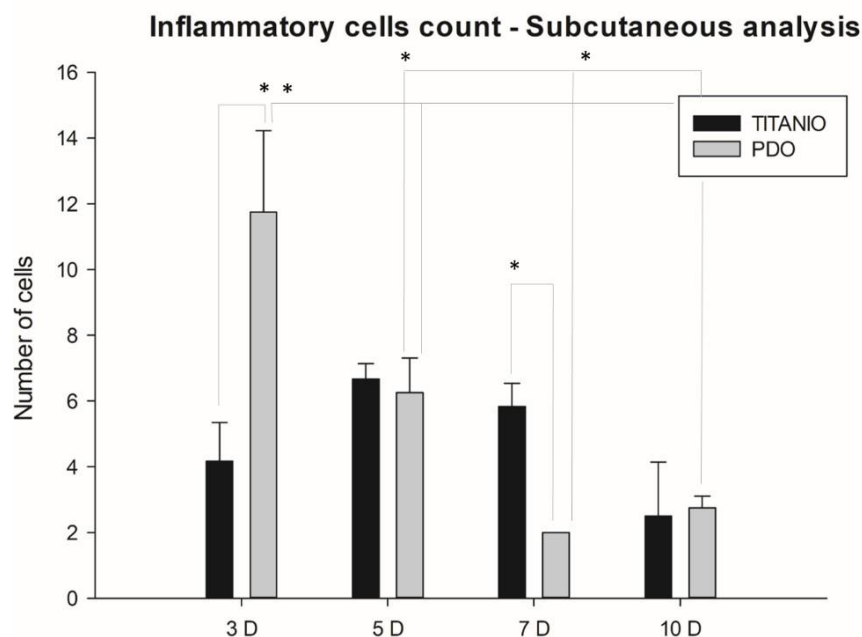
Aos 5 e 7 dias, o grupo Titânio (Ti 5D: $6,665 \pm 0,473762$) (Ti 7D: $5,83 \pm 0,707107$) apresentou maior infiltrado inflamatório quando comparado ao PDO para os respectivos tempos, obtendo diferença estatisticamente significativa apenas aos 7

dias ($p = 0,015$). Além disso, observou-se valores expressivos para o grupo PDO aos 5 dias quando comparados ao mesmo grupo, nos tempos de 7 ($p = 0,026$) e 10 dias ($p = 0,044$) com diferença estatística para ambos. Observa-se, também, uma redução significativa de células inflamatórias a medida que o tempo de análise aumenta, para ambos grupos.

Por fim, aos 10 dias observa-se uma inversão do perfil inflamatório, mostrando a presença mais expressiva de células inflamatórias no grupo PDO em relação ao grupo Titânio (Ti 10D: $2,495 \pm 1,647559$) (Figura 26)

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

Figura 26 – Representação gráfica da média do número de células inflamatórias no tecido subcutâneo no tempo de 3, 5, 7 e 10 dias.

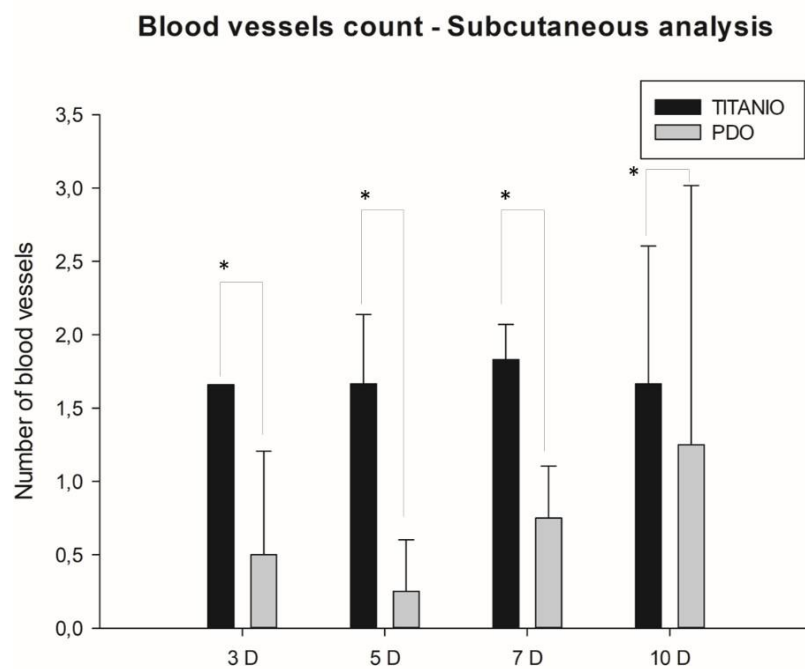


Fonte: Autora, 2024

Para análise quantitativa da biocompatibilidade também foi observado o número de vasos sanguíneos. Dessa maneira, o grupo titânio obteve números mais

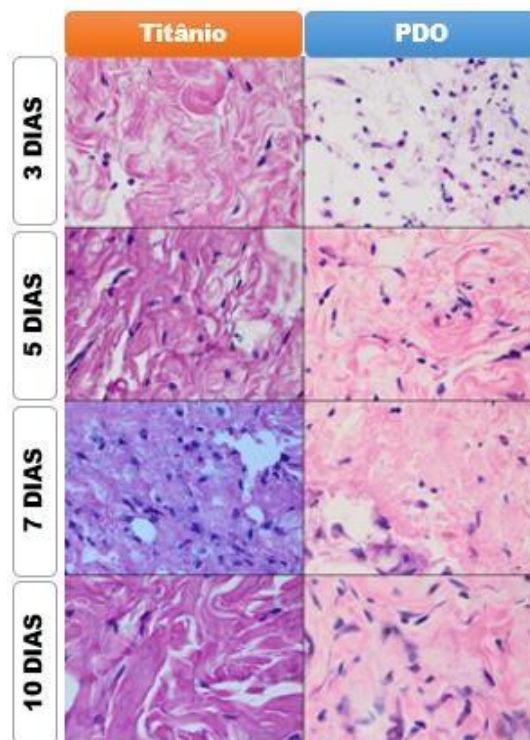
expressivos quando comparado ao grupo PDO em todos os tempos, obtendo diferença estatisticamente significativa para todos eles. (Ti 3D: $1,66 \pm 0$) (PDO 3D: $0,5 \pm 0,707107$) ($p= 0,033$); (Ti 5D: $1,665 \pm 0,473762$) (PDO 5D: $0,25 \pm 0,353553$) ($p= 0,033$); (Ti 7D: $1,83 \pm 0,240416$) (PDO 7D: $0,75 \pm 0,353553$) ($p= 0,033$); (Ti 10D: $1,665 \pm 0,940452$) (PDO 10D: $1,25 \pm 1,767767$) ($p= 0,033$).

Figura 27 – Representação gráfica da média do número de vasos sanguíneos no tecido subcutâneo no tempo de 3, 5, 7 e 10 dias.



Fonte: Autora, 2024

Figura 28 – Figura representativa dos espécimes de tecido subcutâneo demonstrando a biocompatibilidade dos materiais testados aos 3, 5, 7 e 10 dias.



Fonte: Autora, 2024

Nas imagens, temos em um aumento de 100x onde é possível observar infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos.

6 DISCUSSÃO

O objetivo dessa pesquisa, foi avaliar o potencial bioativo de “scaffolds” de polidioxanona (PDO) associado a rhBMP-2, nas reconstruções ósseas após e ressecção de fêmures em ratos. Notou-se que, o grupo PDO apresentou uma otimização no reparo ósseo, com formação e maturação tecidual adiantada em comparação ao grupo titânio, onde há a presença da proteína rhBMP-2 associada a uma malha de titânio convencional. Dessa forma, a hipótese nula apresentada pelo estudo foi rejeitada.

É importante ressaltar que, as grandes ressecções ósseas são de difícil resolução, além de ser consideradas problemáticas, tanto na ortopedia, quanto na cirurgia plástica, e na cirurgia bucomaxilofacial, visto que as grandes perdas ósseas geralmente estão correlacionadas ao comprometimento de funções essenciais à qualidade de vida do indivíduo⁴⁵. Nessa conjuntura, as perdas ósseas em áreas de

maxila e mandíbula, que ocorrem por diferentes causas, gerando ao paciente dificuldades principalmente relacionadas a fonação e a mastigação, ocasionando a busca por tratamentos seguros e eficazes com um propósito de reabilitar a função e estética e garantir que ocorram melhores condições funcionais e psicológicas⁴⁶.

Nos dias atuais, a procura por materiais e terapêuticas que mostram capacidade osteoindutiva é exponencial, com o objetivo de reduzir as morbidades associadas a cirurgia, acelerar o período de recuperação do paciente, diminuindo o tempo de internação, reduzir os riscos de complicações e ter resultados mais satisfatórios^{47,48}. Por isso, a proteína rhBMP-2, tem sido grande objeto de pesquisa, uma vez que apresenta características osteoindutivas, ajudando a regeneração óssea através da ativação de mitoses, quimiotaxia, diferenciação de linhagens de células mesenquimais além de possuir propriedades imunoreguladoras^{49,50}.

Sua formula é líquida e sua meia vida na corrente sanguínea é de apenas alguns minutos⁵¹ com isso, deve ser administrada junto de outro material no qual é responsável pela sua absorção. Por isso, a esponja de colágeno é muito utilizada uma vez que possui formato similar a um favo de mel, favorecendo a incorporação de até 90% da proteína, sendo liberada lentamente, e concluída no 10º dia, bem como a estabilização do coágulo e migração de células progenitoras para seu interior¹⁶. Mas, sua desvantagem é a falta de rigidez estrutural suficiente para manutenção tridimensional dos materiais utilizados na reconstrução, levando ao colapamento de tecidos moles e conseqüentemente prejuízos no ganho de altura óssea²⁰.

Dentro desse contexto, a malha de titânio vem sendo muito utilizada como arcabouço, com a finalidade de estabilização dos materiais reconstrotores e para atuar como guia para a neoformação óssea. Há na literatura, vários relatos da associação de rhBMP-2, com aloenxertos e malha de titânio⁴⁹ mas, além de não possuir propriedades que favoreçam a liberação lenta da rhBMP-2, a principal complicação decorrente dessa associação é a deiscência de sutura, ocasionando casos de infecção e conseqüente insucesso, além da demanda de um segundo estágio cirúrgico para retirar o material, pois não é reabsorvível. E também, são responsáveis pela liberação de resíduos metálicos e oferecem fraca adesão de sua superfície ao tecido adjacente²¹. As complicações foram evidenciadas nesta pesquisa, por meio da análise clínica, onde foi possível notar recorrentes casos de deiscência de sutura no grupo titânio, seguido de quadros de infecção, com formação de abscessos. A análise

do perfil inflamatório corrobora com esse dado, uma vez que se notou um expressivo número de células inflamatórias aos 14 e 60 dias, quando comparado ao grupo PDO.

Com o propósito de suprir essas deficiências sugere-se a PDO, seja capaz de aumentar a adsorção da proteína e aumentar sua meia vida, devido as suas características hidrofílicas e o maior peso molecular atingido por meio da técnica de eletrospinning. Além do mais, o controle dos poros obtidos através desta técnica torna possível controlar a distribuição dos filamentos do polímero, tornando sua superfície similar a matriz extracelular, com característica de semi-permeabilidade, atuando como barreira seletiva para a migração de células do tecido mole em direção ao defeito³⁰. O eletrospinning torna possível controlar a espessura desejada, garantindo a estabilização da arquitetura macroscópica da reconstrução, evitando colapso de tecidos moles, além de ser um material reabsorvível, concluindo sua hidrólise em aproximadamente seis meses, tempo esperado para a consolidação de defeitos ósseos²⁷. Também, esta degradação não gera produtos tóxicos, sendo os metabólitos excretados pelo trato respiratório e intestinal²⁶.

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

Em relação a parte clínica, foi possível notar que a PDO cumpre a proposta de realizar a manutenção tridimensional do defeito e guiar a formação óssea, como foi visto nos espécimes de fêmur coletados posteriormente a eutanásia, no qual o grupo PDO demonstrou calo ósseo bem delimitado. Soma-se ao potencial de acelerar o reparo ósseo, o qual foi claro nesse estudo, que já aos 14 dias de pós-operatório notou-se, que na parte histológica houve a formação de tecido ósseo para os dois grupos experimentais e com uma maturação avançada para o grupo PDO, observada por meio da característica da diminuição do número de células inflamatórias, aumento da deposição de matriz e melhor organização tecidual^{54,55}. Já a avaliação quantitativa

do osso, demonstrou uma maior neoformação para o grupo PDO, em ambos os períodos experimentais e com diferença estatisticamente significativa no período de 60 dias.

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

Sobre o perfil inflamatório, com destaque na contagem de linfócitos e verificação do número de vasos sanguíneos, notou-se que para o grupo titânio, houve maior número de linfócitos nos dois períodos. Embora a inflamação seja parte do processo de reparo ósseo, quando existe a presença de infiltrado inflamatório aumentado. Consequentemente, haverá a formação de um tecido reparacional desorganizado fazendo com que ocorra um atraso na cicatrização, como foi notado também na análise histológica para avaliação de maturação do tecido ósseo. Existe também, estudos que apontam que a rhBMP-2 atua de forma imunomodulatória, controlando a resposta inflamatória inicial. Com isso pode-se observar que o aumento da meia vida da rhBMP-2 proporcionado pelo PDO repercutindo de forma positiva no processo inflamatório e consequentemente na otimização do reparo^{3,49}.

Mesmo o titânio sendo um material biocompatível, a liberação de íons metálicos pode estar associada a um efeito de citotoxicidade, o que pode ser a causa desta diferença entre os grupos^{56,57}. E alguns estudos já mostraram que a PDO apresenta um tecido reativo pequeno, sem grandes infiltrados inflamatórios e sem reação de corpo estranho, tanto para períodos de 14 quanto para 60 dias^{58,59}.

Gollapudi *et al* (2014) observaram que além de ter uma resposta inflamatória mínima, sem perturbar a função fagocítica de monócitos e neutrófilos, secreção de citocinas

por monócitos e linfócitos e também as funções das células citotóxicas, pressupõe que a PDO tenha um efeito anti-inflamatório, por conta de um aumento na interleucina 10 no longo prazo, no qual corresponde a uma interleucina anti-inflamatória por inibir a síntese de citocinas inflamatórias.

Em relação ao número de vasos sanguíneos, notou-se valores mais significantes para o grupo PDO aos 14 dias e para Titânio aos 60 dias. A literatura demonstra que a rhBMP-2 é responsável pela liberação de angiopoietina e fator de crescimento fibroblástico nas primeiras 2 horas, caindo consideravelmente após 8 horas, além do aumento da expressão de VEGF após 24 horas, criando um ambiente favorável a angiogênese, aumentando o número de capilares no defeito ósseo, mostrando um reparo adiantado em relação ao grupo titânio, que somente expressou maior angiogênese aos 60 dias. Com isso é notado que a PDO atenda as expectativas de aumentar o tempo de liberação da rhBMP-2¹.

Os resultados da imunoistoquímica corroboram com o perfil inflamatório, visto que as proteínas associadas a atividade osteoclástica, a OPG e RANKL se apresentaram mais expressas no grupo Titânio. A atividade inflamatória causa uma resposta imunológica, com liberação de fatores pró-osteoclastogênicos, incluindo RANKL^{61,62}. Dessa forma, acontece uma reabsorção óssea maior do que o que ocorre em um turnover ósseo normal, o que corresponde com os resultados de menor área de formação óssea notado no Grupo Titânio. Com a ocorrência de uma reabsorção intensa, tem-se um aumento na liberação de OPG, como o que ocorreu aos 60 dias de pós-operatório, no qual a imunomarcação de OPG teve uma diferença estatística significativa em comparação ao grupo PDO.

Já em relação aos resultados de imunomarcação da proteína BMP-2, o que se nota é que para o Grupo Titânio, a BMP-2 empregado na área de defeito carregada pela esponja de colágeno, mostrou uma liberação rápida, com efeito concentrado nos períodos iniciais do reparo ósseo. Consta-se que, as perfurações presentes na malha de titânio acabam ajudando este escoamento da proteína do local de interesse, o que difere bastante do "Scaffold" de PDO, no qual não possui furos, e apresenta uma estrutura tridimensional que propicia a adesão de proteínas como a BMP-2, que permaneceu no defeito por um tempo maior e foi um fator importante para os resultados satisfatórios associados ao grupo PDO³⁰.

Em relação a proteína de Runx2, que está relacionada com a regulação de proteínas importantes para a diferenciação de células da linhagem osteogênica^{63,64}, foi levemente maior para PDO nos primeiros 14 dias, no entanto, aos 60 dias o Grupo Titânio reverteu esse quadro, o que associado aos resultados de expressão de BMP-2 e a formação de tecido ósseo, levou a uma hipótese de atraso no reparo para este grupo, que diferente de PDO ainda tem formação óssea em andamento. Igualmente acontece com a OCN, proteína que aparece na fase final do reparo ósseo e que está associada à mineralização deste tecido. Como notado nas imagens representativas de PDO, aos 60 dias já se tem uma maturação e mineralização importante do ósseo, levando-se a acreditar que aos 60 dias, o grupo titânio ainda está em fases intermediárias e finais do reparo, enquanto para PDO boa parte da mineralização do tecido ósseo neoformado já foi concluída⁶⁵.

Ademais, a análise de observação do comportamento biológico dos materiais testados mostrou, que por meio da observação anatomopatológica que nenhum dos materiais isoladamente, sem combinação com outro material osteoindutor, é capaz de induzir a formação de tecidos metaplásicos, de causar deposição de partículas em órgãos de metabolização e tecidos adjacentes ou de produzir quaisquer resíduos com repercussão sistêmica.

Em relação a análise de biocompatibilidade, nota-se que nos dois grupos testados, apresentaram pouquíssimo escore de inflamação em tecido subcutâneo, tendo um maior número de células inflamatórias para o grupo PDO, principalmente no dia 3, diminuindo aos poucos para os demais períodos, devido ao início da hidrólise da cadeia polimérica, enquanto que o grupo titânio demonstrou números parecidos para cada um dos períodos analisados, visto que configura um material não reabsorvível.

Já no reparo ósseo, notou-se um comportamento invertido, de maneira que a PDO aumenta a disponibilidade deste que possui propriedades anti-inflamatórias, diminuindo o processo inflamatório associado a esse material. O mesmo comportamento invertido é notado em relação ao número de vasos sanguíneos, conta a mesma propriedade da associação da PDO ao rhBMP-2.

As limitações dessa pesquisa consistem na eleição de uma única espessura do scaffold de polidioxanona, bem como uma única concentração da

rhBMP-2, apesar disso, os resultados apresentados nessa pesquisa mostram que a associação do “Scaffold” de PDO com rhBMP-2 em defeitos críticos em fêmur de ratos, gerou um padrão reparacional bastante favorável quando comparado a reconstrução com malha de titânio e rhBMP-2, no qual pode ser notado maior formação e maturação do osso, e menor inflamação do tecido e uma expressão positiva de proteínas relacionadas a formação e ao turnover do tecido ósseo.

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

7 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

- 36 - de Souza Balbinot G, Leitune VCB, Ponzoni D, Collares FM. Bone healing with niobium-containing bioactive glass composition in rat femur model: A micro-CT study. *Dental Materials*. 2019;35(10):1490-7.
- 37 - Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Giardino R. Characterization of bone defect repair in young and aged rat femur induced by xenogenic demineralized bone matrix. *Journal of periodontology*. 2002;73(9):1003-9.
- 38 - Muramatsu K, Oba K, Mukai D, Hasegawa K, Masuda S, Yoshihara Y. Subacute systemic toxicity assessment of β -tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite implanted in rat femur. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007;18(3):513-22.
- 39 - Meira PS. Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo ósseo em tíbias osteotomizadas de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) frente à ausência de carga e tratamento com ultrassom. 2009.
- 40 - Oliveira MT. Programa computacional ODR-ATA para densitometria óssea baseado na densitometria radiográfica. 2014.
- 41 - Benetti F, Briso A, de Araújo Lopes J, Carminatti M, Conti L, Gallinari M, et al. In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45-cells in the pulp of bleached teeth. *International endodontic journal*. 2019;52(12):1723-37.
- 42 - Cintra LTA, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto RdC, et al. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. *Journal of Applied Oral Science*. 2016;24(1):95-104.
- 43 - Legeros RZ, Craig RG. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1993;8(S2):S583-S96.
- 44 - Cintra LTA, Ribeiro TAA, Gomes-Filho JE, Bernabé PFE, Watanabe S, Facundo ACdS, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. *Dental traumatology*. 2013;29(2):145-50.
- 45 - Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z, Watson JT. Critical-size bone defects: is there a consensus for diagnosis and treatment? *Journal of orthopaedic trauma*. 2018;32:S7-S11.
- 46 - Batstone M. Reconstruction of major defects of the jaws. *Australian dental journal*. 2018;63:S108-S13.
- 47 - Zhang Q, Wu W, Qian C, Xiao W, Zhu H, Guo J, et al. Advanced biomaterials for repairing and reconstruction of mandibular defects. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;103:109858.
- 48 - Zhang M, Matinlinna JP, Tsoi JK, Liu W, Cui X, Lu WW, et al. Recent developments in biomaterials for long-bone segmental defect reconstruction: A narrative overview. *Journal of Orthopaedic Translation*. 2020;22:26-33.

- 49 - Cohen A, Polak D, Nir-Paz R, Westreich N, Casap N. Indirect Bactericidal Properties of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 In Vitro. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2019;77(8):1611-6.
- 50 - Esmail N, Buser Z, Cohen JR, Brodke DS, Meisel H-J, Park J-B, et al. Postoperative complications associated with rhBMP2 use in posterior/posterolateral lumbar fusion. *Global spine journal*. 2018;8(2):142-8.
- 51 - Cicciù M, Herford A, Stoffella E, Cervino G, Cicciù D. Protein-signaled guided bone regeneration using titanium mesh and Rh-BMP2 in oral surgery: a case report involving left mandibular reconstruction after tumor resection. *The open dentistry journal*. 2012;6:51.
- 52 - Trento G, Carvalho P, Macedo D, Gabrielli M, Monnazzi M, Pereira-Filho V. Titanium mesh associated with rhBMP-2 in alveolar ridge reconstruction. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2019;48(4):546-53.
- 53 - Kim TH, Oh SH, Chun SY, Lee JH. Bone morphogenetic proteins-immobilized polydioxanone porous particles as an artificial bone graft. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(5):1264-74.
- 54 - Fisher M, Yee K, Alba B, Tanna N, Bastidas N, Bradley JP. Applications of bone morphogenetic protein-2: alternative therapies in craniofacial reconstruction. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2019;30(7):1952-9.
- 55 - Zeng J-H, Qiu P, Xiong L, Liu S-W, Ding L-H, Xiong S-L, et al. Bone repair scaffold coated with bone morphogenetic protein-2 for bone regeneration in murine calvarial defect model: systematic review and quality evaluation. *The International journal of artificial organs*. 2019;42(7):325-37.
- 56 - Avashia YJ, Sastry A, Fan KL, Mir HS, Thaller SR. Materials used for reconstruction after orbital floor fracture. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2012;23(7):S49-S55.
- 57 - Gepreel MA-H, Niinomi M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2013;20:407-15.
- 58 - Boenisch M, Mink A. Clinical and histological results of septoplasty with a resorbable implant. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2000;126(11):1373-7.
- 59 - Boenisch M, Tamás H, Nolst Trenité GJ. Influence of polydioxanone foil on growing septal cartilage after surgery in an animal model: new aspects of cartilage healing and regeneration (preliminary results). *Archives of facial plastic surgery*. 2003;5(4):316-9.
- 60 - Gollapudi S, So CS, Formica M, Agrawal S, Agrawal A. Safety and efficacy of polydioxanone nano-fibers as anti-inflammatory agents. *J Nanomedine Biotherapeutic Discov*. 2014;4(2):1000127.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

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

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Março de 2022.

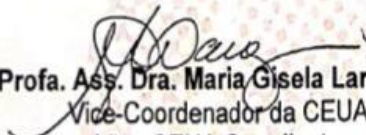
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Abril de 2022.

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 01, 2022.

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


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

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